

「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創製」
平成 20 年度採択研究代表者

宮原 裕二

(独) 物質・材料研究機構 生体材料センター センター長

機能化ナノ構造ゲートバイオトランジスタの創製

1. 研究実施の概要

本研究では電界効果トランジスタを基盤として生体の構成要素である DNA、糖鎖、脂質、及び細胞を主な解析対象とし、それぞれに対応してゲート表面に自己組織化ナノ構造及び材料を構築して、高精度・高感度バイオトランジスタを創製することを目的としている。平成 20 年度は高分子を用いたナノ構造ゲートを構築して遺伝子解析用バイオトランジスタを製作した結果、蛋白質の非特異吸着を抑え高感度に DNA を検出できることを確認した。また、フェニルボロン酸の自己組織化膜を延長ゲート金電極上に形成し、細胞膜表面の糖鎖末端のシアル酸に応答するバイオトランジスタを開発した。この糖鎖認識トランジスタを用いて赤血球表面のシアル酸を特異的にかつ非侵襲で検出できることを確認した。さらに動物実験により正常細胞とがん細胞表面のシアル酸密度の違いを識別でき、転移の程度を表す指標になり得ることを明らかにした。細胞トランジスタにおいては、ゲート絶縁膜上にクラウンエーテルの単分子膜を形成して、カリウムイオン応答トランジスタを製作した。そのゲート上で Hela 細胞の培養を行い、Trail 試薬によりアポトーシスを誘導させ、その際細胞から放出されるカリウムイオンの検出を試みた。トランジスタのカリウムイオン応答は十分な感度が得られていないが、アポトーシスに伴うカリウムイオンの放出を直接検出できることがわかった。また、細胞の高次機能を検出する基盤として、細胞スフェロイドをトランジスタゲート部に作製するための手法を検討した。細胞非接着性マトリックスをゲート材料表面にマイクロパターンニングし、スフェロイドが形成可能なことを確認した。細胞膜/固体界面の最も簡単なモデルとして平面脂質二重膜を用い、ゲート絶縁膜との界面の電気化学的特性の評価をおこなった。様々な脂質から構成される平面脂質二重膜を調製し、脂質膜の電荷密度とゲートの表面電位との関係、塩濃度による遮蔽効果などを明らかにした。本研究では生体分子・細胞／機能性分子／半導体材料・デバイスからなる異分野の融合研究を深め、さまざまな新しい機能を有するバイオトランジスタを創出して、医療、ライフサイエンス分野の進展に貢献する。

2. 研究実施内容

(1) バイオトランジスタによる遺伝子解析

遺伝子配列の読み取り塩基長の向上および DNA の高感度検出を目的とし、ゲート表面にナノピラー構造、ビーズ配列、高分子膜などのナノ構造を形成した。このうち poly(MPC-co-3-methacryloxypropyltriethoxysilane (PMSi)を 30nm の厚さにゲート上に形成したバイオトランジスタは牛血清アルブミン、DNA ポリメラーゼなどの蛋白質の非特異吸着を抑え、S/N の高い測定が可能であることを確認した。

バイオトランジスタ評価システムとしてゲート表面電位の時間変化を計測しうる装置とソフトウェアの開発を行った。装置の概観を図 1 に示す。評価システムは 4 チャンネルの同時測定が可能であり、マニュアルおよび計算機による動作制御が可能である。



図 1 バイオトランジスタ評価装置

(2) 糖鎖認識バイオトランジスタ

フェニルボロン酸化合物の構造を制御し、これを自己組織化単分子膜 (SAM) とすることで、細胞糖鎖シアル酸を特異的に検出する電界効果トランジスタを開発した。シアル酸は細胞膜の糖鎖末端に多く存在し、その密度・分布変化は癌(および転移)や糖尿病等の疾患と密接に関わることから、これらを定量することで、簡便・安価、非標識かつ非侵襲な細胞診断技術への発展が見込まれる。電界効果トランジスタの延長ゲートとなる金電極表面にアルカンチオール分子を用いて自己組織化膜を形成し、アルカンチオール分子の末端にフェニルボロン酸化合物を修飾した。

フェニルボロン酸化合物は生理学的条件下でシアル酸と特異的な親和性を示すため、シアル酸の負電荷を金ゲート電極で検出可能と考えられる。単糖類に対する選択性を確認した後、赤血球を直接上記ゲート表面に導入した結果、図 2 に示すように赤血球数に依存してゲート表面電位が増加し、定量的かつ非侵襲で細胞表面のシアル酸密度を検出可能であることがわかった。酵素処理により細胞膜表面のシアル酸を約 80% 除去すると電位応答が小さくなることから、上記応答はシアル酸特異的であることを確認した。

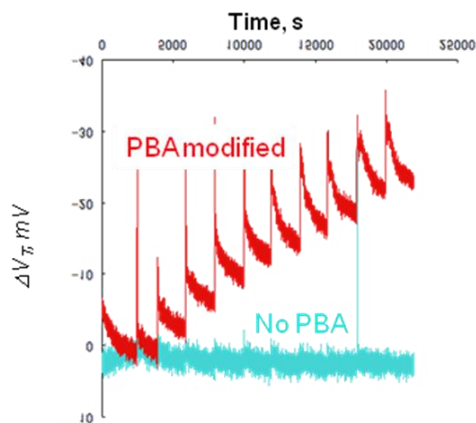


図 2 赤血球表面シアル酸に対する応答

さらにがん細胞の動物転移モデルを用いて、肺に転移した組織から採取したがん細胞のシアル酸密度を定量した結果、正常細胞に比べてがん細胞のシアル酸密度は高くなっており、両者を識別できることがわかった。また、転移の程度に依存して表面電位応答が増加し、転移の程度を表す指標になり得ることを明らかにした。

(3) 細胞トランジスタ

複雑な細胞機能を非標識・非侵襲・リアルタイムで計測するために、細胞/ゲート絶縁膜間に

細胞シグナルを検出可能にする新たな環境を創出する研究を進めている。平成 20 年度はバイオトランジスタによるプログラム細胞死(アポトーシス)の初期段階での検出の可能性を検討した。アポトーシスは細胞の自己除去システムであり、この現象はガン細胞除去や発生、変態などの重要な生物学的意義と深い関わりを持つ。特に近年は、アポトーシスがアルツハイマーを始めとする疾患にも関係することが示唆され、そのメカニズムの解明がますます重要になってきている。バイオトランジスタによるアポトーシス検出法が確立できれば、従来の検出法にはない非侵襲で高速な測定が可能となり、創薬や医学研究において新たな可能性が広がると考えられる。カリウムイオンを選択的に捕獲するクラウンエーテルをシランカップリング反応によりゲート上に固定化したバイオトランジスタを作製し、その表面で Hela 細胞を $2\sim 3 \times 10^5$ cells/ml 播種し、24 時間培養した。ゲート上で Hela 細胞が 100%コンフルエントに達したのち、アポトーシス誘導剤 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を Hela 細胞に導入し、アポトーシスに基づく細胞トランジスタの応答について調べた。その結果、TRAIL を導入していない細胞トランジスタとの差動測定により得られた電位は増加することがわかった。これは、アポトーシス初期の K^+ イオンチャネルより放出される K^+ イオンの流出が細胞膜/ゲート絶縁膜界面に構築したクラウンエーテル膜により選択的に検出されたものであると考えられる。今後はアポトーシスに特徴的な細胞膜の変化をより高精度に検出する細胞トランジスタの研究を進める。

一方、細胞アレイあるいはスフェロイドアレイのためのゲート表面材料設計の検討を行った。金蒸着基板表面に、末端にメルカプト基を有する PEG を反応させることにより PEG ブラシを構築した。パターン状のメタルマスクを介しプラズマ処理することにより、パターン化 PEG 基板を作製した。スフェロイド作製のため、細胞はフィーダーレイヤーとして、ヒト正常血管内皮細胞 (HUVEC) を播種し、1 日後、ウシ関節軟骨細胞 (Chondrocytes) を播種し、経時的変化を顕微鏡観察した。

その結果、非特異的タンパク吸着が最小であった表面で、最も高度にかつ長期にわたり、スフェロイド形態を制御することに成功した(図3)。さらに、hole パターン間の距離の影響についても検討を行ない、距離 $l=100 \mu m$ のとき、内皮細胞はパターンを形成するが、その後に播種した軟骨細胞は培養一日後においてスフェロイドを形成せず、シートを形成した。これは、PEG 密度の低い表面では細胞接着抑制力が十分でなく、効果的に軟骨細胞をパターン化された内皮細胞の上に凝集できなかったためと考えられる。

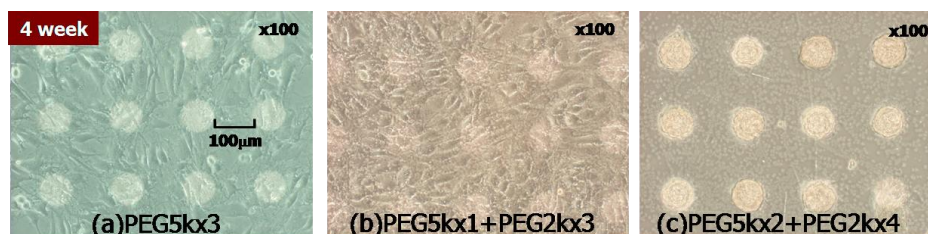


図3. PEG ブラシ表面密度、パターン間隔とスフェロイド挙動 ($l=100 \mu m$)

細胞膜/固体界面の最も簡単なモデルとして平面脂質二重膜を用い、ゲート絶縁膜との界面の電気化学的特性の評価をおこなった。様々な脂質から構成される平面脂質二重膜をゲート絶縁膜材料となる窒化シリコン表面にベシクルフュージョンにより形成し、脂質膜の電荷密度とゲートの表面電位との関係、塩濃度による遮蔽効果などを明らかにした。

3. 研究実施体制

(1)NIMS グループ

①研究分担グループ長： 宮原 裕二 ((独) 物質・材料研究機構、センター長)

②研究項目

1. バイオトランジスタデバイスと計測技術の研究
2. 電界効果デバイスによる脂質膜／ゲート界面の研究

(2)東大グループ

①研究分担グループ長： 坂田 利弥 (東京大学、講師)

②研究項目

1. バイオトランジスタによる細胞機能解析
2. 自己組織化膜を用いた糖鎖認識トランジスタの研究

(3)東京理科大グループ

①研究分担グループ長： 大塚 英典 (東京理科大学、准教授)

②研究項目

1. 細胞トランジスタの設計、作成、評価、研究統括
2. スフェロイドアレイの作成と評価
3. 糖鎖高分子の合成と評価

(4)日立グループ

①研究分担グループ長： 神原 秀記 ((株)日立製作所、フェロー)

②研究項目

1. 前処理を含めたバイオトランジスタの検証
2. 高感度化技術の開発
3. DNAシーケンシングおよび遺伝子発現解析