

宮原 裕二

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授
((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

本年度はバイオトランジスタ研究を下記の項目に分けて、機能性界面ゲートの構築、機能性分子の創製、及びバイオトランジスタの基本機能の検証を中心に検討を進めてきた。

(1) 機能性界面ゲートの構築

①タンパク質の非特異吸着抑制分子として Poly(ethylene glycol) (PEG)、②PEG ブラン固定化分子としてピリジン、③生体特異認識分子として糖鎖を用い、上記 3 ユニートをグラフト共重合により基板表面に構築した。ラクトース認識レクチン及びアシアロ糖タンパク質レセプターを有する肝細胞を用い、上記機能性表面との高い親和性を確認した。さらに、特異イオンを介在した糖鎖-タンパク質間結合についてFET計測が可能かどうかの原理的検証を行った。また、フェニルボロニン酸自己組織化膜を用いて細胞表面の糖鎖シアル酸検出用界面ゲートを構築した。

(2) 機能性分子の創製

DNA塩基配列解析の高精度化のため機能性核酸プローブの開発を進めている。本年度は高輝度ボロンジピロメテン誘導体蛍光色素にカルボキシル基を導入した分子の合成を行い、シャープなスペクトル高輝度の蛍光が得られることを確認した。一方、電荷付与型核酸プローブに関してはカルボキシル基、及びスルホン酸基を有する分子を設計し、安定な分子が合成される条件の最適化を行っている。また、界面活性剤を用いるプロセスを利用して基板上に生体膜を安定に保持させる手法を開発した。

(3) バイオトランジスタ機能検証

DNA、細胞、糖鎖及び蛋白質を検出・解析するバイオトランジスタの機能検証を行った。DNA 塩基配列解析の高精度・高スループット化に対応するために、高精度の電位計測方式を開発し、洗浄プロセスなしの高速検出手法の開発を進めている。細胞トランジスタでは細胞の呼吸活性を非侵襲で計測する方式を検討し、オートファジーのリアルタイム計測に成功した。また、細胞

表面シアル酸の直接検出によるがん転移解析、蛋白質への電荷タグ付与による高感度化など新しい測定手法を開発した。

§2. 研究実施体制

(1) 東京医科歯科大学グループ

- ① 研究分担グループ長: 宮原 裕二 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・DNA 解析用トランジスタの高性能化
 - ・フェニルボロン酸自己組織化膜ゲートトランジスタによる細胞表面糖鎖解析
 - ・蛋白質・ペプチド解析トランジスタのゲート界面創製

(2) NIMS グループ

- ① 研究分担グループ長: 片岡 知歩 (物質・材料研究機構 生体材料センター、研究員)
- ② 研究項目
 - ・生体膜及び遺伝子解析バイオトランジスタの創製

(3) 東大グループ

- ① 研究分担グループ長: 坂田利弥 (東京大学大学院工学系研究科、講師)
- ② 研究項目
 - ・半導体原理に基づく細胞機能の計測

(4) 東京理科大グループ

- ① 研究分担グループ長: 大塚英典 (東京理科大学理学部 第一部応用化学科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・細胞接着を促進させる機能性分子の基板への化学修飾
 - ・ボロン酸基含有ブロック共重合体表面の作成

(5) 日立グループ

- ① 研究分担グループ長: 神原秀記 (日立製作所、フェロー)
- ② 研究項目
 - ・バイオトランジスタ反応システムの構築および特性の検証
 - ・生体反応の FET チップ上での測定を企図した新規生体高分子固定化システムの構築
 - ・応用研究: 1細胞遺伝子発現解析

(6) 慶應グループ

① 研究分担グループ長:鈴木孝治(慶應義塾大学工学部、教授)

② 研究項目

- ・高輝度蛍光プローブ分子候補の設計・合成
- ・電荷付与型核酸プローブ分子候補の設計・合成

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) 機能性界面ゲートの構築(東京理科大グループ)

(1-1) 細胞接着を促進させる機能性分子の基板への化学修飾⁽³⁾

高分子ブラシを用いて接触界面の制御を達成するためには、生体内に存在するタンパク質非特異吸着を抑制することと、さらに第 2 の機能(特異的認識)を付与するために、目的とする生体分子に対して高い特異性を有する分子の固定化が必要である。特に、表面に対する特異認識能を有する分子の固定化密度を制御することで、接触界面を最適化することができる。本研究では高機能バイオインターフェイスの構築を達成するために、①タンパク質の非特異吸着抑制分子として Poly(ethylene glycol) (PEG)、②PEG ブラシ固定化分子としてピリジン、③生体特異認識分子として糖-タンパク質相互作用を利用できる糖鎖を選択した。高分子設計として、①、②、③の各機能を向上させるため、各分子が集積構造をとるグラフト共重合体を設計し、その形成する界面構造と機能について分析を行った⁽⁹⁾。

まず、アニオン重合で PEG を合成した後、末端修飾によって両末端に異なる官能基を有する Hetero-PEG(α -methacryloyl, ω -azide PEG)を合成した。この Hetero-PEG とピリジンを Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer(RAFT)の手法により精密重合し、制御された構造を有するグラフトポリマー(GP)を得た。アジドとアルキンのカップリング反応であるクリックケミストリーで $\alpha=1$ or 2 or 4 分岐ラクトースを GP 末端鎖に導入した(GP-L)。GP へのラクトース導入率(β)として表記する(GP-(α :分岐数)-L(β :導入率))。このように合成した GP-L について、ラクトース認識性レクチン(RCA₁₂₀)の相互作用を表面プラズモン共鳴により評価した。SPR 測定による GP-L と RCA₁₂₀ の相互作用はラクトース密度が増加するに従い、アフィニティーが増加し、さらに導入ラクトースが 2、4 分岐

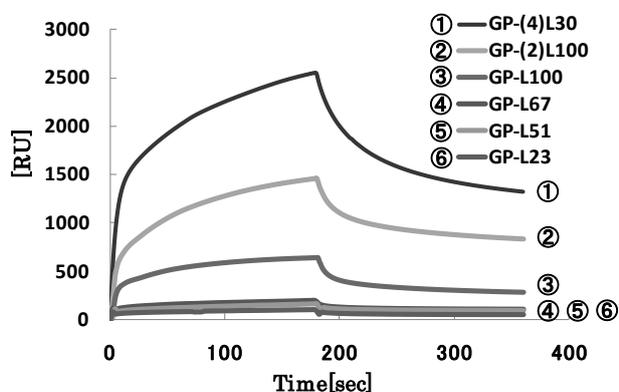


図1 レクチン/ラクトース相互作用測定

になるに従いアフィニティーが増加した(図1)。2分岐と4分岐の結果から、分岐の効果はアフィニティーに強く影響していることが示唆された。また、金ナノ粒子の凝集実験では、生体内擬似環境下では高い分散安定性を示し、RCA₁₂₀ 添加によってはじめてSPRと同様の凝集反応を示した⁽⁴⁾。つまり、ターゲット分子に対する高い生体特異性を有するナノ粒子であることが分った。次にラクトース認識性のアシアロ糖タンパク質レセプターを有する肝細胞に対する金ナノ粒子の取り込み実験を行ったところ、糖鎖の分岐効果が著しく影響し、分岐性が高いほど細胞への高い取り込みを達成することが可能であった。同様に、フェニルボロン酸を高分子鎖中に集積した表面を作成し、

シアル酸の認識挙動の特定を達成した。以上より、本研究によって生理活性機能の高い表面を形成することに成功した。その機能を界面の微視的構造との相関において理解し、さらに機能高度化へ向かう指針を確立できた。

(1-2) タンパク質結合を促進させる機能性分子の基板への化学修飾

本実験では生体分子認識に基づく電位変化を高精度に計測するために、トランジスタ部と反応部を分離した延長ゲート型トランジスタ構造とし、ゲート材料として金電極を用いて金とチオールとの親和性を利用して生体分子(マンノース)を固定化した。このマンノースとのCaイオンを介した特異的相互作用で起こるレクチン(ConA)の吸着特性を調べた。

金基板上にアジドドデカンチオールを用いて SAM 形成後クリック反応により機能性糖鎖であるマンノースブロックポリマーを固定化した。そこで作製されたマンノースと特異的相互作用すると知られている ConA(溶液)を添加し認識の際起こる電位変化を計測した。1mMHEPESBuffer 中に 1mMCaCl₂, 1mMMnCl₂ 添加後、電位変化が安定となった後、ConA を添加した。電位変化が正の方向に変化したことからマンノース-ConA 間の認識の際、Ca²⁺をキレートに介した結合が計測されたのではないかと考えられた。そこで、Ca²⁺を介してマンノース-ConA 間結合が生じているかを確認するため、金属イオンと錯体形成すると知られている EDTA, Ca²⁺を選択的にキレートできる EGTA を添加した結果、選択的な脱着と正電位のベースラインまでの回復が確認できた。

マンノース-ConA 間の認識結合を電位変化で測るためリアルタイムで計測可能な FET を用いて実験を行った。その結果、Ca イオンを介した糖鎖-タンパク質結合を電位変化によってモニタリングできることが明らかとなった。

(2) バイオトランジスタ機能の検証

(2-1) バイオトランジスタによる遺伝子解析

米国ライフテクノロジー社でバイオトランジスタ技術を用いた DNA シーケンサの実用化開発が進められている。この検出原理は本プロジェクトで進めている検出方式と異なるが、伸長反応後の洗浄は不要で高速測定が特徴であると考えられる。本プロジェクトで進めている検出方式をより高速・高感度測定に適合させるために、以下の研究に取り組んだ。

(2-1-1) バイオチップの評価および新規高速・高感度計測系の開発(日立グループ)

FETを用いたバイオセンサーをDNAなどの計測に活用することを目的として技術開発を進めている。通常、FETを用いた計測ではゲート電極にセンサープローブを固定してゲート電位の変化をドレイン電流の変化として捉え、それを一定にするようにソース・ドレイン電圧を制御して計測している。この計測では0.1mVオーダーの変化を捉えることができる。さらに高感度の計測を可能

とするために、参照電極とプローブ電極の電位差を高感度で計測する技術を開発した。ゲート電位の変化により生ずるドレイン電流変化をソース電位の変化とし、ターゲット導入前のソース電位をゼロ電位に調整して変化分を増幅計測する方法である。この方法により、ゲート電位変化 $1\mu\text{V}$ の測定を可能とした。

上記と並行して、DNA ポリメラーゼのような生体高分子の基板表面への固定化、および生体反応計測系の構築について進めている。ゲル被覆等と相性の良い方法で、かつ常温中性 pH で自発的に共有結合する、[フェニルボロン酸]-[特異的ペプチド配列]固定化システムを構築している。これにより任意の蛋白質の生体反応を FET チップ上の極小場で即時計測可能となる。これまで、DNA ポリメラーゼなどの化学反応進行に伴う基質変化(リン酸の放出など)を検出するためのモデル系として、ルシフェラーゼ(ATP分解による発光に伴いリン酸を放出)に当該特異的ペプチド配列を分子末端に導入したものを設計、作成してきた。さらに、フェニルボロン酸を共有結合させた金基板上に特異的ペプチド配列融合ルシフェラーゼを固定し、基質混和の際の化学反応をFET計測できるかについて実験を行った。その結果、これまでにフェニルボロン酸基板への高効率結合が確認できた二種の特異的ペプチド配列に関して、両者ともルシフェラーゼの様な生体高分子に融合しても、その機能を失わず基板上に固定できる事が確認された。また、二種の特異的ペプチド配列はタンデムに結合した6残基のチロシンに1-2残基の塩基性残基を付加したものであるが、この塩基性残基が芳香族環であるもの(6YW)、とそうでないもの(6Y2K)では、ルシフェラーゼ反応にตอบสนองする電位が逆になり、かつ緩和時間も大きく異なる事がわかった(6Y2Kを融合した反応系では反応後十数秒以内に静止電位に戻る)。これらの事から基板に結合する配列を適宜選択する事で、種々の酵素(蛋白質)反応における電荷移動反応の特性に応じた[フェニルボロン酸]-[特異的ペプチド配列]固定化システムを選択する事ができると考えられる。

1細胞遺伝子発現解析へのバイオトランジスタの応用を視野にいれ、1細胞 cDNA ライブラリーを安定に作製し、バイオトランジスタで解析するための基礎技術開発を行っている。H20 年度から引き続き、1細胞解析に適した培養細胞系の選択とその定量分析実験を行い、その結果得られた条件をもとに、実際の培養細胞系への応用実験を行った。分化誘導を行った細胞集団と行っていない細胞集団から1細胞ずつ取り出し個別解析を複数回行った結果、発現パターンの有為な差を見出す事ができた。いくつかのマーカータンパク質について、それぞれの細胞集団に於ける発現パターンの広がりや詳細を明らかにする事ができ、1細胞解析ならではの解析結果を得る事ができた。今後これらの解析における前処理反応系を極小場で自動化し、上記装置に組込む事が可能なプロトコルの構築に着手する。

(2-1-2) 機能性核酸プローブの開発(慶應グループ)

近年、この技術を用いた新たなDNAシーケンシング装置としてバイオトランジスタ装置が宮原らにより考案された。バイオトランジスタは高集積であり、小型、また安価であるため、従来のシーケンシング法に代わる安価・高感度・高速のシーケンシング法として期待される。しかし、現在のバイオトランジスタでの DNA 検出では、i) 低感度、ii) 多塩基(特に10塩基以上)の読み取りが困難、

iii) 電位変化と伸長反応との真の関係が未解明, といった問題点が挙げられる.

本研究では上記の問題を解決するため, 1. 高輝度マルチカラー蛍光プローブ, 2. 電荷付与型プローブの2つの機能性核酸プローブを開発する. 高輝度な蛍光色素を導入したプローブと大きな電荷を付加したプローブを用いることにより, バイオトランジスタ上でのDNAシーケンシングの i) 感度の向上, ii) DNA読み取り長の拡大, iii) 電位/蛍光の同時測定による合成現象の解明を試みるのが目的である.

[1] 高輝度マルチカラー蛍光プローブの設計・合成

本年度の研究では, 上記1の目的のため, 蛍光プローブ分子候補の設計および合成を試みた. まずは, 基質としてのヌクレオチド(dNTP)に, 側鎖(Linker)を介して, 蛍光色素または電荷をもつ部位(Probe)を導入した機能性プローブとすることとし, 以下の3つのユニットから成る分子を設計した.



蛍光色素としては, これまでに本研究室で開発された高輝度ボロンジピロメテン誘導体蛍光色素にカルボキシル基を導入した分子 KFL-11 の合成を行い, シャープなスペクトル高輝度の蛍光が得られることを確認した. この分子は, 市販で世界標準のように DNA ラベル化蛍光色素として用いられている Cy5 とほぼ同波長で光励起できるが蛍光は3倍以上明るい特徴がある. その他, さらに KFL-11 色素分子中に電荷をつけ, 蛍光と電荷の両方からの DNA 伸長の読み取りが可能かどうかを検討している.

[2] 電荷付与型核酸プローブの設計・合成

基質としてのヌクレオチド(dNTP)の合成は, いくつかの工程で行ったが, リン酸付加体の生成物が少量できたが, 不安定であり, 合成ができても次第に壊れてしまった. そこで, 昨年度からの合成法を止め, 新たな合成法で Alkylamino dUTP を作る検討を行った. 基本的には, 基質(dNTP)にリンカーを介し, アミド結合等によって機能性分子を付加したプローブを考案し, 作製する. この場合, 園頭カップリングにより, 基質部分へのアルキルアミノリンカーの付加を行った. また, 基質部分のトリリン酸化は Eckstein 法を用いて行った. リン酸化に用いる試薬である 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4 は5価のリンをもつため, 反応性が高く, 3'末端のOHとも反応する可能性がある. そのため, 実験では始めに3'末端OHのアセチル保護を行い, その後 triリン酸化を行った. リン酸化後の精製は, イオン交換樹脂 (DEAE-sepatax カラム, TEAB:10mM-1M), 及び HPLC (HILIC カラム, TEAA:MeCN=3:7) によって行い, 凍結乾燥し Alkylamino dUTP の TEAA 塩を得た. また, TEAA 塩に比べ Na 塩が安定であることから, その後, Na 塩への塩交換を行い, 目的物を得た. 目的物の同定は ^{31}P -NMR 及び ESI-MS によって行ったところ, 電荷部位を付与する前の重要な中間体が少量ではあるが合成できた.

次に核酸に電荷付与を行うため, スルホン酸カルボン酸を持つ分子の導入を試みた. 電荷付与分子として p-SCN-Bn-DTPA を用い, Alkylamino dUTP への結合を行った. SCN はアミンと

の結合が容易であり、また DTPA は5つのカルボン酸を持つため、負電荷の増加が期待できる。反応条件の検討結果、dUTP のリン酸基は低 pH で脱離しやすいことから、溶媒に水及び Et₃N を用い、pH8 付近で縮合反応を行った。ESI-MS による質量分析の測定結果から DTPA-dUTP の構造 が同定されたが、この分子は DTPA 部位に Ca イオンが錯化された状態で検出された。このことから、合成した DTPA-dUTP は DNA 伸長反応の際、溶液中の金属イオンを錯化してしまう可能性があると考えられる。よって、今後はイオンを錯化しづらい構造を持つ分子の設計を行う必要がある。また、カルボキシル基(COOH 基)は pKa が高く、DTPA 中の全ての COOH が溶液下でアニオン型の COO⁻ となるとは考えにくい。COOH 基にくらべ、SO₃H はより pKa が低いため、現在はスルホン酸基(SO₃H 基)を付加する分子をデザインし合成を進めている。まずは、スルホン酸またはカルボン酸をもつ既存の蛍光核酸プローブをバイオトランジスタ上で用い、電荷付与がどのように応答に寄与するかを確認し、最適な分子設計を行う。

(2-1-3) DNA 伸長反応に伴う pH 変化の測定(NIMS グループ)

DNA ポリメラーゼを基板表面に固定化した時の酵素活性、基板表面の影響などを pH 変化を利用して評価することを試みている。また、pH 変化を利用した DNA の塩基配列解析について研究を行った。トランジスタ表面にプローブ DNA を共有結合させ、これにターゲット DNA をハイブリダイズさせた。次にポリメラーゼと dNTP を添加し、トランジスタの信号から DNA 伸長反応中の pH を測定した。この他に、トランジスタには DNA を固定化せず、バルク溶液中で伸長反応を行い、トランジスタを用いて溶液の pH を測定した。伸長反応の進行は、電気泳動ゲルから確認した。DNA の長さ(18~760bp)、DNA 濃度、緩衝材濃度、dNTP 濃度を変化させ、pH 変化の検出を試みたが、緩衝材を含まない溶液中では pH のドリフトが非常に大きく、また、緩衝材を含む溶液中では pH 変化が検出限界以下であった。どの実験系・実験条件においてもコントロール実験と比べて有為な差は得られなかった。

(2-1-4) 生体膜界面ゲートの構築(NIMS グループ)

基板に支持された平面状脂質二分子膜は、流動性を保持しており、生体膜モデルとして利用することができる。そのため、脂質、膜構造および膜蛋白質の性質を明らかにするために基板支持膜が広く用いられている。このような基板支持膜をゲート表面に作製すれば、生体膜の性質や機能を利用した生体膜バイオトランジスタを創製できると考えられる⁽¹¹⁾。しかし、既存の基板支持膜形成法では利用できる脂質組成や膜蛋白質および基板の種類が制限され、特に膜蛋白質の再構成は大変困難である。そこで、既存の手法に代わる基板支持膜作製法の検討を行った⁽¹⁰⁾。

本手法では、界面活性剤を利用し、ポリエチレングリコール(PEG)で修飾したガラス表面に脂質二分子膜を形成する(図2)。始めに、修飾表面に界面活性剤/脂質混合物を吸着させ、次に脂質ベシクルで表面を洗浄

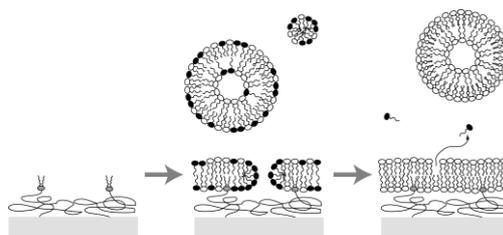


図2 界面活性剤を利用した基板支持膜形成法

して界面活性剤を取り除く。この手法により両性イオン性脂質 DOPC が流動性を保った膜を形成することが分かった。一方、脂質試料に陰イオン性脂質 DOPS を添加すると、膜の形成が妨げられた。しかし、カルシウムイオンを添加した緩衝液中では、10-20 mol%含む脂質試料から流動性を保持した膜を形成できることが分かった。形成された脂質膜は Annexin V を結合した。従って、少なくとも溶液側に面した単分子層には DOPS が含まれていることが示唆される。

(2-2) 細胞トランジスタによる細胞機能の非侵襲モニタリング(東大グループ)

生体の機能は複雑だが簡便に計測し診断ができるセンシング技術があれば、がんやアルツハイマー病、循環器疾患などの原因の解明や治療に最適な薬の開発が高精度に低コストで実現すると考えられる。生物の最小単位は細胞である。そのため、細胞レベルで簡便にその機能を分析できるツールの開発が必要である。つまり、細胞を生体外で培養しながらその機能を最大限に再現し、そこで起きる種々のイベントを非侵襲で簡便にモニタリングすることが可能な独創的なセンシング技術は魅力的である。細胞ではイオンチャネルからのイオンの出入りが細胞間コミュニケーションを担い、細胞内にある DNA 分子は側鎖にイオン性のリン酸基を有する。つまり、生体の機能を直接計測するには、イオンやイオン性分子を簡便に捉えることが素直であるように思われる。我々の研究グループでは、生体の機能をイオン固有の電荷の振る舞いとして捉え、そのイオン固有の電荷を計測可能な半導体バイオセンシング技術により、細胞の諸機能を計測するためのデバイス創製を行う。平成 21 年度は、細胞機能を計測するため、①細胞培養、②電気計測、③顕微鏡観察が同時にリアルタイムで実施可能なシステムを構築し、平成 22 年度は、それを使って諸機能を具体的に計測し、半導体デバイスによる細胞機能計測の可能性について検討した。

(2-3) 自己組織化ゲート表面を用いた糖鎖解析トランジスタの創製(東京医科歯科大グループ)

シアル酸は糖鎖中に最も高頻度かつ糖鎖末端部に集中する分子であり、その密度や分布が細胞の疾病、発生、分化などと強く相関することが知られる。例えば、癌細胞表面においてはシアル酸発現が著しく亢進する一方、インスリン依存型糖尿病患者の赤血球表面では逆に減少することが報告されている。細胞糖鎖シアル酸発現量の変化を FET により捉えることが出来れば、非標識かつ非破壊的な細胞診断技術に繋がるものと考えた⁽⁷⁾。シアル酸を特異的に認識させる分子としてフェニルボロン酸(PBA)を用い、これの自己組織化膜(SAM)を形成した金電極を FET のエクステンデッドゲートとして用いることで、生理的な環境下でシアル酸の有するカルボキシル基の負電荷を特異的に捉えうることを前年度までに確認した。今年度は、転移癌モデルとして、マウス黒色腫細胞を用いた肺癌モデルにおける癌転移度定量的の評価を行った(図3)。高転移性の癌細胞表面ではシアル酸発現が亢進しており、これを指標として、ラベルフリーかつリアルタイムに癌転移度が定量的に求められることが確認された^(6, 12, 13)。すなわち、あらかじめ正常な細胞についての濃度- V_T プロファイルが得られれば、既知濃度の細胞をゲート上に播種するだけで、そのシアル酸発現量がリアルタイムに求められることが明らかとなった(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5494: 同誌“hot paper”採択ならびに Wiley より報道発表)⁽¹⁵⁾。また、上記検討過程において、従来より

も高い糖認識能と水溶性に優れた新規なフェニルボロン酸誘導体を発明するに至り(特願 2010-821、特願 2010-208796)、これを用いたグルコース認識 FET(特願 2010-164955)や、生理条件下、正常血糖値をしきい値とした連続的なインスリン放出制御能を有する材料の開発に成功した(米国仮出願 61/348334)。

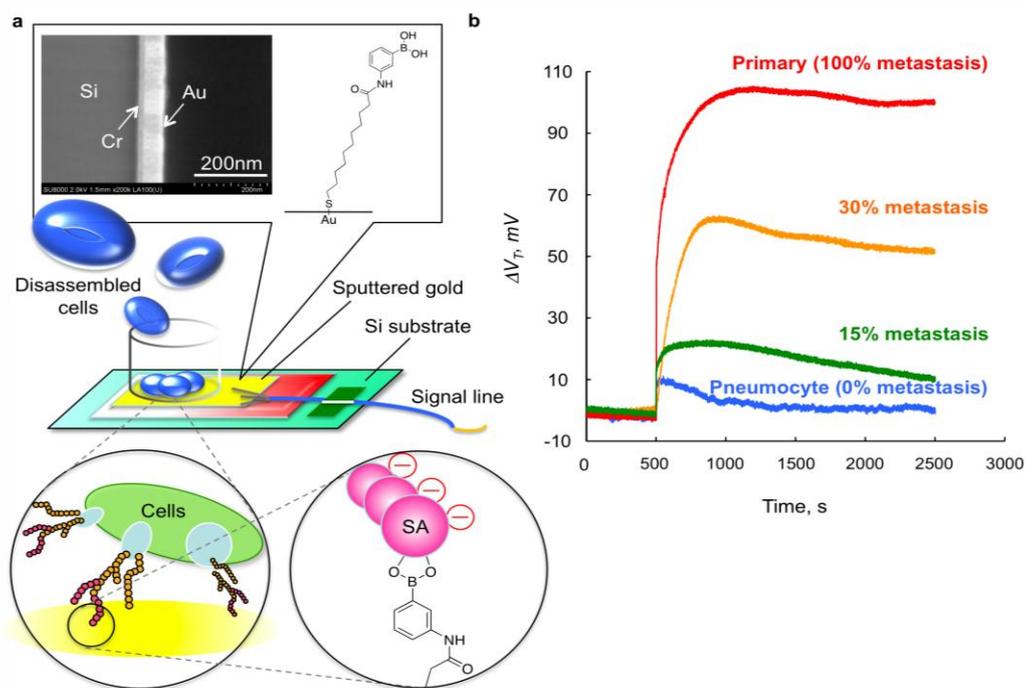


図3 糖鎖解析トランジスタによるがん転移度の定量的測定例

(2-4) FET バイオセンサーによるタンパク質の検出(東京医科歯科大グループ)

固液界面での非特異的なタンパク質吸着の制御は、バイオマテリアルやバイオセンサーの要素技術として重要である。従来、非特異的タンパク質の吸着現象は水晶発振子マイクロバランス(QCM)法や表面プラズモン共鳴(SPR)測定法などにより、非ラベル方式でのリアルタイム高感度測定がなされてきたが、装置が高価であったり、センサーのハイスループット化には不向きであるなどの理由から汎用的な技術とは言い難い。一方、我々は FET バイオセンサーを用いて、吸着した DNA やタンパク質の電荷を直接読み取る方式を用いることにより、非ラベル方式でのリアルタイム高感度測定を達成した^(5, 16)。電解質溶液中でのタンパク質の電荷を Debye-Huckel 理論でモデル化することにより、吸着タンパク質の定量化が可能となった。FET のゲートを金電極に延長したエクステンドゲート型の FET を採用することにより、測定部分と信号変換部分を物理的に隔離することに成功した。これにより、FET の動作安定性が向上するのみならず、エクステンドゲート金電極上の固-液界面にナノオーダーでの様々な機能性有機界面を構築することが可能となり、非

特異的なタンパク質吸着現象に影響を与える官能基・ナノ構造・実験条件等の検討をコンビナトリアル式におこなえることとなった。今後、エクステンドゲートとして、種々の金属材料を電極として用いられることから、より安定した界面電位を得られるセンサー材料の最適化もおこなえる。本項目については *Analytical Chemistry* 誌に掲載された (2010, 82, 1803)⁽¹⁷⁾。

次に、タンパク質を構成するアミノ酸側鎖に電荷を選択的にラベル標識することにより、タンパク質の構造や活性を失うことなく電位測定の高感度化を実現する新しい手法を提案した。DNA (−308 Da/charge) と比べてアルブミンなどのタンパク質 (−5000 Da/charge) は電荷密度が非常に低いと電位計測による高感度測定は困難とされてきた。我々は、カチオン性ペプチドであるリジンの側鎖に着目し、無水コハク酸を用いて選択的にアシル化させてアニオン性のカルボキシル基に変換した (図4)。その結果、牛血清アルブミン (BSA) の高次構造や酵素活性は維持されたまま電荷密度を pH7.4 で 5 倍増加させることに成功し、電位シグナルは 3 倍に増幅された。一方、アルギニン残基を豊富に含むリゾチーム等のタンパク質については、アルギニンに対して選択的に反応する 2,3-butanedione や、リジンとアルギニン双方に反応する methylglyoxal を用いてカチオン性アミノ酸を中性あるいはアニオン性に変換させ、電位シグナルは最大で 10 倍増幅された。この方法はタンパク質の翻訳後修飾を電気化学的に測定できる可能性を示唆しており、今後の研究の発展が期待される。本項目については *Analytical Chemistry* 誌に掲載された (2010, 82, 8946)⁽¹⁴⁾。

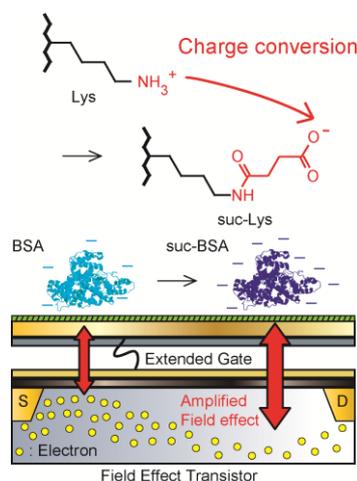


図4. 選択的アミノ酸修飾によるタンパク質の電荷ラベル化法

(2-5) 電位計測方式によるマイクロ流体診断デバイスの開発 (東京医科歯科大グループ: 同領域藤井グループとの共同研究)

本件は、宮原グループが本件で進めている「バイオトランジスタ」による生体分子検出技術と、藤井グループの得意とするマイクロ流体デバイス製造技術とを組み合わせた新規な診断プラットフォームの創出を提案するものである。マイクロ流体デバイス中で生体分子、細胞の接着評価を行うことの利点には、(1)生体試料の大幅な削減、(2)測定の迅速化(試料精製から測定までの一体化)、(3)多項目化、(4)流体パラメータ側の制御によるシグナル/ノイズ比の最大化、また、(5)循環型の流路配置として理論段数を増やすことによるシグナル増幅などが挙げられる。具体的な検出対象として、まず既の実績のある細胞糖鎖シアル酸の検出、続いて、核酸系アプタマーを予定しており、現在、プロトタイプデバイスを製作中である。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

- (1) Toshiya Sakata and Haruyo Sugimoto, “Continuous Monitoring of Electrical Activity of Pancreatic β -Cells Using Cell-Based Field Effect Transistor”, *Japanese Journal of Applied Physics*, (in press)
- (2) Toshiya Sakata, Izumi Makino and Sayaka Kita, “Real-time and noninvasive monitoring of sea urchin embryo activity using semiconductor devices”, *European Biophysics Journal*, (in press)
- (3) Y. Nakasone, H. Otsuka, “Hepatocyte Spheroids Underlayered with Nonparenchymal Cells for Biomedical Applications”, *IEICE Electronics Express*, . Vol.E94-C, No.2, pp. -, Feb. 2011.
- (4) Yoshihiro SAITO, Hidenori OTSUKA, “Polymer-Stabilized Nanoparticles and their Dispersion Properties”, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, 84(1), 12–17 (2011)
- (5) Alessandra Bonanni, Martin Pumera, Yuji Miyahara, Influence of gold nanoparticle size (2-50 nm) upon its electrochemical behavior: an electrochemical impedance spectroscopic and voltammetric study, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 4980-4986(2011). DOI: 10.1039/c0cp01209b
- (6) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, “Biotransistor for Noninvasive Determination of Cell Surface Sialic Acid”, *Proc. IEEEJ*, (in press).
- (7) Brooke Beier, Katherine Musick, Akira Matsumoto, Alyssa Panitch, Eric Nauman, Pedro Irazoqui, “Toward a Continuous Intravascular Glucose Monitoring System”, *Sensors*, 11(1), 409-424 (2011)

- (8) Taiichiro Murakami, Toshiya Sakata, Akira Matsumoto, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, "Development of cell/transistor interface for real-time and noninvasive monitoring of potassium ion release based on apoptosis using biologically-coupled field effect transistor", *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 35 (2010), 255-258.
- (9) Otsuka, H. "Nanofabrication of Nonfouling Surfaces for Micropatterning of Cell and Microtissue", *Molecules* 2010, 15(8), 5525-5546.
- (10) Chiho Kataoka-Hamai, Mahoko Higuchi, Hideo Iwai, and Yuji Miyahara, "Detergent-Mediated Formation of Polymer-Supported Phospholipid Bilayers", *Langmuir*, vol. 26, No. 18, pp. 14600-14605, 2010. (DOI: 10.1021/la102151p)
- (11) Chiho Kataoka-Hamai and Yuji Miyahara, "Field-effect detection using phospholipid membranes", *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 11, p. 033001, 2010. (DOI: 10.1088/1468-6996/11/3/033001)
- (12) Akira Matsumoto, Naoko Sato, Horacio Cabral, Kazunori Kataoka, Yuji Miyahara, "self-assembled molecular gate field effect transistor for sialic acid detection at cell membrane", *Procedia Engineering* 2010, 926-929
- (13) Akira Matsumoto, Naoko Sato, Ryo Yoshida, Kazunori Kataoka, Yuji Miyahara, "Bio-transistor for Label Free Living Cell Diagnosis", *Cells & Materials* 2010, p.173.
- (14) Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, Molecularly engineered charge-conversion of proteins for sensitive biosensing, *Anal. Chem.*, 82, 8946-8953 (2010), DOI: 10.1021/ac1018233
- (15) Akira Matsumoto, Horacio Cabral, Naoko Sato, Kazunori Kataoka, and Yuji Miyahara, Assessment of Tumor Metastasis via Direct Determination of Cell

Membrane Sialic Acid Expression, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 5494-5497 (2010), DOI: 10.1002/anie.201001220

(16) Alessandra Bonanni, Martin Pumera, Yuji Miyahara, "Rapid, Sensitive and Label-free Impedimetric Detection of a Single Nucleotide Polymorphism Correlated to Kidney Disease", *Anal. Chem.*, 82, 3772-3779 (2010), DOI: 10.1021/ac100165q

(17) Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "Detection of Microenvironmental Changes Induced by Protein Adsorption onto Self-Assembled Monolayers using an Extended Gate-Field Effect Transistor", *Anal. Chem.*, 82, 1803-1810 (2010), DOI: 10.1021/ac902401y

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 6 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 9 件)