

宮原 裕二

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

機能化ナノ構造ゲートバイオトランジスタの創製

§1. 研究実施体制

(1) 東京医科歯科大学グループ

①研究代表者: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主たる共同研究者:片岡 知歩 (物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点、
生体機能材料ユニット 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主たる共同研究者:坂田 利弥 (東京大学大学院工学系研究科 准教授)

②研究項目

- ・バイオトランジスタによる細胞機能計測

(4) 東京理科大グループ

①主たる共同研究者:大塚 英典 (東京理科大学総合化学研究科、准教授)

②生体反応性分子インターフェイスの形成

- ・細胞培養基盤の構築
- ・自己組織化高分子膜の形成

(5) 日立グループ

①主たる共同研究者: 神原 秀記 ((株)日立製作所中央研究所、フェロー)

②研究項目

- ・FET 応用バイオチップの開発
- ・酵素等の基板固定化法の確立および FET による生体反応計測系の構築
- ・DNA シーケンシングおよび遺伝子発現解析

(6) 慶應グループ

①主たる共同研究者: 鈴木孝治 (慶應義塾大学理工学部、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

§2. 研究実施内容

(1) 機能性界面ゲートの構築(東京理科大グループ)

(1-1) 細胞培養基盤の構築

FET 計測による細胞機能のその場計測では、細胞膜で生じる諸現象を直接電気シグナルで検出することができ、非侵襲で経時的にモニタリングすることが可能である。本年度は、金基板上にキトサン層を形成し、この表面に形成させるゼラチン層の安定化を図ることによって軟骨スフェロイドをパターンニングを試み、金ゲート表面に形成する細胞足場としての薄膜状態を詳細に解析した。

金スパッタリングしたガラス上に、キトサンコート、ゼラチンコートそれぞれを施し、2層構造を作製した。その2層構造上に光重合型 PEG(poly(ethylene glycol))をスピコートし、フォトソグラフィ法により細胞接着面と非接着面を有するスフェロイドパターンニング基板を作製した。この基板上でウシ由来軟骨細胞を長期間スフェロイド培養し、細胞の分化応答性について経時的変化を追跡した。

キトサン層、ゼラチン層を金基板上にコート後、PEG をフォトソグラフィ法によりマイクロパターンニングし、 $\phi = 100\mu\text{m}$, $l = 100\mu\text{m}$ のスフェロイド培養基板を作成した(図 1a)。

この表面の細胞接着領域をラット由来アルブミンタンパクで染色した結果、マイクロパターンと同一のパターンが金基板上に転写されていることを蛍光抗体法より確認した(図 1b)。この表面にウシ由来軟骨細胞を培養した結果、スフェロイドを作成することに成功し、その細胞パターンは 2 週間以上安定に存在した(図 1c-e)。培養経過に伴う細胞の機能変化を時間経過的にモニタリングした結果、添加因子としてアスコルビン酸を加えたときのみ細胞は分化し、その挙動をグリコサミノグリカン(GAG)産生量として定量化することに成功した。さらに、その状況を FET センシングした結果、硫酸化多糖(GAG)分泌に伴う培養液の酸性変化として、正の表面電位変化として計測可能であることを特定した⁽⁶⁾。

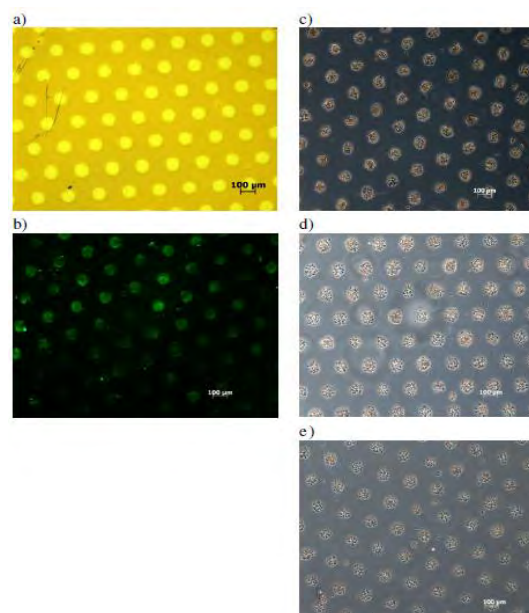


図1 マイクロパターンニングによるスフェロイド培養基板

(a) PEG ハイドロゲルのマイクロパターン ($\phi = 100\mu\text{m}$, $l = 100\mu\text{m}$)、(b) 蛍光染色したマイクロパターン、軟骨スフェロイドの (c)1日、(d)7日、(e)14日経過後。

(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

(2-1-1) 機能性核酸プローブの開発 (慶應グループ)

平成 24 年度の研究では、バイオトランジスタ上での DNA ラベル化後のポリメラーゼによる伸長の証明のため、蛍光プローブ分子の設計および合成を行うが、基質としてのヌクレオチド(dUTP)に、側鎖(Linker)を介して、高輝度蛍光色素をもつ部位(Probe-蛍光色素)を導入した分子構造の機能性プローブとした。

蛍光色素としては、これまでに開発された高輝度ボロンジピロメテン誘導体蛍光色素 KFL にカルボキシル基を導入し、実用化されている比較色素 Cy5 と類似波長特性をもつ蛍光分子の合成を行った。この KFL を用いることにより、既存の DNA 蛍光プローブより高感度な蛍光応答結果が得られたが、同時に非特異吸着の問題があった。実際に使用する色素分子の平面構造と水溶性不足が問題と考えられた。

一方、合成した蛍光分子に電荷を持つようにしたプローブを設計した。電荷をもつ部位として、分子中にスルホン酸やアミノ基を有するものを合成した。このカチオン性蛍光プローブ実際の電気信号では、スルホン酸に由来する負電荷のための負の電位応答が得られた。一方、カチオンが付与されると数ミリボルトの正のポテンシオメトリックな応答が得られた。しかしながら、応答に有意性があるとはいえ、どちらのプローブも再現性(応答のばらつき)に問題が残り、今後解決する課題である。

(2-1-2) 酵素等の基板固定化法の確立および FET による生体反応計測系の構築 (日立グループと東大グループとの共同)

基板等への酵素固定法として、これまでペプチドタグを用いる方法を確立してきたが、このペプチドタグによって一部の酵素反応が阻害されることが問題となった。当該ペプチド配列は連続したチロシン残基を持ち、この部分の疎水性が特に高いため、配列内にスペーサーを導入することで局所的疎水性を減じたタグを作成し、DNA 合成酵素に導入した。

改良タグを付加した DNA 合成酵素を用いて PCR 反応を行ったところ、改良タグでは野生型と変わらない DNA 合成活性を有することが確認することができた(図 2)。

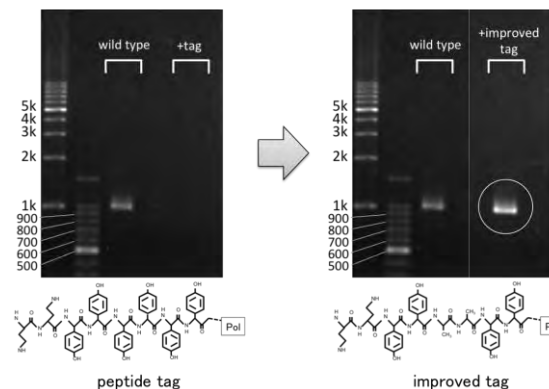


図2. 従来型タグを用いた DNA 合成反応(左)と、改良タグを用いた DNA 合成反応(右)

(2-1-3) マイクロ流路系の新規設計と生体反応計測のための計測感度改良

DNA 合成やタンパク質間相互作用などの生体分子反応を効率的に計測するためには、微細な流路を極小の FET チップ上に構築する必要があるが、そのため周囲の電磁ノイズを拾いやすくなってしまい、反応に伴う微小な電位変化が捉えられなくなる危険がある。今期は図3a に示す微小電極チップと流路を構築し計測系に組込んだ上で、電装系のシールドを入念に行うことで、参照電極への約 0.4mV の印加電圧を即時計測できる系を構築した(図3 b)。

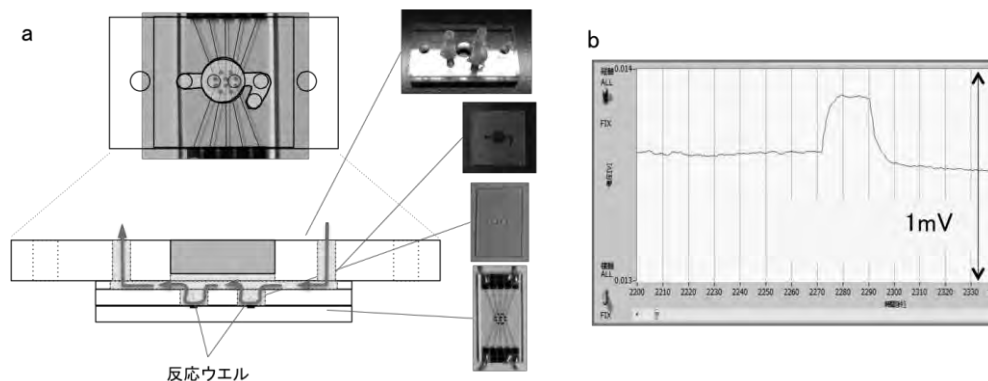


図3. a. マイクロ流路系の模式図, b. サブ mV 印加電圧計測実験

(2-1-4) FET を用いた DNA 合成反応計測

遺伝子配列解析を見据えた DNA 合成反応計測実験として直径 2.8 μm の磁気ビーズ上に固定した DNA 基質を前記流路系の反応ウエル(図4a)に導入し、更に DNA 合成酵素を添加して DNA 合成反応の進行にともなって生じるピロリン酸の検出を行った。ピロリン酸の検出は H23 年度報告書にあるフェニルボロン酸修飾金基板を用いて行った。

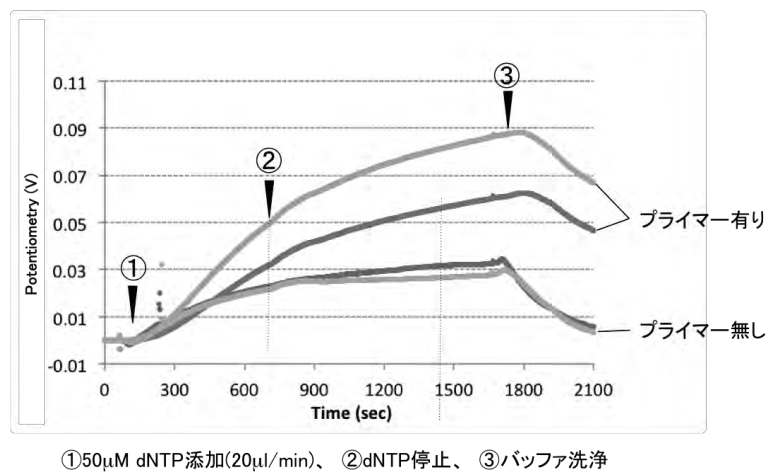


図4. FET による DNA 合成反応の検出実験

FET 検出実験の結果、プライマー無しの **negative control** に比して、40-60mV の電位差を検出することができた(図4)。この基質は 30 塩基伸長するもので、1塩基伸長あたり 1mV 以上の電位差を検出することができたことになる。

(2-1-5) リアルタイム PCR 用の電荷型プローブの開発

平成 24 年度からリアルタイム PCR 用の電荷型プローブの開発を行った。リアルタイム PCR では、短時間に目的の DNA 配列を増幅しながらの検出ができるようにすることで、定量的な解析が可能となる。本研究では、酸化還元物質を用いた電荷付与型プローブの設計と合成を行った。酸化還元物質はインターカレーター機能を利用してリアルタイム PCR 上で用いられているが、より選択性を高めるために、配列特異性の高いオリゴヌクレオチドに酸化還元物質を付与したプローブの開発を目指した。レドックスプローブの分子設計とし図5のように、オリゴヌクレオチドの 3'部分に酸化還元物質であるフェロセンを付与した構造を設計し、合成を行った。測定は PCR の増幅サイクル中、レドックスプローブのフェロセン部分に酸化還元反応を起こし、この時のピーク電流値の変化を観測した。

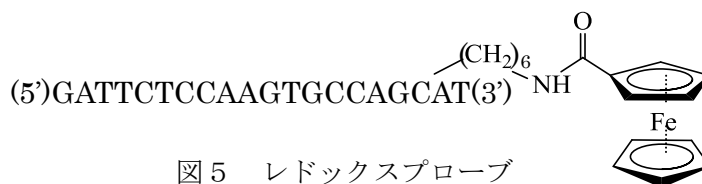


図5 レドックスプローブ

サイクリックボルタンメトリーを用いて、PCR の増幅サイクルごとに電流応答を測定した結果を図6に示す。この結果から DNA の増幅に対応したピーク電流減少が観測でき、今回作成したレドックスプローブがリアルタイム PCR 用の測定に有用であることが示された。

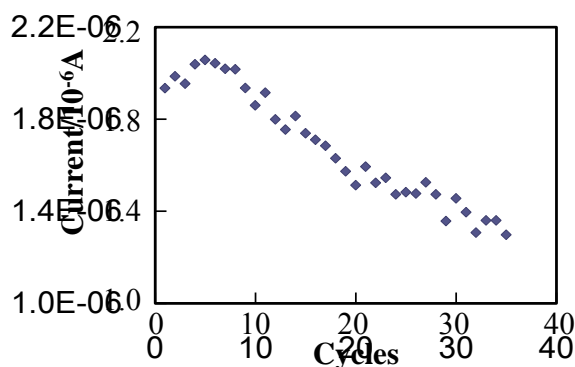


図6 CV-PCR のピーク電流値変化

今後は初期鋳型 DNA 濃度を変化させて同様の実験を行い、より定量的な結果を得ることによってレドックスプローブを用いたリアルタイム PCR の電気化学的測定の実用化が期待される。

(2-1-6) 自己組織化膜修飾電極を用いた核酸検出

金電極表面にアルカンチオール自己組織化膜を形成し、その表面に核酸プローブを固定化した核酸検出用電極を作製した。核酸プローブを固定化したアルカンチオールと固定化し

ていないアルカンチオール(alkanethiol)の混合比を変えることにより、核酸プローブの密度を制御した。検出の一例として microRNA146 と microRNA143a をクロスハイブリさせたときの電位変化を比較した結果を図7に示す。

それぞれの試料と相補的な配列を持つプローブのみに、選択的にハイブリダイゼーションし、大きな信号が得られていることがわかる⁽⁴⁾。microRNA はがんのマーカーとして期待されており、電氣的検出により測定の見易化が期待される。

同様な電極系で DNA プローブと PNA プローブを固定化し、その応答の比較も行った⁽¹⁰⁾。

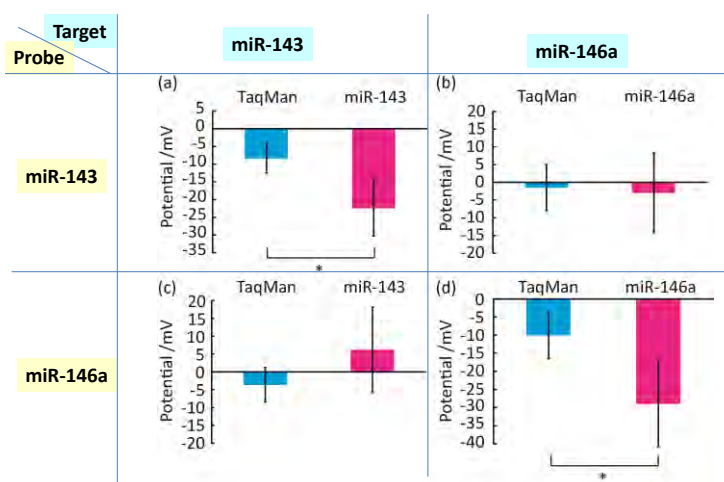


図7 電極アレイによる microRNA の検出

(2-2) 細胞機能の評価技術

(2-2-1) 透明半導体を利用したバイオセンサの研究開発(東大グループ)

細胞の培養は一般的に透明な培養皿で行ない、倒立型顕微鏡により培養液の多少の蒸発などとは無関係に高倍率での観察が可能である。半導体原理を、透明性電極を使って利用することができれば、シリコンベースで培った半導体バイオセンシング技術による細胞機能計測を汎用的に実現することが可能である。そこで本研究では、透明性アモルファス酸化物半導体(Transparent Amorphous Oxide Semiconductor; TAOS)を"Bio-TAOS"として活用するため、溶液中での細胞の培養による電気シグナル変化について検討を進めた。

半導体部分に InGaZnOx(IGZO)を使用し、ゲートのイオン感応成膜には主に SiO₂ 薄膜を使用した。この特徴を有する Bio-TAOS を用いて、細胞機能の一つとして薬効計測のための細胞死(アポトーシス)について調査を行った。その結果、図8に示すように、子宮癌細胞(HeLa 細胞)にアポトーシス誘導タンパク質(抗癌剤など)を導入すると、ゲート表面における電位の上昇、すなわち、正電荷の増加が計測された。Bio-TAOS の特徴から考えると、細胞のアポトーシスと同時に呼吸活性が上昇し、結果として細胞/ゲート界面近傍における pH の変化が生じたものと考えられる。ただし、アポトーシスの際、細胞からカリウムイオンの流出が起きるとい報告もあるため、今後はゲート表面におけるイオン種特異計測のための表面化学処理の検討を行う必要がある。

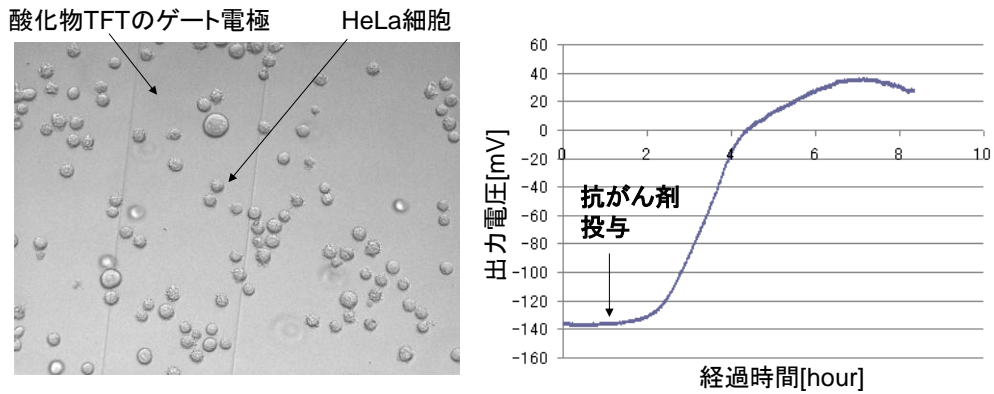


図8 Bio-TAOS による細胞死アポトーシスの計測

(2-3) FET バイオセンサによるタンパク質の検出

(2-3-1) 局所電荷検出による吸着タンパク質の配向解析(東京医科歯科大グループ)

バイオトランジスタによる生体分子検出では、ゲート表面から数 nm 以下の表面のごく近傍の情報のみ取得できる。この特徴は、タンパク質など大きな生体分子を選択的に検出する上では問題になるが、水晶振動子(QCM)、表面プラズモン共鳴(SPR)で測定される情報とともに解析することにより、例えばタンパク質の吸着時の変性過程を解析することができると考えられる。不均質なタンパク質の表面電荷分布に着目し、電界効果トランジスタ(FET) センサを用いて吸着タンパク質の局所的な電荷情報を得ることで、分子レベルでの配向、変性過程などを評価可能かどうか検討した。

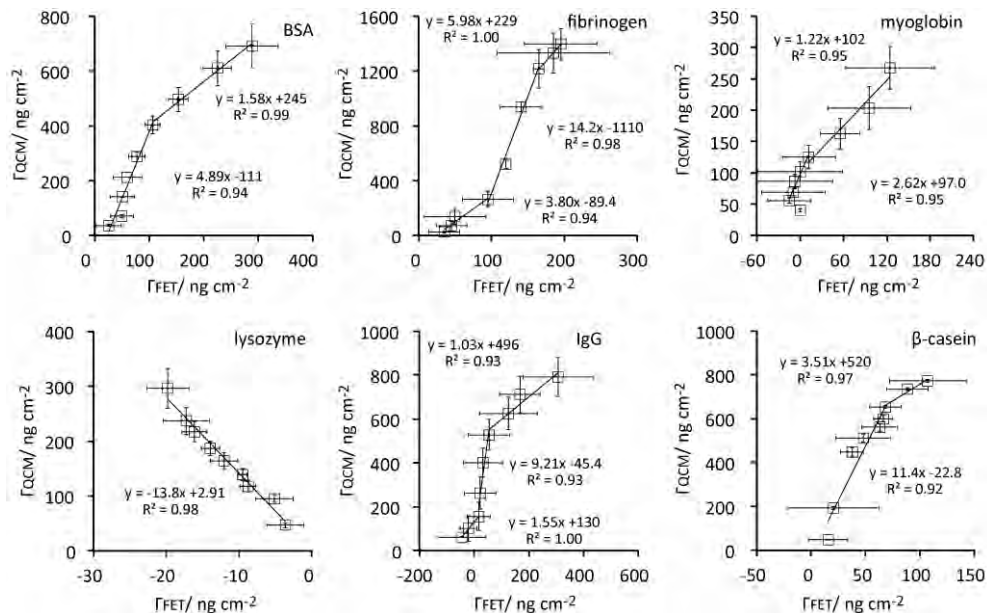


図9 タンパク質吸着における QCM と FET シグナルの相関

タンパク質は、牛血清アルブミン、フィブリノーゲン、ミオグロビン、リゾチーム、IgG、 β -カゼインを用いた。FET 及び QCM の金電極表面にアルカンチオール自己組織化膜を形成し、上記タンパク質を非特異的に吸着させたときの FET 及び QCM の信号を比較した結果を図9に示す。多くのタンパク質において、折れ線状の特性が得られた。QCM の信号 Γ_{QCM} が大きい領域、FET の信号 Γ_{FET} が大きい領域に分けられる。

QCM の信号は水の情報を含む wet mass であり、FET の信号は dry mass である。FET 測定においては、生理学的なイオン強度において検出されるタンパク質の電荷は、溶液のデバイ長の範囲内(およそ 1 nm)となり、吸着したタンパク質の接着面とその近傍の電荷に限定される。これより $\Gamma_{\text{QCM}} / \Gamma_{\text{FET}}$ は吸着タンパク質フィルムの膨潤度の指標となり、 $\Gamma_{\text{QCM}} / \Gamma_{\text{FET}}$ が小さい場合、吸着面にタンパク質の電荷(親水性)ドメインが配向して吸着していることが考察される。以上より、接着面近傍の電荷を反映したシグナルを解析することにより、吸着における分子の配向や経時的な高次構造変化を評価する手法を新たに見出した⁽²⁾⁽³⁾。

(2-3-2)酸化・還元剤と組み合わせたタンパク質の検出 (NIMS グループ)

電界効果デバイス測定における問題点の一つは電位の不安定さである。そこで、電位安定化を目的として、酸化還元剤を添加した系の評価を行った。評価した系は、抗原抗体反応を用いたタンパク質(ヒト血清アルブミン (HSA))の検出である(図10)。

はじめに、酸化インジウムスズ (ITO) 基板に補足抗体を結合させ、この表面を HSA 溶液とインキュベートした。次に、検出抗体とインキュベートし、さらに、検出抗体に西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)標識二次抗体を結合させた。このように作製されたセンサ界面での酸化還元電位を測定した。

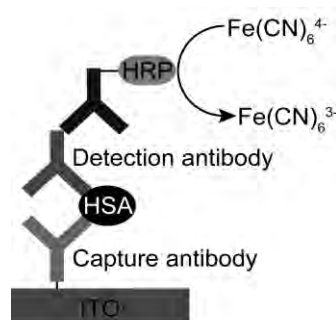
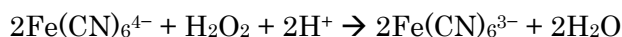


図10 抗原—抗体反応の検出スキーム

電位測定は、9.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、193 mM $\text{CH}_3\text{COOH}\text{-CH}_3\text{COONa}$ 、pH 4.0 溶液中で行った。酸化還元剤が存在する系では、センサの電位はネルンストの式で決定される。

$$E = E^\circ + \frac{2.303RT}{F} \log_{10} \frac{[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]}{[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]} = E^\circ + \text{const} \log_{10} \frac{[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]}{[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]}$$

そして、電位を測定しながら過酸化水素を添加し、下記の酸化還元反応を発生させた。



HRP は上記の酸化還元反応を触媒するため、より多くの HRP 標識二次抗体が存在すれば、より大きな電位変化が発生する。このため、電位変化量から、センサ表面に結合した HSA 量を決定することが可能であるはずである。

測定結果をもとに、過酸化水素を添加してから 1 分後の、HRP 触媒反応による正味の電位変化をプロットしたところ(図11)、0.01 nM 以上の濃度の HSA を検出可能であることが分かった。この

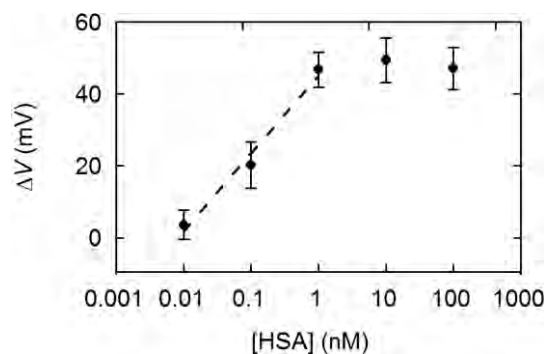


図11 ヒト血清アルブミンの検出

ような系では、酸化剤と還元剤の比によってセンサの電位が明確に決定されるため、電荷直接検出において問題となる電位ドリフトは発生せず、また、センサ間の電位のばらつきもほとんど問題とならない。ここで得られた結果は、酸化還元剤の添加がタンパク質の検出に有効であることを示している。

(2-3) フェニルボロン酸修飾電極によるグルコースの検出

フェニルボロン酸 (PBA) 誘導体は水中において多価水酸基化合物と可逆的に結合する性質を持つが、この結合は PBA の pKa 以上の pH8-9 において強固となり、生体応用の妨げとなってきた。最近我々は pKa を 7 付近に有し、かつ比較的高い水溶性を呈するアクリルアミド誘導体を開発した。

これをトランジスタ界面に導入したグルコースセンサを構築した⁽¹²⁾。図12に示すように、グルコース濃度に依存して、センサの電位応答が変化することが確認された。酵素を用いずに完全合成系の材料で構築できるので、耐環境性、耐熱性に優れ、医療環境の整わない地域でも使用可能である。

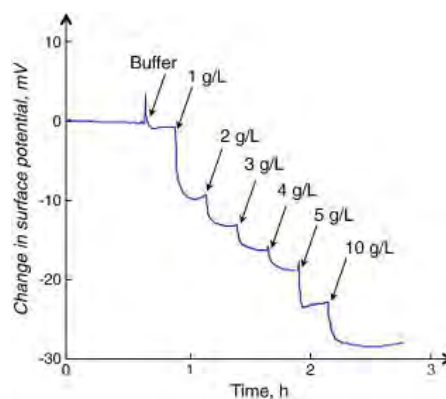


図12 完全合成型グルコースセンサの応答

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Daniel Felix Schaffhauser, Monica Patti, Tatsuro Goda, Yuji Miyahara, Ian Cameron Forster and Petra Stephanie Dittrich, "An Integrated Field-effect Microdevice for Monitoring Membrane Transport in *Xenopus Laevis* Oocytes via Lateral Proton Diffusion", *PLoS ONE*, 2012, *7(7)*, e39238. July 5, 2012, DOI: 10.1371/journal.pone.0039238
2. Tatsuro Goda, Yasuhiro Maeda and Yuji Miyahara, "Simultaneous Monitoring of Protein Adsorption Kinetics using a Quartz Crystal Microbalance and Field-Effect Transistor Integrated Device", *Anal. Chem.*, 2012, *84(17)*, 7308-7314. August 4, 2012 DOI: 10.1021/ac3015092.
3. Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "Interpretation of Protein Adsorption through its Intrinsic Electric Charges: A Comparative Study using a Field-effect Transistor, Surface Plasmon Resonance, and Quartz Crystal Microbalance", *Langmuir*, *28(41)*, 14730-14738. September 19, 2012, DOI: 10.1021/la302977s.
4. Tatsuro Goda, Kozue Masuno, Junko Nishida, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, Akira Matsumoto and Yuji Miyahara, "A Label-free Electrical Detection of Exosomal microRNAs using Microelectrode Array", *Chem. Commun.*, *48(98)*, 11942-11944. published on the web 05 Oct 2012 DOI: 10.1039/C2CC36111F.
5. Hidenori Otsuka, Saya Okimura, Masako Nagamura, Daisuke Matsukuma, Koichi Kutsuzawa, Naoki Matsuda, Tatsuro Nakashima, Hirotaka Okabe. Effect of Low Voltage Pulse on Cell Elimination. *Chem. Lett.*, 2012, *41(12)*, 1636-1638. 20121201 DOI:10.1246/cl.2012.16361
6. Hidenori Otsuka, Masako Nagamura, Akie Kaneko, Koichi Kutsuzawa, Toshiya Sakata, Yuji Miyahara, Chondrocyte Spheroids on Microfabricated PEG Hydrogel Surface and Their Noninvasive Functional Monitoring, *Science and Technology of Advanced Materials*, *13 (6)* 064217, 12.28.2012. (doi:10.1088/1468-6996/13/6/064217)
7. Hidenori Otsuka, Saya Okimura, Masako Nagamura, Daisuke Matsukuma, Koichi Kutsuzawa, Naoki Matsuda, Hirotaka Okabe. Low voltage pulse application to biological cells. *IEICE Trans. ELECTRON*, Vol.E96-C, No.3, pp.348-352 Mar. 2013.
8. Koichi Kutsuzawa, Chihiro Takahashi, Ryohei Sato, Toshihiro Suzuki, Hidehiro Kishimoto, Akiichi Murakami, Takachika Azuma, Ryo Abe, Hidenori Otsuka, Multiarray formation of CHO spheroids cocultured with feeder cells for highly efficient protein production in serum-free medium. *J. Nanosci. Nanotechnol.*,

Volume 13, Number 1, January 2013, pp. 229-235(7). DOI:

<http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2013.7080>

9. Hidenori Otsuka, Masayuki Fukaishi, Takashi Ishizuka, Yoshihiro Saito, Physicochemical characterization of the comb-type Pyridine-co-PEG copolymer at the interface, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Volume 13, Number 1, January 2013, pp. 537-544(8) DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2013.6923>
10. Tatsuro Goda, Ankit Balram Singi, Yasuhiro Maeda, Akira Matsumoto, Masaki Torimura, Hiroshi Aoki and Yuji Miyahara, "Label-free Potentiometry for Detecting DNA Hybridization using Peptide Nucleic Acid and DNA Probes", *Sensors*, 2013, 13(2), 2267-2278. 7 February 2013, DOI: 10.3390/s130202267.
11. Hidenori Otsuka, Masako Nagamura, Akie Kaneko, Koichi Kutsuzawa, Toshiya Sakata. Label-free and noninvasive monitoring of cell differentiation on spheroid microarray. *IEICE Trans. ELECTRON.*, Vol.E96-C, No.3, pp.353-357, 2013/03/01.
12. Akira Matsumoto, Hiroko Matsumoto, Yasuhiro Maeda and Yuji Miyahara, "Simple and Robust Strategy for Potentiometric Detection of Glucose Using Fluorinated Phenylboronic Acid Self-assembled Monolayer", *Biochim. Biophys. Acta* (2013), in press.
13. K. Kutsuzawa, H.Otsuka. Highly efficient production of therapeutic protein by 3D cell culture system using CHO cell spheroid on feeder cells. *Chemical Industry* 2012,63 (9), 62(718)-67(723)
14. Kutsuzawa Koichi, Akaike Toshihiro, Otsuka Hidenori, Medical application of inorganic nanoparticles. *J. Jpn. Soc. Colour Mater.* 2012, 85 (7), 283-288.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 12 件)