

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03551

研究課題名(和文) 機能化グラフェンアレイ構造を用いた高機能イメージバイオセンサの開発

研究課題名(英文) High performance arrayed graphene-based image biosensors

研究代表者

大野 恭秀 (Ohno, Yasuhide)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・准教授

研究者番号：90362623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年合成に成功した大面積単結晶エピタキシャルグラフェンを用いてバイオセンサ応用の研究を行った。これまで機械剥離法やCVD法で作製されたグラフェンは、溶液のpHに対して高感度に反応することが知られていたが、単結晶エピタキシャルグラフェン膜では全く反応しないことが判明した。また、水素イオンだけではなく、基本的にグラフェンはイオンには反応を示さないことが実験的に観測された。例外として、芳香族などのベンゼン環を持つイオン(フタル酸イオンなど)はグラフェン表面と軌道相互作用による反応によって、電気特性に変化が生じることが初めて示された。これらの結果によりグラフェン本来の特性を得ることに初めて成功した。

研究成果の概要(英文)：Biosensing applications based on large-scale, epitaxial graphene film on SiC substrate have been investigated. In the past decade, it has been considered that graphene devices, which were made from conventional mechanical exfoliation and chemical vapor deposition method, can detect solution pH. However, no one can explain why graphene devices can detect solution pH. By using the large-scale, epitaxial graphene film synthesized on a SiC substrate, the electrical characteristics were stable for pH changes. This result indicates that the epitaxial graphene film shows inherent sensing characteristics of graphene. Moreover, from the protein adsorption experiments on the epitaxial graphene film, the charge type of the protein (positive or negative) was independent of the electrical characteristics, indicating the charge transfer from the protein to the graphene film.

研究分野：半導体工学

キーワード：グラフェン バイオセンサ

### 1. 研究開始当初の背景

二次元炭素結晶であるグラフェンを用いたバイオセンサ応用は、研究代表者が 2009 年に報告して以来、年 1000 本の研究雑誌論文が出版されるほど世界中で研究がなされている。ただ、グラフェンを用いたセンサには再現性が悪いという致命的な問題点があり、それが実用化の道を阻んでいる。

### 2. 研究の目的

当初はグラフェンを用いた多項目検出センサを作製することを目的としていた。しかしながら、再現性が悪いという大きな問題の解決が最重要であることが分かり、作製プロセスの見直しを行っていた。その頃、SiC 基板上的エピタキシャルグラフェン成膜技術が飛躍的に向上し、これまでは不可能であったウエハサイズのグラフェン単結晶を得ることに成功したため、このエピタキシャルグラフェン膜を用いて多項目センサには必須である、センサ特性の標準化を行った。エピタキシャルグラフェンの最大の特徴は、これまで必須であった転写プロセスが必要でなかったため、コンタミネーションフリーのグラフェンが得られることである。

### 3. 研究の方法

SiC 基板を加熱してエピタキシャルグラフェンを合成した。レジストなどのコンタミネーションの原因となるプロセスを行わず、PET フィルムによるステンシルマスクリソグラフィを行い、コンタミネーションフリーのグラフェン単結晶デバイスを作製した。このデバイスを用いて溶液の pH、各種タンパク質の検出を行った。

### 4. 研究成果

SiC 基板上に合成したエピタキシャルグラフェンを用いたセンサ実験の模式図及び実験中の写真を図 1 に示す。

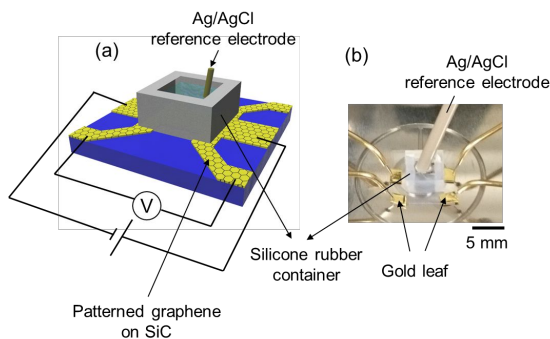


図 1: 実験系の(a)模式図と(b)写真

特徴としては、コンタクト抵抗の影響を排除するために 4 端子測定ができる構造になっていること、電極から溶液へのリーク電流の影

響をなくすために溶液に電極金属が触れない構造になっていることである。エピタキシャルグラフェン膜はコンタミネーションが作製プロセスからも存在せず、しかも全体に渡って単結晶であることから、グラフェン本来のセンシング特性を得ることが期待できる。

これまで pH に対して検出作用があるという報告が多いグラフェンであるが、検出の分解能は異なっており、センサの標準化はできない状態であった。溶液の pH に対するグラフェン本来の特性を調べるに当たり、二種類の溶液を用意した。一つは一般的に pH 測定時に使用される JIS 規格の pH 標準液(フタル酸、リン酸、ホウ酸緩衝液)を混合させて pH 調整したものであり、もう一つはリン酸緩衝液を調合する時に用いるリン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムの割合を変化させて pH を調整したものである。両方とも溶液の濃度は 10 mM に調整した。後者は前者に比べて溶液中に存在するイオンの種類が少ないため、純粋に pH のみの変化を見ることが期待できる。前者は pH の値を 4 から 7 までの間はフタル酸、リン酸緩衝液を混合させて調整し、7 から 9 まではリン酸、ホウ酸緩衝液を混合させて調整した。リン酸緩衝液のみで pH を変化させた者は 6 から 8 まで変化させたものを作製した。これらの溶液中でのドレイン電流 - ゲート電圧特性(伝達特性)の測定結果を図 2 に示す。

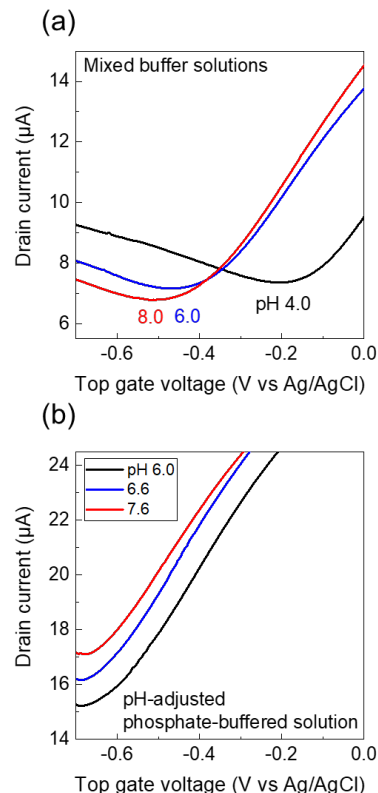


図 2: (a)混合緩衝液と(b)リン酸緩衝液内での伝達特性の pH 依存性

図 2(a)より、混合緩衝液を用いた場合は pH4 から pH7 にかけて伝達特性がゲート電圧の負方向にシフトしている一方、pH7 から pH9 にかけては大きな変化は見られなかった。リン酸緩衝液のみで pH を変化させた溶液の場合は、電荷中性点の電圧の値は変化がなかった。これらの電圧方向のシフトをまとめたものが図 3 である。

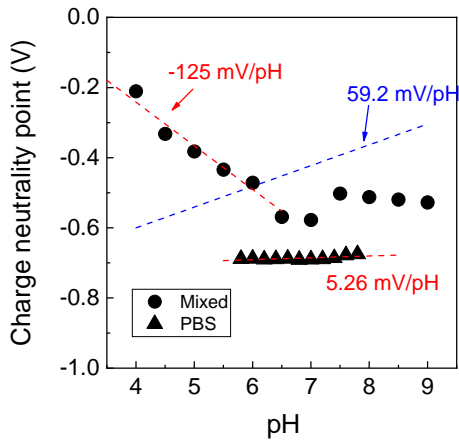


図 3: 電荷中性点の電圧位置の pH 依存性

図中には室温での pH 測定の基準である、ネルンストの関係(59.2 mV/pH)の直線も青色の破線で示している。図 3 より明確にリン酸緩衝液のみで pH を変化させた場合は電荷中性点の位置が変化しないことが分かった。また、JIS 規格の pH 標準液の混合溶液の場合は、pH4 から pH7 まで-125 mV/pH で減少していることが分かる。これはこれまで報告されてきたグラフェンによる pH 検出実験とは全く逆の方向に変化していること、ネルンストの関係とは全く異なることから、pH による変化ではないことが分かる。また、pH7 から pH9 まではほとんど変化していないことから、フタル酸による変化であることが分かった。フタル酸はベンゼンジカルボン酸であることから、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用によりグラフェンとフタル酸が結合したことによる影響だと思われる。これらの結果は作製したデバイス全てに現れた。以上のことより、グラフェンは本来イオンには反応せず、例外的にグラフェン表面と相互作用するイオンのみは反応することが分かった。以上のことは大面積を有する単結晶グラフェン膜を使用することで初めて明確になったことである。

溶液 pH に対する電気特性より、SiC 基板上のエピタキシャルグラフェンはコンタミネーションなどの影響を排除した、本来の特性を評価できることが分かった。また、溶液の pH を変化させて測定する際、フタル酸緩衝液を用いると、フタル酸自体と反応してしまうためにターゲットの評価が難しくなることも分かった。

これらの結果を踏まえてタンパク質の吸着特性を評価した。これまで正(負)に帯電したタンパク質が吸着すると、グラフェンには

負(正)電荷が誘起される、という報告が一般的であったが、これも再現性に問題がある。本研究では、pH 検出実験と同様の実験系でタンパク質の吸着特性を測定した。ターゲットタンパク質としては、牛血清アルブミン(BSA)と $\alpha$ キモトリプシン(CHT)の二種類を用いた。それぞれの等電点は 5.3、8.75 である。pH を変化させてタンパク質溶液を作製し、それぞれの伝達特性を測定した。その BSA についての結果を図 4 に示す。

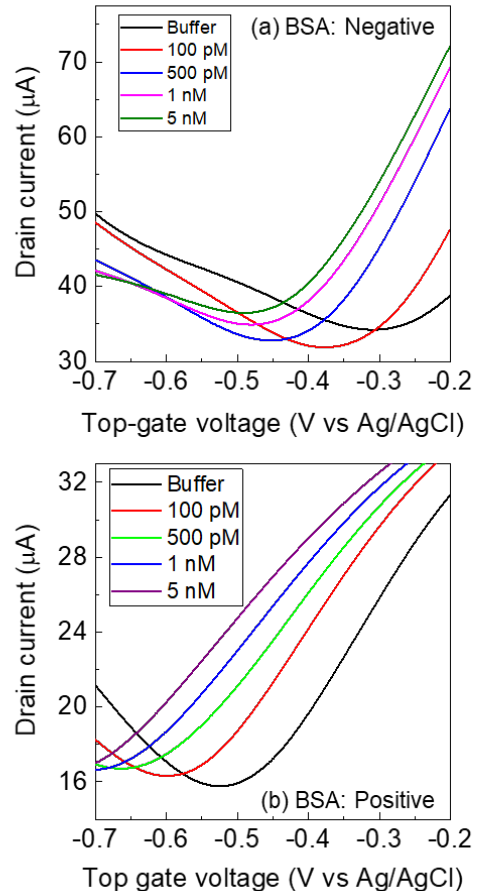


図 4: (a)負に帯電、(b)正に帯電した BSA 吸着時の伝達特性

図 4(a)は pH6.8 において測定したものであり、(b)は pH4.0 において測定したものである。等電点が 5.3 であることから、それぞれ負と正に帯電している。グラフより、帯電の正負に関係なく、タンパク質の濃度が増加すると伝達特性はゲート電圧の負の方向にシフトしていることが分かる。これはこれまで報告されている機械剥離法や CVD 法で合成されたグラフェンを用いた場合における、逆の電荷がグラフェン上に誘起される現象とは完全に異なる。この同じゲート電圧方向にシフトする現象が BSA のみのものではないことを調べるために、CHT を用いて同様の実験を行った。その結果を図 5 に示す。図 5(a)は pH9.2 での測定結果(負に帯電)、(b)は pH6.8 での測定結果(正に帯電)である。グラフを見て分かるように、BSA の時と同様に、帯電の正負にかかわらず伝達特性が CHT 濃度の増加と共に

にゲート電圧の負方向にシフトしていることが分かる。

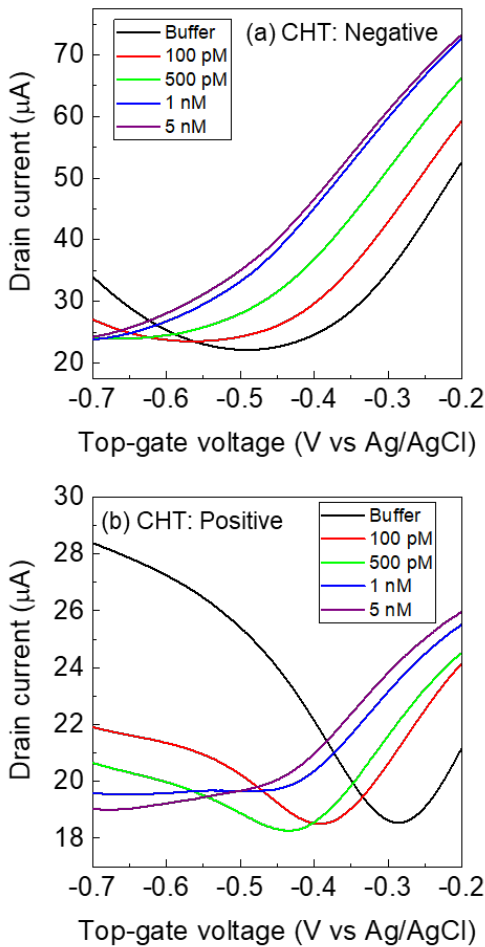


図 5: (a)負に帯電、(b)正に帯電した CHT 吸着時の伝達特性

図 6 に伝達特性のシフト量のタンパク質濃度依存性を示す。濃度が大きくなるにつれ、当初はシフト量が大きく、ある程度の濃度に達するとシフト量は飽和する傾向があることが分かる。この特性はタンパク質の吸着特性であることを示している。

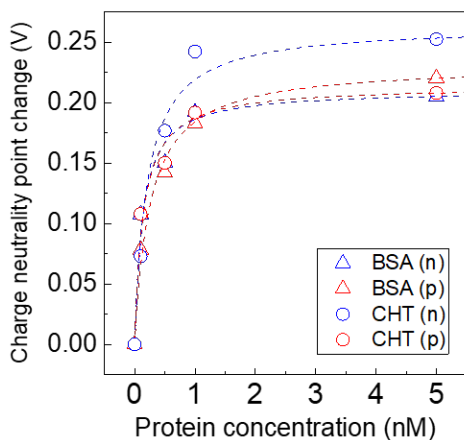


図 6: 伝達特性シフト量のタンパク質濃度依存性

吸着特性であることから、ラングミュアの吸着等温式でフィッティングした結果も一緒に示してあり、非常に良い一致を示すことが分かる。また、このときの解離定数は正・負に帯電した BSA、CHT において約 130-260 pM であり、これは機械剥離法で得られるグラフェンの 1/100 程度の値である。この結果は、一般的に機械剥離法や CVD 法で作製されるグラフェンの移動度は 3,000-5,000 cm<sup>2</sup>/Vs であり、SiC 基板上的エピタキシャルグラフェンは 1,000 cm<sup>2</sup>/Vs 程度であるにも関わらず、移動度の低いエピタキシャルグラフェンの方がタンパク質に対する感度が 100 倍ほど高いことを示している。このタンパク質吸着の実験結果より、エピタキシャルグラフェンではタンパク質 - グラフェン間での電荷移動を検出できているのではないかと考えており、もしそうであるなら電界効果トランジスタを用いたセンサにおける、最大の問題点である電気二重層の厚さによる遮蔽効果を無視してターゲットの検出が可能であることを示唆している。このことについては研究を続けていく予定である。

また、バイオセンサ応用をする場合には、常に非特異吸着が問題になるが、安定な吸着抑制技術はあまりない。特にグラフェンの場合には表面がπ軌道で覆われているため非常に安定であり、一般的に用いられる、BSA 等のタンパク質や Tween20 のようなアルキル基の長い界面活性剤を用いて表面を覆うという方法では、表面を洗うというプロセスを経るだけで剥がれてしまうという欠点がある。本研究では、ホスホリルコリン(ChoP)という分子を用いて安定な非特異吸着抑制技術の開発を行った。ホスホリルコリンはコンタクトレンズや人工臓器にも用いられる分子であり、両性イオンであるために他の分子の吸着を妨げる効果がある。この分子をグラフェンに修飾するために、ピレンとホスホリルコリンを合成して図 7 に示すような新しい分子を合成した。ピレンはグラフェンとπ相互作用により強く結合することが知られており、これによりグラフェン上にホスホリルコリンを強固に結合できる。

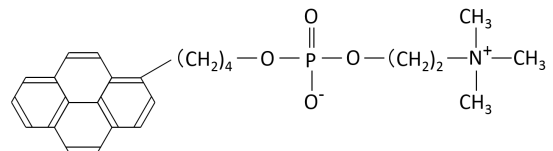


図 7: ホスホリルコリンとピレンの合成分子 (1-pyrenebutnyl-2-(trimethyl-ammonium)ethyl phosphate)

この分子をメタノールに溶かした溶液にグラフェンを浸すことで修飾させた。浸す時間毎に接触角と抵抗の変化量を測定した結果を図 8 に示す。



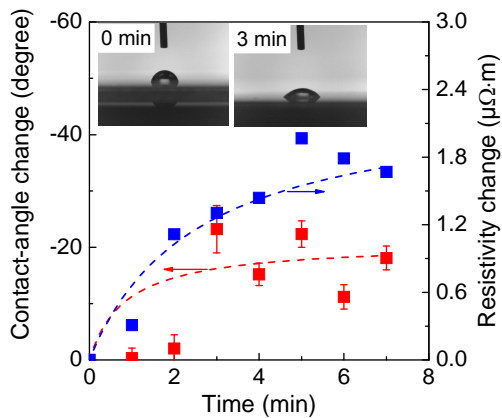


図 8: 接触角と電気抵抗の ChoP 修飾時間依存性。挿入図に修飾前と 3 分修飾後の接触角測定の写真を示す。

接触角・電気抵抗共に修飾時間経過と共に変化していき、5 分ほどで飽和した。接触角については 78° 程度であったものが、60° 程度にまで減少し、本来疎水的なグラフェンが親水化したことが分かった。ChoP は内部に H<sub>2</sub>O を含むので親水化するため、この結果はグラフェンに ChoP が修飾されたことを示している。電気抵抗は 3 倍程度の増加が見られたが、絶縁化するなどの破壊的な修飾ではないことが分かる。

この ChoP 修飾グラフェンデバイスを用いてタンパク質の吸着が抑制可能かを評価した。図 9 に電荷中性点のシフト量を導入したタンパク質濃度に対してプロットしたものを示す。

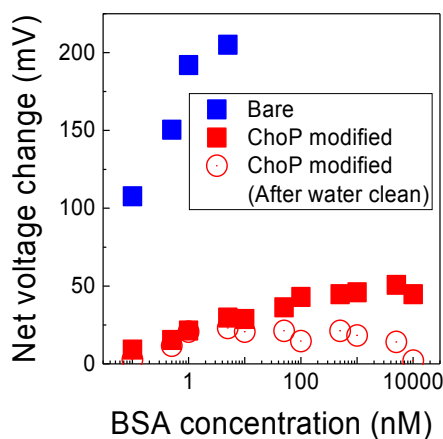


図 9: 伝達特性シフト量のタンパク質濃度依存性

図 9 から、ChoP 修飾グラフェンでは修飾していないものと比較して、タンパク質溶液内で測定してもほとんど伝達特性がシフトしていないことが分かる。これは ChoP が両性イオンであることによる、非特異吸着の抑制が成功していることが示唆される。また、この ChoP 修飾グラフェンを超純水で 15 分ほど洗浄した後、同様の実験を行った結果も、ほ

ぼ同様の結果を示しており、ChoP が非常に安定的にグラフェン上に修飾されていることが分かる。以上の結果から、ChoP によりグラフェンバイオセンサの非特異吸着を安定的に抑制できることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 14 件)

1. Takanori Mitsuno, Yoshiaki Taniguchi, Yasuhide Ohno, Masao Nagase, "Ion sensitivity of large-area epitaxial graphene film on SiC substrate", *Appl. Phys. Lett.*, 査読有, **111**, (2017) 213103. (DOI: 10.1063/1.4994253)
2. Nguyen Thanh Tung, Phan Trong Tue, Truong Thi Ngoc Lien, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Koichi Nishigaki, Manish Biyani, Yuzuru Takamura, "Peptide aptamer-modified singlewalled carbon nanotube-based transistors for high-performance biosensors", *Sci. Rep.*, 査読有, **7**, (2017) 17881. (DOI: 10.1038/s41598-017-18169-1)
3. Yasushi Kanai, Yusuke Ishibashi, Takao Ono, Koichi Inoue, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, "Dynamical thermodiffusion model of graphene synthesis on polymer films by laser irradiation and application to strain sensors", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **56**, (2017) 075102. (DOI: 10.7567/JJAP.56.075102)
4. Yasushi Kanai, Mohamed Almkhtar, Takao Ono, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Kouichi Inoue, Kazuhiko Matsumoto, "Zero-bias conductance anomaly in graphene dots", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **56**, (2017) 06GE07. (DOI: 10.7567/JJAP.56.06GE07)
5. Makoto Kitaoka, Takuya Nagahama, Kota Nakamura, Takuya Aritsuki, Kazuya Takashima, Yasuhide Ohno, Masao Nagase, "Carrier doping effect of humidity for single-crystal graphene on SiC", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **56**, (2017) 085102. (DOI: 10.7567/JJAP.56.085102)
6. Yoshiaki Taniguchi, Tsubasa Miki, Takanori Mitsuno, Yasuhide Ohno, Masao Nagase, Keiji Minagawa, Mikito Yasuzawa, "Fabrication of hydrophilic graphene film by molecular functionalization", *Phys. Status Solidi B*, 査読有, **254**, (2017) 1600524. (DOI: 10.1002/pssb.201600524)
7. D. Terasawa, A. Fukuda, A. Fujimoto, Y. Ohno, Y. Kanai, K. Matsumoto, "Relationship between conductance fluctuation and weak localization in

- graphene", *Phys. Rev. B*, 査読有, **95**, (2017) 125427. (DOI: 10.1103/PhysRevB.95.125427)
8. Takao Ono, Takeshi Oe, Yasushi Kanai, Takashi Ikuta, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin-ichi Nakakita, Yasuo Suzuki, Toshio Kawahara, Kazuhiko Matsumoto, "Glycan-functionalized graphene-FETs toward selective detection of human-infectious avian influenza virus", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **56**, (2017) 030302. (DOI: 10.7567/JJAP.56.030302)
  9. D. Terasawa, A. Fukuda, A. Fujimoto, Y. Ohno, K. Matsumoto, "Temperature dependence of universal conductance fluctuation due to development of weak localization in graphene", *Solid State Commun.*, 査読有, **267**, (2016) 14-17. (DOI: 10.1016/j.ssc.2017.09.002)
  10. Takuya Aritsuki, Takeshi Nakashima, Keisuke Kobayashi, Yasuhide Ohno, Masao Nagase, "Epitaxial graphene on SiC formed by the surface structure control technique", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **55**, (2016) 06GF03. (DOI: 10.7567/JJAP.55.06GF03)
  11. Yasuhide Ohno, Yasushi Kanai, Yuki Mori, Masao Nagase, Kazuhiko Matsumoto, "Top-gated graphene field-effect transistors by low-temperature synthesized SiN<sub>x</sub> insulator on SiC substrates", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **55**, (2016) 06GF09. (DOI: 10.7567/JJAP.55.06GF09)
  12. Takashi Ikuta, Takeshi Oe, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Kazuhiko Matsumoto, "Graphene device array using transfer-free patterned growth on insulator for an electrolyte-gated sensor", *Thin Solid Films*, 査読有, **612**, (2016) 87-90. (DOI: 10.1016/j.tsf.2016.05.040)
  13. Masatoshi Nakamura, Yasushi Kanai, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Kazuhiko Matsumoto, "Graphene-FET-based gas sensor properties depending on substrate surface conditions", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **54**, (2015) 06FF11. (DOI: 10.7567/JJAP.54.06FF11)
  14. Kohei Seike, Yasushi Kanai, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Kazuhiko Matsumoto, "Carbon nanotube single-electron transistors with single-electron charge storages", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **54**, (2015) 06FF05. (DOI: 10.7567/JJAP.54.06FF05)

[学会発表] (計 38 件)

1. Yasuhide Ohno, Taniguchi Yoshiaki, Masao Nagase, "Electrical characteristics of positively and negatively charged protein adsorption to epitaxial graphene film on SiC

- substrate", 2017 Workshop on Innovative Nanoscale Devices and Systems, 2017/11/30, Kohala Coast (USA).
  2. Kitaoka Makoto, Nakamura Kota, Teratani Hitoshi, Yasuhide Ohno, Masao Nagase, "Water adsorption and desorption for graphene on SiC", International Symposium on Epitaxial Graphene 2017, 2017/11/23, 名古屋大学(愛知県).
  3. Taniguchi Yoshiaki, Milki Tsubasa, Yasuhide Ohno, Masao Nagase, Yukihiro Arakawa, Yasushi Imada, Keiji Minagawa, Mikito Yasuzawa, "Intrinsic response of protein adsorption to graphene film on SiC substrate", 2017 International Conference on Solid State Devices and Materials, 2017/9/20, 仙台国際センター(宮城県).
  4. Yasuhide Ohno, Mitsuno Takanori, Taniguchi Yoshiaki, Masao Nagase, "Intrinsic ion sensitivity of graphene field-effect transistors", 2016 Workshop on Innovative Nanoscale Devices and Systems, 2016/12/5, Kohala Coast (USA).
  5. Taniguchi Yoshiaki, Miki Tsubasa, Mitsuno Takanori, Yasuhide Ohno, Masao Nagase, Keiji Minagawa, Mikito Yasuzawa, "Protein adsorption characteristics on bare and phosphorylcholine-modified graphene films on SiC substrate", 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2016/11/11, ANA Crowne Plaza Kyoto (京都府).
- 他  
国際会議 7 件  
国内会議 26 件

[その他]

<http://graphene.ee.tokushima-u.ac.jp/kaken.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大野 恭秀 (OHNO, Yasuhide)  
徳島大学・大学院社会産業理工学研究部  
(理工学域)・准教授  
研究者番号：90362623

### (2)研究分担者

永瀬 雅夫 (NAGASE, Masao)  
徳島大学・大学院社会産業理工学研究部  
(理工学域)・教授  
研究者番号：20393762

前橋 兼三 (MAHASHI, Kenzo)  
東京農工大学・工学研究院・教授  
研究者番号：40229323

金井 康 (KANAI, Yasushi)  
大阪大学・産業科学研究所・助教  
研究者番号：30721310