

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03587

研究課題名(和文) 無線・無電極振動子バイオセンサーを基盤とする次世代診断・創薬ツールの開発

研究課題名(英文) Development of next-generation wireless-electroless oscillator biosensors for diagnosis and drug development

研究代表者

荻 博次 (Ogi, Hirotsugu)

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：90252626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：無線無電極水晶振動子バイオセンサーのMEMS化により、より安定したバイオセンサーの実現が可能となり、夾雑物を含む溶液内での蛋白質の検出や蛋白質の構造変態にともなう粘弾性特性の変化の検出が可能となった。また、全反射蛍光顕微鏡との融合によりアルツハイマー病ペプチドの凝集過程における新たな知見をえることができた。

研究成果の概要(英文)：We have developed MEMS quartz-crystal-microbalance biosensors and succeeded in improving the stability and sensitivity. The high-frequency biosensors allowed us to detect target proteins even in a solution with impurity proteins whose concentrations were much higher than that of target protein. The viscoelasticity was successfully monitored during the structural transduction of Amyloid beta peptide using higher vibrational modes. Furthermore, combination of the wireless-electrodeless QCM in the total internal reflection fluorescence microscopy revealed novel properties of fibrillation of the peptide.

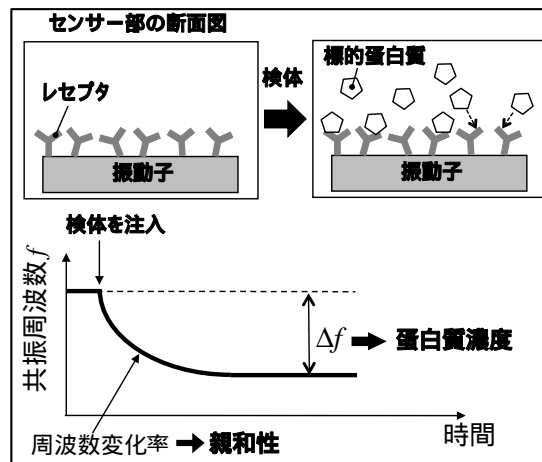
研究分野：超音波工学

キーワード：QCM バイオセンサー 蛋白質相互作用 無線

1. 研究開始当初の背景

バイオセンサーは、生体物質が持つ分子認識能力を利用したセンサーである。血清などの溶液中の特定の蛋白質の検出や蛋白質間の相互作用反応を検知することができ、疾患の早期発見や創薬におけるスクリーニング等への貢献が期待されている。基板に吸着させた標的蛋白質等を様々な物理化学原理を応用して検出する手法が提案されてきた。こういったなか、創薬分野においては、生体分子間反応の親和性を計測することが重要であり(疾患の原因物質に対する薬剤候補物質の親和性が高くなければ高い治療効果が望めないため)これには、生体分子間反応をリアルタイムにモニタリングする必要がある。これを可能とするバイオセンサーの代表として、表面プラズモン共鳴バイオセンサーや水晶振動子微小天秤(QCM)として知られる振動子バイオセンサーが存在する。前者は細胞や大きな凝集体への蛋白質の反応においては、反応場が検知領域(エバネッセント場)から出てしまうために、検出が困難となる。また金属膜を必要とするため顕微鏡との融合は困難である。さらに、チップ表面にチャージを有するためアプタマー等の強いチャージを有する物質を排斥し、それらの検出を困難とする。対して、後者のQCMバイオセンサーでは、振動子に吸着する生体分子を質量として検出するため、検知領域の制限がない。さらにチップ表面にチャージが生じないため、アプタマー等の捕捉が可能である。アルツハイマー病の原因ペプチドのように大きな凝集物を形成する凝集反応の重要性、そして、次世代核酸医薬を支えるアプタマーの蛋白質との相互作用解析の重要性を認識するとき、振動子バイオセンサーこそが創薬イノベーションをもたらす手段であり、実際この分野の研究は世界中で集中的に行われている。

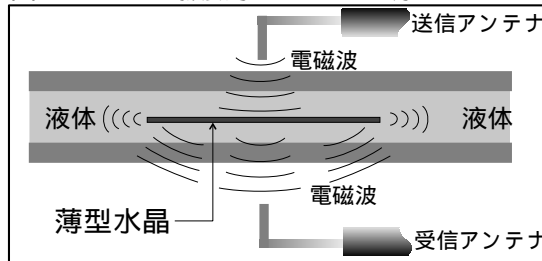
振動子バイオセンサーの原理は図1に示すとおりである。圧電振動子(主に水晶)表面にレセプタ蛋白質を固定化する。そこに検体を注入する。標的蛋白質はレセプタに捕捉され、振動子の見かけの質量が増加する。質量増加にともなう振動子の共振周波数の低下を観測し、標的蛋白質の定量を行う。標識を使用しないために短時間の分析ができ、また、周波数変化率から蛋白質間の親和性を正確に評価することができる。しかし、重大な欠点が存在する。それは標識を使用するバイオセンサーと比較して感度が低いことである。つまり、振動子バイオセンサーの飛躍的な感度向上が診断・創薬イノベーションをもたらすことが十分に認識されていながらもこれが達成されなかった。振動子バイオセンサーの感度は振動子の板厚の自乗に反比例して向上する。薄型化により振動子質量が減少し、吸着する蛋白質の質量が相対的に増加するためである。しかし、圧電体に必須の重い貴



金属電極が動的質量の減少を妨げ、電極への

図1 振動子バイオセンサーの基本原理

図2 ラムネ型振動子センサーの原理



配線の接続が振動を抑制するなどの影響により、薄型化には限界が存在していた。そこで我々は、不可避とされてきた電極と配線を一切用いず、アンテナによって遠隔的に裸の水晶を発振させる技術を確認し、無線・無電極振動子バイオセンサーを世界で初めて実現化し、飛躍的な薄型化を通じて従来感度を大幅に向上させることに成功した。微細流路に閉じ込めた水晶表面に沿って溶液が流れるその構造は、清涼飲料の「ラムネ」のビン内に設置されたビー玉の表面を沿ってジュースが流れ出る様子と似ており、ラムネ型バイオセンサーと命名した。図2に原理を示す。送信アンテナにより電磁波を送り、水晶を共振させる。水晶の振動により励起される電磁波を別のアンテナで受信することで非接触測定が可能となる。溶液は水晶板の両面に沿って流れるため、薄くても液圧による破損が生じない。このセンサーの特徴は3点存在する。

- (1)原理的に水晶振動子をどこまでも薄く(つまり、高感度化)できる点
- (2)無色透明の水晶を用いる点
- (3)センサー表面のチャージをコントロールし得る点

本研究では、これらの特徴を最大限に生かした新しい計測ツールを確立する。

2. 研究の目的

上記(1)の特徴は超高感度化を可能とするだけでなく、発振周波数の上昇による蛋白質層の粘弾性特性の精密評価にもつながる。これにより、夾雑物が多く存在する血清等の中から、特異的に吸着する蛋白質の応答だけを抽出することも可能となる。(2)の特徴は、あらゆる光学顕微鏡との融合を可能とする。生命科学において、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)や共焦点顕微鏡(CFM)は一分子計測が可能な極めて重要な計測ツールであるが、定量性が欠如している。局所的な分子ダイナミクスを観測し得たとしても、親和性等の定量的な情報は得られない。定量性に優れた振動子バイオセンサーとの融合により、「何がどこにどれだけの親和性で結合したか」を解き明かす初めての計測ツールとなる。(3)の特徴は核酸医薬の創出に貢献する。アプタマーは高い蛋白質認識能力を有し、また安価に人口合成が可能のため、抗体に代わる医薬物質として注目されている。しかし、チャージが強く、通常のバイオセンサーではチップ表面に存在するチャージがアプタマーを排斥するため、アプタマー/蛋白質間の親和性の測定は極めて困難であり、結果、重要な薬剤候補を確実に特定できないという問題があった。この問題を解決するためには、チップ表面のチャージをコントロールする必要がある。水晶チップはバイアス電圧を印可した状態でも発振するため、表面チャージをコントロールした計測が可能となる。

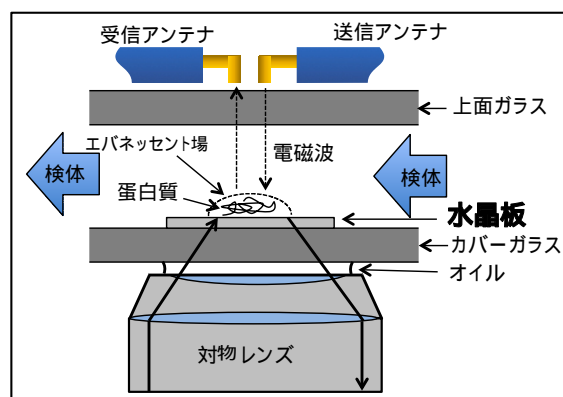
以上の背景および上記の特徴のもと、本課題においては、ラムネ型バイオセンサーにさらなる進化を起し、診断と創薬分野における計測ツールとして定着させるための基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

ラムネ型バイオセンサー内の送液状態を改善するために、振動子直線のピラーの本数を増加させる。ガラス基板/Si基板/ガラス基板の3層構造とし、Si基板内にマイクロ流路を作製する。

また、本プロジェクトの重要な要素技術である水晶バイオセンサーの顕微鏡への融合を実施する。このため、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)との融合を行う。ほとんどのバイオチップは金属膜で覆われており、TIRFMとの融合は非常に困難であった。透明な水晶を使用する本課題のバイオセンサーには、この制限は存在しない。そこで、図3に示すように、対物レンズ上にカバーガラスを含む流路を作成し、裸の水晶振動子をカバーガラス上に設置する。流路の外側に送受信アンテナを設置し、水晶を非接触で発振させる。対物レンズから励起光を入射し、水晶上にエバネッセント場を形成し、蛍光標識からの発光を検出する。同時に、水晶振動子の周波数変化から吸着した蛋白質の量を評価する。

さらに、チャージ制御型アプタマー/蛋白質解析装置の開発を開始する。ラムネ QCM に



対してバイアスのチャージを印加して、アプタマーの固定化を実施し、標的蛋白質をフロ
図 3 全反射蛍光顕微鏡と無線無電極水晶振動子の融合

ーする。

また、基本周波数を f_1 とすると、奇数の高次モード (f_3, f_5, \dots) が観測されるが、高次モードにおいては、速い変位速度に粘弾性体が追従できなくなり、慣性抵抗が薄れ周波数応答量が低下する。これは、蛋白質層の粘弾性を如実に反映した現象であり、複数の高次モードの周波数変化を同時に計測すれば、粘弾性係数が得られる。ただし、周波数が高くなれば粘弾性が周波数応答に反映されない。このため、これまでは減衰(散逸)も同時に計測し、粘弾性を評価してきた。しかし、減衰測定はあらゆる外乱の影響を敏感に受け結果が大きくばらつく。理想的には、計測精度の高い周波数だけから粘弾性特性を評価すべきであるが、これまでの低周波数のバイオセンサーではこれをなし得なかった。ところが、ラムネ型バイオセンサーでは、基本周波数の大幅増加が可能であり、初めて周波数情報だけから蛋白質の粘弾性の正確な評価が可能となる。そこで、基本周波数 55 MHz のラムネ型バイオセンサーを用い、基本モードから 9 次モードまでの周波数変化を同時計測するシステムを開発し、高次モードを含めた周波数応答から逆計算によりアミロイド

ペプチドの構造変態にもなう粘弾性係数をモニタリングする。

4. 研究成果

ピラー数を増加した新たな MEMS 水晶振動子バイオセンサーを開発した。安定性と感度の大幅は向上を確認し、これを使用して夾雑物中のバイオマーカーの検出を行った。炎症反応のマーカーとして C 反応性タンパク質(CRP)をターゲット蛋白質とし、リン酸緩衝溶液に CRP を混入した場合と、さらに夾雑物として牛血清アルブミンを CRP の最大 10 万倍まで混入した溶液を用いた。結果、濃度定量に夾雑物の影響はほとんど現れないことが判明した。また、バイアス電場を印加しアプタマーを固定化するシステムの開発を開始した。水晶振動子の片側からバイアス電場を印加して表面にアプタマーを固定

化する原理である。結果、アプタマー固定を裏付ける有意なデータが得られた

また、全反射蛍光顕微鏡水晶振動子バイオセンサーを開発し、アルツハイマー病の原因蛋白であるアミロイド ペプチドの凝集および融解反応のモニタリングを行った。アミロイド 線維を全反射蛍光顕微鏡により観察し、これがアントシアニンにより融解する様子を、QCM および蛍光顕微鏡の両方で評価した。結果、線維構造と融解能との関連性を強く示す結果を得た。また、超音波を集束してES細胞に照射した際の、ES細胞の分化誘導に与える影響を調べる実験を開始した。マウスES細胞を用いた。培養液を介してES細胞に超音波を照射し、その後の分裂や発生に及ぼす影響を調べるためのシステムを構築した。また、ラムネ型バイオセンサーによる粘弾性計測法のシステムを確立することに成功した。これまでは知られていない蛋白質構造変化と粘弾性量との関係を見出すことに成功した。さらに、超音波照射によるアミロイド ペプチドの異常凝集現象の解明を行うことに成功した。超音波キャピテーションが通常では起こりえない核生成反応を引き起こすことを実験的・理論的に世界で初めて解明することに成功した。

また、水晶振動子の位置付けを正確に行うための工夫をもうけ、さらに、溶液の攪拌効果をより高くするための、ピラーの配置と数を工夫した。これを実際に製作し、無線・無電極状態で駆動させることに成功した。その際、アンテナ形状やアンテナの位置等の最適化も行った。シリコンウェーハに、ドライおよびウェットエッチングを施してマイクロ流路を作成し、同様に、2枚のガラスウェーハにもウェットエッチングにより流路を形成し、これらを陽極接合によって接合した。ガラスウェーハからマイクロピラーを複数伸ばし、振動子の把持を行う構造とした。この振動子バイオセンサーでは、安定性が向上、高周波においても高い発振効率により発振させることができた。そして、アミロイド ペプチドの凝集反応をモニタリングすることができ、さらに、その形態変化と力学的特性(粘弾性)変化との関係を捉えることに成功した。また、アプタマーを静電的に水晶上に固定化する実験システムを構築し、これが可能であることを立証することができた。さらに、全反射蛍光顕微鏡との融合のための新しいセンサーを設計・開発し、これにより、アミロイド ペプチドの凝集反応をQCMおよび全反射蛍光顕微鏡の両方でモニタリングすることに成功した。

さらに、ガラスのマイクロピラーとシリコンのマイクロピラーの数を2倍以上増加させた新型のMEMS水晶振動子バイオセンサーを設計した。さらなる水晶振動子の薄型化においても使用することのできるマイク

ロ流路を意図したものである。これをもちいることにより、周波数が500MHz以上に於いて、発振することを確認することができた。血清中においては、血清の高い粘性に、振動子バイオセンサーの共振周波数のベースラインが依存してしまうが、界面活性剤を少量混入させることにより、この影響を低減させることができた。このことを利用し、血清中のみの結果と、血清中にバイオマーカーが存在するときの結果を比較することにより、血清中のバイオマーカーの検出が可能となる。実際、血清中のCRPの検出が可能である結果を得た。

さらに、全反射蛍光顕微鏡によるアルツハイマー病原因ペプチドであるアミロイドの凝集反応およびアントシアニンによる融解反応をリアルタイムに観測することに成功した。特定のアントシアニンによる融解反応は、反応開始にいたるまでに、ラグタイムが存在することを初めて見出した。融解反応において、線維末端から進行するタイプや線維の中央から進行するタイプなど複数の融解反応のタイプが存在することを明らかとした。形成された多数の線維の融解反応を個々に観測したことにより各線維の形態と融解速度との関係があきらかとなった。

また、アミロイド ペプチドが、水晶振動子上で線維化現象を示すときに、剛性率が増加することを見出した。これは、周波数が500MHzを越える高次モードにおける発振が可能となったために見出された現象であり、原子間力顕微鏡により、その原因が、アミロイド線維の形成によるものであることを明らかとした。

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8件)

1. K. Nakajima, H. Ogi, K. Adachi, K. Noi, M. Hirao, H. Yagi, and Y. Goto, "Nucleus factory on cavitation bubble for amyloid fibril", Scientific Reports, 6, 22015 (2016).
2. T. Shagawa, H. Torii, F. Kato, H. Ogi, and M. Hirao, "Viscoelasticity evolution in protein layers during binding reactions evaluated by a high-frequency wireless and electrodeless QCM biosensor without dissipation", Japanese Journal of Applied Physics, 54, 96601 (2015).
3. 荻 博次, "無線・無電極水晶振動子バイオセンサーの原理と応用", 化学とマイクロ・ナノシステム学会誌, 14, 24-29 (2015).

4. Yen-Ting Lai, Hirotsugu Ogi, Arihiro Iwata and Masahiko Hirao, "Viscoelasticity response during fibrillation of amyloid peptides on quartz crystal microbalance biosensor", Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics, 37, 3E2-3 (2016).
5. Masaki Yamato, Takashi Matsuzaki, Ryo Araki, Shota Tsuchida, Keiji Okuda, Hai Ying Fu, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Yoshihiro Asano, Masanori Asakura, Hiroomi Torii, Kentaro Noi, Hirotsugu Ogi, Ryo Iwamoto, Eisuke Mekada, Seiji Takashima, Masafumi Kitakaze, Yasushi Sakata, Tetsuo Minamino, "RNA aptamer binds heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor with high affinity and specificity and neutralizes its activity", International Journal of Gerontology, 11, 191-196 (2017).
6. 荻博次, "無線振動子バイオセンサの原理と応用", 電子情報通信学会 基礎・境界ソサイエティ Fundamentals Review, 11, 180-185 (2017).
7. Fumihito Kato, Hiroyuki Noguchi, Jun Kishinami, Chihaya Kimura, Taichi Kobayashi, Takumi Kobayashi, Keita Komori, Hirotsugu Ogi, "Sequential Detection of Immunoglobulin G via Nonspecific Adsorbed Staphylococcal Protein A Using PDMS Quartz Crystal Microbalance Sensor", Proceedings of The 38th Symposium on Ultrasonic Electronics, 38, 2P3-9 (2017).
8. Kentaro Noi and Hirotsugu Ogi, "Dynamic characterization of amyloid-fibril formation of Amyloid beta peptide using total-internal-reflection fluorescence microscopy coupled with quartz-crystal microbalance biosensor", Proceedings of The 38th Symposium on Ultrasonic Electronics, 38, 3P2-8 (2017).

[学会発表](計10件)

1. 岩田有弘、鳥居宏臣、荻博次、平尾雅彦, "UHF帯MEMS無線水晶振動子バイオセンサによる夾雑物中のマーカー蛋白質の無標識検出", 第63回応用物理学

会春季学術講演会, 2016年03月19日~2016年03月22日, 東京工業大学 大岡山キャンパス、目黒区.

2. Hirotsugu Ogi, "Ultrafast Propagation of Amyloid beta Fibril in Oligomer Cloud", PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION (Joint Symposium between IPR and RSC)(招待講演)(国際学会), 2015年11月14日~2015年11月16日, Australian National University、オーストラリア
3. 中島吉太郎, 荻博次, 平尾雅彦, 後藤祐児, "Study on aggregation reactions of amyloid peptides induced by ultrasonic irradiation and stirring agitation", 第36回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, 2015年11月05日~2015年11月07日, つくば国際会議場、つくば市.
4. 鳥居宏臣、荻博次、平尾雅彦、山戸昌樹、松崎高志、南野哲男, "Detection of target protein via aptamer electrostatically immobilized on wireless-electrodeless QCM biosensor chip", 第36回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, 2015年11月05日~2015年11月07日, つくば国際会議場、つくば市.
5. 岩田有弘、鳥居宏臣、荻博次、平尾雅彦, "500 MHz帯無線MEMS水晶振動子バイオセンサの開発と夾雑物中の標的タンパク質の無標識検出", 第76回応用物理学学会秋季学術講演会, 2015年09月13日~2015年09月16日, 名古屋国際会議場、名古屋市.
6. 山田晃大朗、西岡大介、中島吉太郎、荻博次、平尾雅彦、後藤祐児, "核依存アミロイド線維の凝集過程及び線維融解過程のTIRFM-QCMによる直接観察", 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年06月07日~2016年06月09日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市).
7. 荻博次, "超音波による蛋白質の凝集制御", 日本応用物理学会第77回秋季大会学術講演会(招待講演), 2016年09月13日, 新潟朱鷺メッセ(新潟県新潟市).
8. Hirotsugu Ogi, "Development of TIRFM coupled with wireless-electrodeless

QCM biosensor: Find and sound out fibrillation and fibril-dissociation phenomena”, IPR Seminar / RIKEN Symposium: New Frontiers in Protein Misfolding and Aggregation(招待講演)(国際学会), 2017年01月27日,大阪大学タンパク質研究所(大阪府吹田市).

9. Hirotsugu Ogi, “Ultrasonic cavitation and fibrillation phenomenon of protein”, Australian National University (ANU) & IPR 2nd Joint Symposium 2017 “PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION”(招待講演)(国際学会), 大阪大学蛋白質研究所、吹田市 (2017).

10. Hirotsugu Ogi, “Ultra-High-Frequency Wireless MEMS QCM Biosensor for Direct Detection of Biomarkers in Serum”, 2017 IEEE International Ultrasonics Symposium(国際学会), WASHINGTON D.C., USA, SEPTEMBER 6-9, (2017)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-qm.prec.eng.osaka-u.ac.jp/pmwiki/pmwiki.php/Main/Research>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻 博次 (OGI, Hirotsugu)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90252626

(2) 研究分担者

南野 哲男 (MINAMINO, Tetsuo)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 30379234

(3) 研究分担者

後藤 祐児 (GOTO, Yuji)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号: 40153770

(4) 研究分担者

中村 暢伴 (NAKAMURA, Nobutomo)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 50452404