

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03986

研究課題名(和文)核形成位置制御法によるグラフェン素子の作製とインフルエンザウイルスの高感度検出

研究課題名(英文) Position-controlled graphene with high quality and glycan-functionalized graphene devices for influenza virus

研究代表者

前橋 兼三 (Maehashi, Kenzo)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40229323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖鎖ブローブをグラフェン上に修飾し、インフルエンザウイルス高感度検出を試みた。まず、核形成位置制御法により高性能デバイスを作製した。これは、マイクロパターンを形成させ、その内に形成される核密度を制御しグラフェンの結晶性を向上させる。その結果、移動度が数倍向上することが分かった。次に、インフルエンザウイルスの代わりに、ヒト・鳥型糖鎖それぞれに特異的な結合を示すニホンワトコレクチンとイヌエンジュレクチンの検出を行った。グラフェンに糖鎖を修飾することにより、高感度に特異的なレクチンの検出に成功した。以上より、糖鎖修飾グラフェンデバイスは、インフルエンザウイルスを高感度検出に有効である。

研究成果の概要(英文)：There are global concerns about threat of pandemic caused by the human-infectious avian influenza virus. Graphene devices realize such high-sensitive electrical detection of the targets, owing to graphene's high carrier mobility. In this study, we have succeeded in growing position-controlled graphene which has high carrier mobility by tuning the nucleation density on catalytic copper surface. Moreover, graphene was functionalized using sialoglycans and employed for the selective detection of lectins from Sambucus sieboldiana and Maackia amurensis as alternatives of the human and avian influenza viruses. Glycan-functionalized graphene devices selectively monitored the sialoglycan-specific binding reactions at subnanomolar sensitivity.

研究分野：半導体物性

キーワード：グラフェン インフルエンザウイルス 糖鎖 核形成位置制御法

1. 研究開始当初の背景

近年、途上国において人に感染する能力を持った鳥インフルエンザウイルスが数多く報告され、その致死率の高さから人から人へ感染を起こす「新型変異ウイルス」を早急に発見するシステムが求められている。現在、新型変異ウイルスの検出方法は、ウイルスの数が少ないと検出できないため、途上国で発生した新型変異ウイルスを一旦国外に持ち出し、BSL-3 管理区域内で培養を行った後に検出が行われている。この方法では時間がかかることはもちろん、万が一にも管理区域外にウイルスが漏れてしまった場合には、重大なバイオハザードが発生する危険性がある。このような現状から、新型変異ウイルスが発生した途上国内でも使用できる、簡便で高感度なセンシングシステムの早急な開発が熱望されている。

2. 研究の目的

本研究は、糖鎖プローブをグラフェンチャンネル上に修飾することにより、インフルエンザウイルス高感度検出システムを創生することである。そのために、まず、核形成位置制御法による高性能グラフェンデバイスのアレイ構造を作製する。これにより、高移動度を有するグラフェンデバイスが形成可能になり、高感度にウイルスを測定可能となる。本研究では、インフルエンザウイルスの代わりに、ヒト・鳥型糖鎖それぞれに特異的な結合を示すニホンニワトコレクチン(SSA)とイヌエンジュレクチン(MAM)の検出を行った。

3. 研究の方法

(1)「核形成位置制御法による高性能グラフェンデバイスのアレイ構造の作製」では、まず、Cu 基板を大気中で加熱することにより Cu 酸化膜を形成する。次に、図 1 に示すようにフォトリソグラフィにより、一部分の Cu 酸化膜をエッチングによって除去する。CVD 炉に導入し、グラフェンを選択的に生成した。

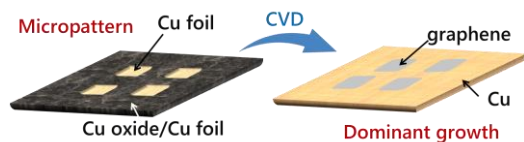


図 1 核形成位置制御法によるグラフェンの選択的生成

(2)「糖鎖プローブをグラフェンチャンネル上に修飾することにより、インフルエンザウイルス高感度検出」では、グラフェンデバイスを用いて、ウイルスを検出する為には、グラフェン表面を糖鎖アレイで修飾する必要がある。そのため、図 2 に示すように、1 ピレンブタン酸スクシンイミジルエステルを用いて糖鎖プローブをグラフェンへ結合可能な誘導体化を行い、アプタマーや抗体と同様に

アミド結合で糖鎖プローブをグラフェン表面へ修飾した。その後、SSA と MAM を滴下した。

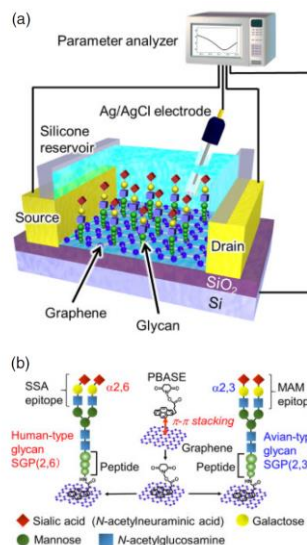


図 2 (a)糖鎖修飾グラフェンデバイスを用いたインフルエンザウイルスの検出方法、(b) グラフェン上へのヒトまたは鳥型糖鎖の修飾方法

4. 研究成果

(1)「核形成位置制御法による高性能グラフェンデバイスのアレイ構造の作製」

フォトリソグラフィと酸化銅のウェットエッチングを用いて、300°C で酸化した銅酸化層から金属銅が露出した 100 μm 四方のマイクロパターンを作製した。CVD でのグラフェン形成の条件を最適化することにより、図 3 に示すように、金属銅が露出した領域にグラフェンを選択的に成長させることに成功した。しかしながら、パターン内には結晶核が多く、結晶バウンダリーが多数存在するため、結晶性が良好ではない。

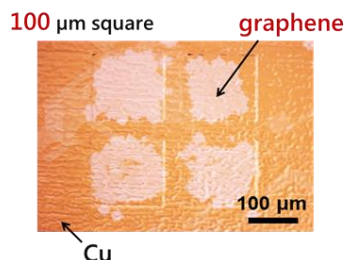


図 3 マイクロパターンを用いたグラフェンの光学顕微鏡像

そのため、次に、そのパターンサイズを変化させることで、内部にある結晶数の制御を試みた。図 4 に示すように、パターンサイズを 150 から 50 μm まで変化させると、パターン内の結晶数が減少し、75 μm 内では結晶数が一個程度になることが明らかになった。したがって、パターンサイズを変化させることで、グラフェンの選択形成だけでなく、内部にある結晶数の制御も可能になるといえる。

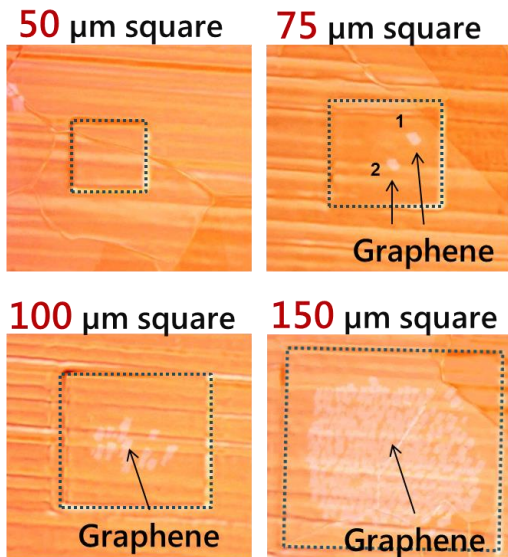


図4 パターンサイズを50から150 μm まで変化させた場合の光学顕微鏡像

さらに、成長時間を増加させることにより、グラフェンの面積をデバイスのチャネル程度に増加させた。そのラマンマッピングを測定することにより、結晶核の部分の構造が明らかになった。最後に、得られたグラフェンの電気測定を行った。図5にパターンサイズが75および100 μm の時の伝達特性を示す。パターンサイズが100から75 μm に減少することにより、移動度が1,600から2,400 cm^2/Vs に増加することが明らかになった。これは、パターンサイズを減少させることにより、核密度が減少し、その結果、結晶性の高いグラフェンが形成されたことを示唆している。

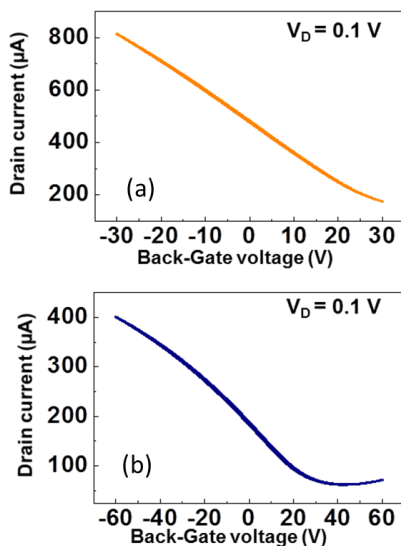


図5 パターンサイズが(a)75 および(b)100 μm の時の伝達特性

以上により、核形成位置制御法を用いることにより、移動度が数倍向上することが明らかになった。

(2)「糖鎖プローブをグラフェンチャネル上に修飾することにより、インフルエンザウイルス高感度検出」

図6(a)に、ヒト型糖鎖を修飾したグラフェンデバイスに150 nMのSSAを導入前後での伝達特性を示す。導入後に電流が増加しているが、これは電荷を持ったSSAが糖鎖に結合することにより伝達特性が正方向にシフトしたことに起因する。図6(b)に、SSAの濃度を0.13~280 nMまで変化させ導入した後のドレイン電流の変化を示す。電流が濃度の増加とともに、増加していることが分かる。

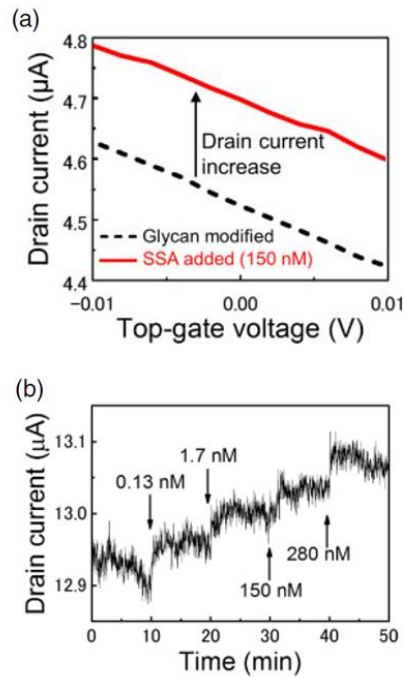


図6 (a)ヒト型糖鎖を修飾したグラフェンデバイスに150 nMのSSAを導入前後での伝達特性、(b)SSAの濃度を0.13~280 nMまで変化させ導入した後のドレイン電流の変化

図7にグラフェンデバイスのレクチンの選択的検出の結果を示す。ヒト型糖鎖修飾デバイスでは特異的なSSAにおいて大きなドレイン電流の変化が生じたが、非特異的なMAMおよびタンパク質においては小さなドレイン電流変化であった[図7(a)]。一方、鳥型糖鎖修飾デバイスにおいても同様に特異的なMAMのみドレイン電流の大きな変化が見られた[図7(b)]。以上の結果より、糖鎖修飾グラフェンデバイスは選択性を有しており、ヒト感染能力を得た鳥インフルエンザウイルスを検出できる能力を有していることを示している。

したがって、糖鎖修飾グラフェンデバイスを用いることにより、鳥インフルエンザ、および、ヒト間伝播能力を獲得した新型変異ウイルスを早期検出可能であると思われる。これにより、これまで不可能であった新型インフルエンザの世界流行の発生監視、世界流行の事前封じ込め、地球規模の防疫体制を可能

となると考えられる。

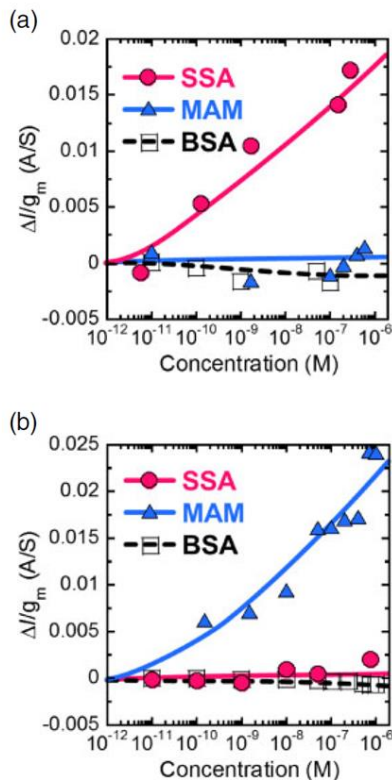


図 7 (a) ヒト型糖鎖修飾デバイスでの SSA、MAM、BSA の濃度変化、(b) 鳥型糖鎖修飾デバイスでの SSA、MAM、BSA の濃度変化

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 6 件)

- ① S. Okuda, T. Ono, Y. Kanai, M. Shimatani, S. Ogawa, T. Ikuta, K. Inoue, K. Maehashi, and K. Matsumoto, “Graphene Surface Acoustic Wave Sensor for Simultaneous Detection of Charge and Mass”, ACS Sensors 3 (2018) 200-204. 査読有
DOI: 10.1021/acssensors.7b00851
- ② T. Ono, T. Oe, Y. Kanai, T. Ikuta, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, Y. Watanabe, S. Nakakita, Y. Suzuki, T. Kawahara, K. Matsumoto, “Glycan-functionalized graphene-FETs toward selective detection of human-infectious avian influenza virus”, Jpn. J. Appl. Phys. 56 (2017) 030302-030302. 査読有
<https://doi.org/10.7567/JJAP.56.030302>
- ③ T. Ono, Y. Kanai, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, K. Matsumoto, “Lab-on-a-Graphene: Functionalized Graphene Transistors and Their Application for Biosensing”, Carbon-related Materials in

Recognition of Nobel Lectures (2017) 79-90. 査読有

https://doi.org/10.1007/978-3-319-61651-3_4

- ④ Y. Kanai, Y. Ishibashi, T. Ono, K. Inoue, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, “Dynamical thermodiffusion model of graphene synthesis on polymer films by laser irradiation and application to strain sensors”, Jpn. J. Appl. Phys. 56 (2017) 075102 ~ 075102. 査読有
<https://doi.org/10.7567/JJAP.56.075102>
- ⑤ T. Ikuta, T. Oe, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, K. Matsumoto, “Graphene device array using transfer-free patterned growth on insulator for an electrolyte-gated sensor”, Thin Solid Films 612 (2016) 87-90. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2016.05.040>
- ⑥ K. Maehashi, Y. Ohno, and K. Matsumoto, “Utilizing research into electrical double layers as a basis for the development of label-free biosensors based on nanomaterial transistors”, Nanobiosensors in Disease Diagnosis 5 (2016) 1-13. 査読有
<http://dx.doi.org/10.2147/NDD.S40316>

[学会発表] (計 15 件)

- ① 山本佳織、小野堯生、牛場翔太、金井康、谷奥正巳、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、渡邊洋平、中北慎一、河原敏男、鈴木康夫、木村雅彦、松本和彦、「グラフェン FET 上でのインフルエンザウイルス/抗体結合のウレアーゼ反応による検出」第 65 回応用物理学会春季学術講演会 2018 年 3 月 17-20 日早稲田大学(東京)
- ② 山中天志、白井充、小野堯生、牛場翔太、金井康、谷奥正巳、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、渡邊洋平、中北慎一、河原敏男、鈴木康夫、木村雅彦、松本和彦、「インフルエンザウイルスのヒト感染性と亜型の鑑別」第 65 回応用物理学会春季学術講演会 2018 年 3 月 17-20 日早稲田大学(東京)
- ③ S. Okuda, T. Ono, Y. Kanai, M. Shimatani, S. Ogawa, T. Ikuta, K. Inoue, K. Maehashi, and K. Matsumoto, “Chemical Sensing using Graphene-based Surface-Acoustic-Wave Sensor”, 2017 Int. Conf. Solid State Devices and Materials (2017) Sept. 19-22, 国際会議場 (宮城・仙台)
- ④ 川田拓哉、小野堯生、金井康、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、渡邊洋平、河原敏男、鈴木康夫、中北慎一、松本和彦、「細胞表面環境を模したグラフェン FET によるインフルエンザウイルス検出」第 77 回

- 応用物理学会秋季学術講演会 2017年9月5日～8日 福岡国際会議場 (福岡)
- ⑤ 河原敏男、平松宏明、大海雄介、鈴木康夫、林京子、中北慎一、渡邊洋平、大野恭秀、前橋兼三、小野堯生、金井康、松本和彦、「インフルエンザバイオセンサー開発のための糖鎖分子の比較」第77回応用物理学会秋季学術講演会 2017年9月5日～8日 福岡国際会議場 (福岡)
- ⑥ K. Kamada, T. Ono, R. Hayashi, Y. Kanai, K. Inoue, Y. Ohno, K. Maehashi, Y. Watanabe, S. Nakakita, Y. Suzuki, T. Kawahara, S. Contera and K. Matsumoto, “Reaction of Viral Proteins and Sialoglycan on Biomimetic Graphene Surface Measured by Liquid Atomic Force Microscope and Graphene Field-Effect Transistor”, 59th Electronic Materials Conference (2017) Jun. 28-30 サウスベント(アメリカ)
- ⑦ T. Ono, Y. Kanai, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, and K. Matsumoto, “Measurement of Enzymatic Reaction Using Graphene Field-Effect Transistor and Microwell for Detection of Helicobacter Pylori”, 59th Electronic Materials Conference (2017) Jun. 28-30 サウスベント(アメリカ)
- ⑧ T. Kawahara, H. Hiramatsu, Y. Suzuki, S. Nakakita, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, T. Matsuba, and R. Utsunomiya, “Developments of the nano-carbon bio sensors using glycan for influenza virus” 13th Int. Conf. on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (2016) Oct. 9-15, ローマ (イタリア)
- ⑨ K. Maehashi, “Electrical detection of biomolecules using graphene-based devices”, PRiME (2016) Oct. 2-7, ハワイ (アメリカ) 招待講演
- ⑩ 河原敏男、平松宏明、鈴木康夫、中北慎一、渡邊洋平、大野恭秀、前橋兼三、小野堯生、金井康、松本和彦、「インフルエンザバイオセンサー開発のための糖鎖分子の検討」第76回応用物理学会秋季学術講演会 2016年9月13日～16日 朱鷺メッセ (新潟)
- ⑪ T. Ono, Y. Kanai, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, and K. Matsumoto, “An Application of Graphene Field Effect Transistor to Enzymatic Assay” The 43rd Int. Symp. on Compound Semiconductor (2016) Jun. 23-30, 富山国際会議場 (富山)
- ⑫ K. Maehashi, “Position-Controlled graphene Synthesis and Development of Biological Sensors and Molecular Devices”, The 11th Annual IEEE Int. Conf. on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (2016) Apr. 17-20, 松島 (宮城) 招待講演
- ⑬ 森祐樹、生田昂、金井康、小野堯生、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、松本和彦「エッチングフリーな単結晶グラフェンデバイスアレイの作製」第63回応用物理学会春季学術講演会 2016年3月19～22日 東京工業大学 (東京)
- ⑭ Y. Mori, T. Ikuta, T. Ono, Y. Kanai, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue and K. Matsumoto, “Position-Controlled Graphene Growth Using Micropatterning on Catalytic Copper Surface”, 28th Int. Microprocesses and Nanotechnology Conference (2015) Nov. 10 - 13, 富山国際会議場 (富山)
- ⑮ 森祐樹、生田昂、小野堯生、金井康、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、松本和彦「銅触媒表面のマイクロパターニングによるグラフェンの位置制御成長」第76回応用物理学会秋季学術講演会 2015年9月13～16日 名古屋国際会議場 (名古屋)
- [その他]
ホームページ：
<http://web.tuat.ac.jp/~maehashi/index.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
前橋 兼三 (MAHASHI, Kenzo)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：40229323
- (2) 研究分担者
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
- 金井 康 (KANAI, Yasushi)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：30721310
- 生田 昂 (IKUTA, Takashi)
東京農工大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：80805929