

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13638

研究課題名(和文) グラフェンを用いた酵素反応の計測とその応用

研究課題名(英文) Measurement of enzymatic reaction using graphene and its application

研究代表者

小野 堯生 (Ono, Takao)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：00752875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グラフェンの特性を利用した生化学研究のための新たなプラットフォーム"Lab on a graphene"構想の第一歩として、グラフェントランジスタ表面のセンシング領域がデバイ長の範囲内にとどまるという問題を解消するため、「酵素反応産物による電気的な生体分子検出」と「反応系のマイクロメートルスケールへの封じ込め」を用いたバイオセンシング技術を開発した。グラフェン上に酵素分子ウレアーゼを捕捉して反応産物を検出することに成功し、また捕捉した病原体を酵素反応産物を指標に検出することにも成功した。本法により、デバイ遮蔽による限界を超えた高感度なバイオセンシングが可能であることが実証された。

研究成果の概要(英文)：In this project, I developed a biosensing technology using "electrical detection of enzyme product by graphene transistor" and "encapsulation of reaction system in microdroplet". It is a first step of "Lab on a graphene", a novel platform for biosensing using graphene and resolves a problem derived from Debye screening. Enzyme urease was captured on graphene and its reaction product was successfully detected by graphene transistor. Also, pathogen was captured on graphene and detected by its reaction product. These results show my novel method can overcome the limitation of Debye screening and be applied to various kind of biosensing.

研究分野：バイオデバイス

キーワード：グラフェン 酵素反応 電界効果トランジスタ マイクロウェル デバイ長

1. 研究開始当初の背景

グラフェンはそのユニークな特性から、半導体応用をはじめ多くの用途が期待されているが、その一つにグラフェン電界効果トランジスタ(グラフェントランジスタ)を用いたバイオセンサー応用がある(Y. Ohno *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18012 (2010)等)。FET型バイオセンサーは、電荷を持つ分子(たんぱく質等)の吸着によるチャネル層の伝達特性変化を検出するが、既知の物質中で最高移動度を持つグラフェンは、吸着電荷あたりの変化量が最大となる。また、SiベースFETと異なり、グラフェンは水溶液中で安定なため、グラフェントランジスタではグラフェンチャネルが試料に直接接触しており、センシング感度が更に高まる。これらの特性から、グラフェントランジスタは理想的なバイオセンサーと言える。さらに、分子の吸着だけでなく、グラフェン上で生化学反応をリアルタイム計測できれば、グラフェントランジスタは超高感度計測が可能な生化学反応プラットフォームになりうると研究代表者は考えており、これを”Lab on a graphene”と名付けて検討を進めている。

しかし、Lab on a grapheneでのバイオセンシングにはデバイ長の問題がある。グラフェンの伝達特性を変えるのは、グラフェンからデバイ長程度の範囲にある電荷のみである。デバイ長は生化学的条件の水溶液中では1 nm程で、細菌やたんぱく質より小さく、計測感度や精度、再現性に課題を残していた。研究代表者はこれまで、バイオセンサー向けのポリマー材料の高精度微細加工技術を開発し(T. Ono *et al.*, *J. Appl. Phys.* **105**, 013314 (2009)等)、センサーを作製して、たんぱく質1分子のイメージングや、触媒活性を持つたんぱく質である酵素1分子の反応活性計測などに応用してきた(小野・応用物理学学会講演奨励賞(2012)、T. Ono *et al.*, *J. Photopol. Sci. Tech.* **27**, 393 (2014)等)。これらの経験から研究代表者は、

- (1) 検出対象が酵素分子ならば、その反応産物(デバイ長より小さな低分子)を検出することで、デバイ長に依存しない検出が可能なのではないか
- (2) 上記の酵素反応系をポリマー製微小容器(マイクロウェル)に封じ込めれば、酵素反応産物がマイクロウェル内に濃縮され、より感度が上がるのではないか
- (3) 抗体(様々な生体分子と特異的に結合する分子)を酵素を組み合わせれば、酵素だけでなくより広いターゲットの検出にも本手法を拡張することができるのではないかと考えた。

グラフェントランジスタにおけるデバイ長の問題に対しては、従来、下記のような対策が提案されてきた(S. Okamoto *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**, 06FD08 (2012)等)。

- (1) たんぱく質をデバイ長以下の大きさに断片化し、デバイ長内部に分子全体が入るようにする
- (2) 水溶液中のイオン濃度を低減してデバイ長を拡張し、たんぱく質等よりも大きくする

しかしこれらの対策は、

- (1) 断片化がたんぱく質の本来の性質(酵素活性・結合能など)を棄損する
- (2) デバイ長を十分拡張するためには、生化学計測に適さない水準までイオン濃度を減らす必要がある

などの問題があり、本質的な解決策とはなり難い。

これらに対して本研究では、測定対象を直接検出しようとするのではなく、その反応産物を間接的に検出することで、デバイ長の問題を解消している点に斬新さがある。

より大きな視点から見ると、グラフェントランジスタのバイオ応用は現在のところ、たんぱく質の吸着を検出するだけの比較的初歩的な段階にとどまっており、グラフェンの高いポテンシャルを十分に生かしたものはなっていない。”Lab on a graphene”は、抗体などの機能性分子やマイクロウェルなどの微小構造体をグラフェンと組み合わせることで、グラフェンを基軸とした生化学プラットフォームを構築し、それによって生化学反応をその場で、超高感度に検出・分析しようとする試みであり、グラフェンのバイオ応用を新たな段階に引き上げる可能性を持っている。

一方で、酵素反応産物を計測しようとする本研究では、反応産物がグラフェンと相互作用するのか、するならばどのように作用するか、といった点を考慮する必要がある。従来、グラフェンデバイスでセンシングされてきた低分子は、専らガス分子や重金属イオンであり(F. Schedin *et al.*, *Nature Mater.* **6**, 652 (2007)等)、生体内の反応産物の直接検出はほとんど行われてこなかった。数少ない例として、水中のpHの検出がある(Y. Ohno *et al.*, *Nano Lett.* **9**, 3318 (2009))。本研究でも、予備検討の段階では、酵素ウレアーゼによる尿素分解に伴うpH増大(OH<sup>-</sup>濃度増大)を検出する予定であった。しかし、実際にウレアーゼ反応をグラフェントランジスタで計測すると、何度計測しても伝達特性は予想と真逆の方向に変化していった。その後原因を検討した結果、ウレアーゼの反応では尿素の分解によりアンモニアNH<sub>3</sub>が生じており、グラフェンはOH<sup>-</sup>濃度(10<sup>-5</sup> M程度)ではなくNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度(10<sup>-1</sup> M程度)に反応していたことが判明した。これは、水溶液中のアンモニアをグラフェンで計測した初めての例である。この知見は、ほかの生体反応産物(カルボン酸や酸性糖など)の直接計測にも応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

グラフェンのユニークな特性を利用した

生化学研究のための新たなプラットフォーム"Lab on a graphene"を構想している。その第一歩として本研究では、グラフェントランジスタ表面のセンシング領域がデバイ長の範囲にとどまるという問題を解消するため、「酵素反応産物による電気的な生体分子検出」と「反応系のマイクロメートルスケールへの封じ込め」を用いた生体分子検出法を開発した。本手法によって極めて高感度の生体分子検出を実現し、病原菌やがんバイオマーカーの検出・診断に応用できる。

### 3. 研究の方法

胃がんの原因菌であるピロリ菌検出のため、ピロリ菌の産生するウレアーゼを高感度検出した。

まず、グラフェントランジスタ上に微小液滴を形成するためのマイクロウェルを作製した。本研究では、キッシュグラファイトから剥離したグラフェン及び化学気相成長によって合成したグラフェンをシリコン基板上に転写して用いた。また、液滴を外部と隔離し、酵素反応産物の漏出を防ぐため、ウェルの材質は撥水性の高い非晶質フッ素ポリマー(Cytop(旭硝子))とし、研究代表者の開発した高異方性酸素プラズマエッチング法によりポリマーを加工した(T. Ono *et al.*, *J. Appl. Phys.* **105**, 013314 (2009))。その際グラフェンにプラズマ誘起ダメージが加わらないよう、グラフェンと Cytop 間にセラミック保護層を堆積した。この保護層はプラズマエッチング後、アルカリエッチングで除去した。

マイクロウェル作製後、グラフェン上にターゲットであるウレアーゼ分子や病原体と特異的に結合するレセプター分子を修飾した。修飾には、分子内に 共役系を持ちグラフェンと スタックする分子 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester (PBASE) を用いた。これらレセプター分子を介してピロリ菌やウレアーゼをグラフェン上に捕捉した。グラフェントランジスタのドレイン電流を計測しながらマイクロウェルを封止し、ウレアーゼ反応による  $\text{NH}_4^+$  の産生をリアルタイム計測した。

予備検討として、マイクロウェルを用いず、数百  $\mu\text{L}$  のウレアーゼ水溶液にグラフェントランジスタを浸漬して、尿素を添加することで、ウレアーゼの反応動態計測に成功している。この過程で、グラフェントランジスタのドレイン電流は水溶液中の  $\text{NH}_4^+$  濃度に応じて変化し、グラフェントランジスタによる水溶液中の  $\text{NH}_4^+$  の検出・定量に初めて成功している。

### 4. 研究成果

まず、セラミック保護層及び非晶質フッ素樹脂層を用いて、グラフェントランジスタ上にマイクロメートルスケール、フェムトリットル体積のマイクロウェルを構築した。ウェルの形成、およびウェルが封止可能であるこ

とは、蛍光色素ローダミンをウェルに導入・封止後に蛍光顕微鏡でウェル内のみが蛍光を発することをもちて確かめた。ウェル底部に位置するグラフェン上に PBASE を介してストレプトアビジンを修飾し、予めビオチン化したウレアーゼをアビジン/ビオチン反応を用いて固定化した上で、ウェルの封止と開放を繰り返すと、生成したアンモニアのウェル内への濃縮に伴うドレイン電流変化と、アンモニア拡散に伴う定常状態への復帰が繰り返し計測された。これは、グラフェン上にフェムトリットル体積の閉じた反応場が構築できること、その内部に反応産物を閉じ込めることで、ごく微量の固定化ウレアーゼの反応を高感度かつ安定的に検出可能であることを示している。ビオチンとアビジンの強い相互作用を利用して、pM オーダーのごく微量のウレアーゼを検出することができた。

次に、PBASE を介してグラフェン上にヘリコバクター・ピロリ抗体を修飾し、そこにピロリ菌を捕捉してウェルを封止したところ、ピロリ菌の持つウレアーゼの反応に起因する電流変化が計測された。電流変化の速度と、予めバルクレベルでのアンモニア生成量の計測から推算したピロリ菌菌体一個当たりのウレアーゼ活性から、ウェル中に捕捉したピロリ菌の個数を概算すると、菌体数個分に相当するごく微量のピロリ菌を検出できていたことがわかった。抗体の大きさは本実験系のデバイ長よりはるかに大きなものであり、マイクロウェルと複合化したグラフェントランジスタで酵素反応産物を計測することにより、デバイ遮蔽による限界を超えた高感度なバイオセンシングが可能であることが実証された。

本研究では、グラフェンのユニークな特性を利用した生化学研究のための新たなプラットフォーム"Lab on a graphene"構想の第一歩として、グラフェントランジスタ表面のセンシング領域がデバイ長の範囲にとどまるという問題を解消するため、「酵素反応産物による電気的な生体分子検出」と「反応系のマイクロメートルスケールへの封じ込め」を用いたバイオセンシング技術を開発した。これにより、ピロリ菌の高感度検出を可能にするとともに、Lab on a graphene を用いた酵素反応動態の高感度リアルタイム計測を実証した。

### 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3件)

小野亮生、金井康、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、松本和彦、「グラフェンを用いたバイオセンシング DNA 検出からインフルエンザ診断まで」 MATERIAL STAGE, 査読無(招待論文)

vol. 16, 2016, pp. 65-70.

Takao Ono, Takeshi Oe, Yasushi Kanai, Takashi Ikuta, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin-ichi Nakakita, Yasuo Suzuki, Toshio Kawahara and Kazuhiko Matsumoto, "Glycan-functionalized graphene-FETs toward selective detection of human-infectious avian influenza virus", Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, Vol. 56, No. 3, 2017, 030302-1~4. <http://iopscience.iop.org/article/10.7567/JJA.P.56.030302>

小野堯生、金井康、奥田聡志、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、松本和彦、「グラフェントランジスタのバイオセンシング応用 - Lab on a graphene - 」, Journal of The Surface Science Society of Japan, 査読有、in print.

〔学会発表〕(計5件)

Takao Ono, Yasushi Kanai, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, and Kazuhiko Matsumoto, "An Application of Graphene Field Effect Transistor to Enzymatic Assay", The 2016 Compound Semiconductor Week (CSW2016), 2016/06/30, Toyama International Conference Center.

小野堯生、金井康、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、松本和彦、「グラフェン電界効果トランジスタ上に捕捉した酵素分子の高感度検出」, 第77回応用物理学会秋期学術講演会、2016年9月15日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)。

Takao Ono, Yasushi Kanai, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, and Kazuhiko Matsumoto, "Measurement of Enzyme Molecules and Their Reactions Using Graphene-FET Equipped with Microwells", 2016 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2016), 2016/09/28, Tsukuba International Congress Center.

小野堯生、「グラフェントランジスタのバイオセンシング応用 - Lab on a graphene - 」, 2016 真空・表面科学合同講演会(第36回表面科学学術講演会・第57回真空に関する連合講演会)、2016年11月29日、名古屋国際会議場

小野堯生、金井康、大野恭秀、前橋兼三、井上恒一、松本和彦、「マイクロウェルと複合化したグラフェントランジスタを用いた *Helicobacter pylori* の検出」, 第64回応用物理学会 春季学術講演会、2017年3月14日、パシフィコ横浜。

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/se/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小野 堯生 (ONO, Takao)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：00752875