

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06395

研究課題名(和文) DNA高度集積回路の開発と相補鎖DNAを演算子とする並列計算の実証化

研究課題名(英文) Development of a highly integrated circuit using DNA and a demonstration test of the parallel computation using a complementary DNA as an operator

研究代表者

磯田 隆聡 (ISODA, TAKAAKI)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：70284544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では電子回路中に集積化したDNA1が、塩基配列の違いで特定のDNA2を認識する相互作用を、電圧のON/OFFに置き換えて情報処理を行う有機体/物理デバイス構築を目標としている。そこで生体高分子である抗体をDNA1のモデルとして用いて、これを基板上に再現性よく集積させる方法を確立した。さらに集積化抗体と特異的に反応する抗原をDNA2のモデルとして用いて、この相互作用を高い精度で電氣的検出する新たな方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のコンピュータは1つの計算を高速に無限回数繰り返して解を求めるシリアル方式である。一方一度に無秩序の組合せを求め、その中から解を特定する並列計算がある。例えば指定条件のルートを通る経路の特定などである。分子生物学の分野では、塩基配列の異なるDNA断片を経路に見立て、これらを実験的手法で無作為に反応させ、その組合せの中から最適解(経路)を特定するアプローチが試みられている。しかしこれは現実的ではない。本研究はこのような煩雑な操作を、申請者がこれまで開発した技術を転用して有機デバイスとして実現できないかと着想した。煩雑な並列計算工程を素子化するための基盤技術となり得る。

研究成果の概要(英文)：We will be aimed at achieving a creation of hybrid device between organic materials and an electric circuit. The principle of operation is an electrical detection for interaction between integrated DNA1 on an electrode surface and a complementary DNA2. This study used antibody as a biological macromolecule model for DNA1 and we resolved a poorly-reproducible method for integration of biomolecules on a on the substrate. Further, we also used antigen as a complementary DNA2 and developed a new method for an electrical detection of interaction between antibody and antigen as model DNAs.

研究分野：生物センサ工学

キーワード：DNAコンピュータ 集積回路 デバイス DNA 並列計算

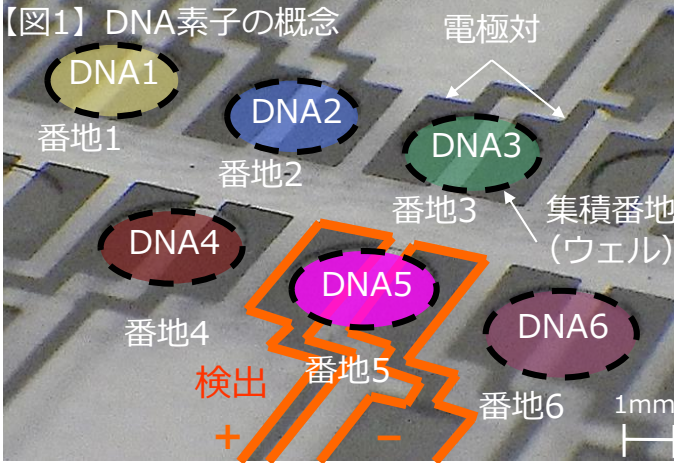


図1 DNA集積電極 (DNA素子) のイメージ

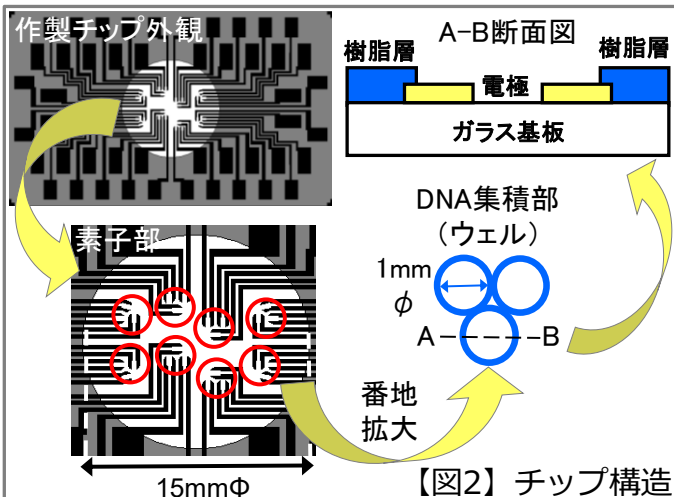


図2 作製した電極基板の外観と構造



図3 電極基板専用に設計、開発した評価測定器

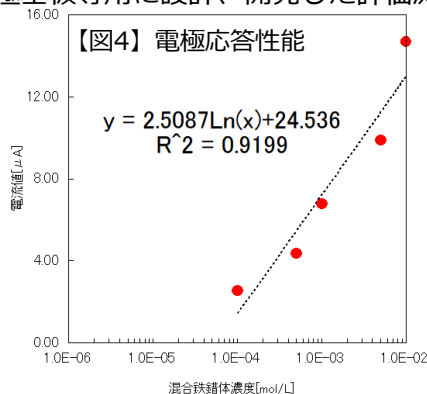


図4 電極基板 (図2) の電解質に対する応答性能

1. 研究開発当初の背景

研究代表者は MEMS (マイクロエレクトロ・メカニカルシステム) 技術を利用し、バイオセンサを電子回路中に集積した有機デバイスの開発を追求している。若手研究 B (H17-18) 及び基盤研究 C (H19-21) では、抗体と抗原の認識を信号変換するセンサ素子を開発した。基盤研究 C (H23-25) では電極の電気化学反応で、基板上的任意の位置にタンパク分子を集積する要素技術を確認した。基盤研究 C (H26~28) では DNA 塩基配列を演算素子に利用する並列計算デバイスの開発へ展開した。[図1] まず DNA を任意の座標に配列する番地化の要素技術を確認した。そして番地を電流値で判別可能な評価装置を開発した。しかし解の判定でエラーが多く、チップ上に集積する素子数も 4bit と低いいため、計算素子としての利用には多くの課題が残された。

2. 研究の目的

本研究では電子回路中に集積化した DNA が、塩基配列の違いで特定の DNA を認識する相互作用を、電圧の ON/OFF に置き換えて情報処理を行う有機体/物理デバイス構築の基礎技術を開発する。そこで前回の基盤研究 C で明らかになった課題を解決するため、以下の 2 点を目的とした。
 ① 生体分子である DNA を基板の上に再現性よく集積化させる方法の確立
 ② 正解の塩基配列の DNA 番地を、高い精度で検出する新たな方法の確立

3. 研究の方法

【H29】 DNA 集積基板の設計と開発

DNA 素子とは DNA を集積した電極で、その種類によって番地化される。[図1] 前回の基盤研究 C では生体分子集積の再現性が低く、これが番地の判定率が低い原因であることが分かった。そこで今回の戦略として素子数は 5bit 以下とし、異なる種類の生体分子を確実に集積できるデバイスの設計と測定システムを開発した。まずガラス基板に積層した Cr 層をフォトリソグラフィ法でパターンニングし、15 mm φ の面積に 3 電極 × 8 個所となるように配置した。[図2] さらに感光性樹脂で各電極の上部が 1 mm φ だけ開口するよう、生体分子の集積部 (以下ウェル) を構築した。この基板には 24 種類の溶液 (各 2 μL) が自発的に液滴となって形成した。また電極群を高速に切り替えて電流を検出する専用の測定器を開発した。[図3] 濃度の異なる鉄錯体溶液を 3 ウェルずつ滴下して電流測定すると、検出電流値は濃度に良く相関した。(相関係数 ≈ 0.92) [図4]

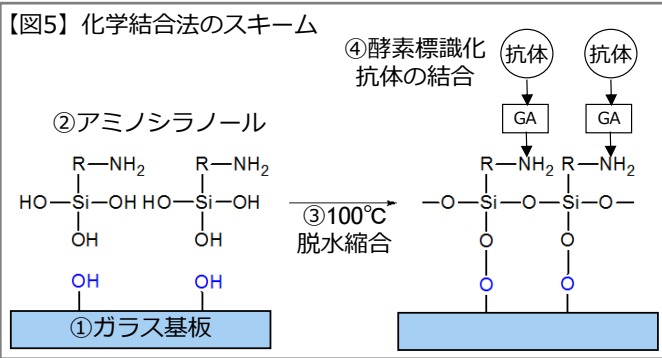


図5 各番地への生体分子の固定化1 (化学結合法)

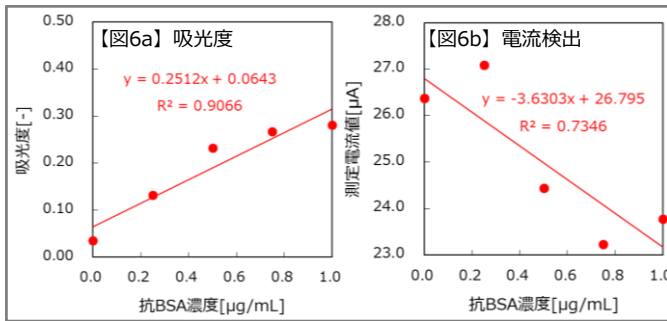


図6 化学結合法で固定化した標識化抗体の評価

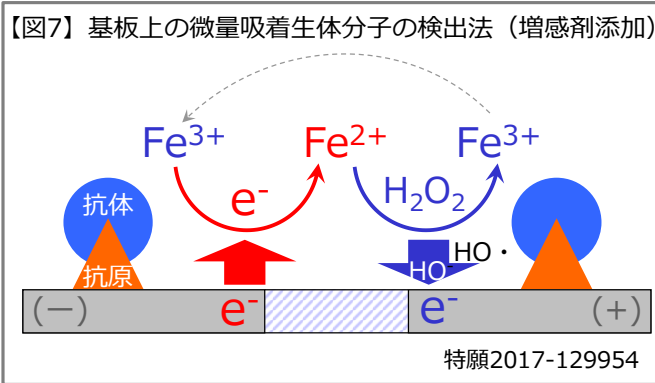


図7 各番地への生体分子の固定化2 (吸着法)

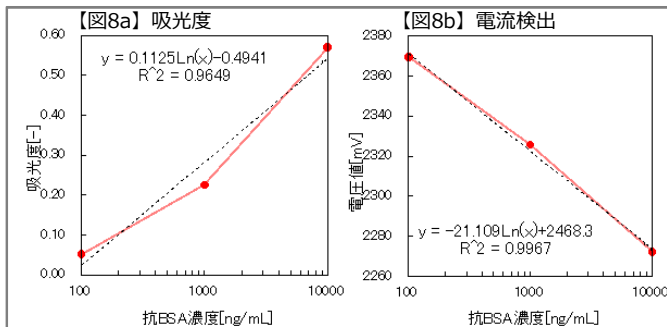


図8 吸着法で固定化した標識化抗体の評価

そこでこれらの問題を解決するために、ウェル全面(ガラス面と電極面)に標識抗体を物理吸着させて集積する方法を検討した。(以下、吸着法)これは標識抗体溶液をウェルに滴下し、37°C-1h 静置した後、水洗浄するシンプルな方法である。またウェル内に吸着する量が微量であるため、電極の検出感度を高める方法を開発した。[図7]これは増感剤を添加して検出電流を増加させる方法である。(以下、増感剤法)増感剤の組成は鉄錯体と過酸化水素である。鉄は3価の酸化状態であり、負極から電子を受け取り2価に還元される。過酸化水素は2価の鉄で分解が進行する。この過程で電子が正極に受け渡され、鉄は再び3価に戻る。このような酸化還元の繰り返しで電極間の電流が増加する。すると微量な集積量のタンパクでも、その導電率の差異を検知できるようになる。まず吸着法で標識抗体を集積したウェルに発色剤を滴下し、発色溶液の吸光度を測定した。標識抗体の量と発色量は良く相関した。(相関係数=0.96) [図8a] 本方法は数回実施して再現性を確認した。次にこの抗体集積基板を[図3]の測定器にセットし、各ウェルに所定濃度の増感剤を滴下して電流値を測定した。[図8b] ウェル中の集積量と検出電流値は高い相関が見られた。(相関係数=1.0)これも数回実施して再現性を確認した。

【H30】 生体高分子による基板集積方法の検証と高精度検出方法の確立

2年目は前年度に開発した24ウェル基板[図2]に、DNAを高い再現性で集積するための要素技術開発を実施した。DNAを指定番地に化学結合させるには、電極表面の化学構造の最適化と、集積化度の評価法が必要である。DNAは取り扱いが繊細なため、このステージでは酵素標識化タンパク(以下標識抗体)を生体高分子のモデルとして開発を加速した。この酵素(ペルオキシダーゼ)は発色剤と反応して溶液を黄色に変化させる。そこで発色溶液の吸光度を計測することで、ウェル内に集積した標識抗体の量を評価できる。

表面化学やセンサの研究分野では、様々な方法で生体分子を材料表面に化学結合する研究が報告されている。本研究では、まずウェルのガラス面に標識抗体を化学結合で集積する方法を検討した。(以下、化学結合法)これはガラス表面を改質剤でアミノ化し、連結剤を介して結合する方法であり、最も一般的である。[図5]このウェルに発色剤を滴下し、発色溶液の吸光度を測定した。標識抗体の量と発色量は良く相関した。(相関係数=0.91) [図6a] 本方法は数回実施して再現性を確認した。次にこの抗体集積基板を[図3]の測定器にセットし、各ウェルに蒸留水を滴下して電流値を測定した。[図6b] 標識抗体はタンパクのため導電性は低い。そのためウェル中の集積量の増加に伴い、検出電流値も低下した。しかしその相関は、相関係数=0.73と低かった。

吸光度から標識抗体の集積量を推算したところ、最大で15ng/mm²程度であった。即ち0~15ng/mm²程度の生体分子の集積量の変化は、本測定器では高い精度で検出できないことが判明した。また標識抗体の集積量を増やすためにガラス表面のアミノ化導入率を増やしたり、連結剤を増やすと、タンパクが変性して逆に再現性が低下する問題が生じた。

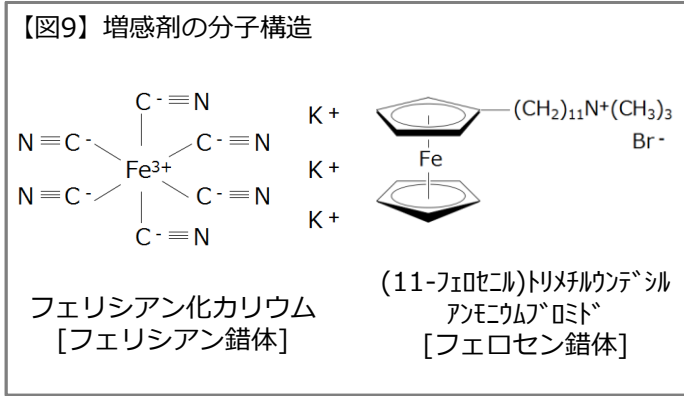


図9 増感剤として選定された錯体化合物の構造

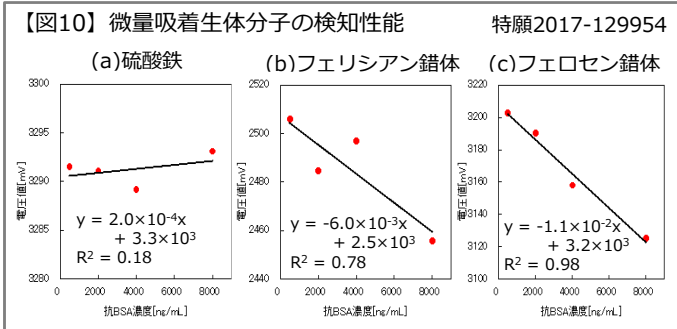


図10 増感剤による微量吸着生体分子の検出性能差

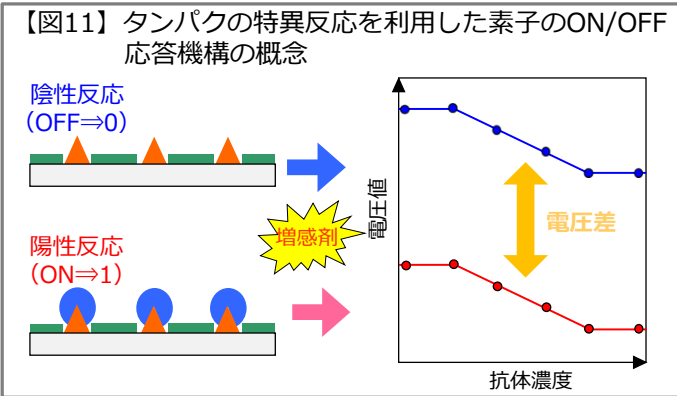


図11 タンパクの特異反応と素子のON/OFFの概念

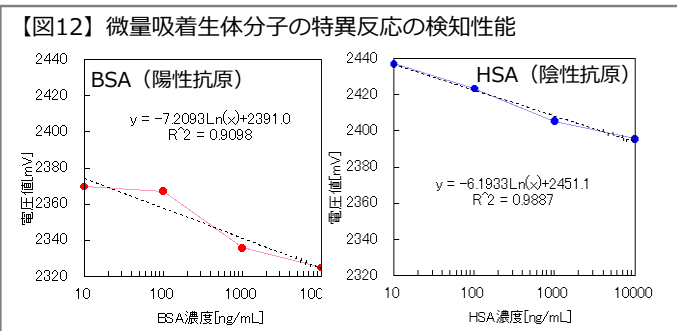


図12 微量吸着生体分子の特異反応の検知性能

【R1】 集積した生体高分子への相互作用検知法の確立

前年度開発した吸着法は生体高分子にダメージを与えることなく高い再現性で集積できることが明らかになった。また増感剤添加によるシグナル増幅で、微量な集積量でも検知できる方法が確立できた。

そこで最終年度では、基板に集積化したDNAに別のDNAが特異的に反応する相互作用を、電流値として検知するための要素技術開発を実施した。ウェルに吸着した微量のDNAに別のDNAが結合する場合、この量はさらに微量であると予想される。このため、まず増感剤組成を最適化して十分な検出精度を発現する要件を探索した。前年度検証した鉄錯体は、ごく一般的なフェリシアン錯体[図9左]である。これは鉄イオンの周囲にはシアン化物イオン(CN)6分子が結合している。鉄イオンはこれらと電子を共有できるため、外界の環境に応じて酸化還元変化する。そこで増感剤の酸化還元反応の安定性と、集積タンパクの検出性能を検証した。その結果、フェロセン錯体[図9右]が有効であることを見出した。増感剤がフェロセン錯体の場合、抗体集積量に対して検出電圧は高い相関を示した。(相関係数=0.98)[図10c] フェリシアン錯体では精度が低下し[図10b]、硫酸鉄では検出できなかった。[図10a]

そこで最終ステージも取り扱いが比較的容易な抗体タンパク(以下抗体)をウェルに吸着させ、これと特異的に反応する抗原タンパク(以下、陽性抗原)を特異反応のモデルに使用した。また抗体と反応しない抗原タンパク(以下、陰性抗原)も比較として用いた。このような組み合わせで特異反応の有無を素子のON/OFFに見立て、生体高分子の相互作用が電流検出できるか検証した。陽性抗原を添加した番地は抗体と反応するため、陰性抗原を添加した番地と比較して導電率が低下する。そのため検出電圧が低下する。[図11] 実際に抗体集積基板では相互作用の有無を電流値の大小で判定できることが証明された。[図12]

4. 研究成果

【H29 年度】 DNA 素子を高速スキャンして塩基情報を読み取るための測定器を開発した。まず5bit以下の素子数を想定し、電極24ヶを集積した基板を設計、作製した。また指定した番地順に計測するシリアル方式の測定器を開発した。全ての番地の検出感度はスマートフォンで設定でき、取得した信号をサーバーへ転送して自動解析するシステムが完成した。

【H30 年度】 DNA 集積化の要素技術開発を実施した。生体高分子を基板上に化学結合させても、集積量は極微量であるため、電流検出精度が低下した。そこで生体高分子を物理吸着で集積させ、これに増感剤を滴下して電流検出感度を高める方法を開発した。本方法は特許出願した。

【R1 年度】 生体高分子の集積量を高精度に電圧検出できる増感剤の組成を見出した。最終的に集積した生体高分子と別の生体高分子の相互作用の有無を電圧で判定できるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 礪田隆聡, 市原勲己, 龍神康大	4. 巻 139
2. 論文標題 高分子シート表面での抗原 抗体反応性とセンサ応答の 評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 電気学会論文誌E (センサ・マイクロマシン部門誌)	6. 最初と最後の頁 303-309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) ISSN 1341-8939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 T. Isoda, H. Ichihara, K. Ryujin, I. Urushibara, T. Shimizu	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of Wireless Electrical Conductivity Sensor Screening System to Evaluate Protein Binding to Sensor Films	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 23-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) ISSN 0914-4935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 礪田隆聡	4. 巻 68
2. 論文標題 携帯型バイオセンサの開発とIoT技術による遠隔医療への応用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 43-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) ISSN 0451-2014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 礪田隆聡	4. 巻 2017-7
2. 論文標題 画像センシングによる皮膚炎症解析法の開発と化粧品の安全性評価	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FRAGRANCE JOURNAL	6. 最初と最後の頁 42-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) ISSN 0288-9803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○鈴木音弥, 今泉瑠菜, 佐藤理夏, 磯田隆聡
2. 発表標題 抗原抗体検査のための 3D 型ウェルセンサの設計と性能評価
3. 学会等名 令和1年度電気学会センサ・マイクロマシン部門 ケミカルセンサ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○鈴木音弥, 今泉瑠菜, 佐藤理夏, 磯田隆聡
2. 発表標題 抗原抗体検査のための 3D 型ウェルセンサの設計と性能評価
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○鈴木音弥, 今泉瑠菜, 佐藤理夏, 磯田隆聡
2. 発表標題 抗原抗体検査のための 3D型ウェルセンサの設計と性能評価
3. 学会等名 電気学会センサ・マイクロマシン部門 第36回センサ・マイクロマシンと 応用システムシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○磯田隆聡
2. 発表標題 食品安全管理の現状と携帯型センサによる食中毒検査法への応用
3. 学会等名 QBキャピタル技術交流会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○礪田隆聡
2. 発表標題 高齢者施設や在宅介護での遠隔診断実現のための携帯型バイオセンサの開発センサの開発
3. 学会等名 JSTイノベーション・ジャパン2019～大学見本市 & ビジネスマッチング～（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○礪田隆聡
2. 発表標題 自主衛生検査のための迅速検査キットの使い方 携帯型バイオセンサとIoT検査システムの紹介
3. 学会等名 食品開発展2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜地凌平, 渡邊裕樹, 刀根健冴, 吉田雄貴, 龍神康大, 市原勲己, ○礪田隆聡
2. 発表標題 バイオセンサの高度集積化技術に関する基礎研究
3. 学会等名 平成30年電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 龍神康大, 吉田雄貴, 市原勲己, 浜地凌平, 渡邊裕樹, 刀根健冴, ○礪田隆聡
2. 発表標題 バイオセンサの集積化法の開発と多項目検査技術への応用
3. 学会等名 平成30年電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市原勲己, 吉田雄貴, 龍神康大, 刀根健冴, 浜地凌平, 渡邊裕樹, ○磯田隆聡
2. 発表標題 抗原抗体シートによる腫瘍マーカーのセンシングとモバイルセンサへの利用
3. 学会等名 平成30年電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ○渡邊裕樹, 刀根健冴, 浜地凌平, 吉田雄貴, 市原勲己, 龍神康大, 磯田隆聡
2. 発表標題 酵素センサ測定法の開発と食品鮮度検査への応用
3. 学会等名 平成30年電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ○渡邊裕樹, 吉田雄貴, 井本亘栄, 鈴木音弥, 磯田隆聡
2. 発表標題 酵素シートを用いたセンサ測定法の開発
3. 学会等名 平成30年度電気学会センサ・マイクロマシン部門 ケミカルセンサ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市原勲己, 龍神康大, 尾崎匠, 吉田雄貴, 磯田隆聡
2. 発表標題 モバイルセンサを用いる抗原抗体反応のスクリーニング検査法の開発
3. 学会等名 平成29年電気学会全国大会, 「人と化学センサ」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田雄貴, 尾崎匠, 市原勲己, 龍神康大, 高尾凌太郎, 礪田隆聡
2. 発表標題 携帯型バイオセンサによる酵素検出法の開発と食品検査への利用
3. 学会等名 平成29年電気学会全国大会, 「人と化学センサ」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 龍神康大, 市原勲己, 尾崎匠, 吉田雄貴, 礪田隆聡
2. 発表標題 集積化バイオセンサの表面分子設計と タンパク検出の電気特性
3. 学会等名 平成29年電気学会全国大会, 「人と化学センサ」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田雄貴, 市原勲己, 龍神康大, 浜地良平, 渡邊裕樹, 礪田隆聡
2. 発表標題 携帯型バイオセンサによる酵素検出法の開発と食品鮮度測定への利用
3. 学会等名 平成29年度電気学会センサ・マイクロマシン部門 ケミカルセンサ研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田雄貴, 市原勲己, 龍神康大, 浜地良平, 渡邊裕樹, 礪田隆聡
2. 発表標題 携帯型バイオセンサによる酵素検出法の開発と食品鮮度測定への利用
3. 学会等名 第54回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊裕樹, 市原勲己, 龍神康大, 吉田雄貴, 浜地良平, 刀根健冨, 礪田隆聡
2. 発表標題 食品鮮度測定のためのセンサ技術の開発
3. 学会等名 電気学会センサ・マイクロマシン部門 第34回センサ・マイクロマシンと
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高尾凌太郎, 市原勲己, 龍神康大, 吉田雄貴, 渡邊裕樹, 浜地良平,
2. 発表標題 7.画像センシング IoT(インターネット化)技術の開発と皮膚炎症の遠隔検査
3. 学会等名 電気学会センサ・マイクロマシン部門 第34回センサ・マイクロマシンと
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 礪田隆聡
2. 発表標題 1.在宅介護や被災地での遠隔診断実現のためのヒューマンヘルスケア・センサ
3. 学会等名 JSTイノベーション・ジャパン2017~大学見本市&ビジネスマッチング~(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 礪田隆聡 他共著	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 562
3. 書名 最先端医療機器の病院への普及展望と今後の製品開発	

1. 著者名 磯田隆聡 他共著	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 332
3. 書名 皮膚の安全性・有用性評価法	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 情報技術を用いた炎症検査方法	発明者 磯田隆聡, 尾池哲郎	権利者 (株)FILTOM
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-115943	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 酵素活性の測定方法	発明者 磯田隆聡, 吉田雄貴	権利者 インテグラムヘルスデザイン(株)
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-023880	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 センサチップ及びその製造方法、分析装置、並びに分析方法	発明者 磯田隆聡, 龍神康大	権利者 北九州市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-039978	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 溶液分析装置及びその製造方法、並びに溶液分析方法	発明者 磯田隆聡, 龍神康大	権利者 北九州市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-022253	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>北九州市立大学環境技術研究所 公開成果1 (生体高分子検出デバイスの応用事例) https://office.env.kitakyuu.ac.jp/kangiken/files/2015/0036/2853/isoda_takaaki_1.pdf</p> <p>北九州市立大学環境技術研究所 公開成果2 (DNA検出デバイスの応用製品例) https://office.env.kitakyuu.ac.jp/kangiken/files/6015/0036/3022/isoda_takaaki_3.pdf</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考