

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14107

研究課題名(和文) グラフェントランジスタで計測可能な汎用的酵素反応系の探索とその酵素免疫法への応用

研究課題名(英文) Exploration of enzymatic reaction systems for measurement using graphene transistor and their application to enzyme immunoassay

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：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-FET"構想の一環として、マイクロウェルと複合化したグラフェントランジスタによる高感度バイオセンシングを発展させ、より汎用的な酵素反応系で検出・定量が可能であることを見出した。これを酵素免疫法に応用し、検出標的であるインフルエンザウイルスに結合した酵素抗体複合体に特異的な電流シグナルを計測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が原理実証した、「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」による高感度なバイオセンシング技術の実用化に向けて、酵素反応系の改変と抗体との複合化によって、技術の適用範囲を広げることが出来た。これらを通じて、研究代表者の提唱する"lab on a graphene-FET"の可能性を広げることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, I extended an application field of my high-sensitive electrical biosensing method using graphene field-effect transistors (graphene-FET) and microdroplets. It is a part of my "lab on a graphene-FET" concept, a novel platform for sensing various biochemical reactions using graphene-FETs. I found a new enzymatic reaction system which is more commonly used compared to urease/urea reaction system and able to be measured by graphene-FETs. I applied this system to enzyme immunoassay and detected target-specific signals from influenza virus.

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 マイクロ流体デバイス デバイ長 病原体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

単原子層のナノカーボン材料であるグラフェンは、その二次元性や極めて高いキャリア移動度など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)の吸着によるチャンネル層の伝達特性変化を検出するが、極めて高い移動度を持つグラフェンは、吸着電荷あたりの電流変化量を極めて大きくできる。また、シリコンと異なり、グラフェンは水溶液中で安定なため、グラフェン電界効果トランジスタでは二次元のグラフェンチャン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、グラフェン電界効果トランジスタは理想的なバイオセンサーと言える。研究代表者は、グラフェンのユニークな特性を利用した生化学反応計測のための新たなプラットフォーム“Lab on a graphene-FET”(“Lab on a chip”に因む)を構想している。本研究もその一環である。

しかし、グラフェン電界効果トランジスタバイオセンサーをはじめとする電界効果トランジスタ型バイオセンサー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。デバイ長は生理的条件の水溶液中では1 nm程度で、ウイルスやたんぱく質よりも小さく、計測感度や精度、再現性に課題があった。この問題に対して、研究代表者は、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(デバイ長よりも小さな低分子)を間接的に検出することで、デバイ長の問題を解消できるのではないかと、さらに、酵素反応系をポリマー製極微小容器(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と考え、原理実証に成功した。

ところが、上記の酵素検出法をより汎用的にするため、抗体と組み合わせた酵素免疫法に応用しようとする、問題が浮上した。原理実証で用いたウレアーゼの反応基質である尿素はたんぱく質を変性させ、また反応産物アンモニアは系のpHを抗原・抗体反応に適さない領域まで上昇させてしまう。ウレアーゼはグラフェン電界効果トランジスタを用いた酵素反応計測の原理実証には有効だったが、本法をさらに発展させるにはウレアーゼ/尿素に代わる酵素反応系が必要となった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、グラフェン電界効果トランジスタで検出可能、かつ抗原・抗体反応などと共存可能な酵素反応系を探索し、グラフェン電界効果トランジスタを用いた酵素免疫法を実現することであった。グラフェン電界効果トランジスタとマイクロウェルを用いた酵素反応計測スキームは研究代表者独自の物であり、本研究により、本スキームは多くの検出ターゲット(がんマーカーやウイルスなど)への応用が可能になる。

### 3. 研究の方法

まず、グラフェン電界効果トランジスタで計測可能なウレアーゼ以外の酵素反応系を探索した。特に酵素免疫法で汎用されている酵素、Alkaline phosphatase(ALP)、Horseradish peroxidase(HRP)、 $\beta$ -galactosidase( $\beta$ -gal)などを重点的に検討し、検出と定量に適した基質を探した。併せて、反応を検出し易いグラフェン電界効果トランジスタの構造を検討した。

次に、見出した酵素を抗体と複合化し、酵素免疫法を開発した。デバイ長よりも大きなインフルエンザウイルスを検出標的として実験を行った。

### 4. 研究成果

まず、検出標的そのものが酵素活性を持つ胃がんの病原菌 *Helicobacter pylori* を検出標的とし、これを抗体で捕捉して検出定量した成果を Nano Letters 誌に論文発表した。本成果については大阪大学からもプレスリリースし(2019年6月18日、図1、[https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190618\\_2](https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190618_2))、英字webメディア等でも報道され(8件)、当該論文は Altmetric score 70 を得た(2020年3月10日時点)。また、本研究で用いたフッ素樹脂製マイクロウェルの技術をさらに洗練化させ、ナノスケールのウェルを大規模並列化したアレイ構造を実現して1分子酵素反応を計測した成果も Analyst 誌に論文発表した(発表誌の Recent HOT articles に選定)。

次に、抗体との複合化を想定して酵素反応系を探索した結果、特定の酵素と反応基質の組合せにおいて、反応産物をグラフェン電界効果トランジスタでリアルタイム定量可能であることが判明した。この結果、反応産物の生成量ないし生成速度から、酵素濃度の検量線を作成することができるようになった。さらに、反応産物は可視領域に吸収を持つため、反応の結果をプレートリーダーなどで確認することもでき、研究に適した反応系であることも分かった。また、微小液滴を封止するマイクロウェルの形状はこれまで円柱形を採用していたが、液滴体積に対するグラフェン接触面積の比を増大させ、更に液滴封止効率を向上させるためにウェルの形状を変更した。

最後に、リンカー分子を用いて、抗インフルエンザウイルス抗体と酵素の複合体を合成し、これをあらかじめグラフェン電界効果トランジスタ上に捕捉したインフルエンザウイルスに対して結合させて液滴を封止し、反応産物の検出を試みた。反応前まではデバイ長が短いためにウイ

ルスの表面電荷等による直接的な検出はほとんどできなかったが、封止・反応後にはグラフェン電界効果トランジスタ上のウイルスの有無(即ち酵素抗体複合体の有無)によって電流シグナルに違いが見られ、本法による間接的な検出を示唆する結果を得た。

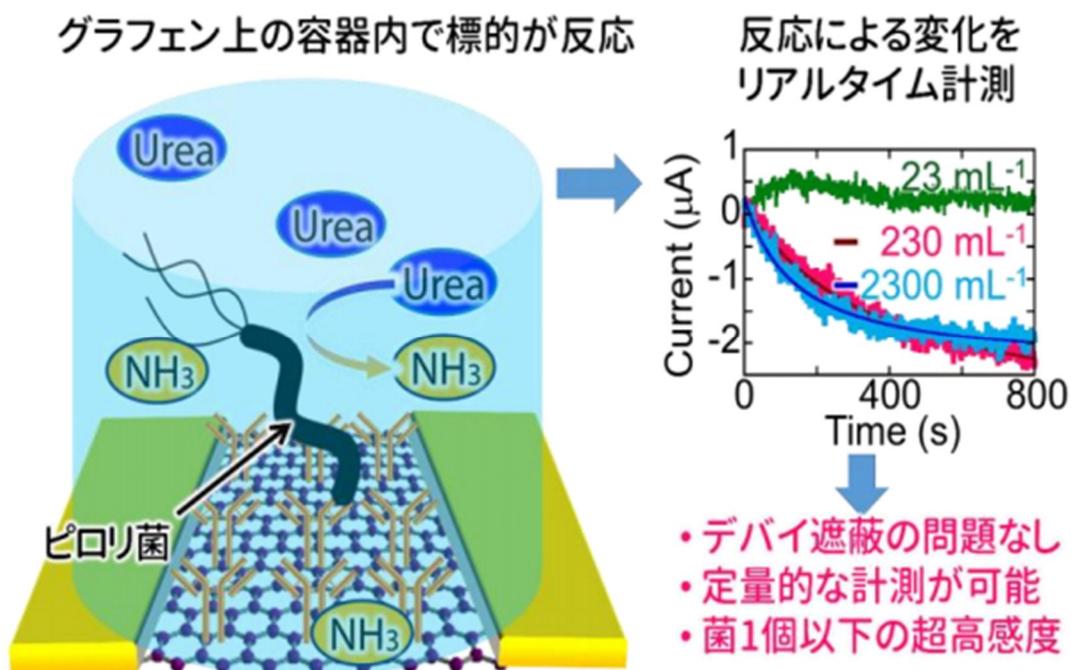


図1 プレスリリースの概要：

極微小反応容器内でピロリ菌が尿素 Urea からアンモニア  $\text{NH}_3$  を生じる反応を、グラフェンが高感度かつリアルタイムに計測することで、塩濃度の影響を受けず、ごく微量の標的を定量することが可能。

## 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 0件）

1. 著者名 Ono Takao, Kanai Yasushi, Inoue Koichi, Watanabe Yohei, Nakakita Shin-ichi, Kawahara Toshio, Suzuki Yasuo, Matsumoto Kazuhiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Electrical Biosensing at Physiological Ionic Strength Using Graphene Field-Effect Transistor in Femtoliter Microdroplet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 4004 ~ 4009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.9b01335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono Takao, Ichiki Takanori, Noji Hiroyuki	4. 巻 143
2. 論文標題 Digital enzyme assay using attoliter droplet array	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 4923 ~ 4929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8AN01152D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawata Takuya, Ono Takao, Kanai Yasushi, Ohno Yasuhide, Maehashi Kenzo, Inoue Koichi, Matsumoto Kazuhiko	4. 巻 57
2. 論文標題 Improved sensitivity of a graphene FET biosensor using porphyrin linkers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 065103 ~ 065103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/JJAP.57.065103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ushiba Shota, Okino Tsuyoshi, Miyakawa Naruto, Ono Takao, Shinagawa Ayumi, Kanai Yasushi, INOUE Kouichi, Takahashi Kohei, Kimura Masahiko, Matsumoto Kazuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 State-space modeling for dynamic response of graphene FET biosensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SGGH04
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/1347-4065/ab65ac	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Takao Ono, Takuya Kawata, Shota Ushiba, Yasushi Kanai, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin'ichi Nakakita, Yasuo Suzuki, Toshio Kawahara, Masahiko Kimura, and Kazuhiko Matsumoto
2. 発表標題 Detection of Human-Infectious Influenza Virus Using Sialoglycan-Modified Graphene Field-Effect Transistor
3. 学会等名 2018 International Conference on Solid State Devices and Materials (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takao Ono
2. 発表標題 Lab-on-a-graphene-FET: a two-dimensional assay platform for biochemical reactions
3. 学会等名 8th imec Handai International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野堯生
2. 発表標題 Lab on a G-FETによる高感度バイオアッセイ
3. 学会等名 1st Quantum Interface and Semiconductor Electronics Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野堯生
2. 発表標題 界面近傍で生じる生化学反応の2次元ナノ材料を用いた計測
3. 学会等名 新世代研究所2019年度第1回界面ナノ科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Ono, Shota Ushiba, Yasushi Kanai, Naruto Miyakawa, Ayumi Shinagawa, Kaori Yamamoto, Masami Tanioku, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin-ichi Nakakita, Toshio Kawahara, Masahiko Kimura, Yasuo Suzuki, and Kazuhiko Matsumoto
2. 発表標題 Biosensor Array Using CVD-Grown Graphene for Influenza Virus Detection
3. 学会等名 61th Electronic Materials Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Ono
2. 発表標題 Lab-on-a-graphene-FET for high-sensitive bioassay
3. 学会等名 Taiwan-Japan Joint Seminar for biomedical informatics and engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Ono, Yasushi Kanai, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin-ichi Nakakita, Toshio Kawahara, Yasuo Suzuki, Kazuhiko Matsumoto
2. 発表標題 ELECTRICAL DETECTION OF PATHOGENS BEYOND THE LIMITATION OF DEBYE SCREENING USING GRAPHENE FIELD-EFFECT TRANSISTORS IN MICRODROPLETS
3. 学会等名 The 23th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Ono, Takuya Kawata, Yasushi Kanai, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin'ichi Nakakita, Yasuo Suzuki, Toshio Kawahara, and Kazuhiko Matsumoto
2. 発表標題 High-Sensitive and Selective Detection of Human-Infectious Influenza Virus Using Biomimetic Graphene Field-Effect Transistor
3. 学会等名 76th Device Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野堯生、谷口嘉昭、牛場翔太、金井康、前橋兼三、井上恒一、渡邊洋平、中北慎一、鈴木康夫、河原敏男、木村雅彦、大野恭秀、永瀬雅夫、松本和彦
2. 発表標題 SiC上グラフェンの糖鎖機能化によるインフルエンザウイルス検出
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋期学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野堯生、松本和彦
2. 発表標題 新型インフルエンザの世界的流行を阻止するグラフェンバイオセンサー
3. 学会等名 ダイナミックアライアンスG1分科会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野堯生、金井康、井上恒一、渡邊洋平、中北慎一、河原敏男、鈴木康夫、松本和彦
2. 発表標題 グラフェン電界効果トランジスタとフェムトリットルチャンバーを用いたデバイ遮蔽の制約を超える病原体の検出
3. 学会等名 第80回応用物理学会 秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野堯生、金井康、井上恒一、渡邊洋平、中北慎一、河原敏男、鈴木康夫、松本和彦
2. 発表標題 グラフェン電界効果トランジスタとフェムトリットルチャンバーを用いたデバイ遮蔽を超える電氣的バイオセンシング
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 堯生、鎌田 果歩、林 亮太、A. R. Piacenti、C. Gabbutt、宮川 成人、山本 佳織、N. Sriwilaijaroen、平松 宏明、金井 康、小山 知弘、井上 恒一、牛場 翔太、品川 歩、木村 雅彦、中北 慎一、河原 敏男、家裕 隆、渡邊 洋平、鈴木 康夫、千葉 大地、S. Contera、松本 和彦
2. 発表標題 グラフェントランジスタを用いたノイラミニダーゼ反応の計測基盤
3. 学会等名 第67回応用物理学会春期学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 佳織、小野 堯生、宮川 成人、金井 康、小山 知弘、谷奥 正巳、牛場 翔太、品川 歩、井上 恒一、渡邊 洋平、中北 慎一、河原 敏男、鈴木 康夫、木村 雅彦、千葉 大地、松本 和彦
2. 発表標題 インフルエンザウイルス検出のためのグラフェン FET 上へのヒト型シアロ糖鎖修飾方法の検討
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南保 舞子、小野 堯生、宮川 成人、金井 康、小山 知弘、谷奥 正巳、牛場 翔太、品川 歩、井上 恒一、渡邊 洋平、中北 慎一、河原 敏男、鈴木 康夫、木村 雅彦、千葉 大地、松本 和彦
2. 発表標題 抗インフルエンザ抗体を提示したグラフェンFETによるインフルエンザウイルス検出法の開発
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷奥 正巳、小野 堯生、金井 康、小山 知弘、宮川 成人、牛場 翔太、木村 雅彦、井上 恒一、千葉 大地、松本 和彦
2. 発表標題 SiN膜によるグラフェン保護プロセスの検討
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金井 康, 大室 有紀, 牛場 翔太, 小野 堯生, 井上 恒一, 木村 雅彦, 上田 宏, 松本 和彦
2. 発表標題 グラフェンFETによるヒト血清中におけるオープンサン ドイツ免疫測定法を用いたバイオセンシング
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂野 喜代治, 小野 堯生, 金井 康, 小山 知弘, 谷奥 正巳, 山本 佳織, 宮川 成人, 牛場 翔太, 木村 雅彦, 井上 恒一, 千葉 大地, 松本 和彦
2. 発表標題 グラフェンバイオセンサにおけるゲートリーク電流低減 検討
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 BSA固定化シアリルラクトサミンのインフルエンザウイルス結合活性
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牛場 翔太, 沖野 剛士, 宮川 成人, 小野 堯生, 品川 歩, 金井 康, 井上 恒一, 高橋 講平, 木村 雅彦, 松本 和彦
2. 発表標題 グラフェンFETバイオセンサ応答の状態空間モデリング
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 佳織、小野 堯生、宮川 成人、金井 康、小山 知弘、谷奥 正巳、牛場 翔太、品川 歩、井上 恒一、渡邊 洋平、中北 慎一、河原 敏男、鈴木 康夫、木村 雅彦、千葉 大地、松本 和彦
2. 発表標題 グラフェン電界効果トランジスタ上のシアロ糖鎖修飾プロセスの検討
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井 康、大室 有紀、牛場 翔太、小野 堯生、井上 恒一、木村 雅彦、上田 宏、松本 和彦
2. 発表標題 グラフェンFETにおけるオープンサンドイッチ免疫測定法を用いた低分子ペプチドの電圧印加による高感度検出
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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