

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20681015

研究課題名（和文） 電界効果を基本原理とした細胞膜電荷分布ナノイメージング技術の創製

研究課題名（英文） Development of nano-imaging method based on molecular charges at cell membrane by use of field effect devices

研究代表者

坂田 利弥（SAKATA TOSHIYA）

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：70399400

研究成果の概要（和文）：

細胞膜における電荷分布を半導体原理により計測する技術の研究開発を行った。その方法として、原子間力顕微鏡で広く利用されているカンチレバーを改良し、レバー先端を導電性材料（白金）として、これを半導体バイオセンシング技術の電極部となるゲートレバーとして作製した。さらに、それを電極として metal oxide semiconductor (MOS) トランジスタに接続することで、半導体原理により、ゲートレバー先端での電荷の変化を計測することに成功した。特に、細胞膜表面はシアル酸等の負電荷が強いため、本手法により細胞膜上の負電荷が計測可能となった。特に、ゲートレバーは AFM によりナノスケールの動きを可能にするため、細胞膜上のタンパク質サイズのスケールを電荷分布として観察可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

I have developed a biosensing technique to measure molecular charge distribution at cell membrane using a principle of semiconductor. In this research, I have utilized cantilever of atomic force microscopy (AFM) in order to contact with cell membrane and to move electrode at nano scale, and developed "gatelever" with platinum tip to detect charges at cell membrane using AFM. The gatelever as electrode is extended from metal oxide semiconductor (MOS) field effect transistor (FET). Actually, negative charges based on sialic acids and so on at cell membrane was detected using AFM with gatelever-based FET. As a result, membrane protein with some charges at cell membrane can be detected at nano scale using the proposed system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：バイオセンシング

科研費の分科・細目：ナノテク・材料

キーワード：(1)電界効果、(2)細胞膜、(3)電荷、(4)プローブ顕微鏡、(5)イメージング、(6)半導体、(7)ナノバイオ、(8)バイオセンシング

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜に点在する様々なタンパク質や糖は水溶液中で電荷を有し、その数や分布は細

胞種あるいはがん化などに伴って大きく異なると考えられる。例えば、糖鎖の一つとして負電荷を有するポリシアル酸がある。これ

は  $\alpha 2$ , 8 結合をしたシアル酸が直鎖で多量体を形成したもので、正常成人の器官では、ポリシアル酸がほとんどないのに対して肺小細胞癌や腎臓の Wilm's 腫瘍では、ポリシアル酸をたくさん合成することが知られている。これらの癌でポリシアル酸は癌細胞が浸潤したり、転移に際しての癌細胞の動きを手助けしていると考えられている。また、細胞膜に点在するイオンチャネルやトランスポーターといった生体膜機能分子は、細胞にとって必要なイオンや物質を選択的に取り込んだり排出することによって、細胞内の恒常性とエネルギー状態を維持する役割を担っている。例えば、有機アニオントランスポーター (Organic Anion Transporting Polypeptide; OATP) は、肝臓における肝汁酸を取り込むトランスポーターとして知られている。このようにトランスポーターは、種々の臓器・組織において生体内因性および外因性物質の取り込みまたは排出に関与していることから、薬物の体内動態に影響していることが十分に考えられる。以上のような細胞膜のスタティックあるいはダイナミックな機能を細胞膜に点在する分子固有の電荷分布やその変化に基づいて調査した報告はなく、その計測法の創出により細胞膜構造の新たな知見が得られるのみならず、細胞診断や創薬スクリーニングのための新規的なイメージングツールになることが期待される。

## 2. 研究の目的

本課題では、生体を構成する最小単位である細胞の機能を *in vitro* で簡便に解析し、診断や薬剤などのスクリーニングのツールとして発展可能な技術をエレクトロニクスとの融合領域から研究開発する。特に、細胞膜に点在する糖鎖などの機能性分子のスタティックな部位特異性や薬剤応答といったダイナミックなイオンチャネル開閉などの分子生物学的情報を、半導体バイオセンシング技術によりイオンや分子固有の電荷変化からナノレベルで電氣的にイメージングする手法を考案する。具体的には、イオンや分子が有する電荷を半導体シリコンを用いて電界効果により電気シグナルとして簡便に直接検出することを可能にする半導体センサーの原理を利用し発展させる。そのため、ナノスケールに制御された電界効果チップを作製し細胞膜上の微小領域を走査することにより細胞膜に点在する膜タンパク質やシアル酸などの電荷を有する糖などの電荷分布を検出し電気シグナルの相対的強度を細胞の形状イメージと照らし合わせて電氣的にイメージングすることを目的とする。以上の原理より、本課題で提案する電界効果を基本原理とした細胞膜電荷分布イメージング法は、これまでにない簡便で高精度の細胞診

断や創薬スクリーニングのイメージングツールになることが大いに期待される。同時に、従来の分子生物学的手法では検出不可能であった細胞膜での諸現象をエレクトロニクスとの融合により解明し細胞膜構造の新たな知見の創出に繋がると期待される。

## 3. 研究の方法

細胞をシャーレなどの培養皿に播種し、基材と接着していない細胞膜における電荷分布をイメージングする手法を提案する。その方法として、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy; AFM) の動作原理を利用する。AFM で使用されるカンチレバーを準備し、そのレバー部の先端には nm サイズの微小な針を形成する。針部には、導電性の金属 (白金、金など) やポリマー、さらにはナノサイズのカーボンナノチューブをゲート電極として利用することにより細胞膜の微小領域の検出を可能にする。測定系には Extended-gate 型バイオトランジスタの原理を利用する。通常、バイオトランジスタはシリコンデバイスに形成された薄いゲート絶縁膜上で起きる生体分子認識反応の電荷密度変化を検出するのに対し、Extended-gate 型ではゲート部をトランジスタ本体から伸張しゲート表面での生体分子認識反応に基づく電位変化をトランジスタにより検出する構造をしている。そのため、ゲート部の材料を必要に応じて選択でき、センサーの繰返し使用を考えた場合、トランジスタは再利用しゲート部のみの交換となるためコストを低減することができる。特に本課題においては、センシング部となるカンチレバー (以後ゲートレバー) をトランジスタ本体から分離して作製できるため微小操作部の作製が容易となる。

## 4. 研究成果

細胞膜における電荷分布を半導体原理により計測する技術の研究開発を行った。その方法として、AFM で広く利用されているカンチレバーを改良し、レバー先端を導電性材料 (白金) として、これを半導体バイオセンシング技術の電極部となるゲートレバーとして作製した。さらに、それを電極として metal oxide semiconductor (MOS) トランジスタに接続することで、半導体原理により、ゲートレバー先端での電荷の変化を計測することに成功した。特に、細胞膜表面はシアル酸等の負電荷が強いため、本手法により細胞膜上の負電荷が計測可能となった。特に、ゲートレバーは AFM によりナノスケールの動きを可能にするため、細胞膜上のタンパク質サイズのスケールを電荷分布として観察可能であることを示した。

## 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5件)

1. Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, "Detection of molecular charges at cell membrane" Japanese Journal of Applied Physics, 47, 2008, 368-370.
2. Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, "Non-invasive monitoring of transporter-substrate interaction at cell membrane", Analytical Chemistry, 80, 2008, 1493-1496.
3. Toshiya Sakata, Izumi Makino, Sayaka Kita and Yuji Miyahara, "Electrical Detection Ovum Membrane Charges Using Biotransistor", Microelectronics Engineering, 85, 2008, 1337-1340.
4. Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, "Capacitance-Voltage Measurement of Transporting Function at Cell Membrane", IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, 129, 2009, 242-244.
5. Taiichiro Murakami, Toshiya Sakata, Akira Matsumoto, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, "Development of cell/transistor interface for real-time and noninvasive monitoring of potassium ion release based on apoptosis using biologically-coupled field effect transistor", Transactions of the Materials Research Society of Japan, 35, 2010, 255-258.

〔学会発表〕(計4件)

1. Toshiya Sakata, "Field Effect-Based Biosensing Devices for Cell Functional Analysis", Materials Research Society (MRS), 2008/12/2, Boston, USA.
2. 坂田利弥、喜田清、宮原裕二、"バイオトランジスタによるマウス受精卵活性の非侵襲モニタリング"、応用物理学会、2009/3/30、筑波大学。
3. 坂田利弥、"半導体バイオセンシング技術と生体機能計測"、インテリジェントナノプロセス、2009/12/18、東北大学。
4. 坂田利弥、"生体機能がスイッチ制御する半導体バイオセンシング技術ー診断医療・創薬スクリーニングデバイスへの応用を目指してー"、応用電子物性分科会研究例会 バイオセンサ・医療デバイスーモノづくりからのアプローチー、2010年12月13日、東京(首都大学東京 サテライトキャンパス)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：細胞測定装置

発明者：坂田利弥

権利者：東京大学

種類：特願

番号：2010-24572

出願年月日：2010/2/5

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biofet/>

6. 研究組織

(1)研究代表者：坂田 利弥

研究者番号：70399400

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし