

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 12 月 19 日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560409

研究課題名(和文)電子回路中への cDNA の自己集積化と mRNA 認識パターンの直接演算処理法

研究課題名(英文) Development of an immobilization method for cDNA on an electronic circuit and an application for a detection of mRNA

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・准教授

研究者番号：70284544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000 円、(間接経費) 780,000 円

研究成果の概要(和文)：微小電極を構築した基板上で電気化学反応を制御することで、DNAやタンパク分子を接着、あるいは非接着する面を構築できる方法を確立した。(電気化学パターニング法)本方法では200 $\mu$ m の電極対25対を集積した4mm四方の任意の位置に、タンパク分子を配列できることが明らかとなった。さらに従来試験管の中で遺伝子からタンパク分子を発現させる無細胞タンパク発現がこのような電極基板上でも進行し、このタンパク発現が電圧変化として検出できることを見出した。入力信号である遺伝子配列を一連の酵素群が精密に認識し、その結果タンパク合成が行われ、出力信号として検出できることが証明された。

研究成果の概要(英文)：We have been established an electrochemical patterning method which is possible to control an immobilization of DNA or protein molecule by an electrochemical reaction on a microelectrode mounted on a circuit board. Patterning of protein on 4mm area has been achieved where 25 pair of microelectrodes of 200 micrometer was integrated. We also found that traditional cell-free protein synthesis method in a test tube using a template DNA could be progressed on a microelectrode mounted on a circuit board and an expression of a protein could be detected.

研究分野：電気電子工学

科研費の分科・細目：電子デバイス・電子機器

キーワード：DNA 遺伝子 タンパク 電子回路 バイオセンサー DNAコンピューター

1. 研究開始当初の背景

DNA は塩基配列の違いで特定の DNA を認識する。この認識を電気信号に変換し、出力信号パターンに変換する素子の開発を目標とした。

2. 研究の目的

そこで本研究では有機体と電子回路を融合するインターフェースの開発に着手した。  
 (1) 電極を構築した基板上で電気化学反応を制御することで、DNA やタンパク分子が接着する表面を構築する方法を確立する。  
 (2) 試験管の中で遺伝子からタンパク分子を発現させる無細胞タンパク発現技術を、電極基板上で発現させる方法を確立する。  
 (3) これらの方法で集積した生体物質が出力信号として認識するか評価する。

3. 研究の方法

(1) 電気化学パターニング法の開発

電極をパターニングした基板を作製し、電極を電気化学的に除去した。この基板にタンパク溶液を滴下すると、電極除去面のみタンパク分子が自己集積することを見出した。この原理を利用して、基板上的任意の位置をタンパク分子でパターニングする方法(以下電気化学パターニング法)を開発した。

(2) 自己集積タンパクのセンサ応答性

電気化学パターニング法で自己集積したタンパクの応答性を、電気信号で検出できた。

(3) タンパク発現電極チップの開発

タンパク分子が自己集積的に接合できる化学修飾基板を開発した。この基板に電極を構築し、遺伝子とタンパク発現因子を滴下すると、電極間に遺伝子配列どおりにタンパクが発現し、かつこれを電気信号で検出できた。

4. 研究成果

(1) 電気化学パターニング法の開発

縦 3 cm × 横 5 cm × 厚さ 1 mm のガラス基板の表面に、Cr を 100nm 積層させた Cr/ガラス基板を作製した。フォトリソグラフィにて Cr 面をパターニングし、基板中央の 4 mm 四方の面積に 150 μm の微小電極を 25 対集積した。この基板を N-2-アミノエチル-3-アミノプロピルトリメトキシシラン水溶液に 100-40 分浸漬させ、ガラス表面をアミノアルキルで修飾した。蒸留水で表面を洗浄後、アミノ化修飾基板を得た。この基板を専用のパターニング装置(アーズ株製:無線センサモジュール 2013 モデル)にセットした。この装置は無線通信によって集積電極の任意の電極の通電を制御することができる。PC に接続した親機から専用ソフトによって数 μA 以下の電流を数ミリ秒単位で操作可能であり、微小電極の電気化学反応を精密に制御できる。

図 1 に実験操作を示す。まず集積電極上に 5%塩酸水溶液 10μL を滴下し、初期電流値 2 ~ 3μA で 50s 通電を行った。蒸留水で表面を

洗浄後、電極除去基板を得た。この表面に 100μg/mL ポリリジン/リン酸生理食塩緩衝液 (PBS) 溶液 (以降タンパク溶液と記載) を 10μL 滴下し、室温-5 分保持した。蒸留水で表面を洗浄後、タンパク集積基板を得た。この基板にタンパク分子のみと特異的に結合する 5-カルボキシフルオレセイン N-スクンイミジル (以降蛍光標識剤と記載) を、100μg/mL PBS 溶液として 10μL 滴下し、室温-5 分保持した。蒸留水で表面を洗浄後、蛍光標識タンパク基板を得た。1-4 番の電極対に通電して電気分解を行った。[図 2] 比較のため 5 番は通電していない。本実験条件で負極側の電極が完全に除去され、ガラス面が露出していることを確認した。またこの時に、蛍光物質等は基板表面に存在していないことを確認した。この基板にタンパク溶液を滴下し蛍光標識剤で処理したところ、負極が除去されたガラス面(図 2L で電極が消失している部分)に蛍光パターンが観察された。この蛍光標識化剤はタンパク分子のアミノ基に特異的に結合する。即ち蛍光パターンとして観測されたガラスに、タンパク分子が自己集積していることが示された。

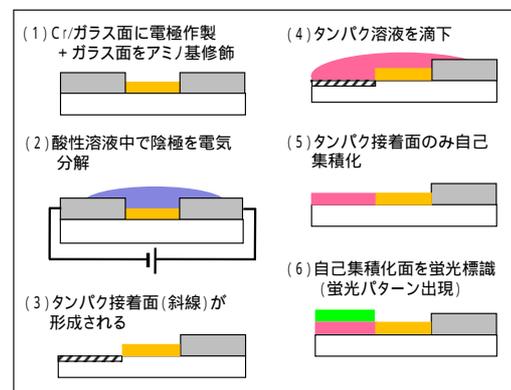


図 1 開発した電気化学パターニング法

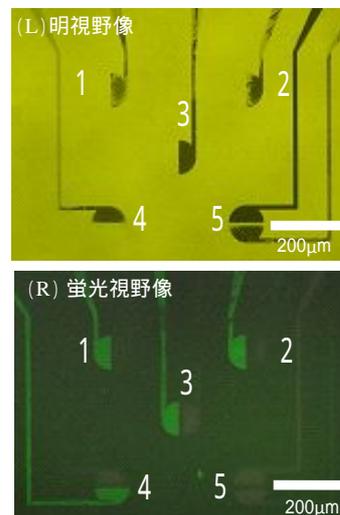


図 2 電気分解面へのタンパクの自己集積化  
 タンパク分子はアミノ基のような極性官能

基と静電的な相互作用、あるいは水素結合による相互作用によって表面に吸着することが知られている。実施例2と比較例2の結果からは、タンパク分子が本来吸着しやすいアミノ化表面よりも、電極を電気分解したガラス面へ特異的に自己集積化することが示された。

## (2) 自己集積タンパクのセンサ応答性

集積化タンパクの応答試験には、市販のセンサ基板[図3a, ウェルセンサ3™(アルバック成膜㈱)製]ならびにセンサ電圧検出器[図3b, バイオセンサモジュール2010モデル(アーズ㈱)製]を用いた。ウェルセンサ3はガラス基板にCr電極が片側5対ずつ配置され、測定部とパッド部以外は撥水性樹脂で被膜されている。測定部分は直径3mmの領域の電極が露出しており(以降ウェルと記載)、全てのウェルにおいて液体との接触面積が等しくなるよう製造されている。このウェルは7~10μLの液体を滴下すると液滴を形成し、その濃度測定が可能である。

バイオセンサモジュール2010モデルはウェルセンサ3専用の測定器であり、センサチップを装着した子機[図3b]の測定データをPCに接続した親機に送信し、これを専用ソフトでリアルタイムに計測できる携帯型計測器である。1回の測定でウェルセンサ3の5つのウェルのデータをパラレルに計測できる。ウェル中の液滴の電導度の計測データから、溶液濃度や電極表面の分子の集積度が解析できる。

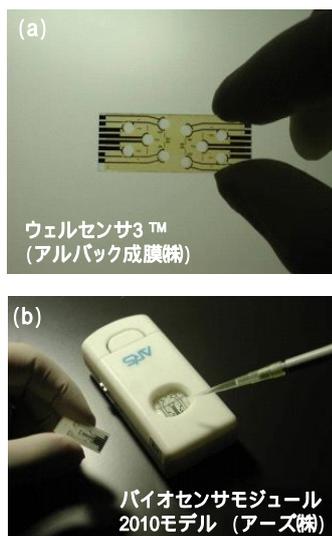


図3 センサチップならびに検出器外観

ウェルセンサを電気化学パターニングする工程を図4に、センサチップ上に集積したタンパクと認識タンパクの組み合わせを図5に示す。全ウェルに10μg/mL抗ヒト血清アルブミン/PBS溶液を7μLずつ滴下し、室温-5分静置した。蒸留水で表面を洗浄後、抗ヒト血清アルブミン集積基板を得た。これに所定

濃度の陽性抗原(ヒト血清アルブミン/PBS溶液)ならびに陰性抗原(ウシ血清アルブミン/PBS溶液)を所定のウェルに滴下し、37-30分静置した。反応後、蒸留水で洗浄して抗体+抗原積層基板を得た。これを再びセンサモジュールに装着し、各ウェルに蒸留水10μL滴下した後、2分間電圧測定を行った。

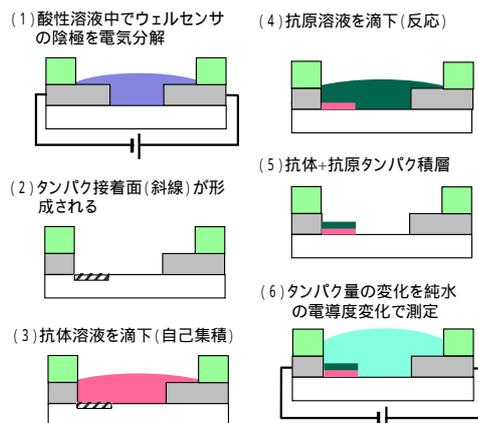


図4 電気化学パターニングによる集積手順

集積タンパク内訳(L側)

ウェルNo	集積タンパク	反応タンパク
0, 1 3, 4	抗ヒト血清アルブミン (抗HSA) 10μg/mL	(陰性)ウシ血清アルブミン (BSA) 100μg/mL
2		PBS (基準電極)

集積タンパク内訳(R側)

ウェルNo	集積タンパク	反応タンパク
0, 1 3, 4	抗ヒト血清アルブミン (抗HSA) 10μg/mL	(陽性)ヒト血清アルブミン (HSA) 100μg/mL
2		PBS (基準電極)

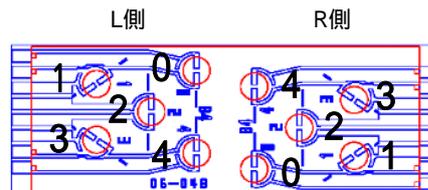


図5 集積タンパクと認識タンパクの内訳

測定後、各ウェルの0~60sの平均電圧を求め、式(1)から相対電圧値を算出した。

$$Rv = 2Vn / (VL2 + VR2) \quad (1)$$

Rv : 相対電圧値 (= センサ応答値)  
 Vn : ウェルnの検出電圧  
 VL2 : L側ウェル2(基準電極)の検出電圧  
 VR2 : R側ウェル2(基準電極)の検出電圧

次に式(2)から、陽性抗原ウェル 陰性抗原ウェル間の応答パラメーターを定義した。

$$Pnm = Rvn / Rvm \quad (2)$$

Pnm : ウェルnとウェルmの間の応答性指標 (ただしnとmはR側、L側の同じ番号)

のウェル(陽性抗原/陰性抗原)の組み合わせ)

Rvn : ウェル n の相対電圧値  
Rvm : ウェル m の相対電圧値

1枚のウェルセンサで陰性抗原測定が4ウェル、陽性抗原測定が4ウェルのため、式(2)ではその組み合わせが8通りとなる。これを算出してレーダーグラフで表示した。式(2)で定義した応答パラメータは理論上、陽性/陰性の比の場合大きく、陰性/陽性の比の場合小さくなる。そのため抗原抗体反応を認識すると、8つのレーダー軸は4方向に伸びた応答パターンとなる。図6に陽性抗原ウェルと陰性抗原ウェル間の応答パラメータを示す。レーダーグラフの軸の略記で、数字はウェル番号、+、-の表記は陽性抗原あるいは陰性抗原の添加したウェルを示す。(例 0- : 陰性抗原を添加したウェル 0 L側ウェル 0) 図6で、4軸方向に伸びた応答パターンが得られた。電気化学パターンニングで自己集積した抗体センサで、抗原をパターン認識で検出できることが示された。

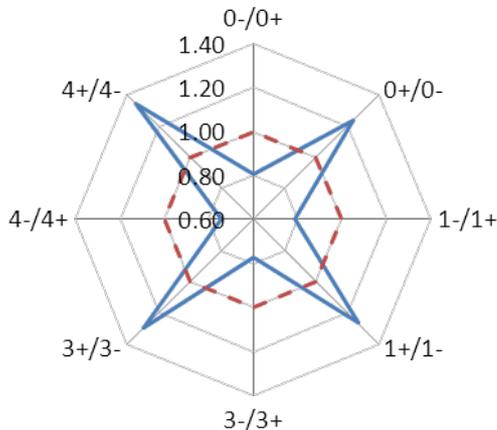


図6 電気化学パターンニング法でセンサチップに集積した抗体タンパクに対する抗原タンパクの認識パターン

### (3) タンパク発現電極チップの開発

ウェルセンサ[図3]のガラス表面をシランカップリング剤を用いて、アミノアルキル基で化学修飾した。これに図7の手順で数種の架橋剤を積層させ、タンパク結合層を形成させた。[タンパク結合基板と記載]

図8にタンパク発現と電圧検出の手順を示す。タンパク発現前のセンサ基板にPBS溶液10μLを各ウェルに滴下後、2分間電圧測定を行った。この平均値を各ウェルの基準電圧とした。次に所定のタンパク発現成分と鑄型DNAを指定のウェルに滴下し、37℃-1h静置した。鑄型DNAにはCAT遺伝子配列を組み込んだ大腸菌プラスミドDNAを用いた。[図9]CAT遺伝子からは、バクテリアが産生するクロラムフェニコール耐性酵素が発現する。反応後の溶液は回収して、ゲル電気泳動法でタンパク発現の確認を行った。基板は蒸留水で

洗浄後、再びセンサモジュールに装着し、PBS溶液10μLを各ウェルに滴下後、2分間電圧測定を行った。この平均値を各ウェルの測定電圧とした。

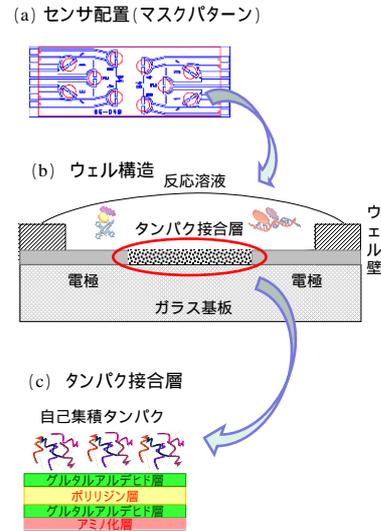


図7 タンパク結合基板の構造と作製手順

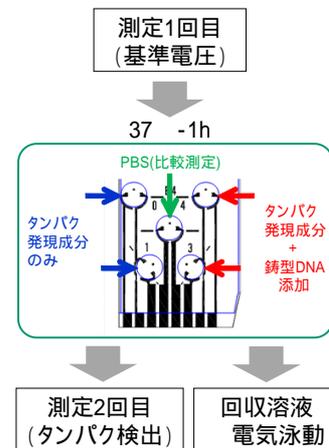


図8 タンパク発現と電圧検出の手順

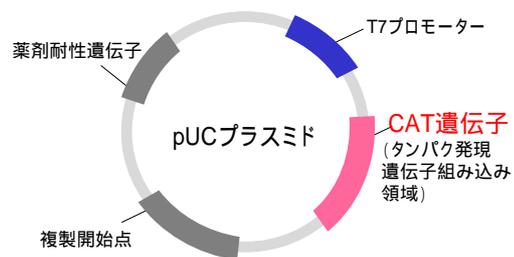


図9 鑄型DNAの構造

以下の式(3)から、相対電圧値を算出した。

$$Rv = V2/V1 \quad (3)$$

Rv : 相対電圧値 (= センサ応答値)  
V1 : タンパク発現前のウェルの検出電圧  
V2 : タンパク発現後のウェルの検出電圧

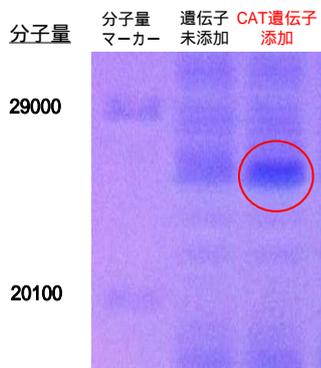


図 10 センサ上の反応回収液のゲル電気泳動結果(赤丸：CAT タンパク、分子量 260,00)

ゲル電気泳動法の結果から、センサ電極間のタンパク結合層で CAT 遺伝子から CAT タンパクが発現していることを確認した。[図 10] またセンサ測定の結果から、CAT タンパクが発現しているウェルでは相対電圧が下がる応答パターンが認められた。[図 11] 鑄型 DNA から発現した CAT タンパクは、センサ基板上に自己集積的に接合し、これが溶液の電導度に反映したと推察される。

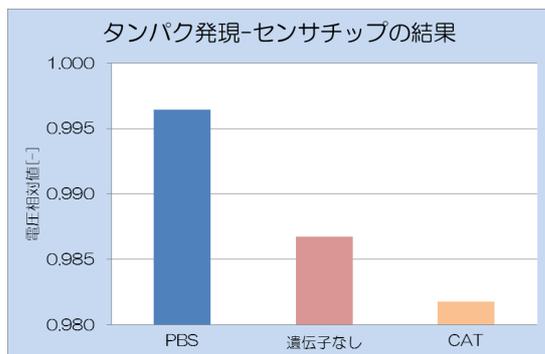


図 11 電極間に自己集積した CAT タンパクのセンサ認識

本研究で考案した 2 つの要素技術は、ともに物理回路にタンパク分子を接合する技術として有効であることが認められた。特に電気化学パターニング法で集積した抗体は、市販のセンサチップで抗原抗体反応をパターン認識した。今後 1 枚のチップに複数の抗体を集積することで、より詳細な疾病予測が実現できるものと期待される。また将来的に半導体回路に生体分子や細胞、組織を融合する技術にも展開できることが期待される。

#### 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 4 件)\*査読有

1\* . 磯田隆聡, バイオセンサによる抗原抗体

反応の検出と化粧品アレルギー検査への応用, FRAGRANCE JOURNAL, 6, (30-35)2013.

2\* . T. Isoda, R.Maeda, Development of an Interaction Assay between Single-Stranded Nucleic Acids Trapped with Silica Particles and Fluorescent Compounds, *Journal of Functional Biomaterials*, 3(2012)601-614.

3\* . T. Isoda, I. Urushibara, H. Sato, N. Yamauchi, Evaluation of Complexation Ability Using a Sensor Electrode Chip Equipped with a Wireless Screening System, *Sensors*, 12(2012) 8405-8425.

4\* . T. Isoda, H. Sato, I. Urushibara, S. Uchida, K. Kusuyama, T. Kojima, T. Asaka, I.Nitta, Evaluation of Immunoglobulin Sensing Function by using of a Fullerene-Composite-Polymer Coated Sensor Electrode, *Sensors and Materials*, 23(2011) 237-249.

[学会発表](計 10 件)

1. 携帯型センサによるタンパク複合体の測定と化粧品中のハプテン検査への応用, 磯田隆聡, COSME Tech 2013 アカデミックフォーラム (2013・7 月: 東京国際展示場)

2. 携帯型センサによる抗原抗体反応の検出と、化粧品アレルギー検査への応用, 磯田隆聡, 第 4 回国際化粧品開発アカデミックフォーラム (2012・7 月: 東京国際展示場)

3. 抗体修飾シリカ微粒子による抗原抗体反応の評価, 梅本洋介, 石川浩太郎, 前田理沙, 岩本春菜, 木村誠, 磯田隆聡, 第 49 回化学関連支部合同九州大会, (2012・6 月: 北九州国際会議場) 5\_6.077

4. ペプチド修飾シリカ微粒子の表面分子設計, 木村誠, 前田理沙, 石川浩太郎, 藏元麻央, 岩本春菜, 梅本洋介, 磯田隆聡, 第 49 回化学関連支部合同九州大会, (2012・6 月: 北九州国際会議場) 5\_6.078

5. 抗体修飾粒子「バイオビーズ」の開発とセンサチップによる抗原検出性能の評価 前田理沙, 石川浩太郎, 藏元麻央, 岩本春菜, 木村誠, 梅本洋介, 磯田隆聡, 第 49 回化学関連支部合同九州大会, (2012・6 月: 北九州国際会議場) 1\_4.080

6. バイオセンサ材料の表面分子設計と合成核酸の特異的認識性能, 前田理沙, 濱松剛志, 亀川良介, 磯田隆聡, 高分子学会 第 60 回高分子学会予稿集, 4958 (2011・10 月: 岡山大学)

(なし)

研究者番号：

7. 抗体分子との結合を目標とする水溶性フラレン誘導体の分子設計, 礒田隆聡, 瀧松剛志, 亀川良介, 前田理沙, 日本化学会第5回バイオ関連化学シンポジウム要旨集, 24 (2011・9月: つくば学研都市)

8. アミノ基を導入したマイクロビーズによる合成核酸分子の特異的認識, 前田理沙, 瀧松剛志, 亀川良介, 礒田隆聡, 日本化学会第5回バイオ関連化学シンポジウム要旨集, 44 (2011・9月: つくば学研都市)

9. フラレンコンポジットポリマーを積層したセンサチップによる IgG 抗体検出の評価, 礒田隆聡, 佐藤光, 漆原育子, 内田茂, 楠山幸一, 小島智明, 浅賀猛, 新田育美 電気学会 E 部門 (センサ・マイクロマシン) ケミカルセンサ研究会予稿集, 33-35 (2011・6月: 東京工業大学)

10. バイオセンサ材料の表面分子設計と合成核酸の特異的認識性能, 前田理沙, 瀧松剛志, 亀川良介, 礒田隆聡, 電気学会 E 部門 (センサ・マイクロマシン) ケミカルセンサ研究会予稿集, 29-31 (2011・6月: 東京工業大学)

〔図書〕(計2件)

1. 礒田隆聡他, 「バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発」, 技術情報協会 (2013) 531-534.

2. 佐藤光, 礒田隆聡他, ワイヤレスセンサシステム, 東京電機大学出版局 (2012) 66-82.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

礒田研究室 HP 内 (-バイオセンサ上へのタンパク分子の集積化法の開発)

<http://www.isodablab.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

礒田 隆聡 (Takaaki ISODA)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号: 70284544

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号:

(3) 連携研究者