

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460707

研究課題名(和文) 次世代酵素センサの開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of the next generation enzymatic sensor

研究代表者

西矢 芳昭 (Nishiya, Yoshiaki)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：70612307

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)：信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタをセンサとして応用し、極めてシンプルな分析ができる汎用バイオ計測システムの構築を最終目的として、酵素センサの開発と応用を行った。本センサは種々の酵素反応で生じる微小な水素イオン濃度の変化を直接的且つ効率良く電気信号に変換し、リアルタイム検出できる。本研究では、さまざまな生体成分の測定方法・測定試薬の開発と、測定装置の小型化検討を並行して行い、新規酵素センサシステムが構築できた。

研究成果の概要(英文)：We developed remarkably simple enzymatic assays based on a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor (SA-ISFET) technology. Decreases in proton concentration resulting from enzyme reactions can be directly and effectively detected in real time by SA-ISFET as a change in potential. The assay methods exhibited high sensitivity, linearity, and reproducibility when potential signals are accumulated 10-fold. We also developed a simple and compact-sized analyzer using the biosensor equipped with SA-ISFET. The proton quantities increased or decreased by enzyme reactions with small amount of samples were directly detected by the SA-ISFET sensor as altered potentials, whereas conventional enzymatic assays required labeling process or coloring process. The biosensor was further improved with built-in reference electrodes and capacities optimized reaction chambers. In future, this analyzer can be applied to various measurement systems based on enzyme reactions.

研究分野：酵素工学 応用微生物学

キーワード：酵素センサ バイオ計測システム 生体成分分析 臨床検査 食品検査 電界効果トランジスタ 信号  
累積 pH変化

### 1. 研究開始当初の背景

(1)医療や研究の分野では、さまざまなバイオ計測システムが活躍しているが、主なものは海外メーカー製である。ただし、それらの主要部品には国内メーカー製が多いと聞く。高い基礎技術があっても最終製品が国内メーカー製とならないのは、応用技術の不足が一因と思われる。

(2)医療や分析化学、食品工学などの分野では、電流検出タイプの酵素センサを用いた計測が盛んに実施されている。一方、われわれは ISFET を用いた電位検出タイプのバイオセンサを検討している。本センサは、表面のイオン感応膜に溶液が接すると、溶液中のイオン活量に応じて表面電位が発生するしくみを利用しており、基本組成が単純で小型化及び規格化が容易など様々な利点がある。しかし感度が低いという問題があり、普及していない。われわれは ISFET の欠点を克服するため信号累積型 ISFET (SA-ISFET) を開発し、電荷をセンサ内に蓄積して測定を瞬時に複数回繰り返すことにより、高感度バイオセンサとしての可能性を見出した。基礎技術として優れている SA-ISFET の応用を発展させれば、実用的な計測システムが構築できると思われる。

### 2. 研究の目的

SA-ISFET を応用し、極めてシンプルな構成の汎用バイオセンサの構築と応用を研究目的とした。SA-ISFET は種々の反応で生じる微量な水素イオン量の変化を直接的かつ効率良く電気信号に変換し、リアルタイム検出することが原理的に可能と思われる。したがって、様々な酵素反応や生体反応も水素イオン量変化として簡便に計測し得ると考えた。具体的には、微量生体成分分析、簡易臨床検査システム、食品分析や環境分析などへ応用可能な SA-ISFET 利用分析技術の開発、および小型で且つ迅速測定が可能な計測機器の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) SA-ISFET センサを使用した測定法の原理を図 1 に示す。ISFET のセンシング部表面電位の変化に基づくポテンシャル井戸の深さの変化を浮遊拡散部に電荷として転送することを繰り返し、浮遊拡散部に電荷が累積される。センシング部表面電位の変化が微量であってもセンサ内で増幅されるため、高感度にイオン濃度の変化を検出することができる。SA-ISFET センサの信号累積回数は、現状で最適と思われる 10 回に設定した。

(2) まず、原理的に SA-ISFET 法にて分析可能な酵素反応を、応用面での重要性から選定した。汎用されている電流検出タイプの酵素センサは酸化還元反応のみを検出できるが、SA-ISFET では酸化還元反応以外にも種々の加水分解反応や合成反応、脱離反

応などに応用の可能性を有する。次いで試薬組成や分析条件などを検討し、信号累積効果や希釈直線性、再現性などを確認した。開発した測定法にて実サンプル中の成分濃度を計測し、実用性を評価した。

(3) 小型装置の開発は、ISFET メーカーである(株)バイオエックスの協力の基、基礎検討装置改良の流れで実施した。

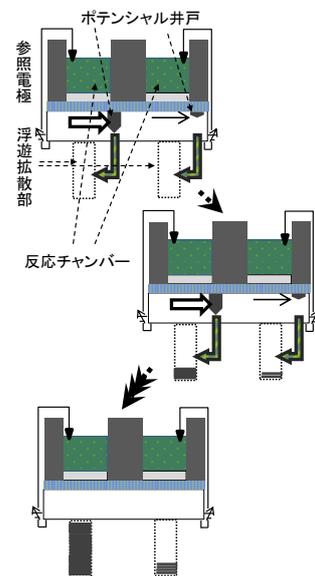


図1 SA-ISFETの測定原理

### 4. 研究成果

#### (1)尿素態窒素測定法の開発

臨床検査や食品分析などで多用される尿素態窒素の測定法を開発した。SA-ISFET センサでは尿素態窒素の測定は、ウレアーゼによる尿素的加水分解でできるアンモニウムイオンに応じた水素イオン量の変化で計測できた。従来法と異なり使用酵素は1種のみで、試薬もバッファーのみを使って高感度な測定を証明できた(図2)。試薬組成および測定条件を至適化した結果、1分間でのエンドポイントアッセイが可能となり、直線性も良好であった。通常の ISFET との比較では、10回の累積測定により大幅な感度向上が見られた。また、同時再現性、日差再現性共問題無いレベルであることを確認した。

さらに、ミルク中の尿素濃度の SA-ISFET センサによる簡便な測定を実証した。市販の測定試薬(ロシュ社 F-キット, No. 542946)は臨床検査と同様の測定原理に基づいており、さらにサンプルの前処理が必要のため、測定時間が約 35 分間と長い。SA-ISFET センサでは、1分間での測定が可能となった。

#### (2)ペルオキシダーゼ測定法の開発

生化学臨床検査や免疫検査、あるいは環境分析にて多用されるセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)反応の測定法を開発した。本反応で微量水素イオン量の変化を伴う系として、2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)(ABTS)を用いるシンプルな測定系を考案した。本測定系の試薬組成および測定条件を設定し、SA-ISFETにて信号累積回数10回での測定を実施した。結果として、HRP反応による過酸化水素の定量が可能なることを確認できた。25℃にて、1~2分間でのアッセイが可

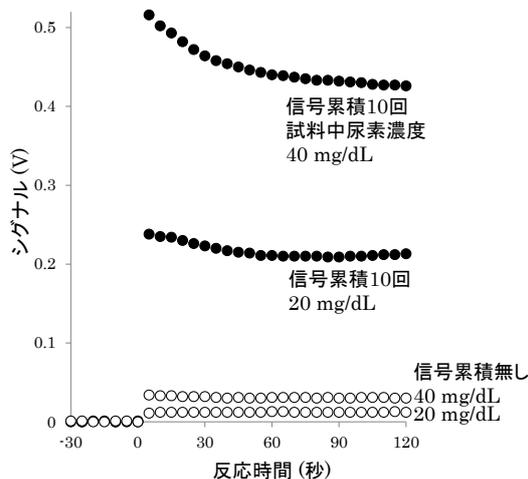


図2 尿素濃度測定の時系列

能であり、直線性も良好であった。通常のISFETとの比較では、10回の累積測定により大幅な感度向上が見られた。また、再現性についてもバイオセンサとして問題無いレベルであることを確認した。さらに、免疫検査における標識酵素検出系としての応用も可能であった。

#### (3) その他の測定法の開発

核酸合成反応の検出モデルとして、T7RNAポリメラーゼによるDNA依存RNA合成反応の検出を検討した。核酸合成では、DNA、RNAに関わらずピロリン酸が生成する。生成したピロリン酸は電離し、最終的に水素イオン濃度が上昇する。バッファー濃度、反応液pH、反応温度などの検討を行い、ピロリン酸の電離が十分に起こる条件を見出すことにより、SA-ISFETによる検出が可能となり、光学系のいらぬ極めて簡便な遺伝子検査システムの構築に目処を得た。さらに、アミノ酸オキシダーゼを用いたアミノ酸測定や、癌等の疾病バイオマーカーとして注目されているサルコシン、主要な臨床検査項目であるグルコースや乳酸、尿酸、ポリフェノール類の測定法も開発した。本検討で培った技術を水平展開すれば、他にも様々な微量生体成分の分析が可能になると考えている。また、アミノ酸の微量分析は、食品分析や環境分析への波及効果も期待できる。

#### (4) 測定装置の小型化

如何に分析が簡便でも、測定装置がコンパクトでなければバイオセンサとして実用化は難しい。SA-ISFETには銀塩化銀参照電極が必要だが、これは周囲に塩素イオンが無い条件では機能しない。このことを考慮し、基礎検討装置には汎用ガラス電極を導入し、塩化カリウム水溶液に電極を浸して使用していた。しかしながら、ガラス電極を使用した状態ではコンパクトな設計が困難で、小型化装置を開発することはできない。種々の測定法検討の過程で、安定な測定のためには塩化ナトリウムや塩化カリウムを50mM程度含有する試薬が効果的なこ

とが判明した。したがって、試薬中に塩素イオンが存在することを前提とした装置設計が可能であると判断し、参照電極として銀塩化銀固体電極を導入することにより装置の大幅な小型化を実現した。

さらに、電子回路を見

直し、表面実装部品を使用することによって制御基板を小型化することや、温度制御部、測定端子部を見直すこと等により、コンパクトサイズ測定装置の開発に成功した(図3)。測定装置のサイズは、従来の装置と比して体積ベースで約1/17となった。

#### (5) 測定操作の簡便化

これまでSA-ISFETセンサでは、参照電極を試薬中に設置する必要があった。これは簡単な操作ではあるが、バイオセンサとしての簡便性を高めるため、操作の更なる簡略化を検討した。固体電極を小型化してセンサの反応チャンバー内に設置し、導線をセンサ基板に接続してセンサと一体化することにより参照電極内蔵型のSA-ISFETセンサを開発し、課題を解決した。参照電極内蔵型とすることで、それまでセンサと電極を別々に洗浄していたものが同時に洗浄できるようになった。またセンサの上部空間が大きく広がり、サンプル添加が容易になった。さらに、反応チャンバー上部に蓋を設けることができるため、細胞や微生物などの生理活性を対象とした反応時間が比較的長い測定にも対応できるようになった。SA-ISFETセンサを用いることで、これまで複雑な系の選択を余儀なくされてきた酵素反応の測定が、シンプルに行えるようになった。本センサの利点を活かし、装置の携帯化、測定項目の多様化へ発展していくものと期待している。

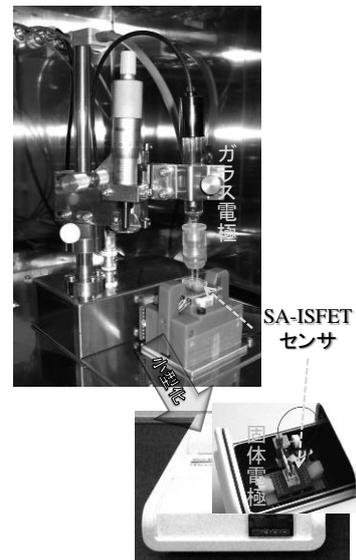


図3 小型化装置の開発

#### <引用文献>

- ① 西矢芳昭他, 生物試料分析, 32: 240-243, 2009
- ② 西矢芳昭他, 物試料分析, 34: 247-250, 2011
- ③ Tomari N, et al., J Biosci Bioeng, 119: 247-250, 2015
- ④ 谷敏夫, 西矢芳昭, 生物試料分析, 38: 196-201, 2015

## 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 11 件)

- ① Nishiya, Y. and Shimozawa, Y.: Properties of *Geobacillus stearothermophilus* malate dehydrogenase used as a diagnostic reagent and its characterization by molecular modeling. Int. J. Anal. Bio-Sci., 4, in press (2016). 査読有
- ② Hibi, T., Kume, A., Kawamura, A., Itoh, T., Fukada, H., and Nishiya, Y.: Hyperstabilization of tetrameric *Bacillus* sp. TB-90 urate oxidase by introducing disulfide bonds through structural plasticity. Biochemistry, 55, 724-732 (2016). 査読有
- ③ Nishiya, Y. and Abe, Y.: Comparison of the substrate specificity of L-pipecolate oxidase and bacterial monomeric sarcosine oxidase, and structural interpretation of the enzymes. Int. J. Anal. Bio-Sci., 3, 140-145 (2015). 査読有
- ④ 谷敏夫, 西矢芳昭: 信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによる生理活性反応測定装置の開発. 生物試料分析, 38, 196-201 (2015). 査読有
- ⑤ Aiba, H., Nishiya, Y., Azuma, M., Yokooji, Y., Atomi, H., and Imanaka, T.: Characterization of a thermostable glucose dehydrogenase with strict substrate specificity from a hyperthermophilic archaeon *Thermoproteus* sp. GDH-1. Biosci. Biotechnol. Biochem., 79, 1094-1102 (2015). 査読有
- ⑥ Tomari, N., Kawasaki, A., Yamamoto, Y., and Nishiya, Y.: A simple and reliable urea assay method based on a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor. J. Biosci. Bioeng., 119, 247-250 (2015). 査読有
- ⑦ Nishiya, Y.: Structural comparison of creatinases for investigating substrate binding. Int. J. Anal. Bio-Sci., 2, 143-147 (2014). 査読有
- ⑧ Hibi, T., Hayashi, Y., Fukada, H., Itoh, T., Nago, T., and Nishiya, Y.: Intersubunit salt bridges with a sulfate anion control subunit dissociation and thermal stabilization of *Bacillus* sp. TB-90 urate oxidase. Biochemistry, 53, 3879-3888 (2014). 査読有
- ⑨ Nishiya, Y. and Nakano, S.: Screening of enzyme stabilizers using thermal shift assays on the basis of structural informations. Int. J. Anal. Bio-Sci., 2, 58-63 (2014). 査読有
- ⑩ Nishiya, Y.: Homology modeling and docking study of creatinine deiminase. Int. J. Anal. Bio-Sci., 1, 55-59 (2013). 査読有
- ⑪ Nishiya, Y.: Altered substrate affinity of monomeric sarcosine oxidase by the mutation

of phenylalanine-103 or histidine-348. Int. J. Anal. Bio-Sci., 1, 21-26 (2013). 査読有

[学会発表] (計 22 件)

- ① 西矢芳昭, 坂井華美, 井原弘絵, 泊直宏, 山本佳宏, 谷敏夫: 信号累積型 ISFET バイオセンサを用いた過酸化水素測定系の開発, 生物試料分析科学会 (2016 年 2 月 21 日, 宜野湾)
- ② 山本眞知, 加納周作, 中野祥平, 西矢芳昭: 臨床検査用酵素の開発: 高基質親和性を有する好熱性光合成細菌由来サルコシンオキシダーゼ, 生物試料分析科学会 (2016 年 2 月 21 日, 宜野湾)
- ③ 吉田知左, 西矢芳昭: サルコシンオキシダーゼの L-チオプロリンに対する反応性, 生物試料分析科学会 (2016 年 2 月 21 日, 宜野湾)
- ④ 穴瀬侑樹, 中嶋義隆, 西矢芳昭, 川南裕, 北林雅夫, 芳本忠, 伊藤潔: *A. oryzae* 由来 FAD 依存型 D-グルコース脱水素酵素の反応機構, 第 38 回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (2015 年 12 月 2 日, 神戸)
- ⑤ 西矢芳昭: 信号累積型 ISFET バイオセンサを利用したペルオキシダーゼ・過酸化水素測定系の開発, 日本臨床化学会 (2015 年 10 月 31 日, 大阪)
- ⑥ 泊直宏, 山本佳宏, 川崎朝子, 西矢芳昭: 信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタに基づく簡便で正確な尿素分析, 日本生物工学会 (2015 年 10 月 26 日, 鹿児島)
- ⑦ 西矢芳昭: 臨床検査用原料酵素: テーマ設定から商品化までの課題と対策, 日本生物工学会 (2015 年 10 月 27 日, 鹿児島)
- ⑧ 穴瀬侑樹, 中嶋義隆, 西矢芳昭, 川南裕, 北林雅夫, 芳本忠, 伊藤潔: *Aspergillus oryzae* 由来 FAD 依存型 D-グルコース脱水素酵素における His506 の役割, 日本生物工学会 (2015 年 10 月 26 日, 鹿児島)
- ⑨ 林祐太, 伊藤貴文, 西矢芳昭, 岸本高英, 日弁隆雄: *Bacillus* sp. TB-90 由来ウリカーゼ高活性化変異体 P287G の構造機能解析, 日本農芸化学会 (2015 年 3 月 28 日, 岡山)
- ⑩ 西矢芳昭: Blocking Peptide Fragment の蛍光ベースアッセイによる安定性評価, 生物試料分析科学会 (2015 年 2 月 15 日, 東京)
- ⑪ 塩野貴子, 鈴村菖, 西矢芳昭, 新井亮一, 野村隆臣: グリシンオキシダーゼの基質阻害様式に関する研究, 日本分子生物学会 (2014 年 11 月 26 日, 横浜)
- ⑫ 塩野貴子, 西矢芳昭, 新井亮一, 野村隆臣: Glycine oxidase の基質阻害に関する構造的基盤, 生物高分子学会 (2014 年 9 月 12 日, 上田)
- ⑬ 中嶋義隆, 西矢芳昭, 川南裕, 北林雅夫, 芳本忠, 伊藤潔: *A. oryzae* 由来 D グル

コース脱水素酵素の基質認識、生物工学会 (2014年9月9日、札幌)

⑭ 西矢芳昭、川崎朝子、泊直宏、山本佳宏：信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタを用いた尿素測定センサの開発、臨床化学会 (2014年9月7日、東京)

⑮ 塩野貴子、新井亮一、西矢芳昭、野村隆臣：Geobacillus kaustophilus 由来 Glycine oxidase の X 線結晶構造解析、蛋白質科学会 (2014年6月26日、横浜)

⑯ 西矢芳昭、川崎朝子、泊直宏、山本佳宏：信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタを用いた尿素測定系の開発、生物試料分析科学会 (2014年3月1日、鈴鹿)

⑰ 中野祥平、西矢芳昭：サーマルシフトアッセイによる診断用酵素の安定化剤スクリーニング、生物試料分析科学会 (2014年3月1日、鈴鹿)

⑱ 筒井和子、伊藤貴文、日弁隆雄、西矢芳昭：超耐熱型好冷性ウリカーゼを用いた尿酸簡易測定法の開発、生物試料分析科学会 (2014年3月1日、鈴鹿)

⑲ 林祐太、伊藤貴文、西矢芳昭、深田はるみ、日弁隆雄：硫酸イオン塩架橋による Bacillus sp. TB-90 ウリカーゼの耐熱化、農芸化学会 (2014年3月28日、東京)

⑳ 大石さくら、塩野貴子、西矢芳昭、新井亮一、野村隆臣：SDS 耐性グリシンオキシダーゼの精製と酵素特性解析、分子生物学会 (2013年12月3日、神戸)

㉑ 中野祥平、西矢芳昭：診断用酵素サルコシンオキシダーゼの基質特異性・立体選択性に関する検討、臨床化学会 (2013年8月31日、徳島)

㉒ 西矢芳昭：診断用酵素クレアチニンデイミナーゼのホモロジーモデリングとその応用、臨床化学会 (2013年8月31日、徳島)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.setsunan.ac.jp/kenkyu/shien/seeds.html>  
<http://www.neyamono.jp/sangaku/>  
<http://www.setsunan.ac.jp/~bio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西矢 芳昭 (NISHIYA, Yoshiaki)  
摂南大学・理工学部・生命科学科・教授  
研究者番号：70612307

(2)研究分担者

野村 隆臣 (NOMURA, Takaomi)  
信州大学・繊維学部・助教  
研究者番号：90362110

(3)連携研究者

( )

研究者番号：