

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19145

研究課題名(和文)疾患発症・進行予測に向けた有機薄膜FETによるヒストン化学修飾解析

研究課題名(英文)Histone modification analysis on an organic FET for diagnosis

研究代表者

栗田 僚二(Kurita, Ryoji)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：50415676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンの化学修飾を生体分子間相互作用として解析するため、有機薄膜FETデバイスの開発を行いエピジェネティクスセンサとして分子生物学や疾病診断、発症・進行予測ツールとしての可能性を見出すことである。各種ガン細胞の培養をおこない、培地中成分の多変量解析として、タンパク質の定性ならびに半定量実験をおこない、ヒストン修飾への足がかりとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ゲノムDNAやヒストンの後天的な化学修飾(エピジェネティクス)と疾病に関する多くの研究がなされており、様々な疾患とエピジェネティックな化学修飾との間に統計的な相関があることは誰もが認めるところである。しかしながら、多岐にわたるヒストン修飾を網羅的に測定する技術が無かった。我々は、ヒストンを含む測定対象溶液を滴下するだけで各種ヒストンの修飾状態を迅速に直接解析可能な有機FETデバイスの開発を行い、がん化等のエピゲノム異常検知、さらには発症・進行予測に向けた基礎・基盤技術を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze chemical modifications of histones as biomolecular interactions, we are developing organic thin film FET devices and finding the possibility as tools for molecular biology, disease diagnosis, onset / progression prediction as epigenetics sensors. Various cancer cells were cultured, and protein qualitative and semi-quantitative experiments were conducted as multivariate analysis of the components in the culture medium, as a basis for histone modification.

研究分野：分析化学

キーワード：エピジェネティクス トランジスタ バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

血液や尿などの体液中に含まれる各種生体成分を検出することは、病気の早期発見や診断さらには治療方針を決定する上で極めて重要である。近年ではゲノム DNA やヒストンの後天的な化学修飾 (エピジェネティクス) と疾病に関する研究が活発に行われ、多くの疾患とエピジェネティックな化学修飾との関連について統計的な相関があることは誰もが認めるところである。現在、ヒストンの化学修飾状態を解析するには、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) が一般的に用いられている。例えば、ヒストンのアセチル化状態を解析するためには、まずヒストンと DNA をホルムアミドでクロスリンクさせ、超音波で断片化した後、抗アセチル化ヒストン抗体で免疫沈降を行う。さらに、沈降させた DNA-ヒストン複合体を脱リンクさせてから DNA を抽出し、目的とする遺伝子特異的プライマーを用い PCR 等で定量している。すなわち、化学修飾されたヒストンに巻き付いた DNA の検出であり、ヒストンの修飾を直接検出しているものではない。また、ヒストンの修飾はメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化など多岐にわたり、さらにメチル化もモノ・ジ・トリメチル化されていることも知られている。多岐にわたる修飾を測定する場合には、免疫沈降反応をその都度抗体を換えて行い、さらに PCR で確認していく必要がある。ここで、複雑で多様なヒストン修飾を免疫沈降によって網羅的に行うことは、その労力と時間を鑑みると現実的ではなく、新規分析手法の開拓が必須である。特に、近年期待が高まっている疾病診断や発症・進行予測に関しては、時間分解能の高い迅速な分析手法によって化学修飾の経時変化をモニタリングして情報を蓄積していくことが欠かせない。

2. 研究の目的

本研究では、多彩なヒストンの修飾状態を迅速かつ直接解析可能な分析手法の実現を目指し、有機 FET (OFET) をプラットフォームとしたセンサアレイの開発を目標とした。FET のデバイス構造は集積化に適しており、膨大な並列処理が可能なことから、次世代シーケンサの検出器としてゲノム解析に用いられている。しかしながら、従来の Si テクノロジーで作製した無機トランジスタはコスト面からディスプレイ化が難しく、より広範なバイオ分析用途に展開することが難しかった。そこで、将来の疾病診断応用も視野に入れ、印刷技術で大量生産可能な OFET によるセンシングプラットフォームの構築に挑戦し、がん化等のエピゲノム異常検知、さらには発症・進行予測を実現する医療・医学や分子生物学ツールとしての可能性を見出すための基盤技術開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

OFET を水溶液中のタンパク質検出に適応させるには、デバイスの低電圧駆動化や安定性が重要となる。そこで本研究では、電解質ゲート検出を有する OFET の作製をおこない、低電圧駆動性について実証した (図 1a)。当該デバイス構造では、半導体/電解質界面の極近傍領域に形成される電気二重層 (EDL) に由来した超強電界により OFET 特性が制御され、超低電圧駆動化とデバイス構造の簡略化が期待できる。デバイス作製においては、はじめに真空蒸着法によってソース/ドレインおよびゲート電極 (Au, 50 nm) をガラス基板の同一平面上に形成した。次に、半導体部とゲート電極部の分離および電極封止をおこなうため、フッ素系樹脂 (Cytop) をスピコートした後、メタルシャドウマスクを介した酸素プラズマエッチングにより、各部位を選択的に開口した。その後、半導体部位に共役性ポリマー (poly(2,5-bis(3-hexadecylthiophene-2-yl)-thieno[3,2-b]thiophene, PBTtT) をドロップキャスト法により形成し、窒素雰囲気下でアニーリング処理を行った。チャンネルおよびゲート部全体を覆うように電解質水溶液を滴下し、電気特性の評価をおこなった。

次に、OFET の特性制御法の確立を検討した。OFET をバイオセンサアレイに適用する際には、アレイ内において集積した OFET 毎の特性のバラツキを小さくする必要がある。

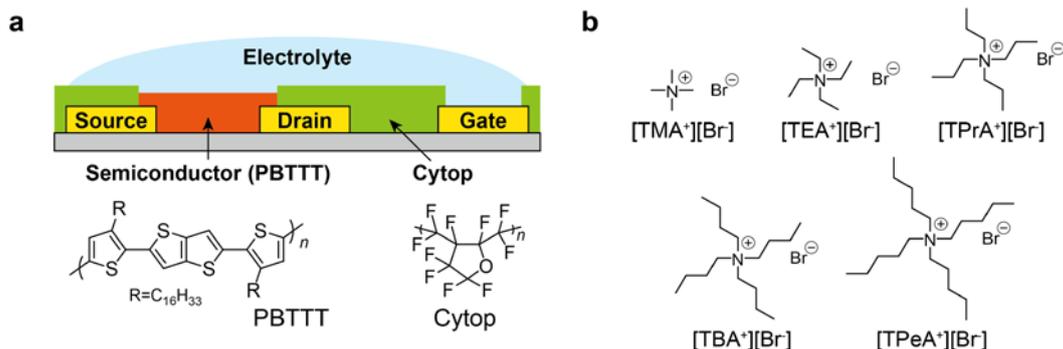


図 1. (a) 作製した OFET の構造。(b) 特性制御に用いた各種有機カチオンの構造。

OFETは従来のSi-FETと比較し、その作製工程において半導体層内や半導体/誘電体界面での無秩序なトラップ準位の生成を抑制することが難しく、これがOFETバラツキの由来となっている。しかしながら、作製済みのデバイスに対する実践的な特性制御法はこれまでに確立されておらず、OFETのセンサアレイへの適用を妨げていた。そこで本研究では、OFETの誘電体層(EDL)を構成する電解質イオンに着目した。前述の作製したOFETにおいて、電解質種としてアルキル鎖長が異なる第4級アンモニウムブロミド類(TAABr)を種々用いることで、カチオン種の分子構造の違いに起因した電気特性(閾値電圧依存性)を評価した(図1b)。なお、電解質濃度は全て10 mMとし、媒体はHEPES緩衝水溶液(100 mM, pH 7.4)を採用した。

4. 研究成果

(1) 水溶液中でのデバイス動作(低電圧駆動性)の実証

はじめに、作製したOFETの基本特性を評価したところ、極めて低い動作電圧で良好な非線形電流応答性が確認された(図2)。また、本デバイスは水系媒質(電解質水溶液)中で駆動させているにも関わらず、掃引電圧に対する電流のヒステリシス(図2a)や経時的な特性変動が観察されなかった。水系媒質中での動作安定性は、適用した半導体材料(PBTTT)の特質に由来し得る。すなわち、PBTTT薄膜においては(1)半導体/水溶液界面に疎水性の高い長鎖アルキル(=ヘキサデシル鎖)が偏析していること、(2)平面性の高いチエノチオフェン骨格が主鎖中に存在することで、空隙のない密なパッキングが実現していること — の2点により、半導体層内への水の侵襲が抑制され、優れた動作安定性が発現されたと考えられる。

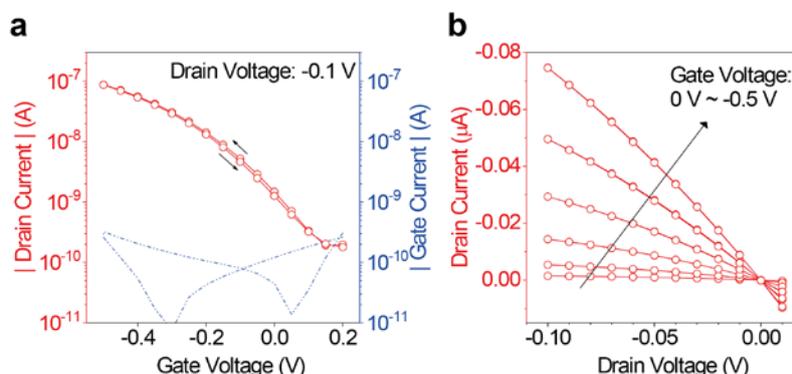


図2. 作製したOFET(電解質: TMABr)の電気特性。(a) 伝達特性 (b) 出力特性

(2) 有機カチオンを用いた特性制御法の確立

次に、電解質として適用する有機カチオン(=[TAA⁺])の分子構造を系統的に検討し、OFET特性の依存性を調査した。その結果、[TAA⁺]のアルキル鎖長が伸びるにつれ、OFETの伝達特性および閾値電圧が負方向にシフトする結果が観測された(図3a)。そこで、各電解質溶液における静電容量を測定したところ、OFETの閾値電圧に対する直線的な相関関係が示された(図3b, 相関係数: 0.97)。このことから、カチオンの分子サイズ変化に伴うEDLの静電容量変化が、ゲート部におけるフラットバンド電圧の変位を誘発し、これに対応してOFETの特性が変化したものと考えられる。カチオンの化学的性質に由来した本現象は、デバイス中に導入する電解質種を変えるだけでOFETの電気特性を調節可能であることを示唆している。さらに、[TMA⁺]および[TPeA⁺]の各電解質を交互に同一のOFET

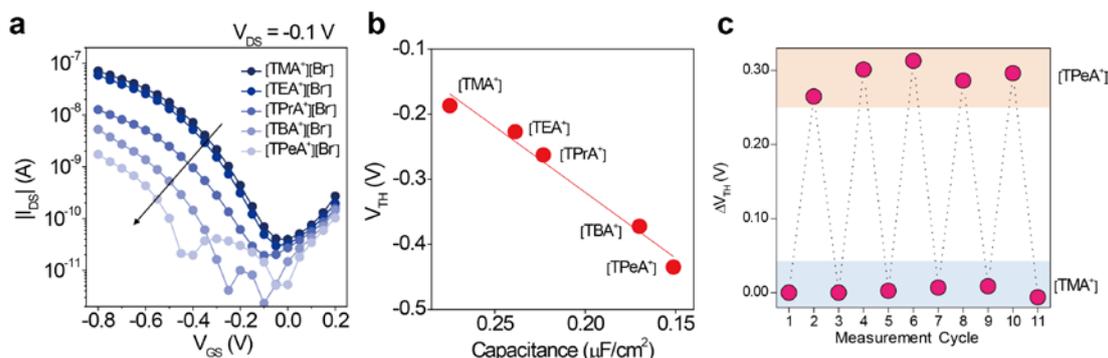


図3. 電解質種に依存したOFETの電気特性。(a) 伝達特性変化 (b) 閾値電圧と静電容量の関係性 (c) 電気特性(閾値電圧)の可逆応答性

に適用し、特性変化の可逆性を調査した。その結果、電解質種を変えることで OFET の閾値電圧を可逆的に制御可能であることが確認された (図 3c)。

以上の研究成果より、(1) 水系媒質中でのタンパク質検知に至適な低電圧駆動性および動作安定性の実現に向けたデバイス構造・材料選定、(2) OFET のバラツキ低減に向けた簡便かつ自在な特性制御手法 — についてそれぞれ検討し、OFET 型センサアレイの実現に向けた重要な知見が得られた。本研究を通じて得られたデバイス設計指針を基に、今後多彩なヒストン化学修飾の網羅的分析へと展開すると共に、その他の生体関連物質についても高スループットな分析技術の構築に向けたデバイス技術の足掛かりとしたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Tsukuru Minamiki and Ryoji Kurita, “Potentiometric detection of biogenic amines utilizing affinity on a 4-mercaptopbenzoic acid monolayer”, *Analytical Methods*, **2019**, *11*, 1155–1158. (査読有)

② 南木 創, 南 豪, “有機薄膜デバイスの分析化学への展開：分子認識能を付与した有機薄膜トランジスタによる化学センシング”, *分析化学*, **2018**, *67*, 229–237. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

① 南木 創, 蘇 爽維, 相子美智雄, 南 豪, “有機カチオンによる電気二重層トランジスタの特性変化”, 日本分析化学会 平成 30 年度東日本分析化学若手交流会, 2018 年 7 月 7 日, 新富亭 (宮城県) (ポスター発表)

[図書] (計 0 件)

[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

産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 ナノバイオデバイス研究グループ

<https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-nbd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名：栗田 僚二

ローマ字氏名：(KURITA, Ryoji)

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：研究グループ長

研究者番号 (8 桁)：50415676

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：富田 峻介

ローマ字氏名：(TOMITA, Shunsuke)

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：研究員

研究者番号 (8 桁)：50726817

(3) 研究分担者

研究分担者氏名：南 豪

ローマ字氏名：(MINAMI, Tsuyoshi)

所属研究機関名：東京大学

部局名：生産技術研究所

職名：講師

研究者番号（8桁）：70731834

(4)研究分担者

研究分担者氏名：南木 創

ローマ字氏名：(MINAMIKI, Tsukuru)

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：研究員

研究者番号（8桁）：40793980

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。