

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K04905

研究課題名(和文) 乳がん予後の高感度簡易検出のためのペプチドFETセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of peptide FET sensor for highly sensitive and simple detection of breast cancer

研究代表者

ビヤニ マニッシュ (Biyani, Manish)

北陸先端科学技術大学院大学・共創的国際研究推進本部・特任教授

研究者番号：00599780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：カテプシンE (CatE) の発現量を測定するために、シリコンベースのFETセンサーを開発した。これは、CatE特異的基質ペプチドをFET表面に固定化し、CatEの切断を手のひらサイズのポータブルFETデバイス(FETSORと呼ぶ)を用いて測定することにより実現した(図1左)。バイオセンサーを動作させるための測定条件は、pH7.4、0.01X PBSで最適化した。その結果、2.3 pmolのCatEが基質ペプチドを切断する活性の有無の区別に成功した(図1右)。pH7.4でのペプチド上の全電荷は+8.51であり、切断後は+3.61に減少し、ゲート電圧測定値が0.05V減少することで確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FETSORを用いたCatE測定の有用性を実証・評価することに成功した。乳がんバイオマーカーであるカテプシンEを簡便かつ迅速に検出するための携帯型ペプチドベースFETセンサーの開発という成果をもって、本研究課題の完了とする。

研究成果の概要(英文)：A silicon-based FET sensor was developed to measure the expression of cathepsin E (CatE). This was achieved by immobilizing a CatE-specific substrate peptide on the FET surface and measuring CatE cleavage using a palm-sized portable FET device (called FETSOR) (Fig. 1 left). The measurement conditions for operating the biosensor were optimized at pH 7.4 and 0.01X PBS. As a result, 2.3 pmol of CatE successfully distinguished the presence or absence of activity to cleave the substrate peptide (Fig. 1 right). The total charge on the peptide at pH 7.4 was +8.51, which decreased to +3.61 after cleavage, as confirmed by a 0.05 V decrease in the measured gate voltage. Thus, the usefulness of the FETSOR-based CatE measurement was successfully demonstrated and evaluated. The project will end with the achievement of developing a portable peptide-based FET sensor for the simple and rapid detection of the breast cancer biomarker cathepsin E.

研究分野：Biosensor

キーワード：Peptide

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景
2. 研究の目的

血液のような多成分系に含まれる微量分子(バイオマーカーなど)を高感度に検出することは、分析化学や医学の基礎的重要課題である。抗体を用いた多くの測定系が確立されてきたが、たんぱくの2割までにしか適用できない等限界が顕在化している。本研究では、より広い分子群へ応用でき、探索方法も確立されつつあり、結合力だけでなく酵素活性など機能も評価できるペプチドアダプタマを用い、高い特異性を実現し、同時に高感度な電気化学センサーへの実装により高信頼性の検出系を構築する。具体的には、早期発見が重大な課題となっている乳がん診断への適用を目指し、カテプシン E の活性を乳がんの分子マーカーとし、進化工学的に創製された高い特異的選択性を有するペプチド分子を用い、それを担持した電気化学的センサー (PEP-on-DEP, PEP-on-FET、結合力 + 酵素活性評価) を開発し、これらの知見を統合・発展させて乳がんの早期診断の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 Design and synthesis of Peptide Aptamer and Peptide substrate: Total 5 peptides candidates are designed and synthesized:

### Peptide aptamer (inhibitor or activator) for Cathepsin E

1. CatE\_3L-Inhibitor-4.5\_Bio (31 aa): NH2-SCGGI IISC IAVIS LIPGR IGCIR AKAAA K(Biotin)
2. CatE\_4L-Activator-7.5\_Bio (36 aa): NH2-GCPCI DFKVE VQVEV AEALL SALS L SPGW R AKAAA K(Biotin)

### Peptide substrate for Cathepsin E

3. CatE-Sub\_acidic-Bio (30 aa): NH2-CALNNRAKAAAKGKPILF\_FRLKRRAKAAAK(Biotin)
4. CatE-Sub\_neutral-Bio (29 aa): NH2-CALNNRAKAAAKGGR\_RSGTCGRRRAKAAAK(Biotin)
5. CatE-Sub\_neutral-Bio/pADA (29 aa): (pADA)RAKAAAKGGR\_RSGTCGRRRAKAAAK(Biotin)

CatE aptamer CatE substrate Alpha helix Ligand for NPs (terminal modification)

3.2 Immobilization of peptide aptamer on carrier magnetic microbeads:

A biotinylated alpha-helix inducing ligand is utilized to immobilize peptide aptamer onto a carrier bead, i.e., streptavidin coated magnetic beads (1 μm). The optimum binding conditions are PBS buffer (pH 7.4) at 25°C for 20 minutes using gentle rotation. The binding efficiency of peptide on beads was confirmed by comparing molecule concentration before and after coupling.

3.3 Coupling of gold nanoparticles (AuNPs) and peptide substrate:

A pentapeptide ligand (CALNN) coupled with alpha-helix inducing ligand (RAKAAAK) is utilized to immobilize the peptide substrate onto gold nanoparticles (40 nm). First, the terminal Cysteine of pentapeptide is coupled with BSA (Bovine Serum Albumin) protein via NHS-ester of BSA protein and pyridyldithiol reactive group of SPDP (succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate) crosslinker. The complex is purified using gel filtration column and confirmed by SDS-PAGE analysis. Next, the CatE-substrate peptide coupled BSA is physically adsorbed onto the gold nanoparticles. The optimum binding conditions are potassium phosphate buffer (50 mM) at 25°C for 10 minutes. The blocking is done by 10% BSA for another 10 minutes. The binding efficiency of peptide on nanoparticles is confirmed by lateral flow assay

3.4 Activity assay and electrochemical sensitivity evaluation of recombinant Human CatE using products of steps 3.2 and 3.3:

The binding of peptide aptamer with recombinant Human CatE enzyme which is bounded on magnetic beads are performed in selection buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) at 25°C for 15 min. The binding efficiency was confirmed by comparing molecule concentration before and after binding reaction.

The protease activity assay of recombinant Human CatE enzyme (20 ng/mL) to cleave peptide substrate-conjugated AuNPs (100 μM) is performed at neutral pH 7.5 using selection buffer at 40°C for 30 min. The uncleaved peptide substrate-conjugated AuNPs is washed out using streptavidin-coated magnetic particles. The protease activity assay is evaluated by performing a direct redox reaction of the AuNP moiety of cleaved products. Fig. 1 shows the electrochemical measurement results. The drop in FETSOR current represents the cleaved part of CatE-substrate

peptide.

#### 4. 研究成果

カテプシン E (CatE) の発現量を測定するために、シリコンベースの FET センサーを開発した。これは、CatE 特異的基質ペプチドを FET 表面に固定化し、CatE の切断を手のひらサイズのポータブル FET デバイス (FETSOR と呼ぶ) を用いて測定することにより実現した (図 1 左)。バイオセンサーを動作させるための測定条件は、pH7.4、0.01X PBS で最適化した。その結果、2.3 pmol の CatE が基質ペプチドを切断する活性の有無の区別成功した (図 1 右)。pH7.4 でのペプチド上の全電荷は +8.51 であり、切断後は +3.61 に減少し、ゲート電圧測定値が 0.05V 減少することで確認された。このように、FETSOR を用いた CatE 測定の実証・評価することに成功した。乳がんバイオマーカーであるカテプシン E を簡便かつ迅速に検出するための携帯型ペプチドベース FET センサーの開発という成果をもって、本研究課題の完了とする。

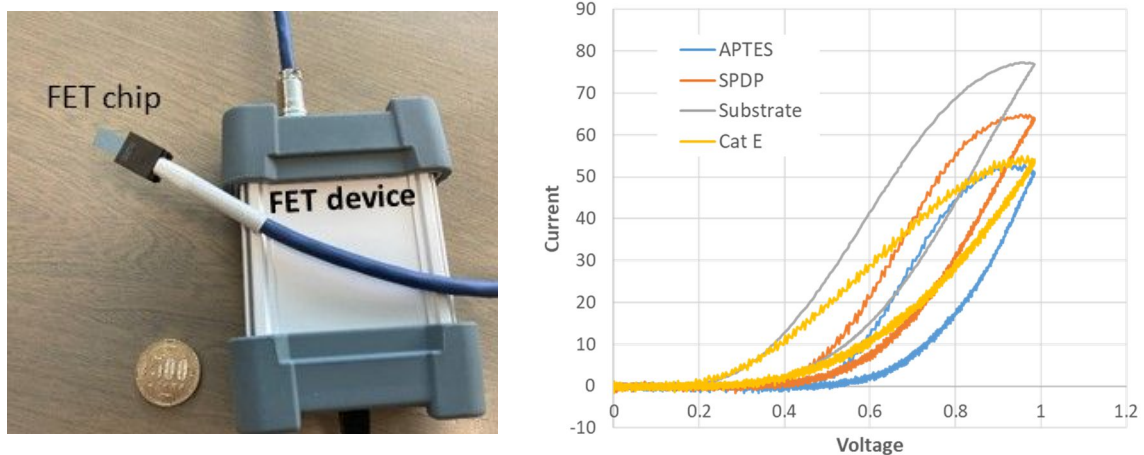


図 1. FETSOR デバイスの写真 (左) と測定結果 (右)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Biyani Radhika, Sharma Kirti, Kojima Kenji, Biyani Madhu, Sharma Vishnu, Kumawat Tarun, Juma Kevin Maafu, Yanagihara Itaru, Fujiwara Shinsuke, Kodama Eiichi, Takamura Yuzuru, Takagi Masahiro, Yasukawa Kiyoshi, Biyani Manish	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of robust isothermal RNA amplification assay for lab-free testing of RNA viruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95411-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Juma Kevin Maafu, Takita Teisuke, Ito Kenji, Yamagata Masaya, Akagi Shihomi, Arikawa Emi, Kojima Kenji, Biyani Manish, Fujiwara Shinsuke, Nakura Yukiko, Yanagihara Itaru, Yasukawa Kiyoshi	4. 巻 567
2. 論文標題 Optimization of reaction condition of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA and RNA using a statistical method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 195 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.023	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 該当する

1. 著者名 Ankita Kushwaha, Yuzuru Takamura, Manish Biyani	4. 巻 -
2. 論文標題 Alternative analyte-binding compounds for immunosensor-like point-of-care application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunodiagnostic technologies from laboratory to point-of-care testing.	6. 最初と最後の頁 111-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-5823-8	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 該当する

1. 著者名 K. Ishizuka, Y. Tsutsumi, M. Baba, R. Biyani, C.W. Meng, M. Biyani, M. Takagi, J. Jaiswa, B. Sharma, K. Kojima, T. Takita, K. Yasukawa	4. 巻 20
2. 論文標題 Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase Activity by the Extractsof Indian Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Macromol	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 H. Rathore, R. Biyani, H. Kato, Y. Takamura, M. Biyani	4. 巻 11
2. 論文標題 Palm-size and one-inch gel electrophoretic device for reliable and field-applicable analysis of recombinase polymerase amplification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal. Methods	6. 最初と最後の頁 4953-5072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9AY01476D	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 A. Kushwaha, Y. Takamura, K. Nishigaki, M. Biyani	4. 巻 9
2. 論文標題 Competitive non-SELEX for the selective and rapid enrichment of DNA aptamers and its use in electrochemical aptasnsor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 6642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43187-6	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 R. Bhardwaj, P.T. Tue, M. Biyani, Y. Takamura	4. 巻 9
2. 論文標題 A Simple and Efficient Microfluidic System for Reverse Chemical Synthesis (50-30) of a Short-Chain Oligonucleotide Without Inert Atmosphere	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl. Sci.	6. 最初と最後の頁 1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9071357	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 Kirti Sharma, Aya Hongo, Koichi Nishigaki, Yuzuru Takamura, Manish Biyani	4. 巻 557
2. 論文標題 'Head-to-Head' mRNA display for the translation of multi-copied proteins with a free C-terminus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anal. Biochem.	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2018.07.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fumihiko Yokota, Manish Biyani, Rafiqul Islam, Ashir Ahmed, Mariko Nishikitani, Kimiyo Kikuchi Yasunobu Nohara and Naoki Nakashima	4. 巻 10
2. 論文標題 Lessons Learned from Co-Design and Co-Production in a Portable Health Clinic Research Project in Jaipur District, India (2016-2018)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sustainability	6. 最初と最後の頁 4148-4148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/su10114148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計18件(うち招待講演 12件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Pick a 'Need' and a 'Seed'
3. 学会等名 Sakura Science Club event 3rd India Alumni Association (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Japanese Advanced Biotechnology-based Analytical Platform to achieve Sustainable Development Goals in India
3. 学会等名 Brainstorming Session about the future S&T partnership Initiatives between India-Japan (AWSAR) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Battling pandemic by changing direction for virus test using deep but robust technologies
3. 学会等名 DAILAB-CAFE, Series 56, Tsukuba (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Madhu Biyani, Kaori Yasuda, Toshiyuki Sakaki, Manish Biyani, Miki Nakajima
2. 発表標題 In vitro selection of a DNA aptamer inhibiting human CYP24A1
3. 学会等名 Th 94th Annual Meeting of the Japan Biochemical Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Battling pandemic by changing direction for virus test using deep but robust technologies
3. 学会等名 DAILAB Cafe (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manish Biyani and Kiyoshi Yasukawa
2. 発表標題 The simplicity of electrophoresis and electrochemical sensor for field-applicable analysis of isothermal RNA/DNA amplification reactions
3. 学会等名 Annual meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Versatile electrochemical sensor for bioanalysis with ease
3. 学会等名 DAILAB Cafe (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 DEPSOR technology-based analytical platform for water-related sustainable development goals
3. 学会等名 Water India Expo (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Merger of Mortalin and DEPSOR Technologies - Addressing Novel Application of Electrochemical Methods for Biosensing of Stress and Disease States
3. 学会等名 DAICENTER Technology Hub Workshop Seris 01 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manish Biyani, Koichi Nishigaki, Yuzuru Takamura
2. 発表標題 Integrated approaches to access smart biosensing of unreached biomarkers
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Japanese Advanced Biotechnology-based Analytical Platform to achieve Sustainable Development Goals in India
3. 学会等名 S&T Partnership Initiatives between India and Japan, Embassy of India (招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 The simplicity of electrophoresis and electrochemical sensor for reliable and field-applicable analysis of Recombinase Polymerase Amplification
3. 学会等名 JSBBA symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Hashimoto, Phan Trong Tue, Yuzuru Takamura, Manish Biyani
2. 発表標題 Enhanced detection of toxic amyloid-beta biomarkers using PEP-on-DEP sensor
3. 学会等名 6th International Conference on Bio-Sensing Technology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 PHC Activity in India: The Experience So Far and Future Direction
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Healthcare, SDGs and Social Business (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 Drive innovations in Healthcare by 'Hybrid Bio-Nano-Electro devices'
3. 学会等名 Seminar at Kwansei Gakuin University (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村幸一郎
2. 発表標題 乳がんの早期診断と治療の双方に期待される中性カテプシンE活性化ペプチドの取得
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of Japanese Society of Disease Protease Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manish Biyani
2. 発表標題 DEPSOR: A tool for rapid commercialization of electrochemical sensor technology
3. 学会等名 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Hashimoto
2. 発表標題 Simple detection of Amyloid-beta oligomers using peptide aptamer and DEPSOR based hybrid biosensor for Alzheimer ' s disease
3. 学会等名 ISAJ2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 2.Fumihiko Yokota, Manish Biyani, Yuandong Hu, Kimiyo Kikuchi, Faiz Shah, Junko Yasuoka, Keiko Nanishi, Rowena Alcoba, and Amina Nourreen	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Decision Science Journal	5. 総ページ数 19
3. 書名 Mobile technologies for delivering healthcare in various regions- PHC and case studies of remote healthcare services in Asian countries	

〔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
研究分担者	高村 禪  (Takamura Yuzuru)  (20290877)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授    (13302)	
研究分担者	山下 啓子  (Yamashita Keiko)  (70332947)	北海道大学・大学病院・教授    (10101)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 DAICENTER TEChnology Hub (DAITECH) Workshop	開催年 2019年～2019年
-------------------------------------------------------	--------------------

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関