

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23246069

研究課題名(和文) アプタマー固定ダイヤモンド表面による高感度プロテインチップ

研究課題名(英文) aptamer

研究代表者

川原田 洋 (Kawarada, Hiroshi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：90161380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,800,000円、(間接経費) 11,340,000円

研究成果の概要(和文)：ダイヤモンドに共有結合固定したDNA、RNAをアプタマーとして特定標的の検出を行った。
1) アプタマー固定のダイヤモンド表面でアプタマーと標的としてHIV-TATタンパク質と血小板成長由来因子(PDGF)の結合過程を蛍光標識による光学検出と電界効果トランジスタ(FET)による電荷検出の双方から検討した。
2) 標的のアデノシン三リン(ATP)に蛍光標識をつけず、ATPのアプタマー(DNA)側に蛍光標識をつけ、アプタマーの挙動からATPを高感度検出した。3) 流路の底部での異なるアプタマーが固定される複数のFETからなるFETアレーで特定タンパク質検出を実施し、集積センサの基礎技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：Specific targets were detected by short DNA and RNA aptamers immobilized on diamond. 1) HIV-TAT protein(target) and platelet derived growth factor (PDGF) were detected by their aptamers using two methods such as photonic method based on fluorescence dye and potentiometric method based on field effect transistor (FET). The bonding between aptamer and their targets were discussed by the two different detecting mechanisms. 2) Adenosine-triphosphate (ATP) has been clearly detected by without-marker on ATP, but with-marker on its aptamer. It shows the possibility of label free aptamer sensor, 3) PDGF were selectively detected by different transistors in FET arrays which are placed at the bottom of micro flow channels. It leads to the basic technology for integrated micro bio-systems.

研究分野：工学・

科研費の分科・細目：電気電子工学・電子デバイス・電子機器

キーワード：アプタマ トランジスタ タンパク質

1. 研究開始当初の背景

プロテインチップでのタンパク質の同定や検出は、対象となるタンパク質の抗体をプローブとして抗原抗体反応のパターン解析を通して行われる。一般的に、抗原抗体反応の有無は、標的タンパク質あるいは標識抗体に固定したラベル（蛍光物質）からの蛍光で光学検出する。しかし、抗体自体の作製が困難で、その固定方法が難しく、失活や変成の問題がある。また、光学検出法では、高価な蛍光物質、その固定技術、光源・光検出装置が必要である。より耐性があり、安価で携帯性のある高感度のプロテインチップには、抗体の代替および蛍光物質等のラベルを使用しないラベルフリーの検出方法の検討が必要である。前者の解決策として、(1) アプタマーという生体物質（特にタンパク質）に特異的に結合する DNA または RNA の使用（抗体の代替）が考えられる。後者の解決策（ラベルフリー化）として、アプタマーと結合した標的タンパク質により変化するダイヤモンド表面電荷を電界効果トランジスタ（FET）により検出する方法がある。FET 型バイオセンサは、微細化しても感度が低下しないため、微量物質検出に有利で、注目されている。本研究は、一塩基多型（SNPs）の高感度検出等で実績がある申請者が開発のダイヤモンド FET をアプタマー固定によるプロテインチップに発展させる。

2. 研究の目的

ダイヤモンドに共有結合固定した DNA、RNA をアプタマーとして特定タンパク質の検出を行う。

(1) アプタマーが固定されたダイヤモンド表面でのアプタマーと標的タンパク質の結合過程ならびに結合後のタンパク質の活性過程を蛍光標識による光学検出と FET による電荷検出の双方から詳細に検討する。

(2) 標的がアプタマーと特異的に結合する機能を失活させないため、標的には標識をつけずにアプタマー側に標識をつけることで、高感度での検出を行う新たな検出方法を開発する。

(3) 低温形成ナノダイヤモンドによる微細 FET チャンネル上にアプタマー固定を行い、標的タンパク質を高速および高感度で検出する。

(4) 上記の微細 FET を集積回路上に形成する技術を開発する。マイクロ流路の底部での異なるアプタマーが固定された FET アレーでの特定タンパク質検出情報の一括処理を行う。

3. 研究の方法

(1) アミノ基、カルボキシル基で化学修飾したダイヤモンド表面でアプタマー固定を行い、蛍光による光学検出と FET による電荷検

出の対応関係を明らかにし、ダイヤモンド表面でのアプタマーと標的タンパク質の結合と生化学反応を詳細に検討する。

(2) 標的に標識を付けず、標的のアプタマーに標識をつけ、そのアプタマーと相補的な DNA を基板と固定する。固定された相補的 DNA とアプタマーで 2 本鎖 (Duplex) DNA を形成する。標的が 2 本鎖 DNA に近づくときアプタマーは 2 本鎖を解き、標的と複合体 (Complex) を形成する。Duplex が Complex になる際に、標識が表面から消失する程度を定量的に測定する。

(3) アプタマーとタンパク質の反応部位の特定アミノ酸配列を検出する微細 SGFET にて、各アプタマーとタンパク質あるいはペプチドとの結合過程の高感度の電荷検出を行う。

(4) 素子の微細化と集積化技術により、マイクロ流路の底部に異なるアプタマーが固定された微小 SGFET センサアレーを作製する。実時間測定の一括処理への測定技術を開発する。

4. 研究成果

ダイヤモンド薄膜の表面修飾、特に生体分子の固定に重要なカルボキシル基による修飾を行い、ダイヤモンド表面に生体分子を固定する技術を確立した。アプタマーとして利用する一元物質である核酸の末端をダイヤモンド基板にアミド結合で安定に固定し、活性部位を固定部位から離すことにより標的分子との結合を高め、さらには非特異的吸着を抑制できるようにダイヤモンド表面を終端構造することで分子認識の特異性が向上した。

センシングの方法としては蛍光検出法と電界効果トランジスタ (FET) による電位検出法を行い、複数の観点からダイヤモンド表面でのセンシングを検討した。前者は DNA チップ等でセンサー技術として確立されているが、核酸をアプタマーとして基板上に固定した状態で、蛍光検出を系統的に行ったのは本研究が最初である。後者のダイヤモンド上の FET は、DNA の塩基配列検出において有利なことが示されているが、タンパク質検出においては開発途上の技術であった。特に、アプタマーの結合部位となる HIV Tat ペプチドは、正電荷を帯びるアルギニン酸が支配的で、これより HIV Tat タンパク質の電荷の総和も正である。正帯電のタンパク質が正孔をキャリアとするダイヤモンド FET のしきい値電圧を正方向にシフトさせ、シフト量からアプタマー捕獲によるタンパク質の密度が定量的に評価された。

以下、各項目ごとに説明する。

(1) ダイヤモンド上へのアプタマー

(DNA, RNA) 直接固定技術

① ダイヤモンド表面に固定されたアプタマーによるタンパク質の検出

局所化学修飾を施したダイヤモンド表面で、アプタマー固定化技術を最適化した。アミノ基、カルボキシル基で化学修飾したダイヤモンド表面（論文①, ③, ⑦, ⑨, ⑩, ⑪, ⑫）でアプタマー固定を行い、蛍光によるタンパク質の光学検出と電解質溶液ゲートFET (SGFET) によるタンパク質の電荷検出の対応関係を明らかにした。ダイヤモンド表面上に固定されたDNAアプタマーにて血小板由来成長因子 (PDGF) の検出を蛍光法およびFETによる電荷検出法の両方で可能とし(論文④, ⑦)、SGFETによる再現性のよい電荷検出をもとに、PDGFの2量体構造のイソフォームの区別等の高精度検出(論文⑧)を行った。また、HIV Tat タンパク質の検出をRNAアプタマーにて実施した。この検定は2段階で、アプタマーがHIV Tat タンパク質と結合する結合部位のペプチド鎖（高アルギニン領域、正に帯電）のみでの検出(論文⑬)と全タンパク質レベルでの検出の両方で電荷検出の可能性を初めて明らかにした(論文②)。

(2) DC-plex 法を利用したアプタマーセンサ開発

アデノシン三リン酸 (ATP) と特異的に結合する ATP 結合 DNA アプタマーを認識プローブとして用い、ATP 検出センサの開発に向けた研究を行った。

ATP の検出では、アプタマーが 2 本鎖で固体表面にいる状態から ATP と複合体を形成する現象を検出する。その概略を以下に示す。ATP 結合アプタマーと相補的な DNA (1 本鎖 DNA) をダイヤモンド基板に固定し、蛍光色素 Cy5 修飾された ATP 結合アプタマーのハイブリダイゼーションで 2 本鎖 DNA プローブ (Duplex) を形成する。このプローブの蛍光を観察する。ATP の添加によって 2 本鎖プローブが解離し、Cy5 修飾された ATP 結合アプタマーが ATP/アプタマー複合体 (Complex) となり、離脱し、それが蛍光強度の低下として高感度で ATP が検出された (DC-plex 法) (論文④、図 1 参照)。

検出を数回繰り返した結果の再現性は高く、再利用性を確認した。ATP の濃度依存性については、 $10 \mu\text{M}$ 以上であれば確実に検出可能である。ATP と構造の近い UTP、CTP、GTP を等量入れた検出媒体での誤検出率は $1/10$ 以下となり、ATP アプタマー特異性の確認を行った(論文④)。このようにセンサの再利用、ATP の検出濃度、特異性に優れているが、さらに、標識の影響を受けやすい ATP のような小さな生体分子の検出には非常に有用な方法である。

(3) DNA認識微細ダイヤモンドSGFET作製

①これまで開発したSGFETをナノサイズまで微細化して分子認識素子に発展させるために、デバイス縮小化を検討した。微小サイズのSGFETの動作確認、検出部にアプタマーの固定を行った(学会発表⑩)。

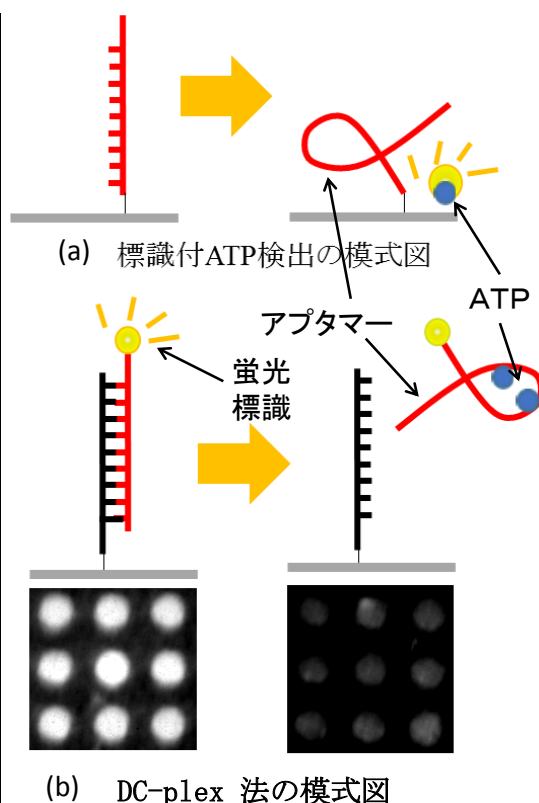


図 1 (a) 標識付 ATP では標識のため ATP がアプタマーと相互作用しづらい (不活性)。 (b) 標識はアプタマ側にあるので ATP は活性。

②ボロンデルタドープダイヤモンドにて新たな溶液ゲート (SG) FET を作製した。このトランジスタの動作安定性は高く、数カ月後も同一の静特性を示す。この原因は、電気伝導性が表面吸着物質の影響を受けにくく、例えばカルボキシル基末端を行う強い酸化剤でも電気伝導性の変動がほとんどないことである。このカルボキシル基末端は生体分子の固定にとって最も重要な表面改質である。その特徴は、電気的に負電荷であり、負電荷を有する生体分子の非特異吸着の抑制に多大な効果があった。このようなボロンドープ層を利用し、検出感度が向上し、しかも再現性が高く、耐性の高いSGFETが作製された(論文⑤)。このデバイスにて、高感度でタンパク質とアプタマー結合による電位変化が検出された(論文⑥)。

(4) 正の電荷を有するタンパク質のアプタマー結合による観測

アプタマーの結合部位となる HIV Tat ペプチドは、正電荷を有するアルギニン酸が支配的な部位であり、正に帯電する。この部位の影響で HIV Tat タンパク質も正電荷を帯びる。正に帯電したタンパク質が正孔をキャリアとするダイヤモンドSGFETのしきい値電圧に及ぼす影響(図2参照)を検討し、アプタマーにより捕獲されたタンパク質の密度を概算した。測定限界の約10倍の電圧である30mVの負方向へのしきい値電圧シフトは $10^{12} \text{ e cm}^{-2}$ の正の面電荷密度に相当し、HIV Tatタンパク質が

10^{11}cm^{-2} の面密度でFETのチャンネル上に捕捉されることを示している(論文②)。本研究では、RNAをアプタマーとして利用し、FETによる定量的で信頼性の高いタンパク質の検出を行った最初の例である。

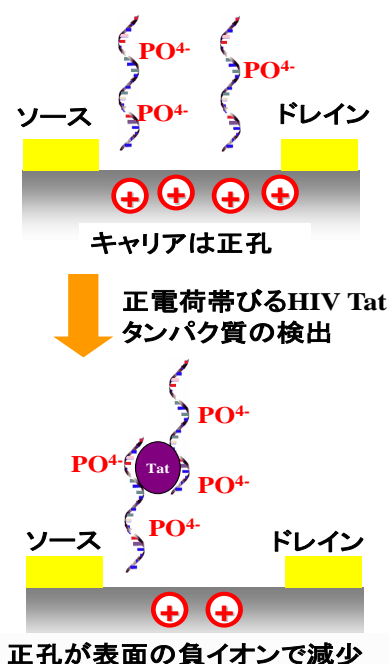


図 2 正に帯電する HIV Tat タンパク質の FET での検出。正孔の減少を負の方向のしきい値シフトとして定量化する。

(5) DC-plex法によるFETでのATP検出

FETにおいても上記(2)のCD-plex法で効率よく検出できることが可能となった。プレハイブリダイゼーションした2本鎖DNAからATPと結合する1本鎖のDNAアプタマーがディネーチャーされ、固定された1本鎖のDNAが残り(図1参照)、負電荷をもつDNAリン酸の半減したことを示す30-40mVの負電位方向へのゲート電圧シフトを明瞭に再現性良く観測した(論文④)。もともと電荷量の少ない生体分子の測定にはこの方法は非常に優れている。

DC-plex法はハイブリダイゼーションしたDNAあるいはRNAがディネーチャーする過程、つまり2本鎖から1本鎖となることを検出する単純な機構であり、流路のように系が流れる状態で非特異吸着を抑制できる方法であることを、蛍光法と電界効果トランジスタの両面から確認した

(6) 標的核酸やアプタマーによる標的タンパク質を検出する微細FETを作製した。流路技術と合体するためにダイヤモンドFETを1次元アレー化し、各チャンネルに塩基配列の異なるDNAプローブ3種(相補型、一塩基相違、非相補型)を固定し、FETによる標的DNAの検出に明確な差がでることを確認した。この結果は複数のタンパク質検出の一括処理にも応用可能である(学会発表②, ⑤, ⑪)。

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13件 全て査読有)

- ① V. Penmatsa, A.R. Ruslinda, M. Beidaghi, H.Kawarada, C. Wang, "Functionalized three-dimensional carbon microarrays for cancer biomarker detection (Conference Paper)", ECS Transactions., 45(15):7-14 (2013) (DOI: 10.1149/04515.0007ecst)
- ② A. R. Rahim, K. Tanabe, S. Ibori, X. Wang, H.Kawarada, "Effects of diamond-FET-based RNA aptamer sensing for detection of real sample of HIV-1 Tat protein", Biosensors and Bioelectronics, 40(1), 277-282 (15 February 2013) (DOI: 10.1016/j.bios.2012.07.048)
- ③ V. Penmatsa, A. R. Rahim, M. Beidaghi, H.Kawarada, C. Wang, "Platelet-derived growth factor oncoprotein detection using three-dimensional carbon microarrays" Biosensors and Bioelectronics, 39(1), 118-123 (15 January 2013) (DOI: 10.1016/j.bios.2012.06.055)
- ④ A. Rahim Ruslinda, Y. Ishiyama, X. Wang, T. Kobayashi and H.Kawarada, "Fluorescence-signaling aptasensor for ATP and PDGF detection on functionalized diamond surfaces" J. Electrochem. Soc., 159(5), J182-J187(2012) (DOI: 10.1149/2.083205jes)
- ⑤ R. Edgington, S. Sato, Y. Ishiyama, R. Morris, R. B. Jackman and H.Kawarada, "Growth and electrical characterisation of δ -doped boron layers on (111) diamond surfaces", J. Appl. Phys., 111(3), 033710/1-7 (2012) (DOI: 10.1063/1.3682760)
- ⑥ R. Edgington, A. R. Ruslinda, S. Sato, Y. Ishiyama, K. Tsuge, T. Ono, H.Kawarada, and R. B. Jackman, "Boron δ -doped (111) diamond solution gate field effect transistors.", Biosensors and Bioelectronics, 33(1), 152-157(2012) (DOI: 10.1016/j.bios.2011.12.044)
- ⑦ X. F. Wang, M. Hasegawa, K. Tsugawa, A. R. Ruslinda, and H.Kawarada, "Controllable oxidization of boron doped nanodiamond covered with different solution via UV/ozone treatment" Diamond & Related Materials, 24, 146-152 (2012) (DOI: 10.1016/j.diamond.2011.12.033)

- ⑧ A.Rahim Ruslinda, V.Penmatsa, Y.Ishii, S.Tajima, H.Kawarada, “Highly sensitive detection of platelet-derived growth factor on a functionalized diamond surface using aptamer sandwich design”, *Analyst*, 137(7), 1692-1697(2012) (DOI:10.1039/C2AN15933C)
- ⑨ X. Wang, Y. Ishii, A.R. Ruslinda, M. Hasegawa, and H.Kawarada, “Effective Surface Functionalization of Nanocrystalline Diamond Films by Direct Carboxylation for PDGF Detection via Aptasensor”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4 (7), 3526-3534 (2012) (DOI:10.1021/am300595f)
- ⑩ X.Wang, S.Kurihara, M.Hasegawa, A.Rahim Ruslinda, H.Kawarada, “High Priority of Nanocrystalline Diamond as a Biosensing Platform”, *Jpn. J. Appl. Phys.* 51, No.9, 090125/1-7 (2012) (DOI:10.1143/JJAP.51.090125)
- ⑪ X. Wang, A.Rahim Ruslinda, Y. Ishiyama, Y. Ishii, H. Kawarada, “Higher coverage of carboxylic acid groups on oxidized single crystal diamond (001)”, *Diamond & Related Materials*, 20(10), 1319-1324 (2011) (DOI:10.1016/j.diamond.2011.08.011)
- ⑫ H.Kawarada and A.R.Ruslinda, “Diamond electrolyte solution gate FETs for DNA and protein sensors using DNA/RNA aptamers” *Phys. Status. Solidi A*, 208 (9), 2005-2016 (2011) (DOI:10.1002/pssa.201100503)
- ⑬ A.R.Ruslinda, X.Wang, Y.Ishii, Y.Ishiyama, K.Tanabe, H.Kawarada, “Human immunodeficiency virus trans-activator of transcription peptide detection via ribo nucleic acid aptamer on aminated diamond biosensor”, *Appl. Phys. Lett.*, 99 (12), 123702/1-3 (2011)(DOI:10.1063/1.3643067)
- environment” ECS 224th meeting, San Francisco, Oct. 2013
- ③ M. Koga, T. Kageura, Khairul. Ishak, Y. Shintani, M. Hasegawa, A. Hiraiwa, H. Kawarada, “Fabrication of P-type transparent conducting films using heavily boron-doped nano crystalline diamond” 2013 JSAP (Japan Society of Applied Physics) -MRS (Materials Research Society) Joint Symposia, Kyoto, Japan, 16-20 Sep. 2013
- ④ H. Kawarada, “Diamond Solution-Gate Transistors for Protein Detection by DNA/RNA Aptamers” (invited) The 6th International Conference on Sensors (AsiaSense 2013), Melaka, Malaysia, 27-29 Aug 2013
- ⑤ Y. Shintani, M. Myodo, S. Ibori, H. Kawarada, “Study of differential FET sensing utilizing termination-controlled diamond surfaces as pH-sensitive/pH-insensitive interfaces” New Diamond and Nanocarbon conference (NDNC2013), Singapore, May 2013
- ⑥ Y. Shintani, S. Ibori, R.A. Rahim, M. Myodo, H. Kawarada, “Study of the characteristics of boron-doped polycrystalline diamond channel solution-gate FET used in harsh environment”, International Conference on Diamond and Carbon Materials, Granada, Spain, September 2012
- ⑦ H. Kawarada, S.Kurihara, R. Kanomata, X. Wang, S. Ibori, Y. Shintani and A. Hiraiwa; “Heavily Boron-doped Diamond and Its Application to Electron Device in Harsh Environment”, NDNC2012, San Juan, Puerto Rico, May 2012
- ⑧ R. Ruslinda, K. Tanabe, S. Ibori, X. Wang, H. Kawarada, “The Effects of Diamond FET-based RNA aptamer sensing for Real Sample HIV-1 Tat Protein detection”, *Biosensors 2012*, Cancun, Mexico, May 2012
- ⑨ A. Rahim Ruslinda, K. Tanabe, S. Ibori and H. Kawarada, “Aptamer-based diamond solution-gate field effect transistor for HIV 1 tat protein detection” *Asia Sense 2011*, The 5th International Conference on Sensors, Jeju, Korea, October 2011
- ⑩ A. Rahim Ruslinda, Y. Ishiyama, X. Wang, T. Kobayashi and H. Kawarada, “Fluorescence-Signaling Aptasensor for ATP and PDGF Detection on Functionalization Diamond Surfaces” 220th ECS Meeting, Boston, MA,
- [学会発表] (計 19 件)
- ① M. Koga, T. Kageura, K. Ishak, Y. Shintani, M. Hasegawa, A. Hiraiwa and H. Kawarada, “The optimization of P-type transparent electrode using boron-doped nanodiamond” 2013 MRS (Materials Research Society) Fall Meeting & Exhibit, Boston, MA, USA, 1-6 Dec. 2013
- ② Y. Shintani, M. Myodo, M. Kobayashi, S. Ibori, H. Kawarada “The I-V characteristics of a termination-controlled polycrystalline diamond field effect transistor pH sensor for using at harsh

- USA, October 2011
- ⑪ S. Ibori, Y. Ishiyama, K. Tanabe, T. Ono, A. R. Ruslinda, T. Asahara, J. Mizuno, A. Hiraiwa, S. Shoji, H. Kawarada, "Boron-delta-doped Channel Diamond SGFET for Single Mismatched DNA Detection", 22nd European conference on Diamond, Garmisch-Partenkirchen, Germany, September 2011
- ⑫ X. Wang, A. Rahim Ruslinda, H. Kawarada, "Effect of surface functionalisation on the detection efficiency of Tat derived peptide on sp³ cubic carbon biosensor" Carbon2011 conference, Shanghai, China, July 2011
- ⑬ 川原田 洋, "ダイヤモンド表面固定アプタマーによるトランジスタ型バイオセンサ" (招待講演) 春季第 61 回応用物理学会・青山学院大学(相模原 C)・2014 年 3 月 17 日-20 日
- ⑭ 小林 幹典, 新谷 幸弘, 明道 三穂, 川原田 洋, "フッ化炭素堆積層を制御したフッ素終端化ダイヤモンドの特性解析" 第 27 回ダイヤモンドシンポジウム, 日本工業大学, 2013 年 11 月 20 日 - 22 日
- ⑮ 新谷 幸弘, 明道 三穂, 小林 幹典, 川原田 洋, "ボロンドープ多結晶ダイヤモンド半導体センサの FET-IV 特性とイオン感応特性の評価" 日本分析化学会第 62 年会, 近畿大学, 2013 年 9 月 10 日-12 日
- ⑯ 新谷 幸弘, 明道 三穂, 井堀 翔志, 川原田 洋, "ボロンドープ多結晶ダイヤモンドトランジスタセンサの pH 感応特性" 第 54 回化学センサ研究発表会 電気化学会創立第 80 周年記念大会, 東北大学, 2013 年 3 月 29 日-31 日
- ⑰ 古閑 三靖, 栗原 慎一郎, 鹿又 龍介, 王 宥芬, カイルル・カレ・イスハック, 高野 義彦, 山口 尚秀, 長谷川 雅考, 平岩 篤, 川原田 洋, "高濃度ボロンドープナノダイヤモンドを用いた P 型透明伝導膜の作製" 春季第 60 回応用物理学会, 神奈川工科大学, 2013 年 3 月 27 日-30 日
- ⑱ 明道 三穂, 小林 拓磨, 井堀 翔志, オウ ケンフン, 津川 和夫, 長谷川 雅考, 川原田 洋, "カルボキシル基終端ナノダイヤモンドを用いた生体分子の検出", 第 26 回ダイヤモンドシンポジウム, 青山学院大学, 2012 年 11 月
- ⑲ 明道 三穂, 小林 拓磨, 井堀 翔志, オウ ケンフン, 津川 和夫, 長谷川 雅考, 川原田 洋, "カルボキシル基終端ナノダイヤモンドによる生体分子の検出", 秋季第 73 回応用物理学会, 愛媛・松山大学, 2012 年 9 月

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ダイヤモンド薄膜の表面処理法、電解

トランジスタの製造方法、及びセンサ素子
 発明者: 新谷幸弘、猿谷敏之、川原田洋
 権利者: 横河電機株式会社
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-175059
 出願年月日: 平成 25 年 08 月 26 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 電解効果トランジスタ、その製造方法及びバイオセンサ
 発明者: 川原田 洋、田島 慎也
 権利者: 学校法人早稲田大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-122399
 取得年月日: 平成 25 年 9 月 20 日
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawarada-lab.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原田 洋 (KAWARADA Hiroshi)
 早稲田大学・理工学術院・教授
 研究者番号: 90161380