

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680051

研究課題名(和文)次世代型アポトーシスパスウェイ解析のための集積化酵素活性計測トランジスタの創製

研究課題名(英文)Development of Integrated Transistor Based device for Monitoring of Enzymatic Activities as Next-generation Platform for Apoptosis Pathways Analysis

研究代表者

松元 亮(Matsumoto, Akira)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：70436541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,700,000円、(間接経費) 6,510,000円

研究成果の概要(和文)：電界効果トランジスタを利用し、酵素活性を高速に定量することのできる集積化デバイスの原理証明を目指した。アポトーシスパスウェイにおいて重要な役割を持つCaspase-3およびCaspase-8を中心に検討した。それぞれが特異的に認識・切断する至適配列の前後に酸性アミノ酸およびスペーサーを介してシステインを配する種々配列のペプチドをデザインした。バルク中でこれらに種々濃度、温度、反応時間で酵素を作用させ、配列特異的な切断を質量分析から確認した。金ナノ粒子の呈色反応より、これらの反応が光学センシングへと応用できる可能性を示した。さらに電位測定の結果からも、本アプローチの妥当性が示された。

研究成果の概要(英文)：We envisioned the development of an integrated transistor based device that is able to quantify enzymatic activities in cells. Caspase-3 and -8 were studied as targets relevant to apoptosis pathway analysis. A series of peptides containing each Caspase-specific amino acid sequence along with spacer and cysteine moiety were prepared so that they will have good enzyme-accessibility and affinity to gold for the immobilization. Mass-spectroscopic analysis uncovered that these designed reactions take place in quantitative and each substrate-specific fashion. This reaction could also be visualized on the basis of the coloration of gold nano-particle. Furthermore, it was compatible with potentiometric detection format, indicating the validity of our approach.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：電界効果トランジスタ アポトーシス カパーゼ 酵素活性 パスウェイ解析

1. 研究開始当初の背景

今日、コンビナトリアルケミストリーの進展に伴い日々多くの候補薬物が合成されている。これらの薬効、薬理メカニズムの解析においては、ターゲットとなる酵素や受容体に対する阻害・活性化作用に関する時空間情報の迅速な定量が求められ、一連の評価プロセスのハイスループット化が強く望まれている。しかしながら、現状これらの解析は、煩雑で多段階プロセスを要する古典的な分子生物学的手法に依拠しており、未来型の高効率な医薬品開発プラットフォームとして求められる高度な要件を満足するものとは言い難い。

本提案では、電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor, FET) 原理を拡張し、非標識で、迅速かつ並列的に細胞内での種々酵素活性を定量する集積化計測デバイスの開発を目指した。FET 法とは、薄い絶縁膜(ゲート)上に固定された分子の荷電または誘電率変化をトランジスタの特性変化として直接検出するものであり、ラベルフリーでレーザーや光学系が不要であるため小型化に有利であること、半導体微細加工技術による高密度・並列化が容易な点、また(前処理も含めて)微小システム化のためのプロセス親和性が高い点などハイスループットシステム化において求められる主要な要件を潜在的に網羅したユニークな検出法として近年注目を集めている。提案者らはこれまでに、FET 原理に立脚した電位計測方式による遺伝子配列解析技術、糖鎖検出に基づいた「細胞診断トランジスタ、また「動的」な界面を巧みに利用することで従来の FET 法の適用範囲を飛躍的に広げる新規なバイオトランジスタの形態を世界に先駆けて提案・実証してきた。上述の酵素群によるシグナル伝達は、いずれも基質(アミノ酸配列)特異的な切断またはリン酸基付与を介して行われるため、各々の至適配列を組み込んだペプチドをあらかじめ FET 検出表面(ゲート)上へ配置しておく、酵素反応前後でのペプチドの有する荷電変化を電界効果として捉えることで、これらの活性変化を並列的に評価することが可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、電界効果トランジスタを利用して、細胞内酵素活性を高処理に定量することのできる集積化計測デバイスの原理証明を目的とした。アポトーシス誘導に関わるシグナル伝達の中核を担うカスパーゼファミリーに加え、同じく調節因子として寄与するリン酸化・脱リン酸化酵素(プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼ)をターゲットとし、それらの時系列的な定量に基づくアポトーシスパスウェイ解析法を提案する。電界効果トランジスタの長所を活かし、アポトーシスにおけるパスウェイ解析を従来よりも簡便、迅速かつ低コストに達成するツ

ルを提供することで、格段に高効率な薬理メカニズム解析や創薬ターゲットの絞り込み評価を可能とする「革新的な医薬品開発プラットフォーム」を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

①ペプチド修飾集積化デバイスの作製:

シリコンチップ上に金電極を集積化させた酵素活性計測 FET デバイスを作製した。シリコンチップの表面に、金スパッタによる薄膜形成とフォトリソグラフィ(リフトオフ)法によるパターンニングによって 10 チャンネルのエクステンディドゲートを作成した。電位変化をリアルタイムに同時計測するため、10 チャンネルのデータロガー装置とエレクトロメータと同期させて記録する専用のソフトを外部に発注して開発した。

②ペプチドの設計:

電界効果の原理を考慮し、対応する各カスパーゼにより至適配列の C 末端側アスパラギン酸部位で切断される際、その負電荷に富む配列の遊離によってペプチド総和の電荷が著しく変化する特徴を持つ構造を設計した。例として、図 1 に、カスパーゼ-3,-8 に対応したペプチド配列を示す。切断される至適配列の N 末端側に負の電荷を持つアスパラギン酸を複数配置したのは、切断による荷電変化の増幅を意図したものである。また、スパーサーとして Amino Hexanoic Acid (Ahx) が導入されているのは、分子運動性を確保して、酵素認識を効率化するためである。その末端(C末端)には、金表面との接着親和性のためにチオール基を有するシステインを配置した。一方で、負電荷の集中による静電反発の抑制を考慮して各部位の間に配置した。

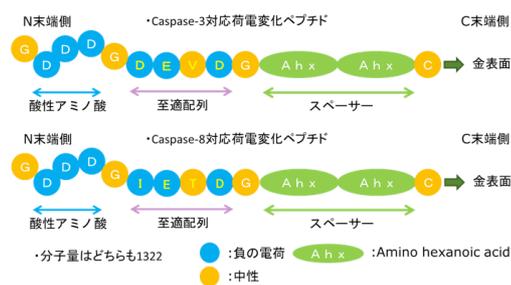


図 1. 荷電変化ペプチドの構造.

③金ナノ粒子を利用した切断反応の可視化

金ナノ粒子の表面プラズモン効果を利用した呈色反応によるペプチド切断反応の光学的な検出を試みた。図 2 に示すようなペプチド設計し、溶液中でカスパーゼ反応後、ここへクエン酸修飾金ナノ粒子を加えた際の溶液呈色変化を観測した。



図 2. 金ナノ粒子表面に修飾したペプチドの構造。

4. 研究成果

質量分析（マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間質量 (MALDI-TOF-MS) から、デザインされたペプチド（図 1 および 2）が各々対応するカスパーゼにより選択的に切断を受けることを確認した。

図 3 に、金ナノ粒子の呈色実験の結果を示す。カスパーゼ反応の前後で、溶液の色が赤色から青色へと変化する様子が観測された。クエン酸修飾された金ナノ粒子はその負電荷の反発により分散状態を保つ（青色）。ここへ図 2 に示した構造のペプチドを修飾すると、至適配列よりも C 末端側に正の電荷を持つアルギニンを配置することで、それらの負電荷による静電反発により粒子の安定性が保たれる（赤色）。一方、対応するカスパーゼによる切断後には、これが一転して正の電荷を帯びることとなる。したがって、この正電荷が金表面のクエン酸の負電荷と打ち合うことで粒子間の静電反発力が弱くなり、金ナノ粒子の凝集が誘起するものと考えられる（青色）。図 4 にこの状況を模式的に示した。以上より、各荷電変化型のペプチド設計指針の妥当性が示された。さらに、これらのペプチドを作成した 10 チャンネル金エクステンディドゲートへ導入し、カスパーゼ反応前後での電位測定を行った。その結果、基質特異的な切断反応と同期した表面電位の変化が観測された。本研究の結果から、電界効果トランジスタを利用した、酵素活性計測デバイスの原理証明を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件 すべて査読有り）

- 1) Miyuki Tabata, Kozue Nogami, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto and Yuji Miyahara, "Fabrication of Self-assembled Monolayer/AgCl Mixed Surface and Its Electrochemical Properties", IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, 2014, 134(10), *in press*.
- 2) Akira Matsumoto; Yusuke Tsurui; Hiroko Matsumoto; Yasuhiro Maeda;

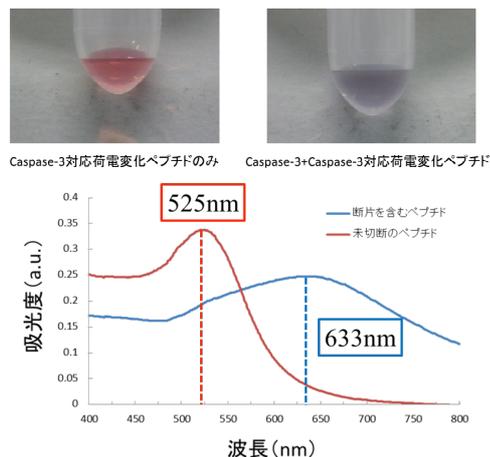


図 3. ペプチド修飾金ナノ粒子の呈色変化と吸収スペクトル。

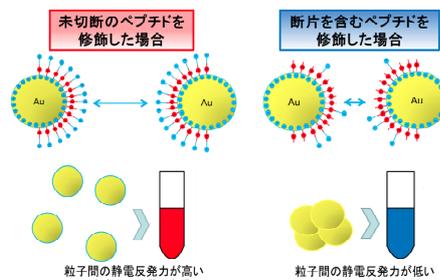


図 4. ペプチド修飾金ナノ粒子の呈色挙動の模式図。

- Toru Hoshi; Takashi Sawaguchi; Yuji Miyahara, "Chemo-electrical Signal Transduction by using Stimuli-responsive Polymer Gate-modified Field Effect Transistor" *Chemosensors*, 2014, 2(2), 97-107.
- 3) Akira Matsumoto; Hiroko Matsumoto; Yuji Miyahara, "Simple and Robust Strategy for Potentiometric Detection of Glucose Using Fluorinated Phenylboronic Acid Self-assembled Monolayer", *BBA-Gen. Subjects*. 2013, 1830(9), 4359-4364.
 - 4) Mai Sanjo, Kazunori Kataoka, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto "Phenylboronic acids-based Diagnostic

and Therapeutic Applications”, *Analytical Science*, 30(1), 111-117 (2014).

- 5) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, “Current and Emerging Challenges of Field Effect Transistor Based Bio-sensing”, *Nonoscale*, 2013, 5(22), 10702-10718.
- 6) Yasuhiro Maeda, Akira Matsumoto, Yoshiko Miura, Yuji Miyahara, “Preparation of a-Mannoside Hydrogel and Electrical Detection of Saccharide-Protein Interactions Using the Smart Gel-modified gate Field Effect Transistor”, *Nanoscale Res. Lett.* 2012, 7, 108.

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Akira Matsumoto, penylboronate based strategies for drug delivery and biosensing, nanotechnology platform: Japan-USA young scientist exchange program, 2013 年 12 月 9 日, Tsukuba.
- 2) 松元亮、ボロン酸を利用した生体計測と DDS、「ナノメディシン分子科学」第三回若手研究交流会、2013 年 10 月 10 日、東京。
- 3) 荒井貴裕、鶴井祐輔、前田康弘、合田達郎、松元亮、宮原裕二、半導体/生体分子ナノ界面の構築とバイオトランジスタへの応用、ソフトインターフェースの分子科学 第 10 回公開シンポジウム、2013 年 7 月 11 日～7 月 12 日、東京。
- 4) 荒井貴裕、前島雪絵、合田達郎、松元亮、大塚英典、宮原裕二、フェニルボロン酸含有高分子層を検出界面とするシアル酸認識バイオトランジスタへの創製、電気学会 バイオ・マイクロシステム研究会、2013 年 8 月 8 日～8 月 9 日、東京。
- 5) Yasuhiro Maeda, Akira Matsumoto, Keiko Miura, Yuji Miyahara, Gel-based Field Effect Transistor for Lectin-detection, The International Conference on Thin Films (ICTF15), 2011 年 11 月 9 日, Kyoto.
- 6) 松元亮、ボロン酸を利用した生体計測と DDS、「スマートバイオプロジェクト」セミナー、平成 23 年 10 月 20 日、大阪。
- 7) Akira Matsumoto, Kazunori Kataoka, Yuji Miyahara, Sialic acid sensitive field effect transistor as a means of facile and quantitative cytology, 2011 MRS Fall Meeting & Exhibit, 平成 23 年 11 月 29 日, Boston.

- 8) 松元亮、宮原裕二、半導体とバイオの融合 —バイオトランジスタの開発—、半導体・集積回路技術シンポジウム、平成 23 年 7 月 8 日、東京。

[図書] (計 7 件)

- 1) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, “Development of a Totally Synthetic “Artificial Pancreas” by Using Smart Gels”, in Human Sensing for Smart Life Care –Sensor, Information & Energy Technologies on Health Conscious Society with Big Data- (ed.: K. Mitsubayashi), CMC Publishing Co., Ltd., Japan, 233-240 (2014).
- 2) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, “Biosensing”, *Artificial Organ*, 42-3, 213-216 (2013).
- 3) Akira Matsumoto, Takehiko Ishii, Kazunori Kataoka, Yuji Miyahara, “Glucose-Responsive Gel for Self-Regulated Insulin Delivery System”, *Drug Delivery Systems*, 28(2), 119-126 (2013).
- 4) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, “Current Development Status and Perspective of Self-Regulated Insulin Delivery Systems: A Review”, *IEEEJ Transactions on Sensors and Micromachines*, 132(12), 455-458 (2012).
- 5) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Kazunori Kataoka, “intelligent surfaces for solid-state nano-biosensing devices”, in intelligent Surfaces in Biotechnology: Scientific and Engineering Concepts, Enabling Technologies, and Translation to Bio-Oriented Applications (ed.: H. Michelle Grandin, Marcus Textor), John Wiley & Sons, Inc., USA, 123-140 (2012).
- 6) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, “ Trends and Perspective of Biosensors” in *Oyo Butsuri*, 80(3), p.

205-2010 (2011).

- 7) Akira Matsumoto, Yuji Miyahara,
“New Trends in NanoBio-Sensing”,
Drug Delivery Systems, 26(1), p. 15-19
(2011).

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 2 件)

①

名称：生体分子検出用電極チップ、及び、生体分子検出方法

発明者：前田康弘、合田達郎、宮原裕二、松元亮、片岡知歩、

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、独立行政法人物質・材料研究機構

種類：特許

番号：PCT/JP2012/060785

出願年月日：平成 23 年 4 月 20 日

国内外の別： 国外

②

名称：生体分子検出用電極チップ、及び、生体分子検出方法

発明者：前田康弘、合田達郎、宮原裕二、松元亮、片岡知歩、

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、独立行政法人物質・材料研究機構

種類：特許

番号：欧州出願 (11809649.4)

出願年月日：平成 24 年 6 月 11 日

国内外の別： 国外

○取得状況 (計 2 件)

①

名称：検出デバイス及びバイオセンサ

発明者：松元亮、宮原裕二

権利者：国立大学法人東京大学、独立行政法人物質・材料研究機構

種類：特許

番号：第 5398017 号

取得年月日：平成 25 年 11 月 1 日

国内外の別： 国内

②

名称：検出デバイス及びバイオセンサ

発明者：松元亮、宮原裕二

権利者：独立行政法人物質・材料研究機構

種類：特許

番号：13/513.939

取得年月日：平成 26 年 3 月 11 日

国内外の別： 米国

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/bsr/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松元亮 (MATSUMOTO, Akira)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・
准教授

研究者番号：70436541