

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500519

研究課題名(和文) 光アドレス電位差センサを用いたマルチバイオセンサの実用化研究

研究課題名(英文) Applied research of multi-biosensor using light addressable potentiometric sensor

## 研究代表者

黒岩 繁樹 (Kuroiwa, Shigeki)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・主任研究員

研究者番号：90313212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：光アドレス電位差センサ(LAPS)は、界面に吸着した分子に由来する表面電位の変化を、光電流量の変化として検出する方法である。本研究は、分子間相互作用イメージング装置、およびセンサ面の境界のないマルチバイオセンサとしてLAPSの応用範囲を医学診断用へ広げることを目的とする。タンパク質のパターンなどを再現性良くセンサ素子上に転写する方法を確立して、LAPSの有用性の実証を目指した。最も重要なセンサの界面修飾技術に関しては、化学修飾および界面活性剤を用いて標的分子の電荷を増強して信号を増強する手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：A light addressable potentiometric sensor (LAPS) is a method to detect a change of surface potential resulted from the adsorption of molecules as the change of the amplitude of photocurrent. This study was to extend the application of LAPS for medical diagnoses as a molecular interaction imaging device and a borderless multi-biosensor. I established the method to copy patterns of the protein on the LAPS sensor reproducibly to prove the usefulness of LAPS. With regard to the most important technique of surface modification of the sensor, I developed the methods of chemical modification and addition of surfactant to reinforce the electric charge of target molecules, because a LAPS detects the intrinsic electric charge of target molecules.

研究分野：ナノバイオサイエンス、生物物理学

キーワード：バイオイメージング 分子間相互作用 バイオセンサ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床医療において、感染症などの検査結果が判明するまでの時間は短時間であることが望ましい。病原体特定に時間が掛かっている、症状の進行を食い止めることが困難な場合も多い。ELISA 法は高感度であるが、高価であり煩雑で時間が必要である。

(2) 病原体等の作用のほとんどは何らかの分子同士の結合から始まるため、検出法では対象の標的分子に対する検出用分子の結合をいかに高感度に定量的に検出するかが重要である。イムノクロマト法による簡易検出キットでは、特定の病気の判定を定性的に行うのみである。

(3) 検出法に関する生化学、生理学、および分子生物学的研究の成果は日進月歩であるが、その成果が医療の現場で生かされるまでのタイムラグが大きい。標的分子に対する検出用分子が見つかり次第、網羅的でありながら迅速に定量的結果が得られる新技術の開発が急務である。

### 2. 研究の目的

(1) LAPS は電界効果型トランジスタ (FET) センサよりも作製し易いだけでなく、複雑なプロセスを経ていないため表面の平滑性が保証され、安定応答を示すことが分かってきた。さらに、二次元のイメージとして測定結果が得られるため、分子間相互作用イメージングを実現できる。

(2) 本研究では、酸化シリコン表面に自己組織化単分子膜を形成する技術を応用して、LAPS 素子 (シリコン基板) 上にタンパク質のパターンを転写する技術を確認し、従来のマルチチップのように検出用分子をドットとして固定化するのではなく、二次元電気泳動等のタンパク質パターンなどを転写することで検出用分子を並べる。複雑な構造を一切持たない境界の無いマルチチップが再現性良く得られれば、将来的にはランダムなアミノ酸配列のペプチドなどを検出用分子として並べた分子間相互作用による高次のプロテオミクスも夢ではなくなる。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では二次元分解能を有効活用できる系を構築して、LAPS の境目のないマルチセンシングシステムを作製した。酸化シリコン表面に自己組織化単分子膜を形成する技術を応用して、LAPS 素子 (シリコン基板) 上に二次元電気泳動等のタンパク質のパターンを転写する技術を確認し、それと並行して半導体レーザーで数ミクロン程度の分解能で XY スキャンを行う装置の開発を行った。さらに転写されたタンパク質等を検出用分子として、分子間相互作用に注目したイメー

ジングを行うシステムを構築した。

(2) より精密な界面固定化技術を追求してセンサの高感度化を行った。主に、受容体分子の小型化と、標的分子の電荷を増強するような化学修飾または可溶化剤の添加を試みた。これらの評価には、電界効果型トランジスタ (FET) センサを用いた。

### 4. 研究成果

(1) LAPS システムはソースメータによる電位の精密制御システムを構築し、さらにロックインアンプを用いることで S/N 比の高い信号を得られた。その制御ソフトウェアは LabVIEW を用いて開発を行った。機械的な XY 掃引装置にはパソコン用 CD ドライブのレーザーをスキャンさせるシステムを転用した。

(2) 界面設計の工夫によって以前は電界効果型のセンサ (FET および LAPS) では測定が困難であったものが測定可能になった。ヒトに対して重篤な脳疾患を引き起こすヒトプリオンタンパク質の検出において、生理的条件下で正電荷を持つ、ヒトプリオンタンパク質の正電荷をさらに増加させることを試みた。

エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと N-ヒドロキシスクシンイミド (EDC/NHS) を用いて、センサに吸着したヒトプリオンタンパク質のカルボン酸の負電荷を減少させ、さらに、エチレンジアミン (Ethylenediamine) によってアミノ化させて正電荷を持たせた。これによって、約十倍の応答の増強に成功した (図 1)。

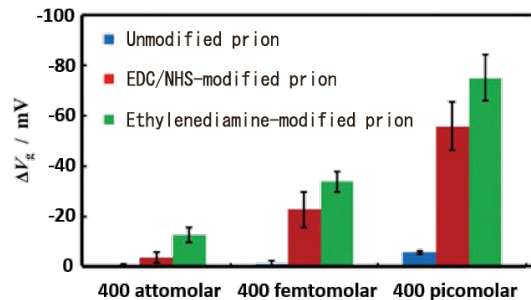


図1. 5. 主な発表論文等の〔雑誌論文〕①  
Fig. 3b より引用

(3) アレルギー反応に関わる IgE 検出のためのアレルゲン固定化センサは卵白アレルギーにおいて既に作製したが〔5. 主な発表論文〔雑誌論文〕〕、逆に食品中のアレルゲンを検出するセンサも有益である。例として重篤なアナフィラキシーショックを引き起こすソバアレルゲン (Bwip16) を検出する系を作製した。標的分子が小分子であるので、表面電荷密度を検出するセンサである FET および LAPS では感度が低くなることが予想されるが、負電荷を持つ界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加することで応答量を数倍にすることに成功した (図 2)。

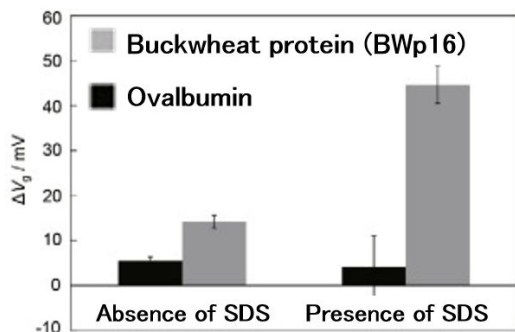


図2. 5. 主な発表論文等の〔雑誌論文〕②  
Fig. 2A より引用

(4) インフルエンザウイルスを検出するために、ウイルス表面のヘマグルチニンを検出するセンサは既に製作したが〔5. 主な発表論文〔雑誌論文〕〕、鼻汁の粘性を下げる試薬を用いて夾雑物の多い鼻汁中のウイルスでも、そのまま安定的に測定できるようになった。

#### 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10件)

S. Wustoni, S. Hideshima, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, Y. Mori, T. Osaka, Conversion of protein net charge via chemical modification for highly sensitive prion detection using field effect transistor (FET) biosensor, Sensors and Actuators B: Chemical, 査読有, Vol.230, 2016, 374-379, DOI:10.1016/j.snb.2016.02.078

S. Hideshima, K. Fujita, Y. Harada, M. Tsuna, Y. Seto, S. Sekiguchi, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Osaka, Signal amplification in electrochemical detection of buckwheat allergenic protein using field effect transistor biosensor by introduction of anionic surfactant, Sensing and Bio-Sensing Research, 査読有, Vol.7, 2016, 90-94, DOI:10.1016/j.sbsr.2016.01.011

S. Wustoni, S. Hideshima, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, Y. Mori, T. Osaka, Label-free detection of Cu (II) in a human serum sample by prion protein-immobilized FET sensor, Analyst, 査読有, Vol.140, 2015, 6485-6488, DOI:10.1039/C5AN01115A

S. Cheng, S. Hideshima, S. Kuroiwa, T.

Nakanishi, T. Osaka, Label-Free Detection of Tumor Markers Using Field Effect Transistor (FET)-Based Biosensors for Lung Cancer Diagnosis, Sensors and Actuators B, 査読有, Vol.212, 2015, 329-334, DOI:10.1016/j.snb.2015.02.038

S. Wustoni, S. Hideshima, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, M. Hashimoto, Y. Mori, T. Osaka, Sensitive electrical detection of human prion proteins using field effect transistor biosensor with dual-ligand binding amplification, Biosensors and Bioelectronics, 査読有, Vol.67, 2014, 256-262, DOI:10.1016/j.bios.2014.08.028

S. Cheng, K. Hotani, S. Hideshima, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, M. Hashimoto, Y. Mori, T. Osaka, Field effect transistor biosensor using antigen binding fragment for detecting tumor marker in human serum, Materials, 査読有, Vol.7, 2014, 2490-2500, DOI:10.3390/ma7042490

S. Hideshima, M. Kobayashi, T. Wada, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, N. Sawamura, T. Asahi, T. Osaka, A label-free electrical assay of fibrous amyloid based on semiconductor biosensing, Chemical Communications, 査読有, Vol.50, 2014, 3476-3479, DOI:10.1039/C3CC49460H

S. Hideshima, S. Wustoni, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, A. K-Takeike, T. Osaka, Monitoring Amyloid Sup35NM Growth with Label-Free Electrical Detection Using Field Effect Transistor Biosensor, ChemElectroChem, 査読有, Vol.1, 2014, 51-54, DOI: 10.1002/celec.201300151

S. Hideshima, S. Kuroiwa, M. Kimura, S. Cheng, T. Osaka, Effect of the size of Receptor in Allergy Detection Using Field Effect Transistor Biosensor, Electrochimica Acta, Vol.110, 2013, 146-151, DOI:10.1016/j.electacta.2013.07.113

S. Hideshima, H. Hinou, D. Ebihara, R. Sato, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, S. Nishimura, T. Osaka, Attomolar Detection of Influenza A Virus Hemagglutinin Human H1 and Avian H5 Using Glycan-blotted Field Effect

Transistor Biosensor, Analytical  
Chemistry, Vol.85, 2013, 5641-5644,  
DOI:10.1021/ac401085c

〔学会発表〕(計5件)

齊藤真衣、藤田主祐、秀島翔、原田義孝、  
網美香、黒岩繁樹、中西卓也、逢坂哲彌、  
電界効果トランジスタを用いたタンパク  
質検出に界面活性剤処理が及ぼす影響、  
電気化学会第 83 回大会、大阪、2016、3  
月

S. Wustoni, S. Hideshima, S. Kuroiwa,  
T. Nakanishi, T. Osaka, Amplification  
strategy of FET biosensor signal for  
sensitive detection of prion proteins,  
228th Meeting of The Electrochemical  
Society (ECS), Arizona, USA, 2015, 10  
月

南部谷俊介、前川達洋、秀島翔、比能洋、  
西村紳一郎、迫田義博、黒岩繁樹、中西  
卓也、逢坂哲彌、糖鎖固定化電界効果ト  
ランジスタによるインフルエンザウイル  
スから分離したヘマグルチニンの検出、  
電気化学会第 82 回大会、神奈川、2015、  
3月

S. Wustoni, S. Hideshima, S. Kuroiwa,  
T. Nakanishi, T. Osaka, Effect of Metal  
Ion Addition on The Sensitivity of  
Prion Detection Using Field Effect  
Transistor Biosensor, 65th  
International Society of  
Electrochemistry (ISE), Lausanne,  
Switzerland, 2014, 8.31-9.5

S. Cheng, K. Hotani, S. Hideshima, S.  
Kuroiwa, T. Nakanishi, Y. Mori, T.  
Osaka, Effect of the Receptor Size on  
the Sensitivity of Field Effect  
Transistor Biosensor for Label-Free  
Detection of Cancer Biomarker, 225th  
Meeting of The Electrochemical Society  
(ECS), FL, USA, 2014, 5.11-15

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒岩 繁樹 (KUROIWA, Shigeki)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・  
主任研究員

研究者番号：9 0 3 1 3 2 1 2