# 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 16 日現在

機関番号: 27101

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2014~2016

課題番号: 26420315

研究課題名(和文)DNAを座標指定で配列した電子回路の開発とこれを用いたDNA並列計算素子への応用

研究課題名(英文) Development of an integrated circuit using DNA as an operator mounted on coordinate axes and the application for parallel computing method

### 研究代表者

礒田 隆聡 (Isoda, Takaaki)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号:70284544

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):膨大な組み合わせの中から1つの解を特定する方法として、DNA塩基配列を演算素子に利用する並列計算手法がある。本研究では 電子回路中の任意の座標に、任意の塩基配列DNA断片を配列する手法の要素技術を確立することを目的とした。DNA断片は、その特性として1塩基の違いで特定のDNAを認識する機能が備わっている。そこで基板上に配列したDANが認識したDNA断片を、電気信号で取り出すことができるようなデバイスの開発の要素技術を確立した。このような要素技術を基に、 DNA並列計算で得られる複数のDNA断片から、特定の解を判定するDNA並列計算素子の基本設計を行った。

研究成果の概要(英文): We have been established an electrochemical patterning method which is possible to control an immobilization of DNA or protein molecule by an electrochemical reaction on a microelectrode mounted on a circuit board. Patterning of protein on 4mm area has been achieved where 25 pair of microelectrodes of 200 micrometer was integrated. We also found that traditional cell-free protein synthesis method in a test tube using a template DNA could be progressed on a microelectrode mounted on a circuit board and an expression of a protein could be detected as a changes in a voltage.

研究分野: センサ工学

キーワード: MEMS DNA 素子 集積 並列計算

# 1.研究開始当初の背景

本研究では電子回路中に様々な塩基配列の cDNA(タンパク合成の塩基配列情報を持つ mRNA からコピーした DNA)を集積化するための新方法を確立する。cDNA は1塩基の違いで特定の mRNA を認識する。最終目標として、認識入力信号に対して出力信号パターンを直接演算する素子の基本原理を開発する。有機体と電子回路のインターフェース開発が鍵である。

申請者は MEMS(マイクロエレクトロ・メカニカルシステム)技術を利用し、バイオセンサを電子回路中に集積した有機デバイスの開発を追求している。若手研究(H17)及び基盤研究 C(H19)では抗体タンパクを集積し、抗原の認識を電気信号に変換するセンサ素子を開発した。[図 1]



図 1 バイオセンサ素子を搭載した 携帯端末

ここでは半導体作製法で電子回路を形成した後、回路の一部を機能性分子で置き換える方法で、分子間の応答を電流の ON/OFFに信号変換させた。しかし人工分子の認識はミスマッチが多く、情報伝達量にも限界の場合を上離して、生物は DNA 中の僅か 4 種類の塩基配列情報を正確に複製・伝達してタンに組動を生産し、生命活動を行っている。また配列によする抗体タンパクは、アミノ酸の配列によって正確に抗原を認識し、生体の様々な免疫反応を制御している、このように有機体と物理デバイスの信号伝達には分子生物学をいかに模倣するかが鍵である。

# 2.研究の目的

本研究ではDNAから遺伝子(塩基配列コード)が正確にコピーされる分子生物学機構を利用して、電子回路中に集積化したDNAが塩基配列の違いで特定の遺伝子を認識する相互作用を、電圧のON/OFFに置き換えて情報処理を行う有機体/物理デバイスを構築するための基礎技術を開発する。そのため以下の3点について基盤技術の開発を行う。

電子回路の任意の位置に、タンパク分子を 集積化する方法論と、その確認法の確立を第 1目標とする。[図 2] 扱い易い抗体、抗原タンパクを相補的な DNAに見立て、これをデバイスに集積化し、 両者の認識を電気信号として検出できるシ ステムの開発を第2目標とする。

抗体のアミノ酸配列の違いで、任意の抗原の認識を電気信号として捉えることを第3目標とする。これら一連の実証により、DNA認識デバイス応用への目処を立てる。

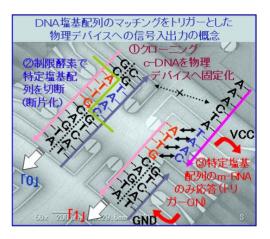


図2 cDNA/電子回路複合デバイスによる パターン情報処理の概念図

## 3. 研究の方法

ガラス基板上に構築した電極を電気分解すると、その除去面にタンパク分子が自発的に配列することを見出した。(以下電気化学パターニング法)本方法を用いると 200 μm の電極対 25 対を集積した僅か 4 mm四方の任意の位置に、タンパク分子を配列できる。

そこで基板上の任意の位置にアミノ酸配列の異なる抗体タンパクを集積させ、ペアーとなる抗原を認識させる。これを出力信号として捉えることが可能か検証する。

## 4. 研究成果

## 4-1. 電気化学パターニング法の開発

実施内容	電極をパターニングした基板を作製し、電極を電気化学的に多いの基板にタンパカーであると、電極除まであるとのでは、では、では、では、では、では、では、では、では、では、では、では、では、で
· - 12 1 1 5 -	,
達成状況	実施例、比較例のデータ収集を
(100%)	行い、その作用機構を解明した。

#### 【実施例1】

縦  $3 \text{ cm} \times$ 横  $5 \text{ cm} \times$ 厚さ 1 mmのガラス基板の表面に、Cr を 100 nm 積層させた Cr /ガラス基板を作製した。フォトリソグラフィー法にて Cr 面をパターニングし、基板中央の 4 mm四方

の面積に 150 µm の微小電極を 25 対集積した。この基板を専用のパターニング装置(アーズ㈱製:センサモジュール 2013 モデル)に装着した。本装置は数 μA 以下の電流を数ミリ秒単位で通電でき、微小電極の電気分解を精密に制御した。

集積電極上に5%塩酸水溶液10μLを滴下し、 初期電流値 2~3µA で 50s 通電を行った。「図 3(1-2)1 蒸留水で表面を洗浄後、電極除去 基板を得た。[図 3(3)] この表面にタンパク のモデルとして 100µg/mL ポリリジン/リン酸 生理食塩緩衝液 (PBS)溶液 (以降タンパク 溶液と記載)を 10μL 滴下し、室温-5 分保持 した。[図 3(4)] 蒸留水で表面を洗浄後、タ ンパク集積基板を得た。[図 3(5)] この基板 にタンパク分子のみと特異的に結合する 5-カルボキシフルオレセイン N-スクシンイミ ジル 以降蛍光標識剤と記載 を 100μg/mL PBS 溶液として10μL滴下し、室温-5分保持した。 蒸留水で表面を洗浄後、蛍光標識タンパク基 板を得た。[図 3(6)] 電気分解前の基板には、 5 つの電極対が 5 か所 (計 25 対 )配置された 状態であることを確認した。[図 4]

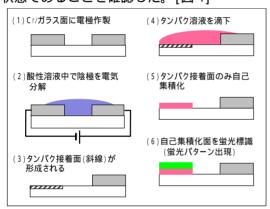


図3 電気化学パターニング手順(実施例1)

実施例1A 電極分解前(明視野像)

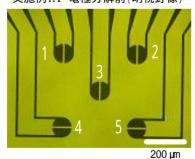
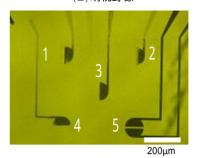


図4 電極分解前(実施例1A)

1-4 番の電極対に通電して電気分解を行った。[図 5] 比較のため 5 番は通電していない。本実験条件で負極側の電極が完全に除去され、ガラス面が露出していることを確認した。[図 5L] またこの時に、蛍光物質等は基板表面に存在していないことを確認した。[図 5R]

この基板にタンパク溶液を滴下し蛍光標 識剤で処理したところ、負極が除去されたガ ラス面(図 6L で電極が消失している部分)に

実施例1B 電極分解後/蛍光標識化前 (L)明視野像



(R) 蛍光視野像

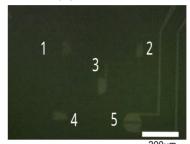
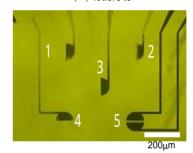


図 5 電極分解後/蛍光標識前(実施例 1B)

実施例1C 電極分解後/蛍光標識化後 (L)明視野像



(R) 蛍光視野像

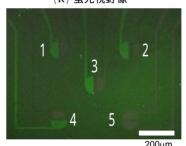


図6 電極分解後/蛍光標識後(実施例1C)

蛍光パターンが観察された。[図 6R] この蛍 光標識化剤はタンパク分子のアミノ基に特 異的に結合する。即ち蛍光パターンとして観 測されたガラスに、タンパク分子が自己集積 していることが示された。

## 【比較例1】

実施例 1 で電極を電気分解する工程[図3(2)]を、電極が溶解する溶液で除去した場合、タンパクの自己集積化が起こるか比較した。実施例1で使用した集積電極チップと同じものを作製し、集積電極上に10%硝酸セリウムアンモニウム水溶液10μLを滴下した。室温-2分保持した後、蒸留水で表面を洗浄後、電極除去基板を得た。その後の工程は全て実

施例1と同じである。

この基板にタンパク溶液を滴下し蛍光標識剤で処理したところ、電極が除去されたガラス面には蛍光パターンは観察されなかった。実施例1と比較例1の結果から、タンパク分子の自己集積化は、電極を電気分解したガラス面に特異的に起こることが示された。【実施例2】

実施例 1 で使用した集積電極チップと同じものを作製した。この基板を N-2-アミノエチル-3-アミノプロピルトリメトキシシラン水溶液に 100 -40 分浸漬させ、ガラス表面をアミノアルキルで修飾した。蒸留水で表面を洗浄後、アミノ化修飾基板を得た。その後の工程は全て実施例 1 と同じである。

実施例1と同様に、負極が除去されたガラス面に蛍光パターンが観察され、タンパク分子が自己集積化した。また実施例1と比較して、蛍光パターンはより明瞭になった。

タンパク分子はアミノ基のような極性官能基と静電的な相互作用、あるいは水素結合による相互作用によって表面に吸着することが知られている。実施例2と比較例2の結果からは、タンパク分子が本来吸着しやすいアミノ化表面よりも、電極を電気分解したガラス面へ特異的に自己集積化することが示された。

#### 【実施例3】

実施例2で使用したガラス面をアミノ化修飾した集積電極チップと同じものを作製した。この集積電極上に50%グルタルアルデヒド水溶液10μLを滴下し、室温-5分保持して表面のアミノ基に結合させた。蒸留水で表面を洗浄後、グルタルアルデヒド修飾基板を得た。その後の工程は全て実施2と同じである。

この場合も負極が除去されたガラス面に 蛍光パターンが観察され、タンパク分子の自 己集積化が認められた。実施例1と比較した 場合、蛍光パターンの輝度は高かった。しか し実施例2と比較した場合、蛍光強度にムラ が確認され、均一性が低下することが確認された。

表1に実施例、比較例の条件をまとめた。

表 1 実験条件一覧

	基板 1)の表 面処理	電極の除去方法
実施例1	なし	5%塩酸滴下+電気分解
比較例1	11	硝酸セリウムアンモニウム で溶解
実施例2	アミ/アルキル 基で修飾	5%塩酸滴下+電気分解
比較例2	"	硝酸セリウムアンモニウム で溶解
実施例3	アミ/アルキル 基で修飾 + グルタルアル デヒドを結合	5%塩酸滴下+電気分解
比較例3	"	硝酸セリウムアンモニウム で溶解

1) Cr電極(25対)集積したガラス基板

# 4-2. 電極に自己集積化したタンパクのセンサ素子としての有効性の実証

実施内容	電気化学パターニング法で自己 集積したタンパクが電気信号と して検出できるか検証し、検体 中に含まれる特定タンパクの有 無をパターン認識で判定できる ことが実証された。
達成状況 (75%)	パターン認識については 2 種類の陽性、陰性検体の検出まで実証できたが、多種検体(5種類以上)のパターン認識については実施に至らなかった。

#### 【実施例4】

電気化学パターニングとその評価試験に は、市販のセンサ基板[ウェルセンサ 3™(ア ルバック成膜(株))]ならびにセンサ電圧測定 器[図7, バイオセンサ2010 モデル(アーズ (株) ]を用いた。ウェルセンサ 3 はガラス基 板に Cr 電極が片側 5 対ずつ配置され、測定 部とパッド部以外は撥水性樹脂で被膜され ている。測定部分は直径3mm の領域の電極 が露出し(以降ウェルと記載) ウェルに7 ~10µL の液体を滴下すると液滴が形成され、 微小液滴の濃度測定が可能である。バイオセ ンサ 2010 モデルはウェルセンサ 3 専用の測 定器であり、センサチップを装着した子機 [図7]の測定データを PC に接続した親機に送 信し、これを専用ソフトでリアルタイムに計 測できる携帯型計測器である。1回の測定で ウェルセンサ3の5つのウェルの電圧値を同 時に計測できる。このシステムを用いて電極 への通電を行い、電気化学パターニングを 実施した。次に基板上のタンパク集積量を、 各ウェルの電圧値測定から評価した。



図7 センサチップならびに検出器外観

センサチップを測定器に装着し、実施例 1 と同様の原理を用いてタンパクの集積化を行った。各ウェルに 5%塩酸水溶液 7μL を滴下し、3000mV-3 分通電して陰極を電気分解した。[図 8(1)] 蒸留水で表面を洗浄後、電極除去基板を得た。[図 8(2)] 各ウェルに所定濃度のヒト血清アルブミン/PBS 溶液(以下 HSA)を 7μL ずつ滴下し、室温-5 分静置した。[図 8(3)] 蒸留水で表面を洗浄後、HSA 集積基板を得た。これを再び測定器に装着し、各ウェルに蒸留水 10μL を滴下し、2 分間電圧測定を行った。[図 8(4)]

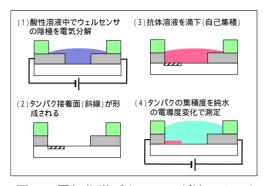
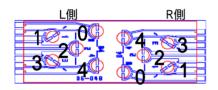


図 8 電気化学パターニング法によるセンサチップ上へのタンパクの集積とその検出方法 (実施例4)

# 表 2 測定したセンサチップの集積タン パク内訳(実施例 4)

集積タンパク内訳 (L側/R側共通)

ウェルNo	集積タンパク ヒト血清アルブミン(HSA)/PBS溶液	
0	6.25 μg/mL	
1	12.5 μg/mL	
2	25 μg/mL	
3	50 μg/mL	
4	100 μg/mL	



各ウェルには表2の内訳でHSA溶液を滴下し、電極除去面に集積化した。蒸留水を滴下後、0~60sの電圧値の平均値を求めた。

図9に電圧値とHSA濃度の関係を示す。検出電圧はHSA濃度の増加とともに減少する傾向が得られた。

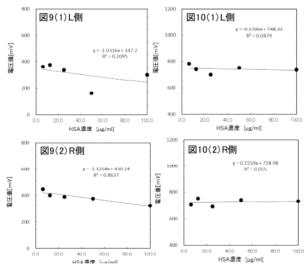


図 9 (左:実施例 4)電気化学パターニングでウェルセンサにタンパクを集積した基板の電導度

図 10 (右:比較例 4) タンパクを単純にセン サ表面に吸着させた基板の電導度

### 【比較例4】

実施例 4 に代えて、電極間のガラス面をアミノアルキル基で表面修飾した。方法は実施例 2 と同じである。その後、各ウェルに所定濃度の HSA/PBS 溶液を 7μL ずつ滴下し、37 -30 分静置してアミノ基修飾表面に物理吸着させた。センサの測定と解析法は実施例4と同じである。図10に測定電圧とHSA濃度には相関がなかった。実施例4と比較例4の結果から、電気化学パターニングによよ濃度には相関がなかった。実施例4と比較例5~7】

ウェルセンサを電気化学パターニングする工程は実施例 4 と同じである。実施例 5~7では、全ウェルに  $10\mu g/mL$  抗ヒト血清アルブミン抗体/PBS 溶液(以下抗 HSA 抗体)を  $7\mu L$ ずつ滴下し、室温-5分静置した。蒸留水で表面を洗浄後、抗 HSA 抗体基板を得た。これに所定濃度の陽性抗原(ヒト血清アルブミン/PBS 溶液;以下 HSA)ならびに陰性抗原(ウシ血清アルブミン/PBS 溶液;以下 BSA)を所定のウェルに滴下し[表 3]、37 -30分静置した。反応後、蒸留水で洗浄して抗体+抗原積層基板を得た。これを再び測定器に装着し、各ウェルに蒸留水  $10\mu L$  を滴下した後、2分間電圧測定を行った。

# 表 3 測定したセンサチップの集積タン パク内訳(実施例5~7)

集積タンパク内訳(L側)

/NIX////	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )		
ウェルNo	集積タンパク	反応タンパク	
0,1 3,4	抗ヒト血清アルブミン (抗HSA) 10 µg/mL	(陰性) ウシ血清アルブミン (BSA) 100 µg/mL	
2		PBS(基準電極)	

集積タンパク内訳(R側)

ウェルNo	集積タンパク	反応タンパク
0,1 3,4	抗ヒト血清アルブミン (抗HSA) 10 μg/mL	(陽性)ヒト血清アルブミン (HSA)100 µg/mL
2		PBS(基準電極)

測定後、各ウェルの 0~60s の平均電圧を 求めた。そして以下の式(1)から、相対電圧 値を算出した。

$$Rv = Vn / \{ (V_{L2} + V_{R2}) / 2 \}$$
 (1)

Rv:相対電圧値

Vn:ウェルnの検出電圧

V<sub>L2</sub>: L 側ウェル 2(基準電極)の検出電圧 V<sub>R2</sub>: R 側ウェル 2(基準電極)の検出電圧

実施例 5~7 は同じ実験で再現性の確認を行った。例として実施例 7 の相対電圧値を図11 に示す。レーダーグラフの軸の略記で(+)は集積化抗体に陽性抗原を添加したウェル、(-)は陰性抗原を添加したウェルである。(+)のウェル側(レーダーグラフ右側半分)に分布の偏りが現れ、応答している。これは

他の実施例5、6でも同様の傾向が得られた。

実施例7 (検出電圧/基準電圧比)

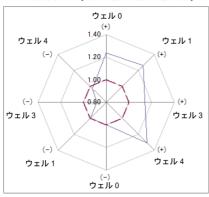


図 11 電気化学パターニング法でセンサチップに集積した抗体タンパクに対する 抗原タンパクの応答性 (実施例7)

このように電気化学パターニングで自己 集積した抗体がアミノ酸配列の違いで抗原 を認識し、これを電気信号で捉えることが可 能であることが示された。

表4に実施例、比較例の条件をまとめた。

表 4 実験条件一覧

	基板	表面処理	電極の除去方法
実施例4	したガラス基板	なし	5%塩酸滴下+電気分解
比較例4		アミ/アルキル 基で修飾	除去なし
	は撥水性樹脂で被膜 (ウェル:10ヶ)	なし	5%塩酸滴下+電気分解

本研究で考案した電気化学パターニング 法は、電気回路にタンパク分子を集積化する 技術としての有効性が認められた。またこの ような手法で集積した抗体タンパクは、アミ ノ酸配列の違いで抗原タンパクを認識し、電 気信号として検出できることが示された。本 要素技術は生体分子である DNA の集積化も応 用可能であり、DNA 素子構築の目処が立った。

# 5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計3件)\*査読有

- 1\* . <u>T. Isoda</u>, H.Ichihara, K.Ryujin, I. Urushibara, T. Shimizu, Development of Wireless Electrical Conductivity Sensor Screening System to Evaluate Protein Binding to Sensor Films, *Sensors and Materials*, 29 (2017) 23-38.
- 2\*. <u>礒田隆聡</u>, インセイセイ, 中谷允哉, 携帯型センサシステムによるエマルションの迅速電導度測定法の開発と化粧品乳化状態の評価, 電気学会論文誌 E. 136 (2016) 160-165.
- 3\*. T. Isoda, R. Maeda, A. Minohoshi, M. Kimura, H. Iwamoto, M. Kuramoto, Development of a Silica Surface Modified with Reactive Amino Group as an Immobilized Carrier for Use as Biosensor Materials, 27 (2015) 165-176

# [学会発表](計12件)

- 1. モバイルセンサを用いる抗原抗体反応のスクリーニング検査法の開発、 市原勲己, 龍神康大, 尾崎匠, 吉田雄貴, <u>礒田隆聡</u>, 平成 29 年電気学会全 国大会, 「人と化学センサ」シンポジウム予稿集, 3-S19-5 (2017・3月:富 山大学)
- 2. 携帯型パイオセンサによる酵素検出法の開発と食品検査への利用, 吉田 雄貴, 尾崎匠, 市原勲己, 龍神康大, 高尾凌太郎, <u>礒田隆</u>聡, 平成 29 年電

気学会全国大会, 「人と化学センサ」シンポジウム予稿集, 3-S19-6 (2017-3月・宮山大学)

- 3.集積化パイオセンサの表面分子設計とタンパク検出の電気特性, 儱神康 大, 市原勲己, 尾崎匠, 吉田雄貴, <u>礒田隆聡</u>, 平成 29 年電気学会全国大会, 「人と化学センサ」シンボジウム予稿集, 3-S19-7 (2017・3 月: 富山大学)
- 4. モバイルセンサを用いる抗原抗体反応のスクリーニング検査法の開発, 市原勲己, 龍神康大, 尾崎匠, 吉田雄貴, 中谷允哉<u>礒田隆聡</u>. 2016 年材料 技術研究協会討論会予稿集, p.11-12 (1B-02) (2016・12 月: 東京理科大)
- 5.集積化パイオセンサの表面分子設計と抗体検出の電気特性, 龍神康大, 市原勲己, 中谷允哉, 尾崎匠, 吉田雄貴, <u>礒田隆聡</u>, 2016 年材料技術研究協 会討論会予稿集. p.13-14 (1B-03) (2016・12 月:東京理科大)
- 6\*. 携帯型パイオセンサによる微量タンパク検出法の開発とガン由来タンパク測定への応用,市原勲己,龍神康大,尾崎匠,吉田雄貴,中谷允哉、<u>礒田隆戦</u>,電気学会センサ・マイクロマシン部門 第 33 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム, (2016・10 月:平戸) 25am2-PS-069 7 パイオセンサを用いた IoT 技術の開発と生化学検査への応用.龍神康大,市原勲己,尾崎匠,吉田雄貴,中谷允哉,<u>礒田隆戦</u>,平成28年度電気学会センサ・マイクロマシン部門 ケミカルセンサ研究会予稿集, CHS-16-275 (2016・7 月:金沢)
- 8 パイオセンサを用いた IoT 技術の開発と生化学検査への応用, 龍神康大, 市原勲己, 尾崎匠, 吉田雄貴, 中谷允哉, <u>礒田隆聡</u>, 第53回化学関連支部合同九州大会, (2016・7月: 北九州国際会議場) EC-3-049
- 9. モバイルセンサを用いる抗原抗体反応のスクリーニング検査法の開発, 市原勲己, 龍神康大, 尾崎匠, 吉田雄貴, 中谷允哉, <u>礒田隆聡</u>, 第53回化学 関連支部合同九州大会, (2016・7月: 北九州国際会議場) EC-3-053
- 10. ワイアレスセンサシステムを用いたタンパク吸着シートの検出性能,中谷允哉,龍神康大,市原勲己,<u>礒田隆聡</u>,平成27年度電気学会研究会パイオマイクロシステム研究会,p.15-18 (BMS-15-068) (2015・12月:筑波) 11. 化学修飾セルロースシートの開発とこれを利用したセンサ検出能の評価,中谷允哉,龍神康大,市原勲己,<u>礒田隆聡</u>,第52回化学関連支部合同九州大会,(2015・7月:北九州国際会議場)EC-2-0002
- 12. ディスポーザブル型タンパク吸着シートの開発とこれを利用したセンサ検出能の評価、中谷允哉、龍神康大、市原勲己、<u>礒田隆聡、</u>平成27年度電気学会センサ・マイクロマシン部門 ケミカルセンサ研究会予稿集。

CHS-15-16 (2015·7月:九州大学)

## [図書](計2件)

- 1 <u>議田隆聡</u>, 「携帯型バイオセンサの開発と IoT 技術による遠隔医療への応用」, 化学工業, 68 (2017) 43-48.
- 2. <u>礒田隆聡</u>他,「パイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発」,技術 情報協会。(2014)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計2件) 取得状況(計0件)

名称 1:溶液分析装置及びその製造方法、並びに溶液分析方法

発明者:礒田隆聡,龍神康大 権利者:北九州市立大学

種類:単願 番号:特願 2017-022253 出願年月日:平成29年2月 国内外の別・国内

名称 2:溶液成分分析キット、溶液成分分析方法、及び溶液成分分析装置

発明者:礒田隆聡,市原勲己,小島智明,内田茂

権利者:北九州市立大学・アルバック成膜㈱

種類:共願 番号:特願 2016-221892 出願年月日:平成28年11月 国内外の別:国内

## 〔その他〕ホームページ等

礒田研究室HP内 関連成果掲載 为ttp://www.kitakyu-u.ac.jp/env/subject/d-life/Takaaki\_Isoda/index.html

## 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

礒田 隆聡 (Takaaki ISODA)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授 研究者番号: 70284544

(2)研究分担者(なし)(3)連携研究者(なし)