

ナノエレクトロニクスと 生命科学の融合を目指して

宮原 裕二 (Miyahara, Yuji)

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

【要旨】

1. はじめに

絶縁ゲート電界効果トランジスタ (Insulated Gate Field Effect Transistor, IGFET) を水溶液中に浸漬し、イオン濃度測定に応用した研究は 1970 年 P. Bergveld によって初めて報告され、Ion-sensitive FET、ISFET と名づけられた(1)。その後、参照電極の設置の必要性(2)、ゲート上に形成するイオン感応膜の研究(3,4)、安定性・ドリフトメカニズムに関する研究(5-7)などが行われ、現在では pH 測定用センサとして実用化されている。イオンセンサとしての応用と並行して固定化酵素と組み合わせた酵素 FET (Enzyme FET) (8-11)、抗原—抗体反応と組み合わせた免疫 FET (Immuno FET) (12) など、生体分子の特異的反応と組み合わせたバイオ FET に関する研究も報告された。免疫 FET はゲート絶縁膜表面における抗原または抗体の電荷を検出するデバイスであるが、再現性のある結果が得られず、実現が困難であるとの見解が広く受け入れられている。その主な要因は、抗体などの蛋白質の大きさと溶液／ゲート絶縁膜界面の電気二重層の幅 (デバイ長) に関係している。抗体の典型的な大きさは約 10nm であるのに対し、生理学的塩溶液中でのデバイ長は約 1nm である。抗体をゲート絶縁膜表面に固定化する場合、溶液中の抗原は電気二重層の外で抗体と結合することになり、抗原の電荷はカウンターイオンによりシールドされ、原理的に FET で検出することが困難になる。最近これらの問題を克服する研究がいくつか報告されている。本講演では最近のバイオ

ランジスタの研究に関して、核酸および細胞に関する著者らの研究を中心に紹介する。

2. 核酸解析用バイオランジスタ

電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor, FET) を用いた DNA の測定系を Fig. 1 に示す。FET のゲート絶縁膜表面にオリゴヌクレオチドプローブを固定化し、Ag/AgCl 参照電極と共に試料溶液中に浸漬する。溶液の電位は参照電極により制御・固定される。DNA はりん酸基に起因する負の電荷を有しているため、ゲート表面に DNA プローブを固定化したり、ターゲット DNA とハイブリダイゼーションさせたりすることにより、ゲート表面近傍の電荷密度が変化する。この電荷密度変化を FET で検出することにより、試料中の目的塩基配列を有する DNA の有無などを知ることができる。ゲート絶縁膜上でのプライマー伸長反応において、4種類のデオキシヌクレオチド dATP, dGTP, dCTP, dTTP をそれぞれ別々に Taq DNA ポリメラーゼとともに順次添加し、FET のしきい値電圧変化を測定した。ターゲット DNA の塩基と相補的であれば一塩基伸長反応により一塩基のみ合成され、相補的でなければ合成反応は起こらない。したがって4種類の塩基を順次添加した後のそれぞれのしきい値電圧の変化を測定すれば、ターゲット DNA の未知の塩基配列を知ることができる。4種類のデオキシヌクレオチドを順次加えて一塩基伸長反応を測定した結果、加えたデオキシヌクレオチドがターゲット DNA の塩基と相補的な場合、一塩基伸長により 4mV 程度しきい値電圧 V_T が変化し、相補的でない場合にはしきい値電圧はほとんど変化しなかった。

これより FET を用いて一塩基伸長反応を検出することができることがわかった。上記より4種類のデオキシヌクレオチドを繰り返し添加してしきい値電圧変化を測定することにより、ターゲット DNA の塩基配列を反映したシグナルが得られることがわかった (13)。FET のゲート絶縁膜上で一塩基伸長反応を繰り返し行い、生成される水

素イオンをイオン応答性 FET で検出し、DNA の塩基配列を解析する方式の DNA シーケンサが既に実用化されている。1cm 角ほどのシリコンチップに 100 万個から 1000 万個のトランジスタを高密度に集積化したチップが開発され、ゲートに捕捉したマイクロビーズ上で同時多発的に一塩基伸張反応をおこなうことによって、高速かつ高スループットなシーケンシングが可能になった。実際、次世代 DNA シーケンサとして製品化され、欧州で流行した病原性大腸菌の型を短時間で同定することに貢献した(14, 15)。

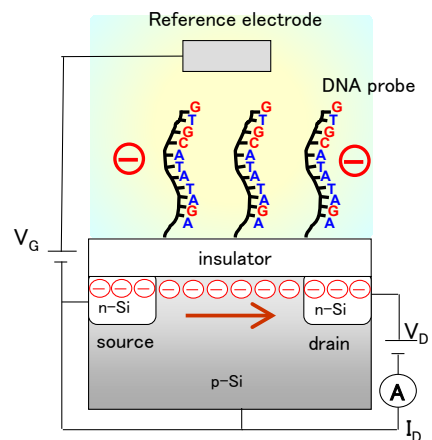


Fig. 1 FET を用いたバイオセンサ

3. 細胞トランジスタによるトランスポーター／基質相互作用のカイネティクス解析

トランスポーターは細胞膜に存在し、物質の能動的な膜輸送を担っている重要な蛋白質、ペプチドである。薬物の作用は作用部位での薬物濃度によって決まり、吸収・分布・代謝・排泄で代表される薬物の体内動態に大きく依存する。吸収・分布・代謝・排泄はすべて細胞膜の透過プロセスを含むため、薬物輸送を担うトランスポーターは薬物の薬効、副作用に重要な役割を果たしている。このため創薬においては、細胞膜表面のトランスポーターと薬物候補化合物（基質）との相互作用を迅速に解析する技術が求められている。本節では電界効果トランジスタのゲート絶縁膜表面にトランスポーターを発現させた細胞を設置し、トランスポーターと基質との相互作用を非侵襲に計測する細胞トランジスタについて述べる。

細胞としてアフリカツメガエル卵母細胞、トランスポーターとしてヒト有機アニオン輸送体(human Organic Anion Transporting Polypeptide; hOATP)、基質としては Estron-3-Sulfate(E3S)等の有機アニオンを用いた。卵母細胞の直径は約 1mm であり、取り扱いが容易である。Fig. 2 に示すように卵母細胞にヒト有機アニオン輸

送体の遺伝子を注入し、細胞膜にヒト有機アニオン輸送体を発現させる。トランスポーターを発現させた卵母細胞およびコントロール

ルとして未発現の卵母細胞をそれぞれ FET のゲート絶縁膜表面に固定する。基質である Estrone-3-Sulfate (E3S)を溶液中に導入するとトランスポーターを発現させた卵母細胞ではトランスポーターを介してE3Sが細胞内に取り込まれる。一方、トランスポーターを発現させていない卵母細胞ではE3Sが取り込まれない。細胞膜にヒト有機アニオン輸送体(hOATP2)を発現させた卵母細胞をゲート絶縁膜上に設置したFET、コントロールとしてトランスポーターを発現させない卵母細胞を設置したFET、さらに卵母細胞を設置しないFETの3種類のFETを用い、基質に対する応答を調べた結果を Fig. 3 に示す。ヒト有機アニオン輸送体を発現させた卵母細胞を有するFETのみ基質との相互作用の結果

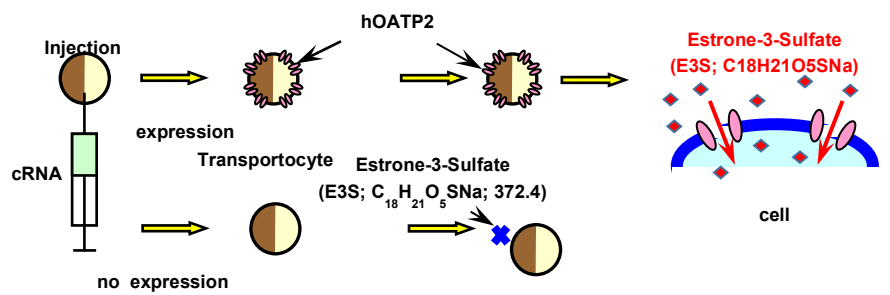


Fig. 2 トランスポーターと基質相互作用解析の概要

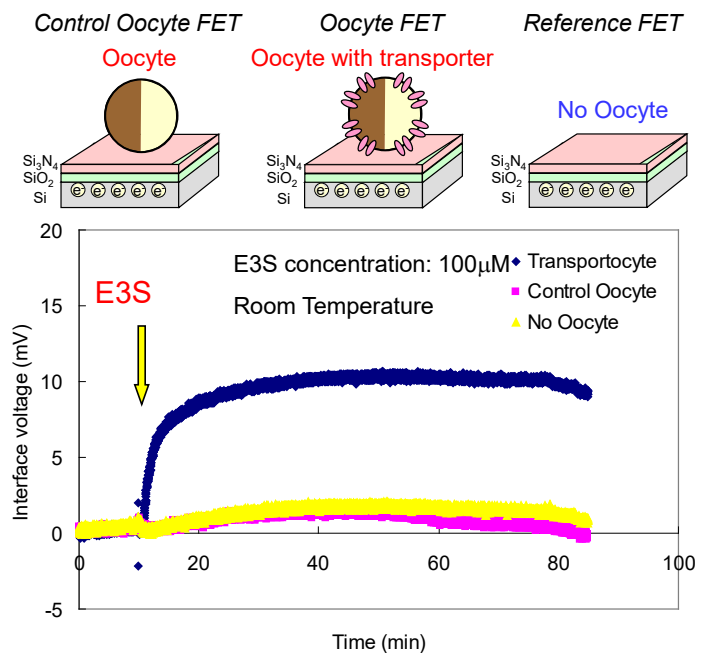


Fig. 3 基質添加による細胞トランジスタの応答

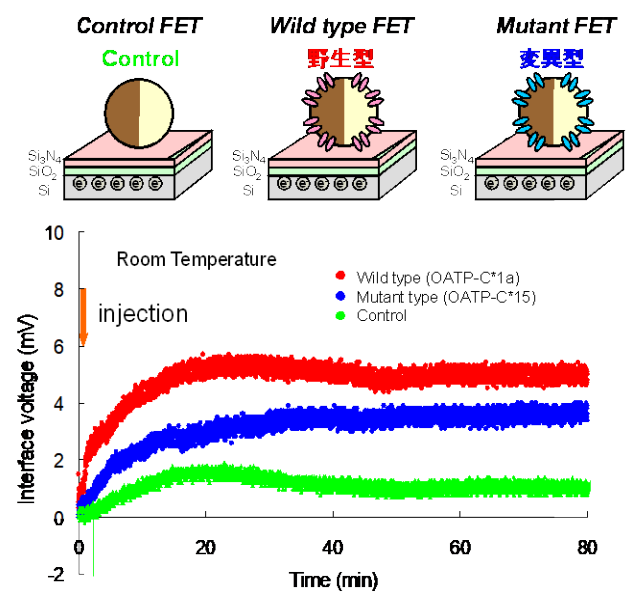


Fig. 4 野生型、変異型トランスポーターの応答

果、10mV 程度のシグナル変化を示した。応答は基質添加後約30分で一定値を示し、基質 E3S などが関与する細胞膜輸送が定常状態に達することがわかる。一方、トランスポーターを発現させていない卵母細胞の電位シグナルはほとんど変化しなかった。

細胞膜にはイオンチャネルやイオンポンプなどの膜蛋白質が埋め込まれており、ヒト有機アニオン輸送体 hOATP により Estron-3-Sulfate (E3S)が細胞内に取り込まれる際、E3S 以外のイオンなどが同時に細胞内に流入したり、細胞から流出することが知られている。

特に水素イオンの流入あるいは流出によりゲート部近傍の pH 変化が応答に寄与していると考えられる。以上より、細胞膜表面におけるトランスポーターと基質との相互作用のカイネティックスを非侵襲で解析できることを確認した。

hOATP トランスポーターには幾つかの遺伝子多型が存在し、細胞への基質取り込み効率は多型の種類によって異なることが知られている。野生型 thOATP-C*1aと2残基アミノ酸置換した変異型 hOATP-C*15を発現させた卵母細胞を複製し、それぞれFETのゲート絶縁膜表面に設置して、基質に対する応答を調べた。Fig. 4 に野生型、変異型、コントロール FET の応答を示す野生型トランスポーターを発現させた卵母細胞を有する FET の電位応答は変異型の FET の電位応答の約2倍であった。この結果はラジオアイソトープを標識として用いた取り込み実験と同様の結果であり、トランスポーターの多型による膜輸送効率の違いを識別することがわかった(16, 17)。以上のように細胞トランジスタでは、細胞膜で起こる電気現象を非標識、非侵襲で計測することができるため、トランスポーターと基質との相互作用や膜蛋白質機能の高スループット解析などに有効である。

4. おわりに

様々な機能性界面を用いたバイオセンサについて紹介したが、それらのうちのいくつかのセンサは既に生命科学の分野で実用化開発が活発化している。ヒトゲノム

プロジェクトによるヒトの全塩基配列解読後も、DNA シーケンシングに対するニーズは増大している。既に述べたようにバイオトランジスタを用いた DNA シーケンサは実用化され、がんゲノム解析など医療分野への応用が進められている。

一方、電気化学デバイスを用いた核酸増幅モニタリングは計測の簡便性や計測システムの小型化、低価格化に有効である。在宅医療やポイントオブケアテストを実現するために、miRNA 検出によるがん検査など、プレジジョンメディシンを指向したリキッドバイオプシーの有用な診断デバイスとなることが期待される。IoT (Internet of things) により様々かつ膨大な情報が共有される昨今、核酸解析による遺伝子情報のデータベース化がますます推奨される社会の中で、超早期診断、先制医療、ヘルスケアを目指したリキッドバイオプシーが果たす将来的な役割は重要なものとなり、今後ますます発展が期待される。

5. 文献

- (1) P. Bergveld: IEEE Trans. Biomed. Eng. 17,70 (1970).
- (2) T. Matsuo and K.D. Wise: IEEE Trans. Biomed. Eng. 21, 485 (1974).
- (3) 松尾正之、江刺正喜、応用物理、49、588 (1980)
- (4) P. T. McBride, J. Janata, P. A. Comte, S. D. Moss, and C. C. Johnson, Anal. Chim. Acta, 108, 161 (1979).
- (5) P. Hein, and P. Egger, Sensors and Actuators B, 1-3, 655 (1993).
- (6) Y. Ito, Sensors and Actuators B, 64, 152 (2000).
- (7) Y. Miyahara, K. Yamashita, S. Ozawa and Y. Watanabe, Anal. Chim. Acta, 331, 85 (1996).
- (8) S. Caras and J. Janata, Anal. Chem. 52, 1935 (1980).
- (9) Yuji Miyahara, Shoko Shiokawa, Toyosaka Moriizumi, Hideaki Matsuoka, Isao Karube, and Shuich Suzuki, Biosensor using ISFET with immobilized enzyme membrane, Proceedings of the 2nd Sensor

Symposium (Tsukuba), 91 (1982)

- (10) 宮原裕二、森泉豊栄、塩川祥子、松岡英明、軽部征夫、鈴木周一、日本化学会誌, No.6, 823 (1983).
- (11) Y. Miyahara, T. Moriizumi, and K. Ichimura, *Sensors and Actuators*, 7, 1 (1985).
- (12) S. Collins and J. Janata, *Anal. Chim. Acta*, 136, 93 (1982).
- (13) Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, *Angew. Chem. Int. Edn.*, 2006, 45(14), 2225-2228
- (14) Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. *Nature* 2011, 475(7356): 348-352.
- (15) Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. *Nature Biotechnology* 2012, 30(5): 434
- (16) Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, *Anal. Chem.*, 2008, 80(5), 1493-1496
- (17) Daniel Felix Schaffhauser, Monica Patti, Tatsuro Goda, Yuji Miyahara, Ian Cameron Forster and Petra Stephanie Dittrich, *PLoS ONE*, 2012, 7(7), e39238