

博士論文概要

Doctoral Thesis Synopsis

論文題目

Thesis Theme

Field Effect Transistor Biosensor Functionalized with
Sensing Interface Based on Biomolecular Interaction
生体分子間相互作用に基づく分子認識界面により
機能化した電界効果トランジスタバイオセンサ

申請者
(Applicant Name)

Hiroki	HAYASHI
林	宏樹

Department of Nanoscience and Nanoengineering
Research on Electrochemical Nano-systems

December, 2020

近年、人々の健康への意識の高まりに伴い、バイオセンサを利用した健康状態の日常的な把握及び管理への需要は増加している。現在、蛍光物質を対象分子に対して標識化する手法や核酸の増幅を利用した手法が開発されているが、これらの検出法は複雑な操作や大型な装置が必要といった課題を有する。半導体素子である電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor: FET) バイオセンサは、FET ゲート表面に対する対象分子の特異吸着に伴う電気二重層 (デバイ長) 内の電荷密度の変化をゲート電圧シフトとして直接検出する。そのため、対象分子をラベルフリー検出することが可能なことから、簡便なバイオセンサとして注目されている。しかし、実用化に至ったものは DNA シーケンサーへの応用のみであり、FET バイオセンサの更なる開発研究が求められている。FET バイオセンサの分子認識界面は、生体分子間相互作用を利用して機能化することで形成される。これまで、抗原抗体反応が FET バイオセンサの分子認識界面の形成に広く利用されてきた。今後、FET バイオセンサの開発促進に向けて、同センサ界面の機能化手法の拡充が求められる。そこで、本博士論文では、抗体以外の受容体として、多くの生体反応に関与する糖鎖及び糖鎖結合タンパク質であるレクチン、様々な分子への親和性を付与することが可能なアプタマーに着目し、各受容体とその生体分子間相互作用の特徴に基づき、対象分子との結合に適した分子認識界面の設計指針を得ることを目的とした。

本論文は全 4 章から構成されている。以下に各章の概要を示す。

第 1 章では、本研究の背景として、FET バイオセンサの特徴及び開発状況に関する既往研究について述べ、本研究の位置づけを明確にした。

第 2 章では、様々な生体反応に関与する糖鎖-レクチン相互作用を FET バイオセンサの分子認識界面へ適用した。糖鎖とレクチンは、多価結合による糖鎖クラスター効果の発現により、相互作用を強固とする。また、同効果の発現のためにレクチン分子が多量化していることが知られている。そこで、これらの特徴が FET バイオセンサの検出感度に与える効果を明らかにすることを目的とした。

第 1 節では、FET ゲート表面上における有効な結合サイト数の増加が検出感度向上に繋がることから、糖鎖との多価結合を形成するために複数の糖鎖結合サイトを有する多量体レクチンに着目した。センサ表面に固定化される受容体は、様々な向きを取るランダム配向により、有効な結合サイト数の減少が懸念される。それに対して、糖鎖認識部位を分子構造内に対称的に有する一部のレクチンは、ランダム配向の影響を低減することが期待された。そこで、4 つの糖鎖認識部位を対称的に有する植物由来レクチンであるジャカリンを FET バイオセンサの受容体とし、同分子が認識する糖鎖をヒンジ部位に有する分泌型免疫グロブリン A (Secretory Immunoglobulin A: s-IgA) の検出から、受容体分子あたりの結合サイト数が対象分子の捕捉に与える効果を評価した。その結果、ジャカリン固定化 FET

は、認識部位が1箇所の抗原認識フラグメントを固定化したFETと比較して、s-IgA由来の応答が大きくなることを明らかにした。このことから、対称構造のジャカリンは固定化時にランダム配向した場合においても、単位面積当たりの有効結合サイト数が減少せず多くのs-IgA分子を捕捉することが示された。また、ヒトから採取した汗中s-IgAの濃度測定から、ジャカリン固定化FETバイオセンサの非侵襲的なストレス把握への応用可能性を示した。以上より、複数の認識部位を対称的に有する受容体は、固定化時のランダム配向の影響を低減し、対象分子に対する高い捕捉能を発現することを見出した。

第2節では、糖鎖を高密度・高配向に固定化した界面とレクチンを有する分子間の多価結合の形成がFETバイオセンサの検出感度に与える効果について述べた。糖鎖は、小型かつ化学的に安定な分子であるため、タンパク質受容体に対して優位な特徴を有する。また、細胞表面の糖鎖と結合することで感染を開始する様々な感染症ウイルスは、その膜表面にレクチン分子が多数存在することが知られている。これらのことから、小型な糖鎖を固定化したFETバイオセンサは、糖鎖クラスター効果による高捕捉能の発現により、高イオン強度下においてウイルス粒子を検出することが期待された。そこで、過去の報告において、インフルエンザウイルス（Influenza Virus: IFV）の膜タンパク質であるヘマグルチニンを高感度に検出することが確認された、6'または3'シアリルラクトースをそれぞれ高密度に固定化したFETバイオセンサを用いて、H1N1ヒトIFV及びH5N1鳥IFVの検出から、糖鎖クラスター効果がFETバイオセンサの検出感度に与える影響を検討した。その結果、各糖鎖固定化FETバイオセンサは、デバイ長が1nm程度となる生体環境と同等のイオン強度下において、粒径100nmの各亜型IFVを特異的かつ広い濃度範囲で検出することを明らかにした。これは、小型な糖鎖が高密度に固定化された表面に対して、ヘマグルチニン分子内に存在する3つの糖鎖認識部位のみならず、ウイルス膜表面全体に存在する複数のヘマグルチニン分子が多価結合したことに起因すると考えられる。そして、ウイルス粒子の糖鎖固定化表面への密着を引き起こし、緩衝液の押し出しによる見かけのデバイ長の拡張が示唆された。続いて、鼻粘液中のIFV検出に向けて、体液の粘性が糖タンパク質であるムチンの凝集に起因することに着目し、L-システインエチルエステルによる粘度低下処理を検討した。その結果、同処理の適用により、鼻粘液中にスパイクした各亜型IFVの特異的な検出を可能にした。このことから、粘性によるウイルス粒子の拡散の阻害や粘液成分の非特異吸着の影響を低減し、実際に宿主から採取した検体中のウイルス検出に向けて有効な手法を確立した。以上より、高密度に糖鎖を固定化した界面は、糖鎖クラスター効果を発現することで、FETバイオセンサによる高イオン強度下でのウイルス粒子検出を可能にすることを示した。

バイオセンサの界面において、対象分子に対する高捕捉能の発現が検出感度の

向上に繋がる。第2章において、有用性が確認された分子認識界面における多量体レクチンの使用及び高密度糖鎖固定化界面の形成は、FET バイオセンサを含めたバイオセンサの界面設計時の選択肢となることが期待される。

第3章では、多様な分子に対する親和性及び化学的安定性を示すことから、抗体に代わる受容体として注目されているアプタマーのFET バイオセンサ界面における固定化密度の制御手法の確立を試みた。初めに、アプタマーがリン酸基に由来する負電荷を有することに着目し、同分子間の静電相互作用の変化による制御を検討した。その結果、固定化時のイオン強度の増加に伴いアプタマー分子の負電荷が遮蔽され、静電相互作用の減少による固定化密度の増加が確認された。そして、荷電ストレスマーカであるクロモグラニンA及びs-IgAに由来する応答が増加した。従って、荷電分子を検出するアプタマー固定化界面は、高イオン強度下で高密度に形成することが有効であることを明らかにした。次に、アプタマーは塩基配列の設計が容易であるため、対象分子の結合に伴う構造可変性の導入が可能である。そして、構造可変性アプタマーは、構造変化に伴うFET ゲート表面近傍の電荷密度を変化させるため、検出が困難であった非荷電分子検出を可能にすることが報告されている。しかし、対象分子との結合に伴う構造変化に対して、隣接アプタマー間の立体障害が懸念されたため、アプタマーの構造変化に必要な空間を形成することが有効と考えられた。そこで、非荷電のストレスホルモンであるコルチゾールとの結合により、グアニン四重鎖構造と呼ばれる高次構造を形成するアプタマーを利用したFET センサ界面の形成において、構造変化させたアプタマーを固定化する手法を提案した。初めに、溶液中でコルチゾールとの結合により構造変化させたアプタマーを固定化したところ、アプタマーを直接固定化した場合と比較して、同分子の固定化密度が減少し、コルチゾール検出時の応答が増加することを確認した。続いて、上記手法において、グアニン四重鎖構造形成の安定化のために使用した K^+ イオンによって、同高次構造の形成を誘発する可能性が考えられた。そこで、アプタマー固定化時の溶液中 K^+ イオン濃度がFET バイオセンサの感度に与える影響を評価したところ、コルチゾールを使用せずに高濃度の K^+ イオン環境下で作製したアプタマー固定化FETの応答が更に増加した。以上より、アプタマー固定化FET バイオセンサの検出感度向上に向け、構造変化を形成したアプタマーを固定化する手法が、同受容体の固定化間隔を制御することを見出した。本章において検討したアプタマー固定化手法は、対象分子との相互作用の効果的な発現を可能にすることから、バイオセンサを含む機能性材料の界面におけるアプタマー固定化状態の制御に繋がることが期待される。

第4章では、本研究において得られた実験結果から、各受容体及びその生体分子間相互作用の特徴に基づくFET バイオセンサの界面設計に関して統括した。更に、本研究から導かれる今後の展望について議論した。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

(List of research achievements for application of doctorate (Dr. of Engineering), Waseda University)

氏名 林 宏樹 印

(2021年 2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む） (theme, journal name, date & year of publication, name of authors inc. yourself)
○論文	H. <u>Hayashi</u> , R. Toyama, R. Takibuchi, S. Hideshima, S. Kuroiwa, N. Kaneko, K. Horii, K. Ohashi, T. Momma, T. Osaka, “Immobilization of Target-Bound Aptamer on FET Biosensor to Improve Sensitivity for Detection of Uncharged Cortisol”, <i>Electrochemistry</i> , in press.
○論文	S. Kuroiwa, H. <u>Hayashi</u> , R. Toyama, N. Kaneko, K. Horii, K. Ohashi, T. Momma, T. Osaka, "Potassium-Regulated Immobilization of Cortisol Aptamer for Field-Effect Transistor Biosensor to Detect Changes in Charge Distribution with Aptamer Transformation", <i>Chemistry Letters</i> , in press.
○論文	H. <u>Hayashi</u> , N. Sakamoto, S. Hideshima, Y. Harada, M. Tsuna, S. Kuroiwa, K. Ohashi, T. Momma, T. Osaka, “Tetrameric jacalin as a receptor for field effect transistor biosensor to detect secretory IgA in human sweat”, <i>Journal of Electroanalytical Chemistry</i> , 873, 114371, (2020)
○論文	S. Hideshima, H. <u>Hayashi</u> , H. Hinou, S. Nambu, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Momma, S.-I. Nishimura, Y. Sakoda, T. Osaka, “Glycan-immobilized dual-channel field effect transistor biosensor for the rapid identification of pandemic influenza viral particles”, <i>Scientific Reports</i> , 9: 11616, (2019)
講演	H. <u>Hayashi</u> , N. Sakamoto, S. Hideshima, Y. Harada, M. Tsuna, S. Kuroiwa, K. Ohashi, T. Momma, T. Osaka, “Detection of Stress-Related Secretory IgA in Human Sweat Using Lectin-Immobilized Field Effect Transistor Biosensor”, PRiME 2020, Online, (October 2020)
講演	K. Ohashi, S. Kuroiwa, R. Toyama, H. <u>Hayashi</u> , T. Momma, T. Osaka, “Saliva Stress Marker Monitor Using Aptamer Immobilized FET Biosensor”, PRiME 2020, Online, (October 2020)
講演	H. <u>Hayashi</u> , T. Momma, T. Osaka, “Discrimination of Influenza virus subtypes in mucus samples using glycan-immobilized semiconductor-based biosensor”, 6th DGIST-Waseda Workshop on Electrochemistry 2018, Daegu, Korea, (November 2018)
講演	S. Hideshima, H. <u>Hayashi</u> , S. Kuroiwa, T. Osaka, “Detection of Whole Influenza Viral Particle in High Ionic Strength Solution by using Glycan-Immobilized Field Effect Transistor Biosensor”, The 12th International Symposium on Electrochemical Micro & Nano System Technologies (EMNT2018), Milano, Italy, (September 2018)
講演	H. <u>Hayashi</u> , S. Hideshima, S. Kuroiwa, T. Momma, T. Osaka, “Discrimination of influenza virus subtypes in nasal mucus using glycan-immobilized field effect transistor biosensor”, International Symposium on Biological Material Science for Agriculture and Engineering- Aiming at Future Interdisciplinary Collaborations, Tokyo, Japan, (June 2018)
講演	H. <u>Hayashi</u> , S. Hideshima, H. Hinou, S. Nishimura, Y. Sakoda, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Momma, T. Osaka, “Detection of Influenza virus in nasal mucus by viscosity reduction using glycan-immobilized FET biosensor”, 28th Anniversary World Congress on Biosensors 2018, Florida, USA, (June 2018)

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

(List of research achievements for application of doctorate (Dr. of Engineering), Waseda University)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む） (theme, journal name, date & year of publication, name of authors inc. yourself)
講演	H. Hayashi, S. Hideshima, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Momma, T. Osaka, “Development of glycan-immobilized FET biosensor toward the detection of Influenza virus from biological sample”, 5th DGIST-Waseda Workshop on Electrochemistry 2017, Tokyo, Japan, (December 2017)
講演	黒岩繁樹, 林宏樹, 坂本尚輝, 原田義孝, 綱美香, 大橋啓之, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「非侵襲なストレスセンサに向けた半導体バイオセンサの作製」, 第3回 COI 学術交流会, オンライン, (2020年7月)
講演	林宏樹, 「簡便なストレスマーカー検出のための半導体センサ界面の構築とバイオセンシングシステム」, 第2回 COI 学会, 東京 (2019年9月)
講演	遠山良, 黒岩繁樹, 林宏樹, 大橋 啓之, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「FET バイオセンサによる非荷電分子検出の感度向上を目的としたターゲット-アプタマー複合体を用いた認識界面の構築」, 2019年電気化学秋季大会, 山梨 (2019年9月)
講演	遠山良, 林宏樹, 黒岩繁樹, 秀島翔, 大橋啓之, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「ストレスマーカーの低侵襲測定に向けたアプタマー固定化電界効果トランジスタセンサの作製」, TOBIRA 第8回研究交流フォーラム, 東京 (2019年5月)
講演	坂本尚輝, 林宏樹, 佐藤慎, 秀島翔, 原田義孝, 綱美香, 黒岩繁樹, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「小型受容体ジャカリンを用いた電界効果トランジスタバイオセンサによる分泌型IgAの検出」, 電気化学会第86回大会, 京都 (2019年3月)
講演	林宏樹, 秀島翔, 比能洋, 西村紳一郎, 迫田義博, 黒岩繁樹, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「インフルエンザウイルスの宿主域識別に向けた糖鎖固定化半導体センサの評価」, 第18回 Conference for BioSignal and Medicine (CBSM), 神奈川 (2018年10月)
講演	林宏樹, 秀島翔, 比能洋, 西村紳一郎, 迫田義博, 黒岩繁樹, 中西卓也, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「糖鎖固定化電界効果トランジスタバイオセンサによるインフルエンザウイルス粒子の高感度検出」, Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 第16回大会, 大分 (2016年9月)

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

(List of research achievements for application of doctorate (Dr. of Engineering), Waseda University)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む） (theme, journal name, date & year of publication, name of authors inc. yourself)
その他 (論文)	S. Hideshima, S. Wustoni, M. Kobayashi, <u>H. Hayashi</u> , S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Osaka, “Effect of human serum on the electrical detection of amyloid- β fibrils in biological environments using azo-dye immobilized field effect transistor (FET) biosensor”, <i>Sensing and Bio-Sensing Research</i> , 17, 25-29, (2018)
その他 (Proceedings)	R. Toyama, S. Kuroiwa, <u>H. Hayashi</u> , K. Ohashi, T. Momma, T. Osaka, “Fabrication of Aptamer-immobilized FET Biosensor for Sensitive Detection of Uncharged Molecules Using Target-Aptamer Complex”, Proceedings of the 66th Chemical Sensor Symposium, Supplement B, 35, 97-99 (2019)
その他 (Proceedings)	S. Sakamoto, <u>H. Hayashi</u> , S. Sato, S. Hideshima, Y. Harada, M. Tsuna, S. Kuroiwa, K. Ohashi, T. Momma, T. Osaka, “Detection of Secretory IgA by Field Effect Transistor Biosensor Using Jacalin as a Small Receptor”, Proceedings of the 65th Chemical Sensor Symposium, Supplement A, 35, 28-30, (2019)
その他 (Proceedings)	S. Kuroiwa, <u>H. Hayashi</u> , S. Hideshima, T. Momma, T. Osaka, “Detection of Amyloid- β Fibrils in Human Serum Using Congo-red immobilized FET Biosensor”, Proceedings of the 64th Chemical Sensor Symposium, Supplement B, 34, 22-24, (2018)
その他 (講演)	M. Fujita, <u>H. Hayashi</u> , S. Kuroiwa, K. Ohashi, T. Momma, T. Osaka, M. Okada, and F. Shibasaki, “Detection of Uncharged 5-Fluorouracil Exploiting Sequential Adsorption of 5-Fluorouracil-Modified Bovine Serum Albumin Using Field Effect Transistor Biosensor”, PRiME 2020, Online, (October 2020)
その他 (講演)	S. Hideshima, S. Kuroiwa, <u>H. Hayashi</u> , Y. Harada, M. Tsuna, T. Momma, T. Osaka, “Semiconductor-Based Portable Biosensor for Food Allergen Detection”, The IEEE International Symposium on Circuits and Systems 2019 (ISCAS2019), Hokkaido, Japan, (June 2019)
その他 (講演)	黒岩繁樹, <u>林宏樹</u> , 秀島翔, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「コンゴレッド固定化 FET バイオセンサを用いたヒト血清中アミロイド β 凝集体の検出」, 2018 年電気化学秋季大会, 石川 (2018 年 9 月)
その他 (講演)	<u>林宏樹</u> , 秀島翔, 黒岩繁樹, 大橋啓之, 門間聰之, 逢坂哲彌, 「電界効果トランジスタバイオセンサを用いたアミロイド β 凝集体の検出」, 東京バイオマーカー・イノベーション技術研究組合(TOBIRA) 第7回研究交流フォーラム, 東京 (2018 年 5 月)
その他 (特許)	逢坂哲彌, 大橋啓之, 黒岩繁樹, <u>林宏樹</u> , 「アプタマー固定化半導体センシングデバイス及び非荷電分子の検出方法」特願 2019-204856 号, 2019 年 11 月 12 日出願
その他 (特許)	逢坂哲彌, 大橋啓之, 黒岩繁樹, <u>林宏樹</u> , 「アプタマー固定化半導体センシングデバイス及び非荷電分子の検出方法」, 特願 2019-150267 号, 2019 年 8 月 20 日出願
その他 (特許)	逢坂哲彌, 門間聰之, 秀島翔, <u>林宏樹</u> , 綱美香, 原田義孝, 「レクチン固定化半導体センシングデバイス及び糖化合物の検出方法」, 特願 2019-043864 号, 2019 年 3 月 11 日出願