

博士論文審査報告書

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

Hiroki	HAYASHI
林	宏樹

Department of Nanoscience and Nanoengineering
Research on Electrochemical Nano-systems

2021年2月

本学位論文研究は、バイオセンサ構築のための分子認識界面の構築手法に対して、生体分子と受容体の相互作用を理解し、受容体の界面への固定に対する研究を行った結果をまとめたものである。QOLの高い社会を発展させていくために、様々な生体物質の検出、定量を可能とする、臨床現場や家庭などで容易に使用可能なセンサシステムの実用化が期待されている。小型で簡便なセンサとして、電界効果トランジスタ（FET）のゲート表面に受容体を固定し認識機能を持たせた FET センサの利用が挙げられる。これまで FET バイオセンサの認識感度を向上させるためには、検出物質のゲート上への吸着量増大に対して、受容体密度の制御が有効であった。一方、使用される受容体には、複数の箇所でも相互作用を示す分子や、対象分子の結合により立体的構造変化が進行するものもある。これらの相互作用を利用するバイオセンサが実現できれば、今後さらに様々な生体分子のセンサの実現が期待される。本研究では、これらの系に対して、生体分子—受容体の相互作用を利用した FET バイオセンサの構築を行うとともに、それらの結合状況の考察からゲート上への受容体固定化密度制御等による感度向上を実現し、FET バイオセンサの認識界面構築に対する指針を提案している。

本学位論文は上記の研究内容につきまとめたものであり、全 4 章より構成されている。

第 1 章では、FET バイオセンサに関する既往研究を紹介し、その特徴と研究開発状況をまとめており、本研究の位置づけを明確にしている。

第 2 章では、糖鎖—レクチン間の相互作用を利用した FET バイオセンサの検討結果をまとめている。レクチンは糖結合性のタンパク質であり、糖鎖を持つ細胞や糖質を特異な組み合わせで凝集する。特に、複数の結合部位により多点結合を形成することで凝集する特徴を有する。本研究ではこの多点結合に着目し、研究を展開している。第 1 節では 1 つの分子内に複数の糖鎖結合サイトを有する多量体レクチンを取り上げ、認識界面の形成を行った。生体物質をゲート表面に固定する際、分子内の固定化部位の選択は難しく、一般的には固定化された受容体はランダムな配向となる。一方受容体上の認識分子と結合する部位は分子内でその位置が固定されていることから、固定された受容体の一部は認識分子と結合できないことが想定される。そこで本学位申請者は、分泌型免疫グロブリン A (s-IgA) に対して分子内に 4 か所の結合点を有するレクチンであるジャカリンに着目し、ジャカリン固定化 FET を設計、作製した。そのセンサ特性および界面評価からゲート表面での s-IgA 捕捉量が、抗原認識フラグメントを固定した FET より多くなることを明らかにし、ヒト汗サンプル中の s-IgA 定量も可能であることを示した。第 2 節では、第 1 節とは逆に、糖鎖をゲート表面に固定した FET の認識界面を構築し、レクチンとの相互作用を利用する FET センサを作製し、多点結合に関して検討を加えた。ウイルスのエンベロープはレクチンを有する脂質膜から構成され、レクチンは宿主細胞膜に存在する糖鎖に結合性を示す。本研究では、ヒ

トおよび鳥インフルエンザウイルスのそれぞれのレクチンに対応する糖鎖をゲート表面に固定した FET センサを作製し、そのセンサ応答および界面評価を行っている。ゲート上に吸着したウイルスの面密度と FET の応答から評価されたゲート表面に固定された電荷量から、ウイルス膜上の複数のレクチンがゲート表面の糖鎖層と相互作用していることを明らかにしている。さらに、センサ応答に対する測定溶液のイオン強度の影響から、見かけのデバイ長が拡張されていることが示された。上記結果から、複数個所での結合により柔軟なエンベロープが変形し、測定水溶液を追い出しながらゲート表面を覆っている状況であることが考察され、生体環境と同等のイオン強度でのウイルス検出が可能となった。さらに、実際の臨床応用への課題抽出のため、ヒトの鼻粘液サンプルにウイルスを混入し、作製されたセンサで評価したところ、粘液の粘性が高いことが検出を困難にすることを見出し、粘度を下げるべく粘液中のムチンの切断処理を行うことでウイルスの特異的検出が可能となることを示している。これら実効的な結合点のゲート上密度の増加によるセンサ感度向上、多点結合によるウイルス粒子に対する親和性の飛躍的向上は、糖鎖—レクチン相互作用を利用する FET バイオセンサの構築のための設計指針を与える成果として工学的に高く評価される。また s-IgA はストレスマーカーであり、ストレスを数値として評価するセンサが示されたこと、ヒトインフルエンザと鳥インフルエンザを識別するインフルエンザウイルスセンサが示されたことから、今後これらのセンサの実用化が期待される。

第3章では FET バイオセンサの受容体としてアプタマーに着目した研究を展開している。荷電分子であるクロモグラニン A (CgA) と s-IgA に対し、親和性を示すアプタマーの負電荷を利用した固定化密度の制御を検討している。固定化環境のイオン強度の制御によりアプタマー間の静電相互作用を利用して固定化密度の制御を可能にし、FET 感度を向上させた。更に、非荷電のコルチゾールに結合して構造変化するアプタマーを固定した FET センサに対して、その面密度の制御も試みている。構造可変性アプタマーは、対象分子との結合により、立体的な構造が変化し、FET ゲート表面のデバイ長内の電荷数変化を引き起こすことで、FET による対象分子のセンシングを可能にする。本申請者は、面密度が高すぎる場合に、対象分子との結合に必要な構造変化が立体障害により阻害されている可能性に着目し、構造変化後のアプタマーをゲート表面に密度高く固定したうえで、構造をもとに戻し、対象分子との結合ができる状態にする手法を複数検討した。その結果、対象分子との結合はさせずに同様の立体構造変化をさせたアプタマーを固定化し、構造をもとに戻す手法が、最も対象分子に対するセンサ応答を高める作製手法であることを明らかにした。これらの成果は、アプタマーの固定化指針のみならず、特に立体的な構造変化に伴う分子認識を利用した FET バイオセンサの認識場界面構築のプロセス設計に重要な知見であり、工学的価値の高い成果である。

第4章では、以上の成果をもとに、FET バイオセンサの界面設計に関して統括し、将来展望を述べている。

以上の成果は、今後ますますニーズの高まる高性能小型簡便バイオセンサの認識場設計、構築に対して有益な指針を与えるものとして高く評価できる。よって本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2021年2月

審査員（主査） 早稲田大学 教授 博士（工学）（早稲田大学） 門間聰之

早稲田大学 教授 工学博士（早稲田大学） 菅原義之

早稲田大学 教授 博士（工学）（早稲田大学） 本間敬之