

<特集>

バイオセンシングの動向、課題、展望

斉藤真人, 民谷栄一

大阪大学 大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻
(〒565-0871 吹田市山田丘 2-1 E-mail:tamiya@ap.eng.osaka-u.ac.jp)

概要

バイオセンサーの研究課題としては、バイオ認識分子の選択・分子設計、トランスジューサーの選択・新デバイス開発、認識分子とトランスジューサーの連携などがある。最近では、金ナノ粒子やカーボンナノチューブなどのナノテクノロジーを利用したバイオセンサー開発が進められている。一方、生体機能をシングル細胞レベルで解析する細胞チップなどの研究も進展している。

キーワード: ナノバイオテクノロジー, 抗体アレイチップ, 遺伝子センサー, 細胞チップ, バイオデバイス

1. バイオセンサーの課題

バイオセンサーとは、文字通り、生物の有する認識機構にならってセンシングを行なうもので、たとえば、感覚細胞の例として味がどのように認識されているかを示すと、味覚である甘味、苦味、塩味に対応する物質が舌にある味覚細胞に捉えられ、味覚細胞の細胞膜を構成しているレセプタータンパク質や脂質分子によって受容される。このレセプター分子と味覚分子との結合が開始信号となり、その信号が細胞内部へ伝わる。特に膜電位変化などとして、細胞内へ伝播され、シグナル伝達が行われる。神経細胞で受容された信号も電気信号として神経細胞間を伝送される。このように特定物質のレセプターによる認識と、それに引き続いて起こる情報変換の作用により信号が伝達される。このことは細胞の種類に関わらず、生物の情報の認識、伝達に関わる一般的な現象と考えられる。

バイオセンサーはこうした生物のもつ分子認識機構に基づいて構築されている。すなわち、分子認識膜とトランスジューサー(信号変換装置)から構成されている。この組み合わせにより分子認識反応電気信号へ変換される。変換された電気信号は状況に応じて信号処理される。分子認識部位には、酵素、抗体、DNA、細胞などの生物材料が通常用いられるが、生体機能を模倣した人工分子であるバイオミメティック分子としてモレキュラーインプリンティングポリマー(MIP)なども検討されている。新たに自然界から探索した酵素や結合タンパク質もあれば、遺伝子組み換え技術やバイオコンビナトリアル法により人為的に作成される認識分子の設計も可能である。また、分子モーターのような新たな生体機能素子を用いたバイオセンシングの可能性も示唆されている。一方、トランスジューサー(信号変換部位)には、電極や半導体などの電気化学デバイスのみならず光検知素子、磁気検知素子など種々の物理デバイスが用いられる。Fig. 1にこうした

バイオセンサーの構成と最近の研究分野を示す。すなわち、以下に示す課題がバイオセンサー先端科学分野においてとりあげられ、進められている。

- (1) バイオ認識分子の選択・分子設計
- (2) トランスジューサーの選択・新デバイス開発
- (3) 認識分子とトランスジューサーの連携
- (4) 機能性インタフェースの設計
- (5) 信号処理法の開発および各種分野への応用

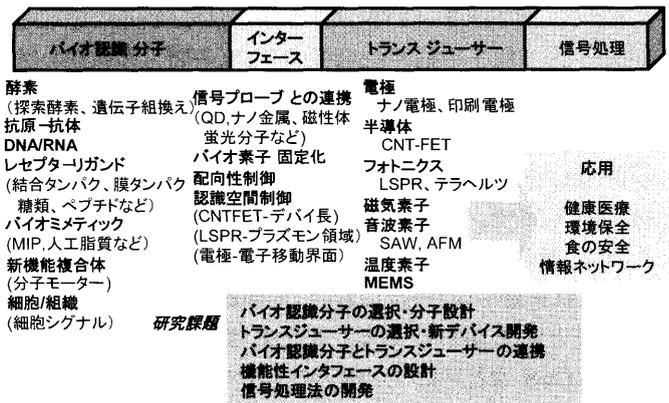


Fig. 1 バイオセンサーの研究課題

2. ナノテクノロジーとバイオセンサー

近年、ナノテクノロジーの進展が著しい。筆者は、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合を目指し、ナノバイオテクノロジーの研究を推進している。バイオセンサー研究においてもカーボンナノチューブ、金属ナノ粒子、量子ドットなどナノ材料の進展により機能が優れたバイオセンサーが生まれている。ナノバイオテクノロジーの概要を Fig. 2に示すが、基盤技術としてナノマテリアル、ナノバイオロジー、ナノデバイスなどがあり、これらを基礎にナノバイオセンサー、ナノドラッグデリバリー、ナノサージェリー、バイオバッテリーなど医療、食糧、環境、エネルギー、デバイス分野などの次世代技術として応用展開が期待されている。生体機能をになうバ

イオ分子の解析を行う手法としては、分子構造や形態に関する情報のみならず生きた細胞内での動的解析が不可欠である。たとえば、バイオ分子の解析をナノ領域で観測しようとする為には電子顕微鏡や走査型プローブ顕微鏡といった手法が有力である。特に、原子間力顕微鏡は、液中での測定も可能であり、遺伝子やタンパク質の構造に関する研究に利用されている。SNOM といった走査型プローブ顕微鏡により、近接場光情報と原子間力情報を合わせもつ方法によるナノ解析も実現している。特に細胞内の GFP 分子をマーカーとした解析や染色体のナノ構造の解析にも展開している。さらにこうした顕微鏡以外にナノ領域を観測する方法として、エバネンセント光を用いた一分子計測が行われており、ATPase 回転運動、ミオシン-アクチンの滑り運動などが直接観測されている。一方、ナノスケールの構造体を利用してバイオの解析に利用する研究も重要である。さらにナノスケールの間隔を有する電極を作成し、電極間に DNA を配置してその特性を測定することも試みている。また、ナノスケールで精密に作成されたチャンネル構造を利用してゲル電気泳動を模倣した微細なシリコンピラによる DNA の分離が実現している。ナノマテリアルとして代表的なカーボンナノチューブを原子間力顕微鏡のチップの先端部に用いてより精密に生体材料の構造を観察する試みもある。すでにこれを用いて DNA の二本鎖の構造が観測できることも明らかとなっている。一方、こうしたナノツールを用いて測定のみならず操作を行うことも行われている。たとえば、光ピンセットの原理を利用してナノ粒子の動きを制御したり、原子間力顕微鏡を用いて細胞や染色体の移動や切断分離したりすることも可能である。ナノ機能材料は、いうまでもないが、ナノスケールで制御された構造体を基盤とした機能材料である。こうしたナノ材料をバイオセンシングに展開する研究が注目されている。それは、対象とするバイオ自体がナノ機能材料を基盤としており、これを調べるツールにおいても同様のナノテクノロジーを必要とするからである。たとえば、ナノ量子ドット (CdSe, CuS など) は、ナノ粒子のサイズを制御することによって蛍光波長を変化させることが可能で、すでに遺伝子やタンパクの標識剤への利用が検討されている。その他、ナノ金属粒子 (金、銀など)、ナノチューブ (CNT、ペプチド、脂質など) などのナノメートルのサイズで制御された材料も開発されており、これらを標識材料にした遺伝子やプロテインのセンシングが行われている。また、チップ表面にナノ粒子を単層の配置したナノ周期構造体による局在プラズモンを用いたバイオセンシングなどの展開も行われている。この方法は、標識剤を必要とせず直接に抗原抗体反応などをモニタリングできる。特に、チップ基板に対して垂直に入射した光に対する反射スペクトルを測定すると行った単純な光学系で行うことができ、オンチップでの集積化も容易である。また、金ナノ粒子に遺伝子プローブを固体化して測定対象となる遺伝子と結合することにより起こる光学特性や電気化学特性を指標とする方法も提案されている。一方、ナノテクノロジーのもう

一つ重要な点である分子設計について示すと、たとえば、細胞内シグナルとしてのリン酸化酵素の活性を調べるプローブを開発するために基質となる配列のペプチドの両端に蛍光物質を付与することにより分子プローブが開発されている。このプローブは酵素活性により構造が変わり、最終的には光の情報へと変化を与える。その結果、細胞内情報をモニタすることができるのである。

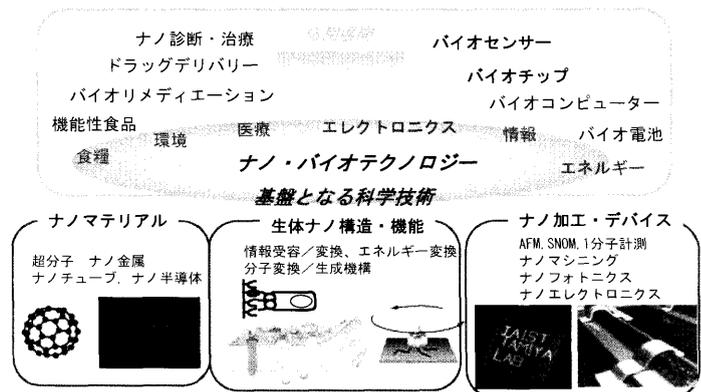


Fig. 2 ナノバイオテクノロジーとバイオセンサー

(1) ナノ周期構造を用いた局在プラズモンデバイスによるバイオセンシング

抗体を用いる免疫センサーは、医療分析、環境分析などにきわめて有力である。しかし従来から用いられている方法では、蛍光分子や酵素などの標識剤を必要とし、多段階のきわめて煩雑な操作を必要としていた。一方、表面プラズモン共鳴 (SPR) や水晶振動子を用いる非標識法もあるが、ワンチップ上に集積して、一度に多種類の測定をすることは容易ではない。そこで、著者らは、金ナノ粒子の周期構造による光学特性を利用したバイオセンシングシステムの構築について検討した。この方法であれば、基板を容易に調製でき、標識剤を必要とせず、局在プラズモン共鳴に基づく検出が可能である (Fig. 3)。測定系も基板に対して垂直方向の入射光・反射光を用いるため、より単純な光学系ででき、オンチップでの集積化がきわめて容易である。ここでは、この局在プラズモン共鳴デバイスを免疫センサーに適用し、その特性を評価した。まず、金蒸着したガラス基板へ Dithiodibutyric acid (DDA) の自己組織化単分子層 (Self assembled monolayer: SAM) を形成した。そして SAM 形成した基板表面へ、3-aminopropyltriethoxysilane (γ -APTES) で表面修飾した粒径 100 nm のシリカ微粒子を共有結合させた後、再度微粒子の上へ金蒸着を行い、周期構造基板とした。作製した周期構造基板に対して入射光を照射し、その反射光に対する吸収スペクトルを測定したところ、シリカ微粒子周期構造基板では 558nm の波長にて、吸収ピークが観察された。著者らが作製した 300 スポットからなるプロテインアレイプラズモン免疫チップでは、抗 IgA 抗体、抗 IgD 抗体、抗 IgG 抗体、抗 IgM 抗体、抗 C-reactive protein (CRP) 抗体および抗フィブリノゲン抗体を、各 50 スポットずつプロテインアレイプラズモンバイオチップ表面へ固

定化することとした。なお、各スポットに添加する抗体および抗原溶液量は、100nLとした。本プロテインアレイプラズモンバイオチップでは、相互作用を解析する検体数に応じて、リガンド固定化および分析物質の添加におけるスポット数、添加量などを柔軟に変更させることが可能である。その結果、各抗体固定化スポットの光学特性変化量は、添加した抗原濃度に応じて異なる吸収ピーク強度変化を示すことが観察された。そして、それぞれ添加した抗原に対して特異的に認識する抗体が固定化されていたスポットのみに、顕著な吸収ピーク強度変化が観察された。検出限界は測定対象によって異なるが、ほぼ 100pg/mL であった。またこのデバイスを用いることで、プローブ遺伝子とのハイブリダイゼーションによる特定遺伝子の検出にも応用できた。

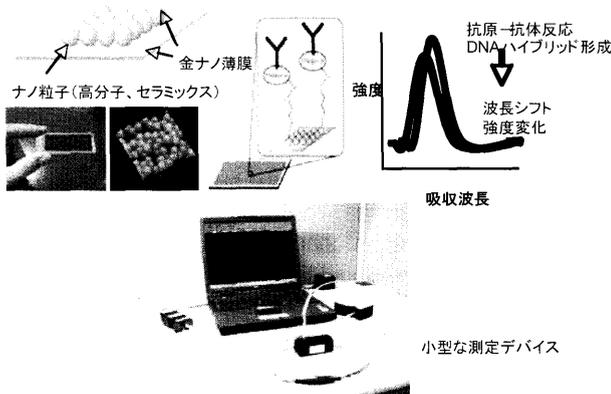


Fig. 3 局在プラズモンバイオセンサー

(2) カーボンナノチューブ FET の構成とバイオセンシング

CNTは、直径数 nm の1次元構造を有し、表面の状態変化に極めて敏感であるため、FET のゲート部として機能させ、微小な電位変化をとらえるデバイスとして期待されている。これを用いて、DNA のハイブリダイゼーションや抗原抗体反応の検出を検討した。まず、CNTFET のバックゲート(Au)にペプチド核酸(PNA)を化学修飾によって固定させ、DNA のハイブリダイゼーションの検出を行なった。PNA は、DNA と異なりペプチド結合で骨格を形成しているおり、無電荷であるため DNA とより強くハイブリダイズし相補鎖認識も優れている。まず、緩衝液中で FET の伝導特性を測定し、次に DNA を導入し、ソース・ドレイン電流の時間変化を調べたところ、6.8 fmol/L ときわめて薄い DNA 濃度を用いても徐々に電流値が増大し、ハイブリダイゼーションが検出できた。つぎに、この CNTFET を抗体検出に応用した。レセプターとして抗体を用いた従来のセンサでは、抗体のサイズがデバイ長よりも大きいために高感度での検出は難しい。そこで、デバイ長に比べてサイズの小さいアプタマーをレセプターとして使用した。すでにさまざまなタンパク質に対応するアプタマーが見つかっており、今回その中で代表的な IgE アプタマーを用いた。CNTFET の CNT チャンネルに IgE アプタマーを化学修飾し、IgE とアプタマーの結合を CNT 表面の状態変化として捉え、リアルタイムで FET の電気特性を測

定した。アプタマーを修飾した CNTFET のチャンネル部分を、緩衝溶液(PBS)中に浸し、同じく溶液中に浸した参照電極をゲート電極として用いた。同一の試料に濃度の異なる IgE を導入し、FET の電気特性を測定した。ソース・ドレイン電圧を 200mV、参照電極をソースに対して 0V として固定し、ソース・ドレイン電流の時間変化をプロットした結果を Fig. 4 に示す。図中の矢印は IgE の滴下を示しており、矢印の上の数字は滴下後の PBS 溶液中の IgE の濃度を表している。IgE 導入後に電流値は減少しており、極微量の IgE を CNTFET が検知したことを示している。

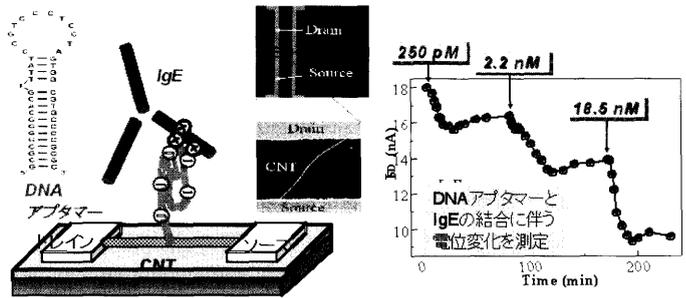


Fig. 4 CNT-FET バイオセンサー

3. 細胞センシングの展開

生体機構を理解するうえで細胞内のみならず細胞間シグナルの授受メカニズムを明らかにすることは、本質的な必須なアプローチと考えられる。特に、神経細胞ネットワーク、生体防御ネットワークなどに代表されるように数多くのヘテロな細胞からなる細胞集団を対象とし、基本単位である細胞の機能を一細胞あるいはサブセルレベルでの解析できる手法およびシステムの開発が必要である。近年、半導体製造技術等によって培われたマイクロ・ナノテクノロジー分野における微細加工技術の進歩に伴って、複雑で緻密なデバイス作製が可能となり、遺伝子やタンパク質の検出、解析だけでなく、高精度な細胞の操作および解析の可能性も広がっており、その解析ツールの1つとして細胞チップが注目されている。Fig. 5に著者らの開発したシングル免疫 B 細胞チップ、神経ネットワーク細胞チップ、細胞アッセイチップなどの例を示した。これらを用いて細胞シグナル解析が可能となり、ドラッグスクリーニングなどへの応用が検討されている。

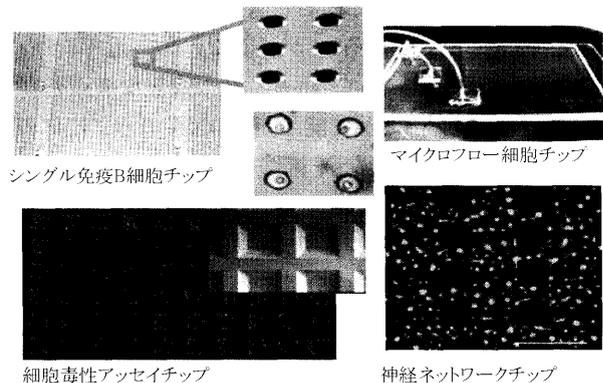


Fig. 5 細胞チップの例

ここで、シングル細胞チップを用いた免疫細胞ネットワーク解析の例について以下に紹介する。免疫システムにおいて中心的役割を担うBリンパ球細胞は、外部からの異物あるいは抗原を認識する抗体分子を生成する。B細胞は多くの人の場合、 10^8 以上の種類の抗体を生産できるとされており、その多様性をもって様々な抗原に対応していると考えられている。B細胞は、1個の細胞が産生する抗体は1種類であり、これをモノクローナル抗体と呼んでいる。通常の抗体作製の方法においては、抗原を動物に感作させて、その後体内で産生する抗体を入手する方法が用いられている。この場合には、複数のB細胞が産生する抗体の混合物として得られるため、いわゆるポリクローナル抗体が得られることになる。ガン細胞や特定のウイルスの測定や診断する場合には、特異性の高い認識の優れたモノクローナル抗体の方が有利と考えられている。1細胞の配置できるマイクロチャンバーが20万個以上集積したマイクロアレイチップを作製し、抗原刺激前後の細胞内カルシウムシグナル応答の測定に成功している。こうしたマイクロアレイを用いたシステムは、細胞1個ずつの解析を一度にかつ大量に行える点が特徴である。既存の細胞分析技術としてセルソーターを用いるフローサイトメトリー法があるが、これとの相違は、セルソーターは、単位時間あたりに解析できる細胞数は多いが、本研究で用いるB細胞のような刺激前後の応答を比較するような場合、セルソーターでは、刺激前後の細胞集団を別々に調製して測定するため、特定の細胞を一細胞レベルでその応答を比較することは不可能であり、あくまでも統計的な細胞集団解析しか行えない。したがって、その測定限界以下の極めて低い割合の特異的な細胞のスクリーニングおよび解析は困難である。一方、本研究によって開発したシングル細胞チップでは、個々の細胞が収納できる20万個以上のチャンバーアレイをチップ基板上に構築しており、0.001%以下の細胞も検出可能であるばかりでなく、独立したマイクロチャンバー内に単一細胞が別々に配置され、その空間的な座標についてもデータ化されている。そのため、マイクロチャンバーアレイに配置された全細胞を網羅的に細胞1個ずつのレベルで刺激前後の応答の比較解析が可能になる。さらに、解析によって得られた抗原刺激に特異的な単一細胞をマイクロマニピュレーターによって回収することにも成功しており、回収されたB細胞は1細胞PCRにより、特定の抗体の抗原認識部位の遺伝子配列を増幅、入手することが可能である。近年、チップテクノロジーの発展によって、緻密でかつ複雑な構造を有する様々なチップデバイスが可能となり、DNAチップに代表されるマイクロアレイだけでなく、流路(フロー)型のチップデバイスも盛んに研究開発されている。その理由としては、流路型チップの特徴として、アレイ型チップとは異なり溶液交換などが容易であるため、細胞の分離やパターンニング培養などに用いられており、それ以外にも様々なアッセイ等にも期待されており、細胞破碎、細胞融合、エレクトロポレーションなども試みられている。さらに将来的には、前処理、分離、検出

などを一枚のチップ上ですべて行おうとすること(ワンチップ化)が目指されており、micro Total Analysis System (μ TAS)と呼ばれ期待されている。筆者らも流路型チップを作製し、独自のセルソーティング技術と連携させ、一細胞レベルでの網羅的細胞解析システムの開発を進めている。開発されたマイクロ流路型細胞チップは、オイル溶液と細胞溶液を別々の流路から送液し、二相液が合流したフローチャンネル中でピコリッターレベルの二相液のコンパートメント流体を交互に作成し、細胞溶液をオイル溶液によって一細胞ごとに分離する従来にはない原理を用いて、流路内で多数の単一細胞を同時に検出するシステムの開発に成功している。また、オイル溶液によって形成される単一細胞のみを含む各コンパートメント流体の挙動を解析し、各コンパートメント中で刺激応答する一細胞の定量検出が可能なシステムも構築している。

[参考文献]

- 1) 民谷栄一監修「バイオセンサー先端科学技術と応用」シーエムシー出版(2007)
- 2) D.Kim, K.Kerman, M.Saito, S. Rao, Tatsuro Endo, S.Yamamura, Y.Kwon and E.Tamiya Label-free DNA biosensor based on localized surface plasmon resonance coupled with interferometry, *Analytical Chemistry* 79(5) 1855-1864(2007)
- 3) K.Kerman, M.Vestergaard and E.Tamiya Label-Free Electrical Sensing of Small-Molecule Inhibition on Tyrosine Phosphorylation, *Analytical Chemistry* 79, 6881-6885(2007)
- 4) K.Maehashi, T.Katsura, K.Matsumoto, K.Kerman, Y.Takamura and E.Tamiya, Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors, *Analytical Chemistry* 79(2) 782-787(2007)
- 5) T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, H. M. Hiep, D.-K. Kim, Y. Yonezawa, K. Nakano, E. Tamiya Multiple Label-Free Detection of Antigen-Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core-Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip" *Analytical Chemistry*, 78(18) 6465-6475 (2006).
- 6) T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya, Label-free detection of peptide nucleic acid-DNA hybridization using localized surface plasmon resonance based optical biosensor" *Analytical Chemistry* 77(21) 6976-6984(2005)
- 7) K.Kerman Y.Morita, Y.Takamura, E.Tamiya, K.Maehashi, K.Matsumoto, Peptide Nucleic Acid Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistor for Ultra Sensitive Real-Time Detection of DNA Hybridization, *NanoBiotechnology*, 1(1) 65-70 (2005)
- 8) Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kagan Kerman, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, Ultrasensitive detection of DNA hybridization using carbon nanotube field-effect transistors, *Japan Journal of Applied Physics*, 43(12A) L1558-L1560(2004)
- 9) S.Yamamura, H.Kishi, Y.Tokimitsu, S.Kondo, R.Honda, S.R.Rao, M.Omori, E.Tamiya and A.Muraguchi, Single-cell microarray for analyzing cellular response, *Analytical Chemistry*, 77(24), 8050-8056 (2005)
- 10) M.Vestergaard, K.Kerman, M.Saito, M.Nagatani, Y.Takamura, and E.Tamiya A rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of Alzheimer's Amyloid-beta aggregation, *J.Am.Chem.Soc.* 127, 11892-11893 (2005)