

# 研究報告書

## 「無線・無電極振動子たんぱく質マイクロアレイの創製」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：荻博次

### 1. 研究のねらい

癌やアルツハイマー病などの難病の早期の発見、および、それらに対する創薬プロセスに貢献するための高感度振動子たんぱく質アレイチップ開発を目指す。振動子センサにおいては不可欠と考えられていました電極と配線を使用しない技術を独自に考案・確立し、従来の振動子センサの感度を飛躍的に向上する。一枚のチップ内に多数の測定領域を作り、一度に複数のたんぱく質相互作用をモニタリングするマイクロアレイチップを創製する。さらに、ナノ構造体を振動子とする次世代の超高感度振動子バイオセンサの基礎技術を確立する。

### 2. 研究成果

振動子バイオセンサーは生体分子間の反応をリアルタイムにモニタリングすることができる。振動子表面に固定化したレセプタにより目的たんぱく質を捕捉し、振動子の有効質量を増加させて系の共振周波数の変化量を測定し、吸着物質の定量評価を行うという原理である。標識を一切用いる必要が無いために迅速な計測が可能であり、また、反応過程をリアルタイムにモニタリングすることができるため、たんぱく質間の親和性を定量的に評価することができる(図1)。この原理を考えると、振動子センサの感度の向上は、「同じ質量付加に対していかに大きな周波数変化を得るか」という点に帰着する。質量付加による共振周波数の変化量は振動子の厚さの自乗に

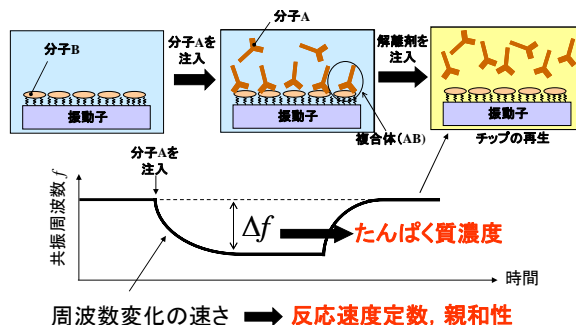


図1 振動子バイオセンサーの原理. 振動子に固定化したレセプタたんぱく質(分子B)に目的たんぱく質(分子A)が吸着すると共振周波数が指数関数的に減少する。減少量・ $f$ から分子Aの濃度を、周波数の減少率(指数係数)から分子AとB間の熱力学的諸量を定量的に決定することができる。

反比例する。つまり、振動子センサの感度を向上させるには、できるだけ薄い振動子を用いれば良いことになる。しかし、従来の振動子ではこれは原理的に困難であった。というのは、有効な電場を与えるために、振動子両面に貴金属電極が成膜されており、さらに金属配線が接続されているからである。比重の大きい貴金属電極は、都合の悪いことに、振動加速度の最も大きい表面に存在し、大きな慣性抵抗を生み出し、発振を妨げる。配線との機械的な接続も振動のQ値を大きく低下させることは言うまでもない。振動子が薄くなるほど、こういった電極と配線の悪影響が顕著になる。この欠点は従来の圧電振動子においては原理的に不可避であり、その結果、検出限界が存在した。

振動子センサの感度限界を打ち破るための最も明快かつ確実なアプローチは「無線・無電極測定」である。つまり、諸悪の根源となる電極と配線を無くせば良い。そこで、我々は高周波平面アンテナによって非接触で圧電振動子の共振周波数を計測する手法を独自に考案し、孤立した水晶振動子を有するバイオセンサーを開発し、感度を3桁向上させることに成功した。さらに、裸の振動子表面にたんぱく質が非特異的

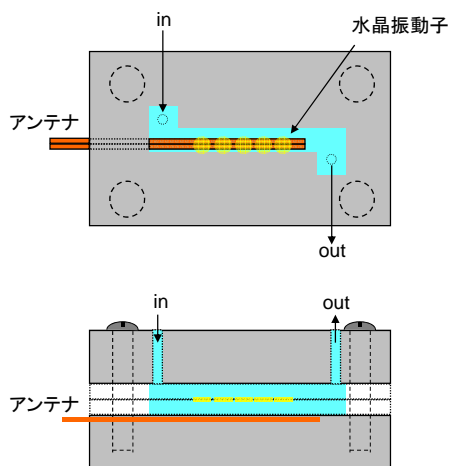


図 2 多チャンネル無線・無電極水晶振動子バイオセンサの概略図。

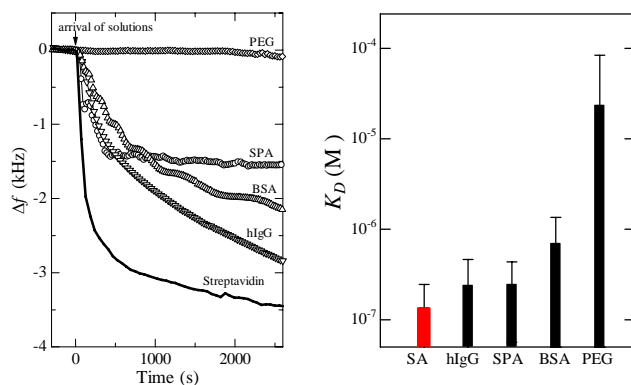


図 3 裸の水晶振動子表面への各種たんぱく質の非特異吸着の様子（左）と水晶-たんぱく質間の解離定数（右）。SA：ストレプトアビジン，hlgG：ヒト免疫グロブリンG，SPA：黄色ブドウ球菌プロテインA，BSA：ウシ血清アルブミン，PEG：ポリエチレングリコール。

に強く吸着することを見出し、水晶振動子を Si ウェーハに内に埋め込んだラムネ型振動子センサを開発し、半永久使用可能なバイオセンサの基礎概念を構築した。

図 2 に多チャンネルの無線・無電極水晶振動子バイオセンサの概略を示す。裸の水晶振動子を直線アンテナ上に配列し、アンテナより電磁場を送り一斉に振動させる。圧電体水晶の振動は、別のアンテナによって圧電効果により受信する。振動子の板厚をわずかに変化させることにより、発振源の振動子を周波数により特定する。アース部は送受信アンテナの中央部に設置するタイプとそれらの対面側のセル壁に埋め込むタイプを開発した。このように、完全に非接触測定が可能であるため、振動子表面には電極や配線を接続する必要が無い。さらに、振動子の全面かつ両面を溶液に浸すことができ、反応面積を増加することができるだけでなく、液圧による振動子の破損を防ぐこともできる。

図 3 は酸で洗浄した裸の水晶表面に様々なたんぱく質溶液をフローさせた際の周波数変化および解離定数  $K_D$  を示している。多くのたんぱく質は水晶表面と高い親和性を示す。特にストレプトアビジンが高い親和性を示し、これを土台としてビオチン化した任意のたんぱく質を固定化することも可能である。

図 4 は、黄色ブドウ球菌プロテイン A (SPA) を非特異的に固定化した水晶振動子を用いてヒト免疫グロブリン G (hlgG) を検出した際の周波数変化を示す。従来の振動子バイオセンサ（黒線）と比較して、新たに開発した無線・無電極振動子バイオセンサ（青線と赤線）の周波数低下量が飛躍的に増加していることが分かる。特に、厚さ  $9.7 \mu\text{m}$  の水晶振動子を用いた基本周波数 170 MHz のバイオセンサにおいては、従来の 1000 倍以上の感度を示す結果となった。

裸の水晶振動子を用いてレセプタたんぱく質を非特異的に吸着させてアッセイを行った場合、強酸等による洗浄によって水晶振動子表面のたんぱく質を全て洗い流すことができ、一つの振動子を用いて何度でもアッセイを繰り返すことが可能となる。この利点を生かして、Si やガラスウェーハに微細流路を作成し、そこに裸の水晶振動子を力学的な拘束を与えることなく埋め込んだ QCM を開発した。我々は、このバイオセンサを「ラムネ Q センサ」(Resonant Acoustic Microbalance with Noncontacting Electrodeless Quartz Sensor: RAMNE-Q Sensor) と呼ぶ。清涼飲料水のラムネのビン内のビー玉が拘束無く設置されており、その表面を沿うように飲料が流れ出ることか

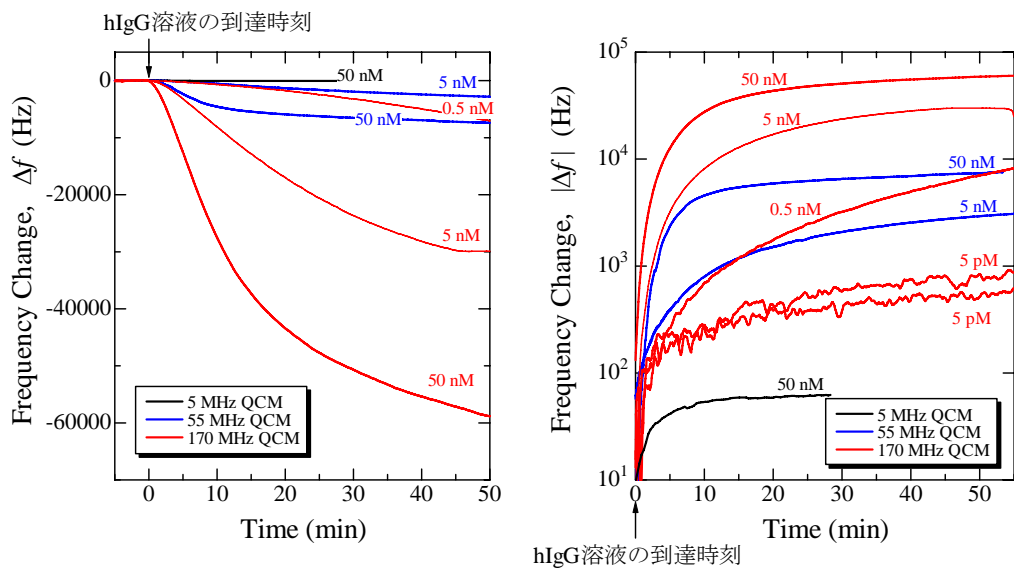


図4 SPA と hIgG 間の結合反応のリアルタイムモニタリング。レセプタとして SPA を非特異的にセンサ表面に吸着させた後、hIgG を含む PBS 溶液を注入した。黒実線は従来の 300  $\mu\text{m}$  厚さの振動子バイオセンサの応答を示す。青および赤実線はそれぞれ 30  $\mu\text{m}$  および 9.7  $\mu\text{m}$  厚さの無線・無電極バイオセンサの応答を示す。右図は周波数変化量の絶対値の対数表示。図中の数値は hIgG の濃度を表す。

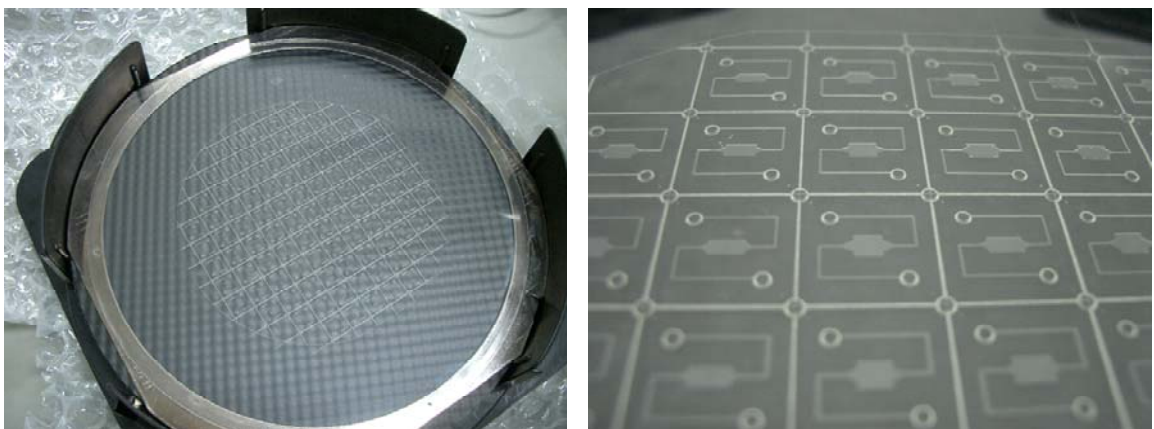


図5 ガラス/Si/ガラス構造からなるラムネ QCM。MEMS プロセスにより大量のセンサチップの作成が可能となる。

らヒントを得た。使い捨てが常識であったバイオチップの分野において、取替え不要のセンサを作成することができる。例えば、図5はSi ウェーハと2枚のガラスウェーハに MEMS プロセスを用いて微細流路を作成し、中央の Si 部に厚さ 9.7  $\mu\text{m}$  の裸の AT カット水晶振動子を設置して、Si 部をサンドイッチするようにこれらを接合したセンサチップである。水晶板は上下より伸ばした微細ピラーにより支持しているが、ピラーの間隙が水晶の厚さよりも大きいため、その間に水晶板が位置することとなり、力学的な負荷を与えていない。外部に設置したアンテナにより内部の水晶を発振させることができる。また、複数のチップを並べて発振させることにより多チャンネル化も

可能となる。このラムネ Q センサを用いて hlgG の検出を行った。最初にプロテイン A を流入して水晶表面に非特異的に固定化し、その後 hlgG 溶液を流入してプロテイン A による hlgG の捕捉を行った。この結果、hlgG 溶液の到達とともに 70 kHz にもおよぶ周波数の低下量が観測され（従来の変化量の 1000 倍以上）、高感度かつ取替え不要のバイオセンサーの基礎モデルとして作動することを確認した。

### 3. 今後の展開

超高感度振動子バイオセンサの開発を目指して、水晶振動子の無線・無電極化を中心に研究開発を行ってきた。その結果、ラムネ Q センサへとたどり着いた。MEMS プロセスを用いたセンサチップの開発が可能であることから、センサチップの更なる小型化、振動子の薄型化も容易に行えるため、本研究で達成した以上の検出感度が期待される。

また、高感度 QCM バイオセンサが A $\beta$  ペプチドの凝集能の定量評価に極めて有効であることが明らかとなったため、系統的な研究をさらに行うことにより、その凝集メカニズムと細胞毒性を明らかにしたい。

さらに、ナノ構造体振動子バイオセンサの確立により、次世代振動子バイオセンサの確立を目指す。

### 4. 自己評価

圧電振動子の無線・無電極化を行うことにより、3桁を上回る感度向上を第一の目的として研究開発を進めたが、厚さ 9  $\cdot$  m 程度の無電極水晶振動子センサを用いることにより、これを可能とした。また、ラムネ Q センサの開発にたどり着き、今後さらなる小型化・高感度化の術を確立し得たと考えている。ただし、生命機能の解明に資するための系統的研究においてはまだ研究遂行中であり、特に、A $\beta$  ペプチドの凝集メカニズムの研究に関しては、今後更なるデータの蓄積と解析を要する。

### 5. 研究総括の見解

水晶振動子の無線・無電極化と薄型化により、当初の目標を十分にクリアする高感度センサの開発に成功したことは大変素晴らしい成果であり、実用的なセンサとして様々な現場で有効活用されることが期待される。ラムネ型 QCM も装置として完成させた点も高く評価出来る。ナノ量の物質を計測する方法は新しい技術として発展することが期待される。一方、感度を上げることによって動特性に影響を与える振動子表面でのタンパク質の状態が重要視されよう。すなわち、相互作用の強さの違う状態を吸着分子数(質量の違い)として見る以外の方法が必要となってくると思われる。特に吸着分子が大きなタンパク質において感度上昇とともに重要になってくると思われる。

多数のセンサを同時に働かせて得られる情報の有効な利用法の開発も必要ではないだろうか。

### 6. 主要な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

• H. Ogi, Y. Fukunishi, T. Omori, K. Hatanaka, M. Hirao, M. Nishiyama, Effects of Flow Rate on Sensitivity and Affinity in Flow Injection Biosensor Systems Studied by 55-MHz Wireless Quartz Crystal Microbalance, Anal. Chem. 80, 5494–5500 (2008).
• H. Ogi, H. Nagai, Y. Fukunishi, M. Hirao, and M. Nishiyama, 170-MHz Electrodeless Quartz Crystal Microbalance Biosensor: Capability and Limitation of Higher Frequency Measurement, Anal. Chem. 81, 8068–8073 (2009).
• H. Ogi, K. Okamoto, H. Nagai, Y. Fukunishi, and M. Hirao, Replacement-Free Electrodeless QCM Biosensor Using Nonspecific-Adsorption of Streptavidin on

	Quartz, Anal. Chem. 81, 4015-4020 (2009).
	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ H. Ogi, Y. Fukunishi, H. Nagai, K. Okamoto, M. Hirao, and M. Nishiyama, Nonspecific-Adsorption Behavior of Polyethylenglycol and Bovine Serum Albumin Studied by 55-MHz Wireless-Electrodeless Quartz Crystal Microbalance, Biosens. Bioelectron. 24, 3148-3152, (2009).</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ H. Ogi, H. Nagai, Y. Fukunishi, T. Yanagida, M. Hirao, and M. Nishiyama, Multichannel Wireless-Electrodeless Quartz-Crystal Microbalance Immunosensor, Anal. Chem. 82, 3957-3962 (2010).</li> </ul>

(2) 特許出願

研究期間累積件数：3件（海外1件、国内2件）

（海外出願）

発明者： 荻博次, 加藤史仁, 平尾雅彦  
 発明の名称： 検出素子  
 出願人： 科学技術振興機構  
 出願日： 2010/12/9

（国内出願）

発明者： 荻博次, 平尾雅彦  
 発明の名称： 検出素子, それを備えた検出装置, 検出素子に用いられる振動子, および検出装置における検出対象物の検知方法  
 出願人： 財団法人大阪産業振興機構, 国立大学法人大阪大学  
 出願日： 2008/12/10

発明者： 荻博次, 加藤史仁, 平尾雅彦  
 発明の名称： 検出素子  
 出願人： 科学技術振興機構  
 出願日： 2010/3/29

(3) 学会発表

学会発表（国際）

- ・ H. Ogi, H. Nagai, Y. Fukunishi, T. Yanagida, M. Hirao, M. Nishiyama, Multichannel High-Frequency Electrodeless Quartz Crystal Microbalance Biosensors, 20th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2010), 2010年5月26日～5月28日 於 Glasgow, UK.
- ・ H. Ogi, T. Kawamoto, N. Nakamura, M. Hirao, and M. Nishiyama, Ultrathin Film Oscillator Biosensors Excited by Ultrafast Light Pulses, 20th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2010), 2010年5月26日～5月28日 於 Glasgow, UK.
- ・ H. Ogi, K. Matsumoto, Y. Fujita, T. Kawamoto, N. Nakamura, and M. Hirao, Ultrathin Pt film oscillator biosensor, The 13th International Conference on Phonon Scattering in Condensed Matter (Phonons 2010), 2010年4月19日

～4月23日 於 Taipei, Taiwan.

学会発表 (国内)

- ・ T. Yanagida, H. Ogi, M. Hirao, M. Nishiyama, M. Koyama, and S. Watanabe, Detection of C-reactive protein with mass-amplified sandwich assay using electrodeless quartz-crystal microbalance biosensor, 第31回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (平成22年12月6日～12月8日, 明治大学駿河台キャンパス) .
- ・ F. Kato, S. Nishikawa, T. Yanagida, H. Ogi, M. Hirao, M. Koyama, and S. Watanabe, Development of a high-frequency electrodeless quartz crystal microbalance chip with a bare quartz resonator encapsulated in a silicon microchannel and its application to a biosensor, 第31回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (平成22年12月6日～12月8日, 明治大学駿河台キャンパス) .
- ・ 加藤史仁, 西川慎太郎, 柳田泰次, 荻博次, 平尾雅彦, ベア水晶内蔵シリコン微細流路タイプ 無線・無電極高周波 QCM センサの開発, 第71回応用物理学会学術講演会 (平成22年9月14～9月17日 於 長崎大学文教キャンパス).
- ・ H. Nagai, Y. Fukunishi, H. Ogi, M. Hirao, and M. Nishiyama, Development of 170-MHz Wireless-Electrodeless Quartz Crystal Microbalance Biosensor, 第30回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (平成21年11月18～20日 於 同志社大学今出川キャンパス寒梅館) .
- ・ Y. Fukunishi, H. Nagai, H. Ogi, M. Hirao, and M. Nishiyama, Systematic research on the dependence of the aggregation behavior of A $\beta$  peptides on the amyloid nuclei using multichannel wireless-electrodeless QCM, 第30回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (平成21年11月18～20日 於 同志社大学今出川キャンパス寒梅館) .

(4) 招待講演

招待講演 (国内)

- ・ 荻博次, 超高感度振動子バイオセンサの創成: 診断・創薬への貢献を目指して, 早稲田大学ナノテクノロジーフォーラム, 未踏・ナノデバイステクノロジー第151委員会研究会 (2010/7/30) .
- ・ 荻博次, ピコ秒超音波による線形・非線形計測: 波長 30nm の超音波非破壊検査, 日本非破壊検査協会 第5回 非線形超音波研究会 (2010/3/9).
- ・ 荻博次, ナノ構造物の共振計測と物性評価およびセンシングへの応用, 日本材料学会 第42回マイクロマテリアル部門委員会講演会 (2008/12/12).