

# 研究終了報告書

## 「量子容量を用いた生化学的界面の計測と制御」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：小野 堯生

### 1. 研究のねらい

固液界面は生体やバイオデバイスの内部に普遍的に存在するにもかかわらず、アクセスする方法は極めて限られている。本研究では、単原子層の炭素薄膜である2次元量子材料グラフェンを用いて、界面の実時間計測と制御を実現する。

本研究は、グラフェン固有の物性に支えられている。①2次元材料グラフェンは全原子が表面に露出し、全材料中で最高の比表面積を持つ。また②炭素材料のため、電位窓が広く水中で安定である。よって、溶液中の検出対象はグラフェン表面にほぼ距離ゼロで接触し、半導体的な性質を持つグラフェン中に効率的にキャリアを誘起できる。③グラフェンは既知の材料中で最高水準のキャリア移動度を持つ。よってグラフェンは、検出対象が誘起するキャリアの変調を、極めて大きなチャンネル電流変化に変換できる。これらのユニークな物性を併せ持つグラフェンセンサーを用いて、界面を計測し制御する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究で設定したゴールは概ね達成できた。

まず、2次元材料向けのプロセスの構築に成功し、研究に適した清浄で規格化された界面を再現性良く構築することを可能にした。これを基盤に研究を進めた。また、溶液の組成を任意に制御・把握することも可能にした。さらに、界面を計測するためにグラフェン上に修飾するピレニル基を持つ分子を選定した。上記を通じ、グラフェンと分子の性状を詳細に制御・把握した上で界面の構築と計測に成功した。さらに研究を進め、計測結果をシミュレーションすることにも成功した。シミュレーション結果は実験結果とかなりよく整合しており、シミュレーションに基づいて実験系を設計することも可能になった。

界面における生化学反応の計測では、インフルエンザウイルスがヒト細胞に感染した際に生じる、ウイルス酵素ノイラミニダーゼが細胞表面のシアロ糖鎖を分解する反応を計測した。まずグラフェン上にシアロ糖鎖を修飾し、その末端シアル酸(負電荷を持つ)を、電氣的計測と液中AFM計測の2つの手法で評価した。2つの計測結果はよく整合しており、界面の状態をよく把握できた。ここにノイラミニダーゼを導入して、末端シアル酸の分解を電氣的に計測した。

以上を通じて、2次元材料を用いた界面の計測に成功し、反応場としての界面を研究するための、理論と実験の両輪を揃えることができた。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A「界面計測の基盤の確立」

まず研究の基盤を整えるため、グラフェンを含む界面を対象としたプロセスの構築を試み

た。本研究においては、グラフェンの清浄表面を溶液に露出させることが重要であるが、2次元材料であり表面が全体であるグラフェンに対しては、従来半導体微細加工プロセスで洗練されてきた洗浄方法をそのまま適用することはできない。2次元材料を用いた界面研究のための新たなプロセスが必要だった。グラフェンの品質向上(図1)、転写技術の改良、洗浄技術の開発の結果、清浄で規格化された界面を再現性よく構築可能になった(図2)。

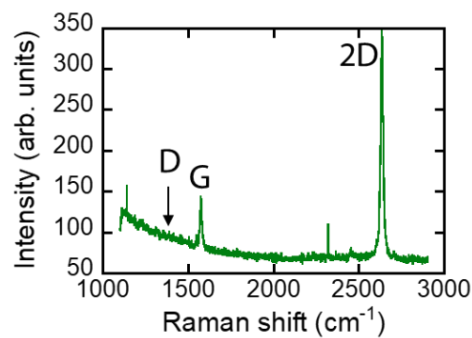


図1：グラフェンのラマンスペクトルは、品質の均一性を示す鋭いG, 2Dピークを示した。また2D/Gピーク強度比も2を大きく上回り、単層グラフェンの合成を示した。さらに、グラフェン欠陥由来のDピークは全く観測されず、欠陥の極めて少ないグラフェンが合成できていることを示した。

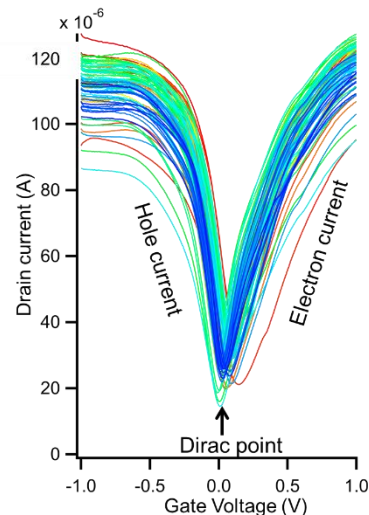


図2：作製したグラフェンランジスタアレイの伝達特性。 $I_d$ - $V_g$ カーブの揃った均質な界面を得られた。

### 研究テーマB「界面の計測と制御」

研究テーマAに続き、グラフェン上の溶液に着目した。まず、適切な溶液系を探索し、広い範囲のpHを調製可能な、くえん酸(citric acid, CA)、ビス-トリスプロパン(bis-tris propane, BTP)の混合液であるCBTP緩衝液を見出した。CAとBTPの混合比を変えてpH2.6~10.0までの幅広いpHを調整できるようになった。こうした工夫により、グラフェンと溶液を合わせて界面を制御しながら計測することが可能になった。計測した結果はシミュレーションとも良好に整合しており、実験系の合理的設計にも道を拓いた。

### 研究テーマC「界面での生化学反応計測」

界面における酵素反応(ノイラミニダーゼ反応)の実時間計測を行った[論文1]。まず、ノイラミニダーゼの反応基質シアロ糖鎖をグラフェン上に修飾し、その計測を行った。計測結果は液中AFM計測からも裏付けられた。次に、ノイラミニダーゼを導入し、シアロ糖鎖末端がノイラミニダーゼ反応に伴ってグラフェン上から解離するのを電氣的に計測した。シアル酸脱離に伴う指数関数的な変化が示され、ノイラミニダーゼ反応の高精度な実時間電気計測に成功した。この指数関数的な変化は、ノイラミニダーゼ濃度やミカエリス定数より十分小さな基質濃度が刻々変化するとした時の基質濃度変化を反映していると考えられる。この結果をさらに詳細に分析するには、まず研究テーマBをさらに発展させて、糖鎖や酵素を含む界面の状態をより詳細に

把握する必要がある。

### 3. 今後の展開

本研究は、さきがけ研究とは別に企業らと進めているグラフェンバイオセンサーの開発に有用な知見を既にもたらししており、センサー社会実装への取り組みを加速している。まずはセンサー作製プロセスの開発などに繋がるが、5年内には、さらに踏み込んだ成果の応用が可能と考えており、同時期にセンサーそのものの社会実装も達成できると考えている。

グラフェンバイオセンサー以外の領域への適用は、より時間を要するが、特に創薬応用を期待している。2・3年内にこのような応用のきっかけを示したい。

本研究で開発された汎用的な手法は、いくつかの実例を提示すれば、研究の裾野が広がり、将来的な波及効果は大きいと考える。

### 4. 自己評価

当初設定した本研究のゴールは概ね達成できた。一方で進め方には反省がある。さきがけと別途に進めているグラフェンバイオセンサーとの親和性の高さ、共通する要素の多さから、ノイラミニダーゼ反応計測を早い段階で進め、興味深い結果を計測できた。しかし生化学反応の複雑性から、結果の原因を掘り下げるのが困難であったため、より単純な系での概念実証に注力する方向に、途中で方針転換した。ここまで時間に要したため、当初からより単純な系に重点を置くべきだったかもしれない。ただ、特に界面のシミュレーションは、ここ1・2年、周囲でシミュレーションが盛んになった結果実現できた側面もあり、早期に研究を進めて実現できていたかは判断が難しい。また、さきがけ研究で構築したグラフェンプロセスは、既にグラフェンバイオセンサー開発に適用しており、社会実装には近い位置にある。元々、さきがけ研究の社会実装はバイオセンサー応用をきっかけにする考えだったため、企業とも連携して、成果は随時実装を進めていく。

他、研究実施体制では、技術補佐員の採用がコロナ禍で思うに任せなかったが、採用できた補佐員は期待以上の働きをしてくれた。予算執行については、当初想定していた装置は揃い、より進んだ検討のための装置も導入できた。

本研究は、界面計測の概念実証であり、具体的な社会実装の萌芽となるものだが、今後の発展の最初のきっかけを作ることができたと考えている。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 15件

1. Takao Ono, Kaho Kamada, Ryota Hayashi, Alba Rosa Piacenti, Calum Gabbutt, Nongluk Sriwilaijaroen, Hiroaki Hiramatsu, Yasushi Kanai, Koichi Inoue, Shin-ichi Nakakita, Toshio Kawahara, Yutaka Ie, Yohei Watanabe, Yasuo Suzuki, Sonia Antoranz Contera, and Kazuhiko Matsumoto, "Lab-on-a-graphene-FET detection of key molecular events underpinning influenza virus infection and effect of antiviral drugs", *BioRxiv* (2020) doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.996884>.

インフルエンザウイルスが感染細胞内で増殖した後、他細胞に感染を広げる時、細胞表面の

シアロ糖鎖を酵素ノイラミニダーゼ(NA)が切断し、感染細胞から離れていく。これを阻止すれば感染拡大を抑止できるため、多くの抗ウイルス薬がNA阻害剤である。シアロ糖鎖の切断部位が負電荷を持つことを利用し、シアロ糖鎖を修飾したグラフェン電界効果トランジスタ(G-FET)でNA反応を実時間計測し、NA阻害剤(リレンザ®)の薬効評価に成功した。G-FET表面でウイルス関連分子が形成する興味深い階層構造も、液中AFM観察により見出した。

2. Naruto Miyakawa, Ayumi Shinagawa, Yasuko Kajiwara, Shota Ushiba, Takao Ono, Yasushi Kanai, Shinsuke Tani, Masahiko Kimura, Kazuhiko Matsumoto, “Drift Suppression of Solution-Gated Graphene Field-Effect Transistors by Cation Doping for Sensing Platforms”, *Sensors* (2021) **21**, 7455.

グラフェンの電気特性は、電解質溶液中で経時的に変化(ドリフト)することが多く、計測上の問題となっているが、原因は特定されていない。グラフェン上のポリマー残渣やグラフェン/基板間に、溶液中のカチオンが徐々に浸透し、グラフェンのpドーピングをゆっくりと打ち消すためにドリフトが生じると仮説を立て、十分なカチオンを測定前にドーピングしたところ、ドリフトを96%低減できた。特許1を申請中。

3. Yuka Oka, Shota Ushiba, Naruto Miyakawa, Madoka Nishio, Takao Ono, Yasushi Kanai, Yohei Watanabe, Shinsuke Tani, Masahiko Kimura, Kazuhiko Matsumoto, “Ionic strength-sensitive and pH-insensitive interactions between C-reactive protein (CRP) and an anti-CRP antibody”, *Biophysics and Physicobiology* (2022) **19**, e190003.

界面のイオン濃度及びpHによる生化学反応系への影響を、C反応性たんぱく質の抗体への結合反応を用いて調べた。その結果、pH5.9から8.1の範囲ではpHの変化に対して親和性は鈍感であったが、イオン強度の低下によって結合親和性は有意に減少した。CRPとCRP抗体はともに当該pH領域で負に帯電しており、イオン強度が低下すると、抗原抗体間の反発力が著しく増大することがわかった。これは界面上での反応系の理論構築に示唆を与える。

## (2)特許出願

研究期間全出願件数: 2件

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 【主要な学会発表】

- The 23th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2019), 2019/10/30, 口頭発表採択率 8.7%, 発表題目: ELECTRICAL DETECTION OF PATHOGENS BEYOND THE LIMITATION OF DEBYE SCREENING USING GRAPHENE FIELD-EFFECT TRANSISTORS IN MICRODROPLETS 発表者: Takao Ono, Yasushi Kanai, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin-ichi Nakakita, Toshio Kawahara, Yasuo Suzuki, Matsumoto Kazuhiko

### 【受賞】

- 大阪大学賞 若手教員部門, 2020年11月26日、受賞業績「グラフェンを基盤とした生化学

## 反応計測の研究」

### 【報道】

- 「産研探訪 ～多彩な研究陣に会う～ 第10回」、2019年10月23日、産研ニューズレター 第67号 pp.4-5
- 「大阪大がグラフェンやフレキシブル有機エレなど最新の成果発表」、2020年6月26日、電波新聞 12面

### 【招待講演】

- 新世代研究所 2019年度第1回界面ナノ科学研究会, 2019年10月11日、発表題目: 「界面近傍で生じる生化学反応の2次元ナノ材料を用いた計測」
- 8th imec Handai International Symposium, 2019年11月13日, “Lab-on-a-graphene-FET: a two-dimensional assay platform for biochemical reactions”