

ペプチドマトリックス界面を利用した 超高感度VOC検出バイオエレクトロニクスデバイスの開発

Development of Ultra-Sensitive VOC Detection Bioelectronic Device Using Peptide Matrix Interface

M21助自68

代表研究者 田 中 祐 圭 東京工業大学 物質理工学院 准教授
Masayoshi Tanaka Associate Professor, Department of Chemical Science & Engineering,
Tokyo Institute of Technology

共同研究者 早 水 裕 平 東京工業大学 物質理工学院 准教授
Yuhei Hayamizu Associate Professor, Department of Material Science & Engineering,
Tokyo Institute of Technology

Peptides are promising probes for sensor development, while the screening for volatile organic compound (VOC) binding remains a challenge. In this study, the peptides binding to nonanal and benzaldehyde were screened from a phage display library and peptide array respectively. Several peptide sequences found the binding activity with these target molecules. The nonanal binding in the gas phase was also confirmed using a candidate peptide-immobilized ZnO nanowire structure. In addition, a peptide with benzaldehyde binding property was conjugated with a graphene binding peptide and self-assembled onto GFET sensor. The real-time response of peptide-GFET sensor to benzaldehyde molecule was observed as a change in drain current (ΔI). Interestingly, the sensor displays sensitive detection to benzaldehyde at pico-molar range. In conclusion, we developed a screening technique to isolate a VOC targeting peptide. By employing the peptide-modified GFET sensor, we also proposed a real-time VOC sensor for highly sensitive and selective detection of benzaldehyde.

研究目的

近年、揮発性低分子有機化合物 (VOC) の超高感度センシング技術の開発は、環境モニタリングだけでなく、食物の品質管理や医療応用など幅広い用途への展開が期待されている。一方で、ガスクロマトグラフィーなどの既存のVOCセンサは、リアルタイム検出、小型化、超高感度化などの検査ニーズに応えることができていない。そこで本研究では、標的認識分子の設計技術と2次元原子薄膜上でのバイオセンシング技術を融合することで、検査ニーズに

応えた超高感度バイオエレクトロニクスVOCセンサを創出することを目的とする。ここでは、シックハウス症候群の原因物質であるノナールなどのアルデヒド系分子を中心に研究を進める。本研究によりVOCを超高感度検出できるセンサを開発できれば、例えば車載されるストレスセンサや住居リスク評価、疾病診断、体調の常時高感度モニタリング技術など様々なイノベーションが生み出されるものと期待される。

概 要

近年、揮発性低分子有機化合物 (VOC) の超

高感度センシング技術の開発は、環境モニタリングだけでなく、食物の品質管理や医療応用など幅広い用途への展開が期待されている。それを受けてMEMSなどの半導体製造技術を用いた様々な標的に対する小型デバイスの開発が進んでいる。一方で、ガスクロマトグラフィーなどの既存のVOCセンサは、リアルタイム検出、小型化、超高感度化などの検査ニーズに応えることができていない。そこで本研究では、標的認識分子の設計技術と2次元原子薄膜上でのバイオセンシング技術を融合することで、検査ニーズに応えた超高感度バイオエレクトロニクスVOCセンサを創出することを目的とする。まずシックハウス症候群などの原因分子であるVOCの一つであるノナナールに結合するペプチドを探索し、これをZnOナノワイヤアレイの表面に修飾することでノナナールを効率的に捕捉できる機能性材料を開発した。さらに、これまでに同定している他のアルデヒド系分子であるベンズアルデヒド結合性ペプチドを用いたグラフェン電界効果トランジスタ(GFET)センシングを実施し、超高感度にVOCを検出できることが示された。より具体的には以下の研究成果が得られた。

1) ノナナール結合ペプチドの探索

ノナナールを化学修飾した基板を調製し、これに対してファージディスプレイライブラリーを用いることで、ノナナールに結合するペプチドを探索した。洗浄条件などさまざまな条件検討を行うことで、ノナナール結合性ペプチド候補配列を一つ取得した。

2) ZnOナノワイヤアレイの合成とペプチド修飾

同定されたペプチドを用い、ノナナールを効率的に捕捉するためにZnOナノワイヤアレイを合成し、その表面をノナナール結合性ペプチ

ドで修飾した。合成されたナノワイヤアレイの表面積は、基板1 mm²あたり約20 mm²であることが示され、さらに候補ペプチドの修飾密度は69.1 pmol/mm²であった。

3) ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用いたノナナールの捕捉

上記で合成されたノナナール結合性ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用い、気相中のノナナールを捕捉し、GC-MSを用いて定量したところ、ネガティブコントロールであるアラニンが4残基連結したペプチドに対して約8.3倍の結合量を示した。これにより、ここで開発されたペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイがVOCであるノナナールを効率的に捕捉できる有用な機能性材料であることが示された。

4) ペプチドを利用したベンズアルデヒドのGFETセンシング

これまでの研究で同定されてきたベンズアルデヒド結合性ペプチドを利用したGFETセンシングについても検討を進めた。ベンズアルデヒド結合ペプチドとグラフェン結合ペプチドを連結した二機能性ペプチドを調製し、これをグラフェン表面に滴下することで表面を機能化し、異なる濃度のベンズアルデヒドに対する応答性評価をもとに乖離定数を評価した。その結果、ベンズアルデヒドとの乖離定数が数pMであることが示され、非常に優れた結合親和性をもつことが示された。

本研究によりZnOナノワイヤを用いた微細加工によるVOCの濃縮、そして小型化が容易なセンシング技術であるGFETへの適用可能性が示されたことは、今後VOCを携帯可能なレベルでの小型センサを利用したリアルタイム検出の足がかりとなる研究成果である。そのため今後ますます健康、安全などに関わるセンシング

技術の開発が求められる中で、本研究によって得られた成果は非常に波及効果が大きく、更なる研究の発展が強く期待される。

本文

1. はじめに

近年、揮発性低分子有機化合物 (VOC) の超高感度センシング技術の開発は、環境モニタリングだけでなく、食物の品質検査、危険物探知、疲労・ストレスマーカー、医療応用など幅広い用途への展開が期待されている^[1]。一方で、ガスクロマトグラフィーやイオンモビリティ質量分析装置などの既存のVOCセンサは、リアルタイム検出、小型化、超高感度化などの検査ニーズに応えることができていない。

電解効果型トランジスタ (FET) センサに用いられる電極表面では、溶液内のイオンが引き寄せられデバイ長と呼ばれる10 nm程度の範囲で電位の傾きを生じる。FETセンサでは、この領域内に捉えた標的分子による電位の変化により高感度センシングが可能となる^[2,3]。そのため、グラフェンなどの電極表面に修飾される標的認識分子のサイズが、センサ感度の向上に重要である。一方で、最も一般的に利用される標的認識分子である抗体は、分子サイズが10-15 nm程度と大きいことから、既存の界面分子設計ではグラフェンがもつ優れた導電性を最大限活かしたセンシングを実現できない。そのため、抗体と同等の標的認識能を有し、抗体よりもサイズの小さい分子設計が可能となれば、超高感度バイオエレクトロニクスセンサの創出が期待される。

そこで本研究では、標的認識ペプチド分子の設計技術と2次元原子薄膜上でのバイオセンシング技術を融合することで、検査ニーズに応えた超高感度バイオエレクトロニクスVOCセンサを創出することを目的とした。ここでは特に、

シックハウス症候群の原因物質として知られる、ノナナールやベンズアルデヒドなどのアルデヒド系分子を中心に研究を実施した。

2. 方法

1) VOC結合ペプチドの探索

ノナナール結合性ペプチドを探索には、ファージディスプレイライブラリー (NEW ENGLAND BIOLABs, Phage display library kit) を用いた。まずカバーガラスをMilliQ、エタノールで2回ずつ洗浄し70℃で1 h乾燥させた。次に70%エタノール中に0.1 Mの濃度となるようにノナナールを溶解し、洗浄したカバーガラスの上に400 μ lスポットし、ガラス表面全体に引き伸ばした。その状態で30分間静置し、エタノールの蒸発とともにノナナールを吸着させた。それに対して、7残基のランダムペプチドを提示しているファージ溶液を滴下し、60分静置後に、Tris buffered saline (TBS, pH7.4) により6回洗浄し、Gly-HCl buffer (pH2.6) を500 μ lをスポットし、20分間静置することで強固にノナナール修飾基板に吸着したファージを回収した。ファージDNAを回収しDNA配列を取得することで、ノナナール修飾基板に高い結合能をもつペプチド配列を同定した。

2) ZnOナノワイヤアレイの合成とペプチド修飾

シリコン基板上にスパッタリングによってTi薄膜、Au薄膜、ZnO薄膜を順に形成し、完全に風乾させた後、窒素ガスによって不純物を除いた。その後、0.9%のポリエチルイミン、6 mMヘキサメチレンテトラミン (HMTA)、24 mM硝酸亜鉛六水和物をMilliQに溶解させた反応液に基板を浸漬し、ナノワイヤアレイを伸長させた。伸長したナノワイヤアレイは、走査型電子顕微鏡 (SEM) により性状を観察し、その表面積を算出した。

ここで合成されたZnOナノワイヤアレイを1で同定されたノナナール結合性ペプチドを修飾した。具体的には以下に示すスキームによって実施した(図1)。3-aminopropyl-tri-ethoxysilane (APTES, 1%)を調製し、15分間超音波攪拌を行い、その後ZnOナノワイヤアレイ基板を浸漬し、30分間反応させた。反応後、MilliQに一回ディップし、100℃で1時間加熱し焼結した。その後基板をMilliQ、エタノールでそれぞれ2回洗浄し、70℃で一晩乾燥させた。

アミノ基修飾した基板に対し、ペプチド溶液(5 mM in DMF)、HBTU 10 mM、DIEA 20 mM、となるよう各試薬を溶解させ、アミノ基修飾したZnOナノワイヤアレイ基板を浸漬させ2時間反応させた。反応後、DMF、メタノールでそれぞれ4回洗浄し、風乾させた。

主鎖を保護するFmoc基は、20%piperidineに50分間浸漬させることで脱保護した。脱保護した溶液は回収し、301 nmでの吸光度を測定することで、修飾されたペプチドの量を定量した。

3) GC/MSによるペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイのノナナール捕捉量定量測定

作製したペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイのノナナール捕捉能を確かめるために、飽和ノナナール蒸気(p=49.3 Pa)に5分間暴露し、その捕捉量をGC/MSで定量することによりペプチド修飾前後でのノナナール捕捉量を定量的に比較した。バイアル瓶中に針金で籠を作り、ペ

プチド修飾基板を籠の内部に入れ、バイアル瓶に液体のノナナールを加えることにより、飽和ノナナール蒸気にペプチド修飾ナノワイヤアレイ基板を暴露した。その後、400℃で20分加熱することで吸着したノナナールを脱離させ、気相内にあるノナナールをGC/MSにより計測した。

4) ペプチドを利用したベンズアルデヒドのGFETセンシング

GFETを用いて、ペプチドの結合特性を評価した。グラフェンは熱化学気相合成法により合成された単層グラフェンを使用し、リソグラフィ技術によりマイクロ電極を接触させることで、電気伝導を測定した。このGFETを電気化学セル中に設置することにより、グラフェンに適宜電圧を印加することが可能となる。GFET表面に自己組織化的にペプチドを修飾し、ベンズアルデヒドの結合応答をグラフェンの電気伝導率の変化をもとにリアルタイム測定した。標的分子に対する電気伝導率の速度論的な解析に加えて、標的分子の濃度依存性(1 pM～10 nM)から結合特性を定量的に評価した。

3. 主な研究成果

1) ノナナール結合ペプチドの探索

ノナナール修飾基板に対して、ファージディスプレイライブラリーを用いたところ、今回解析した24クローンのうち、全ての配列がペプチドXであった。この配列Xは分子内に酸性アミノ酸も塩基性アミノ酸も持たず、分子内での構造を取りにくい、比較的自由度の高い疎水性な物性を持っていることが考えられた。今回標的とするノナナールは疎水性の強い炭水素鎖の部分と、極性及びマイナスチャージが強いアルデヒド基を有している。そのため結合部位としては、ノナナールの分子サイズ(約アミノ酸3残基)程度の疎水性の高い領域に対し

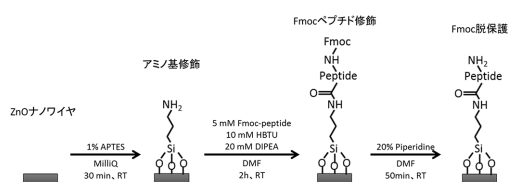


図1 ZnOナノワイヤアレイへのペプチド修飾方法

て結合していると考えられる。今回の配列Xのうち、N末端側にこのような特性に該当する領域があることから、この部位がノナナール結合領域であると考えられた。

2) ZnOナノワイヤアレイ合成とペプチド修飾

合成されたナノワイヤアレイのSEM画像からナノワイヤの直径と長さを算出したところ、それぞれ平均すると直径約500 nm、長さ約7 μm と見積もられた。そこから算出される表面積は、基板1 mm²あたり約20 mm²である。このことから、ナノワイヤアレイ基板を用いることにより、ノナナール捕捉量が平板と比べて最大で20倍に向上する可能性が見込まれるが、現実にはナノワイヤアレイ間のスペースは物質移動が制限され、反応効率が低下すると考えられる。

ここで得られたナノワイヤアレイにペプチドXを修飾し、その密度を算出したところ、69.1 pmol/mm²であった。これは平面ガラス基板を用いた際の修飾密度11.2 pmol/mm²と比較して約5倍の密度であった。これによりナノワイヤ構造により表面積を増加させることで単位面積あたりのペプチド修飾密度を向上できることが示された。一方で表面積としては20倍あるのに対して、修飾密度の向上は6倍程度であった。これは、ナノワイヤアレイ上部には比較的大きな間隙が存在するのに対し、根元付近では非常に密になっており、ペプチドなどの分子の物質移動が制限され、修飾効率が低下している可能性がある。ペプチドの分子サイズは、7残基ペプチドで1.5 nm程度であり、今回使用したナノワイヤアレイの間隙と比較すると十分小さな分子であるが、ナノワイヤ表面には活性点(アミノ基)が無数に存在している点、静置して反応させていることから、物質移動が拡散による点を考慮すると、ナノワイヤ下部には未反応点がかかり存在する可能性がある。より

ペプチド修飾密度の向上が求められた場合は、この辺りの検討が必要と考えられた。

3) ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用いたノナナールの捕捉

ノナナール結合候補ペプチドX及びコントロールペプチドAAAAを修飾したZnOナノワイヤアレイ基板を加えて、ノナナール吸着量の評価をGC-MSを用いて行った。

その結果、ペプチド配列Xを修飾したZnOナノワイヤアレイ基板では、ノナナール捕捉量がネガティブコントロールであるAAAA修飾基板に対して8.27倍向上することが示された(図2)。従来行われてきた芳香族化合物検出や、アルコール類や酢酸、アンモニアといった極性の強い小分子の検出のみならず、疎水性が強く特徴的な官能基の少ない揮発性有機物に対しても特定のアミノ酸配列を有するペプチドを分子認識プローブとして利用することで、デバイスの捕捉・濃縮効率を高めることが可能であることを示すものである。

4) ペプチドを利用したベンズアルデヒドのGFETセンシング

これまでに同定してきたベンズアルデヒド結合性ペプチドを利用したGFETセンシングについて

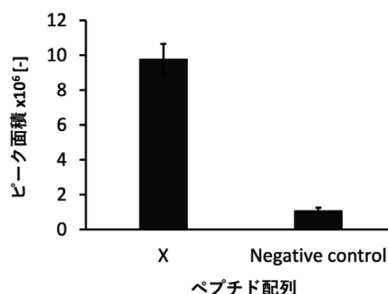


図2 ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用いたノナナールの捕捉

も検討を進めた。今回用いたペプチド配列Yとグラフェン結合配列を連結した二機能性ペプチドを調製し、これをグラフェン表面に滴下することで表面を機能化し、異なる濃度のベンズアルデヒドに対する応答性評価をもとに乖離定数を評価した。その結果、ベンズアルデヒドとの乖離定数が数pMであることが示され、非常に優れた結合親和性を保つことが示された。また1 pMのベンズアルデヒドに対しても応答が得られており、ベンズアルデヒドを超高感度に検出できるセンシング技術を開発することができた。

4. まとめ

本研究により、これまでに報告例の非常に乏しいVOCに対するペプチドプローブを探索する方法を確立し、同定されたペプチドを用いることで気相のVOCを濃縮回収できること、そしてGFETセンサ表面を修飾することでVOCを超高感度に検出できることが確認された。今後は、標的選択性の評価、そしてこれまでに研究を進めているペプチドマトリックス構造を利用することによる結合親和性、選択性の向上に向けた研究開発が進められることが期待される^[4]。また本研究により微細加工によるVOCの濃縮、そして小型化が容易なセンシング技術であるGFETへの適用可能性が示されたことは、今後VOCを携帯可能なレベルでの小型センサを利用したリアルタイム検出の足が

りとなる研究成果である。そのため今後ますます健康、安全などに関わるセンシング技術の開発が求められる中で、本研究によって得られた成果は非常に波及効果が大きく、更なる研究の発展が強く期待される。

参考文献

- [1] *Chem Soc Rev.* 2020;49 (17) :6364-401.
- [2] *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132 (51) :18012-3.
- [3] *Biosens. Bioelectron.* 2019;1 (1) :100016.
- [4] *Biosens. Bioelectron.*, 2020;153:112030.

今後の研究の見通し

本研究により、VOC結合性ペプチドプローブの探索法を確立し、得られたペプチド3次元ナノ構造体であるナノワイヤアレイに修飾することで、効率的に気相のVOCを濃縮回収できること、そしてGFETセンサ表面を修飾することでVOCを超高感度に検出できることが確認された。今後は、標的選択性の評価、そしてこれまでに研究を進めているペプチドマトリックス構造を利用することによる結合親和性、選択性の向上に向けた研究開発が進められることが期待される。また本研究により微細加工によるVOCの濃縮、そして小型化が容易なセンシング技術であるGFETへの適用可能性が示されたことは、今後VOCを携帯可能なレベルでの小型センサを利用したリアルタイム検出の足がかりとなる研究成果である。そのため今後ますます健康、安全などに関わるセンシング技術の開発が求められる中で、本研究によって得られた成果は非常に波及効果が大きく、更なる研究の発展が強く期待される。

本助成金による主な発表論文、著書名

第74回日本生物工学会大会

Date: 2022/10/20

Title: Investigation of olfactory mimetic peptide functionalized graphene field effect transistor for sensitive

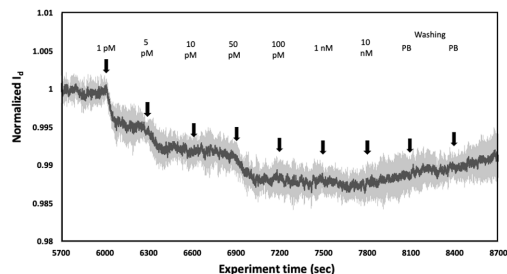


図3 ペプチド修飾GFETを用いたベンズアルデヒド検出

and selective limonene sensing

Authors: Tharatorn Rungreunthanapol¹, Chishu Homma¹, Masayoshi Tanaka¹, Yoshiaki Sugizaki², Hideyuki Tomizawa², Atsunobu Isobayashi², Yuhei Hayamizu¹ and Mina Okochi¹

Affiliation: ¹Tokyo Institute of Technology, ² Toshiba corporation

2022年度生物学若手研究者の集い

Date: 2022/05/27

Title: Investigation of olfactory mimetic peptide functionalized graphene field effect transistor for sensitive and selective limonene sensing

Authors: Tharatorn Rungreunthanapol¹, Chishu Homma¹, Masayoshi Tanaka¹, Yoshiaki Sugizaki², Hideyuki Tomizawa², Atsunobu Isobayashi², Yuhei Hayamizu¹ and Mina Okochi¹

Affiliation: ¹Tokyo Institute of Technology, ² Toshiba corporation

2022電気化学会第89回大会

Date: 2022/03/15

Title: Olfactory receptor derived peptide-based graphene field effect transistor sensor for highly sensitive limonene detection

Authors: Tharatorn Rungreunthanapol¹, Chishu Homma¹, Masayoshi Tanaka¹, Yoshiaki Sugizaki², Hideyuki Tomizawa², Atsunobu Isobayashi², Yuhei Hayamizu¹ and Mina Okochi¹

Affiliation: ¹Tokyo Institute of Technology, ² Toshiba corporation

The 26th Symposium of Young Asian Biological Engineers Community

Date: 2021/11/20

Title: Limonene detection by insect olfactory-mimetic peptide coupled graphene field effect transistor

Authors: Tharatorn Rungreunthanapol¹, Chishu Homma¹, Masayoshi Tanaka¹, Yoshiaki Sugizaki², Hideyuki Tomizawa², Atsunobu Isobayashi², Yuhei Hayamizu¹ and Mina Okochi¹

Affiliation: ¹Tokyo Institute of Technology, ² Toshiba corporation