

細菌の走化性システムを利用する超高感度・ マルチセンシング可能なバイオセンサの開発

Development of Highly Sensitive Biosensor for Multiple Amino Acid Sensing Using Bacterial Chemotaxis

2157016



研究代表者	東北大学大学院医工学研究科	博士後期課程	分 部 寛 道
共同研究者	東北大学大学院医工学研究科	教 授	田 中 徹

[研究の目的]

近年のメタボロミクスの隆盛により血液中アミノ酸をバイオマーカーとして利用することが注目されており、血中や尿中のアミノ酸の組成変化を調べることで病気の有無や病態の進行度合いを評価する手法が開発されている。病院での日常的な検体検査や家庭での健康管理への利用の観点から、このようなアミノ酸組成を調べる手法として高価な測定機器を必要とせず、迅速かつ簡便に測定が行える検査システムが求められている。本研究では、細菌の持つ走化性システムを利用したマルチセンシング可能な高感度アミノ酸バイオセンサの開発を行い、医療システムの土台を支える患者近辺での検査システム (Point of Care Testing, POCT) の構築に貢献することを目的とする。

[研究の内容, 成果]

1. 脂質二分子膜 FET センサによるアミノ酸検出の原理

細菌は自身の生存に好ましい環境に向けて移動する走性と呼ばれるシステムを有し、特に化学物質に対する走性を走化性という。細菌の運動能はらせん状のべん毛を回転させることで得ており、栄養素などの誘引物質に対しては順回

転により直進遊泳、金属イオンなどの忌避物質に対しては逆回転により方向転換を行う。細胞膜に存在する受容体がこれらの反応を引き起こす対象となる化学物質 (走化性物質) を感知すると、その情報は細胞内シグナル伝達により増幅され、べん毛の基部に存在するべん毛モーターに伝わり、べん毛モーターを通じて細胞内に流入するプロトンと共役し回転方向を切り替える。すなわち走化性システム自体が信号増幅/変換を備えた一つの化学センサであると言える。たとえば大腸菌のアスパラギン酸受容体 Tar のアスパラギン酸に対する解離定数 K_d の値は $\sim 1 \mu\text{mol/L}$ であるが、菌はわずか $\sim 30 \text{ nmol/L}$ の濃度にも応答し、かつ非常に広いダイナミックレンジを有する^[1]。さらに細菌の中には多種多様な受容体が存在し、例えばコレラ菌はチロシンを除く 19 種のアミノ酸に対する受容体が確認されている。そこで誘引/忌避応答の結果起きる脂質二分子膜内へのプロトン流入を捉えることで走化性物質であるアミノ酸の高感度な検出が可能になると考えられる。

さらに本研究では POCT 対応の観点から、高速応答と高集積化が可能なイオン感応型電界効果トランジスタ (ISFET) をベースにしたバイオセンサを開発する。ISFET は金属-酸化物-半導体接合電界効果トランジスタ (MOSFET) のゲート電極を取り払いイオン感

応膜を被膜したもので、測定溶液中のイオンなどの荷電物質を検出することができるセンサである。以上の点を踏まえ、本研究で提案する細菌の走化性システムを利用したFETセンサの概要を図1に示す。

ISFETゲート酸化膜上に高分子材料(SU-8)による微小な井戸構造(マイクロウェル)を形成する。この開口部に脂質二分子膜を形成し、単一のアミノ酸受容体を持つ走化性システム(膜タンパク質)を再構成することで対象アミノ酸の到来に伴うプロトン流入の開始・停止をISFETにより検出し、アミノ酸のセンシングを行う。

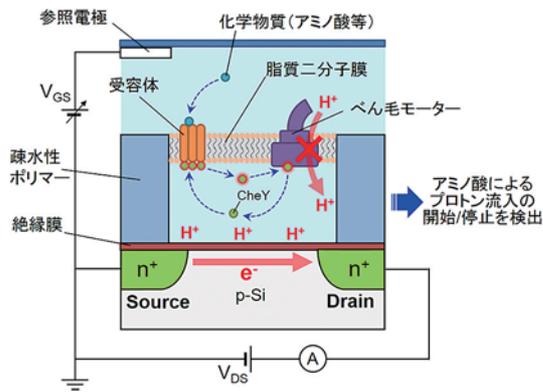


図1 脂質二分子膜FETセンサによるアミノ酸検出

2. ISFET上へのマイクロウェルアレイ形成と電気特性評価

市販のISFETを使用し、感光性ポリマーであるSU-8を用いたフォトリソグラフィプロセスによりISFET上へのマイクロウェル形成を行った。図2に作製したSU-8マイクロウェルアレイを示す。ISFETゲート酸化膜上に穴径 $25\mu\text{m}$ 、深さ $5\mu\text{m}$ のマイクロウェルアレイを形成した後、ウェル内に気泡を含むことなく溶液中での測定を可能にするためエキシマUVによる表面親水化処理を行った。続いて半導体パラメータアナライザを用い、異なるpH溶液におけるISFETの I_D (ドレイン電流)- V_G (ゲート電圧)特性を調べた。参照電極にはAg/AgCl電極を用いた。その結果図3aに示す

ようにpH変化に対して理論値であるNernst応答(59mV/pH)に近い 57.3mV/pH の閾値電圧変化(ΔV_{TH})が得られた。これは fL オーダーのウェル体積ならばプロトン1個の変化に対して 1mV の閾値電圧変化に相当する計算になり、測定装置の分解能($<5\mu\text{V}$)以下であることから目標に対して十分な感度を持っていることを確認した。また形成後にウェルをUV硬化性樹脂で埋めることでウェルの有無によるドレイン電流変化を確認した(図3b)

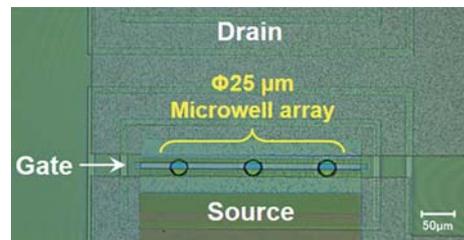


図2 ISFET上に形成したSU-8マイクロウェルアレイ

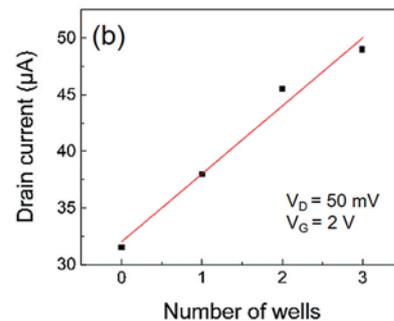
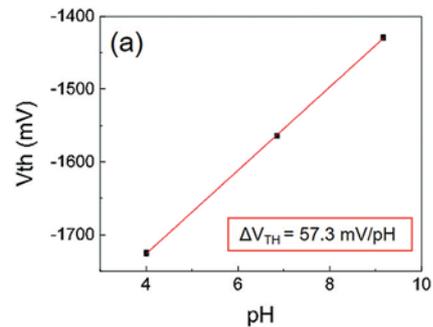


図3 (a) マイクロウェルアレイ付きISFETの閾値電圧変化 (b) マイクロウェルの有無によるドレイン電流の変化

3. Water-Oil-Water型灌流システムによる脂質二分子膜形成

ISFET上マイクロウェルアレイへの脂質二分子膜形成はWater-Oil-Water(W-O-W)灌

流システムにより行った。W-O-W 灌流による脂質二分子膜形成の概要を図4に示す。水溶液・脂質分子を溶かした有機溶媒・水溶液の順で連続的に疎水性ポリマーのマイクロウェル上に灌流すると、Water-Oil 界面に並んだ脂質分子がジッパーのように閉じ合い、マイクロウェル開口部に脂質二分子膜が形成される^[2]。本研究では図5に示すように ISFET センサ上にポリイミドテープによる灌流チャンバを作製し、シリンジポンプとフローセレクションバルブにより W-O-W 灌流を行った。この方法は既存の脂質二分子膜形成手法と異なり、何度でも膜

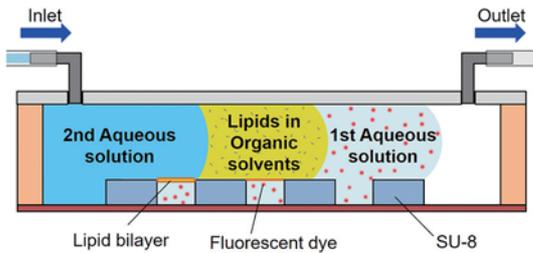


図4 W-O-W 灌流による脂質二分子膜形成

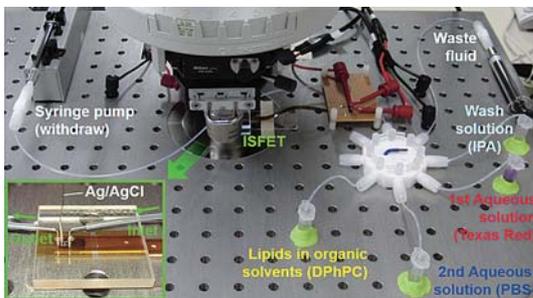


図5 W-O-W 灌流システムを用いた脂質二分子膜 FET センサ測定系

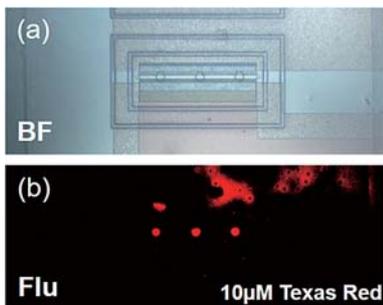


図6 蛍光顕微鏡による脂質二分子膜形成の確認 (a) W-O-W 灌流後の ISFET 上マイクロウェルアレイの明視野顕微鏡画像 (b) (a) の蛍光顕微鏡画像

形成可能かつ自動化・MEMS 化を目指したシステムであり、バイオセンサとしての応用を見据えたものとなっている。図6に W-O-W 溶液灌流後の蛍光顕微鏡観察結果を示す。図6bの蛍光顕微鏡画像では ISFET ゲート酸化膜上に形成したマイクロウェル部分が赤く写っていることから、ウェル上に脂質二分子膜が形成され、蛍光色素がウェル内に閉じ込められていることが確認できた。

4. ISFET チップ樹脂封止パッケージング

次に流路設計の自由度の向上と将来の並列化処理に向けたチップレベルセンシングを目指し、ISFET チップの樹脂封止パッケージングを行った。シリコンウェハに金配線を施した後、Bosch プロセスによる Deep-RIE を行いチップと同サイズの貫通孔を作製した。この開口部に ISFET センサチップ部を埋め込み、ポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane, PDMS) を注入して樹脂封止を行った (図7)。

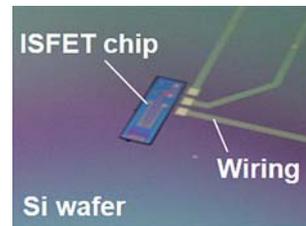


図7 ISFET センサチップのシリコンウェハへの封止

[今後の研究の方向, 課題]

W-O-W 型灌流システムを用いて、ISFET ゲート酸化膜上に形成したマイクロウェルに脂質二分子膜を形成することに成功した。しかし、ISFET センサと灌流チャンバの接着不良に由来する膜形成の再現性・安定性に課題が残ることが分かった。現在、この問題を解決すべく、樹脂封止した ISFET チップ上に SU-8 による強固な灌流チャンバの形成を試みている。今後は脂質二分子膜を安定的に形成できるよう灌流

システムを改良した後、走化性システムによる
アミノ酸センシングを行う予定である。

[参考文献]

- [1] R. Jasuja, Y. Lin, D. R. Trentham, and S. Khan,
“Response tuning in bacterial chemotaxis,” *Proc.
Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 20, pp. 11346–51,

Sep. 1999.

- [2] R. Watanabe, N. Soga, D. Fujita, K. V. Tabata, L.
Yamauchi, S. Hyeon Kim, D. Asanuma, M. Kamiya,
Y. Urano, H. Suga, and H. Noji, “Arrayed lipid
bilayer chambers allow single-molecule analysis of
membrane transporter activity,” *Nat. Commun.*,
vol. 5, p. 4519, Jan. 2014.