

シリカ結合タンパク質を用いた半導体バイオ融合デバイス開発

池田 丈^{1,2}・本村 圭^{1,2}・阿部 陽介¹・雨宮 嘉照¹・福山 正隆¹・廣田 隆一²・
横山 新¹・黒田 章夫^{1,2}

¹ 広島大学ナノデバイス・バイオ融合科学研究所

² 広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻

〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1 電話: 082-424-7047

Fax: 082-424-7047 E-mail: ikedakeshi@hiroshima-u.ac.jp

近年、ナノスケールでの微細加工が可能な半導体デバイスと、それ自身がナノサイズの分子デバイスである生体分子を組み合わせることで、革新的な半導体バイオ融合デバイスを創出しようとする研究が盛んに行われている。我々が発見したシリカ結合タンパク質「Si-tag」を接着分子として利用することで、半導体であるシリコン基板表面上に任意のタンパク質を固定化することができる。本手法は基板の表面処理を必要としないため、迅速かつ簡便な半導体バイオ融合デバイス作製が可能となる。このような利点を活かして、シリコンリング光共振器と組み合わせたラベルフリーのバイオセンシング法の開発を進めている。

1. はじめに

抗体・酵素に代表されるタンパク質は、アミノ酸の多様な組み合わせから創出される多様性と、生命進化の過程で洗練された特異的物質認識能や触媒機能を有している。これらタンパク質とナノスケールでの微細加工が可能なシリコンデバイスを組み合わせることで、革新的な融合デバイスを創出しようとする研究が近年盛んに行われている。このような融合デバイスの開発においては、デバイス上の特定の位置に、タンパク質の活性を保ったまま固定化する技術が重要となる。従来の物理的吸着や化学的架橋法では、固定化に時間と手間がかかるうえ、固定化されるタンパク質の方向性が制御できず、固体表面上での活性が大きく低下する。さらに、固体表面との相互作用に伴う立体構造の変化によってタンパク質が変性することも多いうえ、固体表面や近傍の分子による立体障害も問題となる。

そこで我々は、生体分子を固定化するための接着剤兼足場として、固体表面に結合するタンパク質を利用する方法を提唱している。主要な半導体材料であるシリコンを材料としたバイオ融合デバイス開発のために、自然界からシリコン表面に結合するタンパク質の探索を行ったところ、細菌由来のリボソームタンパク質 L2 が粒子表面に強く吸着することが判明した[1]。L2 は目的タンパク質をシリコン基板・ガラス表面上に固定化するための融合タグとして利用できることから、我々は本タンパク質を「Si-tag」と呼んでいる。シリコンは空気中では表面が酸化され SiO₂ (シリカ)膜が形成されることから、正確に言えば Si-tag はシリカに結合する

と考えられた。Si-tag を遺伝子工学的に融合したタンパク質を含む溶液をシリコン基板やガラス上に接触させるだけで、当該タンパク質分子は速やかにシリカ表面に吸着する。本手法では、固体表面の前処理などを必要としないため、迅速かつ簡便なタンパク質固定化を実現できる。また、目的タンパク質と融合した Si-tag が固体表面との間のクッションになるため、固定化されたタンパク質の分子配向性が揃い、固体表面上でも安定して高い活性を発揮できる。このような利点を活かして、シリコンデバイスと組み合わせた融合バイオセンサーの開発を進めている。

2. 原理

特異的物質認識能を有するタンパク質(抗体・酵素)による対象(抗原・基質)の捕捉反応に伴い生じる電気・熱・光学・化学的变化を、半導体デバイスで検出することで、いわゆるバイオセンシングが可能となる。すなわち、デバイス表面に固定化されたタンパク質が検出対象分子のレセプターとして機能し、そのシグナルが半導体デバイスというトランスデューサー(変換器)を介して最終的に電気信号へと変換され、出力される。我々は、トランスデューサーとなるデバイスとしてシリコンを材料としたリング光共振器を採用し、タンパク質吸着に伴う屈折率変化を指標としたラベルフリーのバイオセンシング法の開発を進めている[2,3]。

リング光共振器は、光入出力用の 2 本の光導波路と、その間に存在するリング状導波路の 3 本の光導波路から構成されている。入力された光は導波路内を全反射

しながら進行するが、導波路間のギャップ長が光の波長程度に小さい場合、光の染み出し効果により入力ラインを通る光の一部がリング状導波路へと移動する。光がリング内部を周回する際に特定の波長成分のみが共振を起し、その他の波長成分は打ち消し合って減衰する。リング内で共振した光は再度出力ラインへと染み出し、検出部へと導かれる。その共振波長は、リング近傍に存在する物質による屈折率変化に依存して変化する。特異的物質認識能を有するタンパク質を Si-tag を介してリング光共振器上に固定化することで、バイオセンサーとしての利用が可能となる(図 1)。シリコンデバイスでありながら検出に電気ではなく光を利用するため、溶液中のイオンなどによる電氣的攪乱に強く、溶液中でも安定した動作が可能であるという利点を有している。

3. 結果と考察

通常の半導体微細加工プロセスにてシリコン基板上にマイクロスケールのリング光共振器を作製し、PDMS (polydimethylsiloxane)を材料とした微小流路を貼り付けた。まず、Si-tag を融合した抗体結合タンパク質 protein A [4]を PDMS 流路を介して光共振器上に送液したところ、速やかに共振波長のシフト(図 2, 矢印 1)が観察されたことから、Si-tag 融合 protein A がリング上に結合したことが確認された。続いて、抗 GFP 抗体を送液したところ、さらなる共振波長のシフト(矢印 2)が観察され、先に固定化した Si-tag 融合 protein A を介して、抗体がリング上に固定化されたことが示された。ここに抗原である GFP を送液したところ、三度目のシフト(矢印 3)が観察された。対照実験として抗 PSA 抗体を固定化した場合には、GFP 溶液を送液しても矢印 3 に相当するシフトは観察されなかった。これらの結果から、抗原抗体反応を共振波長のシフトとして検出できたことが示された。

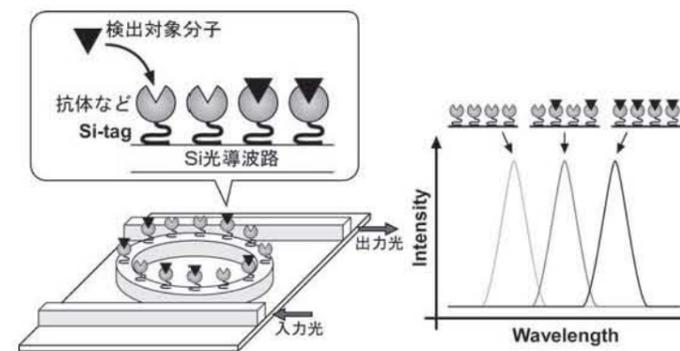


図 1. Si-tag とリング光共振器を組み合わせたバイオセンサーの概念図。リング光共振器上に Si-tag 融合タンパク質を固定化する。検出対象分子が固定化タンパク質によって捕捉されるとリング光共振器の共振波長が変化する。

本実験の他に、固定化した Si-tag 融合抗原による血清中の抗体検出などにも成功しており[3]、Si-tag とリング光共振器の組み合わせがラベルフリーのバイオセンサーとして有効に機能することを確認している。

4. 今後の展望

本融合デバイスはシリコンチップ上に集積化できることから、バイオマーカーの網羅的検出法として有望である。現在、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の産業技術研究助成事業の支援を受けて、Si-tag を用いたタンパク質固定化法およびリング構造の改良による高感度化や多項目同時測定を目指し、さらなる研究を進めている。また、Si-tag とシリカとの親和性を利用したタンパク質のアフィニティー精製法を既に確立しており、融合デバイス開発に必要な Si-tag 融合タンパク質を簡単に調製することができる[5]。

Si-tag はバイオテクノロジーと半導体エレクトロニクス・フォトンクス分野を結びつける技術として非常に高い汎用性を有しており、今回紹介したリング光共振器の他にも、電界効果トランジスタと組み合わせたバイオセンサーの開発が進められている[6,7]。無機材料表面に有用機能を付加する表面修飾法としてナノテクノロジーや材料分野での利用も期待される。

参考文献

- [1] Taniguchi K, *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, 96, 1023-1029 (2007)
- [2] Yamatogi S, *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.*, 48, 04C188 (2009)
- [3] Fukuyama M, *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.*, 49, 04DL09 (2010)
- [4] Ikeda T, *et al.*: *Anal. Biochem.*, 385, 132-137 (2009)
- [5] Ikeda T, *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, 71, 91-95 (2010)
- [6] Gu B, *et al.*: *Small*, 5, 2407-2412 (2009)
- [7] Lee K-W, *et al.*: *Appl. Phys. Lett.*, 96, 033703 (2010)

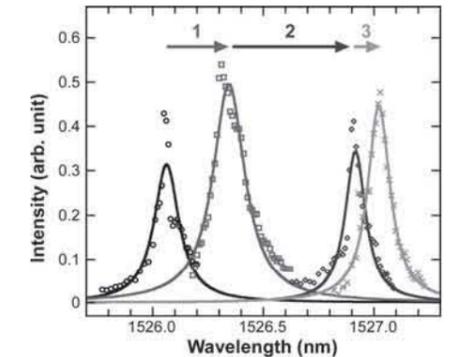


図 2. 融合デバイスによる抗原抗体反応の検出。Si-tag 融合 protein A の固定化(1)、抗体の固定化(2)、抗原の捕捉(3)による共振波長の変化を示す。