

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

Aptamer-based Diamond Biosensors
for Protein Detection

アプタマー修飾ダイヤモンドバイオセンサー
によるタンパク質検出

申請者

Ruslinda	BINTI A.RAHIM
ビンディ アブドル ラヒム	ルスリンダ

ナノ理工学専攻 ナノデバイス研究

2012年 7月

アプタマーとは、特定のタンパク質あるいは他の生体分子と特異的な結合をする数十塩基以下の塩基配列を有する DNA あるいは RNA のことである。これらの核酸は塩基配列の相違により異なる三次元構造をとるため、タンパク質との結合の選択性が高く、抗原抗体反応に匹敵する特異性を有する。従って、タンパク質センサーとして分子認識部位への活用が期待されているが、その応用研究はまだ始まったばかりである。その理由は、タンパク質の検出に適合した核酸固定技術およびタンパク質の非特異的吸着抑制技術が確立されていないことにある。本論文では、一元物質である核酸の末端をダイヤモンド基板にアミド結合で安定に固定し、活性部位を固定部位から離すことにより標的分子との結合を高め、さらには非特異的吸着を抑制できるようダイヤモンド表面を終端構造することで分子認識の特異性が向上することを試みている。センシングの方法としては蛍光検出法と電界効果トランジスタ (FET) による電位検出法を行い、複数の観点からダイヤモンド表面でのセンシングを検討している。前者は DNA チップ等の応用でセンサー技術として確立されているが、核酸をアプタマーとして基板上に固定し、蛍光検出を系統的に行ったのは本論文が最初である。後者のダイヤモンド上の FET は、DNA の塩基配列検出において有利であることが示されているが、タンパク質検出においては開発途上の技術である。本論文は、DNA および RNA をアプタマーとして利用し、FET による信頼性の高いタンパク質の検出を行った最初の例であり、全 5 章から構成される。以下、各章ごとに評価概要を述べる。

第 1 章では、機能性ダイヤモンド表面の作製、ダイヤモンド上での生体分子固定の有利性、アプタマーによるタンパク質等の生体分子の選択的結合、その性質を利用したセンサーとして応用の可能性について述べている。特に FET のような固体表面を利用するセンサーで、プローブ (アプタマー) の固定技術、非特異的吸着の抑制、表面近傍での検出などの特長を述べている。アプタマーによるタンパク質検出と抗原抗体反応による検出とを比べ、FET センサーでの前者の有利性を述べている。本研究で標的としたタンパク質である血小板由来成長因子 (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) とヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 転写活性化

(Transactivator, Tat) タンパク質の基本構造を FET で電位検出する際のタンパク質内の電荷分布という観点から説明している。さらに本研究の目的が、アプタマー修飾されたダイヤモンドバイオセンサーによるタンパク質検出の実証にあることを述べている。

第 2 章では、本研究に利用したダイヤモンドの機能性表面の性質、作製方法および生体分子の固定方法について説明している。本研究で使用した多結晶ダイヤモンドは、マイクロ波プラズマ CVD 法にて形成されている。このダイヤモンド表面の水素終端構造は、疎水性で、表面近傍では p 型伝導が生じる。この層の表面正孔密度は 10^{13} cm^{-2} 台であり、移動度は $10\text{-}100 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ と FET を駆動させるのに十分なキャリア濃度と移動度が得られている。アンモニアの紫外線による光分解にて、水素終端ダイヤモンド表面の一部、被覆

率にして 20–30% がアミノ基に置き換わる。カルボキシル基で終端された DNA をこのダイヤモンド表面のアミノ基によりアミド結合で固定する。一方、RNA は不安定でアミノ終端の方が形成しやすい。カルボキシル基を両端に持つテレフタル酸をリンカーとし、基板側のアミノ基と RNA の末端アミノ基とをアミド結合でリンカーに結合させ、RNA を基板に固定している。一般に不安定とされる RNA も DNA 固定と同程度の安定度で固定化されている。ダイヤモンドはフッ素終端により超撥水性の表面となる。これらの表面は活性部位の分離、非特異吸着の抑制に利用されている。以上、ダイヤモンド表面修飾により、DNA および RNA アプタマーの固定技術を開発している。

第 3 章では、DNA アプタマーによる PDGF およびアデノシン三リン酸 (ATP) の蛍光検出および RNA アプタマーによる HIV Tat ペプチドおよび HIV Tat タンパク質の蛍光検出を行っている。

PDGF の検出では、PDGF が 2 量体であり、2 か所でアプタマーと結合する性質を利用し、ダイヤモンド基板に固定された DNA アプタマー、蛍光ラベルをつけたアプタマーが同時に PDGF と結合した際の蛍光を観測する方法を開発した。PDGF の検出感度は 4pM であった。他の検出方法として、基板表面に固定したアプタマーに蛍光標識したインタカレータを結合させておき、このアプタマーが PDGF と結合した際にインタカレータが脱離する性質を利用し、蛍光標識脱離での蛍光強度の減少から PDGF を検出する方法も開発した。ATP の検出では、ATP と結合するアプタマーをダイヤモンド上に固定し、蛍光ラベルを付けた相補的な DNA と 2 本鎖にし、ATP が近づくと 2 本鎖がほどけ ATP とアプタマーが結合する性質を利用している。この際、蛍光標識付の DNA の解離で減少する蛍光を測定する。類似した三リン酸である GTP、CTP、UTP ではこの反応は起こりにくく、ATP が他の三リン酸から識別されることを述べている。

HIV Tat タンパク質 (101 アミノ酸残基) の検出に先立ち、その一部である HIV Tat ペプチド (10 アミノ酸残基) の検出を行った。2 つの部位に分離された RNA アプタマー (固定された RNA と蛍光標識付の非固定 RNA) がアルギニン酸の多い部位 (HIV Tat ペプチド) に選択的に結合する性質を利用している。分離された RNA 同士は結合せず、HIV Tat ペプチドの存在下でのみ、2 本の RNA と HIV Tat ペプチドが結合する。3 部位の結合が必要となるため、この蛍光検出は高感度となっている。RNA は一般に不安定とされるが、固体基板に固定された RNA アプタマーによるタンパク質の繰り返し検出は初めての例と言える。

以上のように、本章では、アプタマーと標的、アプタマーと蛍光ラベルの相関関係を巧みに利用し、固体基板上でのアプタマーによるタンパク質の蛍光検出に成功している。

第 4 章では、まず、アプタマーが固定された電解質溶液ゲート (Solution Gate, SG) FET による標的タンパク質の測定原理について述べ、DNA アプタマーによる PDGF および RNA アプタマーによる HIV Tat ペプチドおよび

HIV Tat タンパク質の電位検出を行っている。アプタマーの結合部位となる HIV Tat ペプチドは、正電荷を有するアルギニン酸が支配的な部位であり、正に帯電する。この部位の影響で HIV Tat タンパク質も正電荷を帯びる。一方、PDGF も正に帯電することが電気泳動法により確認されている。正に帯電したタンパク質が正孔をキャリアとするダイヤモンド SGFET のしきい値電圧に及ぼす影響を検討し、アプタマーにより捕獲されたタンパク質の密度を概算している。その結果、測定限界の約 10 倍の電圧である 30mV の負方向へのしきい値電圧シフトは $10^{12} \text{ e cm}^{-2}$ の正の面電荷密度に相当し、タンパク質が $10^{11}\text{-}10^{12} \text{ cm}^{-2}$ の面密度で SGFET のチャンネル上に捕捉されることを示している。

PDGF の SGFET での検出では、濃度 1nM で約 30mV の負方向へのしきい値電圧シフトを示し、PDGF が脱離すると逆方向で同量のシフトが観測された。PDGF の捕獲と脱離を数サイクルにわたり、同程度の電圧シフトで検出している。繰り返し測定可能な FET でのタンパク質検出は他に例がない。また、この SGFET の検出の選択性は高く、他のタンパク質の誤検出はなく、PDGF のアイソフォームもほぼ検出されない。HIV Tat ペプチドおよび HIV Tat タンパク質の SGFET での検出では、濃度 1nM でそれぞれ約 40mV と約 20mV の負の方向のシフトが観測されている。シフト量の違いは、ペプチドは正電荷のアルギニン酸が支配的な部位であるのに対し、タンパク質は負電荷のグルタミン酸等で部分的な電荷の相殺があると解釈される。RNA アプタマーとしての FET による電位検出は初めての例である。

第 5 章は結論として、第 2 章から第 4 章までに得られた結果を総括し、その意義を述べている。

以上、本研究は、アプタマーの有する特異的な分子認識能と核酸を安定に固定出来る生体適合性基板としてのダイヤモンドという組み合わせを利用し、蛍光検出と FET による電位検出の両面からタンパク質の高感度検出を行っている。タンパク質の捕獲脱離を繰り返ししても安定なアプタマーの固定化技術、再現性の高い FET でのタンパク質検出等、世界で最初に開発した成果をまとめている。ナノスケールにおける表面制御と生体分子の固定および固体表面での生化学反応に基づき、実用性のあるタンパク質センサーの開発をまとめた本論文は、電子工学、バイオエンジニアリング、センサー工学に多大な貢献をすると期待される。よって、博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2012年7月

審査員（主査）	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	川原田 洋
	早稲田大学教授	工学博士（東北大学）	庄子 習一
	早稲田大学教授	博士（工学）早稲田大学	谷井 孝至