

Title	カーボンナノチューブ電界効果トランジスタを用いたDNAハイブリダイゼーションの高感度検出
Author(s)	前橋, 兼三; 松本, 和彦
Citation	大阪大学低温センターだより. 2005, 131, p. 11-15
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/12590
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

カーボンナノチューブ電界効果トランジスタを用いたDNAハイブリダイゼーションの高感度検出

産業科学研究所 前橋兼三、松本和彦（内線 8412）

E-mail: maehashi@sanken.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

21世紀になって、ヒトゲノムの全塩基配列解読が完了し、その成果を基盤とする遺伝子機能解析が活発に行われ、その結果、特定の病院の原因となる遺伝子や遺伝子の違いによる個人の薬効の違いなどがわかるようになってきた。^[1,2] あらかじめ病気の本体である遺伝子を検出できれば発症前に予防することも可能となり、そのため、特定のDNAを検出するDNAバイオセンサの研究は近年盛んになっている。

現在、DNAハイブリダイゼーション*の検出に光学的手法が主に使われている。これは、あらかじめ蛍光試薬でラベル化したプローブDNAを基板の上に固定し、DNAの相補的に2重らせん構造を作る性質を利用して、プローブDNAがどのターゲットDNAとハイブリダイゼーションするかをレーザーを用いて検出する方法である。しかしながら、プローブDNAに蛍光物質を化学修飾させるという煩雑な操作が必要である、リアルタイムに検出不可能である、レーザー等の大型の装置を必要とするため小型化が不可能である等といった問題点がある。生物学・医学の研究分野にとどまらず、臨床検査・創薬など高速かつ簡便なDNAハイブリダイゼーションの検出が必要とされる場面が増大している。

本稿では、図1のように、カーボンナノチューブ*電界効果トランジスタ*を用いて、電気化学的手法によりDNAハイ

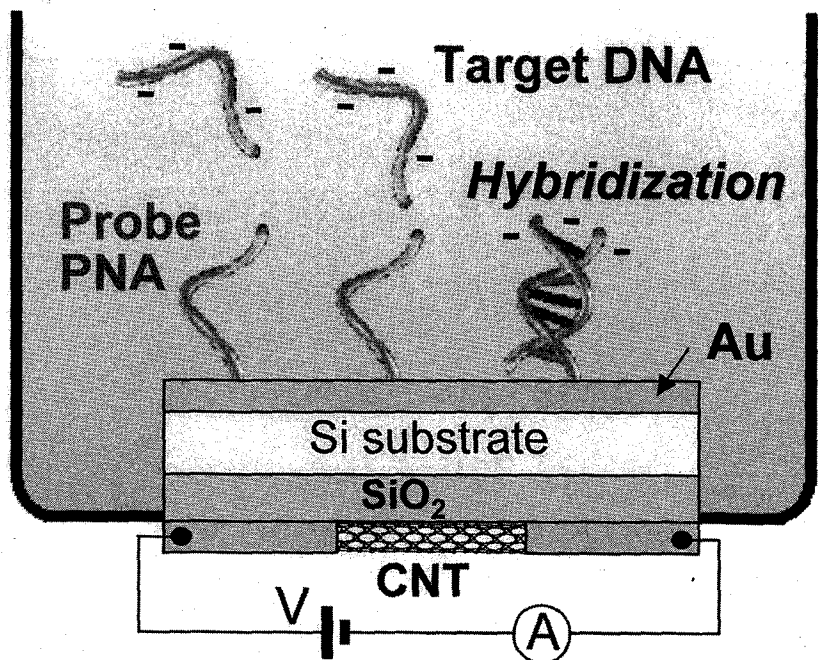


図1 カーボンナノチューブ電界効果トランジスタを用いたDNAハイブリダイゼーションの検出の模式図。

*この印の付いている語は、後に「用語説明」があります。

ブリダイゼーションの検出を試みたので紹介する。カーボンナノチューブは直径数nmの1次元構造であるため、カーボンナノチューブを電界効果トランジスタのチャネルとして利用すると、DNAハイブリダイゼーションを高感度に検出できると考えられる。ここでは、はじめに、なぜ、DNAハイブリダイゼーションがカーボンナノチューブ電界効果トランジスタを用いると検出できるかについて説明し、次に、実験結果、展望について述べる。

2. 実験方法

DNAは、図2 (a) のように、「塩基 (base)」、「糖 (sugar)」、「リン酸 (phosphate)」が1つずつ結合したものが1単位となり、さらに、これが鎖のようにつながっている構造であり、さらに、2本の逆向きのDNAは、相補的な塩基による水素結合を介して、全体として2重らせん構造をとる。

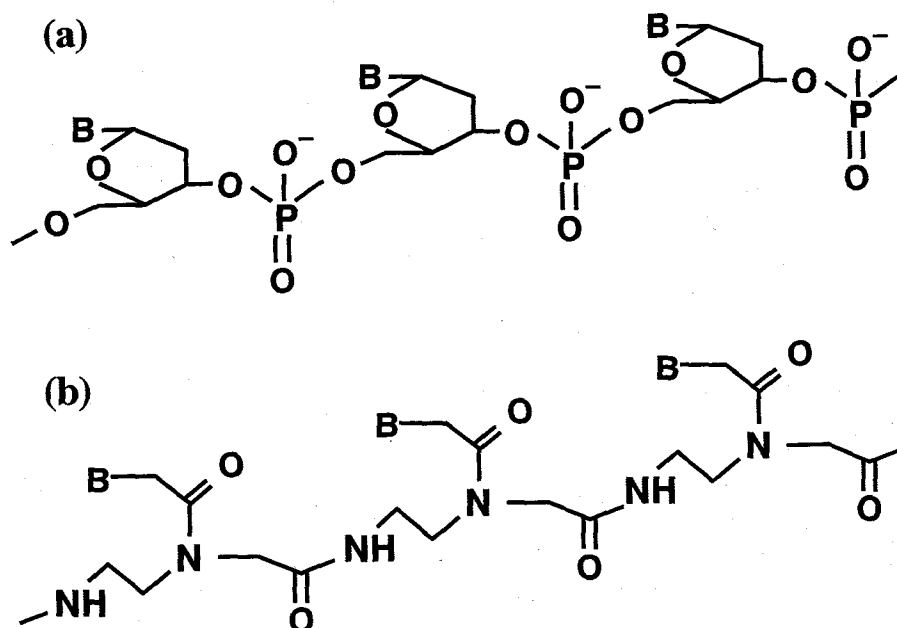
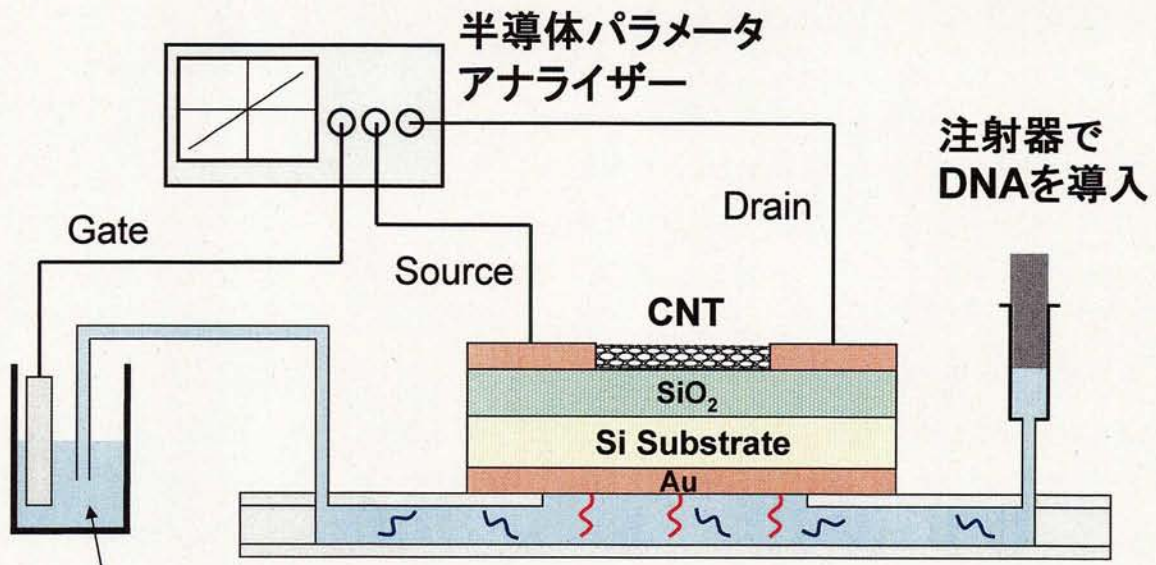


図2 DNA (a) とPNA (b) の模式図。

本研究では、図1のように、カーボンナノチューブ電界効果トランジスタのバックゲート表面にプローブを固定し、ターゲットDNA導入することにより、バックゲート表面上で2重らせん構造が形成される。ここで、DNAは、水溶液中ではリン酸イオンに起因する負電荷を有しているため、ゲート上でDNAハイブリダイゼーションが起きると、負電荷がゲートに印加されることになる。その結果、ソース・ドレイン間の電流量が変化し、ターゲットDNAを検出することが可能となる。本研究では、プローブとして、図2 (b) のようなペプチド核酸 (PNA) を使用した。PNAはDNAとは異なり、ペプチド結合で骨格を形成しているDNA類似の構造をもつ人工化合物である。^[3] PNAは無電荷であるため、DNAとより強くハイブリダイズし、相補鎖認識力も向上すると言われている。

カーボンナノチューブ電界効果トランジスタを用いたDNAハイブリダイゼーションの検出測定系を図3に示す。まず、SiO₂表面の触媒パターン上にアルコール化学気相成長法*を用いてカーボンナノチューブを形成し、電極間に架橋させることにより、電界効果トランジスタを作製した。^[4,5] 得られた電界効果トランジスタはp型であった。次に、Auのバックゲート表面上にPNAを化学修飾して固定させた。さらに、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いてマイクロチャネルを作製し、その中心部分に窓を開け、カーボンナノチューブ電界効果トランジスタをマイクロチャネルに密着させた。溶液中の電位はAg/AgCl参照電極により制御され、注射器を用いてターゲットDNAを導入し、ソース・ドレイン電極間における電流の変化を測定した。



リン酸緩衝液(PBS)

PDMSでマイクロチャネルを作製

図3 カーボンナノチューブ電界効果トランジスタを用いたDNAハイブリダイゼーションの検出測定系。

3. 実験結果

図4 (a) に、非常に濃度の薄い6.8 fmol/Lの相補的なターゲットDNAをマイクロフロー・チップに導入した後のカーボンナノチューブ電界効果トランジスタの伝導特性を示す。^[6] ただし、ゲートバイアスは0Vである。時間と共にプラス側で電流が増加、マイナス側で電流が減少していることがわかる。用いたカーボンナノチューブ電界効果トランジスタはp型であるため、この現象は負電荷がバックゲートに印加されたことを意味している。これは、上記で述べたようにDNAが負の電荷を持つことと一致する。すなわち、プローブPNAとターゲットDNAとのハイブリダイゼーションによる現象であると考えられる。図4 (b) にDNA導入後のソース・ドレイン電圧1Vにおけるソース・ドレイン電流の時間依存性を示す。初期においては、電流は急激に増加するが、時間がたつにつれて電流の増加は緩やかになり、180分後あたりでほぼ飽和することが明らかになった。初期においては、電界効果トランジスタのバックゲート付近に存在した1本鎖のターゲットDNA

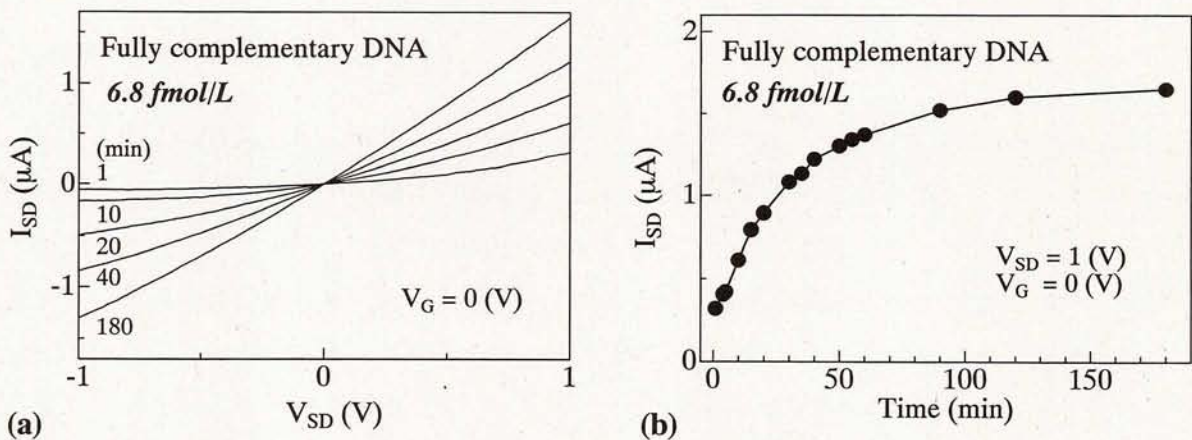


図4 (a) 6.8 fmol/Lの相補的なDNAをマイクロフロー・チップに導入後のカーボンナノチューブ電界効果トランジスタの伝導特性、および、(b) ソース・ドレイン電圧1Vにおけるソース・ドレイン電流の時間依存性。

とのハイブリダイゼーションによる影響のために、電流の急激な増加が見られる。しかしながら、時間がたつにつれて、ゲート付近にターゲットDNAが存在しなくなり、離れた場所に存在したターゲットDNAが、拡散によってゲートに到達することによって、ハイブリダイゼーションが誘起される。その結果、図4 (b) に見られるような曲線が得られると考えられる。

次に、ターゲットDNAの濃度依存性について述べる。図5 (a) に、20 fmol/Lの相補的なターゲットDNAを導入した後のソース・ドレイン電流の時間依存性について示す。図4と同じように、時間と共にソース・ドレイン電流が増加し、これはプローブPNAとターゲットDNAとのハイブリダイゼーションによる現象であることがわかる。図5 (b) は、DNAの濃度を変化させた場合のDNA導入60分後の電流量の変化を示す。ここで、電流の増加量は、図5 (a) の様に直線近似をして求めた。導入したDNAの濃度が20、10、1 fmol/Lと変化するにしたがって、電流の増加量もほぼ線形的に減少していることがわかる。これは、バックゲートに加えられた負の電荷量も線形的に減少していることを意味する。つまり、この1 fmol/L程度の濃度を持ったDNAの検出が可能であることを示唆している。この濃度のDNA検出は電気化学的手法において世界最高レベルであり、カーボンナノチューブ電界効果トランジスタを用いることによりDNAハイブリダイゼーションを高感度に検出できることが明らかになった。

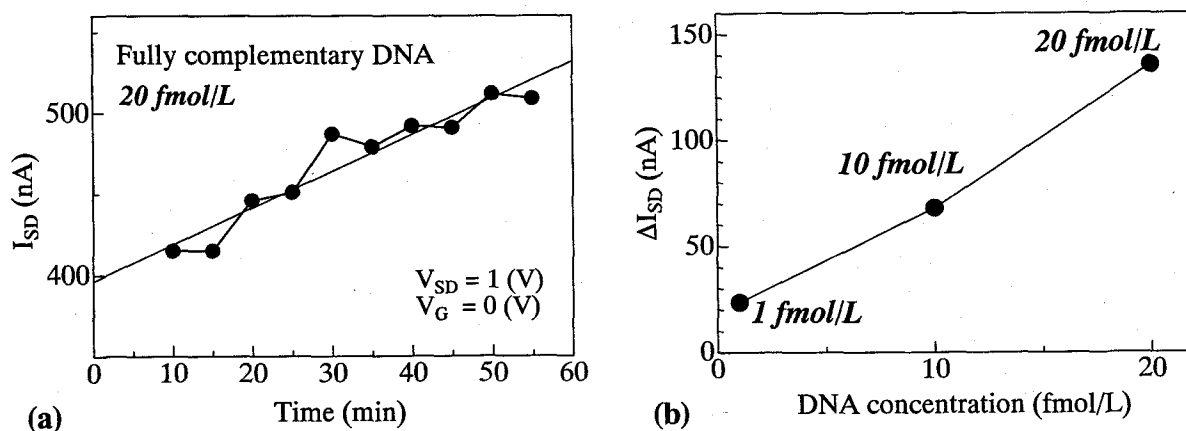


図5 (a) 20 fmol/Lの相補的なDNAを導入後のソース・ドレイン電流の時間依存性、および、(b) DNAの濃度を変化させた場合のDNA導入60分後の電流量の変化。

4. 展望

我々は、カーボンナノチューブ電界効果トランジスタのバックゲートに、PNAを化学修飾し、DNAとのハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果、1 fmol/L程度の濃度を持ったDNAの検出が可能であることが明らかになった。今回は、厚いSiO₂膜を有するバックゲート型トランジスタを用いたため、もし、薄い絶縁膜を有するトップゲート型トランジスタを作製することが可能であれば、さらに1桁以上感度が向上すると期待できる。現在、触媒CVD法を用いて、カーボンナノチューブチャンネル上へのSiN絶縁保護膜を形成し、^[7] トップゲート型カーボンナノチューブ電界効果トランジスタの作製に成功しており、これを用いて新しいバイオセンサの開発を行っている。

以上より、この方法は、蛍光や酵素を用いた増幅を必要とせず、直接様々な生体1分子を電気化

学的に測定するものであり、迅速かつ、極めて容易・安全に診断が可能になる。各家庭でのインフルエンザ、肝炎、HIVなどのウイルス抗原の早期発見、各種癌の発病・再発モニター、慢性疾患の経過観察などにも十分対応でき、健康維持と病気の予防、医療の大幅な向上に資するものと考えられる。

謝辞

マイクロフロー・チップの作製およびDNAハイブリダイゼーションの検出に関してご協力頂いた北陸先端科学技術大学院大学の民谷栄一教授、高村禅助教授、カーンケルマン博士に感謝いたします。

参考文献

- [1] P. P. Zarrinkar *et al.*, Genome Res. 11, 1256 (2001)
- [2] T. A. Carter *et al.*, Physiol. Behav. 73, 849 (2001)
- [3] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, Science 254, 1497 (1991).
- [4] K. Matsumoto, S. Kinoshita, Y. Gotoh, K. Kurachi, T. Kamiura, M. Maeda, K. Sakamoto, M. Kuwahara, N. Atoda and Y. Awano, Jpn. J. Appl. Phys. 42, 2415 (2003)
- [5] K. Maehashi, Y. Ohno, K. Inoue and K. Matsumoto, Appl. Phys. Lett. 85, 858 (2004)
- [6] K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, Jpn. J. Appl. Phys. 43, L1558 (2004)
- [7] D. Kaminishi, H. Ozaki, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, K. Matsumoto, Y. Seri, A. Masuda, and H. Matsumura, Appl. Phys. Lett. 86, 113115 (2005)

用語説明

ハイブリダイゼーション

1本鎖DNAがアデニン-チミン、グアニン-チミンの塩基対形成により2本鎖DNAとなることをハイブリダイゼーション (hybridization) という。

カーボンナノチューブ

カーボンナノチューブはグラフェンシート (1枚のグラファイト) を筒状に巻いた形状をしており、単層と多層の2種類がある。そのため、直径は1nm以下から数10nmまで及ぶ。また、直径と巻き方により、カーボンナノチューブは半導体にも金属にもなりうる。

電界効果トランジスタ

金属-絶縁膜-半導体から構成され、ゲート電極に電圧を加えることにより、ソース・ドレイン間に流れる電流を制御する素子である。

化学気相成長法

この方法は、薄膜形成方法のひとつであり、反応管内で加熱した基板上に、目的とする薄膜の成分を含む原料ガスを供給し、基板表面あるいは気相での化学反応により膜を堆積する方法である。