グラフェン FET を用いた生体分子センサ応用[†]

大野恭秀・前橋兼三・松本和彦

大阪大学産業科学研究所 ☎ 567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

(2013 年 3 月 8 日受付；2013 年 4 月 16 日掲載決定)

Graphene Field-Effect Transistor-Based Biological Sensors

Yasuhide OHNO, Kenzo MAEHASHI and Kazuhiko MATSUMOTO

The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047

(Received March 8, 2013 ; Accepted April 16, 2013)

Chemical and biological sensors based on graphene field-effect transistors (FETs) were described. The transfer characteristics of the graphene FET were changed by the solution pH and the protein adsorption. Especially, the detection limit of the solution pH was 0.03, indicating the high sensitivity. In order to achieve the specific biomolecule sensing, aptamers were used as a receptor material. The aptamer was the single-stranded DNA binding to the specific molecules. The aptamer-modified graphene FET can detect only the target molecule while the graphene FET with the bare graphene channel detects all proteins with charges. These sensing results show that the graphene FET has high potential for the high sensitive biological sensors.

KEYWORDS : graphene, field-effect transistor, biosensor, aptamer, antibody

1. は じ め に

生活習慣病の蔓延・新型インフルエンザの流行など、近年では個々人のヘルスケアに注目が集まっている。しかしながら、各自が自分の体のことを調べる場合、専門機関へ自分の検体を提出して調べなければならないのが現状であり、この方法は非常に高価である。少量の唾液・尿・血液等を用いて、誰でも、簡便に調べられるバイオセンサが求められている。本研究紹介では、グラフェンの電界効果トランジスタ特性を利用したバイオセンサへの応用に関して述べる^{1~4)}。

2. グラフェン電界効果トランジスタ

2.1 デバイス作製

近年グラフェンの CVD 合成技術の発展が目覚ましく、優れた特性を持つ合成グラフェンが世に出ている

が、結晶性という点では、未だ黒鉛から粘着テープ等を用いて剥離することで得られるグラフェンに今一步及んでいないのが現状である。本研究では、この黒鉛からの剥離グラフェンを用いてデバイスの作製を行った。バルク黒鉛を粘着テープを利用して数回の劈開を行い、SiO₂/Si 基板に転写した。リソグラフィ技術により電極を形成し、グラフェン電界効果トランジスタ（グラフェン FET）を作製した。Fig. 1 に本研究で使用した典型的

Fig. 1. (color online). Optical microscope image of a graphene field-effect transistor.

[†] 第 32 回表面科学学術講演会（2012 年 11 月 20 日～22 日）にて発表

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

なグラフェン FET の光学顕微鏡写真を示す。

2.2 電気二重層

通常、測定する生体分子は唾液、血液といった溶液中に溶けている状態で存在するため、センサ自体も溶液中で使用できることが望ましい。しかしながら、一般的な半導体材料であるシリコンなどは、溶液中で利用するためには SiO_2 などの絶縁膜でチャネルを保護しなければならない。これは、溶液中ではシリコンやガリウムヒ素は酸化されやすいためである。他方、グラフェンは炭素のみからなる物質であり、電位窓が広く酸化しにくい。そのため、グラフェンは Fig. 2 に示すように、チャネルに保護膜を形成することなく、そのまま溶液中で電界を印可できる。事実、電気化学測定用の電極として炭素電極は白金電極とともによく使用されている。このことは、グラフェン FET では検体を直接チャネル上で検出できることに繋がり、高感度が期待できる。

この系において、溶液内の電位を正確に決定するために銀/塩化銀参照電極を溶液中に挿入している。このとき、この参照電極からトップゲート電圧をグラフェンに印可することができる。このように溶液中の電極に電界

を印可すると、電極およびグラフェン近傍のイオンが電界に引き寄せられ電気二重層を形成する。

Fig. 3 に溶液中の電気二重層の概念図を示す。溶液内のイオンは電極に引き寄せられることで、電気二重層を電極近傍に形成する。このとき、電位は電極近傍で大きな傾きを持つことになる。この傾きの距離をデバイ長と呼び、Debye-Hückel の式で表され、温度とイオン強度（ $\approx$ 溶液の濃度）の関数である。この電気二重層がゲート絶縁膜の役割を果たす。デバイ長は濃度 10 mM (mmol/L) 程度の緩衝溶液では室温において約 5 nm である。すなわち、バックゲートとして用いる SiO_2 の厚さ（ ~ 300 nm）よりも遙かに薄いために、溶液内では効果的に電圧を印可できる¹⁾。

2.3 グラフェン FET のセンシング原理

グラフェンはそのバンド構造が K 点において伝導帯・価電子帯が線形に交わるため、グラフェン FET の伝達特性（ドレイン電流-ゲート電圧特性）は非常に特徴的な両極性電動を示す。このとき、正または負に帯電した粒子がグラフェン上に吸着することで、バンド内のフェルミエネルギーが変化する。結果、伝達特性は吸着後にシフトして観測されることになる（Fig. 4）。

3. 実験結果と考察

3.1 溶液 pH の検出

最初に溶液の pH に対して伝達特性がどのように変化するかを調べた。溶液の pH を変化させながら伝達特性を測定した結果、Fig. 5 (a) に示すように、伝達特性は溶液 pH が大きくなるにつれて正電圧側へシフトしていく様子が観測された。

pH の値が大きくなると、水素イオン (H^+) の濃度が

Fig. 2. (color online). Schematic image of the measurement.

Fig. 3. (color online). Conceptual diagram of the electrical-double layer.

Fig. 4. (color online). Schematic illustration of the principle for sensing by graphene FETs.

Fig. 5. (color online). (a) Solution pH dependence of the transfer characteristics and (b) time course of the drain current. Every after 10 min, the solution with higher pH were added.

減少し、水酸化物イオン (OH^-) の濃度が増大する。このため、pH の値が大きくなり、負に帯電したイオン濃度が増大した結果、伝達特性が正電圧方向へシフトしたものと考えられる。このとき、ドレイン電圧、ゲート電圧を一定にして電流を測定しながら溶液の pH を変化させていくと、Fig. 5 (b) に見えるような階段状の特性が得られる。ドレイン電流は溶液 pH に対してほぼ線形に変化していることから、pH センサとして利用できることを示している。ここで、感度限界 (測定分解能) を信号強度とノイズ強度の強度比が 3 になるところ、と定義して求めると、0.03 という非常に小さな値が得られ、簡易 pH センサとして実用レベルにあることを示している。この伝達特性の変化は、おそらく主にグラフェン上の欠陥または端部に水素 (水酸化物) イオンが結合したものと考えられ、前述したセンシング原理で説明でき

Fig. 6. (color online). Time course of the drain current. At 10 min, various kind of proteins were added.

る。

3.2 タンパク質検出

タンパク質はアミノ酸が集合してできた生体分子であり、アミノ酸はアミノ基 ($-\text{NH}_2$) とカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) の両方を持つ有機分子である。そのため、タンパク質はある特定の pH を持つ溶液内ではアミノ基・カルボキシル基の両方が電離しない状態、すなわち電荷を持たない状態になり、このときの pH を等電点と呼ぶ。グラフェン FET では電荷を持った状態のタンパク質が吸着すると、溶液 pH と同様に電流値が変化することが予想される。

実験では、3 種類のタンパク質を用意した。牛血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA)、ストレプトアビジン (Streptavidin, SA)、ヒト免疫グロブリン E (Human Immunoglobulin E, IgE) を 10 mM のリン酸緩衝溶液 (pH 6.8) に溶かしたものを用意し、タンパク質の入っていない緩衝溶液に浸したグラフェン FET 上に滴下した。タンパク質の濃度は滴下したときに 50 nM になるように調整した。結果を Fig. 6 に示す。測定開始 10 分後にタンパク質を含んだ緩衝溶液を滴下すると BSA の場合は電流値が上昇したのに対し、SA と IgE を滴下すると電流値は減少した。測定においては、グラフェンを流れるキャリアが正孔になるようにトップゲート電圧を印可しているため、これらの変化はそれぞれのタンパク質の等電点を反映しているものと考えられる。すなわち、BSA と SA の等電点はそれぞれ 5.3 と 7.0 であるため、pH 6.8 の緩衝溶液の中ではそれぞれ負と正に帯電している。IgE に関しては、非常に大きな分子 (分子量約 190000) であることから、等電点を決めることが難しい

が、電流が減少していることから、主に正に帯電した部分がグラフェンに吸着していると考えられる。

これらの結果は、グラフェン FET はタンパク質の電荷を検出可能であることを示唆するとともに、この状態では電荷を持つタンパク質をすべて検出してしまうために、特定のタンパク質を検出できないことを示している。また、タンパク質が電荷を持たない等電点の溶液においても、検出が難しいと考えられる。

3.3 特定タンパク質の検出

特定のタンパク質のみを検出するためには、グラフェンチャネル表面に分子認識材料（レセプター）を修飾する必要がある。このとき、グラフェン FET を用いたバイオセンサでは注意をしなければならない点が二つある。一つ目は「レセプターとターゲットタンパク質の結合が電気二重層内で行われなければならない」ということである。FET は電気二重層の外側の電荷を、遮蔽効果により検出できないためである。本研究の実験条件では、電気二重層の厚さは 5 nm 程度であるために、レセプターの大きさはこれよりも小さくしなければならない。一般的にレセプターとしては抗体が用いられるが、抗体は大きさが 10~15 nm と大きく、電気二重層の外側で反応が起きてしまう問題がある。本研究では、抗体の代わりにアプタマーという特定のタンパク質に特異的に結合する性質を持った人工 DNA を用いた。実験においては、ターゲットタンパク質として IgE を選び、IgE と特異的に結合するアプタマーを用いた。IgE はアレルギーを持つ哺乳類の血液中に多く現れるタンパク質である。IgE と結合するアプタマーの塩基配列は 5'-NH₂ GCG CGG GGC ACG TTT ATC CGT CCC TCC TAG TGG CGT GCC CCG CGC-3' である。アプタマーの大きさは 2~3 nm であり、反応を電気二重層内で起こすことが可能になる。さらに、ポリマーゼ連鎖反応による大量生産が可能であり、抗体に比べて安価であることがあげられる。また、3' または 5' の位置に様々な官能基を修飾することも容易である。今回は、グラフェン上への修飾のため、5' の位置にアミノ基を修飾してある。二つ目の注意点は「グラフェン表面に欠陥が入る修飾は避ける」があげられる。これは導入された欠陥が散乱中心となり、移動度の低下を招き、結果として感度が落ちてしまうからである。

本研究では、まずグラフェンとアプタマーを固定するために、リンカーとして 1-ピレンブタン酸スクシンイミジルエステルという物質を用意した。これは、ピレンの部分がグラフェンと π スタッキングを形成して結合し、スクシンイミドの部分がアプタマーの 5' に修飾したアミノ基と結合することで、グラフェン上にアプタマ

Fig. 7. (color online). AFM images of the graphene FET before and after aptamer functionalization, and their height profiles are also shown.

ーを固定することができる。この手法はグラフェン表面に欠陥を導入することなく、様々なレセプター材料を固定化することができる。

Fig. 7 に修飾前後で観測した原子間力顕微鏡 (AFM) の結果を示す。修飾前には電極間に高さ約 0.4 nm ほどの構造物が観測されており、単層のグラフェンがチャネルとなっていることがわかる。他方、修飾処理後において、チャネル部分のみのコントラストが大きくなっていることが一見してわかる。構造物の高さは 3~4 nm であることから、アプタマーがグラフェンチャネル上のみ、固定化されていることがわかる。

アプタマーの修飾は、グラフェン FET の溶液ゲートからの電気特性にも明確な変化を引き起こす。**Fig. 8** に修飾前後での伝達特性を示した。アプタマー修飾後、伝達特性が大きく正電圧側にシフトしていることがわかる。アプタマーは DNA であるために、ヌクレオチド内のリン酸が溶液中では必ず電離する。結果、DNA は溶液中では常に負に帯電している。**Fig. 8** に示された結果はグラフェン上に負に帯電した物質が存在することを示しており、アプタマーが修飾されたことを示唆している。さらに、修飾前後で伝達特性の傾きに変化がほとんどないことから、この手法は欠陥を導入しないこともわかった。

作製したアプタマー修飾グラフェン FET を用いて、特定のタンパク質を実際に検出できるか実験を行った。**Fig. 9** にアプタマー修飾グラフェン FET のドレイン電流の時間依存性を示す。10, 30 分後にアプタマーとは結合しない BSA, SA をほぼ 100 nM になるように投入しても電流は変化を示さなかったのに対し、50 分後にターゲットである IgE を投入すると電流値が急激に減少し

Fig. 8. (color online). Drain current versus top gate voltage characteristics of the graphene FET before and after aptamer functionalization.

Fig. 9. (color online). Time course of the drain current for the aptamer-modified graphene FET.

ていることがわかる。Fig. 6 に示した何も修飾していないグラフェン FET の場合と比較すると明らかなように、ターゲットである IgE のみにドレイン電流は反応し、アプタマー修飾グラフェン FET を用いた特定タンパク質の検出に成功したことがわかった。

また、アプタマーとターゲット IgE が結合しているかどうか調べるために、アプタマー修飾グラフェン FET を用いて、ターゲット IgE の濃度に対する反応を調べた。Fig. 10 (a) に、アプタマー修飾グラフェン FET のドレイン電流の時間依存性を示す。10 分経過ごとに異なる濃度のターゲット IgE を含む溶液を滴下すると、電流値は階段状に減少していることがわかる。この結果か

Fig. 10. (color online). (a) Time course of the drain current of the aptamer-modified graphene FET. Ever after 10 min, various concentration of IgE was added. (b) IgE concentration dependence of the drain current change.

ら、滴下した IgE の濃度に対する電流の変化量をプロットしたものが Fig. 10 (b) である。ドレイン電流は、IgE 濃度が低い場合には大きく変化しているが、IgE 濃度が高くなってくると電流値の変化は飽和していく傾向が見られる。これらのことは、この反応が Langmuir の吸着等温式 (1) でフィッティングすることが可能であることを示している。

$$\frac{\Delta I}{\Delta I_{\text{MAX}}} = \frac{C_{\text{IgE}}}{C_{\text{IgE}} + K_D} \quad (1)$$

ここで、 ΔI は電流の変化量、 ΔI_{MAX} は電流の変化量の最大値、 C_{IgE} は IgE 濃度、 K_D は解離定数を示す。Fig. 10 (b) に点線でフィッティングした曲線を示した。見積もられた K_D は 47 nM であった。アプタマーを用いた IgE 検出はいくつか報告されており、たとえば水晶振動子マイクロバランス測定法⁵⁾では $K_D = 3.6 \sim 8.4$ nM、キャピラリー電気泳動法⁶⁾では、29 nM、光学検出⁷⁾では 46

Fig. 11. (color online). Schematic illustrations of the whole antibody and fragment antigen-binding (Fab).

nM, カーボンナノチューブ FET⁸⁾では 1.9 nM, 傾斜フリーフロー電気泳動法⁹⁾では 48 nM という値が報告されている。我々のアプタマー修飾グラフェン FET で得られた 47 nM という値は, これまでの報告のものと比較して同等のものであることから, アプタマーと IgE の反応を反映しているものだと考えられる。

3.4 フラグメント抗体の利用

グラフェン FET はレセプターを修飾することで, 特定タンパク質を検出可能であることはわかったが, 実用化を考えた場合, 選択性が大きなアプタマーはそれほど多く発見されていないという問題点がある。今後様々な腫瘍マーカーを検出できるようにするためには, 抗体をレセプターとして利用できるようにしなければならない。しかしながら, 3.3 節で述べたように, 電気二重層の中で反応を起こさなければ検出が難しいため, 大きさが 10~15 nm ある抗体は FET を用いたセンサでは検出が困難になる。近年, グラフェン FET を用いたバイオセンサの次のステップとして, 抗体を用いたセンサの開発を試みている。

抗体は Fig. 11 に示すように, アルファベットの Y 字型の構造をした生体分子である。抗体は二つの Fab (Fragment antigen-binding) と一つの Fc (Fragment crystallizable) から構成されている。このうち, ターゲット分子と結合するのは Fab であり, Fab だけであれば大きさは 3~5 nm と非常に小さい。この Fc と Fab は糖鎖で結合されており, この糖鎖は Papain という酵素で切断できることが知られている。

本研究では熱ショックタンパク質 (Heat shock protein, HSP) のフラグメント抗体を用意し, 実験を行った。アプタマーと同様の手法で Fab を修飾し, ターゲット HSP に反応するかどうかを確認した。Fig. 12 にドレイン電流の時間依存性を示す。10 分ごとに異なるターゲット HSP 濃度を滴下したときの反応を示している。アプタマーの結果と同様に, ターゲット HSP に対してドレイン電流が反応していることがわかる。このことより, Fab はグラフェン FET を用いたバイオセンサにおいてレセプターとして利用できることを示唆している。

Fig. 12. (color online). Time course of the drain current of the Fab-modified graphene FET.

4. ま と め

本稿ではグラフェンをチャンネルとした FET を利用したセンサについて述べた。グラフェン FET は溶液の pH, タンパク質の電荷に対して反応を示し, レセプターをグラフェン上に修飾することでバイオセンサとして利用できることを示した。グラフェンは高移動度が注目されているが, 半金属である故に電流が Off の状態を実現することが難しいため, 高速デバイスとしての利用は難しいとされている。しかしながら, 本稿で述べたようなセンサの応用であれば, その高移動度を如何なく発揮することができるため, 応用として適していると考えられる。

文 献

- 1) Y. Ohno, K. Maehashi, Y. Yamashiro and K. Matsumoto : Nano Lett. **9**, 3318 (2009).
- 2) Y. Ohno, K. Maehashi and K. Matsumoto : Biosens. Bioelectron. **26**, 1727 (2010).
- 3) Y. Ohno, K. Maehashi and K. Matsumoto : J. Am. Chem. Soc. **132**, 18012 (2010).
- 4) S. Okamoto, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue and K. Matsumoto : Jpn. J. Appl. Phys. **51**, 06FD08 (2012).
- 5) M. Liss, B. Petersen, H. Wolf, E. Prohaska : Anal. Chem. **74**, 4488 (2002).
- 6) S.D. Mendonsa and M.T. Bowser : Anal. Chem. **76**, 5387 (2004).
- 7) E. Katilius, Z. Katiliene and N.W. Woodbury : Anal. Chem. **78**, 6484 (2006).
- 8) K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto and E. Tamiya : Anal. Chem. **79**, 782 (2007).
- 9) R.T. Turgeon, B.R. Fonslow, M. Jing and M.T. Bowser : Anal. Chem. **82**, 3636 (2010).