グラフェン電界効果トランジスタを基盤としたバイオセンサ[†]牛場翔太^{1,*}・宮川成人¹・沖野剛士¹・品川 歩¹・岡 優果¹
木村雅彦¹・小野堯生^{2,3}・金井 康²・井上恒一²・松本和彦²¹ 株式会社村田製作所 ☎ 617-8555 京都府長岡京市東神足 1 丁目 10 番 1 号² 大阪大学産業科学研究所 ☎ 567-0047 大阪府茨木市美穂が丘 8-1³ 科学技術振興機構さきがけ ☎ 332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

(2020 年 2 月 14 日受付 ; 2020 年 4 月 17 日掲載決定)

Biosensing Platforms Based on Graphene Field Effect Transistors

Shota USHIBA^{1,*}, Naruto MIYAKAWA¹, Tsuyoshi OKINO¹, Ayumi SHINAGAWA¹, Yuka OKA¹,
Masahiko KIMURA¹, Takao ONO^{2,3}, Yasushi KANAI², Koichi INOUE² and Kazuhiko MATSUMOTO²¹ Murata Manufacturing Co., Ltd., 1-10-1 Higashikotari, Nagaokakyo-shi, Kyoto 617-8555² Osaka University, Ibaraki, Osaka 567-0047³ JST, PRESTO, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012

(Received February 14, 2020 ; Accepted April 17, 2020)

Since ion-sensitive field effect transistors (ISFETs) have been developed in 1970, much attention has been focused on FET-based biosensors. In particular, graphene is one of the promising candidates for FET-based biosensors owing to their high electron/hole mobilities and unique 2D nature. Herein, we report specific detection of biomolecules using sialylglycopeptide-modified graphene FET (G-FET) biosensors. In addition, we also present state-space models (SSMs) to analyze time-series data of G-FET biosensors. This computational approach helps to separate the response against target biomolecules from the baseline drifted data. G-FET biosensors open the door to a more versatile sensing platform for biomolecules and biological functions.

KEYWORDS : graphene, field effect transistors, biosensors, lab on a chip, state-space modeling

1. は じ め に

1970 年に初めてイオン感応膜性電界効果トランジスタ (Ion-sensitive field effect transistor, ISFET) が報告されてから、2020 年でちょうど 50 年である。最初に報告した P. Bergveld は、ISFET が固液界面の表面電荷に応答するという特長を活かし、局所的なイオン活量の測定や神経活動を測定するセンサとして ISFET を報告した¹⁾。そして最初の報告から数年後には、ISFET を用いて細胞の単相パルス²⁾や 2 相パルス³⁾の測定を行った。電気生理学的なセンサとしての立場を確立した ISFET は、生体分子の

検出にも適用された。多くの生体分子は水溶液下で表面に電荷を帯びており、ISFET でそれらの電荷を検出することで生体分子のセンシングが可能となる。

初期の ISFET は半導体材料としてシリコンを用いたセンサが主流であった。現在では、シリコンだけでなく、グラフェン⁴⁾、シリコンナノワイヤ⁵⁾、カーボンナノチューブ⁶⁾、二硫化モリブデン⁷⁾といったナノ材料を用いた ISFET も提案されている。これら新奇材料を ISFET に用いることで、aM (10^{-18} M) オーダーの極微量の生体分子も検出されている⁸⁾。さらに、ISFET の特長として、非標識 (ラベルフリー) かつ高速な検出、さらには、半導体技術を活かした小型化及び高集積化が可能であることが挙げられる。こうした特長を活かして、ISFET の検出対象は、DNA⁹⁾、糖¹⁰⁾、イオン⁴⁾、タンパク

[†]2019 年日本表面真空学会学術講演会 (2019 年 10 月 28 日 ~ 30 日) にて発表

* E-mail : shota.ushiba@murata.com

質^{11, 12)}, 抗体¹³⁾, 細胞¹⁴⁾, 細菌¹⁵⁾, ウイルス¹⁶⁾など様々な生体分子にまで広がっている。現在, ISFET は学術及び産業分野の両分野において積極的に研究開発が進められるデバイスとなっている。

我々は, 単層グラフェンを用いたグラフェン FET (G-FET) バイオセンサの研究を進めている。単層グラフェンは, ハニカム構造状に配列した炭素原子一層からなる材料である。単層グラフェンは, 2004 年に Andre Geim と Konstantin Novoselov らによって粘着テープを用いてグラファイトから機械的に剥離する方法で作製された¹⁷⁾。機械剥離グラフェンは高品質なグラフェンが得られるが, 層数や位置の制御が困難であり, 機械剥離グラフェンを安定的に量産する技術は未だ確立していない。一方で, グラフェンを化学気相成長法 (chemical vapor deposition, CVD) で合成する方法は, 2008 年になって報告された¹⁸⁾。この報告以降, CVD 法を用いて, より高品質, より大面積, より低コストでグラフェンを合成する研究開発が積極的に進められている。最近ではロール to ロール方式でのグラフェンの連続合成¹⁹⁾や, ウェハーサイズの単結晶グラフェンの合成²⁰⁾といった大面積かつ高品質な CVD グラフェンの合成も報告されている。

単層グラフェンは, 構成する全ての原子が表面と接しているため, 表面の電荷変化を“直接的”に感じ, 電気特性が変化する。一方で, 従来用いられているシリコンは表面が酸化膜で覆われており, 表面の電荷変化を“間接的”に感じる。そのため, グラフェンはシリコンと比較して, より鋭敏に生体分子の電荷に対して応答することが期待できる。また, グラフェンは $200000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ という高いキャリア移動度を有する²¹⁾。この値は室温でのシリコンのキャリア移動度と比べて遥かに大きい値である。ISFET 型のバイオセンサでは, センサ出力となるコンダクタンスの変化量は移動度と比例する。そのため, グラフェンを用いることで ISFET の高感度化が期待できる。

我々はこれらグラフェンの特長を活かして, G-FET を用いたイオン⁴⁾, タンパク質^{11, 12)}, 細菌¹⁵⁾の検出や, グラフェンを用いて荷電分子の分布を可視化するイメージセンサ²²⁾を報告してきた。また, 我々は G-FET バイオセンサの課題であるドリフトの解決にも取り組んできた²³⁾。グラフェンは表面敏感であるため, 検出対象とする生体分子の吸着以外にも僅かな環境変化や, 溶液に含まれる他の分子 (夾雑物) の吸着にも応答する。FET 周囲の環境は常に一定ではないため, FET の電気特性は検出対象分子がなくとも経時的にベースラインがドリフトすることがある。そのため, G-FET バイオセンサでは, 検出対象分子に対する応答と, それ以外の応答を分離する必要がある。我々は状態空間モデル (state space model, SSM) を用いて G-FET バイオセンサの動的応答をシグナルとドリフトに分離する手法を開発した。本稿では, 我々が開発を進める糖鎖修飾 G-FET バイオセンサと, SSM を用いた G-FET の動的応答の解析について述べる。

2. デバイスの構造と検出原理

我々が開発している G-FET バイオセンサの基本構造を説明する。単層グラフェンは, 機械剥離グラフェン, もしくは CVD グラフェンを用いた。単層グラフェンは Si/SiO₂ 基板上に転写し, Ni/Au もしくは Ti/Au をソース/ドレイン電極として配線した。Fig. 1 (a) にデバイスの一例として, CVD グラフェンを用いて作製したデバイスの光学顕微鏡写真を示す。Fig. 1 (b) に示すように, グラフェン上を緩衝液で満たし, 緩衝液に銀/塩化銀電極を浸して電気二重層を介してグラフェンのキャリア密度を変化させた。Fig. 1 (c) に典型的なグラフェン FET の伝達特性を示す。グラフェンはバンドギャップがなく, ゲート電圧を負側から正側へと掃引すると, ホール電流から電流値が極小となる電荷中性点 (charge

Fig. 1. (color online). (a) A bright field image of a G-FET biosensor. (b) Schematic of a G-FET biosensor. (c) A typical I_{DS} - V_{GS} plot. (ref. 23) Copyright (2019) The Japan Society of Applied Physics.

neutrality point, CNP) を通って電子電流へとシームレスに切り替わる。グラフェン上に検出対象分子が吸着すると、分子の有する電荷によって G-FET の伝達特性が変化する。G-FET では、この伝達特性の変化をシグナルとして捉える。これが G-FET バイオセンサの原理である。但し、グラフェンの伝達特性は吸着した電荷を有する全ての分子に対して応答して変化する、つまり応答に特異性がない。そのため、検出対象分子を選択的に検出するには、G-FET に特異性を付与する必要がある。我々はグラフェン上に糖鎖を修飾した G-FET を作製し、糖鎖と特異的に結合する分子を選択的に検出した。次章でそれについて述べる。

3. 糖鎖修飾 G-FET による生体分子の検出¹¹⁾

糖鎖は文字通り“糖”が“鎖”のように連なった高分子であり、生体内でタンパク質の認識といった役割を担っている。我々は末端がシアル酸の糖鎖がペプチドに結合したシアリルグリコペプチド (sialylglycopeptide, SGP) をグラフェン上に修飾した。SGP は $\alpha 2,6$ 型と $\alpha 2,3$ 型の 2 種類の糖鎖を用いた。 $\alpha 2,6$ 型の糖鎖はヒトの細胞上に、また $\alpha 2,3$ 型はトリの細胞上に多く存在するため、本稿ではそれぞれをヒト型糖鎖とトリ型糖鎖と呼ぶ。SGP を修飾するグラフェンには機械剥離グラフェンを用いた。SGP はグラフェン上に 1-ピレンブタン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (1-Pyrenebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester, PBASE) を介して固相化した。具体的には、グラフェンと PBASE のピレン骨格との π - π 相互作用を用いて PBASE を固相化し、PBASE の NHS エステルと SGP のアミノ基とをアミド化させた。上記プロセスでヒト型糖鎖及びトリ型糖鎖をグラフェン上に固相化することが可能である。

Fig. 2 (a) に SGP 修飾の各ステップの G-FET の伝達特性を示す。PBASE 修飾後、伝達特性は正側にシフトし、SGP 修飾後にはさらに正側にシフトした。この結果は、グラフェン上に修飾した PBASE 及び SGP の電荷によって伝達特性がシフトしたことを示している。さらに、グラフェン上に SGP が固相化されたことを原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy, AFM) 像を大気中で測定して確かめた。Fig. 2 (b) に SGP 修飾前後の G-FET の AFM 像と断面プロファイルを示す。SGP 修飾前は高さ約 0.32 nm であったのに対し、SGP 修飾後には高さ約 2.3 nm となった。電気測定の結果と同様に、この結果はグラフェン上に SGP が固相化されていることを示している。

SGP 修飾後、グラフェン上への生体分子の非特異的な吸着を抑制する目的でウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) でブロッキングした。ヒト型糖鎖とトリ

Fig. 2. (color online). (a) Transfer characteristics of a G-FET with bare graphene (black dashed-dotted line), PBASE-modified graphene (red dashed line) and SGP-modified graphene (blue solid line). (b) AFM images of graphene channels in air and their height profiles at the edge of the channels (white solid lines). (ref. 11) Copyright (2017) The Japan Society of Applied Physics.

型糖鎖とそれぞれ特異的に結合する生体分子として、ニホンニワトコ (*Sambucus sieboldiana*, SSA) 由来とイヌエンジュ (*Maackia amurensis*, MAM) 由来のレクチンを用意した。ヒト型糖鎖とトリ型糖鎖を修飾したそれぞれの G-FET 上に SSA レクチン, MAM レクチン, またコントロールとして BSA を滴下した。Fig. 3 に、そのときの G-FET バイオセンサの電流値の変化量を示す。Fig. 3 から、SSA レクチンはヒト型糖鎖に、MAM レクチンはトリ型糖鎖に結合し、G-FET を流れる電流値が変化したことが分かる。また、コントロールとして用いた BSA は共に電流値が変化しなかった。この結果は、糖鎖修飾 G-FET が生体分子に特異的に応答したことを示している。また、SSA レクチンと MAM レクチンの検出下限はそれぞれ 130 pM と 150 pM 以下であった。これらの結果は、G-FET バイオセンサは生体分子を特異的かつ高感度で検出可能であることを示している。

4. G-FET バイオセンサの状態空間モデル²³⁾

1 章で述べたように、G-FET バイオセンサの伝達特性は、ターゲット分子の吸着の影響のみでなく、イオン濃

Fig. 3. (color online). (a) Correlation between SSA lectin, MAM lectin and BSA concentrations and (b) avian-type SGP(α 2-3) modified G-FET. The drain current change (ΔI) is normalized by the transconductance (g_m). (ref. 11) Copyright (2017) The Japan Society of Applied Physics.

度, 温度, pH といった環境の僅かな変化も反映される。そのため, G-FET バイオセンサの時系列データを, ターゲット分子への応答とベースラインに分離する必要がある。本章では, 状態空間モデルを用いた G-FET バイオセンサの動的応答の解析について述べる。

Fig. 4 に G-FET の CNP の動的応答と, そのときに G-FET 上に検出対象分子として間欠的に滴下した BSA 濃度の時系列データを示す。このとき使用したデバイスは, CVD グラフェンを用いて作製した。G-FET 上に BSA を滴下する前の状態でも CNP は一定ではなく, 徐々に負側にシフトした。つまり, ドリフトが生じていることを示している。そのため, G-FET の BSA に対する応答を評価するには時系列データからドリフトを分離する必要があることが分かる。

我々は, ドリフトがある G-FET バイオセンサの時系列データから, 検出対象分子への応答を分離する方法として, SSM を用いた。SSM は時系列データの解析に用いられるフレームワークの一つである。G-FET バイオセンサの時系列データを解析するために, 式 (1)–(6)

Fig. 4. (color online). (a) Time-series data of the CNP against BSA. The arrows indicate the time at which BSA was introduced to the sensor. (b) Time-series data of the BSA concentration during the measurement. (ref. 23) Copyright (2019) The Japan Society of Applied Physics.

で表される SSM を構築した。**Fig. 5** (a) に構築した SSM のグラフィカルモデルを示す。構築した SSM では, 得られた CNP の時系列データ (y_t) は, ベースライン (x_t) と BSA への応答量 (q_t) と観測ノイズ (ε_t) の和で表される (式 (1)) とし, 次の四つの仮定を含んでいる。

(i) ベースライン (x_t) のドリフトは二階差分トレンドに従う (式 (2)), (ii) 応答量 (q_t) は指数関数的に定常状態に漸近する (式 (3)–(4)), (iii) BSA 濃度 (c_t) に対する応答量 (Q_t) はラングミュアの吸着等温式に従う (式 (5)), (iv) 応答速度 (τ_t) は BSA 濃度 (c_t) の対数と相関する (式 (6))。

$$y_t = x_t + q_t + \varepsilon_t, \quad \varepsilon_t \sim N(0, \sigma_\varepsilon) \quad (1)$$

$$x_t - x_{t-1} = x_{t-1} - x_{t-2} + w_t, \quad w_t \sim N(0, \sigma_w) \quad (2)$$

$$q_t = \sum_{i=1}^N \Delta q_i \quad (3)$$

$$\Delta q_i = \begin{cases} 0 & (t < t_i) \\ (Q_i - Q_{i-1})\{1 - \exp(-t - t_i/\tau_i)\} & (t \geq t_i) \end{cases} \quad (4)$$

Fig. 5. (color online). (a) Graphical model of the SSM. (b) Trace plots of four chains for K_D . (c) The posterior distribution of K_D calculated from (b). (ref. 23) Copyright (2019) The Japan Society of Applied Physics.

$$Q_i = \frac{ac_i}{K_D + c_i} \quad (5)$$

$$\tau_i = A \log(c_i) + B + \omega_i, \quad \omega_i \sim N(0, \sigma_\tau) \quad (6)$$

構築したSSMをFig. 4 (a)の時系列データに当てはめ、SSMのモデルパラメータ(解離定数 K_D など)、ベースライン(x_t)、応答量(q_t)、観測ノイズ(ε_t)をマルコフ連鎖モンテカルロ法(Markov chain Monte Carlo, MCMC)²⁴⁾で推定した。一例として、Fig. 5 (b)に K_D のMCMCサンプリングの結果を示す。四つのトレースプロットは重なっており、適切にサンプリングされたことを示している。また、Fig. 5 (b)のヒストグラムが K_D の事後分布に対応する(Fig. 5 (c))。Fig. 5 (c)に示した事後分布から、 K_D の平均値及び95%ベイズ信用区間はそれぞれ151 nMと(85 nM, 257 nM)と算出された。同様に、G-FETのベースライン(x_t)とBSAへの応答(q_t)も推定した。Fig. 6 (a) (b)では、推定した x_t と q_t 、及びその95%ベイズ信用区間を可視化している。また、推定したパラメータを用いてBSA濃度(c_i)に対する応答量を算出することも可能である(Fig. 6 (c))。

式(1)–(6)で表されるSSMはドリフトが二階差分

Fig. 6. (color online). (a) Measurement data of CNP (red) and estimated baseline (x_t) (black). (b) The response to BSA. (c) The G-FET biosensor response against BSA as a function of the concentration (c_i). (ref. 23) Copyright (2019) The Japan Society of Applied Physics.

であることを仮定している。同様に、ドリフトの傾きが一定と仮定するSSMと、ドリフトが一階差分であると仮定するSSMを構築し、Fig. 4 (a)の時系列データに当てはめた。これら複数のSSMの中から最も適切なSSMを選択するために、広く使えるベイズ情報量規準(widely applicable Bayesian information criterion, WBIC)²⁵⁾を計算した。WBICは、適切なモデルを選択するための一つの指標であり、WBICが低い値である方が適切なモデルであることを示唆する。WBICを計算した結果、二階差分ドリフトを仮定したモデルが、構築したSSMの中でG-

FETの動的応答を説明するのに最も適したモデルであることが分かった。SSMを用いた動的応答の解析は、G-FETに限らず他のISFETにも適用可能である。そのため、本手法はISFETの可能性をさらに高められると考える。

5. ま と め

本稿では、糖鎖修飾G-FETによる生体分子の選択的検出と、SSMを用いたG-FETの動的応答の解析について報告した。グラフェンの表面には様々なレセプター分子を修飾することが可能であり、目的に応じたターゲット分子を高感度かつ特異的に検出することが可能である。グラフェンはバイオセンシングのプラットフォームとして期待される材料であり、今後ますます世界中で産業化を目指した取り組みが進められるので、我々はそこに貢献していく。

謝 辞

本研究は京都府立医科大学の渡邊洋平先生、中部大学の鈴木康夫先生、河原敏男先生、香川大学の中北愼一先生にご協力を頂き、感謝の意を表します。本研究はJST CREST (JPMJCR15F4) の支援を受けた。

文 献

- 1) P. Bergveld : *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **BME-17**, 70 (1970).
- 2) P. Bergveld : *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **BME-19**, 342 (1972).
- 3) P. Bergveld, J. Wiersma and H. Meertens : *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **BME-23**, 136 (1976).
- 4) Y. Ohno, K. Maehashi, Y. Yamashiro and K. Matsumoto : *Nano Lett.* **9**, 3318 (2009).
- 5) E. Stern, J.F. Klemic, D.A. Routenberg, P.N. Wyrembak, D.B. Turner-evans, A.D. Hamilton, D.A. Lavan, T.M. Fahmy and M.A. Reed : *Nature* **445**, 519 (2007).
- 6) S. Boussaad, N.J. Tao, R. Zhang, T. Hopson and L.A. Nagahara : *Chem. Commun.* **13**, 1502 (2003).
- 7) D. Sarkar, W. Liu, X. Xie, A.C. Anselmo, S. Mitragotri and K. Banerjee : *ACS Nano* **8**, 3992 (2014).
- 8) S.J. Park, O.S. Kwon, S.H. Lee, H.S. Song, T.H. Park and J. Jang : *Nano Lett.* **12**, 5082 (2012).
- 9) G. Xu, J. Abbott, L. Qin, K.Y.M. Yeung, Y. Song, H. Yoon, J. Kong and D. Ham : *Nat. Commun.* **5**, 4866 (2014).
- 10) X. You and J.J. Pak : *Sens. Actuators, B* **202**, 1357 (2014).
- 11) T. Ono, T. Oe, Y. Kanai, T. Ikuta, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, Y. Watanabe, S. Nakakita, Y. Suzuki, T. Kawahara and K. Matsumoto : *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**, 030302 (2017).
- 12) Y. Kanai, Y. Ohmuro-Matsuyama, M. Tanioku, S. Ushiba, T. Ono, K. Inoue, T. Kitaguchi, M. Kimura, H. Ueda and K. Matsumoto : *ACS Sens.* **5**, 24 (2020).
- 13) M. Hinnemo, A. Makaraviciute, P. Ahlberg, J. Olsson, Z. Zhang, S.-L. Zhang and Z.-B. Zhang : *IEEE Sens. J.* **18**, 6497 (2018).
- 14) H. Xie, Y. Li, Y. Lei, Y. Liu, M. Xiao, C. Gao, D. Pang, W. Huang, Z. Zhang and G. Zhang : *Anal. Chem.* **88**, 11115 (2016).
- 15) T. Ono, Y. Kanai, K. Inoue, Y. Watanabe, S. Nakakita, T. Kawahara, Y. Suzuki and K. Matsumoto : *Nano Lett.* **19**, 4004 (2019).
- 16) F. Patolsky, G. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. Zhuang and C.M. Lieber : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14017 (2004).
- 17) K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva and A.A. Firsov : *Science* **306**, 666 (2004).
- 18) Q. Yu, J. Lian, S. Siriponglert, H. Li, Y.P. Chen and S. Pei : *Appl. Phys. Lett.* **93**, 113103 (2008).
- 19) S. Bae, H. Kim, Y. Lee, X. Xu, J.-S. Park, Y. Zheng, J. Balakrishnan, T. Lei, H.R. Kim, Y. Il Song, Y.-J. Kim, K.S. Kim, B. Özyilmaz, J.-H. Ahn, B.H. Hong and S. Iijima : *Nat. Nanotechnol.* **5**, 574 (2010).
- 20) J.-H. Lee, E.K. Lee, W. Joo, Y. Jang, B. Kim, J.Y. Lim, S. Choi, S.J. Ahn, J.R. Ahn, M. Park, C. Yang, B.L. Choi, S. Hwang and D. Whang : *Science* **344**, 286 (2014).
- 21) K.I. Bolotin, K.J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim and H.L. Stormer : *Solid State Commun.* **146**, 351 (2008).
- 22) S. Ushiba, T. Ono, Y. Kanai, K. Inoue, M. Kimura and K. Matsumoto : *ACS Omega* **3**, 3137 (2018).
- 23) S. Ushiba, T. Okino, N. Miyakawa, T. Ono, A. Shinagawa, Y. Kanai, K. Inoue, K. Takahashi, M. Kimura and K. Matsumoto : *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**, SGGH04 (2020).
- 24) B. Carpenter, A. Gelman, M.D. Hoffman, D. Lee, B. Goodrich, M. Betancourt, M.A. Brubaker, P. Li and A. Riddell : *J. Stat. Softw.* **76**, 1 (2017).
- 25) S. Watanabe : *J. Mach. Learn. Res.* **14**, 867 (2013).