

博士論文（要約）

分子動力学法による  
半導体/バイオインターフェイス構造の解明

平成 27 年 6 月

前川 侑毅

生物学研究のみならず疾患の診断や創薬などの医学分野において、簡便で高感度なバイオセンサが活用され、その性能改善と新たな原理の提案が期待されている。バイオセンサは、ターゲットとなる生体分子、生体分子が持つ固有の情報をシグナルとして変換するインターフェイス、そのシグナルを検出するトランスデューサの三要素から構成されている。中でも半導体を基本原理としたFET(Field Effect Transistor)バイオセンサは、電界効果に基づき、生体分子固有の電荷を直接計測できるバイオセンサである。生体の機能は、イオンや生体分子が持つ電荷が大きな役割を果たしていることが多く、これらの電荷を容易に計測できるFETバイオセンサは、生体機能を測定する素直な方法であると考えられる。FETバイオセンサは、酸化膜、生体分子、溶液が一体となった半導体/バイオインターフェイス構造を形成し、その理解はFETバイオセンサの検出にとって必要不可欠となる。しかしながら、3つの状態が混在した半導体/バイオインターフェイス構造を実験的に解明することは難しく、これまで詳細な研究がなされていないのが実情であった。そこで本研究では、コンピュータ上に半導体/バイオインターフェイス構造を再現し、古典分子動力学 (Molecular Dynamics; MD)シミュレーションによって、水やイオン、DNAなどの振る舞いを実時間スケールで追跡し、半導体/バイオインターフェイス構造を明らかにすることを目的とした。また、シミュレーションにより予測される半導体/バイオインターフェイス構造を、これまでのFETバイオセンサを用いた実験結果と照らし合わせることにより、界面構造および検出原理の再検討を試みた。

本研究は大きく4つの観点から構成される。

#### ○濃厚NaCl溶液におけるSiO<sub>2</sub>界面に形成される電気二重層構造の調査

まず、半導体/バイオインターフェイス構造における固液界面に着目し、MD法によりSiO<sub>2</sub>界面に形成される電気二重層構造についての調査を行った。また細胞機能計測などにおいては、溶液のイオン強度が高くなるため、濃厚溶液の電気二重層構造が重要になる。従って、0.5 Mから5.0 Mの領域のNaCl水溶液とSiO<sub>2</sub>の界面モデルシミュレーションセルを作製し、MD計算を行った。各直方体固液界面セルに対して、最急降下法と共役勾配法により平衡化を行った後、3.0 nsのMD計算を行った。温度はNoseの熱浴を用いて、300 Kに制御し、セルの境界は周期的境界条件により定義した。力場はCOMPASSを使用した。SiO<sub>2</sub>は、数万個のシミュレーションにおいて電気二重層構造を形成し、かつFETバイオセンサで測定溶液に用いる中性溶液に可能な限り近いpH = 5.5を選択し、SiO<sub>2</sub>表面上にSiOHとSiO<sup>-</sup>を5:1の割合でランダムに挿入することでpHを再現した。SiO<sub>2</sub>基板に対して垂直方向をz方向と定義し、z方向に対する各物性値を解析した。

水分子は、SiO<sub>2</sub>界面に3-4層の層構造を形成した。水分子の酸素原子と水素原子の分布に差異が生じており、水分子が配向性を持っていることが示唆され、実際に水分子の双極子モーメントの解析結果からも確かめられた。一方、Na<sup>+</sup>はSiO<sub>2</sub>界面に2層の層構

造を形成している. この2層の $\text{Na}^+$ は別種の $\text{Na}^+$ がそれぞれ層構造を形成しているのではなく, 同一の $\text{Na}^+$ の上下運動によって形成されることと示した. 更に, 水分子の双極子モーメントの配向は,  $\text{Na}^+$ の層を挟んで反転していることが確認でき, 水分子の $\text{Na}^+$ に対する水和により生じたものであると考えられた. また全原子の電荷を積算した電荷分布からポワソン方程式を解くことにより,  $z$ 方向の電位分布を求めた. 電位分布は3つの特徴的なドメインによって構成され, **Stern model**とは異なる分布を得た. 濃厚溶液の場合,  $\text{Na}^+$ と $\text{Cl}^-$ が**Bjerrum pair**を作ることによって完全に電離していない状況が生じたこと, およびイオンが界面においても水和されていることが大きく起因していると考えられた. すなわち, 濃厚溶液における電気二重層構造は, 水分子とイオンの個々の要素によって決定されるものではなく, 相互に関係し合っ形成されるものであることを示した. また, 計算から得られた $\text{SiO}_2$ 表面電位とFETバイオセンサにおける計測電位の $\text{Na}^+$ 濃度依存性に相関が見られ, シミュレーションの妥当性を述べ, 濃厚溶液における計測での留意点を提起した.

#### ○ $\text{SiO}_2/\text{B-DNA}/\text{NaCl}$ aqにおける半導体/バイointerフェイスの調査

次に,  $\text{SiO}_2$ 表面上にリンカー分子により10 merのB-DNAを固定化し, 周囲を1.0 Mの $\text{NaCl}$ 水溶液で充填することにより, 半導体/バイointerフェイス構造モデルを作成し, 分子動力学計算を実行した. 最急降下法と共役勾配法および昇温過程による分子動力学計算により平衡化を行った後, 300 Kで3.0 nsのMD計算を実行した. またほぼ同一サイズのDNAが固定されていない $\text{SiO}_2/\text{NaCl}$ aqの固液界面シミュレーションセルを作成し, 同様の条件で計算を行い, 結果を比較検討した.

DNAは3.0 nsの間, 二重螺旋構造を維持していた.  $\text{SiO}_2$ に固定化されたDNAは溶液中を漂うように運動するが, DNA自身は比較的rigidであるため, 屈曲は主としてリンカー部で生じた. DNAが固定されている場合とされていない場合, いずれにおいても負電荷を持つ $\text{SiO}_2$ 界面に $\text{Na}^+$ が集積しているのが確認された. 実際に,  $\text{SiO}_2$ 界面における水分子の水素原子と酸素原子, およびイオンの $z$ 方向に対する密度分布は, DNAの有無で変化しないことが分かった. 従って, 全原子由来の $\text{SiO}_2$ 界面における $z$ 方向の電荷分布も一致した. またDNAが存在する領域においても, DNAが多数の負電荷を有しているにも関わらず, 電荷分布は中性で一定となった. これは $\text{Na}^+$ がB-DNAの周囲に凝縮して, DNAの負電荷を完全に遮蔽されたためであると考えられたため, DNA周囲のイオン雰囲気場が, 固液界面に形成される電気二重層構造変化に重要であると結論づけた.

#### ○DNA周囲の溶液構造の調査

最後に, 生体分子と周囲の溶液との界面構造を調査するため, B-DNAを中央に固定し, 周囲をそれぞれ90 mMと923 mMの $\text{NaCl}$ 水溶液により充填した直方体セルを2種類作成した. DNAは周期的境界条件により無限遠長を持つと仮定し, DNA周囲に形成さ

れる水分子およびイオンの溶液構造についての調査を行った。平衡化の後、温度制御 300 Kで10 nsのMD計算を実行した。本項ではDNAの軸をz軸として円柱座標変換し、動径、偏角を定義した。

水分子は、DNAのリン酸基の周囲に水素結合して三次元的なshell構造を形成するだけでなく、DNAの溝に入り込んで、DNAの塩基とも水素結合しているという結果が得られた。一方、Na<sup>+</sup>はDNAが負電荷を持っているため、DNAの周囲に集積していた。集積したDNAはいずれのNaCl濃度においても、動径方向に対して2層の層構造を形成しており、SiO<sub>2</sub>界面に形成された層構造と類似の構造を得た。DNA周囲に形成された2層の構造も水分子との相互作用によって形成されたものであると考えられた。90 mMにおいてDNAの周囲に集積したNa<sup>+</sup>はDNAの総電荷に対して約70%であり、Manning-Oosawaの対イオン凝縮理論と良く一致した。加えて、90 mMの場合は、Na<sup>+</sup>が集積した凝縮相の外側には散漫なイオン雰囲気場が形成されていることが確認された。一方、923 mMにおいては、凝縮相でDNAの電荷を完全に遮蔽されるだけのNa<sup>+</sup>が集積しており、半導体/バイオインターフェイス構造におけるMD計算と矛盾しない結果が得られた。凝縮相の外側には、散漫なイオン雰囲気場は確認されないことから、濃厚溶液においてはDNAの電荷はカウンターイオンによって完全に遮蔽されていることが示された。

#### ○シミュレーション結果に基づく実験結果の再解釈

本研究におけるMD計算の結果に基づいて、FETバイオセンサによる先行実験結果の新たな解釈を提案した。20 merのDNAをSiO<sub>2</sub>表面に固定したときのFETバイオセンサによる電位変化の測定溶液濃度依存性を計測した実験 (Pouthas *et al.* Appl. Phys. Lett. 84 (2004) 1594) では、濃度変化前後でいずれも、FETバイオセンサの検出限界範囲とされる酸化物絶縁膜のデバイ長内にDNAが存在しているにも関わらず、電位変化量が減少するという結果が報告されている。本研究から、酸化物絶縁膜表面のデバイ長ではなく、DNA周囲のイオン雰囲気場が重要であるという示唆が得られたので、この実験結果と照合し、DNAの形成するイオン雰囲気場によりSiO<sub>2</sub>表面のプロトンおよびイオン配置を変更されることで、電位変化が生じているという説を提案した。この測定原理を磁性粒子に生体分子を固定し、FETバイオセンサ表面に粒子を接近させて電位変化量計測を行うというMolecular charge contact (MCC)法 (Miyazawa *et al.* Eur. Biophys. J. 43 (2014) 217) を用いて実証を試みた。Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>の酸化物表面とAuの金属表面に同様にストレプトアビジンとビオチンの複合体を固定化した磁気粒子を接近させた実験では、Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>表面ではビオチンの負電荷が計測できたが、Au表面では計測できなかった。Au表面はpHが計測できないという点でTa<sub>2</sub>O<sub>5</sub>表面と大きく異なっているため、FETバイオセンサの酸化物絶縁膜のプロトンの吸着脱離が電位変化量に大きく寄与していることが示唆され、その吸着脱離は生体分子のイオン雰囲気場が支配していると考

えられた。

また，DNAを磁性粒子に固定して希薄溶液と濃厚溶液でFETバイオセンサの電位変化量を計測した実験では，濃厚溶液の場合のみ電位変化が確認できなかった．従って濃厚溶液においては，シミュレーション結果と同様に，生体分子の電荷が遮蔽されFETバイオセンサの計測においては無視できる可能性が示唆された．この遮蔽効果は，幾つかの細胞培養環境中の計測（Otsuka *et al.* *Sci. Technol. Adv. Mater.* 13 (2012) 064217 and Sugimoto *et al.* *Jpn. J. Appl. Phys.* 53 (2014) 05FS02) においても確認されており，細胞培養環境下ではタンパク質などのマクロイオンの影響は無視できる可能性がある．

以上から，本研究は，古典MD法によりFETバイオセンサにおける複雑な界面現象を調査した研究であり，シミュレーション的手法が，バイオセンサにおける性能改善に大きな指針を与えるツールとして有用であることを示したと考えている．