

# ペプチドマトリックスを用いた化粧品香料の超高感度センシング

東京工業大学

田中 祐圭

In recent years, the development of ultra-sensitive sensing technology for volatile organic compounds (VOCs) has extended beyond environmental monitoring to encompass a wide range of applications including cosmetics and food quality inspection, body odor analysis, fatigue and stress marker detection, and hazardous substance detection. In response, there has been significant progress in the development of compact devices targeting various VOCs using semiconductor manufacturing technologies such as MEMS. However, existing VOC sensors like gas chromatography have been unable to meet the demands for real-time detection, miniaturization, and ultra-sensitivity. Therefore, this study aims to create an ultra-sensitive bioelectronics VOC sensor that meets inspection needs by integrating target recognition molecule design techniques with biosensing technology on two-dimensional atomic thin films. Initially, peptides binding to nonanal, a major component of cosmetic fragrances and a key contributor to aging odor, were explored. Functional materials capable of efficiently capturing nonanal were developed by modifying the surface of ZnO nanowire arrays with these peptides. Furthermore, graphene field-effect transistor (GFET) sensing using peptides binding to other aldehyde molecules identified previously, such as benzaldehyde, demonstrated ultra-sensitive VOC detection.

## 1. 緒言

近年、揮発性有機化合物 (VOC) の超高感度センシングが注目されている。これは、環境モニタリングだけでなく、化粧品や食品の品質検査、体臭の分析、疲労やストレスのマーカの検出、そして危険物の探知など、幅広い用途に期待されている (Chem Soc Rev. 2020;49:6364-401)。しかし、ガスクロマトグラフィーやイオンモビリティ質量分析などの既存の VOC センサは、リアルタイムの検出や小型化、超高感度などの検査ニーズに十分に答えられていない。

電解効果トランジスタ (FET) センサに用いられる電極表面では、溶液内のイオンが引き寄せられ、デバイ長と呼ばれる 10nm 程度の領域で電位の傾きが生じる。FET センサでは、この領域内に捉えた標的分子による微小な電位変化を検出することで高感度センシングが可能となる。したがって、センサ感度の向上には、グラフェンなどの電極表面に修飾される標的認識分子のサイズが重要である。しかし、一般的に利用される標的認識分子である抗体は、分子サイズが 10-15nm 程度と大きいため、既存の界面分子設計ではグラフェンがもつ優れた導電性を最大限活かしたセンシングを実現することが難しい状況である (図 1)。そのため、抗体と同等の標的認識能を有し、かつ抗

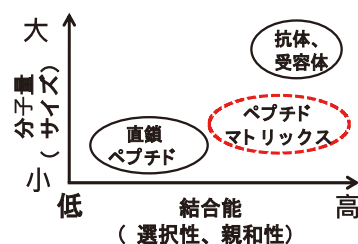


図1 ペプチドマトリックスがもつ分子特性と標的結合能の模式図

体よりもサイズの小さい分子設計が可能となれば、超高感度 VOC センサの開発が期待される。

これまで、申請者はアミノ酸が 5~20 程度繋がった様々な標的認識ペプチドについて研究を進めてきた<sup>1-3)</sup>。しかしながら、これらの直鎖ペプチドは一般に優れた保存安定性をもつものの、標的への特異性や親和性に課題がある。このため、申請者はシステインを両端に付与した機能性ペプチドを開発した。システインはチオール (SH) 基をもつため、このペプチドを材料表面に滴下すると、各ペプチド分子が S-S 結合により繋がった複雑な構造を形成する。このマトリックス構造を標的分子との結合界面に利用すると、サイズの大きい類似分子には結合せず、標的小分子を複数のペプチドで同時に捉えることが可能となる。実際に、このペプチドマトリックスを表面プラズモン共鳴 (SPR) センサ基板上で合成したところ、標的小分子トリニトロトルエン (TNT) に対して、抗体に匹敵する結合親和性 ( $KD=10.1$  nM) を示した<sup>4)</sup>。このような特性をもつペプチドマトリックスは、グラフェン FET による超高感度 VOC 検出に求められる理想的な界面分子となる。

そこで本研究では、これまでに開発を進めている標的認



Ultra-sensitive sensing of cosmetic fragrances using peptide matrices

Masayoshi Tanaka

Tokyo Institute of Technology

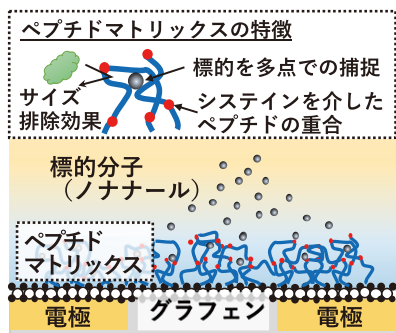


図2 開発するペプチドマトリックス修飾グラフェンFETによる超高感度VOCセンサの概要

識分子の設計技術を用い、検査ニーズを満たすこれまでにない超高感度VOCセンサを創出することを目的とした(図2)。

## 2. 方法

### 2.1. VOC結合ペプチドの探索

ノナフルエン結合性ペプチドの探索には、ファージディスプレイライブラリー (NEW ENGLAND BIOLABS, Phage display library kit) を使用した。最初に、カバーガラスをMilliQ水とエタノールで2回ずつ洗浄して70℃で1時間乾燥させた。次に70%エタノール中に0.1 Mの濃度となるようにノナフルエンを溶解し、洗浄したカバーガラスの上に400 μLスポットし、ガラス表面全体に引き伸ばした。その状態で30分間静置し、エタノールの蒸発とともにノナフルエンを吸着させた。その後、7残基のランダムペプチドを提示しているファージ溶液を滴下し、60分静置後、Tris buffered saline (TBS, pH7.4) で6回洗浄した。次に、Gly-HCl buffer (pH2.6) を500 μLをスポットし、20分間静置することで強固にノナフルエン修飾基板に吸着したファージを回収した。ファージDNAを回収しDNA配列を取得することで、ノナフルエン修飾基板に高い結合能をもつペプチド配列を同定した。

### 2.2. ZnOナノワイヤアレイの合成とペプチド修飾

シリコン基板の上にスパッタリングによってTi薄膜、Au薄膜、ZnO薄膜を順に形成し、完全に風乾させた後、窒素ガスで不純物を除いた。その後、0.9%のポリエチレンイミン、6mMヘキサメチレンテトラミン (HMTA)、24mM硝酸亜鉛六水和物をMilliQに溶解した反応液に基板を浸漬し、ナノワイヤアレイを伸長させた。伸長したナノワイヤアレイは、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察され、その表面積を算出した。

合成されたZnOナノワイヤアレイを同定されたノナフルエン結合性ペプチドで修飾した。具体的には、3-aminopropyl-tri-ethoxy-silane (APTES, 1%) を調製し、15分間超音波攪拌を行い、その後ZnOナノワイヤアレイ基板を浸漬し、30分間反応させた。反応後、MilliQに1回ディップし、100℃で1時間加熱することで焼結した。その後、基板をMilliQとエタノールでそれぞれ2回洗浄し、70℃で一晩乾燥させた(図3)。

ペプチド溶液 (5 mM in DMF)、HBTU 10 mM、DIEA 20 mM、となるよう各試薬を溶解し、アミノ基修飾したZnOナノワイヤアレイ基板を浸漬させ2時間反応させた。反応後、DMF、メタノールでそれぞれ4回洗浄し、風乾した。

主鎖を保護するFmoc基は、20%のpiperidineに50分間浸漬させることで脱保護した。脱保護した溶液は回収し、301 nmでの吸光度を測定することで、修飾されたペプチド量を定量した。

### 2.3. GC/MSによるペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイのノナフルエン捕捉量定量測定

作製したペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイのノナフルエン捕捉能を評価するために、飽和ノナフルエン蒸気 (p=49.3 Pa) に5分間暴露した。その後、GC/MSによって捕捉されたノナフルエン量を定量し、ペプチド修飾前後でのノナフルエン捕捉量を比較した。バイアル瓶の中に針金で籠を作り、ペプチド修飾基板を籠の内部に入れ、バイアル瓶に液体のノナフルエンを加えることにより、飽和ノナフルエン蒸

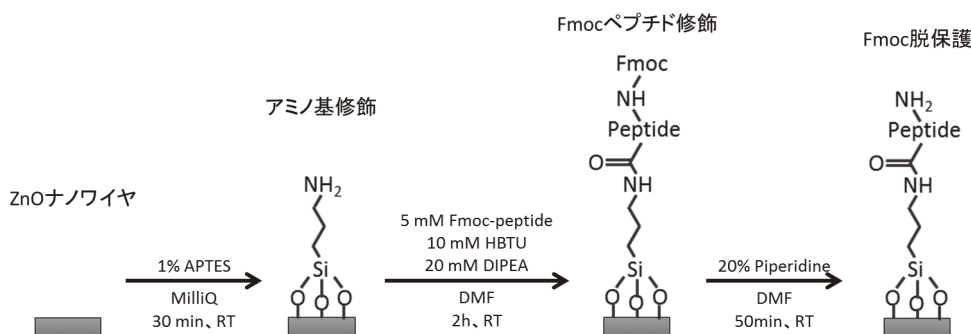


図3 ZnOナノワイヤアレイへのペプチド修飾方法

気にペプチド修飾ナノワイヤアレイ基板を暴露した。その後、400℃で20分加熱することで吸着したノナナールを脱離させ、GC/MSで気相内のノナナールを計測した。

## 2.4. ペプチドを利用したベンズアルデヒドのGFETセンシング

GFETを使用して、ペプチドの結合特性を評価した。単層グラフェンは熱化学気相合成法で合成され、リソグラフィ技術を用いてマイクロ電極を接触させることで、電気伝導を測定した。このGFETを電気化学セル中に設置することで、グラフェンに適宜電圧を印加することが可能となる。GFET表面に自己組織的にペプチドを修飾し、ベンズアルデヒドの結合応答をグラフェンの電気伝導率変化をもとにリアルタイム測定した。標的分子に対する標的分子の濃度依存性 (1 pM~10 nM) から結合特性を定量的に評価するとともに、電気伝導率の測度論的な解析を実施した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. ノナナール結合ペプチドの探索

ノナナール修飾基板に対して、ファージディスプレイライブラリーを用いたところ、今回解析した24クローンのうち、全ての配列がペプチドXであった。そのため、この配列Xは分子内に酸性アミノ酸も塩基性アミノ酸ももたず、分子内での構造を取りにくい、比較的自由度の高い疎水性な物性をもっていることが考えられた。今回標的とするノナナールは疎水性の強い炭化水素鎖の部分と、極性及びマイナスチャージが強いアルデヒド基を有している。そのため結合部位としては、ノナナールの分子サイズ (約アミノ酸3残基) 程度の疎水性の高い領域に対して結合していると考えられる。今回の配列Xのうち、N末端側にこのような特性に該当する領域があることから、この部位がノナナール結合領域であると考えられた。

### 3.2. ZnOナノワイヤアレイ合成とペプチド修飾

合成されたナノワイヤアレイのSEM画像からナノワイヤの直径と長さを算出したところ、それぞれ平均すると直径約500 nm、長さ約7μmと見積もられた。そこから算出される表面積は、基板1 mm<sup>2</sup>あたり約20 mm<sup>2</sup>である。このことから、ナノワイヤアレイ基板を用いることにより、ノナナール捕捉量が平板と比べて最大で20倍に向上する可能性が見込まれるが、現実にはナノワイヤアレイ間のスペースは物質移動が制限され、反応効率が低下すると考えられる。

ここで得られたナノワイヤアレイにペプチドXを修飾し、その密度を算出したところ、69.1 pmol/mm<sup>2</sup>であった。これは平面ガラス基板を用いた際の修飾密度11.2 pmol/

mm<sup>2</sup>と比較して約5倍の密度であった。これによりナノワイヤ構造により表面積を増加させることで単位面積あたりのペプチド修飾密度を向上できることが示された。一方で表面積としては20倍あるのに対して、修飾密度の向上は6倍程度であった。これは、ナノワイヤアレイ上部には比較的大きな間隙が存在するのに対し、根元付近では非常に密になっており、ペプチドなどの分子の物質移動が制限され、修飾効率が低下している可能性がある。ペプチドの分子サイズは、7残基ペプチドで1.5 nm程度であり、今回使用したナノワイヤアレイの間隙と比較すると十分小さな分子であるが、ナノワイヤ表面には活性点 (アミノ基) が無数に存在している点、静置して反応させていることから、物質移動が拡散による点を考慮すると、ナノワイヤ下部には未反応点がかかり存在する可能性がある。よりペプチド修飾密度の向上が求められた場合は、この辺りの検討が必要と考えられた。

### 3.3. ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用いたノナナールの捕捉

ノナナール結合候補ペプチドX及びコントロールペプチドAAAAを修飾したZnOナノワイヤアレイ基板を加えて、ノナナール吸着量の評価をGC-MSを用いて行った。

その結果、ペプチド配列Xを修飾したZnOナノワイヤアレイ基板では、ノナナール捕捉量がネガティブコントロールであるAAAA修飾基板に対して8.27倍向上することが示された (図4)。従来行われてきた芳香族化合物検出や、アルコール類や酢酸、アンモニアといった極性の強い小分子の検出のみならず、疎水性が強く特徴的な官能基の少ない揮発性有機物に対しても特定のアミノ酸配列を有するペプチドを分子認識プローブとして利用することで、デバイスの捕捉・濃縮効率を高めることが可能であることを示すものである。

### 3.4. ペプチドを利用したベンズアルデヒドのGFETセンシング

これまでに同定してきたベンズアルデヒド結合性ペプチ

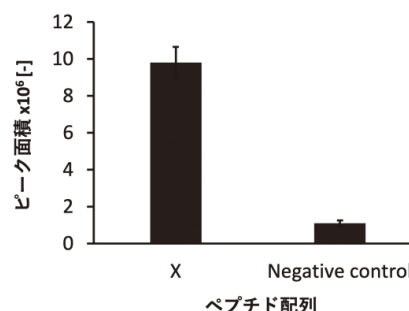


図4 ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用いたノナナールの捕捉

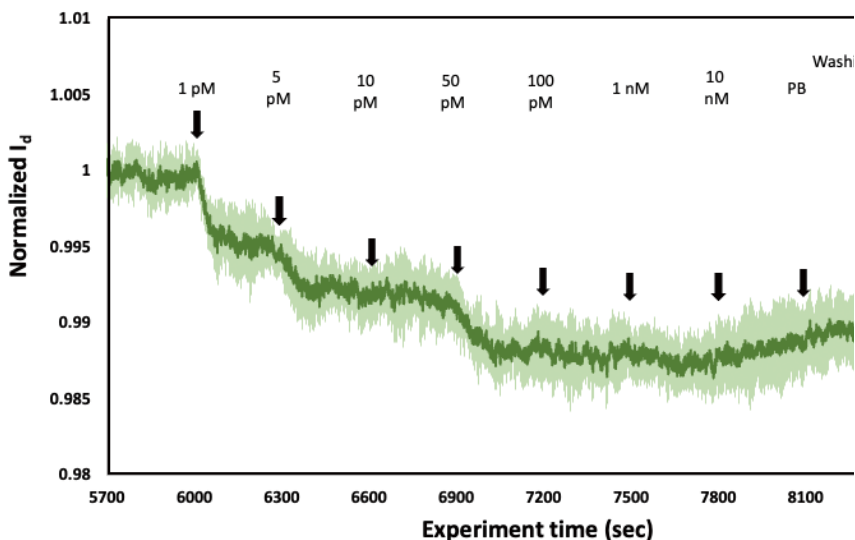


図5 ベンズアルデヒド修飾 GFET を用いたベンズアルデヒド検出

ドを利用したGFETセンシングについても検討を進めた。今回用いたペプチド配列Yとグラフェン結合配列を連結した二機能性ペプチドを調製し、これをグラフェン表面に滴下することで表面を機能化し、異なる濃度のベンズアルデヒドに対する応答性評価をもとに乖離定数を評価した。その結果、ベンズアルデヒドとの乖離定数が数pMであることが示され、非常に優れた結合親和性を保つことが示された。また1 pMのベンズアルデヒドに対しても応答が得られており、ベンズアルデヒドを超高感度に検出できるセンシング技術を開発することができた(図5)。

#### 4. まとめ

本研究により、これまでに報告例の非常に乏しいVOCに対するペプチドプローブを探索する方法を確立し、同定されたペプチドを用いることで気相のVOCを濃縮回収できること、そしてGFETセンサ表面を修飾することでVOCを超高感度に検出できることが確認された。今後は、標的選択性の評価、そしてこれまでに研究を進めているペプチドマトリックス構造を利用することによる結合親和性、選択性の向上に向けた研究開発が進められることが期待される。また本研究により微細加工によるVOCの濃縮、そして小型化が容易なセンシング技術であるGFETへの適用可能性が示されたことは、今後VOCを携帯可能なレベルでの小型センサを利用したリアルタイム検出の足がかりとなる研究成果である。そのため今後ますます健康、安全などに関わるセンシング技術の開発が求められる中で、本

研究によって得られた成果は非常に波及効果が大きく、更なる研究の発展が強く期待される。

#### (引用文献)

- 1) Tanaka, M.; Hayashi, M.; Roach, L.; Kiriki, Y.; Kadonosono, T.; Nomoto, T.; Nishiyama, N.; Choi, J.; Critchley, K.; Evans, S. D.; Okochi, M. Synthesis of Near-Infrared Absorbing Triangular Au Nanoplates Using Biomineralisation Peptides. *Acta Biomater.* **2021**, *131*, 519-531. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.06.010>.
- 2) Suwatthanarak, T.; Tanaka, M.; Miyamoto, Y.; Miyado, K.; Okochi, M. Inhibition of Cancer-Cell Migration by Tetraspanin CD9-Binding Peptide. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (40), 4906-4909. <https://doi.org/10.1039/D1CC01295A>.
- 3) Yoshikawa, K.; Saito, S.; Kadonosono, T.; Tanaka, M.; Okochi, M. Osmotic Stress Induces the Formation of Migrasome-like Vesicles. *FEBS Lett.* **2024**, *598* (4), 437-445. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14816>.
- 4) Komikawa, T.; Tanaka, M.; Yanai, K.; Johnson, B. R. G.; Critchley, K.; Onodera, T.; Evans, S. D.; Toko, K.; Okochi, M. A Bioinspired Peptide Matrix for the Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *153*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112030>.