

信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによる アルカリホスファターゼ活性の簡易・低コスト検出¹

Simple and cost-effective detection of alkaline phosphatase activity using a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor

佐々本康平 摂南大学大学院理工学研究科生命科学専攻
寺田理一郎 摂南大学理工学部生命科学科
西矢芳昭² 摂南大学理工学部生命科学科

SASAMOTO, Kohei Division of Life Science,
Graduate School of Science and Engineering, Setsunan University
TERADA, Riichiro Department of Life Science,
Faculty of Science and Engineering, Setsunan University
NISHIYA, Yoshiaki Department of Life Science,
Faculty of Science and Engineering, Setsunan University

Abstract

A signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor (SA-ISFET) acts as a biosensor capable of detecting changes in hydrogen ions due to enzymatic reactions. In this study, we describe an alkaline phosphatase (AP) activity detection method that uses SA-ISFET and a reagent containing pyrophosphate which acts as both substrate and buffer. The method enabled simple and cost-effective AP assays, when potential signals accumulated 10-fold. Calf intestinal AP did not require the cofactors Zn^{2+} and Mg^{2+} for the assay, whereas AP from *Shewanella* sp. T3-3 did. Different metal ion-dependence on the assays was explained by the structural comparison of both AP. In addition, assay application to a labeled enzyme detection system based on an immunoassay was discussed.

キーワード: トランジスタ, バイオセンサ, 酵素, ホスファターゼ, ピロリン酸

Keywords : transistor, biosensor, enzyme, phosphatase, pyrophosphate

¹【原稿受付】2022年9月8日、【掲載決定】2022年12月12日

²【主著者連絡先】西矢 芳昭 e-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp

〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8, 摂南大学 理工学部 生命科学科

1.はじめに

医療や健康管理, 食品分析, フィットネス, フィジカルトレーニングなどさまざまな分野で, 酵素を使用したバイオセンサが活用されている. 例えば, 糖尿病患者は血糖センサにより血液中グルコース濃度を自己測定している¹. 血液中コレステロール濃度や乳酸濃度を測定できるバイオセンサは, フィットネスやアスリートのトレーニングなどに利用されている². これらのセンサは, 酸化還元酵素の基質酸化反応を電気化学的に検出する. より具体的には, 一般に 3 電極 (作用極, 対極, 参照電極) が基材上に形成されており, 作用極には酵素 (グルコースオキシダーゼ, グルコースデヒドロゲナーゼ, コレステロールオキシダーゼ, 乳酸オキシダーゼなど), およびメディエータ (フェリシアニド, ルテニウム錯体, オスミウム錯体, キノン類, フェノチアジン類, フェノキサジン類など) が配置される. 試料中の基質は作用極上で酵素と反応して酸化され, 基質量に比例する電気化学反応を起こす³. 血糖センサの場合, 血液中のグルコースがグルコースオキシダーゼあるいはグルコースデヒドロゲナーゼと反応してグルコン酸に酸化される. その際, 酵素-補酵素複合体はグルコースから移動する 2 電子によって一時的に還元され, さらにメディエータと反応して電子が移動すると共に元の酸化状態に戻る. 還元されたメディエータは電極表面に拡散し, 電位をバイオセンサに印加して元の酸化状態に戻る. 電気化学センサはメディエータの酸化によって生成する電流を測定し, 血液中グルコース濃度に比例して関連付ける.

一方, 酵素との組み合わせでバイオセンサとなり得る素材として, イオン感应性電界効果トランジスタ (ISFET) も古くから注目されている. ISFET は FET のゲート部絶縁膜上に窒化ケイ素などのイオンに感应する膜を有し, このイオン感应膜に溶液が接するとイオン濃度の変化に応じて界面電位が発生する. この電位変化に基づくチャネルの電位レベルの変化量を検出することで, イオン濃度を検出することができる⁴. 電気化学センサが酸化還元酵素との組み合わせの一択に対し, ISFET は化学反応で生じる水素イオン (プロトン) の増減を直接電気信号として取り出すことができるため, 幅広い種類の酵素反応の計測に応用できるバイオセンサとなり得る⁵. また, ISFET センサは応答速度が早いので溶液のイオン濃度をリアルタイムに連続測定でき, 半導体集積化技術により大量生産が容易なため低価格性であり, 小型なので取り扱いが容易などの長所がある.

しかし, ISFET の応用については長期にわたり数多くの研究がなされたものの, 水素イオンに感应することで pH センサとして実用化されている以外にはバイオセンサとしての際立った応用例は見当たらない. バイオセンサとして応用するには ISFET の感度が十分でなく, 信号レベルが低くてノイズに埋もれてしまうため, 微少な変化に対応できないとされてきたからである. 例外として, 次世代 DNA シーケンシング技術の 1 種であるイオン半導体シーケンシングは ISFET を利用している⁶. これはシーケンシング反応中のヌクレオチド取り込みの際, 溶液中へ水素イオンが放出されることを利用して, その変化を ISFET によりデジタル情報 (0, 1) に変換し DNA 配列を分析する. 他の方法に比べシンプルで迅速なシーケンシングを可能にしたが, エラー率が高いという欠点もある.

ISFET の欠点である不十分な感度を改良するため, われわれは信号累積型 ISFET (SA-ISFET) に着目した. これは, 電荷がセンサ内に蓄積できるように改良されており, 測定を瞬時に複数回繰り返し信号を累積させ, 増幅した後に信号を取り出す. これによりシグナル・ノイズ比が向上し, 微少変化の検出を要求される高感度バイオセンサとしての応用が可

能になった⁷。SA-ISFET はメディエータ等の仲介物質，あるいは光学検出法に要求される発色反応や蛍光標識などを用いないので，簡便なシステムとなり，前処理等もシンプルで迅速となる。反応選択性が低いため，測定対象は広範囲に見出すことができる。また，光路長を必要とする光学測定系を使用しないので装置の小型化に向いており，かつ大型機器に比べコストが低く，測定に高い技術力を必要としないといった数多くの特長を有している。

これまで，われわれは SA-ISFET を利用したバイオセンサを種々検討し，測定対象項目としてクレアチニン，コレステロールエステル，尿素，過酸化水素，グルコース，サルコシン，乳酸，尿酸，ホルムアルデヒド，油脂，グリセロール，没食子酸，ウレアーゼ，ATP アーゼ，RNA ポリメラーゼ，ペルオキシダーゼ，フェノールオキシダーゼなどが既に開発された^{5,7-13}。SA-ISFET による核酸増幅の新規検出系についても，応用例が公表された⁵。現在，企業や公的研究機関との共同研究にて，SA-ISFET と新規な免疫測定系の組み合わせによる微生物検査システムの開発および商品化を進めている。医療や食品検査分野などでは，免疫測定が汎用されており，検出に用いる抗体標識用酵素はホースラディッシュ由来ペルオキシダーゼ (HRP, EC 1.11.1.7) または牛小腸由来アルカリホスファターゼ (CIAP, EC 3.1.3.1) が多用される。HRP については，既に SA-ISFET 用の効率的な検出原理が考案され (図 1 A)，測定方法が確立された¹²。CIAP についても SA-ISFET 用の検出方法が提案されたが¹¹，ATP を用いるので，先に開発された ATP アーゼ検出法と同様の原理に基づく (図 1 B)。今回，われわれは CIAP 活性に特化した非常にシンプルで安価な検出方法を考案 (図 1 C)，本法の SA-ISFET センサへの適用を実証したので報告する。

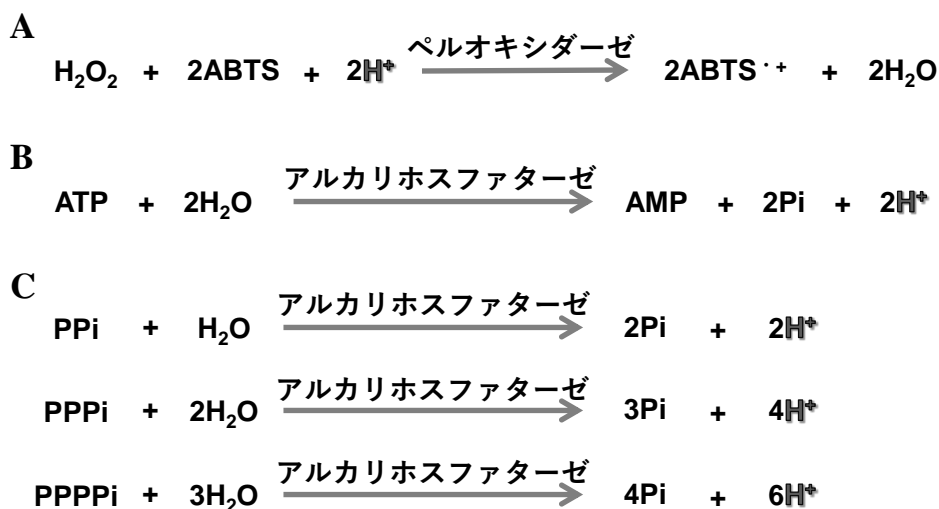


図 1 SA-ISFET による抗体標識用酵素の活性検出原理

A：既報のペルオキシダーゼ活性検出原理。ABTS：2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)。B：既報のアルカリホスファターゼ活性検出原理。ATP：アデノシントリリン酸。C：本研究のアルカリホスファターゼ活性検出原理。Pi：リン酸，PPi：ピロリン酸，PPPi：トリリン酸，PPPPi：テトラリン酸。

2. 実験材料と方法

(1) 実験材料

使用試薬のピロリン酸ナトリウム十水和物、トリリン酸ナトリウム、テトラリン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、および金属塩化物は全て特級で、ナカライテスク株式会社（京都）より購入した。簡易検出検討対象の酵素は、CIAP（タカラバイオ株式会社、京都）およびHRP（東洋紡株式会社、大阪）を用いた。また、免疫測定用として最近開発、商品化された細菌 *Shewanella* sp. T3-3 由来アルカリホスファターゼ（T3-3AP）^{14,15} を東洋紡株式会社より入手し使用した。

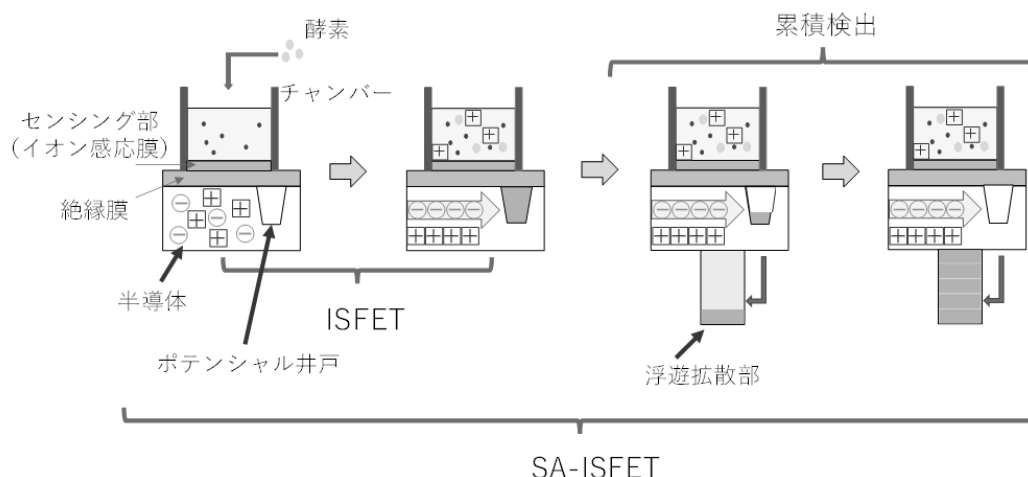


図2 SA-ISFET センサによる信号検出原理

(2) センサおよび実験装置

SA-ISFET センサ（AMIS-051）は、株式会社バイオエックス（京都）より購入した。本センサによる信号検出原理を図2に示す。イオン感応膜層として窒化ケイ素の代わりに5酸化タンタルを用いたISFETセンサを使用し、センシング部に作用するイオン濃度に応じて変化した電荷量をポテンシャル井戸（コンデンサ）へ溜める。そして、ポテンシャル井戸からの汲み出し回数に応じ、電位リセット後に浮遊拡散部へ蓄積する電荷量を電位変化として計測する。SA-ISFETセンサの累積

回数は、浮遊拡散部の蓄積量から現状で最適と思われる10回に設定した。これ以上の回数は、現センサでは累積に要する時間の測定への影響が無視できない。センサ信号検出装置は、既報のものを使用した^{5,11-13}

（図3）。恒温気体発生型温度調節装置は、本研究のためにバイオエックス社に依頼し製作された（図3）。

恒温気体発生型温度調節装置



センサ信号検出装置

図3 本研究にて使用された装置

(3) 実験方法

本研究で用いたSA-ISFETセンサは、2つのチャンバーからなる2チャンネル方式である。

各チャンバーに、1.0 mmol/L ピロリン酸および 50 mmol/L 塩化ナトリウムからなる反応溶液を 45 μ L ずつ添加した。次いで、測定用チャンバーに CIAP, T3-3AP, または HRP を含む測定試料（酵素溶液）を 5 μ L 添加、混合した。対照用チャンバーには、超純水のみ 5 μ L 添加した。シグナルを 5 秒毎に 5 分間計測し、両チャンバーのシグナルの差分より酵素活性を検出した（図 4）。

CIAP と T3-3AP の一次構造は、ソフトウェア Genetyx（Ver4.0, ゼネティクス, 東京）を用いて比較した。両酵素の立体構造モデルは、統合計算化学ソフトウェア MOE（Ver2022.02, Chemical Computing Group, Montreal, Canada）¹⁶⁻²⁰ を用いたホモロジーモデリングにて新たに構築した。鋳型構造は、CIAP に対しては PDB ID: 1ZED を、T3-3AP に対しては PDB ID: 3A52a をそれぞれ使用した。CIAP（514 残基）と 1ZED（484 残基）のアミノ酸配列一致率は 76% で、ギャップが見られなかったため、精度の高いモデリングが可能と考えられた²¹。一方、T3-3AP（419 残基）と 3A52a（400 残基）のアミノ酸配列一致率は 69% で、こちらもギャップは見られなかった。両立体構造のエネルギー最小化計算、比較解析、および基質とのドッキングシミュレーションは、MOE を用いて実施した。酵素活性中心近傍の露出表面積およびポケット部位体積は、オンラインツール CASTp（Ver3.0, <http://sts.bioe.uic.edu/castp/>）²² を用いて、Radius probe: 2.0 Å で予測した。

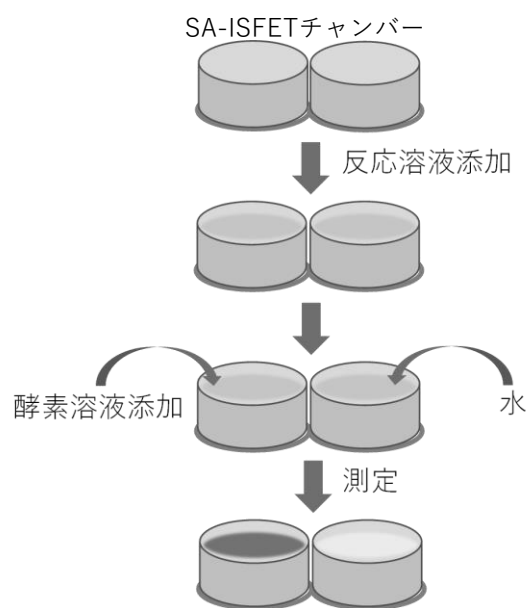


図 4 SA-ISFET センサでの酵素活性検出方法

3. 結果と考察

(1) CIAP 活性検出

既存の CIAP 活性検出法は、PPD, CSPD, CDP-star, APS-5, *p*-nitrophenyl phosphate などのように脱リン酸反応にて発光や発色が起こる合成基質を利用している。一方、SA-ISFET センサは酵素反応による水素イオンの増減を検出可能であり、高価な合成基質を必要としない。SA-ISFET センサの特性を活かすため、われわれは低分子量の天然基質で非常に安価なポリリン酸を利用した CIAP の活性検出法を考案した（図 1 C）。これらポリリン酸は緩衝能を持つため、試薬にバッファを使用する必要が無いという利点もある。ピロリン酸、トリリン酸、テトラリン酸の pH は、1.0 mmol/L 濃度ではそれぞれ 9.7, 8.8, 8.0 であった。CIAP の至適 pH は 10 で、pH 9 でも相対活性が約 40% に低下するので²³、基質兼バッファーとして 1.0 mmol/L ピロリン酸を採用した。ピロリン酸以外の検出試薬組成としては、これまでの SA-ISFET 用試薬と同様に電位測定を安定化するための塩化ナトリウムを 50 mmol/L 加えた。

本法にて CIAP の活性検出を行った際の、タイムコースの一例を図 5 A に示す。終濃度

10 mU/ μ L の CIAP によるピロリン酸の脱リン酸反応は、理論通り水素イオンを連続的に生成し、直線的な電位シグナルの変化が見られた。したがって、SA-ISFET センサによるアルカリホスファターゼの簡易検出が可能と示された。繰返し数 5 での同時再現性を見たところ、変動係数が 16% となり、バイオセンサの実測データ再現性として許容できるレベルであった。また、同時再現性は対照用チャンバーのシグナルを差し引かずとも変動係数 16% が維持された。すなわち、本法では 1 チャンネル・センサでも 2 チャンネル・センサと同等の正確性でアルカリホスファターゼ活性検出が可能であった。さらに、測定 100 回分の試薬コストは約 0.07 円と見積もられ、分析用途として極めて低コストを実現した。

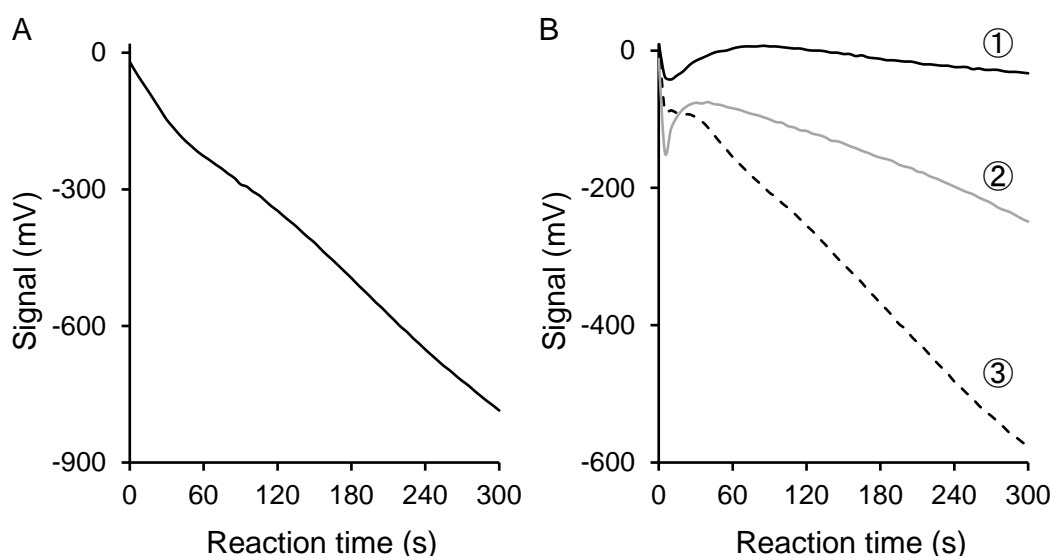


図5 アルカリホスファターゼ活性検出のタイムコース

A : CIAP (反応溶液組成 ; 1.0 mmol/L ピロリン酸, 50 mmol/L 塩化ナトリウム), B : T3-3AP (反応溶液組成 ; ①1.0 mmol/L ピロリン酸, 50 mmol/L 塩化ナトリウム ; ②1.0 mmol/L ピロリン酸, 50 mmol/L 塩化ナトリウム, 1 mmol/L MgCl_2 ; ③1.0 mmol/L ピロリン酸, 50 mmol/L 塩化ナトリウム, 1 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L ZnCl_2).

本法における酵素反応を考察するため、CIAP の立体構造をホモロジーモデリングにより予測した(図6). 活性中心近傍の露出表面積およびポケット部位体積は、それぞれ 61.6 \AA^2 , 134 \AA^3 と見積もられた。ポケット部位体積は基質体積に比べ小さいが、活性中心空間が外側に大きく開いており、PPD (分子量 426), CSPD (分子量 417), CDP-star (分子量 495), APS-5 (分子量 492) などの合成基質を取り込み、リン酸基を加水分解し得る。各基質のドッキングシミュレーションからも、そのことは確認された(データ示さず)。しかしながら、これら合成基質はリン酸基以外の部分が大きいため、pH や組成物濃度など反応条件の差による検出感度への影響が知られている。小サイズのピロリン酸 (分子量 178) は、反応条件の影響低下やそれに伴う施設間差低減への寄与が期待される。

(2)T3-3AP 活性検出と構造的解釈

最近、免疫測定に供する抗体標識用酵素として T3-3AP が開発、商品化された。T3-3AP は

CIAP と比して、蛍光基質に対する活性が 1.4～2.2 倍増加している¹⁴。また、抗体標識効率を高く設定できるため、免疫測定 of 感度を向上させ得るといった特徴を有する^{14,15}。

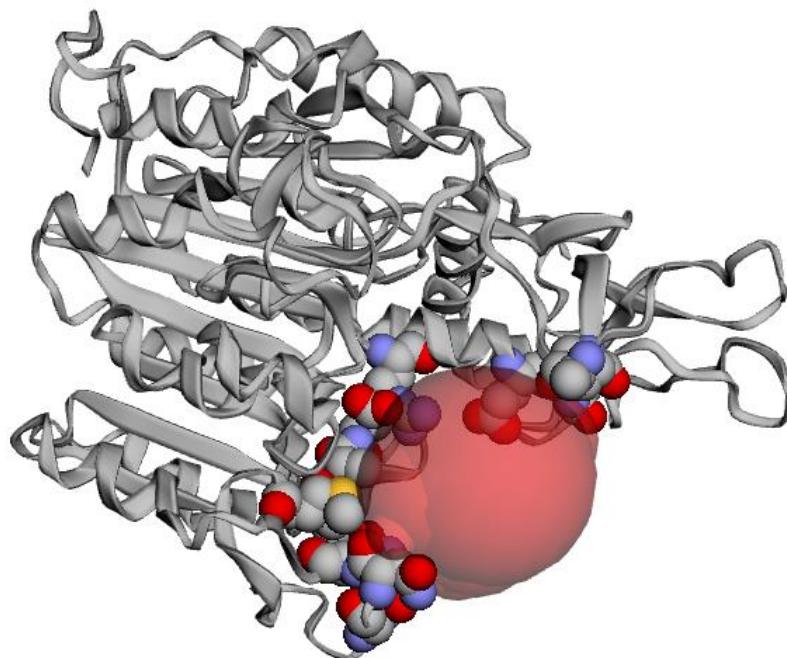


図6 CIAP の構造モデルと基質結合ポケット

主鎖の立体構造はリボンモデルで、基質結合ポケットを形成する主なアミノ酸残基は球体モデルで、それぞれ示す。ポケット部位体積は透けた赤色で表す。

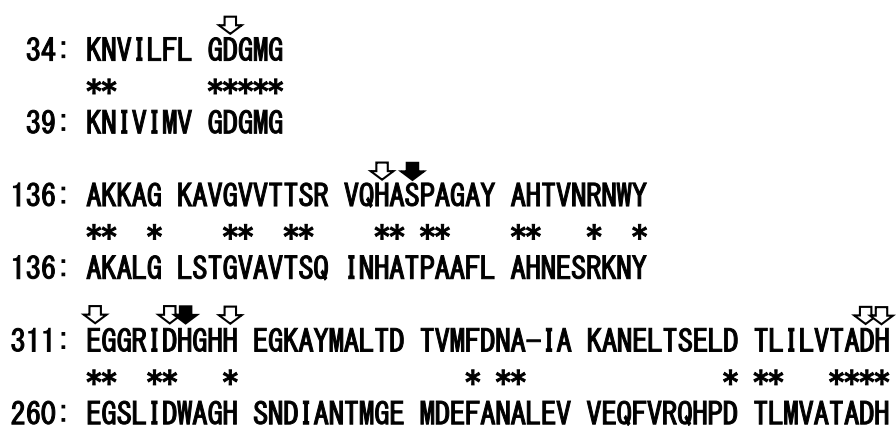


図7 CIAP-T3-3AP 一次構造比較

一致するアミノ酸を*で表す。上：CIAP，下：T3-3AP。矢印は金属キレーター残基を示し、そのうち黒矢印は両酵素でアミノ酸が一致しない。

本法にて T3-3AP の活性検出を行った際の、タイムコースの一例を図5B①に示す。T3-3AP は CIAP と異なり、SA-ISFET センサでシグナル変化を検出できなかった。T3-3AP の至適 pH は 9.5 で¹⁴、ピロリン酸系での測定に支障ない。

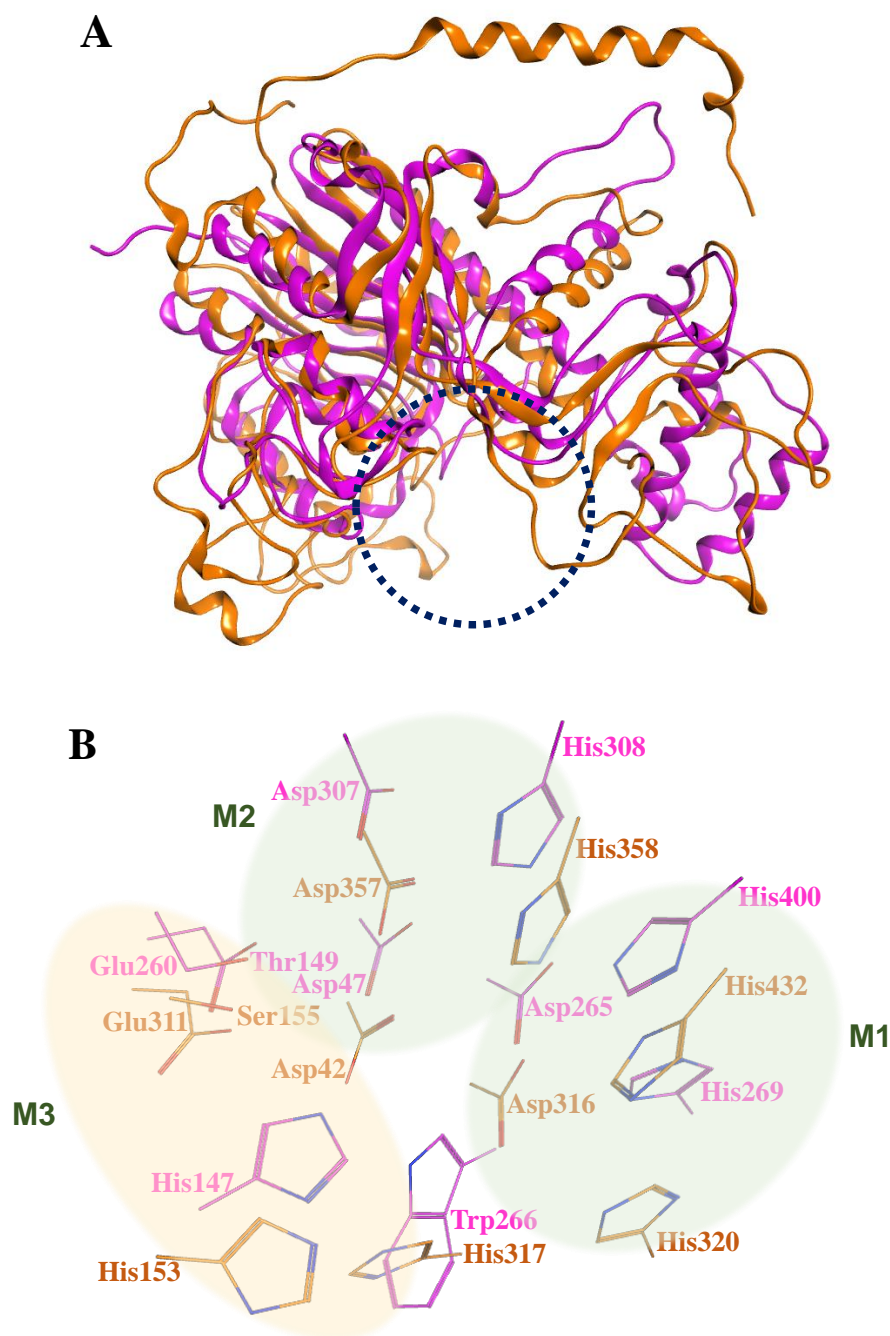


図8 CIAP-T3-3AP 立体構造比較

A : 構造モデルの重ね合わせ. オレンジ : CIAP, マゼンタ : T3-3AP. 青円 (点線) は活性中心を表す. B : 活性中心近傍の比較. オレンジ : CIAP のキレーター残基, マゼンタ : T3-3AP のキレーター残基. M1~M3 は金属イオン結合部位をそれぞれ示す.

アルカリホスファターゼは触媒活性に Mg^{2+} と Zn^{2+} を必要とするが, CIAP はこれら金属イオンが酵素内に強固にキレート結合されている. しかし, T3-3AP は金属イオンが酵素内に常時キレート結合されていないと考えられた^{14,15}. そこで, 試薬に 1 mmol/L の MgCl_2 ,

0.1 mmol/L の ZnCl_2 を加え、T3-3AP の酵素活性を SA-ISFET センサで測定したところ、シグナル変化を検出することができた (図 5 B③). T3-3AP に関する以前の研究では、基質によっては Mg^{2+} の添加のみで十分な触媒活性が得られた¹⁴. そこで、試薬に 1 mmol/L の MgCl_2 のみを加えて測定を行ったが、シグナル変化の検出は不十分であった (図 5 B②).

CIAP と T3-3AP の金属イオン依存性の違いを議論するため、両酵素の構造比較を行った. 両酵素の一次構造に明確な相同性は見られなかったが、マキシマムマッチングでは 23% の弱い相同性が観察された. また、一般的なアルカリホスファターゼには金属キレーター 10 残基が存在するが、CIAP と T3-3AP の比較では、10 残基中 9 残基で周辺のアミノ酸配列が保存されていた (図 7).

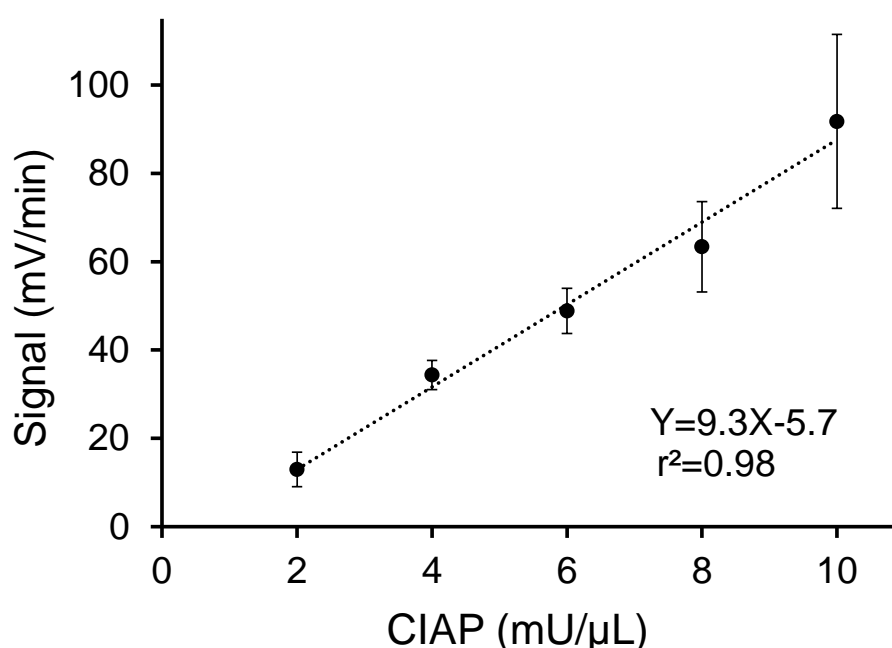


図 9 CIAP 活性検出の直線性

各測定は繰返し数 5 で実施しており、標準偏差をバーで表示する.

われわれは既に T3-3AP の立体構造をホモロジーモデリングにより構築したが¹⁵, 今回新たに CIAP と同様の手法で再構築した. 本酵素の構造モデルを CIAP の構造と重ね合わせたところ、 α 炭素鎖の平均二乗偏差 (root mean square deviation) は 5.8 Å と比較的大きなずれが見積もられた (図 8 A). しかしながら、活性中心近傍の 315 アミノ酸残基における平均二乗偏差は 2.2 Å で、類似性が認められたため、金属キレーター残基の比較を行った (図 8 B). アルカリホスファターゼの活性中心には、3 箇所の金属イオン結合部位 M1~M3 が存在する. M1 と M2 には Zn^{2+} が、M3 には Mg^{2+} がそれぞれキレート結合する. M1 および M2 については、CIAP と T3-3AP のキレーター残基間の関係に大きな差異は認められなかった. 一方、CIAP のキレーター 10 アミノ酸残基中 M3 の Ser155 と His317 が、T3-3AP では Thr149 と Trp266 にそれぞれ置換していた (図 7). とりわけ His→Trp 置換は Mg^{2+} との距離が遠ざかるため、 Mg^{2+} に対する結合を弱めていると予想された. したがって、T3-3AP は CIAP に

比べ、金属イオンの保持が難しいと考えられた。さらに、両者の活性中心のエントランスは、T3-3APの方が明確に広い(図8A)。このことは、T3-3APが保持した金属イオンを酵素外へ放出してしまう理由のひとつかもしれない。

(3)希釈直線性

CIAP 活性に対するシグナル変化の標準曲線を、図9に示す。終濃度 10 mU/μL まで、試料中の CIAP 活性が十分な直線性を維持して測定された。10 mU/μL を超える CIAP 活性の場合、測定値が 10 mU/μL における値と殆ど変化無かった(データ示さず)。分析において感度向上と広範なダイナミックレンジは、相反する特性である。シグナルを増幅する SA-ISFET センサでは、ダイナミックレンジは必然的に狭くなる。

検出感度は終濃度 2 mU/μL で、1 mU/μL の場合はシグナル変化の大幅な減少が認められた。本法の応用対象は免疫検査であり、微生物検査システムをはじめとする医療や食品検査分野での半定量測定を想定している。SA-ISFET センサは高域を正確に測定できないが、免疫検査において試料に基準値以上の濃度で対象物質が存在するかの判定には、簡便性とコストの点で極めて有用である。本用途において、CIAP の希釈直線性は既報の HRP 同様に問題無いものと考えられた¹²。

(4)検出感度の向上

これまでの検討は、センサ信号検出装置の小型ヒーターを 37℃に設定して実施した。しかしながら、ヒーターの保温面は厚さ約 1.5 mm の SA-ISFET センサ基盤下部に接するため、酵素反応が起こる測定用チャンバー自体は設定温度で制御されていなかった。

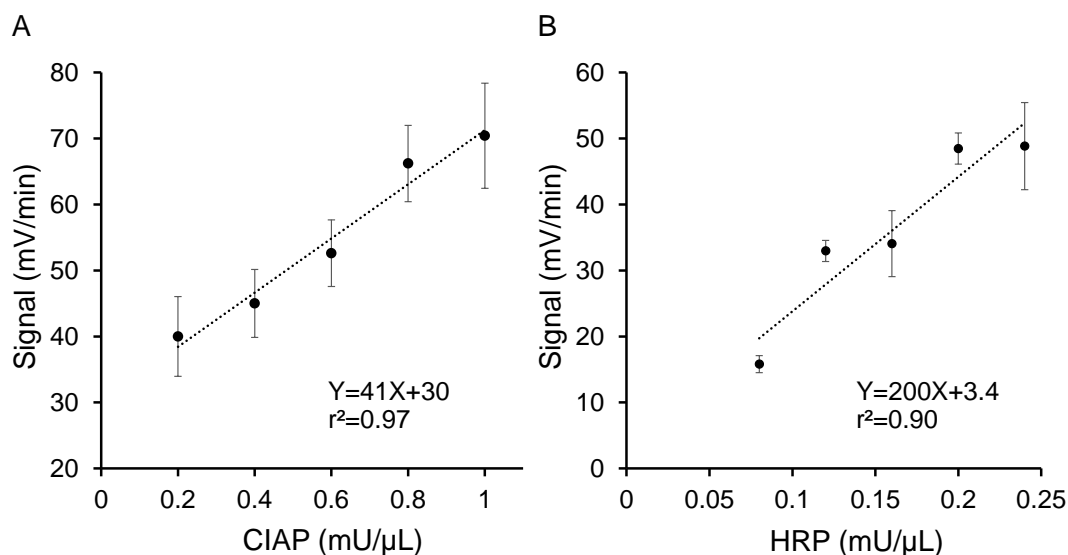


図10 37℃制御による活性検出の直線性

A : CIAP, B : HRP. 各測定は繰返し数 5 で実施しており、標準偏差をバーで表示する。

われわれは本法の感度向上のため、新製作の恒温気体発生型温度調節装置を用いた 37℃での反応温度制御を検討した。本装置は、センサ上部の測定用チャンバーに恒温気体を当て

ることにより、反応液の温度制御を直接行うことができる。CIAP 検出の標準曲線を、図 1 0 A に示す。

制御により反応温度が高まり、活性検出感度は約 10 倍向上した。CIAP の比活性 (約 7,000 U/mg) と分子量 (約 100,000) から最小検出濃度を概算すると、約 0.29 fmol/μL となった。既報の HRP 検出系との感度比較を行うため、恒温気体発生型温度調節装置を用いた 37°C での反応温度制御にて HRP 検出の標準曲線を取得した (図 1 0 B)。HRP の比活性 (約 300 U/mg) と分子量 (約 40,000) から最小検出濃度を概算すると、約 6.7 fmol/μL となった。すなわち、本研究の方法による CIAP 検出の方が既報の HRP 検出より感度的には約 23 倍優れる。

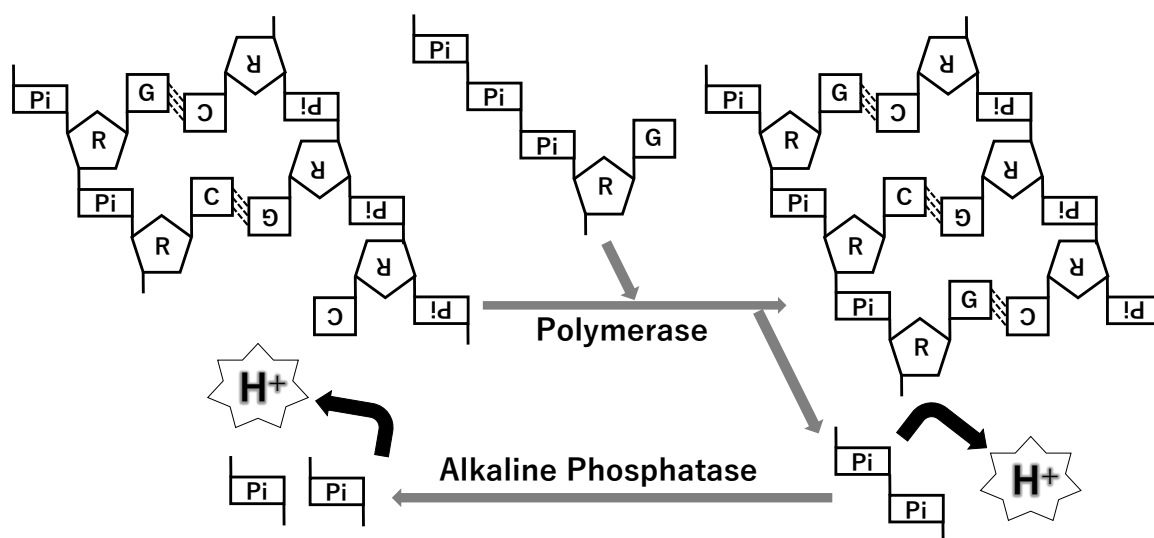


図 1 1 核酸 (DNA または RNA) 増幅の検出原理

Pi : リン酸, R : リボースまたはデオキシリボース, G と C : 塩基. 点線は塩基間の水素結合を表す. 従来の ISFET による核酸増幅検出 (ポリメラーゼ反応による水素イオン濃度変化の測定) に加え, アルカリホスファターゼにてピロリン酸を加水分解し, SA-ISFET にて測定し得ることを示している。

4.まとめ

SA-ISFET センサを用いた, アルカリホスファターゼ活性の簡易検出系を確立できた。これにより、今迄にない安価な測定が可能となった。測定対象のアルカリホスファターゼとして、免疫検査に多用されている CIAP はもちろんのこと、最近開発・商品化された T3-3AP も試薬に Mg^{2+} と Zn^{2+} を添加すれば検出可能であった。T3-3AP のみ Mg^{2+} と Zn^{2+} を必要とする理由は、立体構造モデルの比較解析から推定された。

比活性と分子量からタンパク質検出感度を見積もった結果、本研究での CIAP 活性検出系は既報の HRP 検出系に比べ 20 倍以上高感度であることが判明した。今後、本研究の方法による SA-ISFET センサの免疫検査への具体的な応用が期待される。

アルカリホスファターゼ反応で生じたリン酸の検出方法としては、化学的測定法や酵素的測定法、キレート物質を用いた測定方法などがある。しかしながら、比較的安価な化学的

測定法でも、キットによる測定 1 回分の試薬コストが約 10～20 円かかる。酵素的測定法は臨床検査で活用されており、正確な分析が可能だが、酵素を 2～4 種類使用するため高価格である。キレート物質を用いた測定方法も高価で、且つ簡便性に課題がある。SA-ISFET センサは、酵素反応産物としてのリン酸の簡便な検出など、基礎研究分野での応用も可能かと思われる。

最後に、本研究の免疫検査以外への応用について述べたい。半導体シーケンシングや PCR など核酸増幅の際には、ポリメラーゼ反応の産物としてピロリン酸と水素イオンが発生し、ISFET にて水素イオン濃度変化を検出する。これらの増幅系に CIAP を加えることで、ピロリン酸の加水分解により水素イオンが追加発生し、SA-ISFET にてシグナルを増幅して高感度検出することが、理論的に可能である (図 1 1)。

謝辞

本研究の一部は、2016～2018 年度戦略的基盤技術高度化支援事業「高発現表層タンパク質を標的とした低コスト迅速分析を可能とする微生物検査の革新」の間接補助金にて行われ、感謝の意を表したい。

参考文献

- (1) 南海史朗, 池田信, 藤原雅樹, “電気化学血糖センサ”, *Electrochemistry*, 83(2015), pp.19-23.
- (2) 小山孟志, “競技現場において動きや負荷を定量的に評価する研究”, *バスケットボール研究*, 5(2019), pp.11-16.
- (3) 日比隆雄, 西矢芳昭, “血中尿酸センサー開発に向けた耐熱性ウリカーゼの創出”, *構造生物学*, 共立出版 (2007), pp.191-199.
- (4) 藤井輝夫, ファンデルワールピーター, 許正憲, 下島公紀, デロイニコ, “イオン感応性電界効果トランジスタを用いた現場型 pH センサの温度圧力特性”, *生産研究*, 56(2004), pp.455-459.
- (5) 西矢芳昭, “信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタ (SA-ISFET) を応用したバイオセンサ測定系の開発”, *医療と検査機器・試薬*, 39(2016), pp.452-458.
- (6) L, Keeble., N, Moser., J, Rodriguez-Manzano., P, Georgiou., “ISFET-based sensing and electric field actuation of DNA for on-chip detection: A review”, *IEEE Sensors Journal*, 20(2020), pp. 11044-11065.
- (7) 西矢芳昭, 谷敏夫, “信号累積型のイオン感応性電界効果トランジスタによる腎臓疾患マーカーおよびトランスポートの測定法”, *BioClinica*, 26(2011), pp.62-67.
- (8) 西矢芳昭, 谷敏夫, 廣岡青央, 泊直宏, 高坂千尋, 山本佳宏, “信号累積型イオン感受性電界効果トランジスタによるクレアチニンの新規測定法”, *生物試料分析*, 32(2009), pp.240-243 (2009).
- (9) 西矢芳昭, 廣岡青央, 谷敏夫, 泊直宏, 高坂千尋, 山本佳宏, “信号累積型イオン感受性電界効果トランジスタによるコレステロールエステルの新規測定法”, *生物試料分析*, 34(2011), pp.247-250.
- (10) N, Tomari., A, Kawasaki., Y, Yamamoto., Y, Nishiya., “A simple and reliable urea assay method based on a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor”, *J. Biosci. Bioeng.*,

119(2015), pp.247-250.

- (11) 谷敏夫, 西矢芳昭, “信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによる生理活性反応測定装置の開発”, 生物試料分析, 38(2015), pp.196-201.
- (12) N, Tomari., K, Sasamoto., H, Sakai., T, Tani., Y, Yamamoto., Y, Nishiya., “New enzymatic assays based on the combination of signal accumulation type of ion sensitive field effect transistor (SA-ISFET) with horseradish peroxidase”, *Anal. Biochem.*, 584(2019), 113353.
- (13) Y, Nishiya., M, Ueda., Y, Yamashita., N, Tomari., Y, Yamamoto., “Simple phenol oxidase activity assay method based on a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor”, *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 9(2021), pp.7-13.
- (14) H, Aiba., Y, Nishiya., M, Azuma., “Over-expression, characterization and modification of highly active alkaline phosphatase from a *Shewanella* genus bacterium”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81(2017), pp.1994-2001.
- (15) Y, Shimozawa., H, Aiba., Y, Nishiya., “Structural prediction and analysis of the highly reactive alkaline phosphatase from *Shewanella* sp. T3-3”, *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 8(2020), pp.39-43.
- (16) 西矢芳昭, “ヒト臍臓 α -アミラーゼと合成基質 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside との反応性結合の構造的予測”, 生物試料分析, 44(2021), pp.83-88.
- (17) Y, Nishiya., K, Nagoshi., S, Shinki., S, Imai., T, Baba., “Development of a hippuric acid-hydrolysing enzyme for monitoring toluene exposure”, *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 9(2021), pp.15-21.
- (18) Y, Nishiya., G, Torii., M, Suganaka., S, Imai., T, Baba., “Analysis of a hippurate hydrolase homolog from *Acetomicrobium mobile*”, *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 9(2021), pp.30-35.
- (19) Y, Sumida., M, Yamasaki., Y, Nishiya., S, Kumagai., T, Yamada., M, Azuma., “Protein engineering of D-succinylase from *Cupriavidus* sp. for D-amino acid synthesis and the structural implications”, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 363(2021), pp.4770-4778.
- (20) Y, Nishiya., S, Imai., S, Shinki., K, Nagoshi., T, Baba., “Development of highly efficient variants of *Pyrococcus* Hippurate hydrolase for monitoring toluene and xylene exposure”, *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 10(2022), pp.42-47.
- (21) 西矢芳昭, “検査薬の改良に役立つホモロジーモデリング: その限界の把握”, 生物試料分析, 41(2018), pp.229-235.
- (22) W, Tian., C, Chen., X, Lei., J, Zhao., J, Liang., “CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins”, *Nucleic Acids Res*, 46(2018) pp.W363-W367.
- (23) Merck Home Page, <https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/technical-documents/technical-article/protein-biology/western-blotting/alkaline-phosphatase> (access 2022.7.26)