

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20710091

研究課題名（和文）ナノ粒子積層薄膜プレートの構築と環境バイオセンシング技術への応用
 研究課題名（英文）Fabrication of layer-stacked nanoparticles on the plate for environmental and biosensing application

研究代表者

川崎 英也 (KAWASAKI HIDEYA)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：50322285

研究成果の概要（和文）：本研究は、環境バイオセンシング技術への応用を目指して、表面支援レーザー脱離イオン化質量分析(SALDI-MS)のための新規な SALDI プレートの開発を目的としている。その研究成果として、SALDI-MS のための新規なナノ粒子積層薄膜プレート、(1) 金ナノ粒子/高分子交互積層薄膜と (2) ポリエチレンイミン修飾グラファイトシートを開発した。金ナノ粒子/高分子交互積層薄膜では、フェムトモルオーダーのペプチドの高感度検出、分子量1万程度の蛋白質の検出など、従来の金ナノ粒子を用いた SALDI に比べて、感度と検出限界分子量ともに向上できた。環境分析を目的としたポリエチレンイミン修飾グラファイトシートでは、近年、環境残留の点で問題となっている炭化フッ素系の界面活性剤 (PFOS, PFA) の高感度検出と定量分析の有効性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) using organic matrices is a soft ionization technique that causes very less fragmentation of the analytes. However, matrix ion interface and detector saturation are inevitable in the MALDI-MS analysis of low-mass molecules ($<m/z$ 500), and this makes the characterization of small molecules difficult despite the significance of such characterization. As an approach involving the use of organic-matrix-free LDI-MS for analyzing small molecules in a MALDI instrument, we have investigated a new and facile method for synthesizing layer-stacked nanoparticles on the plate for the applications of surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (SALDI-MS). New types of nanostructured substrates for organic-matrix-free LDI-MS have been found: (1) layer-by-layer (LBL) self-assembled films (polymer/gold) and (2) cationic-polymer-coated graphite sheets (polymer/graphite). The feasibility of using these nanomaterials for SALDI-MS has been demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：レーザー脱離イオン化質量分析法、ナノ粒子、SALDI-MS、環境分析、バイオ分析

1. 研究開始当初の背景

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)は、たんぱく質や合成高分子などの高分子量化合物を測定するための基盤技術として広く利用されている。しかし、MALDI 法では、試料に加えるマトリックスの種類や混合比などの最適な条件を測定ごとに試行錯誤しなければならない。加えて、過剰に加えられた有機マトリックス分子に由来するクラスターイオンが低分子量域に強く観測されるために、分子量が 1000 以下のペプチドや添加剤などの分析が困難となる。

Siuzdak らは、電解エッジングにより作製された数百ナノメートルの細孔構造を持つ多孔質シリコン基板を利用して、マトリックスなしでイオン化をできることを報告した。彼らはこの方法を **Desorption/ionization on silicon(DIOS)**と名づけた。このようなマトリックスを用いない表面支援レーザー脱離イオン化(SALDI)は、低分子量域の妨害イオンが観測されず、MALDI に比べて定量性に優れている。さらに、重要なことはマトリックスを用いないことで、ハイスループット分析が実現できることである。今後、医療・環境分野においてスクリーニング分析の需要が拡大することは目に見えており、それに対応できる唯一の技術として発展することが期待される。

DIOS 法は、いろいろ報告されている SALDI 法の中で最も優れたイオン化法で、分子量 3000 以下の有機化合物が感度よく測定できる。しかし、DIOS 基板の製造コストが高く、保存性が良くない欠点を持つ。Russell らは 5 nm サイズの金ナノ粒子をマトリックス代わりに用いてペプチドのサブスタンス P(MW 1348)のイオン化を報告した(JACS,2005)。しかし、試料調製法、低分子量域の詳細なスペクトル及び MALDI スペクトルの標準品であるアンジオテンシンのスペクトルが記述されていないのでその評価は限定的であった。また、国内ではイオンビームによるシリコン基盤上に数十から数百ナノメートル間隔でゲルマニウムドットを成長させた表面ナノ構造を利用して、マトリックスなしでイオン化できることが学会発表された。このようにして、研究開始当初、国内外で DIOS を凌ぐ新しい表面構造体や無機ナノ粒子を利用したレーザー脱離イオン化法の開発競争が始まったところであった。

2. 研究の目的

本研究は、近年、特にライフサイエンス分

野・環境分野において物質分析の重要な地位を築きつつあるレーザー脱離イオン化質量分析(LDI-MS)のための新規な LDI プレートとして、シリコン基板上にナノ粒子と高分子を交互に積層吸着させた“ナノ粒子積層薄膜プレート”を開発する。このナノ粒子積層薄膜プレートと質量分析計を結合することにより、抽出操作が不要で(敏速分析)、かつ高感度(サブフェムト mol 以上)、高選択性を有するハイスループットなスクリーニング分析システムを実現することを目標とする。

3. 研究の方法

金ナノ粒子積層薄膜プレートの作製条件の確立と、その LDI-MS の特性評価を行う。標的分子は、PRTR 法の「第一種指定化学物質」に指定されているイオン性界面活性剤と多環芳香族炭化水素(PAHs)である。イオン性界面活性剤ではナノ粒子薄膜との間の静電相互作用を利用して、PAH と高分子との疎水性相互作用を利用してプレート内に試料を濃縮し、高感度・定量性を有するハイスループットなスクリーニング分析システムを実現する。続いて、生体試料であるペプチドや蛋白質をターゲット試料とする。特に、ナノ粒子の特異的な化学的親和性(ケモアフィニティ)を利用して、医薬創製や病気診断に応用可能な高感度・高選択性を有するハイスループットなスクリーニング分析システムを実現する。

4. 研究成果

本研究では、SALDI-MS のためのナノ粒子の 2 次元規則配列表面をもつ LDI プレート(ナノ粒子を含む)として、新規なプレートを開発した。(1) 金ナノ粒子/高分子交互積層薄膜と(2) ポリエチレンイミン修飾グラファイトシートである。以下に本研究で開発された主な LDI プレートの特徴を示す。

(1) 金ナノ粒子/高分子交互積層薄膜

金ナノ粒子を利用した SALDI (Au-SALDI)は、簡便性、粒子当たりの高いイオン化効率、及び粒子表面吸着物の選択的イオン化が可能などの特徴を持っている。しかし、Au-SALDI の問題点はナノサイズ効果によって金ナノ粒子の融点が減少するために、レーザー照射によって生じる金クラスターイオンが妨害イオンピークとして低分子量域に出現する。また、Au-SALDI では、一般的に、金コロイドを滴下乾燥させた基板をイオン化基板として用いるが、その乾燥過程で金ナノ粒子が凝集し、その凝集状態が試料のイオン化効率や

再現性に影響を与えていた。本研究では、Au-SALDI の特性向上には、基板上に担持する金ナノ粒子の固定化と金ナノ粒子の分散制御が重要と考え、高分子を利用した交互積層法により金ナノ粒子の積層化を行った。金ナノ粒子の積層数を増大させる試料のピーク強度が増大し、金クラスターイオンが妨害イオンピークが低減した。これにより、従来の Au-SALDI の問題点を克服するとともに、更なる高感度化 (約 10 倍向上) を実現することに成功した。この金ナノ粒子積層基板によるペプチドや環境化学物質の SALDI-MS への応用可能性を示した。

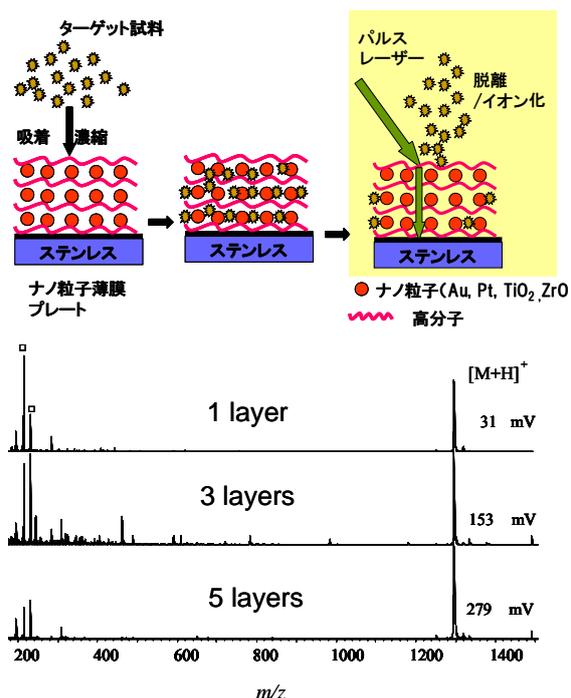


図 金ナノ粒子/高分子交互積層薄膜を利用した SALDI-MS の概念図。金ナノ粒子の積層数増大に伴うアンジオテンシン試料のピーク強度の増大を示す SALDI マススペクトル。

(2) ポリエチレンイミン修飾グラファイトシート、及びポーラスシリコン(DIOS)基板を用いた SALDI-MS による環境分析

MALDI では、環境汚染物質などの 500 Da 以下の低分子有機化合物が測定困難だけでなく、マトリックス/試料結晶の均一性がスペクトルの再現性に大きく影響し、定量性に欠ける課題がある。このような状況の中、本研究では、環境汚染物質として問題となり世界的な規制が始まろうとしているフッ素系類似化合物を対象とした SALDI-MS の研究を行った。パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) とそのフッ素系類似化合物、計 4 種の負イオン DIOS スペクトルを検討したところ、特に、PFOS の検出感度が極めて高く、1ppt であった。この PFOS については、2.5~10

ng/mL の測定範囲において検量線を得ることができた。実試料として水道水中の PFOS を測定した結果、PFOS 濃度は 8.7 ± 2.2 ppt であり、LC/MS/MS による測定値の 8.1 ± 1.0 ppt とほぼ同じ値であった。ただし、DIOS 基板では、パーフルオロオクタン酸 (PFOA) の検出は困難であった。

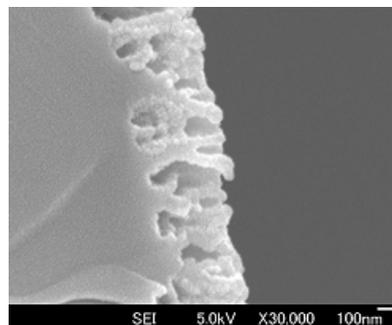


図 ポーラスシリコン基板の SEM 像

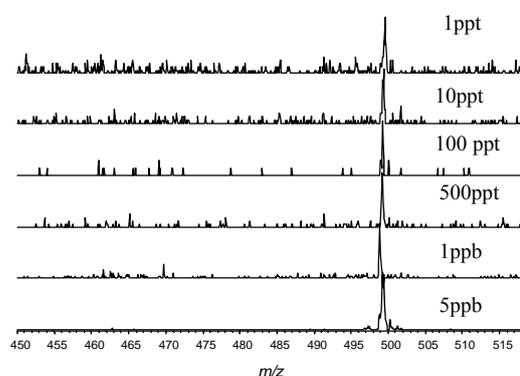


図 ポーラスシリコン基板を用いた PFOS の SALDI マススペクトル

そこで、PFOA の検出が可能となる SALDI 基板を検討したところ、ポリエチレンイミン (PEI) 修飾グラファイトシートを SALDI (GS-SALDI-MS) に用いることにより、PFOA の検出が可能であることを見出した。これは、PEI 修飾したグラファイトシート上に PFOA を表面吸着させたのち、レーザー脱離し、質量分析計で高感度検出するという原理からなる。PEI 未修飾では検出できなかった PFOA を、PEI 表面修飾を行うことにより高感度に検出できることがわかった。その検出限界は 10 ppb であり、10 ppb~1000 ppb の間で良好な検量線を作成することができた。さらに、炭化フッ素鎖長の異なる他の有機フッ素化合物や多環芳香族など、法的に規制されている他の環境汚染物質の検出にも PEI 表面修飾 GS は有効であることがわかった。GS-SALDI-MS により環境汚染物質を分析する手法は従来法と比較して、有機溶剤使用量が少なく済み、迅速かつ簡易な環境スクリーニングと半定量が可能となると考えられる。

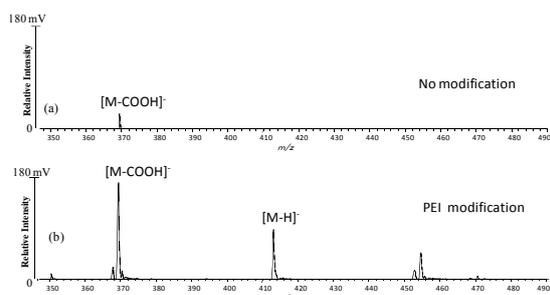


図 グラファイトシートを用いた PFOA のマススペクトル。PEI 表面修飾を行うことにより PFOA が検出可能になった。

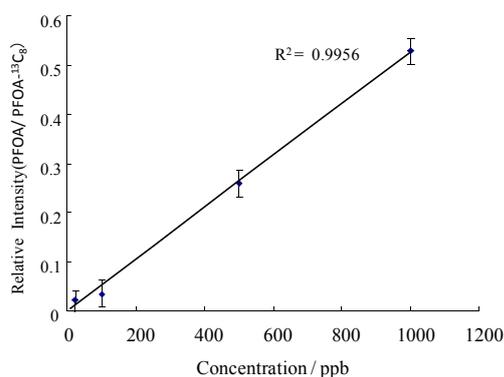


図 グラファイトシートを用いた SALDI-MS における PFOA の検量線

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

雑誌論文 (計 34 件)

① T. Yao, H. Kawasaki, T. Watanabe, and R. Arakawa, Effectiveness of Platinum Particle Deposition on Silicon Surfaces for Surface Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Peptides, *Int.J. Mass Spectrom.*, 291,145-151(2010). 査読有り

② H. Kawasaki, T. Akira, T. Watanabe, K. Nozaki, T. Yonezawa, and R. Arakawa, Sulfonate group-modified FePtCu nanoparticles as a selective probe for LDI-MS analysis of oligopeptides from a peptide mixture and human serum proteins, *Anal Bioanal Chem*, 395, 1423-1431(2009). 査読有り

③ H. Kawasaki, N. Takahashi, H. Fujimori, K.Okumura, T. Watanabe, C. Matsumura, S. Takemine, Takeshi Nakano, R. Arakawa, "Functionalized Pyrolytic Highly Oriented Graphite Polymer Film for Surface Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Environmental Analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 3323-3332(2009). 査読有り

④ H. Kawasaki, Y. Shimomae, T. Watanabe, and

R. Arakawa, Desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry (DIOS-MS) of perfluorooctane sulfonate (PFOS), *Colloids and Surfaces A*, 347, 220-224(2009). 査読有り

⑤ Y. Niidome, Y. Nakamura, K. Honda, Y.Akiyama, K. Nishioka, H. Kawasaki, N. Nakashima, Characterization of Silver Ion Complexes adsorbed on Gold Nanorods: Surface Analysis by Using Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (SALDI-MS), *Chem. Comm.* 1754-1796(2009). 査読有り

⑥ T. Yonezawa, H. Kawasaki, A. Tarui, T. Watanabe, R. Arakawa, T. Shimada, F. Mafune, Detailed Investigation on Possibility of Nanoparticles of Various Metal Elements for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Sci.*, 3,339- 346(2009). 査読有り

⑦ A. Tarui, H. Kawasaki, T. Taiko, T. Watanabe, T. Yonezawa, and R. Arakawa, Gold-nanoparticle-supported silicon plate with polymer micelles for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides, *J. Nanosci. Nanotech.*, 9, 159-164(2009). 査読有り

⑧ H. Kawasaki, T. Sugitani, T. Watanabe, T. Yonezawa, H. Moriwaki, R. Arakawa, Layer-by-Layer Self-Assembled Multilayer Films of Gold Nanoparticles for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal.Chem.*, 80,7524-7533(2008). 査読有り

⑨ T. Watanabe, H. Kawasaki, T. Yonezawa and R. Arakawa, Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles, *J. Mass Spectrom.*, 43,1063-1071(2008). 査読有り

[学会発表] (計 62 件)

① 川崎英也、高橋尚幸、渡辺健宏、竹峰秀祐、中野武、荒川 隆一、酸化グラファイトシートを利用した表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法による有機フッ素化合物の検出、第 70 回分析化学討論会、2009 年 5 月 16 日、和歌山大学。

② 奥村晃司、渡辺健宏、川崎英也、荒川隆一、合成高分子分析における酸化物微粒子を用いた SALDI 特性、第 13 回高分子分析討論会、2008 年 11 月 26 日、名古屋国際会議場。

[図書] (計 1 件)

川崎英也、「金属ナノ・マイクロ粒子の形状・構造制御技術」、シーエムシー出版、p53-62、2009 年。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 6 件）

①名称：MALDI 質量分析測定のためのナノ粒子担持イオン化基板の製造方法とその用途

発明者：米澤 徹、川崎 英也、渡辺 健宏、荒川 隆一

権利者：東京大学、関西大学

種類：特願、番号：2007-36658

出願年月日：2007年2月16日

国内外の別：国内

②名称：質量分析用基板及びその製造方法並びに質量分析法

発明者：川崎 英也、渡辺 健宏、荒川 隆一、溝口 大剛、室内 聖人、田村 祐介

権利者：関西大学、(株)大日本塗料

種類：特願、

番号：2008-332164

出願年月日：2008年12月26日

国内外の別：国内

③名称：試料捕捉合金、質量分析装置、質量分析方法、試料捕捉方法、試料捕捉合金、試料捕捉合金製造方法

発明者：川崎 英也、樽井 彰、渡辺 健宏、荒川 隆一

権利者：関西大学

種類：特願、

番号：2009-171507

出願年月日：2009年7月22日

国内外の別：国内

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 英也 (KAWASAKI HIDEYA)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：50322285