

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550084

研究課題名（和文） 高感度プロテオミクスのためのナノ構造基板の開発

研究課題名（英文） Development of nano-scale layered structure for sensitive proteomics

## 研究代表者

矢野 和義（YANO KAZUYOSHI）

東京工科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：40262109

研究成果の概要（和文）：ガラス基板上に金属膜として Ag 膜を、誘電体膜としてプラズマ重合膜を順次積層させたナノ構造基板を構築することで、その上で行う免疫アッセイからの蛍光シグナルを約 8 倍増強させることに成功した。また同様の構造を、より汎用性の高い 96 穴マイクロプレートに構築した場合でも、免疫アッセイの高感度化を達成することができた。

研究成果の概要（英文）：Nano-scale layered structure composed of silver and plasma-polymerized layers was built up on the glass substrate. Immunoassay on the substrate revealed that the fluorescence intensity was enhanced about 8-fold compared with that obtained by unmodified substrate. Furthermore, the same effect could be achieved when the nano-scale layered structure was fabricated on the 96-well microtiter plate.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分析化学、分子生物学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：プロテオミクス、プラズマ重合、分析化学、薄膜、蛍光

## 1. 研究開始当初の背景

ポストヒトゲノムとして、タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスが世界中で精力的に行われている。この際問題になるのは、ガンなどの疾患に関わる重要なマーカータンパク質やその他の創薬ターゲットなどは極めて微量にしか存在しないということである。このような重要かつ微量なタンパク質を高感度に検出する技術を開発することは、プロテオミクス分野のみならず、タンパ

ク質間相互作用などの詳細な生化学的研究分野においても極めて重要である。

一方、研究代表者はこれまでにナノメートルサイズの薄膜構造の構築により、高機能な DNA アレイやプロテインアレイの作製と標的分子の高感度な測定に成功してきた。例えば、プラズマ下で基板上に有機薄膜を形成するプラズマ重合法を駆使し、タンパク質をその機能を保持したまま重合膜に固定化・アレイ化することに成功している。平成 19-21 年

度科研費（基盤研究C）においては、基板上に金属膜とプラズマ重合膜をナノレベルで順次積層させたナノ構造基板を作製することにより、基板の蛍光標識タンパク質からの蛍光シグナルを著しく増幅することに成功している。

## 2. 研究の目的

本研究では、金属膜とプラズマ重合膜からなるナノ積層構造をタンパク質検出のためのさまざまなフォーマット（バイオチップやマイクロプレート）に構築し、これを用いて微量のタンパク質を高感度に検出することを目的とする。

具体的には、まずガラス基板の上にスパッタリングやプラズマ重合法などを駆使することによって、金属膜とプラズマ重合膜の積層構造を構築する。それらの基板上に抗原を固定化し、これを認識する Cy3 標識抗体を相互作用させることにより、抗原の高感度検出を試みる。また、別なアッセイフォーマットとして、より汎用性の高い 96 穴のマイクロタイタープレート上にもこのナノ構造基板を構築し、同様の効果が ELISA でも得られるかを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ナノ薄膜の製膜と膜厚の測定

洗浄したスライドガラス上に Ag の薄膜をスパッタリング装置 (CFS-4ES, SHIBAURA) によって 200 W の条件下で、200 nm の膜厚になるように製膜した。

また、プラズマ重合膜は、プラズマ重合装置 (Model BP-1, SAMCO) を用いて製膜した。本装置の外観を図 1 に示す。本研究で使用したモノマーは、hexamethyldisiloxane (HMDS) である。製膜の条件は、20 ccm、0.4 Torr、100 W とした。



図 1 プラズマ重合装置

Ag 膜とプラズマ重合膜の膜厚は触針型表面形状解析装置 (Dektak8 stylus profiler,

Veeco) を用いて測定した。

### (2) ナノ構造基板上における抗原抗体反応の検出

ナノ構造基板 (HMDS 膜: 約 53 nm, Ag 膜: 約 200 nm) と未修飾ガラス基板の 2 種類の基板を用いて抗原抗体反応による検出シグナルの比較を試みた。抗原には mouse IgG を、抗体には Cy3 標識抗 mouse IgG 抗体を使用した。

まず mouse IgG を様々な濃度になるよう PBS で希釈し、各溶液を 2  $\mu$ l ずつ、1 種類の希釈溶液につき 5 スポットずつそれぞれの基板上に滴下し、風乾させた。緩衝液で洗浄後、human serum albumin (HSA) を含む緩衝液でブロッキングした。洗浄後、10  $\mu$ g/ml Cy3 標識抗 mouse IgG 抗体を 700  $\mu$ l 滴下し、カバーをして室温で 30 分インキュベートした。洗浄、乾燥後、二次元蛍光検出装置 (Pharos, Bio-Rad) により蛍光の測定を行った。

### (3) マイクロプレートへの製膜の検討

マイクロプレート上に Ag 膜と HMDS 膜を製膜する場合、スライドガラスやシリコン基板とは異なり底が深い構造となっているため、均一に製膜されない可能性が高い。そこでマイクロプレートの底面部分の一部をマスキングした上で、薄膜の製膜を行った。その後、マイクロプレートの上部を切断し、触針型表面形状解析装置を用いて二次元的にウェル底面に製膜された薄膜の膜厚を測定することで製膜の様子を評価した。

### (4) ナノ構造マイクロプレートを用いた抗原抗体反応の検出

ナノ構造マイクロプレート上において、抗原抗体反応に由来する特異的な結合と蛍光シグナルの増強が起こるかを確認するため、抗原抗体反応の検出を試みた。抗原は mouse IgG と rabbit IgG の 2 種類とし、抗体として Cy3 標識抗 mouse IgG 抗体を使用することとした。

まず mouse IgG と rabbit IgG を様々な濃度になるように PBS で希釈した。これらの各溶液を 100  $\mu$ l ずつ、1 種類の希釈溶液につき 2 サンプルずつマイクロプレートのウェルに入れ、シールでカバーし、室温で 2 時間インキュベートした。洗浄後、HSA を含む緩衝液でブロッキングし、また洗浄した。次に 10  $\mu$ g/ml Cy3 標識抗 mouse IgG 抗体 100  $\mu$ l を各ウェルに滴下し、室温で 30 分間インキュベートし、洗浄した。最後に各ウェルに 150  $\mu$ l の緩衝液を滴下し、二次元蛍光検出装置を用いて蛍光シグナルを測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ナノ構造基板上における抗原抗体反応

の検出

未修飾ガラス基板及びナノ構造基板上において抗原抗体反応の検出を行い、得られた二次元蛍光像を図2に、また各蛍光シグナル強度を測定しグラフ化したものを図3に示す。

抗原: mouse IgG  
抗体: Cy3-labeled  
anti-mouse IgG antibody

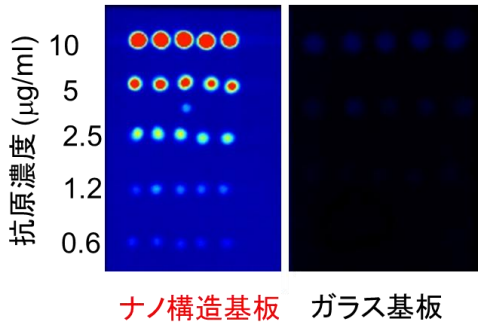


図2 ナノ構造基板上における抗原抗体反応の検出結果

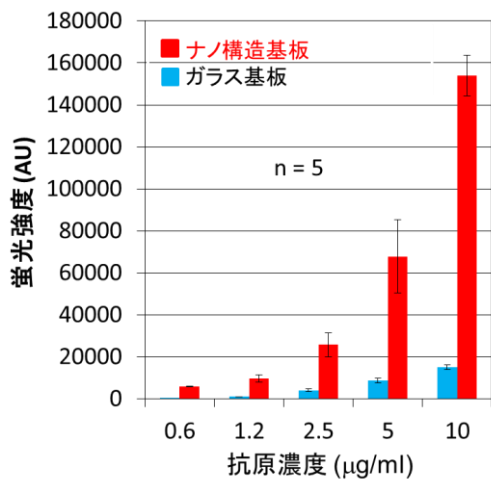


図3 蛍光シグナルの算出結果

図2より、未修飾のガラス基板上においては、サンプル濃度が5 µg/mlまでは微弱な蛍光シグナルを確認できたが、それ以下の濃度のサンプルでは蛍光シグナルを確認することができなかった。それに対し、ナノ構造基板上においては未修飾ガラス基板の蛍光シグナルよりも非常に強い蛍光シグナルが確認された。また図3から、ナノ構造基板における蛍光強度は、未修飾ガラス基板に比べ約8倍高いものとなっていることが分かった。さらに mouse IgG の濃度に依存して蛍光強度が変化しており、未修飾ガラス基板上においては検出できない0.6 µg/mlのサンプルについても検出が可能であった。以上の結果、ナノ構造基板は抗原抗体反応に由来するシグナルを増強し、かつ未修飾の基板では検出できない濃度についても検出を行えることが

確認できた。

(2) マイクロプレートへの製膜の検討

マイクロプレートのウェル上で製膜した HMDS 膜の膜厚を測定し、ガラス基板上における HMDS 膜の膜厚測定結果と併せてまとめたグラフを図4に示す。

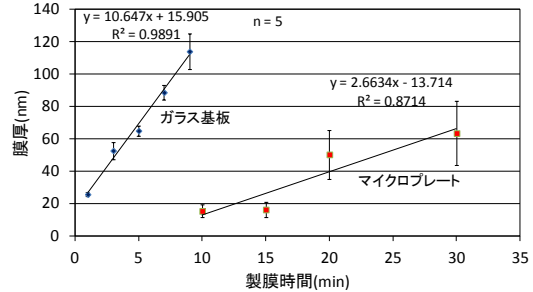


図4 マイクロプレート上へのナノ構造の構築

この結果、マイクロプレートのウェル底面では製膜速度が非常に遅くなり、ガラス基板における製膜速度の約1/4となっていることが分かった。またマイクロプレートに Ag 膜を製膜した場合でも同様の結果が得られた。ここで得られた検量線をもとに、以降の製膜を行うこととした。

(3) ナノ構造マイクロプレートを用いた抗原抗体反応の検出

ナノ構造マイクロプレートを用いて抗原抗体反応を行い、得られた二次元蛍光像を図5に示す。

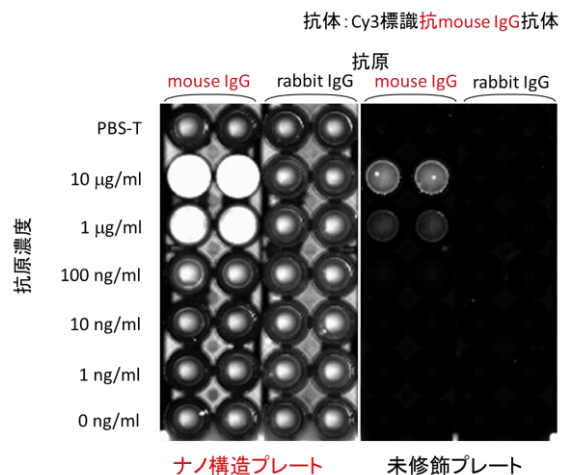


図5 ナノ構造プレートを用いた免疫反応

未修飾マイクロプレートにおいては mouse IgG を固相化したウェルから微弱な蛍光シグナルしか確認できないのに対し、ナノ構造マイクロプレートにおいては mouse IgG を固相化したウェルから非常に強い蛍光シグナル

が発せられている様子が確認できた。  
この二次元蛍光像をもとに蛍光強度を算出しグラフ化した結果を図6に示す。

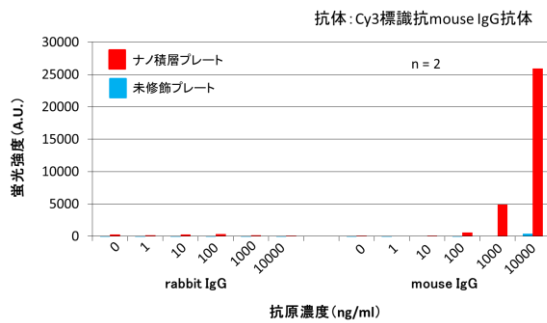


図6 ナノ構造プレートを用いた免疫反応の算出結果

このグラフから、ナノ構造プレートでは mouse IgG を固相化したウェルのみ濃度依存的な蛍光シグナルの増減が見られ、rabbit IgG を固相化した部分においては蛍光シグナルの変化が見られないことが確認できた。また、未修飾マイクロプレートでは検出できない 100 ng/ml の mouse IgG を検出できた。このことから、ナノ構造マイクロプレートでは抗原抗体反応に由来する特異的な結合が起こり、それに由来する蛍光シグナルが増強されることで高感度に抗原抗体反応を検出できることが分かった。

以上の結果から、Ag 膜とプラズマ重合膜が積層されたナノ構造基板、ナノ構造マイクロプレートを用いることで、免疫アッセイを高感度に行えることが示された。

## 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1件)

①K. Miyajima, G. Itabashi, T. Koshida, K. Tamari, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, H. Saito, K. Yano, K. Shiba, K. Mitsubayashi, Fluorescence immunoassay using an optical fiber for determination of *Dermatophagoides farinae* (*Der f 1*), *Environmental Monitoring and Assessment*, 査読有, 2011, **182**, pp. 233-241

[学会発表] (計7件)

①矢野和義、岩崎憲晃、蛍光増強構造を有するマイクロプレートを用いた高感度免疫アッセイ、第64回日本生物工学会大会、2012年10月26日、神戸国際会議場

②岩崎憲晃、矢野和義、蛍光増強構造を有するマイクロプレートを用いた高感度免疫アッセイ、第5回バイオ関連化学シンポジウ

ム、2011年9月12日、つくば国際会議場

③矢野和義、柳田奈那美、佐々木典子、坂口菜央、平塚淳典、佐藤淳、横山憲二、軽部征夫、全自動二次元電気泳動装置を用いたタンパク質の分離とリン酸化タンパク質の免疫検出、日本化学会第5回関東支部大会、2011年8月30日、東京農工大学

④K. Yano, S. Watanabe, A. Iwasaki, H. Miyachi and T. Akimoto, Highly sensitive antibody arrays modified by plasma polymerization, PACIFICHEM2010, Dec. 17, 2010, Honolulu Convention Center, Hawaii, USA

⑤岩崎憲晃、矢野和義、蛍光増強構造を有するマイクロプレートを用いた高感度蛍光検出、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド

⑥矢野和義、柳田奈那美、佐々木典子、坂口菜央、平塚淳典、佐藤淳、横山憲二、軽部征夫、全自動二次元電気泳動装置を用いたタンパク質の分離とリン酸化タンパク質の免疫検出、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド

⑦岩崎憲晃、矢野和義、蛍光増強構造を有するマイクロプレートを用いた高感度蛍光検出、日本化学会第4回関東支部大会、2010年8月30日、筑波大学

[図書] (計1件)

①軽部征夫編著(他9名)、バイオセンサーのはなしー生体分子や細胞を用いた新しいバイオ計測法ー、2012年、日刊工業新聞社、pp27-42、128-133、146-150

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 和義 (YANO KAZUYOSHI)  
東京工科大学・医療保健学部・教授  
研究者番号: 40262109

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

秋元 卓夫 (AKIMOTO TAKUO)  
東京工科大学・応用生物学部・准教授  
研究者番号: 90367194