

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655074

研究課題名（和文）低分子化合物とタンパク質の結合評価のための銀ナノプレート集積体バイオチップの創成

研究課題名（英文）Fabrication of Ag nanoplate-bio tip for evaluation of the binding between proteins and small molecules.

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）：

本研究の目的は、分子標的創薬や個別化医療の実現に貢献する「標的タンパク質と複数の低分子薬物の特異的な結合様式を解明」するための質量分析と分光分析を連携させた新規な分析手法を開発した。局在表面プラズモン(LSPR)センサーによる相互作用解析とレーザー脱離イオン化法質量分析(LDI-MS)による結合物の同定・構造解析を同一試料基板で行うことができる三角形銀ナノ構造体チップを作成した。この構造体チップを用いた LSPR/LDI-MS 連携させた分析手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

A complementary analytical methodology combining localised surface plasmon resonance (LSPR) sensing and matrix assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry (MALDI-MS) has been developed by using triangular silver nanoplates (Ag NPLs). Ag NPLs with near-IR LSPR absorbance were prepared via a two-step photo-mediated growth process from Ag nanoparticles. These could be utilised as a common platform for LSPR/MALDI-MS, as they were suitable for LSPR sensing via the analysis of surface plasmon adsorption bands and as the assisting material for LDI-MS. For practical use, the detection of analytes by LSPR sensing can be achieved by using specific biomolecular recognition techniques that involve the surface modification of metal NPs with large molecules such as proteins. We investigated the effect on LSPR sensitivity (i.e. refractive index unit, RIU) of modifying the Ag surface with molecules of different sizes, and found that the RIU values were proportional to the amplitude of the cube root of the molecular weight, $M_w^{1/3}$. We demonstrated the utility of this complementary LSPR and MALDI-MS analysis methodology by evaluating the binding of soy bean trypsin inhibitor to the Ag NPL substrate covalently modified with trypsin. This specific biomolecule recognition phenomenon was first detected using the LSPR technique, and then successfully identified by the MALDI-MS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオチップ・銀ナノプレート・低分子化合物・タンパク質・MALDI-MS・LSPR

1. 研究開始当初の背景

分子標的創薬や個別化医療の実現には、「標的タンパク質と複数の低分子薬物の特異的な結合様式」を解明することが重要である。

リガンドに対するタンパク質やタンパク質間相互作用などタンパク質をターゲットとする様々な分析方法に加え、タンパク質と結合する低分子化合物（分子標的薬）を解析す

る分析手法の開発が重要である。しかし、その測定の困難さから、分析手法の開発が遅れているのが現状であった。

2. 研究の目的

上記の背景の中で本研究は、低分子化合物と標的タンパク質との相互作用解析を行う“局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) センサー”とタンパク質と結合した低分子化合物の同定・構造決定を行うレーザー脱離イオン化質量分析 (LDI-MS) を連携させた LSPR/LDI-MS 連携分析法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

LSPR-LDI-MS 連携システムを実現するために、以下の研究を行った。(1) LSPR と LDI-MS の両方で使用でき、かつ高感度化できる三角形銀ナノ構造体チップを新規に創製した。(2) 三角形銀ナノ構造体チップを用いた LSPR/LDI-MS 連携分析法による低分子化合物-タンパク質間結合、及びタンパク質-タンパク質間結合の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 近赤外吸収を示す三角形銀ナノプレートの合成

三角形銀ナノプレート (三角形の板状の銀ナノ粒子, AgNPL) を用いた LSPR センサーとは、標的物質の吸着による銀ナノ粒子表面の周囲の屈折率変化にตอบสนองして LSPR ピーク波長やその強度が変化することを利用して、標的物質の結合を簡便に検出できるセンシング法である。この LSPR センシングの高感度化には、近赤外領域に LSPR ピーク波長を示す AgNPL を使用することが有効である (つまり、アスペクト比が大きい AgNPL)。これは、保護剤として界面活性剤や高分子を用いなければならず、これら有機物で保護された AgNPL は、LSPR センシングや LDI-MS で使用する場合に感度低下につながり、問題がある。

そこで本研究では、照射と化学還元法を組み合わせた合成方法により、界面活性剤や高分子を用いずとも、近赤外領域に LSPR ピーク波長を示す AgNPL を合成する手法を見出した。本合成法は、3 ステップからなる。Step 1. クエン酸保護された球状銀ナノ粒子の合成 (種粒子)。Step 2: Na ランプ照射することにより、球状銀ナノ粒子から AgNPL を生成 (LSPR 吸収波長: 600-700 nm) (図 1 a)。Step 3. Na ランプ照射 4 時間後に AgNPL 成長促進剤として硝酸銀を添加し、近赤外領域に LSPR ピーク波長 (800-1000nm) を示す AgNPL を合成できた (図 1 b)。

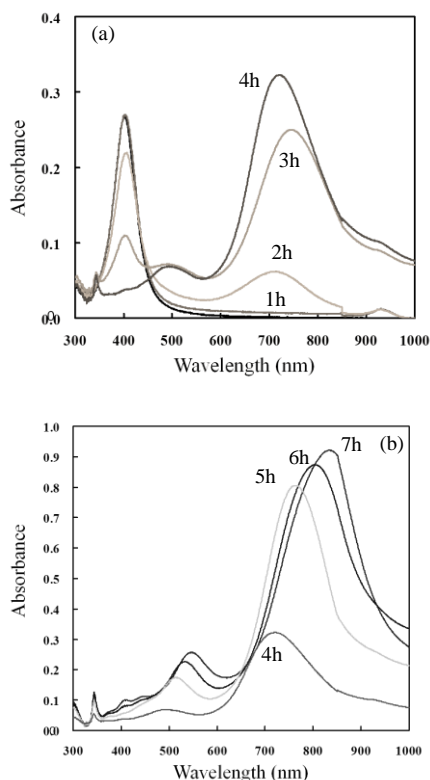


図 1 紫外可視吸収スペクトル: 銀ナノプレートの成長過程 (a) 照射 0 から 4 時間 (b) 照射 6 から 7 時間

TEM 観察により、4 時間照射した系では、エッジ長約 60 nm の AgNPL が観察された。一方、Ag⁺イオンを追加後さらに 3 時間照射した系 (計 7 時間照射) では、エッジ長が約 120 nm と大きく成長した AgNPL が多く観察された。

(2) LSPR/LDI-MS 連携分析で使用する三角銀ナノプレート固定化基板の作成

LSPR/LDI-MS 連携分析で使用するためのチップとして、AgNPL をガラス基板に固定化した。この際、AgNPL が基板上で凝集すると LSPR ピークがブロード化し、LSPR センシングに問題が生じる。AgNPL が基板上で分散して固定化される条件を検討した。

ガラス基板を 1 mg/mL ポリエチレンジアミン水溶液に 1 時間浸漬した。その後、AgNPL 水溶液に 24 時間浸漬してガラス基板上に AgNPL を固定した。更に、50 mM メルカプトウンデカン酸を含むエタノール溶液に 2 時間浸漬し、AgNPL 表面をカルボン酸で表面修飾した後、アミンカップリング法により様々なタンパク質を AgNPL 表面に固定化した。図 2 に、AgNPL 固定化基板の写真と基板に固定化された AgNPL の SEM 像、及び紫外可視吸収スペクトルを示す。基板上で AgNPL は分散して固定

化されており、近赤外領域の 800 nm 付近に LSPR ピークを示すことを確認した。このようにして、三角形銀ナノ構造体チップを作成した。

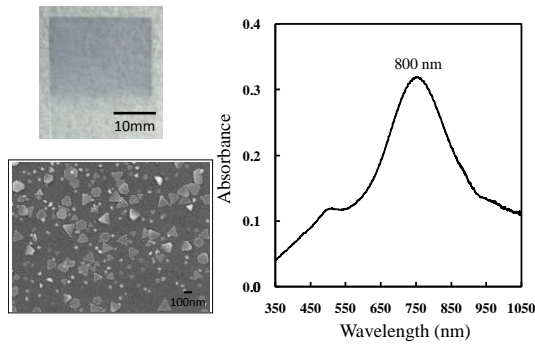


図 2 LSPR/SALDI 連携システムで使用する三角銀ナノプレート固定化基板

(3) 三角形銀ナノ構造体チップを用いた LSPR/LDI-MS 連携分析の装置作成と評価

LSPR センシングは、標的物質の結合をリアルタイムでモニターするために、フローシステムを採用した。三角形銀ナノ構造体チップをフローセル内に固定化した。試料溶液を、ポンプ (SMP-21, 東京理化機械株式会社) を用いてフローセルに流入し、紫外可視吸収分光光度計 (検出器: USB4000, Ocean Optics, 光源: DH-2000-BAL, Mikropack) により、表面修飾された AgNPL と目的試料との相互作用をリアルタイムで測定した。目的試料の AgNPL 上への結合の同定・構造解析は、LSPR センシングで用いた AgNPL 固定基板を、LDI-MS (AXIMA-CFR TOFMS, 株式会社島津製作所) で直接分析することで行った。図 3 に、LSPR/LDI-MS センシングの概念図を示す。

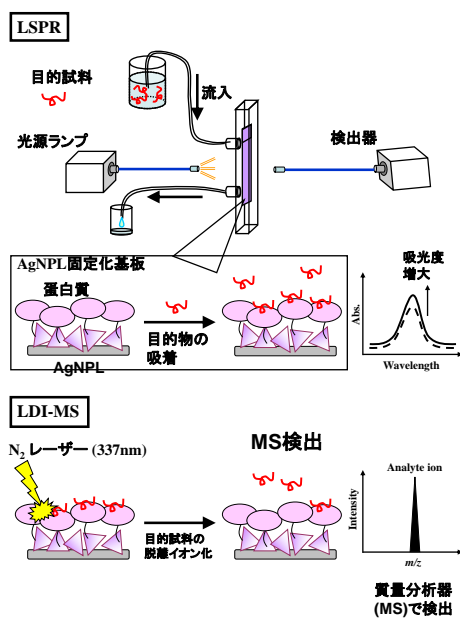


図 3 AgNPL 固定化基板を用いた LSPR/SALDI センシングの概念図

3-1. 低分子化合物 (PFOS) の検出

メルカプトウンデカカルボン酸 (MUA) で表面修飾した MUA-AgNPL 固定基板を用いて LSPR センシング/LDI-MS による PFOS の検出・同定を検討した。PFOS は、自然環境中で分解し難いため広範囲に蓄積し易く、人体にも有害であると言われている環境汚染物質である。

図 4 a に 0.2 mM PFOS 水溶液の流入時間と MUA 修飾 AgNPL 固定基板の LSPR 吸光度変化の関係を示す。最初に純水を約 20 分間流入し、LSPR 強度に大きな変化がないことを確認した。続いて、0.2 mM PFOS 水溶液を流入したところ、約 0.035 の吸光度増加が観察された。この吸光度変化は、PFOS が MUA-AgNPL 固定基板の表面に結合し、表面の屈折率が変化したことに基づくものと考えられる。LSPR の吸光度増加が PFOS の AgNPL 固定基板への吸着に起因することは、LDI-MS 測定により確認された (図 4b)。マススペクトルから、 $m/z = 499$ に [PFOS-H]⁻ のイオンが検出され、LSPR 強度の増加は PFOS の吸着によるものと明らかになった。

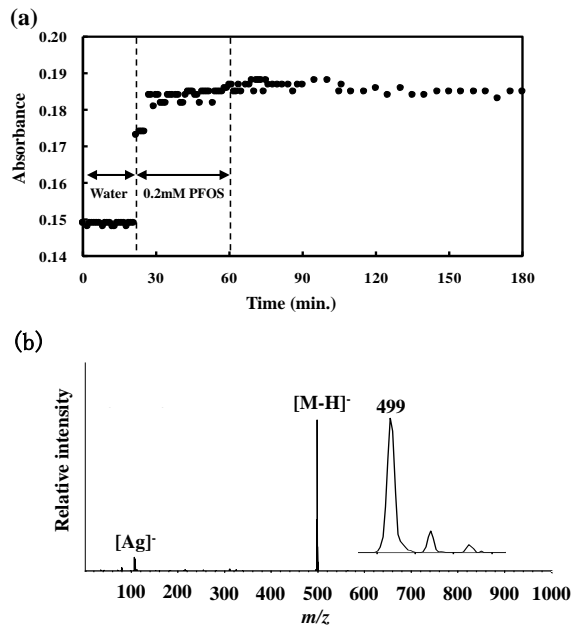


図 4 (a) PFOS 水溶液の流入時間と MUA 修飾 AgNPL 固定基板の LSPR 吸光度変化 (b) LDI-MS スペクトル

3-2. 蛋白質の検出

トリプシン (Tryp) 修飾された AgNPL 固定基板 (Tryp-AgNPL) を用いて、LSPR センシング/マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) 連携分析による Tryp と Tryp 阻害剤 (SBTI) との相互作用の検出・同定を検討した。SBTI は酵素タンパク質である

Tryp と結合し、その酵素作用を阻害する物質として知られている。現在、各種酵素阻害剤の開発は癌の治療薬候補として期待されており、その阻害剤の開発が活発に行われているため、酵素-酵素阻害剤の相互作用を調べる分析手法の開発は重要である。

図 5 に 24 μ M SBTI を含む 0.2 M リン酸バッファ水溶液 (PBS) の流入時間と Tryp 修飾 AgNPL 固定基板の LSPR 吸光度変化の関係を示す。LSPR センシングにおいて、最初に約 30 分間 PBS を流入し、LSPR 吸収に大きな変化がないことを確認した (図 5a 領域 I)。続いて SBTI を流したところ、吸光度の増加が観察された (図 5a 領域 II)。これは、AgNPL 表面の Tryp に SBTI が結合したためである。その後 PBS で洗浄したが、Tryp と SBTI に結合が維持されたため、吸光度に大きな変化は見られなかった (図 5a 領域 III)。SBTI の結合を明らかにするため、LSPR センシング後の AgNPL 固定基板について MALDI-MS 測定を行った (図 5b)。マスペクトルにおいて、 $m/z=20,100$ 付近に SBTI の分子イオンが検出され、LSPR センシングによる吸光度変化は、SBTI の結合によるものであることが明らかになった。

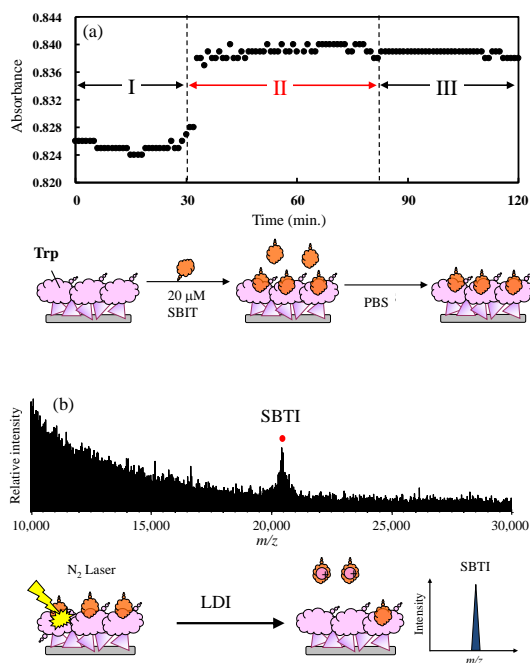


図 5 (a) SBTI 水溶液の流入時間と Tryp 修飾 AgNPL 固定基板の LSPR 吸光度変化 (b) MALDI-MS スペクトル

LSPR と MALDI-MS を組み合わせた本計測システムは、標的タンパク質と薬物との相互作用や抗原-抗体反応などを解析、結合した分子の同定・構造解析をする新たな手法として

の展開が期待される。

(4) 蛋白質-低分子薬物結合を利用した SALDI-MS による血清中の薬物検出

磁性を有する酸化鉄 (Fe_3O_4) ナノ粒子の表面に、低分子薬物と相互作用のあるヒト血清アルブミン (HSA) を修飾させた HSA 修飾 Fe_3O_4 ナノ粒子 ($\text{HSA-Fe}_3\text{O}_4$) を新規に合成した。HSA と結合した低分子薬物を、抽出操作なしで直接、LDI-MS で検出できることがわかった。HSA 未修飾の Fe_3O_4 ナノ粒子 ($\text{Bare-Fe}_3\text{O}_4$) では血清・尿試料中に含まれる低分子薬物であるワルファリンのピークを検出できなかった。一方、 $\text{HSA-Fe}_3\text{O}_4$ を用いることで、血清・尿試料中のワルファリンのイオンピークを検出することができた (図 6)。

以上のように、磁性ナノ粒子の 2 つの機能、(1) タンパク質で表面修飾した磁性ナノ粒子と低分子薬物との相互作用と (2) 磁性ナノ粒子の LDI 特性を利用することで、粒子表面に吸着した低分子薬物を直接、LDI-MS で検出できることがわかった。

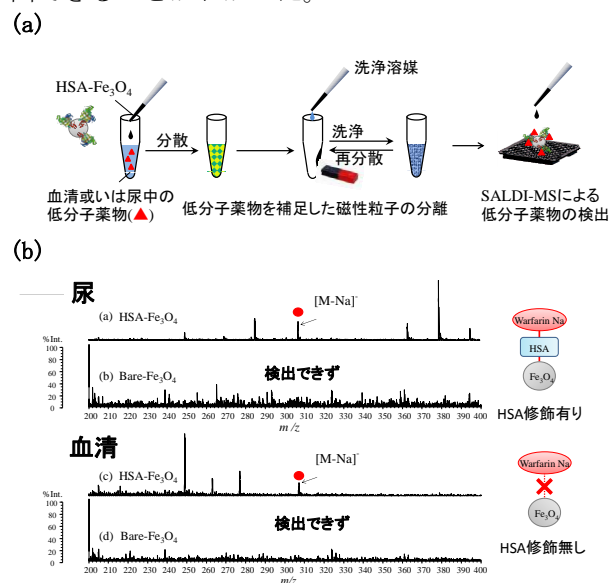


図 6 ヒト血清アルブミン (HAS) -低分子薬物結合を利用した SALDI-MS による血清中の薬物検出。(a) 概念図、(b) 血清、及び尿中のワルファリンの SALDI-MS による検出

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- (1) S. Nitta, H. Kawasaki, T. Suganuma, Y. Shigeri, and R. Arakawa, "Desorption/Ionization Efficiency of Common Amino Acids in Surface-assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) with Nanostructured Platinum", *J. Phys. Chem. C*, 117, 238-245 (2013).

- DOI: 10.1021/jp308380z. (査読有り)
- (2) H. Kawasaki, T. Ozawa, H. Hisatomi and R. Arakawa, “ Platinum Vapor Deposition Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization for Imaging Mass Spectrometry of Small Molecules, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 1849-1858 (2012). doi: 10.1002/rcm.6301. (査読有り).
- (3) Y. Iwaki, H. Kawasaki, and R. Arakawa, “Human Serum Albumin-Modified Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles for Affinity-SALDI-MS of Small-Molecule Drugs in Biological Liquid, *Anal. Sci.*, 28, 893-900 (2012). https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/28/9/28_893/_article. (査読有り).
- (4) H. Kawasaki, K. Nakai, R. Arakawa, E. K. Athanassiou, R. N. Grass, and W. J. Stark, “Functionalized Graphene Coated Cobalt Nanoparticles for Highly Efficient SALDI-MS analysis “, *Anal. Chem.*, 84, 9268-9275 (2012). doi: 10.1021/ac302004g. (査読有り).

[学会発表] (計5件)

- (1) 新田 修平, 白金ナノ構造体チップを用いたアミノ酸20種によるSALDI-MSの特性評価, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012年09月17日, 京都.
- (2) 川崎 英也, Functionalized CarbonGraphen-Coated Iron Nanoparticles as the Matrix and Magnetic Separation for Highly Efficient SALDI MS analysis, International Association of Colloid and Interface ScientistsConference, 2012年05月15日, 仙台.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.kikibun.com/>

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

(2) 研究分担者

荒川 隆一 (ARAKAWA RYUICHI)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号: 00127177

(3) 連携研究者: 無し

研究者番号: