

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289069

研究課題名(和文) テラヘルツ帯の電磁エネルギーによる生体タンパクの分画・同定技術の研究

研究課題名(英文) Development of biological protein fractionation and Identification technique by the electromagnetic energy of THz wave

研究代表者

吉村 昇 (Yoshimura, Noboru)

秋田大学・その他部局等・その他

研究者番号：60006674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体タンパク、アミノ酸を対象としてTHzスペクトラム解析装置を用いて吸収スペクトルの測定を試みた。セルロースアセテート膜を母材とした条件では、塗布状態の違いにより吸収スペクトルに定量誤差が誘発されることを明らかにした。最適な塗布条件を検討するために、マテリアルプリンタを用いて単位面積あたりの塗布量・塗布条件の最適化をはかり、THz吸収スペクトルの定量に適した試料作製条件を構築した。これにより、アミノ酸単体では明瞭な吸収スペクトルを示すこと、一方、タンパク質はブロードな吸収特性となることを明らかにした。さらに、アミノ酸を分離して塗布した状態と混合溶液とではスペクトルが全く異なる現象を発見した。

研究成果の概要(英文)：Biological protein and amino acid, was attempted to measure the absorption spectrum by using a THz spectrum analyzer. The quantification error in the absorption spectra was induced by the differences in coated state as a base material of Cellulose acetate membranes. To investigate the optimum coating conditions, it optimizes the coating amount and coating conditions per unit area using a material printer, was constructed sample preparation conditions suitable for the determination of THz absorption spectrum. Thus, the amino acid itself exhibit distinct absorption spectra, whereas, protein was revealed to be a broad absorption properties. Further, the spectrum was completely different between the mixed solution and individual amino acid.

研究分野：電気絶縁材料

キーワード：テラヘルツ タンパク質 バイオ関連機器 生体分子 可視化技術 マテリアルプリンタ

1. 研究開始当初の背景

THz 波はミリ波と遠赤外線の中間に位置づけられる 10^{11} から 10^{13} Hz までの周波数帯の電磁波であり、近年まで利用することが出来なかった未開拓の電磁波である。物質に THz 波をあてると原子間の振動が共振して電波が吸収される。逆に吸収周波数から物質を構成する分子の結合が分る。そのため、FTIR (フーリエ変換赤外分光光度計) で用いられる赤外線と比べ、極めて高い精度で有機分子の構造欠陥をも調べる可能性を秘めている。本研究代表者は 1970 年以来、誘電体および絶縁材料内外の絶縁劣化現象である水トリー、トラッキング、プリント配線板における電気化学的絶縁劣化現象として知られるイオンマイグレーションについて研究しており、各種高分子内でのトリーの発生・進展メカニズム、印加電圧と周波数が誘電体・絶縁体に及ぼす影響、さらに各種金属イオンの挙動等を明らかにしてきた。この過程で、電磁気学的な試験法・評価方法に関する技術とノウハウを蓄積してきた。平成 16 年度には、本研究代表者(吉村昇)が初代会長となり秋田テラヘルツ応用研究会を創設、秋田県内の医学、薬学、工学、農学の研究者が共同で THz の応用研究を開始した。本研究会を母胎として境界領域での共同研究が進められ、本研究課題は他分野とも連携し体系的に境界分野の最新情報が得られるとの特色を有している。我々はこれまでに(財)半導体研究所(仙台市)で開発された THz イメージング装置を用いて、可視光線では診断が困難な皮膚ガン的一种であるメラノーマの検査方法を研究してきた。我々は既に THz 波を用いた生体材料の計測に関する基礎実験を終え、皮膚ガン的一种であるメラノーマと母斑との弁別が可能であることを明らかにした。一方、水分が多い体内では THz 波の吸収が極めて大きく、現在の出力では計測に限界があった。この経験を基に発想を逆転させ、生体由来物質による吸収に優れるメリットを最大限に活用し、病態検査における電気泳動後の染色プロセスを THz イメージングで代行できるのではないかと発案した。その後、科学研究費(平成 22 年度~24 年度)の支援を受け、0.2THz の THz 波によりセルロースアセテート膜上で電気泳動したタンパクを非染色で可視化する実証実験に成功した。この研究を進める過程で、タンパクの構成要素であるアミノ酸等、生体由来物質の種類により THz 帯の電磁波の吸収スペクトルが異なる点に気づき、THz 波で「タンパクの種類を識別・同定する」との発想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、従来、抗体反応を利用して染色しなければ可視化することができなかった血清タンパクの電気泳動技術に、テラヘル

ツ帯の電磁波を利用した可視化技術を組み合わせることにより、低コストに複数の生体由来物質を同定・操作することで、病態の迅速診断を可能にする検査技術を研究開発することを目的としている。

3. 研究の方法

THz イメージング装置は TUNNETT 発振素子、パルス電源、SBD 検出器、ロックインアンプ、X-Z ステージおよびコンピュータで構成されており、透過像と反射像を得ることができる(図1, 図2)。本装置では X-Z ステージに取り付けられた試料を走査させることで、2台の SBD(Schottky diode)を用いて THz 波反射・吸収イメージを同時に作成する。ここで TUNNETT 発振素子とは、トンネル注入走行時間効果負性抵抗ダイオードの名称で、30GHz~3THz までの周波数帯の発振を得る事のできるダイオードである。また、これまでは生体組織を対象として計測してきたが、本研究課題では新たに各種生体由来物質を測定できるように、イメージング装置のサンプルホルダ(試料台)と SBD のホーンアンテナ部を改良する。一方、電気泳動後にタンパクの質量分布(図3)を正確に計測するためには、電気泳動前に生体由来物質をセルロースアセテート膜上に如何に正確に塗布できるかが鍵となる。本研究では、1 p ℓ のサンプルを 1 μ m の位置分解能で再現性良くプリントアウト可能なマテリアルプリンタを導入する。これにより、泳動前の初期条件をコントロールすることが可能となり、分画の精度向上も期待できる。なお、利用には生体試料の粘性および表面張力を適正值に制御する必要があり、ここでは試料調整方法も合わせて技術開発する。

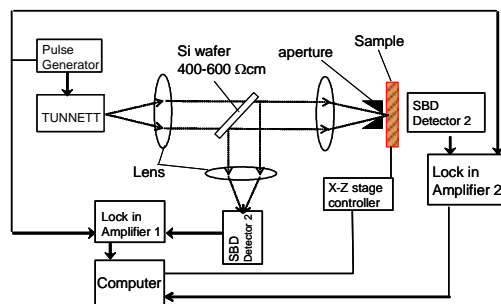


図1 THz 波イメージング装置のブロック図

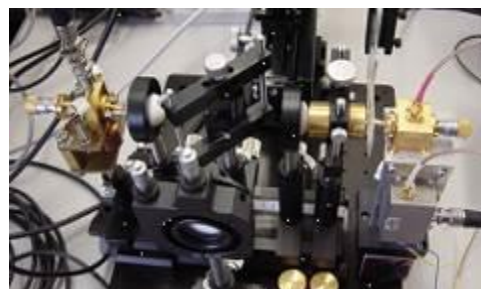


図2 THz 波イメージング装置の外観

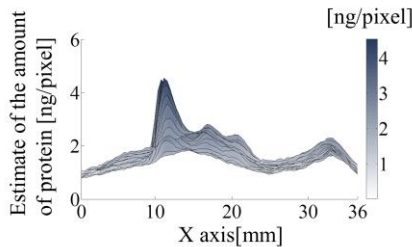
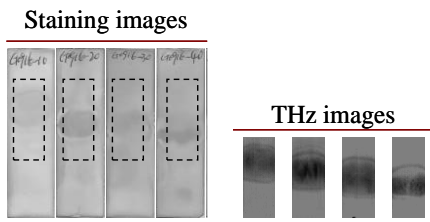


図3 電気泳動後の可視化試料と THz 吸収量から算出した質量分布

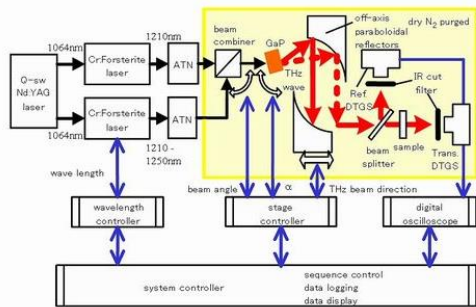


図4 THz スペクトラム解析装置のブロック図

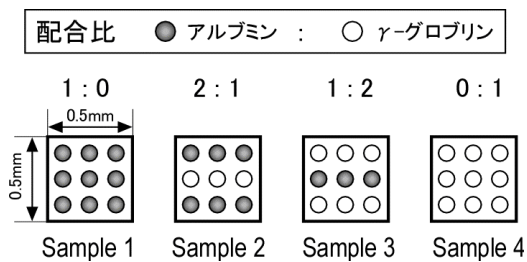


図5 THz 吸収スペクトル検証用のリファレンス試料

電気泳動法に用いられる代表的なタンパク、アミノ酸で計測用試料を作製し、THz 帯での吸収スペクトルを測定する。なお、計測には学内共同利用設備である THz スペクトラム解析装置 (図4) を利用する。通常、遠赤外から THz 帯における吸収スペクトルの計測には、錠剤状に成型した KBr, Si が利用されてきた。本研究では電気泳動で利用可能なセルロースアセテート膜を母材として考えている。しかしながら、セルロースアセテート

(CA) 膜での計測事例は少なく、新たな計測技術の構築が必要となる。ここで、複数種類のタンパクが混在して塗布された状態では分子間相互作用により吸収スペクトルが消失する可能性があり、粉体試料を測定する錠剤法を模擬した条件で試料を調整・製作する必要があると考えた。そこで、高い位置精度でタンパクを印刷できるマテリアルプリンタを用いてタンパクまたはアミノ酸の混合比率を調整したリファレンス試料 (図5) を作製して、吸収スペクトルを取得する。さらに、電気泳動により分画したタンパクの THz 吸収スペクトルの計測技術の構築もめざしていく。本研究を通して構築されるセルロースアセテート膜を母材としたタンパクの吸収スペクトル計測技術を踏まえ、実際に電気泳動されたタンパクを対象として吸収スペクトルを取得するための要素技術の構築を進める。なお、タンパクの可視化には THz イメージング装置を利用する予定である。

4. 研究成果

本研究では、THz イメージングおよび THz スペクトルの領主法を用いて PVDF 膜および CA 膜に塗布したタンパクおよびアミノ酸の可視化技術について検討した。

THz イメージングにおいては、PVDF 膜へのタンパク質転写処理によるタンパク質の拡散防止を試み、THz イメージングに適した試料作製プロセスを構築した。また、THz スペクトルにおいては、THz 波の持つ指紋スペクトルによって電気泳動技術における成分分析を可能にするべく、高分子膜を支持体とした試料において特徴的な生体物質の THz 吸収スペクトルを取得した。得られた成果を以下に示す。

4-1. SDS-PAGE 試料における THz イメージング技術の構築

従来、等電点電気泳動に使用していた CA 膜は、タンパク質の吸着性能を持ち合わせていないため、乾燥工程においてタンパク質の拡散現象が生じていた。そこで、試料作製手法を改め、SDS-PAGE によってタンパク質を分離し、PVDF 膜へ転写することで、タンパク質の拡散による影響を低減できると考えた。

□SDS-PAGE 試料における THz イメージングの有効性の実証：

SDS-PAGE におけるタンパク質の最適な泳動量は、 $20 \sim 40 \mu\text{l}$ とされている。しかし、泳動における最適量は THz イメージングにおいても最適であるとはいえないため、泳動するタンパク質量を4段階に設定して THz イメージング結果を比較した。その結果、タンパク質量 $200 \mu\text{l}$ および $300 \mu\text{l}$ の試料において、染色結果と同等のタンパク質バンドを THz イ

メージングにより可視化できることを明らかにした (図 6 (a)). しかし, タンパク質量 40 μl および 100 μl の試料における THz イメージングでは, タンパク質バンドの吸収を視認できなかつた (図 6 (b)). タンパク質量の少ない試料における THz イメージングにおいて泳動結果を視認できなかつた原因について, PVDF 膜上にノイズとなる物質が存在しているためと考えた.

□ 泳動バッファの洗浄工程追加による SDS-PAGE 試料作製プロセスの構築:

ノイズの原因物質について, SDS-PAGE および WB にて使用する各バッファを調査したところ, 泳動バッファが THz 波を顕著に吸収することを明らかにした. そこで, ゲル表面に残存する泳動バッファを除外する工程を追加し, SDS-PAGE に組み込んで実験したところ, タンパク質量 40 μl の泳動試料において, THz イメージングによって可視化できることを明らかにした (図 7). また, タンパク質バンド先頭部における THz 吸収電圧値の検討では, SDS-PAGE の工程改良前後の 7 試料において解析したところ, 工程改良後の試料において統計学的に有意な差を見出し, タンパク質量の違いによる弁別が可能であること, また工程改良後の 7 試料において再現性ある THz 吸収電圧値を取得できることを明らかにした (図 8). 以上より, 乾燥工程を経てもタンパク質の拡散が生じない手法にて, THz イメージングに適した試料作製プロセスを構築した.

4-2. 生体物質特有の THz スペクトルを取得できる溶液滴下試料の作製

本研究では, 取り扱いが容易な高分子膜を支持体とした THz スペクトル試料作製手法を構築すると共に, 物質特有の指紋スペクトルの抽出条件を検討した.

□ 溶液滴下試料における問題点の顕在化:

5wt%濃度に調整した L-threonine 溶液を親水性 PVDF 膜にマイクロピペットによって 30 μl 滴下し, THz 分光分析装置によって THz 吸収スペクトルを計測した. その結果, L-threonine の参照スペクトルと比較して, 吸収ピークおよびスペクトル形状が一致しないことを明らかにした. これは, L-threonine 溶液を滴下したことでコーヒーリング現象が発生し, L-threonine の密度が偏ったためと考察した.

□ マテリアルプリンタを用いた L-threonine 試料作製手法の提案:

コーヒーリング現象は, 滴下する液滴が微量なほど抑制される. そこで, 数 n l の正確な液滴吐出が可能マテリアルプリンタを導入し, コーヒーリング現象の抑制について検討した. コーヒーリング現象が発生しない

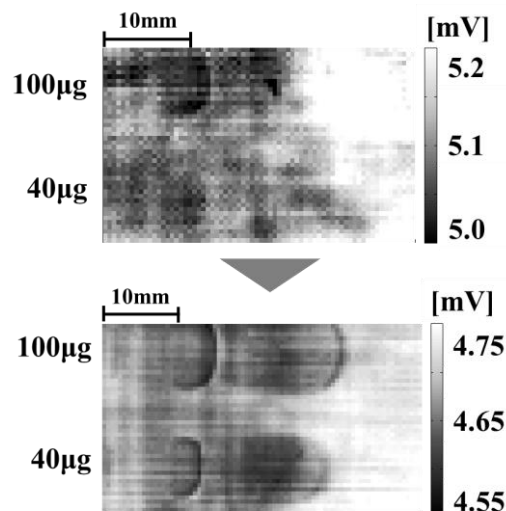
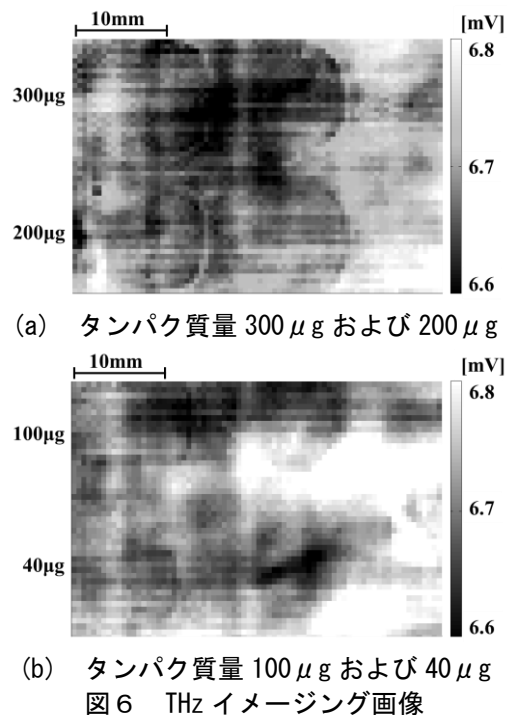


図 7 泳動バッファ除外工程を加えたタンパク質バンドの視認性変化画像

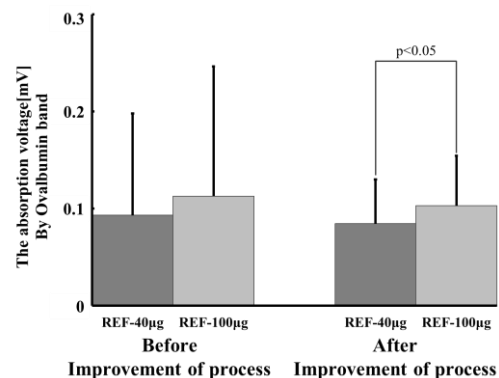


図 8 泳動バッファ除去工程の有無による Ovalbumin バンドの THz 吸収電圧 (n=7)

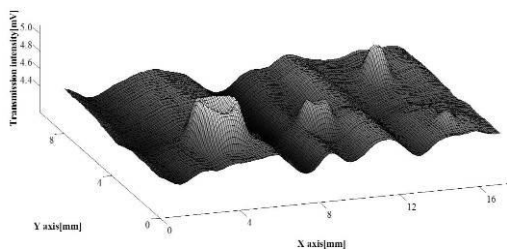


図9 各吐出条件におけるコーヒーリング現象の発生程度を示す3Dプロット図

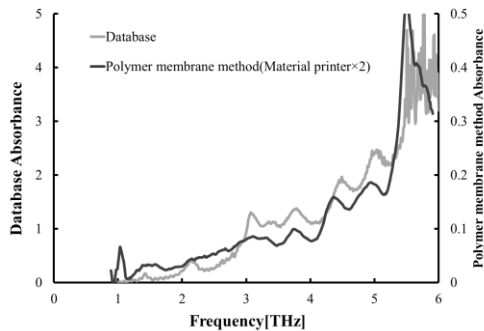


図10 マテリアルプリンタにより作製したL-threonine試料のTHz吸収スペクトル(2回繰り返しパターン形成した試料)

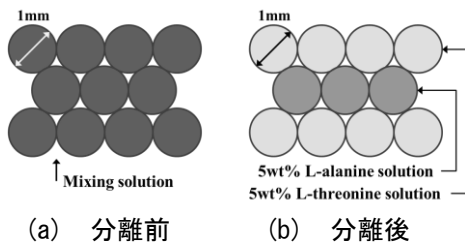


図11 2種類のアミノ酸溶液により形成した滴下パターンのイメージ図

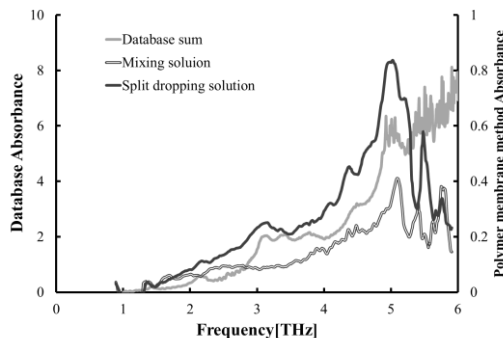


図12 2種類のアミノ酸試料におけるTHz吸収スペクトル(4回繰り返しパターン形成した試料)

溶液吐出発数が、1スポットにつき50発であることを明らかにし、その条件においてL-threonine特有の吸収ピークを含むTHz吸収スペクトルを取得した。以上より、コーヒーリング現象をある程度抑制することによ

り、高分子膜を支持体とした溶液滴下試料において生体物質特有のTHzスペクトルを取得できることを明らかにした(図9)。

□ マテリアルプリンタにて作製したL-alanine試料のTHzスペクトル：

高分子膜を支持体としたTHzスペクトル計測用のための溶液滴下手法が、他のアミノ酸においても有効であるかどうか検討した。L-alanineを用いてTHzスペクトルを計測したが、L-threonine試料で構築した諸条件ではL-alanineの吸収ピークを認識できないことを明らかにした。これは、アミノ酸の側鎖に由来したTHz吸収量の違いによるものであると考察した。そこで、アミノ酸量を変更して実験したところ、L-threonine試料の作製条件と比較して倍量のアミノ酸を使用して試料作製すると、L-alanine特有のTHz吸収スペクトルを取得できることを明らかにした(図10)。

□ 異なる生体物質を用いた試料によるTHzスペクトル：

L-threonineおよびL-alanineの各アミノ酸溶液を用いて、混合溶液滴下試料および溶液分離滴下試料を作製し(図11)、それぞれのTHz吸収スペクトルを計測した。混合溶液では、各アミノ酸の結晶成長が相互作用によって複雑化し、特徴的な吸収ピークを抽出できないことを明らかにした。一方、溶液分離滴下試料では、マテリアルプリンタによって各アミノ酸を隣接滴下したことで、それぞれ独立した結晶成長が実現し、各アミノ酸におけるTHzスペクトルを加算した状態のTHzスペクトルを得られることを明らかにした(図12)。

以上の知見は、アミノ酸混合溶液を電氣的にマイクロな領域で分画するだけで、THz吸収スペクトルを利用して構成要素を特定できる可能性を示唆しており、電気泳動技術における長い処理時間の欠点を解決する新たな迅速診断の実現可能性を示している。今後、導入済みの光造形式3Dプリンタを用いて、マイクロな領域で分画可能な生体試料前処理装置を試作することで高精度なTHz迅速診断に不可欠な前処理技術の構築を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Loi Tonthat, Hajime Saito, Ryuhei Miyamoto, Masafumi Suzuki, Noboru Yoshimura, Kazutaka Mitobe, Rotary Scanning Wireless Temperature Measurement Method for Hyperthermia using Ferromagnetic Implants, IEEJ Trans. Elect. Electron. Eng., 査読有, Vol.10, 2015, pp. s1-s6

- ②三浦友彰, カビール ムハムドゥル, 中島春介, 森茂久, 鈴木雅文, 中山間地の斜面を想定した動電学的手法による汚損土壌からのセシウム除去, 電気学会論文誌 A, 査読有, Vol. 135, No. 11, 2015, pp. 725-726
- ③上野智之, 今野大, 鈴木雅文, 吉村昇, 水戸部一孝, 電気泳動処理後のタンパク質を対象とした THz 波による非染色可視化技術の構築, 平成 26 年度電気学会全国大会講演論文集, 査読無, No. 3, 2014, p. 003
- ④カビール ムハムドゥル, 千葉達也, 鈴木雅文, 吉村昇, フェライトモーション・コントロールによる余剰活性汚泥の減容化, 電気学会論文誌 D, 査読有, Vol. 134, No. 14, 2014, pp. 475-476
- ⑤舟木東紀, カビール ムハムドゥル, 鈴木雅文, 吉村昇, フェライト粒子のモーションコントロールによる微生物の殺菌効果, 電気学会論文誌 A, 査読有, Vol. 134, No. 11, 2014, pp. 604-609
- ⑥カビール ムハムドゥル, 遠藤雅也, 鈴木雅文, 吉村昇, 汚泥返送ラインにおける余剰汚泥処理に関する研究, 電気学会論文誌 D, 査読有, Vol. 134, No. 2, 2014, pp. 239-240
- ⑦今野大, 水戸部一孝, 藤村和由, 鈴木雅文, 吉村昇, 各種無電解めっき電極の耐イオンマイグレーション性能, 電気学会論文誌 A, 査読有, Vol. 133, No. 4, 2013, pp. 153-158
- ⑧小野結太, カビール ムハムドゥル, 鈴木雅文, 吉村昇, ZnO マイクロバリスタを注入した絶縁材料の電気特性の解析, 電気学会論文誌 B, 査読有, Vol. 133, No. 11, 2013, pp. 882-887
- [学会発表] (計 6 件)
- ①加藤宗, カビール ムハムドゥル, 鈴木雅文, 吉村昇, ZnO マイクロファイラーを添加したエポキシ複合体の誘電緩和, 誘電絶縁材料電線・ケーブル合同研究会, 2015 年 11 月 20 日 (秋田大学, 秋田県・秋田市)
- ②上野智之, 水戸部一孝, 鈴木雅文, 吉村昇, 電気泳動処理後の生体物質を対象とした THz イメージング技術の構築, センサ工学研究会, 2014 年 9 月 29 日 (秋田県健康増進交流センター, 秋田県・秋田市)
- ③加藤宗, 楊瀚知, カビール ムハムドゥル, 鈴木雅文, 萩島みゆき, 桑木亮仙, 複合体の誘電特性に関する研究, 第 38 回静電気学会全国大会, 2014 年 9 月 8 日 (広島国際大学, 広島県・呉市)
- ④上野智之, 今野大, 鈴木雅文, 吉村昇, 水戸部一孝, 電気泳動処理後のタンパク質を対象とした THz 波による非染色可視化技術の構築, 平成 26 年度電気学会全国大会, 2014 年 3 月 19 日 (愛媛大学, 愛媛県・松山市)
- ⑤楊瀚知, 小野結太, カビール ムハムドゥル, 鈴木雅文, 吉村昇, 萩島みゆき, 桑木亮仙, エポキシ/ZnO 複合体の誘電特性,

電気学会全国大会, 2014 年 3 月 19 日 (愛媛大学, 愛媛県・松山市)

- ⑥D. Konno, K. Mitobe, T. Ito, H. Takahashi, M. Suzuki and N. Yoshimura, Visualization and Quantification of Protein after Electrophoresis using Terahertz Wave, IEEE EMBS conf., 2013.6.3 (Osaka International Convention Center, Osaka)

[図書] (計 1 件)

- ①KABIR MAHMUDUL, 鈴木雅文, 吉村昇, 電気特性の測定, 評価とデータ解釈～導電性, 絶縁性, 電磁波吸収性, 帯電性～, 技術情報協会, 2015

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)
名称: 作業位置判別システム及び作業位置判別方法
発明者: 小林守, 中野英彦, 水戸部一孝, 吉村昇
権利者: 国立大学法人秋田大学
種類: 特願
番号: 2013-24408
出願年月日: 平成 25 年 2 月 12 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 昇 (YOSHIMURA, Noboru)
秋田大学・その他部局等・その他
研究者番号: 60006674

(2) 研究分担者

カビール ムハムドゥル (KABIR MAHMUDUL)
秋田大学・工学資源学研究科・講師
研究者番号: 10422164

鈴木 雅史 (SUZUKI, Masafumi)
秋田大学・工学資源学研究科・教授
研究者番号: 60226553

水戸部一孝 (MITOBE, Kazutaka)
秋田大学・工学資源学研究科・教授
研究者番号: 60282159