

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410151

研究課題名(和文) 高感度プロテオミクスを指向したナノ構造基板による高機能バイオチップの創製

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

研究代表者

矢野 和義 (YANO, Kazuyoshi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：40262109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：96穴マイクロプレート上に、金属膜として銀薄膜を、光干渉膜としてプラズマ重合膜を順次積層させたナノ構造マイクロプレートを構築した。この上で、疾病の指標成分となるC-reactive proteinやInterleukin-2を標的分子とした蛍光抗体サンドイッチ免疫アッセイを行ったところ、未修飾のマイクロプレートと比べて蛍光強度が増強され、高感度検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Nano-scale layered structure was fabricated on a 96-well microplate modified with silver layer as a metal mirror and with plasma-polymerized film as an optical interference layer. Fluorescence-based sandwich immunoassay targeting C-reactive protein and interleukin-2 was performed using the microplate. It was shown that enhanced fluorescence signal was obtained with the modified microplate compared with the unmodified one, resulting in highly sensitive detection.

研究分野：分析化学、分子生物学

キーワード：プロテオミクス プラズマ重合 分析化学 イムノアッセイ 蛍光 薄膜

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスの重要性は、近年ますます高まっている。特に、ガンなどの疾患に関わる極めて微量なマーカータンパク質やその他の創薬ターゲットを高感度に検出する技術の開発が強く望まれている。

一方、本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検出に成功してきた。例えば、プラズマ下で基板上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 (*Anal. Chem.* (2003) 75, 1116)。また平成 22-24 年度科研費(基盤研究C)においては、基板に金属膜と光透過膜として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により、基板上での抗原抗体反応に由来する蛍光シグナルを著しく増幅することに成功している。一方で、抗体に代わる安定な分子認識素子として注目されている核酸アプタマーの探索とその応用にも精力的に取り組んでいる (*NAR* (2000) 28, 1963)。

### 2. 研究の目的

本研究では、ナノメートルサイズの薄膜積層構造をタンパク質検出のためのさまざまなバイオチップ上に構築し(ナノ構造基板の創出)、薄膜内の光干渉現象を利用して蛍光シグナルを増幅することで、標的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、1)まず高感度免疫アッセイの実現を目標とし、96 穴マイクロプレート上にスパッタリングとプラズマ重合法により、金属膜とプラズマ重合膜のナノ積層構造を構築する。得られるナノ構造マイクロプレート上で蛍光抗体サンドイッチ免疫アッセイを行い(図 1)、未修飾マイクロプレートと比べて検出感度を数十倍増幅させることを目標とする。一方、2)抗体の代わりに DNA アプタマーを用いたアプタマーアッセイもこのナノ積層構造基板上で試み、同様に検出感度の向上を図る。

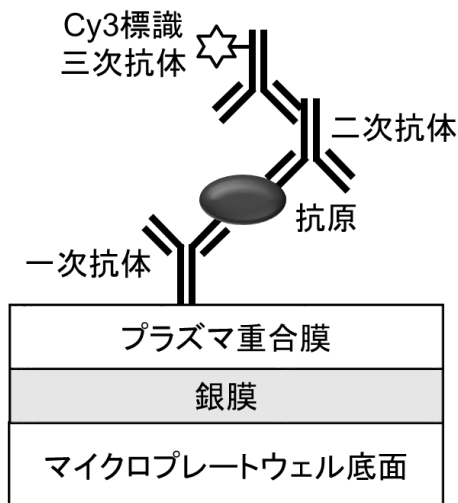


図 1 ナノ構造マイクロプレートを用いた高感度蛍光抗体サンドイッチアッセイの概念図

### 3. 研究の方法

#### (1) ナノ薄膜の製膜

96 穴マイクロプレート上に約 200 nm の銀薄膜をスパッタリング装置によって製膜した。またプラズマ重合膜は、SAMCO 社製のプラズマ重合装置を用いて製膜した。本研究では、hexamethyldisiloxane (HMDS) をモノマーとして使用した。これは、すでにこれまでの研究により、HMDS がナノ構造をもったガラス基板上で光透過膜として蛍光増強に寄与することが確認されているからである。製膜の条件は、20 ccm、0.4 Torr、100 W とし、約 53 nm の膜厚の HMDS プラズマ重合膜を製膜した。

#### (2) ナノ構造マイクロプレートを用いた蛍光抗体サンドイッチアッセイ

まずターゲット分子として、一般的な炎症マーカーである C-reactive protein (CRP) を用いて、サンドイッチ免疫アッセイを行った。ナノ構造をもったマイクロプレートのウェルに、一次抗体として rabbit 由来抗 human CRP 抗体を加え、固相化した。洗浄後、ヒト血清アルブミン (HSA) でブロッキングした。その後、二次抗体として、mouse 由来抗 human CRP モノクローナル抗体を加え、室温で相互作用させた。洗浄後、三次抗体として、Cy3 標識抗 mouse IgG 抗体を加え、さらに相互作用させた。洗浄後、緩衝液を加え、二次元蛍光検出装置を用いて蛍光シグナルを検出した。

また、標的分子をトランスフェリンに変え、同様な手順で蛍光抗体サンドイッチアッセイを行った。一次抗体として mouse 由来抗ヒトトランスフェリン抗体、二次抗体として goat 由来抗ヒトトランスフェリン抗体、三次抗体として Cy3 標識抗 goat IgG 抗体を用いた。トランスフェリンのネガティブコントロールとして、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。

さらに、標的分子を免疫反応に関わるサイトカインの一種インターロイキン-2 (IL-2) に変え、同様な手順で蛍光抗体サンドイッチアッセイを行った。一次抗体として抗ヒト IL-2 抗体、二次抗体としてビオチン標識抗ヒト IL-2 抗体、さらに最終的な検出用プローブとして Cy3 標識streptavidinを用いた。

#### (3) ナノ構造基板と DNA アプタマーを用いた CD4 の検出

ガラス基板上にナノ積層構造を構築したナノ構造基板上で、本研究代表者が *in vitro* selection により獲得した DNA アプタマーを用いた標的タンパク質 CD4 の高感度検出を試みた。CD4、またはコントロールとしてヒト血清アルブミン (BSA) 溶液を 1  $\mu$ l  $\times$  3 スポットずつ基板に滴下し風乾させた。HSA によるブロッキング後、1  $\mu$ M の Cy3 標識抗 CD4 アプタマー溶液と相互作用させた。洗浄、風乾後、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) ナノ薄膜の製膜

平成 22-24 年度科研費(基盤研究C)研究で得られた、96穴マイクロプレート上でのスパッタリングとプラズマ重合における製膜検量線をもとに、目的の膜厚のナノ積層構造を構築した。得られたマイクロプレートの外観を図2に示す。

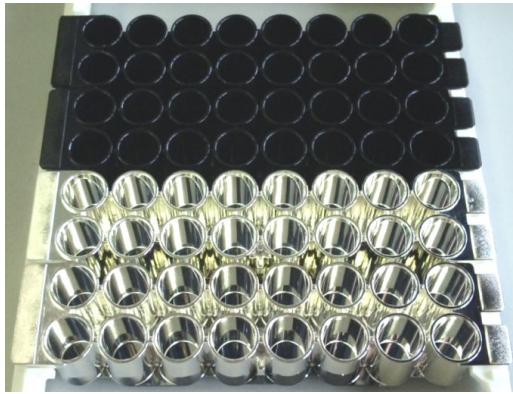


図2 ナノ構造マイクロプレート(下)と未修飾のマイクロプレート(上)

##### (2) ナノ構造マイクロプレートを用いた蛍光抗体サンドイッチアッセイ

まず、CRP を標的分子とした蛍光抗体サンドイッチアッセイを行った。その結果を図3に示す。

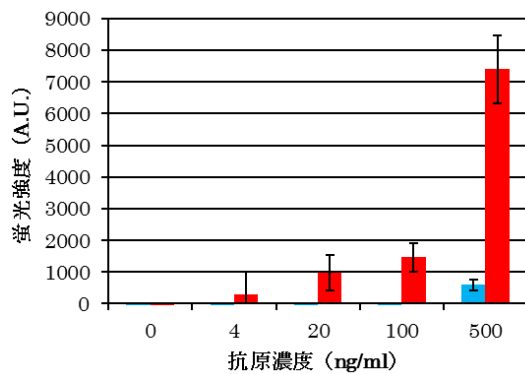


図3 CRP サンドイッチアッセイ (青:未修飾, 赤:ナノ構造)

これより、500 ng/mL のCRP に対して、未修飾のマイクロプレートと比べてナノ構造マイクロプレートを用いたときの方が蛍光シグナルは約 10 倍増幅されていた。また 100 ng/mL 以下になると、未修飾マイクロプレートではシグナルが全く検出されなくなったのに対して、ナノ構造マイクロプレートでは 20 ng/mL でも蛍光シグナルが認められた。以上のことから、ナノ構造をもったマイクロプレートによって標的タンパク質をより高感度に検

出できることが示された。

次に、標的タンパク質としてトランスフェリンを用いて同様のサンドイッチアッセイを試みた。その結果、未修飾のマイクロプレートよりもナノ構造マイクロプレートからの検出シグナルは高かったが、ネガティブコントロールである BSA からの蛍光シグナルも無視できないほど高かった。またトランスフェリンの濃度依存的な蛍光シグナルの変化も見ることができなかった。この理由として、今回選択した二次抗体または三次抗体の特異性が低く、またブロッキング剤として用いた HSA に非特異的に結合していることも考えられた。

さらに、IL-2 をターゲットとしてサンドイッチアッセイを行ったところ、未修飾マイクロプレートにおいては IL-2 濃度が 10 ng/ml のとき既に蛍光シグナルが検出されていないのに対し、ナノ構造マイクロプレートにおいては 1.25 ng/ml の濃度でも検出が可能であった(図4)。このことから、ナノ構造マイクロプレートにおけるサンドイッチアッセイにより、IL-2 を高感度に検出できたと見える。

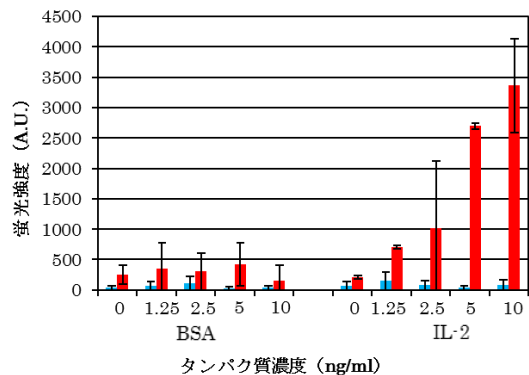


図4 IL-2 サンドイッチアッセイ (青:未修飾, 赤:ナノ構造)

##### (3) ナノ構造基板と DNA アプタマーを用いた CD4 の検出

抗体の代わりに DNA アプタマーを用いて、抗体のときと同様に標的タンパク質の高感度検出が行えるか評価した。ナノ構造を持ったガラス基板上にヘルパーT 細胞の表面抗原である CD4 タンパク質を物理吸着させ、これに Cy3 標識した抗 CD4 DNA アプタマーを相互作用させることで高感度検出を試みたが、シグナルは得られなかった(図5)。これは物理吸着させた CD4 が洗浄操作によって除去されてしまったためと考えられる。今後は、アプタマーサンドイッチアッセイを目的に、まず一次アプタマーの固定化を確実に行うことで、高感度検出が行えると期待される。

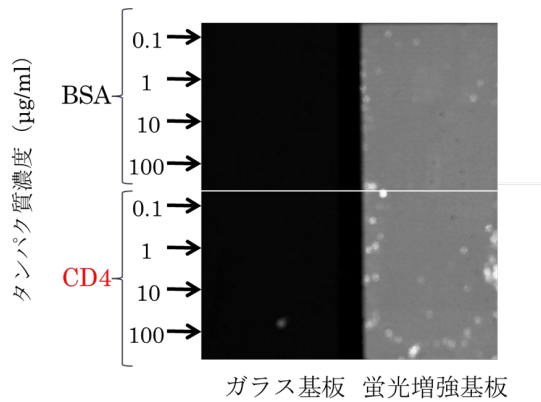


図5 抗CD4アプタマーを用いたCD4検出

## 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)

K. Yano, K. Yamano, A. Iwasaki, T. Akimoto, H. Miyachi<sup>1</sup> and A. Hiratsuka, Fluorescence Enhancement of Immunoassay Using Multilayered Glass Substrates Modified with Plasma-Polymerized Films, *Sensors and Materials*, 査読有, **27** (2015), pp.859-869, DOI:10.18494/SAM.2015.1122

[学会発表] (計4件)

K. Yano, T. Shibata, Y. Sato, H. Kubo, T. Shimizu, A. Shiratani, M. Shimizu and A. Sato, Characterization of the DNA aptamer which binds to CD4 and its application for detection of CD4-expressing cells, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2015), Dec. 15-20, 2015, Honolulu (USA)

矢野和義、柴田俊奈生、西山銀侍、清水智夫、白谷明子、清水雅史、片岡尚希、佐藤淳、CD4に結合するDNAアプタマーの解析とCD4発現細胞の検出への応用、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月3日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 和義(YANO, Kazuyoshi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号:40262109