

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19550098  
 研究課題名 (和文) ナノ構造基板によるプロテオミクスのための高感度タンパク質検出法の開発  
 研究課題名 (英文) Development of a highly sensitive protein detection method using substrates with nano-scale structure.  
 研究代表者  
 矢野 和義 (YANO KAZUYOSHI)  
 東京工科大学・応用生物学部・准教授  
 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誘電体膜を順に製膜することで、蛍光シグナルを増強できるナノ構造基板を作製した。金属膜として Ag 膜を、誘電体膜としてヘキサメチルジシロキサンをモノマーとしたプラズマ重合膜を様々な膜厚で製膜した。そして蛍光標識タンパク質を滴下し、基板からの蛍光強度を測定したところ、プラズマ重合膜の膜厚が約 56 nm のとき、蛍光強度を約 13 倍に増幅できた。これにより、免疫測定の高感度化が可能となった。

研究成果の概要 (英文)：Fluorescence enhancement structure was built up on the glass substrate. First, the Ag film was deposited on the slide glass. The hexamethyldisiloxane plasma-polymerized film (PPF) was subsequently deposited as a dielectric film with various film thickness. The fluorophore-labeled protein was spotted, and the fluorescence intensity from the substrate was measured. As a result, the fluorescence intensity could be enhanced about approximately 13-fold when the thickness of PPF was approximately 56 nm, suggesting the future possibility of highly sensitive immunoassay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

研究開始当初にヒトゲノム解析が終了したことを受け、ゲノムからつくられるすべてのタンパク質を網羅的に解析しようとするプロテオミクスが世界中で精力的に行われるようになった。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。例えば、血清中に存在するタンパク質の含有量は、アルブミンなどのように多いものでは  $5 \times 10^{10}$  pg/ml 程度であるが、少ないも

のではわずか 1 pg/mL と、100 億分の 1 以下である。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、プロテオミクスの分野にとどまらず、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。そこでこのような微量タンパク質を高感度に検出する技術が求められていた。

## 2. 研究の目的

筆者らはこれまでに、DNA アレイやプロテインアレイを作製する際にナノメートルサイズの薄膜構造を形成することによって、効率的な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、緻密な有機薄膜を作製できるプラズマ重合法を用いて、基板上にナノサイズの有機薄膜を製膜した。これにより、タンパク質をその機能を保持したまま固定化することに成功し、新規 DNA・プロテインアレイを開発した。このように筆者は薄膜作製技術を駆使したタンパク質検出技術に関する豊富な知見と経験を有している。

一方、Hall らは、ガラス基板上に数～数十ナノメートルの金属膜と誘電体膜を順次積層させると、非修飾のガラス基板よりも、その上に置いた蛍光物質の蛍光強度が増強される、という現象を見出していた (*J. Opt. Soc. Am. B* (1997) 14, 1149)。

そこで筆者は高機能薄膜作製の知見と経験を生かして、この構造をタンパク質検出のための抗体アレイ上に構築し、タンパク質を従来法よりも数十倍高感度に検出することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 金属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。Ag 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) プラズマ重合膜の作製

プラズマ重合装置 (Model BP-1, SAMCO) を用いて製膜を行った。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。そして製膜時間と膜厚との関係について測定を行った。その結果を図 2 に示す。なお、膜厚の測定には、レーザーエリブソメーター (ESM-1AT, ULVAC) を用いた。



図 1 プラズマ重合装置

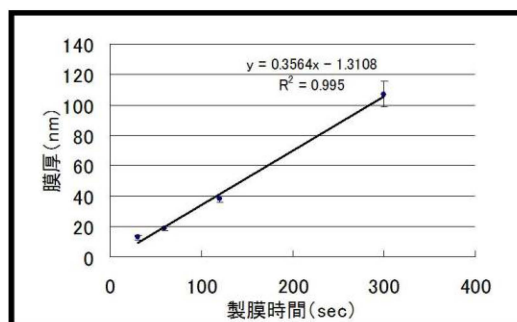


図 2 プラズマ重合時間に対する膜厚の検量線

### (3) 蛍光増強基板の作製

ガラス基板上に Ag 膜を製膜する足場となる Cr 膜を 15 sec 製膜し、その上に Ag 膜を約 200 nm 製膜した。その後に HMDS 膜を製膜し、蛍光増強基板を作製した。HMDS 膜厚は 0-100 nm の範囲で 10 nm ごとの厚さに製膜した。また、対照基板として、洗浄したガラス基板上へ同様の条件の HMDS 膜を製膜した基板を用いた。

### (4) 蛍光増強基板による抗原抗体反応

対象とする基板は、蛍光増強基板 (HMDS 膜: 約 71 nm, Ag 膜: 約 196 nm)、Ag 膜のみ製膜した基板 (Ag 膜: 約 196 nm)、HMDS 膜のみ製膜した基板 (HMDS 膜: 約 71 nm)、ガラス基板の 4 種類とし、以下の手順で抗原抗体反応を行った。

- ① mouse IgG と rabbit IgG の 1  $\mu$ g/ml 溶液を PBS 溶液で 10 倍希釈していき、各溶液を 300  $\mu$ l 以上用意する。
- ② 各 IgG 溶液を 2  $\mu$ l ずつ、1 種類の希釈溶液につき 3 サンプルずつ基板上に滴下する。
- ③ 風乾させ、吸着させる

- ④ HBSPM-Tween20-human serum albumin 溶液を1ml 滴下し、カバーして室温で15 min インキュベートする。
- ⑤ PBS 溶液をタッパーに25 ml 入れた中に基板を置き、2 min×2 回洗浄する。
- ⑥ 10 µg/ml Cy3 標識抗マウス IgG 抗体 400 µl を滴下し、カバーして室温で15 min インキュベートする。
- ⑦ ⑤と同様に洗浄する。
- ⑧ 風乾させ、蛍光シグナルを測定する。

(5) アレイヤーを使用した、蛍光増強基板による抗原抗体反応

より再現性のあるデータを得るため、アレイヤーを用いて抗原を滴下し、抗体と反応させて測定を行った。基板上には10 µg/ml Cy3 標識抗マウス IgG 抗体を100 nl ずつスポットした。その他の実験内容は(4)の実験と同様とした。

(6) 4種類の抗原を用いた抗原抗体反応

使用する抗原を4種類にして抗原抗体反応を行った。mouse IgG と rabbit IgG、さらに、mouse anti-human C-reactive protein monoclonal antibody (mouse CRP-MCA) と rabbit anti-human C-reactive protein monoclonal antibody (rabbit CRP-MCA) の各抗原をPBSにより、10 µg/ml、1 µg/ml の濃度に希釈し、基板上にマイクロピペットを用いて1 µl ずつスポットした。今回の実験における対象基板は蛍光増強基板とガラス基板の2種類とした。蛍光増強基板は約197 nm の Ag 膜と約62 nm の HMDS 膜を順次積層させたものを使用した。抗原抗体反応は(4)の実験と同様に行った。

#### 4. 研究成果

(1) HMDS 膜基板と蛍光増強基板における蛍光シグナルの測定

蛍光増強に最適な HMDS 膜の膜厚の検証を行った。そのために HMDS 膜を製膜した基板と蛍光増強構造を構築したガラス基板上へサンプルを滴下・風乾した。滴下はアレイヤーを用いて行った。この時の Ag 膜の膜厚は約201 nm であり、HMDS 膜の膜厚は0~92 nm であった。各蛍光シグナルを測定した結果を図3に示す。

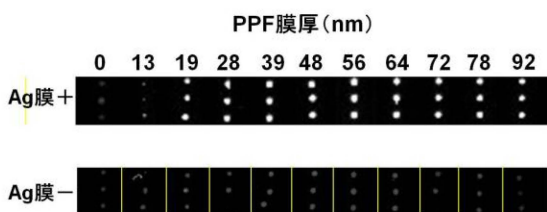


図3 Ag 膜の有無と蛍光強度の関係

Ag 膜-の場合ほどの PPF 膜厚でも蛍光強度が低く一定であるのに対し、Ag 膜+では PPF 膜厚が19 nm 以上のときに蛍光強度が増幅されているのがわかった。Ag 膜+での HMDS 膜の膜厚と蛍光強度との関係を図4に示す。

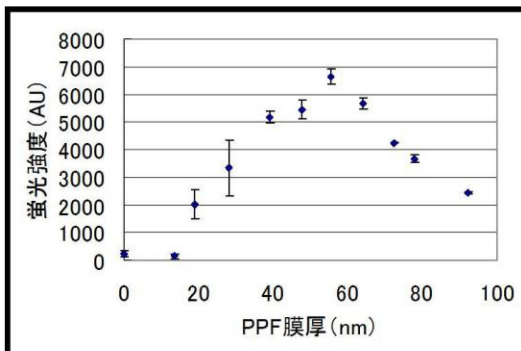


図4 HMDS 膜の膜厚と蛍光強度の関係

蛍光強度は HMDS 膜の膜厚が約56 nm のときにピークとなり、山なりに近い蛍光強度を得ることができた。この結果から、蛍光増強に最適な膜厚は約56 nm ということが示唆された。また、その時の蛍光増強度は約13倍となった。

(2) 4種類の抗原を用いた抗原抗体反応における蛍光強度の測定

蛍光増強基板を利用して4種類の抗原を用いた抗体抗原反応の結果を図5に示す。

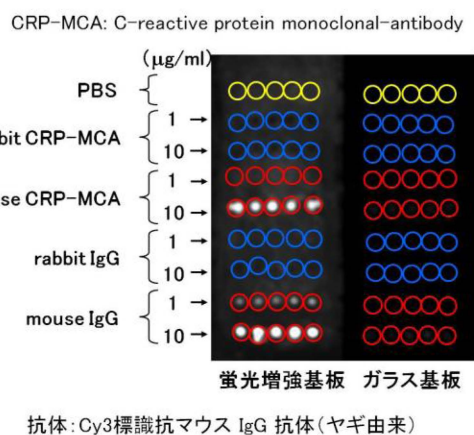


図5 4種類の抗原を用いた抗原抗体反応

この結果より、mouse IgG と mouse CRP-MCA の2種類のサンプルに蛍光シグナルが確認できた。rabbit IgG と Rabbit CRP-MCA のサンプルでは蛍光は確認できなかった。これにより蛍光増強基板上で特異的な抗原抗体反応を行っても高感度に検出できることが明らかになった。

次に蛍光強度を測定したグラフを図6に示

す。

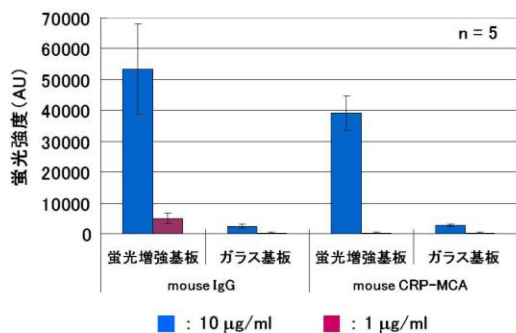


図6 各種基板の蛍光強度の比較

mouse IgGのサンプル濃度が10 µg/mlの時、蛍光増強基板では蛍光強度が約53000となり、蛍光増強度が約21倍となった。またmouse CRP-MCAのサンプル濃度が10 µg/mlの時、蛍光増強基板では蛍光増強が約3900となり、蛍光強度が約14倍となった。

以上の結果から、金属膜とプラズマ重合膜からなるナノ構造基板を用いることにより、免疫測定の高感度化が可能となった。

## 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2件)

- ① M.-X. Chu, H. Kudo, T. Shirai, K. Miyajima, H. Saito, N. Morimoto, K. Yano, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, K. Mitsubayashi, A soft and flexible biosensor using a phospholipid polymer for continuous glucose monitoring, *Biomedical Microdevices*, 査読有, 2009, 11(4), 837-842
- ② A. Hiratsuka, H. Kinoshita, Y. Maruo, K. Takahashi, S. Akutsu, C. Hayashida, K. Sakairi, K. Usui, K. Shiseki, H. Inamochi, Y. Nakada, K. Yodoya, I. Namatame, Y. Unuma, M. Nakamura, K. Ueyama, Y. Ishii, K. Yano and K. Yokoyama, Fully Automated Two-Dimensional Electrophoresis System for High-Throughput Protein Analysis, *Analytical Chemistry*, 査読有, 2007, 79, 5730-5739

[学会発表] (計2件)

- ① 矢野和義、渡辺直、君塚亮太、山野一行、安田充、池下雄介、宮地寛登、秋元卓央、プラズマ重合法を用いた抗体アレイの高感度化、日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、近畿大学
- ② 渡辺直、君塚亮太、山野一行、安田充、

池下雄介、宮地寛登、秋元卓央、矢野和義、プラズマ重合法を用いた抗体アレイの高機能化、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、パシフィコ横浜

[産業財産権]

①取得状況 (計1件)

名称：不一致増幅物質を含むプローブ核酸を用いる標的配列の検出方法、プローブ核酸および標的配列検出用アッセイキット

発明者：木下英樹、矢野和義、軽部征夫

権利者：学校法人片柳学園、凸版印刷株式会社

種類：特許

番号：第4283578号

取得年月日：2009年3月27日

国内外の別：国内

## 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・准教授

研究者番号：40262109

(2)研究分担者

(3)連携研究者

秋元 卓夫 (AKIMOTO TAKUO)

東京工科大学・応用生物学部・講師

研究者番号：90367194