

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24年6月1日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651047

研究課題名（和文） 金の異常反射法を利用するラベルフリー型バイオチップの創製

研究課題名（英文） Construction of label-free biochips using anomalous reflection of gold

研究代表者

三原 久和 (MIHARA HISAKAZU)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：30183966

研究成果の概要（和文）：プロテインチップなどのバイオチップ創製のために、蛍光基などラベルを用いない（ラベルフリー）検出法が強く望まれている。本研究においては、金の異常反射（Anomalous Reflection, AR）を利用したペプチド・タンパク質相互作用の検出を通じて、種々のペプチドチップやプロテインチップなどへ適用可能となる簡便ハイスループットなラベルフリー検出法の開発のための挑戦的萌芽研究を行った。

研究成果の概要（英文）：A efficient label-free detection method is desired to improve the technology of biochips including protein microarray. In this study, the novel label-free detection method using anomalous reflection of gold (AR) was developed. The AR method is highly sensitive and easy to miniaturize so as to apply it to biochips detecting various peptide and protein interactions in a high-throughput manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：バイオチップ、金基板、反射法、非標識、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムを初め様々な生物のゲノム配列の解読が完了し、我々は膨大な遺伝子情報を入手可能になり、それらを有効に活用するポストゲノム時代に突入した。そのような時代の先駆的技術として、外部刺激に対する生体応答を遺伝子発現量パターンとして解析するDNAチップが開発された。生命維持活動

を直接担っているのは遺伝子産物であるタンパク質であり、DNAチップ技術と合わせてタンパク質ネットワークを直接検出するプロテインチップ技術開発が精力的に進行している。これらの次世代バイオチップの開発のためには、ターゲットを捕捉する生体分子群（捕捉剤）の開発とともに、ターゲットを高度ハイスループットに検出する革新的方

法の開発が不可欠である。既存の DNA チップやプロテインチップにおいては、その汎用性から蛍光基でラベルした検出方法が多用されている。しかし、蛍光法は、対象のタンパク質などに嵩高い蛍光基を導入するため、その定量的導入法の困難さや相互作用に蛍光基が障害になるなど問題点も多い。そこで、蛍光基などラベルを用いない高効率なラベルフリーシグナル検出法の開発が強く望まれており、国際的な競争になっている。シグナル検出法には表面プラズモン共鳴 (SPR) 法や水晶発振子 (QCM) 法が多く用いられている。しかしながら、いずれも装置が高価であることやチャンネル数が少なく分子間相互作用の高度ハイスループットな検出法に難を残す。

2. 研究の目的

プロテインチップなどのバイオチップ創製のために、ターゲットを捕捉する生体分子群の開発とともに、高度ハイスループットな検出法の開発が不可欠である。既存の DNA チップやプロテインチップにおいては、その汎用性から蛍光基でラベルした検出方法が多用されている。しかし、蛍光法は、対象のタンパク質などに嵩高い蛍光基を導入するため、その定量的導入法の困難さや相互作用に蛍光基が障害になるなど問題点も多い。そこで、蛍光基などラベルを用いない (ラベルフリー) 検出法が強く望まれている。本研究においては、金の異常反射 (Anomalous Reflection, AR) を利用したペプチド・タンパク質相互作用の検出を通じて、申請者らの開発している種々のペプチドチップやプロテインチップなどへ適用可能となる簡便ハイスループットなラベルフリー検出法の開発のための挑戦的萌芽研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

蛍光検出より簡便なアレイシステムの構築には完全非標識 (ラベルフリー) の検出技術開発は欠かせない。そこで本研究では、金の異常反射 (AR) 特性を利用するファイバー型相互作用測定法の開発に着手した (図 1)。一般に、金属は全ての波長域の光に対する反射率が非常に高いことが特徴であるが、金の場合には青-紫色光を吸収するといった特異な性質 (AR) を示す。AR による分子間相互作用検出法は、金表面に分子膜が生成すると金表面-分子膜間の多重反射によって金表面における反射光強度が減少する現象を利用したものであり、QCM 法および SPR 法などの他の非標識検出法と比較して装置が簡単で低コスト化、小型化が容易な点が特長である。

初期の研究成果として、溶液中でのタンパク質- α ヘリックスペプチド間相互作用の

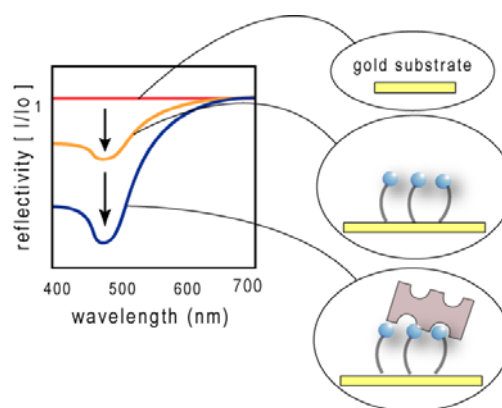


図 1. 金の異常反射 AR を利用した検出システム；膜厚に応じた AR シグナル変化

ラベルフリー検出に成功している。まず、ガラス基板上に金薄膜を蒸着し、自己組織化単分子膜を作製後、単分子膜末端のマレイミド基とペプチド中に位置特異的に導入したシステイン側鎖チオールとの結合により、ペプチドを金薄膜上に固定化した。標的タンパク質を固定化ペプチドと相互作用させると、反射率は急激に減少し平衡に達する。さらに、タンパク質濃度を変化させて反射率の変化をプロットすることにより、吸着定数などの物理化学的パラメータを算出することもできる。以上のように AR 法はラベルフリーにもかかわらず、タンパク質-ペプチド間のような比較的親和性が低い相互作用の検出・解析に適用でき、簡便かつ高感度な検出法の確立が期待できる。

本研究では、以下の方法によりドライ系での AR 法の高感度化を図り、ラベルフリー型バイオチップ創製の萌芽研究を行った。

(1) デンドリマーなどの有機高分子化学を駆使した表面化学的手法による 3 次元表面作成と高感度化：3 次元表面を作成するテクノロジーとして、多枝状高分子であるデンドリマーを利用する表面化学を展開し、AR 法の高感度化を図る。

(2) 金基板の屈折率変化によるバイオチップ検出法の高感度化：金表面のみでは、約 2% 程度の屈折率変化しか達成できない。この感度でも十分にバイオチップ検出法として実用できるが、より高度ハイスループット検出法として萌芽させるべく、金・インシュレーター・金属 (MIM) システム基板において種々コンポジションを変更しつつ、基板の屈折率最適化を行い、AR シグナル 10% 以上の変化を有する最適基板の開発を目指す。

(3) ペプチド・タンパク質相互作用を高感度に検出するマイクロアレイ型バイオチップシステムへの展開：タンパク質を AR 基板上に配置したマイクロアレイ化検出を達成し、種々のペプチド・タンパク質相互作用の高効率検出やタンパク質の機能などをハイスル

ーブット検出するシステムへと展開する。

4. 研究成果

(1) デンドリマーなどの有機高分子化学を駆使した表面化学的手法による3次元表面作成と高感度化

AR による生体分子間相互作用検出法の基礎の基礎に基づいて、本検出法の感度向上を目指して、新規金薄膜修飾法の検討を行った。基板と捕捉分子間にリンカーとしてポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマーを用いた表面化学的手法に取り組んだ (図2)。ガラス基板上に金薄膜を蒸着し、自己組織化単分子膜を作製後、単分子膜末端のスクシンイミド活性エステルと PAMAM デンドリマー中のアミノ基との結合により、PAMAM デンドリマーを金薄膜上に固定化した。得られた金薄膜表面の PAMAM デンドリマーの溶媒に接したアミノ基とビオチンを結合して、ビオチン修飾金薄膜を作製した。用いる PAMAM デンドリマーの分岐が G2、G3、G4 と増えて分子量が大きくなるにつれて金表面の三次元的な粗さが大きくなり、さらに金表面の単位面積当たりのアビジン結合量も世代に依存して増大することが分かった。この三次元表面の利用により、高効率にアビジン-ビオチン間の相互作用を解析できるようになった。

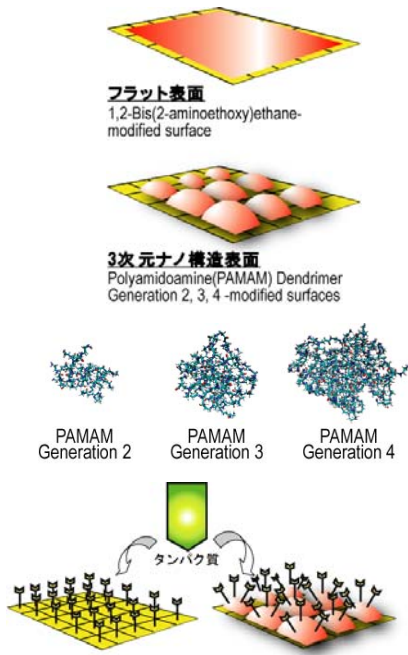


図2. ポリアミドアミン PAMAM デンドリマー第2世代G2~第4世代G4を用いる表面化学改良によるAR感度の向上

(2) 金基板の屈折率変化によるバイオチップ検出法の高感度化

次いで、金薄膜にインシュレーターを挟み込むMIMを利用したナノテクノロジー手法に

よる感度向上を行った (図3)。MIM構造はエレクトロニクスやオプトエレクトロニクス分野において様々な用途に用いられてきた。今回、インシュレーターにポリメチルメタクリレート (PMMA) を用いて、基板表面から Au-PMMA-Au (Au-MIM) の順番に膜を積層し、得られた MIM 表面に自己組織化単分子膜を作製後、単分子膜末端のアミノ基にビオチンを導入した。このビオチン化 MIM 基板を用いてアビジンとの結合特性を評価した。結果 Au-MIM では Au のみの基板と比べて約5倍の感度向上を達成することができた。

さらに、Au-PMMA-Ag (Ag-MIM) を同様に作成した (図3)。Ag-MIM では水溶液中でもより安定した基板を作成できた。さらに計算結果でも示された通り実測値においてもアビジン結合試験において、14.4%の反射率低下を示し、非常に高感度化が達成されたことが分かった。

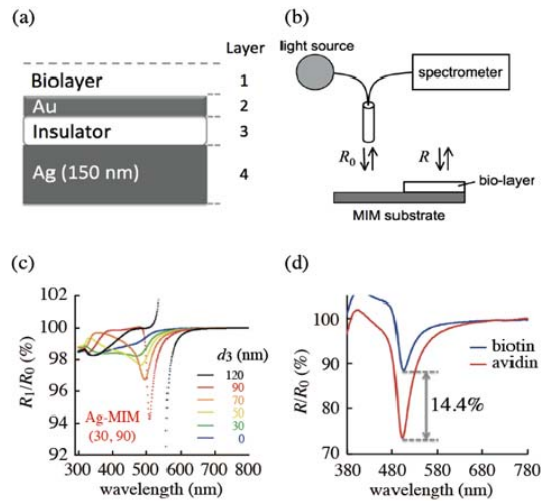


図3. Ag-MIM基板の構築とビオチン固定化基板によるアビジンの高感度検出 (計算と実測)

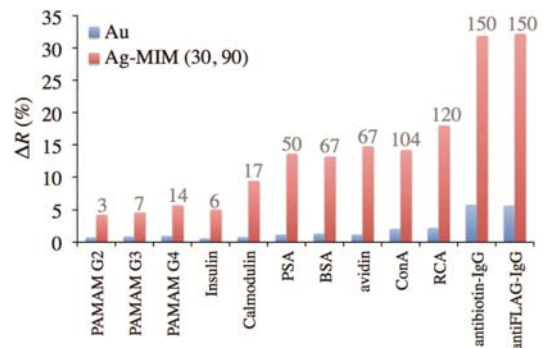


図4. Ag-MIM基板上での種々の分子量のタンパク質吸着の高感度検出

Ag-MIM 基板を用いて、種々の分子量のタンパク質の固定化を行ったところ、図4に示すように、Auのみの基板と比べて、タンパク質吸着の感度向上が観測され、最大12倍の高感度化が実現した。

また、この高感度化により、今までのAuのみの基板では不可能であった、ビオチンやビオチン誘導体などの分子量200程度の小分子の検出も可能となった(図5)。

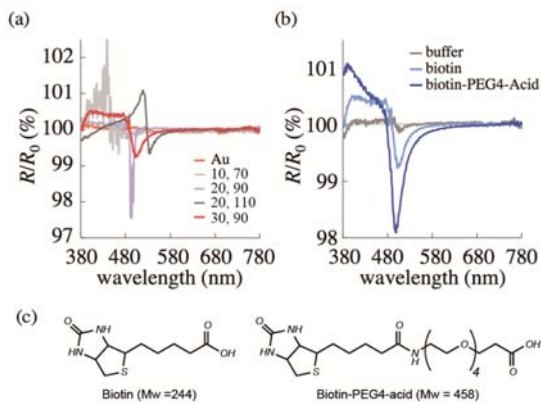


図5. Ag-MIM 基板上でのビオチン (Mw244) やその誘導体 (Mw458) の検出

(3) ペプチド・タンパク質相互作用を高感度に検出するマイクロアレイ型バイオチップシステムへの展開

本 Ag-MIM 基板の開発により、基板上に結合させた2種の異なるレクチンタンパク質に対して、マンノース (Man) とガラクトース (Gal) の異なる単糖をもつペプチドリガンドの結合解析にも成功した(図6)。

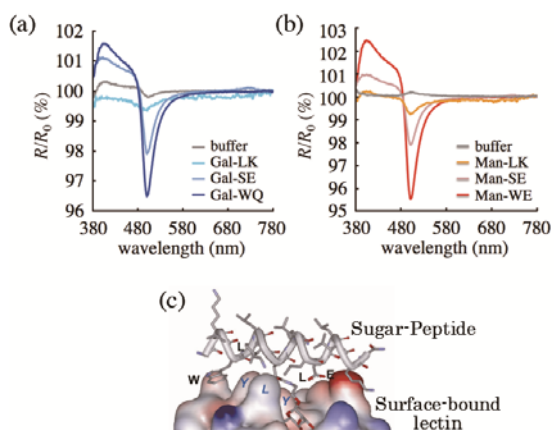


図6. Ag-MIM 基板に固定化したレクチンへの糖ペプチドの結合と特異性

このような単糖ペプチド-レクチン相互作用について糖の種類やアミノ酸配列によ

る選択性の多様性を Ag-MIM 上にアレイ形式で4種類のレクチンを固定化して、4種のペプチドの結合を調べた。結果、図7に示すように、種々の特異的結合特性の評価を行うことが可能であった。

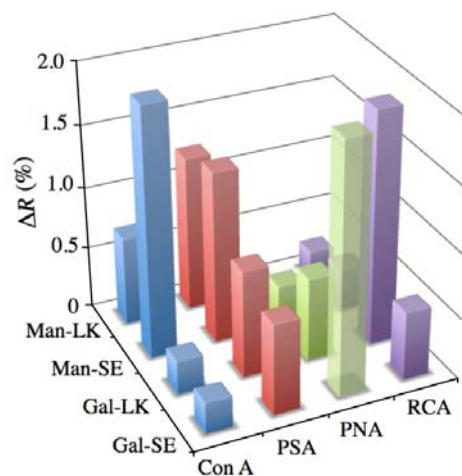


図7. Ag-MIM 基板上に固定化したレクチンと単糖ペプチドとの結合多様性のアレイ状解析

以上のように、新規の高感度ノンラベル検出技術である AR(MIM)法を開発した。本システムは、低コスト化、小型化、多チャンネル化が容易な点が大きな利点である。今後、マイクロアレイにおける代表的なノンラベル検出技術として発展することが期待される。

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3件)

①白井健二、富崎欣也、三原久和
“オミクス”研究に向けた設計ペプチドアレイの構築、分析化学、印刷中

②A. Syahir, K. Kajikawa, H. Mihara
Sensitive Detection of Small Molecule-Protein Interactions on a Metal-Insulator-Metal Label-Free Biosensing Platform
Chem. Asia. J., in press (2012)

③A. Syahir, H. Mihara, K. Kajikawa
A New Optical Label-Free Biosensing Platform Based on a Metal-Insulator-Metal Structure
Langmuir, **26**, 6053-6057 (2010)

〔学会発表〕(計3件)

①田島健一、アミルシャヒル、梶川浩太郎、三原久和、金の異常反射法による金基板上でのプロテアーゼ反応の検出、第48回ペプチド討論会；2011.9.27-39、札幌

②田島健一、Amir Syahir、梶川浩太郎、三原久和、金の異常反射を利用したプロテアーゼ反応の検出、第91日本化学会春季年会；2011.3.26-29、横浜

③Hisakazu Mihara, Designed peptide libraries for protein and cell analyses, 5th International Peptide Symposium/47th Japanese Peptide Symposium; 2010.12.4-9, Kyoto

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mihara.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原 久和 (MIHARA HISAKAZU)

研究者番号：30183966

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし