

## TOF-SIMS を用いたバイオセンサ基板上のタンパク質分布評価

加藤 信彦<sup>\*1</sup>, 星 奨<sup>\*2</sup>, 青柳 里果<sup>\*3</sup>, 工藤 正博<sup>\*4</sup>

### Evaluation of Protein Distributions on Biosensor Surfaces by Using TOF-SIMS

Nobuhiko KATO<sup>\*1</sup>, Sho HOSHI<sup>\*2</sup>, Satoka AOYAGI<sup>\*3</sup>, and Masahiro KUDO<sup>\*4</sup>

**ABSTRACT** : Monitoring of proteins on biosensor surfaces is required for developing high performance biosensors. In this study, distributions of proteins, protein A, immunoglobulin G (IgG) and bovine serum albumin (BSA), immobilized on glass plates were monitored by means of a new protein monitoring technique using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) that provides specific chemical imaging. The TOF-SIMS spectra of the protein immobilized on glass plates were analyzed by means of mutual information to select the appropriate fragment ions related to each protein for chemical imaging of proteins. Finally the distributions of protein A, IgG and BSA are obtained respectively with this method.

**Keywords** : TOF-SIMS, Information entropy, protein A, immunoglobulin G (IgG), bovine serum albumin (BSA), chemical imaging, biosensor

(Received September 28, 2006)

### 1. はじめに

バイオセンサ基板上の固定化タンパク質の状態および試料溶液との反応性を評価するためには、基板上の各タンパク質の分布測定が必要である。飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)は、材料表面上のタンパク質を検出する有望な測定法の1つである。しかし、二次イオン質量分析法(SIMS)では、一般に、巨大分子はフラグメントイオンとして検出され、タンパク質は互いにフラグメントイオンが類似するため、単純なスペクトル比較による複数のタンパク質の識別は困難である。そこで、これまで主成分分析<sup>1), 2)</sup>や情報エントロピー<sup>3)</sup>などを用いたスペクトル解析が行われている。主成分分析は特に定性分析で有効であり、数種類のタンパク質を TOF-SIMS フラグメントイオン強度から識別できる。イメージングのための特定二次イオンの選出には情報エントロピーが特に有効であり、この手法ではタンパク質試料と参照試

料とのスペクトル強度を比較した前後での情報エントロピーの差である相互情報量を基に、特定タンパク質に起因する二次イオンピークを選出する。

本研究では、基板上に固定化した免疫グロブリンプロテイン A(PA), 免疫グロブリン G(IgG), およびウシ血清アルブミン(BSA)の3種類のタンパク質の TOF-SIMS による識別を試みた。それぞれのタンパク質をガラス基板に共有結合で固定化し、それらを TOF-SIMS で測定した。それぞれのタンパク質を区別するために、各 TOF-SIMS スペクトルの相互情報量を求め、それぞれのタンパク質に特異的なフラグメントイオンを選出した。また、主成分分析による結果と比較した。

### 2. 実験

#### 2.1 タンパク質固定化ガラス作成

スライドガラスを8×8 mmに切り出し、アミノプロピルトリメトキシシラン2mlを含むトルエン30ml中で5時間還流し、表面をアミノシラン化した。そして、1%グルタルアルデヒドでアミノシラン化したガラス表面を架橋し、pH7.4リン酸緩衝溶液中に30時間、4℃でFITC標識プロテインA, IgGおよび、BSAをそれぞれ固定化した。

<sup>\*1</sup>: 物質生命理工学科助手(Research Associate, Dept. of Material and Life Science),

<sup>\*2</sup>: 物理情報工学専攻博士前期課程平成17年度卒業生,

<sup>\*3</sup>: 島根大生物資源科学部助教授 (2005年2月まで成蹊大工学部助手),

<sup>\*4</sup>: 物質生命理工学科教授(Professor, Dept. of Material and Life Science)

Table 1 Fragment ions related to amino acids of protein.

Amino acids	Chemical formula	m/z	Amino acids	Chemical formula	m/z
Gly	CH <sub>4</sub> N	30	Asn	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O	87
Arg	CH <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	43	Asn, Asp	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub>	88
Ala	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N	44	Asn	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	98
Cys	CHS	45	Arg	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	100
Asn, Pro	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N	70	Arg	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub>	101
	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> NO		Glu	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub>	102
Arg	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub>	73	His	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub>	110
His	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	81	Arg	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	112
His	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	82	Arg	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub>	127
Gln, Glu	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO	84			

これらのタンパク質固定化ガラスは TOF-SIMS 測定直前に純水で洗浄し、薬包紙で水分を吸収して、乾燥させた。

## 2. 2 TOF-SIMS 測定

測定装置は TFS-2100(Physical Electronics, Eden Prairie, MN)を用い、一次イオンは 15keV の Ga イオン、レーザーサイズは 120 μm 角で、イオンドーズ量はスタティック限界である 10<sup>12</sup>ion/cm<sup>2</sup>以下とし、各タンパク質固定化ガラス試料を測定した。また、試料には金属メッシュを被せ、中和電子銃を照射した。

## 2. 3 TOF-SIMS スペクトル測定

### 2. 3. 1 相互情報量

各 TOF-SIMS スペクトルにおける二次イオンのピーク m/z=40 ~ 200 を各スペクトルの Total Ion Count で規格化したピーク強度を用いて、相互情報量<sup>4),5)</sup>を計算した。相互情報量は、ある二次イオンピークの強度を対象にして、サンプルの種類(事象 A)に関する事前エントロピー(式 1)を求め、そのピーク強度の、ある閾値 V との比較(事象 B)に関する事後エントロピー(式 2)を引くことによって得られる(式 3)。ただし p(ai), p(aj,bi)はそれぞれ確率 n(ai)/N, n(aj,bi)/N を表す。

事前エントロピー：

$$S(A) = -\sum p(ai) \log_2 p(ai) \quad (1)$$

事後エントロピー：

$$S(A | B) = -\sum p(aj) \sum p(aj,bi) \log_2 p(aj,bi) \quad (2)$$

相互情報量：

$$I(A; B) = S(A) - S(A | B) \quad (3)$$

ここで、N は TOF-SIMS スペクトルの個数、n(a1), n(a2) は試料 1 および試料 2 の個数、n(a1,b1), n(a2,b1)は試料 1 および試料 2 で閾値 V よりもピーク強度が高いスペクトルの個数、n(a1,b2), n(a2,b2)は試料 1 および試料 2 で閾値 V よりもピーク強度が低いスペクトルの個数とする。相互情報量は PA, IgG, BSA およびアミノシラン化ガラスの各スペクトルの比較によって求めた。

### 2. 3. 2 主成分分析(PCA)

タンパク質を構成するアミノ酸由来のフラグメントイオン<sup>6)</sup>として知られる Table 1 の二次イオンピークを用いて各試料スペクトルの主成分分析を多変量解析 for Excel(エスミ, 東京)によって実行した。

## 3. 結果および考察

IgG は分子量 155000 程度であり、PA(42000 程度)、BSA(69000 程度)と比べて非常に大きいですが、どちらもタンパク質であるために、共通するフラグメントイオンが多く、単純なスペクトル比較では識別が困難である。

そこで、TOF-SIMS によるフラグメントイオンから PA, IgG, BSA を確認するために、タンパク質由来として報告されているフラグメントイオンを用いて、主成分分析した。その結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 より、Table 1 のフラグメントイオンを用いてガラス基板上の 3 種類のタンパク質(PA, IgG, BSA)が識別できることが示された。したがって、今回対象とした質量数 200 以下のフラグメント

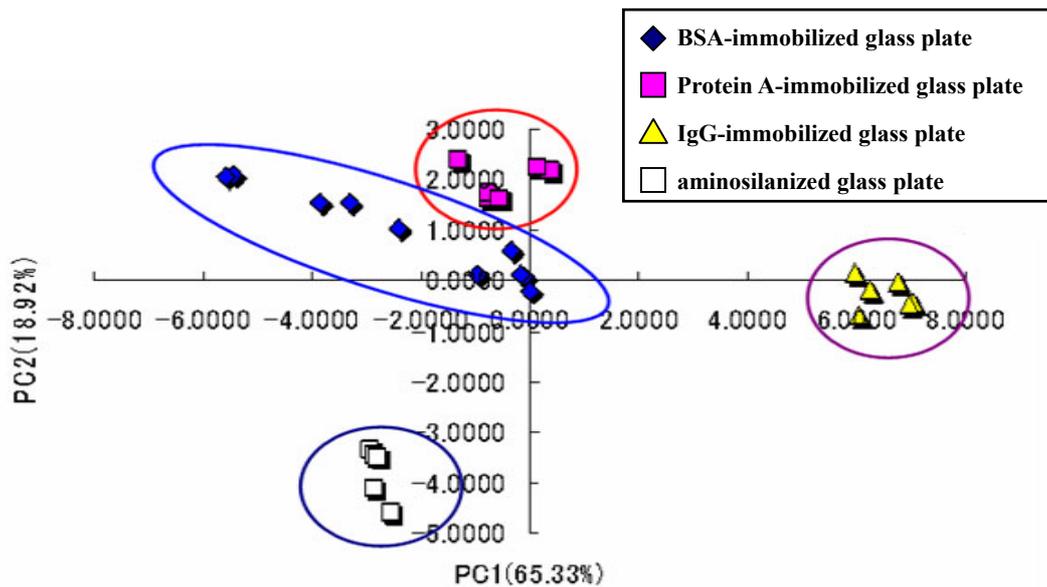


Fig. 1 Score plot from PC1 and PC3 of Positive ion spectra.

Table 2 Mutual information of BSA, Protein A, and IgG on glass plates.

Sample	Mutual information (-)	Secondary ion peak (m/z)
BSA	1.00	88
Protein A	1.00	40, 44, 56, 120, 124
IgG	1.00	70, 72, 81, 86, 91, 95, 100, 103, 105, 107, 110, 115, 128, 129, 130, 131, 142, 143, 165

イオンによるタンパク質イメージングが、ガリウムイオン銃による通常の TOF-SIMS 測定でも可能であることが、主成分分析によって客観的にも確認された。

ただし、定性だけでなく、定量、分布測定を行うには、主成分分析結果の各主成分の負荷量と、試料と主成分得点の関係から、各ピークを特徴付ける必要がある。また、各タンパク質に帰属するフラグメントイオンの決定は、主成分分析だけでは困難であり、判別分析などの他の解析方法と併せて検討する必要がある。そこで、各タンパク質試料における各ピークの相互情報量を計算し、比較することによって、各タンパク質に起因するピークを選出した。その際、PA が固定化されたガラス基板では、ガラス基板由来の二次イオンが高強度で検出されたため、IgG, BSA 固定化ガラス基板との差を抑えるために、全イオン強度ではなく、タンパク質に由来するピーク強度の合計で規格化した。その結果、各タンパク質に由来するフラグメントイオンピークとして、高い相互情報量をもつものを Table 2 に示す。

この中で、強度が参照試料に比べて十分高いピークとして、BSA に由来する二次イオン、 $m/z=88$ 、IgG に由来する二次イオン、 $m/z=70, 72, 130$ 、PA に由来する二次イオン、 $m/z=44, 124$  を選出した。これらの二次イオンを用いて、各タンパク質のガラス基板上の分布を TOF-SIMS 二次イオン像として得た。Fig. 2 に、PA 固定化ガラス、IgG 固定化ガラスおよび BSA 固定化ガラスそれぞれにおける、各タンパク質に由来する二次イオン像を示す。Fig. 2 より、タンパク質が固定化されたいないアミノシラン化ガラスでは、いずれのタンパク質起因の二次イオン像も暗く、ほとんど存在しないことが確認された。また、各タンパク質固定化ガラスでは、それぞれ固定化されていない他のタンパク質に起因する二次イオン像は暗くなり、選出したピークが、それぞれのタンパク質に主に起因することが確認された。したがって、TOF-SIMS によるフラグメントイオンから複数のタンパク質に起因する二次イオンの選出が可能であることが示された。また、相互情報量を用いた場合は従来の PCA と

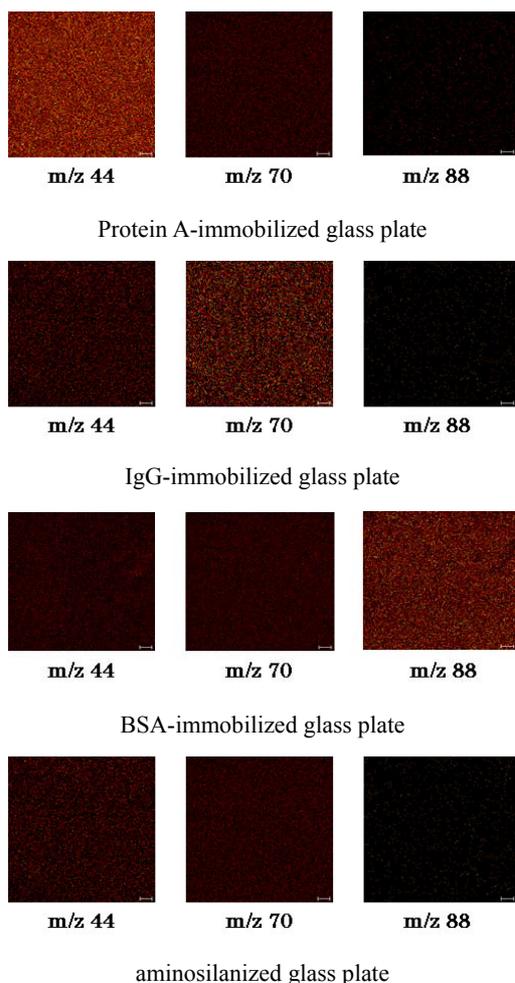


Fig. 2 TOF-SIMS secondary ion images related to protein A, IgG and BSA.

比べて、標準試料との比較から容易にタンパク質起因のピークを選出できるという利点があることも示された。

#### 4 まとめ

ガラス基板上に固定化したタンパク質の TOF-SIMS スペクトルを情報エントロピーと主成分分析法で解析した結果、異なるタンパク質は TOF-SIMS によって識別可能であることが示された。また、参照試料との相互情報量の比較によって、各タンパク質に起因するフラグメントイオンを選出できる。こうして選出された特異的なフラグメントイオンピークを用いて、各タンパク質のバイオセンサ基板上の分布を得ることができると考えられる。したがって、TOF-SIMS による基板測定は、バイオセンサ基板の評価に有効であり、バイオセンサ機能評価および高性能化に大いに貢献できると期待される。

また、相互情報量による特異的ピークを選出は、タンパク質の TOF-SIMS スペクトルの解析を簡便にし、定性

ばかりでなく特定のタンパク質の定量およびイメージングを可能とする。今後はひとつの基板上に複数のタンパク質が固定化された試料に対して、相互情報量によるスペクトル解析の有効性を検討し、実際のバイオセンサ基板上における固液反応のモニタリングへ応用する。

#### 文献

- 1) M. S. Wagner, B. J. Tyler and D. G. Castner, *Anal. Chem.*, **74**, 1824 (2002).
- 2) G. Coullerez, S. Lundmark, M. Malkoch, H. Magnusson, E. Malmstrom, S. Hult and H. J. Mathieu, *Appl. Surf. Sci.*, **34**, 55 (2002).
- 3) S. Aoyagi, M. Hayama, U. Hasegawa, K. Sakai, M. Tozu, T. Hoshi and M. Kudo, *e-J. Surf. Sci. Nanotech*, **1**, 67 (2003)
- 4) C. E. Shannon and W. Weaver, *The mathematical theory of information* (University of Illinois Press, Urbana, IL, 1947)
- 5) T. Fujikura, K. Sakamoto and J. T. Shimozaawa, *Anal. Chim. Acta.*, **351**, 387 (1997).
- 6) J-B. Lhoest, E. Detrait, P. Aguilar and P. Bertrand, *J. Biomed. Materials Res.* **41**, 95 (1998).