ガラス基板上のタンパク質分布に関する TOF-SIMS イメージング評価法[†]

青柳 里果・工藤 正博

成蹊大学工学部物理情報工学科 180-8633 東京都武蔵野市吉祥寺北町 3-3-1

(2004 年 2 月 19 日受付；2004 年 3 月 26 日掲載決定)

Evaluation of TOF-SIMS Imaging of Proteins on Glass Plates

Satoka AOYAGI and Masahiro KUDO

Department of Applied Physics, Seikei University
3-3-1 Kichijoji-kitamachi, Musashino, Tokyo 180-8633

(Received February 19, 2004 ; Accepted March 26, 2004)

Monitoring of proteins on biosensor surfaces is required for developing high performance biosensors. In this study, distributions of proteins, protein A and immunoglobulin G (IgG), 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 and IgG are obtained respectively with this method.

1. はじめに

バイオセンサ基板上的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^{1, 2}や情報エントロピー³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。

本論文では、免疫グロブリン G (IgG) 測定用のバイオセンサ⁴を対象とし、基板上に固定化したプロテイン A と溶液中の IgG の 2 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、ガラス表面をアミノプロピルトリメトキシシラン (東京化成, 東京) でアミノシラン化した。そして、1% グルタルアルデヒド (特級: 和光純薬, 大阪) で架橋し、pH 7.4 リン酸緩衝溶液中に 30 h, 4℃ で反応させて、FITC 標識プロテ

[†] 第 23 回表面科学講演大会 (2003 年 11 月 26 日~11 月 28 日) にて発表

E-mail: aoyagi@apm.seikei.ac.jp

Table 1. Fragment ions related to amino acids of protein.

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

イン A (Zymed Lab. Inc., San Francisco, CA) および IgG (Zymed Lab. Inc.) をそれぞれ固定化した。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。

洗浄した 8×8 mm のスライドガラスをアミノプロピルトリメトキシシラン 2 ml を含むトルエン (特級: 和光純薬) 30 ml 中で 5 時間還流し、表面をアミノシラン化した。

2.2 TOF-SIMS 測定

TFS-2100 (Physical Electronics, Eden Prairie, MN) を用い、一次イオンは 12 keV の Ga イオン、ラスターサイズ 120 μm 角で、イオンドーズ量はスタティック限界以内である 10¹² ion/cm² として、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 スペクトル解析

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^{5,6)}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、サンプルの種類に関する (事象 A) 事前エントロピーを求め、そのピークの強度のある閾値 V に対する高低に関する (事象 B) 事後エントロピーを引くことによって得られる。

事前エントロピー (*a priori* entropy) :

$$S(A) = -\sum p(a_i) \log 2p(a_i)$$

TOF-SIMS スペクトルの個数を N, 試料 1 の個数を n(a 1), 試料 2 の個数を n(a 2) とする。

事後エントロピー (*a posteriori* entropy) :

$$S(A|B) = -\sum p(a_j) \sum p(a_j, b_i) \log 2p(a_j, b_i)$$

試料 1 および 2 で V よりもピーク強度が高いスペクトルの個数を各々 n(a 1, b 1), n(a 2, b 1), V よりもピーク強度が低いスペクトルの個数を n(a 1, b 2), n(a 2,

b 2) とする。

$$\text{相互情報量} : I(A; B) = S(A) - S(A|B)$$

相互情報量をプロテイン A および IgG 固定化ガラス、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⁷⁾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、分子量 42000 程度のプロテイン A と比べて非常に大きい、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プロテイン A と IgG 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。その結果を示す **Fig. 1** より、フラグメントイオンからガラス基板上の 2 種類のタンパク質 IgG とプロテイン A 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、定性だけではなく、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法と併せて検討する必要がある。そこで、各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。

Fig. 1. Scores plot from PC 1 and PC 3 of positive ion spectra.

Table 2. Mutual information of protein A and IgG on glass plates.

Sample	Mutual information (—)	Secondary ion peak (m/z)
Protein A	0.99	143, 168
	0.79	41, 43, 44, 53, 54, 55, 64, 75, 80, 146, 188, 189
IgG	0.79	56, 60, 70, 72, 74, 81, 85, 86, 87, 95, 100, 107, 110, 112, 121, 125, 129, 130, 131, 136, 145, 147, 157, 170, 171, 184, 185

その際、プロテイン A 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多く検出されたため、IgG 固定化ガラス基板との差を抑えるために、全イオン強度でなく、タンパク質に由来する全イオン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持つものを Table 2 に示す。

この中で、強度が参照試料に比べて十分に高いピークとして、プロテイン A に由来する二次イオン、 $m/z=80$, 146, IgG に由来する二次イオン、 $m/z=130$, 157, 184 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、プロテイン A 固定化ガラス、IgG 固定化ガラス、タンパク質固定化前のアミノシラン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。

タンパク質が固定化されて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。プロテイン A および IgG 固定化ガラスでは、それぞれ固定化されていないタンパク質に起因する二次イオン像は暗く得られ、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が相互情報量によって識別でき、また各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、標準試料との比較から容易に求められるという利点がある。今後は、固定化したプロテイン A と試料溶液中の IgG を反応させた試料を測定し、プロテイン A と IgG の固液反応を評価する。

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

4. ま と め

ガラスに固定化したタンパク質の TOF-SIMS による質量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が選出できる。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が得られる。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が可能であり、バイオセンサの機能評価および高性能バイオセンサの開発に大いに貢献すると期待される。

また、相互情報量による特異的ピークの選出は、TOF-SIMS のタンパク質測定を簡便にし、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、IgG と反応した固定化プロテイン A の TOF-SIMS 質量スペクトルの解析によって、バイオセンサ基板上における固液反応をモニタリングし、非定常状態等の新しい測定法開発を探る。

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, A. 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) S. Aoyagi, R. Imai, K. Saka and M. Kudo: Biosens. Bioelectron. **18**, 79 (2003).
- 5) C.E. Shannon and W. Weaver: The mathematical theory of information (University of Illinois Press, Urbana, IL, 1947).
- 6) T. Fujikura, K. Sakamoto and J.T. Shimozawa: Anal. Chim. Acta, **351**, 387 (1997).
- 7) J-B. Lhoest, E. Detrait, PvdBd Aguilar and P. Bertrand: J. Biomed. Materials Res. **41**, 95 (1998).