

量子ドットを用いた微量タンパク質検出法

量子ドットの集積で抗体によるタンパク質の検出感度を飛躍的に向上

これまでにない優れた特性をもつ蛍光性量子ドットを新たに合成し、この量子ドットを用いてタンパク質やDNA/RNA計測用のナノバイオハイブリッド材料の開発に成功した。さらに、この新材料を抗体を用いた微量タンパク質検出法（イムノブロット法）に応用したところ、検出感度が大幅に向上した。

We have succeeded in the synthesis of unique high quality fluorescent quantum dots, and nano-biohybrid materials for protein and DNA/RNA measurements are developed using the quantum dots. The nano-hybrid materials can be applied for detection of trace amounts of proteins using antibodies (immunoblotting). The sensitivity of the method was drastically improved.

イムノブロット法の現状

抗体を用いて狙ったタンパク質を検出するイムノブロット法は、開発されてすでに20年以上になるが、現在でも分子生物学や医学の分野において、細胞や組織中のタンパク質を検出する主要な方法である。特にゲノムの機能解析や全タンパク質（プロテオミクス）解析におけるマイクロアレイ技術の基本となる方法の1つである。イムノブロット法は幅広く長い間利用されているにもかかわらず、技術的に大きな改善はなされておらず、次のような問題

点がある。①定量性に欠ける、②操作工程が煩雑で長時間かかる、③再現性に乏しい、④微量のタンパク質を検出するには感度が低すぎる、⑤細胞溶解液から直接に検出できない、⑥タンパク質の沈殿・濃縮などの前処理を必要とする、などである。

新規量子ドットの開発

量子ドットは、無機半導体材料でできた数nm（ナノメートル）の粒子で、紫外線を照射すると強い蛍光を出すことから、バイオイメーjing、バイオ計測、光増感剤などの光学材料として注目を集め、熾烈な研究開発競争が展開されている。その中でわれわれは、高い発光性、有効なサイズ分布、優れた光化学的安定性、非凝集性、非点滅

大庭 英樹 おおば ひでき
h.ooba@aist.go.jp
実環境計測・診断研究ラボ
主任研究員
(九州センター)

現在、蛍光性量子ドットの新規合成法の開発と応用に関する研究に従事している。すでに実用化に結びつく可能性のある技術の開発に成功しているが、今後さらに国内外の研究者と共同で、ライフサイエンス、医療や産業の分野で本当に役立つ蛍光性量子ドットを用いたバイオイメーjingやバイオセンシング技術の開発に貢献していきたい。また、量子ドット研究では世界をリードする研究グループを目指す。

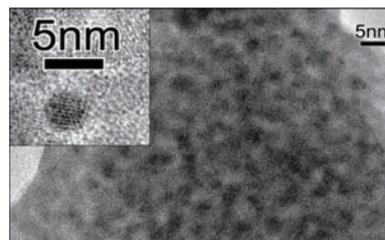


図1 合成した量子ドットの高分解透過型電子顕微鏡写真
今回合成した量子ドットのうち、サイズが3nmのものを示す。



図2 量子ドットが発する蛍光
サイズが小さい(2nm)と青色の蛍光を発生し、3nmでは緑色、4nmでは黄色、サイズが大きい(5nm)と赤色の蛍光を発生する。励起波長は365nm。

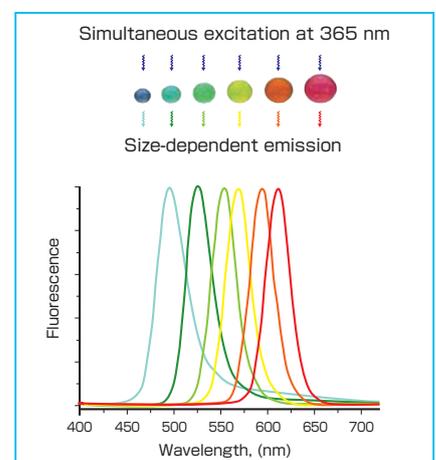


図3 量子ドットの蛍光スペクトルのサイズ依存性

現象などの特性を併せ持つ優れた量子ドットの調製に成功した。

量子ドットのイムノプロットへの応用

合成した量子ドットは、セレン化カドミウム(CdSe)という材料で、直径はわずか3～6nmである(図1)。これに紫外線を照射すると、それぞれのサイズに応じて鮮やかな青色から赤色の蛍光を発する(図2)。そして蛍光スペクトル(図3)も非常にシャープである。

われわれは、まず量子ドットにさまざまな生体分子を結合させる技術を開発し、これを利用してタンパク質アビジンや生体分子ビオチンと量子ドットを結合した材料を合成した(図4)。次に、この材料をビオチンで標識した抗体と組み合わせて、イムノプロット法に適用した。

この方法により、細胞分裂にかかわるTelomeric Binding Factor (TRF1、56kDa)とTRF1-interacting nuclear Protein 2 (Tin2、40kDa)の2種類のタンパク質の検出を行なった。これらは慢性骨髄性白血病細胞に90%以上の割合で発現しているが、ごくわずかにしか存在しないタンパク質である。比較のため、従来の化学発光を用いたイムノプロット法も行なった。

その結果、従来のイムノプロット法では検出できなかった(図5A2)微量タンパク質を、量子ドットを使用したイムノプロット法では高感度に検出できることがわかった(図5B2)。

さらに、量子ドットの蛍光は、市販の蛍光測定装置で連続測定した場合でも約40分間は安定であり、解析や検出データの取得にも適していることが分かった。また、4℃で遮光しておけば、蛍光シグナルに大きな変化は見られず、数週間は安定であった。

これらの結果は、量子ドットを用いた“サンドイッチタイプ”イムノプロッ

ト法が微量タンパク質を検出する技術として、従来のイムノプロット法よりも優れていることを示している。

今後の展開

名古屋大学応用化学科(馬場嘉信教授)との共同研究で、この量子ドットイムノプロット法を、マイクロチップ電気泳動による天然タンパク質の検出と同定を行なうためのチップの開発に適用する予定である。また、醸造・発酵を含めた食品製造プロセスで生成したり侵入したりする望ましくない菌類や異物を特異的に標識する量子ドット

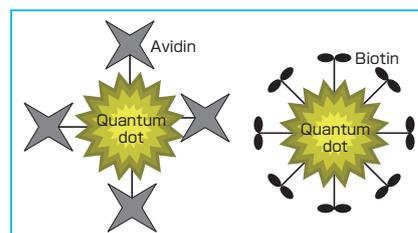


図4 アビジンおよびビオチンを結合した量子ドットの模式図

左：量子ドット-アビジン

右：量子ドット-ビオチン

の表面処理技術を開発し、最適なプロセス管理を行なうための評価技術にも応用する予定である。

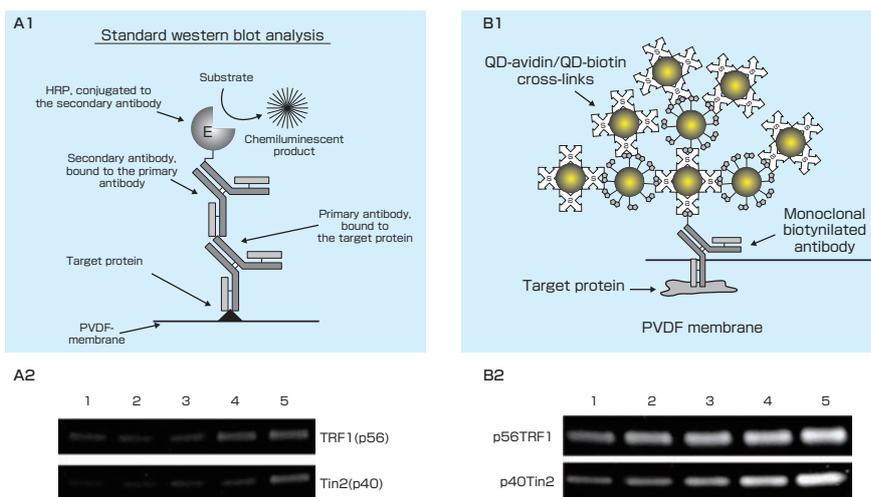


図5 細胞中に存在する微量タンパク質 (TRF 1、Tin 2) の検出

左：従来のイムノプロット法 A1；スキーム、A2；TRF1 および Tin2 のバンド

右：量子ドット使用イムノプロット法 B1；スキーム、B2；TRF1 および Tin2 のバンド

番号は各タンパク質量に相当する量の白血病細胞株 K562 細胞溶菌液

1：10 μg、2：20 μg、3：30 μg、4：40 μg、5：50 μg。

関連情報：

- 共同研究者 Zhivko Zhelev, Rumiana Bakalova、馬場嘉信 (名古屋大学)
- 産総研プレス発表：2006年2月16日 「蛍光性ナノ粒子で微量タンパク質の高感度検出を可能に」
- Z. Zhelev, R. Bakalova, H. Ohba, R. Jose, Y. Imai, Y. Baba, Anal. Chem., 2006, 78(1): 321-330.
- R. Bakalova, Z. Zhelev, H. Ohba, Y. Baba, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(32): 11328-11335.
- 「白色/黄色蛍光量子ドットの産業分野、ライフサイエンス分野への応用」 ナノテク2006 (平成18年2月21日～2月23日、東京ビッグサイト)
- 特願 2005-348157 「免疫化学的検出方法、及びその検出用試薬キット」