

# 高電圧パルス印加による 「その場」タンパク質抽出固定化技術の開発

平賀 諒太\*, 岸 一希\*, 高橋 俊介\*\*\*, 宮田 英史\*,  
大重 真彦\*, 桂 進司\*.<sup>1</sup>

(2016年9月29日受付; 2016年11月15日受理)

## A new Method of *in situ* Protein Extraction and Immobilization with Application of High Voltage Pulses

Ryota HIRAGA\*, Kazuki KISHI\*, Shunsuke TAKAHASHI\*\*\*,  
Hidefumi MIYATA\*, Masahiko OSHIGE\* and Shinji KATSURA\*.<sup>1</sup>

(Received September 29, 2016; Accepted November 15, 2016)

In this study, the *E. coli* cells expressing His-GFP (His-tagged Green Fluorescence Protein) were broken down by applying high voltage pulses on modified gold substrate for protein immobilization. The His-tagged proteins in cytosol were extracted followed by immediate immobilization on modified gold surface when the pulses above three times of the capacitance: 2nF, capacitor charging voltage: 15 kV, were applied. The amounts of immobilized His-GFP with/without lysozyme treatment of His-GFP expressed *E. coli* were 2.7 ng/mm<sup>2</sup> or 1.4 ng/mm<sup>2</sup> respectively.

### 1. はじめに

ゲノムプロジェクトにより得られた遺伝情報を診断や分子生物学・生化学研究等の幅広い分野で生かすために、多種類のタンパク質間相互作用解析をハイスループットで行える技術開発が行われている<sup>1-3)</sup>。このような解析を行うためのタンパク質調製は、大腸菌等を用いた遺伝子組換え実験により行われる。その際、細胞内で発現させた目的タンパク質は混在する無数の細胞内性タンパク質から単離する操作が必要となることから、目的タンパク質を得るための分離プロセスに多大な時間と手間が費やされているのが実情である。このため、タンパク質間相互作用解析のハイスループット化を進めるにあたり大きな問題となっている。この問題を解決するために、本研究では固液分離による分離プロセスを経ることにより簡便に目的タンパク質を基板表面上に固定化させる技術を開発した。具体的には、細胞内で目的タンパク質を発現させた大腸菌をバイオセンサで汎用されている

金薄膜上に塗布した後、高電圧パルス印加することにより目的タンパク質の抽出および固定を行う方法である。

バイオセンサとしては、Surface Plasmon Resonance (SPR)<sup>4)</sup> や Quartz Crystal Microbalance (QCM)<sup>5)</sup> を用いた分析技術が開発されている。これらの方法は目的のタンパク質や相互作用因子を蛍光物質や放射性同位元素などにより標識する必要がなく、センサ表面上に固定化した生体分子の量を精密に測定することにより、タンパク質間相互作用を検出している。これらのセンサ表面上に固定化するタンパク質は、目的タンパク質の遺伝子を導入した大腸菌培養・目的タンパク質発現・目的タンパク質抽出・精製操作を行うことにより調製される。その後、精製した目的タンパク質はセンサ表面上に滴下することによって固定化させる。しかし、これらの工程の並列化は困難であり、固定化の対象となる多種類の目的タンパク質を調製するには多大な作業が必要となる。したがって、タンパク質間相互作用解析のハイスループット化を実現するためには、目的タンパク質の調製法の改良が必須となる。

そこで、本研究では 3-Mercaptopropionic Acid (MPA) - Ni 錯体を修飾したタンパク質固定化金基板に His-Tag 融合タンパク質を固定化する技術を利用し (図 1)<sup>6)</sup>、高電圧パルス印加と組み合わせることにより迅速・簡便に目的タンパク質を抽出・精製・固定する方法を開発した。

具体的には、① His-Tag 融合タンパク質発現大腸菌をタンパク質固定化金基板上に塗布、②高電圧パルスを印

**キーワード**: 高電圧パルス, タンパク質抽出, タンパク質固定

\* 群馬大学大学院理工学府環境創生部門  
(〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Department of Environmental Engineering Science,  
Graduate School of Science and Technology, Gunma  
University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma 376-8515,  
Japan

\*\* 日本学術振興会特別研究員 DC2

<sup>1</sup> katsura@gunma-u.ac.jp

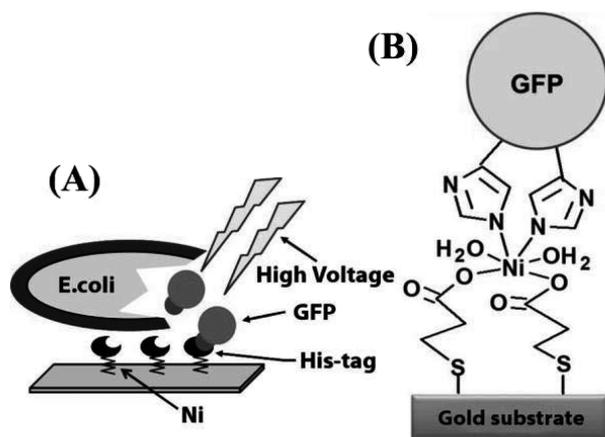


図1 高電圧パルスによる His-tag 融合タンパク質の固定化のイメージ図 (A) と His-tag 融合タンパク質-Ni-MPA 複合体モデル (B)

Fig.1 Illustration of His-tagged protein immobilization by applying high-voltage pulses (A) and His-tagged protein-Ni-MPA complex model (B).

加し大腸菌内膜を破壊・タンパク質抽出と同時にタンパク質固定化金基板表面上への「その場」固定を行う (図1A)。その後、③ His-Tag 融合タンパク質が固定化された基板表面上を洗浄することにより His-Tag 融合タンパク質の精製が完了する。これにより、従来法のカラム樹脂によるタンパク質精製工程を経ることなく、大腸菌培養・タンパク質発現誘導後すぐにタンパク質固定化金基板表面上に His-Tag 融合タンパク質を固定化することが可能となる (図1B)。

大腸菌は外膜と内膜の2重膜構造を持ち、これらの膜の間にペプチドグリカン層が存在する。この内膜は外膜及びペプチドグリカン層に比べてイオン透過性が低く、低い電位差による膜破壊が可能である。そのため、従来の研究ではリゾチーム処理により外膜およびペプチドグリカン層を取り除き、内膜だけの状態に調製していた<sup>7)</sup>。一方、本研究の最終目標は固定化基板上で目的タンパク質発現大腸菌を培養し、高電圧パルス印加することによって「その場」固定化を行うことである。このことから、基板上にて培養された目的タンパク質発現大腸菌にリゾチーム処理を行うことは困難である。そこで、リゾチーム処理をせずに大腸菌の外膜及び内膜を破壊し、目的タンパク質を「その場」抽出・固定することが可能なパルス印加条件を見つけ出すことを試みた。本研究の具体的な検討項目として、大腸菌をタンパク質固定化金基板表面上に塗布し、高電圧パルス印加による大腸菌の膜破壊および His-tag 融合タンパク質の固定をおこなうためのコンデンサ充電電圧の必要条件と印加回数条件を検討した。また、リゾチーム処理がタンパク質固定化密度に与える影響も検討した。タンパク質固定化基板上に固定する

モデルタンパク質として、His-Tag 融合 Green Fluorescent Protein (His-GFP, 励起波長: 488 nm/ 蛍光波長: 510 nm) を使用した。高電圧パルス印加後、タンパク質固定化基板上に固定された His-GFP の蛍光を観察することにより評価した。

## 2. 実験方法

本実験では、水道水から純水製造装置 (Elix UV 3, Millipore) を用いてイオン交換水を製造し、このイオン交換水を超純水製造装置 (Simplicity UV, Millipore) で処理することにより得られた超純水 (Milli-Q 水) を用いた。

### 2.1 遺伝子組換え大腸菌の調製・培養とタンパク質発現誘導

His-GFP の調製には、GFP 発現ベクター (pGGFP) で形質転換した大腸菌 (Rosetta (DE3) pLysS) を使用した。形質転換を行った大腸菌を 1% グルコース, 0.05 mg/mL アンピシリン (和光純薬工業, 012-20162), 0.034 mg/mL クロラムフェニコール (和光純薬工業, 032-19451) を含む LB 培地 (Luria Broth: Tryptone 1w/v%, 0.5w/v% 酵母エキス, 0.5w/v% NaCl) 1 mL 中で、30°C, 16時間振盪培養した。この培養液 1 mL を上記2種類の抗生物質およびグルコースを含む LB 培地 10 mL 中に全て添加し、30°C で 30分間の振盪培養後、最終濃度が 1 mM になるようにタンパク質発現誘導剤 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside, 和光純薬工業, 099-05013) を加えた。その後、16°C で 20~24時間振盪培養することで His-GFP の発現誘導を行った。

### 2.2 タンパク質発現誘導大腸菌の調製

タンパク質発現誘導した大腸菌培養液の波長 600 nm における吸光度を吸光度計 (島津製作所, UVmini-1240) により測定し、 $[\text{吸光度}] \times [\text{大腸菌溶液 (ml)}] = 2$  となるようにマイクロチューブに分注した。分注したタンパク質発現誘導大腸菌培養液を 600 × g, 4°C, 10分間遠心分離を行った後、上清を除去した。沈殿した大腸菌を大腸菌調製用バッファー (2 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 100 mM グルコース) で懸濁および遠心分離を行うことにより大腸菌を洗浄した。この洗浄操作を2回行った後、遠心分離した大腸菌を 100 μL の大腸菌調製用バッファーに再懸濁し、大腸菌濃縮液とした。リゾチーム処理を行う場合、この大腸菌濃縮液に、最終濃度が 1 mg/mL になるようにリゾチーム溶液 (2 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 100 mg/mL リゾチーム (SIGMA, L6876)) を加え、1時間、室温で静置した大腸菌濃縮液をリゾチーム処理大腸菌濃縮液とした。

### 2.3 His-Tag融合タンパク質固定化金基板の調製

His-Tag 融合タンパク質を固定化するための金基板は、カバーガラス (MATSUNAMI, C025601: 厚さ 0.12~0.17 mm, 25 × 60 mm) に金箔 (Nilaco, AU-173102: 厚さ 0.0025 mm, 10 × 14 mm) を両面テープで接着することにより作製した。金基板表面を洗浄するために、濃硝酸中に室温で1時間浸した。硝酸処理した金基板を Milli-Q 水で洗浄し、金基板表面に MPA (東京化成工業, M0061) を修飾するために、1 M MPA 溶液中で、金基板を陽極、アルミ板を陰極として、DC 5 V 一定の条件で、10分間、電着操作を行った。この電着操作により MPA 分子が金基板表面に引き寄せられ、分子が持つチオール基 (-SH) が表面金原子と共有結合し、結果として各々の分子のカルボキシ基 (-COOH) が表面へ向くように配向制御した金基板の修飾が可能である。修飾した金基板表面を Milli-Q 水で洗浄した後、0.1 M NiCl<sub>2</sub> 溶液 (和光純薬工業, 148-01055) に1晩浸漬し、修飾された金基板表面のカルボキシ基と Ni<sup>2+</sup> との間に錯体を形成させることによりタンパク質固定化金基板とした。このタンパク質固定化金基板は His-Tag 融合タンパク質の His-Tag と特異的に結合していることから、固定化した His-Tag 融合タンパク質は 500 mM イミダゾール (和光純薬工業, 095-00015) により解離させた。

### 2.4 高電圧パルス発生装置

スライダックにより電圧を調整し、ネオン変圧器 (ダイヘン, TP-0496) で昇圧、高圧ダイオードによって整流後、2 nF (0.5 nF の高電圧セラミックコンデンサ (Murata, 789-9337) を4個並列接続) のコンデンサに充電し、それを高電圧スイッチで開閉することにより高電圧パルスを発生させた (図 2A)。高電圧スイッチ (図 2B) は接点となる銅製の丸鋸が打ち付けた可動性のプラスチック板と固定プラスチック板からなるソレノイドコイル (マルハ電機, MD26202) への通電によりプランジャーを操作し、プラスチック板を曲げることでスイッチングを行った。ソレノイドコイルの制御は Arduino Uno R3 (スイッチサイエンス, ARDUINO-A000066) を使い、スイッチングのインターバルは1秒とした。また、発生させたパルス波形は高電圧プローブ (Tektronix, P6015A) を介してオシロスコープ (Tectronix, TDS 2014) により測定した。図 2C は目的タンパク質発現大腸菌への高電圧パルス印加のためのチャンバーの模式図を示す。アルミ板上に設置したシリコンシートで作製した孔 (10 × 10 × 0.5 mm) にタンパク質固定化金基板を重ねあわせた装置をチャンバーとして使用した。

図 2D は本チャンバーを負荷とし、コンデンサ充電電

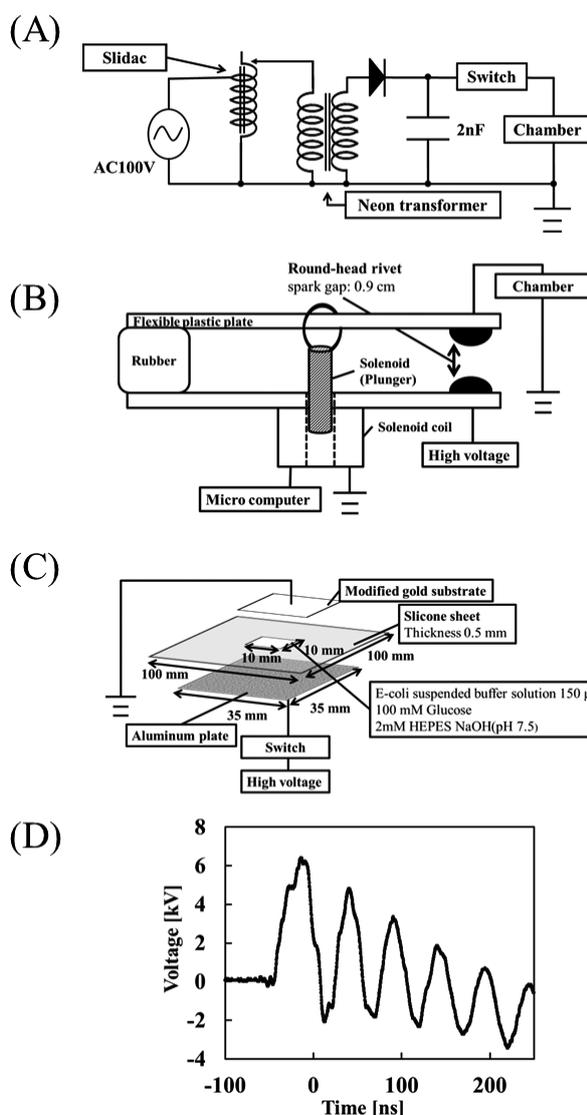


図 2 高電圧パルス発生装置 (A) 高電圧パルス発生回路, (B) 高電圧パルス用スイッチ, (C) 回路高電圧パルス印加用チャンバー, (D) この装置により発生する代表的なパルス波形 (コンデンサ充電電圧 10 kV)。

Fig.2 A high voltage pulse generator. (A) Circuit of the high voltage pulse generator, (B) Switch for high voltage pulse generation, (C) Chamber structure for high voltage pulse application, and (D) A waveform of a typical high-voltage pulse (Charging voltage was 10 kV).

圧 10 kV の時に得られた高電圧パルスの代表的な波形を示す。

### 2.5 タンパク質固定化用金基板上での His-GFP 発現大腸菌への高電圧パルス印加条件の検討

タンパク質固定化金基板と大腸菌濃縮液で満たしたチャンバーを重ね合わせた後、各種条件 (印加回数およびコンデンサ充電電圧) にて高電圧パルスを印加した (図 2C)。このときの電極間隔距離は 0.5 mm のシリコンシートの厚さとなる。高電圧パルスの印加後、チャンバーはそのまま重ねあわせた状態で 15 分間静置した。その

後、非特異的に吸着しているタンパク質等を取り除くために、基板を室温・遮光条件下にて 0.05% Tween20 に 2 時間浸漬洗浄し、蛍光顕微鏡で観察・撮影した。その後、His-GFP が His-tag 特異的に固定化していることを確認するため、500 mM イミダゾール溶液中で攪拌しながら、室温・遮光条件下にて一晩処理した。その後、蛍光顕微鏡で観察・撮影を行った。

## 2.6 タンパク質固定化用金基板に固定した His-GFP の蛍光観察

蛍光観察には対物レンズ 4 倍 (Nikon, OFN25/MRH 00041) を装着した蛍光顕微鏡 (Nikon, TE-2000U) を使用した。His-GFP の蛍光観察には Nikon B-2A 蛍光フィルターセット (Excitation filter: 450-490 nm, Dichroic mirror: 505 nm, Barrier filter: 520 nm), Alexs568-ssDNA の蛍光観察には Nikon G-2A 蛍光フィルターセット (Excitation filter: 510-560 nm, Dichroic mirror: 575 nm, Barrier filter: 590 nm) を使用した。撮影にはデジタルカメラ (Nikon, D3200) を使用し、撮影した画像は Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いてタンパク質固定化用金基板上の His-GFP の蛍光強度を数値化した。その後、既知の濃度の精製 His-GFP の蛍光強度を Image J によって数値化した検量線を用いて、固定化した His-GFP の固定化量を算出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 リゾチーム処理無しで固定化可能なコンデンサ充電電圧の条件

リゾチーム処理無しで固定化可能なコンデンサ充電電圧を検討するために、パルス印加回数を 3 回に固定し、コンデンサ充電電圧を 0 ~ 15 kV にて実験を行った。各コンデンサ充電電圧での高電圧パルス印加後、0.05% Tween-20 溶液を用いて洗浄操作したときに観察した結果、コンデンサ充電電圧が 15 kV のみにて His-GFP が固定化されたことが示された (図 3A)。さらに、これらの画像から His-GFP の固定化量を解析した結果、15 kV のコンデンサ充電電圧での高電圧パルス印加による His-GFP の固定化密度は 1.4 ng/mm<sup>2</sup> であった (図 3B)。

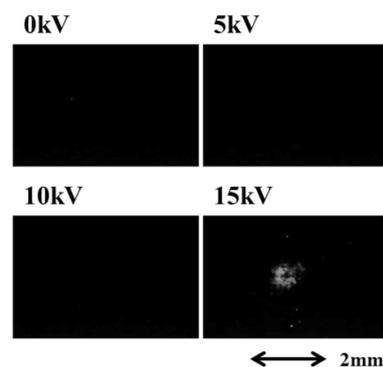
微生物細胞膜に印加される電圧  $V_c$  は細胞形状を球形と仮定すると、下の式により算出される<sup>8)</sup>。

$$V_c = 1.5aEc \cos\theta \quad \text{式(1)}$$

( $a$ : 球形の細胞の半径,  $E_c$ : 臨界電界強度,  $\theta$ : 電気力線方向と細胞の中心と細胞膜位置を結んだ線がなす角度)

筆者らの既報の研究において、リゾチーム処理を行った大腸菌ではコンデンサ充電電圧 3 kV (実際のピークパ

(A)



(B)

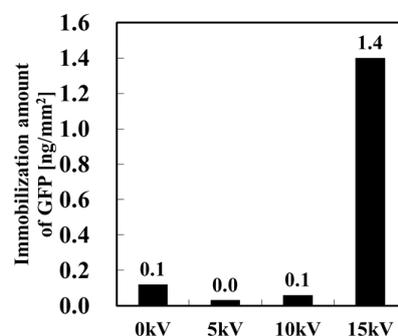


図 3 リゾチーム処理なし His-GFP 発現大腸菌への各コンデンサ充電電圧での高電圧パルス印加 (3回)。各コンデンサ充電電圧での高電圧パルス印加後の固定化 His-GFP の蛍光画像 (A) とその蛍光強度から解析した His-GFP の固定化密度 (B)。スケールバー=2 mm。

Fig.3 His-GFP expressed *E. coli* cells without lysozyme treatment were applied to three times high voltage pulses under different charging voltages (0, 5, 10, and 15 kV). (A) Fluorescent images of the immobilized His-GFP on the protein immobilization gold substrates under different charging voltages. Scale bar = 2mm. (B) Immobilization densities of His-GFP determined from the fluorescent intensity of the immobilized His-GFP.

ルス電圧 2 kV 程度) のパルスを印加することにより、大腸菌からの目的タンパク質の抽出・固定が実現できることが明らかになっている<sup>7)</sup>。ここで、大腸菌を 1  $\mu$ m の球と仮定し、ピーク電圧 2 kV を式(1)に適用すると、最大膜電位は 6 V と算出される。大腸菌内膜である細胞膜には 1 V を超える電圧を与えると細胞膜の不可逆的な変化が起こり始めることが既往の研究で示されている<sup>8)</sup>。このことからリゾチーム処理大腸菌については、理論による膜電位による破壊とある程度の一致が見られたといえる。一方で、ここで示したように、リゾチーム未処理の大腸菌を対象とした目的タンパク質の抽出・固定にはコンデンサ充電電圧 15 kV (実際のピークパルス電圧 10 kV 程度) のパルス印加が必要であり、その際の膜電位は 30 V 程度と算出される。このことは、リゾチーム未

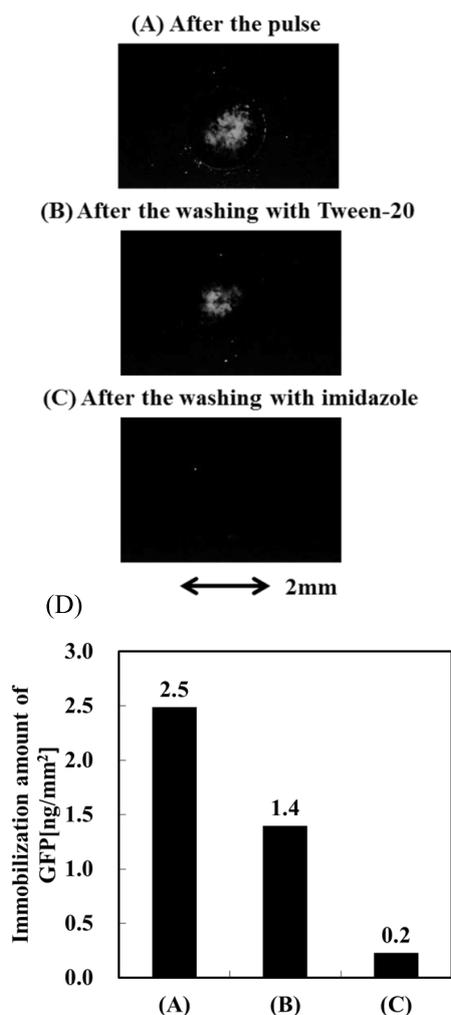


図4 リゾチーム処理なし His-GFP 発現大腸菌にパルス印加および洗浄操作を行った後のタンパク質固定化基板上 His-GFP の蛍光画像。(A) パルス印加直後, (B) Tween-20 溶液洗浄後, (C) イミダゾール溶液洗浄後。スケールバー = 2 mm。(D) 蛍光強度から解析した His-GFP の固定化密度。

Fig.4 Fluorescent images of the immobilized His-GFP on the protein immobilization gold substrate after the washing with Tween20 and imidazole. Scale bar = 2 mm. (A) After the application of high voltage pulses. (B) After the washing with Tween-20. (C) After the washing with imidazole. (D) Immobilization densities of His-GFP determined from the fluorescent intensity of the immobilized His-GFP.

処理の大腸菌において目的タンパク質を抽出・固定するためには、大腸菌の内膜を破壊するだけでなく、さらなる高電界を印加することによって外膜などを破壊することが必要であることを示唆している。

図4はパルス印加後に洗浄操作を行ったタンパク質固定化基板の観察画像を示す。タンパク質固定化基板は0.05% Tween-20 溶液によって浸漬洗浄した後、観察をおこなった。その結果、固定化 His-GFP の蛍光強度はわずかに低下した。この理由は基板表面上に固定化されなかった His-GFP や破壊されなかった His-GFP タンパク質発現大腸菌などが洗い流されたためである。従って、図

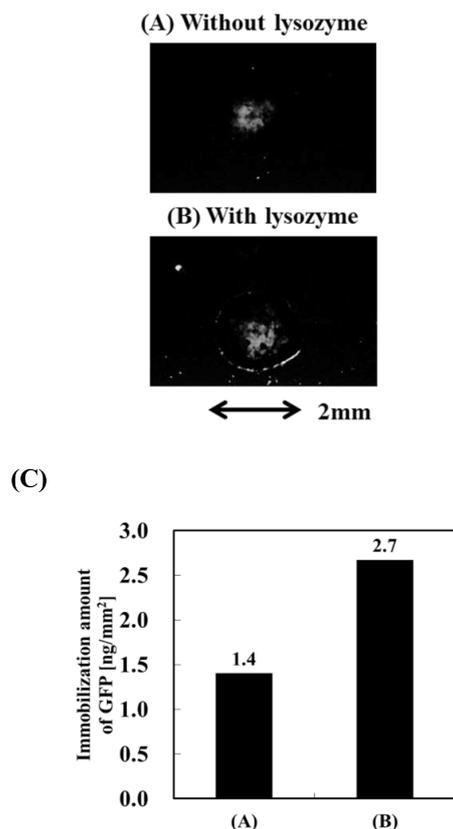


図5 コンデンサ充電電圧 15 kV 一定条件下でのリゾチーム処理の有無による固定化 His-GFP の蛍光画像と固定化量の比較。(A) リゾチーム処理有り, (B) リゾチーム処理無し。スケールバー = 2 mm。(C) 蛍光強度から解析した His-GFP の固定化密度。

Fig.5 Fluorescent images and immobilization densities of the immobilized His-GFP by applying high voltage pulses to His-GFP expressed *E.coli* with/without lysozyme treatment on the protein immobilization gold substrate. Capacitor charging voltage was 15 kV. Scale bar = 2 mm. (A) Fluorescent image of the immobilized His-GFP with lysozyme treatment (B) Fluorescent image of the immobilized His-GFP without lysozyme treatment (C) Immobilization densities of His-GFP determined from the fluorescent intensity of the immobilized His-GFP.

4B 中の蛍光は His-tag 特異的に固定化基板上に固定化された His-GFP によるものである。その後、固定化基板表面を 500 mM イミダゾール溶液によって浸漬洗浄をした後に固定化基板を観察すると、固定化基板上の His-GFP の蛍光はほとんど失われた。この結果から、固定化された His-GFP は固定化基板上に His-tag 特異的に結合したものだと言える。ゆえに、His-GFP が結合活性を保ったまま特異的に固定化されたことが示された。

### 3.2 リゾチーム処理の有無による固定化量の差

大腸菌濃縮液へのリゾチーム処理の有無による、His-GFP の固定化密度の差を図5に示す。リゾチーム処理をしない場合での His-GFP の固定化密度はリゾチーム処理をした場合の約 50% 程度であった (図 5B)。この差は、大腸菌の外膜上に膜電圧がかかりにくいいため、リゾチー

ム処理をしていない一部の*E. coli*では、その外膜が破壊されずに、細胞膜内にて発現した His-GFP が細胞外に流出しなかったことが原因であると考えられる。パルス印加電圧を上げることによってより大腸菌の外膜を効率よく破壊することが可能になれば、リゾチーム処理による His-GFP の固定化量の差はさらに小さくなると期待される。しかしながら、コンデンサ充電電圧を 15 kV より大きくするとタンパク質固定化基板の金箔が焼き切れてしまうことから、His-GFP の固定化ができなかったため、コンデンサ充電電圧 15 kV 以上での「その場」タンパク質抽出・固定化を実証することが困難であり、より高い高電圧パルス印加に対応可能なタンパク質固定化基板の作製が必要となる。

#### 4. まとめ

コンデンサ充電電圧が 15 kV の高電圧パルスを基板に印加することによって、リゾチーム処理無しで、1.4 ng/mm<sup>2</sup> の密度で発現 GFP を特異的に固定化することに成功した。さらに、リゾチーム処理をしない場合の発現 GFP 固定化密度は、処理をした大腸菌の 50% 程度であることを確認した。リゾチーム処理をした大腸菌としていない大腸菌の固定化量の差は、破壊できた大腸菌量の差によるところだと考えられる。また、現在のところ、この目的タンパク質の抽出・固定技術は固定化密度が不十分であるために SPR, QCM などの高感度機器にしか応用することができないと考えられる。一般的にプロテインアレイに適用できる固定化密度は 6 ng/mm<sup>2</sup> 以上と言われているので<sup>9)</sup>、より固定化量を増大させることが可能になれば、様々な分析技術にも応用することが可能になり、金表面へのタンパク質固定化を利用する分析技術において、解析のハイスループット化に大きく貢献することが期待できる。

#### 謝辞

本研究は群馬大学高度人材センター (HRCC) の助成を受けた。本実験で使用した His-GFP 発現ベクター pGGFPH は名古屋大学院生命農学研究科 生命技術科学

専攻の中野秀雄先生に提供して頂いた。ここに感謝の意を表す。

#### 参考文献

- 1) Carneiro, D. G., Clarke, T., Davies, C. C., & Bailey, D.: Identifying novel protein interactions: Proteomic methods, optimisation approaches and data analysis pipelines. *Methods*, **95** (2016) 46-54
- 2) Choi, J. W., Kang, D. K., Park, H., deMello, A. J., & Chang, S. I.: High-throughput analysis of protein-protein interactions in picoliter-volume droplets using fluorescence polarization. *Analytical chemistry*, **84** [8] (2012) 3849-3854
- 3) Wetie, A. G. N., Sokolowska, I., Woods, A. G., Roy, U., Deinhardt, K., & Darie, C. C.: Protein-protein interactions: switch from classical methods to proteomics and bioinformatics-based approaches. *Cellular and molecular life sciences*, **71** [2] (2014) 205-228
- 4) R.W. Nelson, D. Nedelkov, K.A. Tubbs: Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach. *Electrophoresis*, **21** (2000) 1155
- 5) C.J. Fee: Label-free, real-time interaction and adsorption analysis 1: surface plasmon resonance. *Methods Mol. Biol.*, **996** (2013) 287
- 6) H. Miyata, K. Yumoto, K. Itoh, M. Sasahara, H. Kawaura, N. Oshima, T. Shuzuki, S. Takahashi, M. Oshige and S. Katsura, Immobilization of His-tagged proteins through interaction with L-cysteine electrodeposited on modified gold surfaces. *Key Eng. Mater.*, **596** (2014) 219
- 7) 宮田英史, 石黒勇斗, 大島伸之, 内海 歩, 高橋俊介, 大重真彦, 桂 進司: 静電気学会講演論文集 1, p. 257-260 (2013)
- 8) 勝木 淳: パルスパワーによるバクテリアの殺菌. *プラズマ・核融合学会誌*, **79** [1] (2003) 20-25
- 9) F. Baldini, A.N. Chester, J. Homola, S. Martellucci: *Optical Chemical Sensors*, p. 225, Springer Science & Business Media, New York (2006)