

DNA・抗体マイクロアレイの開発

(財)千葉県産業振興センター (研究員) 田村 学

【目的】

本研究では、「DNA・抗体マイクロアレイの作製技術開発及びその作製・評価」を目的としたテーマ3の基盤技術として必須のDNA・抗体マイクロアレイを開発するものである。

【背景】

地域結集型共同研究事業 テーマ3において掲げられた研究課題「DNA・抗体マイクロアレイの作成技術開発及びその作製・評価」で取得される長鎖cDNA及び抗体をマイクロアレイチップとして商品化するためには固定化基板とともにcDNA及び抗体を効率的且つ定量的に固定化できるDNA・抗体マイクロアレイの開発が必須である。カケンジェネックスは早くからDNAのマイクロアレイを開発して関連技術を蓄積しており、その技術をベースに抗体やタンパク質にも対応できるDNA・抗体マイクロアレイを開発する。

【5年間の研究成果】

1. 抗体アレイの要件探索

まず、従来のDNAマイクロアレイでは不可能とされた抗体・タンパク質をチップ化するために何が障害となっているかを徹底的に調査、テストし、抗体マイクロアレイに必要な以下の要件を洗い出した。

① 高精度スポットが必要

DNAと異なり、タンパクは種類が圧倒的に多く、種類間の差が小さいので個々のスポット精度(定量性、再現性)が解析品質に大きく影響する。

② タンパクが安定固定化できる基板、ソリューション技術が必要

種類が多く、性状の異なるタンパクをクロスコンタミ無く安定に固定化できる基板及びソリューションが必要

③ 微量で且つ3次元スポットが必要

DNAと異なりタンパクは増幅できないので微小スポットが必要、且つタンパク構造上、機能解析には3次元スポットでのアレイが求められる

④ 活性保持が必要

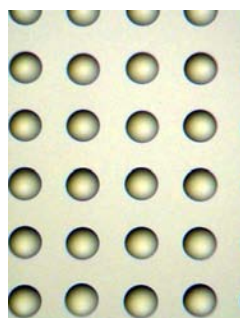
不変性のDNAと異なり、タンパクには変質・劣化が伴うのでアレイ環境、保存環境に活性保持のための施策が必要

⑤ スポット間クロスコンタミを生じない洗浄方式が必要

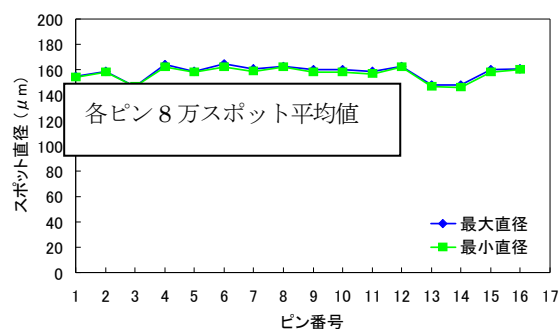
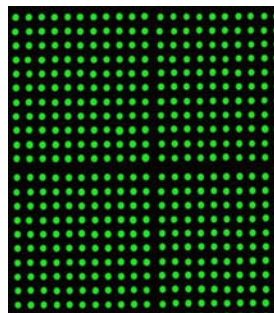
2. 抗体アレイの実現

① 高精度・3次元スポット

DNAマイクロアレイで当社が独自開発した高精度スポットピンをさらに改良を加えて微小スポット60 μm のスポット径を可能にし、今回の研究ではこれに加えて各ピンがすべて均一且つソフトな接触圧力でガラス基板に接触するピン制御機構をかずさDNA研究所と共同開発して標準偏差 $\pm 2\%$ という画期的高精度のアレイを実現するとともにタンパクアレイに必要なとされる3次元スポットをも実現した。



スポット写真



②固定化

フェーズⅡの地域分サブテーマとして「タンパクチップの開発」が新規に設定され当社が担当したので詳細は当該報告書を参照されたい。タンパクの固定化ができる基板及びソリューションの開発はかずさ DNA 研究所および当社が業務提携している各顧客からのコンテンツを受け、基板メーカーと独自の仕様を開発した。(現在、KG スライドとして市販している)

③活性保持

タンパク機能解析に必要なアレイ中の活性の保持についてはアレイ環境制御面から分離膜を利用した湿度コントロール機構とマイクロプレートに保持されたサンプルを冷却するサンプル冷却機構ならびに必要なに応じて使用される酸素濃度コントロール機構と基板冷却機構を開発した。これらの組み合わせにより大抵のタンパク質のアレイ中の変質・活性劣化を防止できた。アレイ後の長期保存方法については上記②に記載した「タンパクチップの開発」報告書を参照されたい。

④コンタミ防止

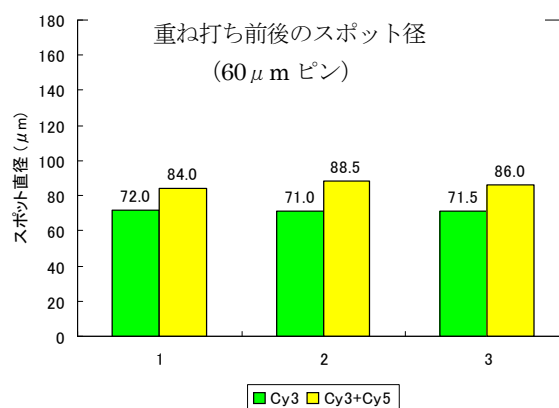
サンプルのクロスコンタミを防止するピンの洗浄方法も新たに 3 槽式超音波洗浄機構を開発、タンパク溶解用溶剤なども組み合わせて使用を可能にした。

⑤重ね打ち&狙い打ち

ピンの X、Y、Z 軸駆動制御機構も改良し、 $1\mu\text{m}$ の制御精度を実現、前記ピン制御機構との相乗効果でプローブの重ね打ちや狙い打ちが高精度で可能となった。

これにより、アレイヤー内で重ね打ちアレイによるハイブリダイゼーションの可能性が開けたばかりか、微小電極チップのようにあらかじめ集積された電極に目的のプローブの狙い打ちスポットができるようになった。また、この精度を活用してウエハーなどに半導体技術で形成された数千の微小ディンプルに各々異種のプローブを充填するマルチマイクロリアクターなどにも応用展開が始まった。

右のグラフは重ね打ち前後のスポット径を示したもので横軸 1 は基板を外さず重ね打ちをした結果、2 は 10 枚単位のホルダー毎外して再度取り付けて重ね打ちした結果、3 は 2 に加え、ホルダーから更に基板を外外した後、再度組み込んで重ね打ちした結果を示す。いずれも差がなく高精度に重ね打ちができています。



⑥ 装置実績

平成 16 年 12 月に初号機を大手創薬メーカーに納入して以来、現在まで 11 台の実績がある。



小型アレイヤー試作機



CCD カメラ付電極チップアレイヤー



3. 今後の計画

- ① 接触ピンタイプのスポッターとして画期的な高精度スポットを生かしてタンパクチップはもちろん電極チップやマイクロリアクターといった新規分野に横展開を図り、事業性に重点を置いた営業活動を展開していく。
- ② 本装置をハードの核として2社と共同事業開発が進行しており、これらを通してさらに一層マイクロレイヤーとしての技術レベルをアップしていく。
- ③ 平成18年度のJST産学共同シーズイノベーション化事業・顕在化ステージにテーマ「立体構造、修飾、部分分解たんぱく質等をも認識可能な癌特異的抗体の新規作製法の検証、及び検証の為の大規模高速スクリーニングシステムの確立」で北里大学、株式会社ダイナコムと共同で応募し、認可された。このテーマ実現の鍵となるのは本マイクロレイヤーの重ね打ち技術を核とした当社のマイクロレイ技術である。レイヤー内ハイブリダイゼーションなど周辺技術開発も多々必要であり、技術を結集して当たりたい。

4. 成果発表&受賞

- ① 平成17年12月 地域発先端テクノフェア発表（東京ビッグサイト）
- ② 平成18年5月 国際バイオEXPO発表（東京ビッグサイト）
- ③ 平成17年8月 内閣総理大臣表彰「第1回ものづくり日本大賞」優秀賞受賞
- ④ 平成18年3月 経済産業省「明日の日本を支える元気なモノ作り中小企業300社」に選定される
- ⑤ 平成18年4月 「第18回中小企業優秀新技術・新製品賞」優秀賞受賞

5. 関連特許

- 1) 特願2005-351182 「プロテインマイクロレイヤー」（出願日 2005/11/8）
出願人：株式会社カケンジェネックス