

## 別紙8 (補足資料)

<p>テーマ番号：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 サブテーマ名：②タンパクチップの開発</p>
<p>サブテマリーダー（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（研究員）今井一英 小テマリーダー（所属、役職、氏名）(株)カケンジェネックス（社長）吉岡弘料 研究従事者（所属、役職、氏名）(株)カケンジェネックス（専務取締役）後藤征人、志水加代（H16-H18）、窪田純一（H16-H18）</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>平成17年度には、(株)カケンジェネックス内で既に開発したタンパクチップ用スライドグラスを用いて検討し、タンパク質チップを作製した。</p> <p>平成18年度には、平成17年度の成果として(株)カケンジェネックス内で開発したタンパク質チップについて検討し、より汎用性の高いタンパク質チップ・抗体チップを開発した。</p> <p>②研究の独自性・新規性</p> <p>ポスト・ゲノム・シーケンシング時代の焦点はタンパク質（プロテオーム）機能解析を網羅的に行うプロテオミクスが今や世界の主流となりつつある。こうした需要を満たすものとして、直接タンパク質をアレイする技術が各方面から求められるようになってきている。しかし、タンパク質はプロセッシング、糖鎖付加、リン酸化、脂肪付加などさまざまな修飾を受けており、その多岐にわたる活性はDNAと異なり熱やpHの影響を受けやすい為、アレイ化が難しいとされてきた。</p> <p>本研究では、平成16年度で商品化にも成功したタンパク/抗体アレイヤーを用いてタンパク質アレイを作製する。タンパク質濃度と固定化効率、活性の安定化について検討し、各種タンパク質をDNAチップ並に高感度で検出することを目指す。</p> <p>③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）</p> <p>フェーズⅡ（H16-H18）：</p> <p>平成17年度には、(株)カケンジェネックス内で既に開発したタンパクチップ用スライドグラス（化学蛍光法）を用いて、下記の項目を検討しタンパク質チップ・抗体チップの作製をする。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>タンパク質の固定化方法：30種類のタンパク質の固定化を行なう</li> <li>タンパク質の濃度と固定化効率：10<math>\mu</math>g/ml～800<math>\mu</math>g/ml</li> <li>タンパク質の活性の安定化：スポット後の活性低下率2週間後2割低下以内</li> </ol> <p>平成18年度には、平成17年度の成果として(株)カケンジェネックス内で開発したタンパク質チップについて、下記項目を検討し、より汎用性の高いタンパク質チップ・抗体チップを開発する。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>タンパク質チップに用いる溶媒の拡充：3種類の緩衝液（PBS、TBS、Carbonate-Bicarbonate buffer）を溶媒としたタンパク質アレイの評価</li> <li>抗体チップへの応用として抗体の濃度と固定化効率を確認：10<math>\mu</math>g～800<math>\mu</math>g/ml</li> <li>タンパク質チップが活性を有する期間の延長：一ヶ月以上</li> </ol> <p>フェーズⅢ（H18. 11.25事業完了日以降）：</p> <p>タンパク質チップが活性を有する期間の延長について検討し、タンパク質の提供を含めた提携先を模索する。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>平成17年度には、スライド基板上にアレイするタンパク質濃度が検出感度に及ぼす影響をまず確認した。次いで、ビオチン標識した30種類のタンパク質について基板への固定化を試みた。ビオチンとの結合能を有するCy5-conjugated streptavidineにより基板上的タンパク質を検出し、30種類のタンパク質全ての固定化が確認された。検出結果は既存の検出方法であるELISA法との比較を行い、相関性を確認した。進捗状況はほぼ目標通りだが、基板に固定化したタンパク質活性が安定して維持される期間が二週間であった点については、実際の検出現場ではより長期の保存期間が要求されるため、更なる検討が必要である。</p> <p>平成18年度には今後取り扱うタンパク質の多様化に備え、3種類の緩衝液を溶媒としてビオチン標識したタンパク質を基板上にアレイし、Cy5-conjugated streptavidineによりスポット形状及び固定化効率を比較した。更に抗体についても基板上への固定化を試み、より高い感度が得られる濃度について検討を進めた。</p>

が、検出限界を明確にするには至っていない。タンパク質活性の長期安定化については引き続き検討を進めている。

#### 主な成果

具体的な成果内容：

平成17年度には最も効率的に固定化されるタンパク質濃度を決定し、同様の手法を用いて30種類のタンパク質をスライド基板に固定化することに成功した。これにより、基板自体の汎用性が期待される。又、既存の検出方法であるELISA法との相関性が確認されたことで、平成17年度の成果として作製されたタンパク質チップの有用性が示唆される。

平成18年度には、三種類の緩衝液を溶媒として31種類のタンパク質をスライド基板に固定化した。このことから、より広範囲のタンパク質の検出が可能であると予測される。更に抗体チップにも着手し、抗原との結合をサンドイッチアッセイにより検出した。これにより、本タンパク質チップの手法がより広範囲に適用されることが予想される。

特許件数：0

論文数：0

口頭発表件数：0

#### 研究成果に関する評価

##### 1 国内外における水準との対比

海外ではBiacore社（スウェーデン）とCiphergen（米国）、Invitrogen社（米国）を主要なメーカーとして、タンパク質チップが既に販売されている。前二社では多試料ハイスループット解析は取り扱っていないが、数千ものタンパク質がアレイされているInvitrogen社製の高密度マイクロアレイが登場している。国内のタンパク質チップメーカーとしてはタカラバイオ社や住友ベークライト社が挙げられるが、いずれも抗体もしくは限られた種類のタンパク質チップであり、網羅的タンパク質相互作用の検出デバイスとしては出遅れ感がある。

本研究では広範囲のタンパク質をスライド基板上に固定化/ 検出することを目指しており、この実現により国内での多試料ハイスループット解析が可能となる。

##### 2 実用化に向けた波及効果

本研究では抗体及び抗体以外のタンパク質、いずれのチップ化にも着手しており、複数種類の緩衝液を溶媒として用いた場合でもタンパク質は基板上に固定化されている。本手法がより広い範囲のタンパク質に適応することが可能となれば、医療分野におけるタンパク質機能解析はもとより、網羅的タンパク質発現解析の検出手段としての利用が期待される。

#### 残された課題と対応方針について

課題として、タンパク質チップが活性を有する期間を延長する必要性が挙げられる。一般にタンパク質は金属やガラス等の固体表面との接触で変性しやすいため、基板の表面修飾について更に検討を重ねる。又、具体的な検出対象についても対応する必要があり、タンパク質の提供を含めた提携先を模索する必要がある。

#### 代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]

JST負担による設備：なし

地域負担による設備：機器設計用コンピューターシステム、チップ作製・解析用クリーンルームなど