

## タンパク質パターニングのためのPDMS穴あき構造

PDMS Perforated Film for Protein Patterning

熱田京子\*・野地博行\*\*・竹内昌治\*\*\*

Kyoko ATSUTA, Hiroyuki NOJI and Shoji TAKEUCHI

## 1. はじめに

ゲノムプロジェクト等の進展により様々な生物の遺伝子配列が明らかにされている今、時代は実際に細胞においてのタンパク質の発現状況を解析するプロテオームへと移行しつつある。タンパク質の機能やタンパク質同士の相互作用の解析を効率よく行う手段として、DNAと同様、タンパク質や細胞をアレイ状に配列したプロテインチップを用いることが求められている。近年マイクロマシン技術をバイオテクノロジーに応用したBio-MEMSの発展も著しく、この技術を応用したマイクロチップ等の開発も盛んに行われている<sup>1-3)</sup>。

現在、タンパク質を基板上の特定の位置にだけ結合させることは、マイクロコンタクトプリンティングやマイクロ流体システム、基板の修飾等いくつかの方法で実現されている<sup>4-7)</sup>。基板上の特定の位置にだけ化学的な修飾を施し、化学的な相互作用によりタンパク質を結合させてパターニングする方法では、通常タンパク質は非特異的に基板上のどこにでも結合してしまう(非特異的吸着)ため、タンパク質溶液を基板上に流して特定の位置にのみ固定化するのは難しい。スタンプやスポットして他のところに広がらないようにする物理的な方法は、タンパク質が乾燥したり変性してしまったりして、酵素の活性を保ったままでパターニングするのはやはり困難である。ここでは、MEMS技術を用いてPDMS (poly-(dimethylsiloxane)) というポリマー樹脂にマイクロサイズの穴をあけたフィルム (PDMS sieve) を作成し、それらの問題を解決したタンパク質のパターニングの方法を確立したので報告する。

## 2. 実験

図1に、今回用いたパターニング方法の概念を示した。顕微鏡下での観察による検出を目的としたため、タンパク質を結合させる基板としてスライドガラスを用いた。PDMSは透明なポリマーで、柔軟でありガラスへの密着性が非常に高い。これにマイクロサイズの穴を開けて、ガラスに密着させる。そこにタンパク質の溶液を流すと、PDMSがマスクになり穴の部分にだけ溶液が浸透するので、穴のあったところだけタンパク質が基板と接触する。過剰な溶媒はこのシートを剥がすと共に除去されるので非特異的吸着が防がれる。溶液が乾くことがないのでタンパク質が活性を保持したままで固定化される。

## 2.1 PDMS sieveの製作

図2aに製造工程を、図3に製作したPDMSモールドとPDMS sieveの写真を示した。シリコンウェハ (Si) の表面を熱酸化し ( $\text{SiO}_2$ )、穴の部分の  $\text{SiO}_2$  を BHF でパターニングした。  $\text{SiO}_2$  をマスクとして 22% TMAH, 75°C で異方性エッチングを行い、ピラミッドの形に穴を掘った。その後、Si基板を  $\text{CHF}_3$  プラズマで処理し、PDMSで型取りして、ピラミッド型のPDMSモールドを製作した。

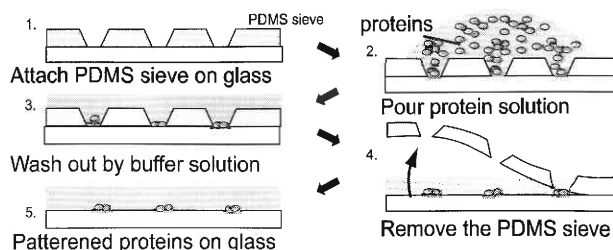


図1 Sequence of protein patterning using the PDMS perforated structure (PDMS sieve). To avoid the trapping of air bubble at the holes during the pouring process, the buffers are degassed in advance. The PDMS sieve is removed after washing with the buffer solution.

\*山崎製パン(株)民間等との共同研究員

\*\*東京大学生産技術研究所 物質・生命部門

\*\*\*東京大学生産技術研究所 マイクロメカトロニクス国際研究センター

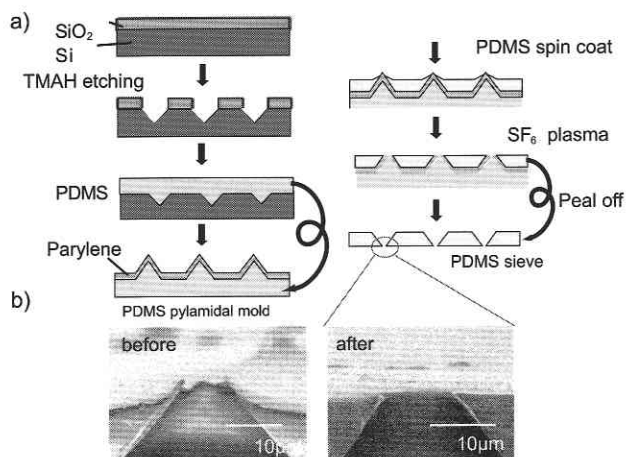


図2 a) Fabrication process of the PDMS sieve. The sieve can be formed by spin-coating PDMS on the pyramidal mold. b) Close-up view of the smaller side of the aperture before/after  $\text{SF}_6$  plasma treatment.

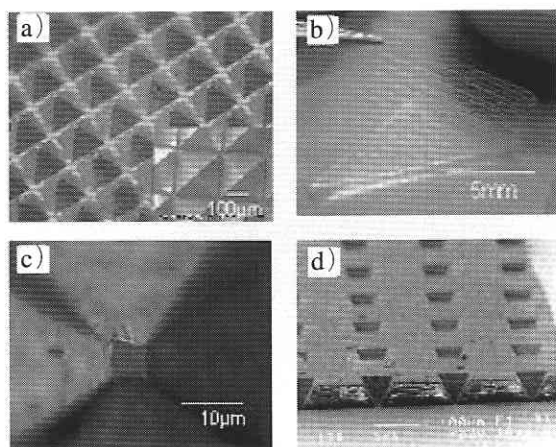


図3 a) Array of PDMS pyramids mold. b) PDMS sieve. c) Close up view of a square hole from the larger opening. d) An SEM photograph of the sieve with its cross-section.

この上に PDMS をそのままのせて硬化させても、PDMS 同士が結合してしまい離れなくなる。そのため、ここで PDMS モールドの上にパリレンを  $0.5 \mu\text{m}$  程度蒸着し、その上から硬化剤と 10 : 2 で混合した PDMS をスピコートした。しかし、スピコートしただけでは穴を開けたい山の先端にも薄く PDMS 膜が残ってしまうため、 $\text{SF}_6$  プラズマを当てることにより、先端に残った PDMS を取り除いた (図 2 b)。これを裏返して、上部 (入り口) が広く、ガラスとの接触面 (出口) が小さい穴を実現した。

## 2.2 試薬の調整

蛍光アルブミン (FITC-albumin, Bovine) はシグマ社製

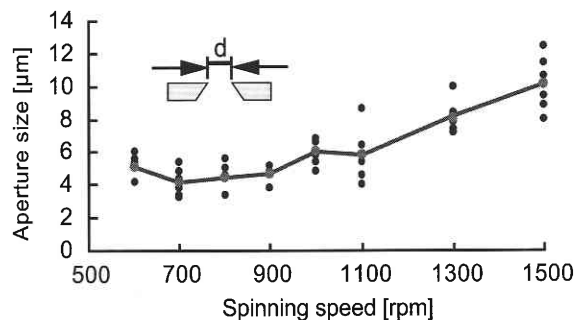


図4 Dependency of the aperture size on the spin-coating speed.

の、マイクロピーズは molecular probe 社製のものを使用した。F<sub>1</sub>-ATPase は、大腸菌に組み込んで発現させた好熱菌由来のものをアフィニティーカラム、HPLC を用いて精製し、ビオチン化させたものを使用した。

## 2.3 スピコートによる穴の大きさの調整

PDMS が硬化するまでの時間と PDMS の硬さにより多少のばらつきはあるが、PDMS をモールドにスピコートする速度を変えることによって、その穴の大きさをコントロールすることができた。図 4 に、ピラミッド型モールドの高さが約  $100 \mu\text{m}$  であるときのスピコートのスピードと穴のサイズを示した。回転速度が  $600 \text{ rpm}$  以下のときは膜の厚みが  $100 \mu\text{m}$  程度なので穴が開かなかった。 $600\text{--}1100 \text{ rpm}$  程度まででは  $10 \mu\text{m}$  以下の小穴 (最小  $3 \mu\text{m}$  以下) を開けることができた。 $1500 \text{ rpm}$  以上の速度になると穴の大きさは  $20 \mu\text{m}$  以上になり、厚さも  $50 \mu\text{m}$  程度まで薄くなる。あまり薄すぎるとその後の過程における操作性がよくないので、 $1000 \text{ rpm}$  程度の速度で調整した PDMS sieve を用いることとした。

## 3. 結果および考察

### 3.1 蛍光タンパク質のパターニング

PDMS sieve を用いて蛍光標識したアルブミンを、上記の方法でパターニングした。小さな穴に水溶液を満たそうとするときに、穴の中に空気が入ってしまい穴に導入できないので、あらかじめ溶液を脱気し溶け込んでいる空気を少なくすることで、穴の中の空気をその溶液に吸収させ導入した。

蛍光の散乱により実際よりも大きな範囲に広がって見えるが、 $5 \mu\text{m}$  以下のサイズにパターニングされた。図 5, a にパターンした写真を、b に AA' のラインで切った蛍光強度のグラフを示した。穴の部分にだけ蛍光アルブミンがきれいにパターニングされたことがわかる。これより、この方法で周囲に非特異的吸着がなくパターニングできるこ

研 究 速 報

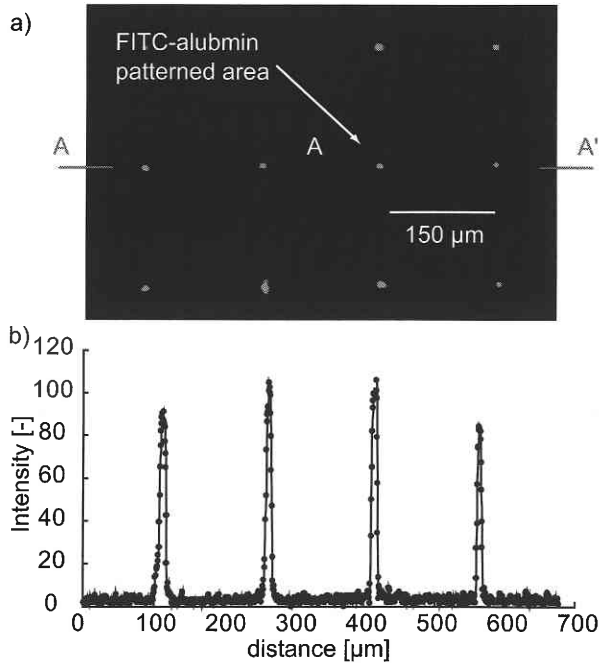


図5 Protein patterning test. a)Fluorescent image of FITC-albumin patterned on a glass using the PDMS sieve. b)The intensity distribution along the line AA' shows that the non-specific binding is not observed after peeling off the sieve.

とが確認された。

3.2 活性のある酵素のパターニング

F<sub>1</sub>-ATPase は、ミトコンドリア内膜に存在する ATP 合成酵素の一部であり、それ単独で ATP を加水分解する活性を持つ酵素である。この酵素は ATP を加水分解する際にそれ自身が回転している生体分子モーターであることがわかっている<sup>8)</sup>。これを利用して PDMS sieve を用いてパターニングしたタンパク質が、活性を保持したままの状態であることを確かめた。

F<sub>1</sub>-ATPase には、Ni-NTA で処理したガラス基板に固定できるような His タグを導入してあり、上記の方法で溶液を流すことにより、それを介して基板上に固定することができる。また、この酵素の大きさは 10 nm 程度なので、光学顕微鏡で回転を可視化するためにビオチンを導入し、ストレプトアビジンで修飾されたビーズを結合できるようにしてある。F<sub>1</sub>-ATPase とストレプトアビジンビーズ溶液を流して結合させた後、過剰の酵素とビーズを洗い流す。穴の中にパターンされているのを確認した後、ここに ATP を導入する。ここで F<sub>1</sub>-ATPase が活性を保って入れれば回転が観察される。

図6に、このときの F<sub>1</sub>-ATPase の回転の連続写真と模式図を示した。この状態で回転が観察され、活性を保持した

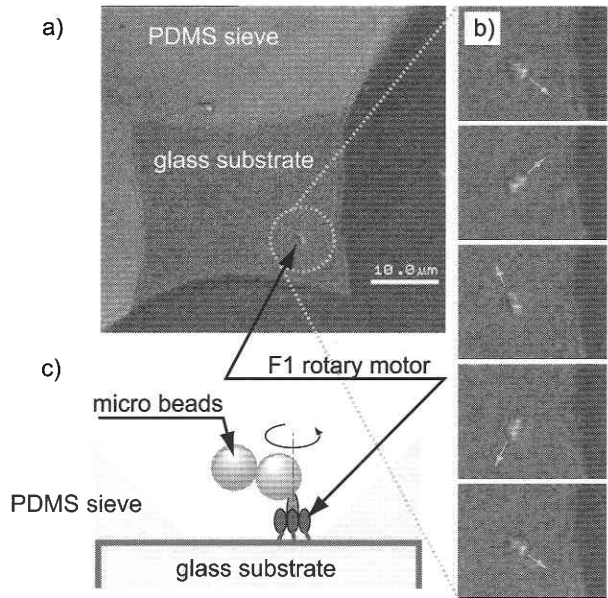


図6 a)Rotating F<sub>1</sub>-ATPase protein immobilized in the opening of PDMS sieve. b)Sequential photographs of the Rotational motion, at 0.13 sec. c)Cross-sectional schematic of the F<sub>1</sub>-ATPase rotation.

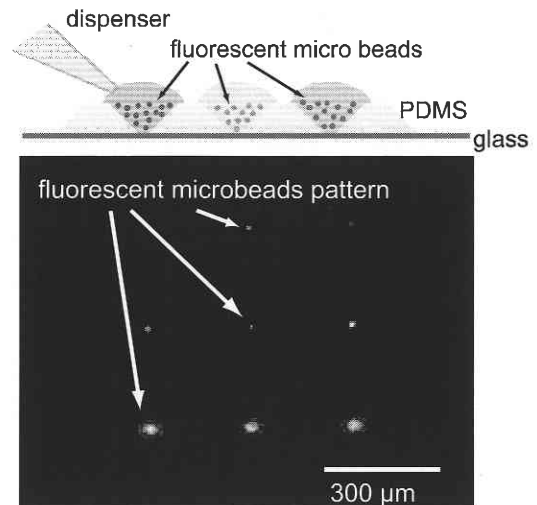


図7 Selective patterning of micro-beads with three different fluorescent (Red, Green and Blue). The photo was taken after the PDMS sieve removal.

ままの酵素をパターニングできることが確認された。ここで示しているのは 20 μm 程度の大きさの穴であるが、実際には 5 μm 以下のサイズの穴にも、活性を保ったままのパターニングは可能であった。

3.3 選択的パターニング

このようなピラミッド型のモールドを利用し、入り口が

広く出口を小さくしたことにより、タンパク質アレイチップとしてさらに発展させることが可能であることが示唆された。

図7のように、Sieveの形をこのようにすれば、ある程度の大きさを持った水滴を、一つ一つの穴に混合しないように分配することができ、スポットされる部位は小さくすることができるため、ごく小さい領域にパターンすることが可能となる。つまり、一つ一つの穴に異なる種類のタンパク質溶液を導入し、一つの基板上に何種類ものタンパク質を同時にパターンニングすることができるのである。ここでは、3種類の異なる蛍光をつけたビーズを、同一基板上の $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$ のサイズにスポットすることに成功した。

#### 4. 結 論

本研究では、MEMS技術を用いて、ピラミッド形の微細な穴あき構造を持つPDMS薄膜 (PDMS sieve) を作成する方法を確立した。その薄膜を用いて溶液中のタンパク質をパターンニングし、その状態で酵素活性のあることを確認した。また、このPDMS sieveを使うことにより、同一

基板上に活性のある異なる種類のタンパク質をアレイ状に分配できることが示唆された。

(2003年10月6日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) J. Aizenberg *et al*, "Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers." *Nature*, 398 (1999), 495-498
- 2) G. MacBeath *et al*, "Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination." *Science*, 289 (2000), 1760-1763
- 3) T. Kodadek, "Protein microarrays: prospects and problems." *Chemistry & Biology*, 8 (2001), 105-115
- 4) A. S. Blawas *et al*, "Protein patterning." *Biomaterials*, 19 (1998), 595-609
- 5) R. J. Jackman *et al*, "Fabrication of submicrometer features on curved substrates by microcontact printing." *Science*, 269 (1995), 664-666
- 6) E. Delamarche *et al*, "Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks." *Science*, 276 (1997), 779-781
- 7) R.S. Kane *et al*, "Patterning proteins and cells using soft lithography." *Biomaterials*, 20 (1999), 2363-2376
- 8) H. Noji *et al*, "Direct observation of the rotation of  $F_1$ -ATPase." *Nature*, 386 (1997), 299-302