

集積化マイクロチップにおける蛋白質の生体外並列合成

Parallel Cell-free Protein Synthesis on an Integrated Microchip

山 本 貴富喜*・野 島 高 彦**・藤 井 輝 夫*

Takatoki YAMAMOTO, Takahiko NOJIMA and Teruo FUJII

1. は じ め に

近年、キャピラリー電気泳動装置の発達による DNA シーケンシングの高速化に伴い、膨大な量の遺伝子データが蓄積されつつある。さらには、化学分析や化学反応等の装置を 1 チップ上に微細化・集積化して処理の高精度化・高速化をめざす μ -TAS (micro total analysis system)^{1,2)} や DNA チップ技術³⁾ の開発により、シーケンシングの高速化に一層の拍車がかかっている。一方、基礎研究もさることながら、医薬品などへの応用をふまえた遺伝子解析に実際に必要とされるのは遺伝子にコードされているタンパク質の機能や構造であり、ある組織に含まれる(発現している)全タンパク質をとらえようとするプロテオーム解析は、ポストゲノムシーケンスをふまえた次世代のタンパク質解析として脚光を浴びている。しかしながら、タンパク質は翻訳後修飾、立体構造の変化、複合体形成など、単に塩基配列からでは解析不能な多種多様な構造変化をする事が知られており、単に塩基配列だけから翻訳産物であるタンパク質の機能の推定をする事が出来ない。そこで実際に DNA からタンパク質を翻訳して、その構造や機能を解析することがタンパク質の役割や関連物質の機能を明らかにする上で極めて重要となる。

遺伝子からタンパク質を精製するためには、大腸菌などの菌体に遺伝子を組み込んで作らせる遺伝子組換えによる方法が一箱的であるが、菌体を培養するのに膨大な手間と時間が必要とされる。これに対し細胞を模した人工の化学反応容器を作り、この中でタンパク質を合成する無細胞タンパク合成系は、煩雑な菌体の培養をすることなく、かつ反応に関わる物質の濃度や温度などの反応条件を制御しながら高効率で塩基配列としての遺伝情報を実際にタンパク質として手に入れることの出来る有用な手法である^{4,5)}。

しかしながら他の生化学反応系と同様、少量の試料を扱う事による実験結果の低再現性や低操作性といった障害があり未だ一般的な手法には至っていない。こうした問題を解決するため、本研究ではマイクロマシニングを用いて微量の試料を高効率で反応させ、同時に反応状態を計測・分析・制御出来るようなタンパク質合成用マイクロリアクタの開発を行うことにした。

図 1 に本研究で開発したマイクロリアクタを模式的に示す。マイクロリアクタは流路や反応チャンバを作り込んだ PDMS (polydimethylsiloxane) チップと、ガラス基板チップから構成されるハイブリッド構造となっている。ガラスチップ上には、薄膜状の透明導電体 ITO (Indium Tin Oxide) を材料とするヒータと温度センサが形成されているので、加熱ならびに温度制御を同時に行うことが出来る。また

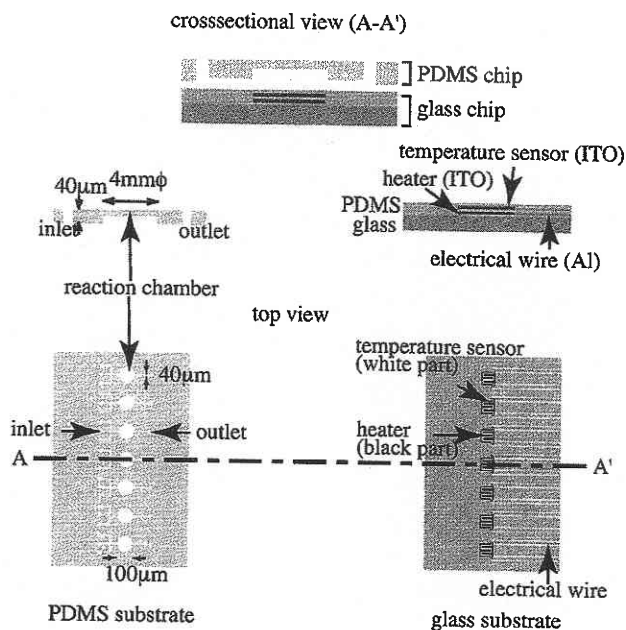


図 1 ハイブリッドマイクロリアクタ

*東京大学生産技術研究所 海中工学研究センター

**協力研究員 (早稲田大学理工学総合研究センター)

PDMS, ITO, ガラス全てが透明な材質なので反応の様子の透過光や蛍光観察が可能である. このようなハイブリッド構造の最大の利点は, 材料費や製作コストが安価な PDMS チップ部分をディスプレイとし, 比較的ファブリケーションに手間とコストのかかるガラスチップ部分に関しては洗浄して繰り返し使用出来る事にある. このような PDMS チップのディスプレイ化により, クロスコンタミネーションの確率が低く, 複雑な温度制御機構を含みながらもコスト的に安いディスプレイシステムを構築する事が出来る. 以後, 本論文ではこのような構造のマイクロリアクタを, ハイブリッドマイクロリアクタ (HMR: Hybrid Micro Reactor) と呼ぶ.

以下では, HMR の作製方法, および蛍光タンパク質を用いた HMR でのタンパク質の合成を実証したのでここに報告する.

2. ハイブリッドマイクロリアクタの作製方法

2.1 PDMS チップの製作方法

図 2 A に PDMS チップの製作手順を示す. まずシリコンウェハ (同図 a) 上に, フォトレジスト (EPON SU-8-50) をパターニングして, PDMS チップの流路や反応チャンバの鋳型となる凸型構造を作製する (同図 b). 次にモールド後の PDMS のリリースを良くするため, 鋳型を RIE チャンバ内の CHF_3 プラズマ雰囲気中に静置し, 表面にフルオロカーボン層を形成する (同図 c). 主剤: 重合剤 = 10:1 の割合で混合した未重合の PDMS (Dow Corning, Sylgard 184) を鋳型上に流し込み, 90°C で一時間の熱硬化後 (同図 d), PDMS を鋳型から剥がし取り, サンプルの注入・排出ポートを穴空けする (同図 e).

製作した PDMS チップの拡大写真を図 3 b) に示す. 反応チャンバの直径は 4 mm で高さ約 $40\ \mu\text{m}$, 容積にして約 $1\ \mu\text{l}$ である. 流路の幅と高さはそれぞれ $100\ \mu\text{m}$ と $40\ \mu\text{m}$ である. 外部との反応溶液のやりとりをするために, 3つの試薬注入口と1つの排出口を設けてあり, その直径は共に 1 mm である. HMR 全体の寸法は $76\ \text{mm} \times 52\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$ である.

2.2 ガラスチップ(ヒータ・温度センサチップ)の製作方法

図 2 B にヒータ・温度センサチップの作製方法を示す. まずガラス基板上に厚さ 500 nm の ITO (Indium Tin Oxide) 膜をスパッタにより着膜し (同図 a), フォトリソグラフィとウェットエッチングを用いて ITO をヒータの形状にパターニングする (同図 b). 次にヒータへの電力供給用の電気配線となる Al を真空蒸着により着膜し, これも ITO と同様の手法をもってパターニングする. 2層構造と

なるヒータと温度センサの電氣的絶縁のため, 基板上に厚さ約 300 nm の SiO_2 層をスパッタにより形成し, さらに温度センサとなる厚さ 500 nm の ITO をスパッタしてパターニングする (同図 c). ヒータ用の電気配線は, 配線での発熱を最小限にするため ITO より低抵抗の Al を使用したが, 温度センサに関しては電気配線も ITO で行った. 最後に, 基板表面の保護層として厚さ約 500 nm の SiO_2 をスパッタにより着膜する (同図 d).

図 3 a) は, ガラスチップの拡大写真である. 図中で灰色の蛇行して見えている部分が温度センサで, センサに接続している幅広の半透明の部分が ITO で作製した電気配線である. 透明であるため図中では観察が困難であるが, 温度センサ下部にヒータが配置されており, 白い太い線がヒータに接続されている Al の電気配線である.

両方の基板が完成の後, PDMS 基板を反応チャンバがヒータ, 温度センサの直上にくるように位置合わせしながらガラス基板上に張り付け, 反応チャンバと流路構造をガラスチップで密閉してチャンネル構造を形成する (図 2 C). PDMS は平坦な表面上に対して物理的な自己接着性があるため, 特別な接合過程を必要せず簡単に接合可能である. 接合後の引き剥がしも容易で, 剥がれた後に PDMS の一

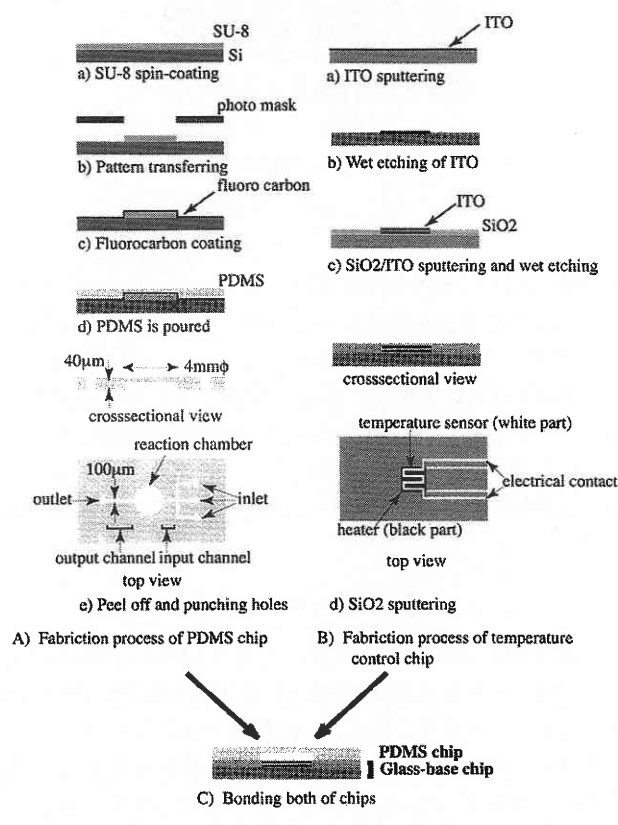


図 2 HMR の製作プロセス

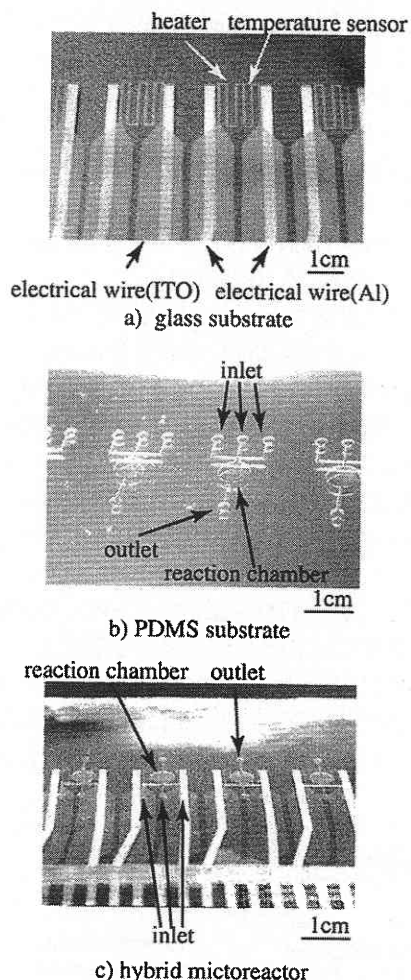


図3 HMRの写真

部分が基板上に吸着したまま残る事もない。接着力に関しては定量的な測定を行っていないが、本研究において接着部が剥がれてリークが生じる事はなかった。図3(c)は完成したHMRの拡大図で、各部の配置、およびヒータ、温度センサ、反応チャンバ等の全ての構成要素が光学的に透明である事が確認出来る。本研究では7つのマイクロリアクタを集積したチップを用いて、以後のタンパク合成実験に使用した。

3. 実験および考察

本研究では、蛍光タンパク質を合成する転写・翻訳反応をマイクロリアクタで行い、合成された蛍光タンパク質からの蛍光量をモニタすることによって反応の定量化を行った。

蛍光タンパク質の遺伝子としては、緑色蛍光を発するGFPuv (6089-1, Clontech) と、青色蛍光を発するpBFP 2 (6038-1, Clontech) を使用した。これら2種類の遺伝子

を、それぞれあらかじめT7プロモーターのバインディングサイトと共にpUC 19のマルチクローニングサイトに導入したものを発現ベクターとして実験に使用した。

観察は全て蛍光顕微鏡下で行われ、HMRは顕微鏡のステージ上に設置される。各種試薬は、HMRの各注入口にシリコンチューブで接続されたマイクロシリンジにより供給される。HMR内の蛍光強度は、顕微鏡に設置した超高度度のSITカメラ (Hamamatsu Photonics K.K.) で測定し、画像処理によってリアクタ内の蛍光強度を平均化して蛍光量のデータとした。

HMRの温度制御は、ITOで形成した抵抗温度センサからの信号を、ヒータに印加する直流電圧にフィードバックする事により行った。フィードバックサイクルは10 msで、計測制御用ソフトウェアのLabView (National Instruments Co.) を用いたPID制御により、反応至適温度の37℃に維持した。温度制御能は、室温から37℃まで加熱する際の加熱速度は約20℃/sec.で、定温状態での温度誤差は±0.4℃と、高速・高精度を両立した温度制御を実現した。

蛍光タンパク質ベクターとその合成反応に必要な要素をそれぞれマイクロシリンジでHMRに注入し、37℃で一定時間保温した後に励起光を照射したところ、2種類の蛍光タンパク質にそれぞれ固有の蛍光が観測された。

図4(a)は合成開始前、図4(b)～(h)は7つあるリアクタのチャンネル1番から7番で同時に合成を2時間行った際の反応チャンバの写真である。奇数番のチャンネルはGFPuvを合成した結果で、偶数番のチャンネルはpBFPを合成した結果である。反応開始前は、同図(a)のように反応チャンバの内外部で蛍光強度に差異は見られない。これに対し、合成を2時間行った同図(b)～(h)では、反応チャンバ内の蛍光強度がチャンバ外よりも強くなっている。蛍光タンパク質がHMR内で合成されたことが明らかとなった。また偶数番および奇数番の各リアクタで蛍光強度のばらつきが見られないことから、どのチャンネルのリアクタでも均一に反応が行われており、集積化によって各リアクタ間に個体差が生じていないことが確認された。

GFPuvを合成中の反応チャンバ内の蛍光強度の時間変化をプロットした結果が図5であり、時間と共に蛍光強度が上昇、すなわちGFPuvが合成されていく様子が分かる。図5をみると、合成開始から30分程は蛍光強度の変化が見られない。これはGFPuvが合成終了後に発色団を形成するためのフォールディングや翻訳後修飾に必要とする時間を示すものと考えられる。合成開始から2時間程度で蛍光強度が飽和しているが、これはチャンバ内に存在するアミノ酸などのタンパク質を合成するのに必要な要素を使い

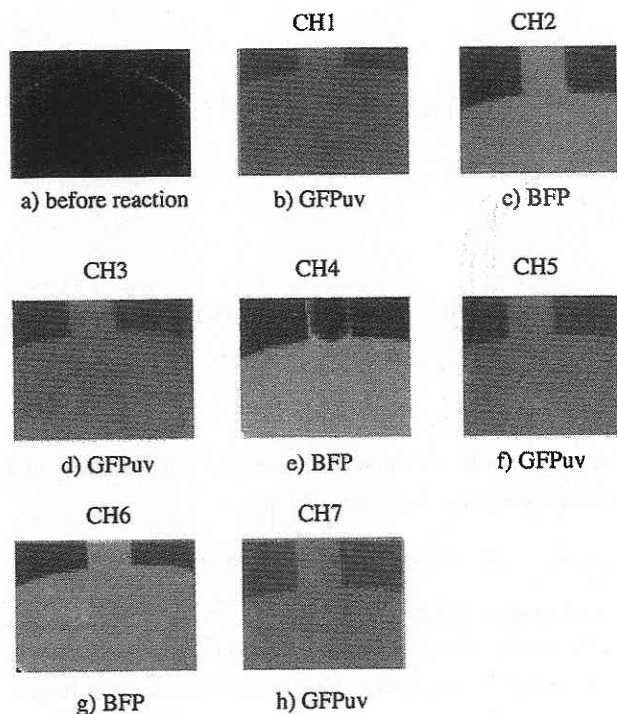


図 4 合成された蛍光タンパク質

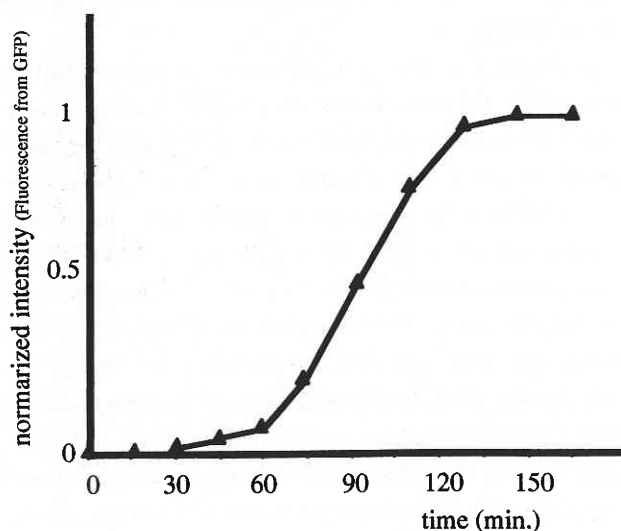


図 5 HMR 内の蛍光強度の時間変化

尽くしたため、合成が停止したためと考えられる。

同様のタンパク質合成を菌体培養を用いた手法で行う場合、1) 遺伝子の導入、2) 培養、3) 多段の分離・精製プロセスを経て、合成したタンパク質を確認するため、最低でも数日の作業が必要となる。これに対し、本マイクロリアクタでは 1) と 2) にかかる時間が大幅に短縮出来、かつタンパク質の観測は合成反応中に行うことが出来るので、HMR を使用すれば作業の簡素化と時間の大幅な短縮化が可能であることを実証した。

4. 結 論

材料が安価で製作が容易な PDMS チップを使い捨て使用にすることにより、温度制御機構を含みながらもディスプレイ可能な用途に使用可能な、ハイブリッド構造のマイクロリアクタ (HMR) を提案し試作した。HMR の温度制御能は、約 20°C/sec. の加熱速度、温度誤差 ± 0.4°C の高速・高精度を両立する事が出来た。また、HMR で蛍光タンパク質の遺伝子を組み込んだベクターの転写・翻訳反応に成功し、各リアクタで個体差のない、均一なリアクタの集積化に成功した。

近い将来はリアクタ自体に合成産物の検出機構や、ポンプやバルブといったメカニカルな要素を組み合わせ、外部からの送液や観察装置を必要とせずにチップ単体での動作が可能なシステム構築を目指す予定である。また本装置にファンやペルチェ素子を組み合わせれば、加熱のみならず冷却も可能となり、冷却を必要とする PCR 反応など、適用できる化学反応の範囲が広がるものと期待される。

参 考 文 献

- 1) A. Van den Berg and P. Bergveld (Eds.): "Micro Total Analysis Systems", Kluwer Academic Publishers, 1995.
- 2) A. Manz *et al.*: "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis in a chip", *J. Chromatography*, 593, (1992) pp. 253-258.
- 3) 村松正明 他: DNA マイクロアレイと最新 PCR 法, 秀潤社 (2000).
- 4) T. Nojima, T. Fujii, *et al.*: "Cell-free protein synthesis in a micro-fabricated reactor", *Bioprocess Engineering* 22 (2000) pp. 13-17.
- 5) T. Fujii, K. Hosokawa, *et al.*: "Development of a Microfabricated Biochemical Workbench-Improving the Mixing Efficiency", *Proceedings of Micro Total Analysis Systems'98, Banff* (1998) pp. 173-176.