

マイクロチャネル内壁へのタンパク質のパターニング

九州大学大学院工学研究院応用化学部門 中嶋 秀

マイクロチップを利用した分析法は、少ない試薬量でハイスループットな分析が可能であることから、生化学分析に広く用いられるようになってきた。マイクロチップを用いて生化学分析を行うためには、DNA や酵素・抗体などの機能性タンパク質をマイクロチャネル内に固定する必要がある。固定化方法としては、マイクロビーズを充填する方法、物理吸着あるいは化学修飾によりマイクロチャネル内壁に直接固定する方法など数多く報告されている。しかし、マイクロチャネル内の特定の位置にタンパク質を固定化した例は少ない。

Huber らは温度応答性高分子と微細なヒーターを組み込んだマイクロチップを用いて、タンパク質をマイクロチャネルの特定の位置に固定する方法を開発した<sup>1)</sup>。本法はチップの温度を制御することにより、自在にタンパク質を吸着または脱着させることが可能であり、タンパク質の前濃縮や分離に有用であると考えられる。

一方、光化学反応を利用した固定化法も開発されている。Holden らは、Biotin-4-fluorescein が Ar<sup>+</sup>/Kr レーザー光 (488nm)の照射によりマイクロチャネル表面のFibrinogen単分子層に吸着することを利用して、2種類の酵素を1つのマイクロチャネル内に固定した<sup>2)</sup>。また、Balakirev らはBenzophenoneを用いてタンパク質をガラスキャピラリー内に固定する方法を開発した<sup>3)</sup>。著者らは、一方にアジド基を他方にスクシンイミドエステル基をもつ光架橋剤を用いて、マイクロチャネル内壁にグルコースオキシダーゼと西洋ワサビペルオキシダーゼの区画を作製し、2ステップの酵素反応を原理とするマイクロチップグルコースセンサを開発した<sup>4)</sup>。

最近、Kaji らは電気化学的手法によりタンパク質をマイクロチャネル内の特定の位置に固定する方法を開発した<sup>5)</sup>。そのスキームを Fig.1 に示す。まず、マイクロチャネル上壁に白金電極を集積したマイクロチップのチャンネル壁面に Polyethyleneimine (PEI) と Heparin を吸着させる。次に、チャンネルに KBr 溶液を満たして、電極に 1.7 V (vs Ag/AgCl) の電位を印加すると、HBrO が生成し、チャンネル下壁の PEI と Heparin が HBrO の酸化作用により脱離する。PEI と Heparin が脱離したチャンネル表面はタンパク質の吸着性に富むため、目的とするタンパク質をチャンネルに導入することにより、チャンネル下壁の電極に対応する部分だけに目的とするタンパク質を固定することができる。このようにして Cy3 標識 Protein A を固定したマイクロチャネルの蛍光像を Fig.2B に示す。図から明らかなように、マイクロチャネル下壁の電極に対応する部分のみに蛍光が観察され、Protein A の位置選択的な固定が確認された。

マイクロチップを用いる生化学分析において、多成分同時測定にはマルチチャンネル化が最も容易な選択である。しかし、実用に耐え得るようなマイクロチップに適した微小ポンプやバルブはまだ登場しておらず、現状では通常の周辺機器をチャンネル数だけ揃えるほかない。そのため、マルチチャンネル化はコストの増加と装置全体の大型化をもたらす。これに対して、1つのマイクロチャネル内に複数の種類のタンパク質をパターニングすれば、1台のポンプで多成分の同時測定が可能となる。本稿で紹介した固定化技術は、タンパク質の種類を変えることにより、医療・食品・

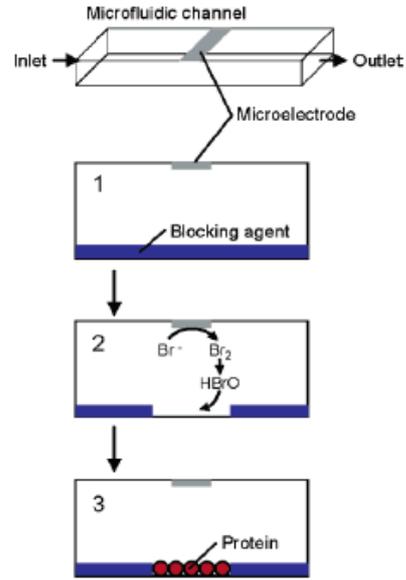


Fig. 1 Methodology for immobilization of proteins within a sealed microchannel.

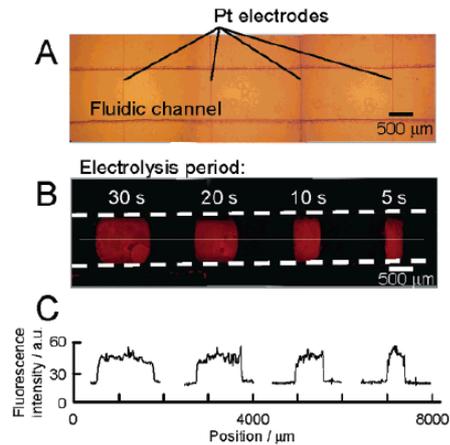


Fig. 2 (A) Microelectrode array fabricated at the upper wall of the microchannel. (B) Fluorescence image of the protein A-Cy3 patterned on the bottom wall of the channel. (C) Fluorescence intensity along the white line shown in (B).

環境など様々な分野における一斉分析に応用可能であり、今後の発展が期待される。

- 1) D. L. Huber, R. P. Manginell, M. A. Samara, B. Kim, B. C. Bunker, *Science*, **301**, 352-354 (2003).
- 2) M. A. Holden, S. Y. Jung, P. S. Cremer, *Anal. Chem.*, **76**, 1838-1843 (2004).
- 3) M. Y. Balakirev, S. Porte, M. V. Gris, M. Berger, J. P. Arié, B. Fouqué, F. Chatelain, *Anal. Chem.*, **77**, 5474-5479 (2005).
- 4) H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Nakagama, T. Shimosaka, K. Uchiyama, *Anal. Chim. Acta*, **562**, 103-109 (2006).
- 5) H. Kaji, M. Hashimoto, M. Nishizawa, *Anal. Chem.*, **78**, 5469-5473 (2006).