

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5334006号
(P5334006)

(45) 発行日 平成25年11月6日(2013.11.6)

(24) 登録日 平成25年8月9日(2013.8.9)

(51) Int.Cl.		F 1		
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		D
CO 7 K 17/12	(2006.01)	CO 7 K 17/12		
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 2	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00		F

請求項の数 13 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2004-197739 (P2004-197739)
 (22) 出願日 平成16年7月5日(2004.7.5)
 (65) 公開番号 特開2004-271540 (P2004-271540A)
 (43) 公開日 平成16年9月30日(2004.9.30)
 審査請求日 平成19年7月3日(2007.7.3)
 審判番号 不服2011-3328 (P2011-3328/J1)
 審判請求日 平成23年2月15日(2011.2.15)

特許権者において、権利譲渡の用意がある。

(73) 特許権者 506249347
 株式会社発明屋
 東京都中野区中野4丁目11番5-505号

(72) 発明者 佐藤 謙治
 東京都中野区中野2-13-21-303

合議体
 審判長 郡山 順
 審判官 安藤 倫世
 審判官 齊藤 真由美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテインチップ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

バクテリアセルロースのシートを表面が平らな基板の表面に固定することにより当該基板上に当該バクテリアセルロースのシートからなるバクテリアセルロース層を形成する工程と、

前記バクテリアセルロース層をレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

タンパク質を含む水溶液を前記アレイ要素に含浸させる工程と、
 を含むことを特徴とする、プロテインチップの製造方法。

【請求項2】

バクテリアセルロースのシートをレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

前記バクテリアセルロースアレイを表面が平らな基板の表面に固定する工程と、
 タンパク質を含む水溶液を前記アレイ要素に含浸させる工程と、
 を含むことを特徴とする、プロテインチップの製造方法。

【請求項3】

前記バクテリアセルロースはナタデココである、請求項1または2に記載のプロテインチップの製造方法。

【請求項4】

タンパク質を含む水溶液を含浸したバクテリアセルロースからなるプローブセルを基板

上に整然と並べて固定してなるプロテインチップを作成するためのプレートの製造方法であって、

バクテリアセルロースのシートを表面が平らな基板の表面に固定することにより当該基板上に当該バクテリアセルロースのシートからなるバクテリアセルロース層を形成する工程と、

前記バクテリアセルロース層をレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、
を含むことを特徴とする、プロテインチップ作成用プレートの製造方法。

【請求項 5】

タンパク質を含む水溶液を含浸したバクテリアセルロースからなるプローブセルを基板上に整然と並べて固定してなるプロテインチップを作成するためのプレートの製造方法であって、

バクテリアセルロースのシートをレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

前記バクテリアセルロースアレイを表面が平らな基板の表面に固定する工程と、
を含むことを特徴とする、プロテインチップ作成用プレートの製造方法。

【請求項 6】

前記バクテリアセルロースはナタデココである、請求項 4 または 5 に記載のプロテインチップ作成用プレートの製造方法。

【請求項 7】

バクテリアセルロースのシートを表面が平らな基板の表面に固定することにより当該基板上に当該バクテリアセルロースのシートからなるバクテリアセルロース層を形成する工程と、

前記バクテリアセルロース層をレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

前記アレイ要素上で生体細胞を培養する工程と、
を含むことを特徴とする、バイオリジカルチップの製造方法。

【請求項 8】

バクテリアセルロースのシートをレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

前記バクテリアセルロースアレイを表面が平らな基板の表面に固定する工程と、
前記アレイ要素上で生体細胞を培養する工程と、

を含むことを特徴とする、バイオリジカルチップの製造方法。

【請求項 9】

バクテリアセルロースのシートを表面が平らな基板の表面に固定することにより当該基板上に当該バクテリアセルロースのシートからなるバクテリアセルロース層を形成する工程と、

前記バクテリアセルロース層をレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

前記アレイ要素上に生体組織標本（ティッシュ）を載せ置く工程と、
を含むことを特徴とする、バイオリジカルチップの製造方法。

【請求項 10】

バクテリアセルロースのシートをレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

前記バクテリアセルロースアレイを表面が平らな基板の表面に固定する工程と、
前記アレイ要素上に生体組織標本（ティッシュ）を載せ置く工程と、

を含むことを特徴とする、バイオリジカルチップの製造方法。

【請求項 11】

バクテリアセルロースのシートを表面が平らな基板の表面に固定することにより当該基板上に当該バクテリアセルロースのシートからなるバクテリアセルロース層を形成する工

10

20

30

40

50

程と、

前記バクテリアセルロース層をレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

糖鎖を含む水溶液を前記アレイ要素に含浸させる工程と、
を含むことを特徴とする、バイオロジカルチップの製造方法。

【請求項 1 2】

バクテリアセルロースのシートをレーザービームにより切断することにより整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、

前記バクテリアセルロースアレイを表面が平らな基板の表面に固定する工程と、

糖鎖を含む水溶液を前記アレイ要素に含浸させる工程と、
を含むことを特徴とする、バイオロジカルチップの製造方法。

10

【請求項 1 3】

前記バクテリアセルロースはナタデココである、請求項 7 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のバイオロジカルチップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プローブ生体分子と生体由来のターゲット分子との相互作用を観察することによりターゲット分子の同定や解析等を行う技術に関し、特に、タンパク質をプローブとして少なくとも一部に保持したプロテインチップとそれを製造するための技術に関する。

20

【背景技術】

【0002】

ヒト・ゲノムシーケンスの解読が終了し、加えて DNA チップ技術（マイクロアレイ法）が普及したことに伴い、ゲノム DNA の発現解析が急速に推し進められ、大量のゲノム情報が蓄積されつつある。

【0003】

しかし、生体内において、細胞の機能はタンパク質が他のタンパク質や低分子、DNA などと相互作用したり、リン酸化などの翻訳後修飾を受けたりすることにより調節・維持されているので、直接的に細胞機能にかかわるタンパク質を解析することが必須である。

【0004】

4 種類の塩基から構成される DNA とは異なり、タンパク質は 20 種類のアミノ酸から構成され、1 次構造から 4 次構造までの高次構造を有するため、高次構造まで含めたその存在種は膨大な数にのぼる。

30

【0005】

また、DNA における PCR のようなタンパク質増幅方法がなく、発現量の少ない制御タンパク質などを高感度に検出するのは難しいため、異なる幾つかの分析手法を組み合わせる必要があり、各手法にも熟練を要する操作が要求されるなど、タンパク質の研究は労力と時間を要するものである。そこで、生体内で発現しているタンパク質を短時間で同定し、または相互作用を解析するハイスループットシステムの開発が切望されている。

40

【0006】

このような背景のもと、網羅的解析が可能である DNA チップ技術の利点を、プロテオーム解析に応用することが試みられている。そのひとつとしてプロテインチップ（プロテインアレイとも呼ばれる）を用いた解析方法がある。

【0007】

プロテインチップには大きく分けて 2 つのタイプがある。1 番目のタイプは、基板表面に化学処理を施したものの、すなわち基板表面に疎水性やイオン交換性、金属イオンなどを導入して性質の異なる多数のスポットを形成し、これらのスポットへのタンパク質の物理化学的親和性の違いを利用して、タンパク質の発現解析や同定、精製に用いられる、ケミカルチップと呼ばれるものである。2 番目のタイプは、タンパク質や抗体、DNA など生

50

体分子を基板表面に固定し、タンパク質の生化学的親和性を利用して、相互作用するタンパク質やリガンドを探索するバイオリジカルチップがある。

【0008】

プロテインチップを用いた解析では、このような化学的もしくは生化学的修飾が施された多数のスポットにタンパク質を反応させた後、親和性を示さないタンパク質やその他の夾雑物を洗浄により取り除き、TOF-MS (Time OF Flight-mass Spectrometer、飛行時間型質量分析計) により、スポットに捕捉されたタンパク質の正確な分子量を測定することができる。

【0009】

プロテインチップは、多種・大量試料のタンパク質の発現解析や相互作用解析、さらには精製や同定、機能解析などへも応用が可能であり、プロテオーム解析を加速するためのプラットフォーム技術として期待されている。また、糖鎖の機能解析や細胞機能解析を目的とした、糖鎖チップや細胞チップの研究も進められており、ポストゲノム研究を支えるチップ技術として注目されている。(非特許文献1)

しかし、DNAチップ技術をプロテインチップにそのまま転用することはできない。DNAチップは乾燥した基板上にDNAやRNAを固定したものであるが、大多数のタンパク質は水溶液中でしか機能せず、乾燥した瞬間にその高次構造(立体構造)が損なわれてしまう。しかもタンパク質は一旦乾燥してしまったら水を与えても元に戻らない。このため、タンパク質をその本来の高次構造を保ったまま乾燥させて基板上に固定することはできない。この点がDNAとは大きく異なる。

【0010】

このような背景から、ペプチドやタンパク質を超分子ヒドロゲルでソフトに包み込んで活性を保ちつつ基板上に固定するセミウエットデバイス技術が開発された。この技術では、まず超分子ヒドロゲル化剤を緩衝溶液に加熱して溶かし、ガラスなどの基板上にスポットして冷やすことにより、ヒドロゲルのアレイを作る。そこにペプチドやタンパク質を打ち込んで、ペプチドやタンパク質のセミウエットアレイとする。この技術によれば、ペプチドやタンパク質が並んだアレイを簡単に作成することができる。(非特許文献2)

【非特許文献1】川合 知二監修、「ナノテクノロジー大辞典」、工業調査会、2003年12月25日、p853-854

【非特許文献2】浜地 格、他2名、超分子ヒドロゲルを利用したセミウエット型ペプチド/プロテインの開発、「Bioベンチャー」、羊土社、2004年4月20日、Vol.4 No.3、p42-43

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

非特許文献2のセミウエットデバイス技術で使用される超分子ヒドロゲル化剤は、新規に開発された人工合成剤である。

【0012】

本発明が解決しようとする課題は、超分子ヒドロゲル化剤のような人工合成剤を使用することなく、ペプチドやタンパク質をその活性を保った状態で基板上に固定し得るプロテインチップ技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記課題を解決するために、本発明は以下の手段を採用する。

【0014】

本発明にかかるプロテインチップの製造方法は、バクテリアセルロース層を基板上に形成する工程と、前記バクテリアセルロース層を整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、タンパク質(プローブ生体分子)を含む水溶液を前記アレイ要素に含浸させる(滴下する、スポットする)工程と、を含む。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明にかかるプロテインチップの別の製造方法は、バクテリアセルロースのシートを整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する工程と、前記バクテリアセルロースアレイを基板上に固定する工程と、タンパク質（プローブ生体分子）を含む水溶液を前記アレイ要素に含浸させる工程と、を含む。

【0016】

本発明にかかるプロテインチップの更に別の製造方法は、バクテリアセルロース層を基板上に形成する工程と、タンパク質（プローブ生体分子）を含む水溶液を前記バクテリアセルロース層上に整然と並べてスポットする工程と、を含む。

【0017】

本発明にかかるプロテインチップは、タンパク質（プローブ生体分子）を含む水溶液を含浸したバクテリアセルロースからなるプローブセルを基板上に整然と並べて固定してなる。

10

【0018】

本発明にかかる別のプロテインチップは、バクテリアセルロース層を基板上に形成するとともに、タンパク質（プローブ生体分子）を含む水溶液を前記バクテリアセルロース層上に整然と並べてスポットしてなる。

【0019】

本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートは、前記水溶液を含ませる前のバクテリアセルロースを基板上に固定してなる。

【0020】

本発明にかかるタンパク質保持方法は、バクテリアセルロースのフィブリル間に存在する水溶液中にタンパク質を浮遊させた状態で保持するようにしたことを特徴としている。

20

【0021】

ここで、「整然と並んだ」とは、ライン状、マトリクス状、ハニカム状といった一定の整列状態に規則正しく並んでいることを表している。バクテリアセルロース層のアレイ要素やプローブセルが一定の整列状態に規則正しく並んでいることにより、プローブセル（アレイ要素）のアドレッシングやプローブ生体分子水溶液の自動スポッティングが可能となる。

【0022】

本発明で使用するバクテリアセルロースとしてはナタデココが最適である。ナタデココは、食べることができるほど無害な素材である。ナタデココは、高い形状保持性能（強いコシ）を有している。ナタデココは、薄くスライスしたり細かくカットしたりするといった加工が容易である。ナタデココは、無菌状態に保てば長期保存も可能である。ナタデココは、特別な生産設備を必要とせず常温で簡単に培養できるので、生産コストが安い。ナタデココは、天然セルロースであるので自然環境に優しい。

30

【0023】

バクテリアセルロースは、天然のセルロース生産菌によって生産されたセルロースである。セルロース生産菌の例として、アセトバクター アセトサム (*Acetobacter acetosum*)、アセトバクター キシリナム (*Acetobacter xylinum*)、アセトバクター パスツリアナム (*Acetobacter pasteurianum*)、アセトバクター ランセンス (*Acetobacter rance* ns) 等の酢酸菌、サルシナ ベントキュリ (*Sarcina ventriculi*)、バクテリウム キシロイデス (*Bacterium xyloides*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属菌、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属菌等を挙げることができる。本発明で使用するバクテリアセルロースの生産菌としては、*Acetobacter aceti* var. *xylinum* が最も好ましい。*Acetobacter aceti* var. *xylinum* は、ナタと呼ばれる繊維質厚膜の生産菌としてフィリピン等で古くから利用されてきたバクテリアである。

40

【0024】

バクテリアセルロースは、セルロース成分に対して数倍～数百倍の重量の水分を保持できる。バクテリアセルロースは、三次元的に複雑に張り巡らされたフィブリルのネットを骨格として持つ。水分を含んだバクテリアセルロースは、その水分の大部分をフィブリル

50

ネットの網目内に保持する。タンパク質を含む水溶液をバクテリアセルロースに含浸させると、その水溶液の大部分はフィブリルネットの網目内に保持される。水溶液内のタンパク質は、フィブリルネットの網目内を充たす水溶液中に浮遊しているため、そのタンパク質本来の高次構造を保つ。

【0025】

したがって、本発明の製造方法によれば、バクテリアセルロース層を基板上に形成し、そのバクテリアセルロース層を整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工し、タンパク質を含む水溶液を各アレイ要素に滴下することにより、タンパク質をその活性を保ちつつ基板上に整然と並べて固定することができる。

【0026】

また、本発明の別の製造方法によれば、バクテリアセルロース層を基板上に形成し、タンパク質を含む水溶液を前記バクテリアセルロース層上に整然と並べてスポットすることにより、タンパク質をその活性を保ちつつ基板上に整然と並べて固定することができる。

【0027】

バクテリアセルロース層を基板上に形成する方法は幾つかある。その一例として、培養槽から取り出したバクテリアセルロース(ナタ)をシート状にスライスして基板に貼り付ける方法を挙げることができる。その際、バクテリアセルロース内に存在している生産菌由来のタンパク質やDNAなどは適切な処理剤を使用して除去しておくことが望ましい。バクテリアセルロース・シートは、乾燥させてからガラスなどの基板に貼り付けても、湿った状態のまま基板に貼り付けてもよい。貼り付けた基板上でバクテリアセルロース・シートを乾燥させてもよい。

【0028】

バクテリアセルロースを乾燥させる場合には、セルロース内のフィブリル同士の癒着を防止することが望ましい。その方法として、バクテリアセルロースの水懸濁液を凍結乾燥や溶剤置換乾燥することによって、乾燥時にフィブリル間に水素結合に由来する結合を生じさせないようにする方法がある。さらに、バクテリアセルロースを含有する水性懸濁液に水以外の第3成分を加えた後に脱水乾燥する方法(特開平09-165402)や、攪拌培養により製造されたバクテリアセルロースを緊張下で脱水乾燥し、得られたバクテリアセルロースを離解処理する方法(WO97/48730)などもある。

【0029】

バクテリアセルロース層を基板上に形成する別の方法として、バクテリアセルロースを基板上で直接培養する方法がある。基板にセルロース材料等の生体高分子を用い、その基板表面にセルロース生産菌に対して親和性を持つ物質からなるレールを形成しておけば、セルロース生産菌が当該レールに沿って走行しつつフィブリルを産生するため、配向性の高いセルロース膜を形成することができる。また、基板表面に多数のピット(小さな窪み)を整然と並べて形成しておき、各ピット内でバクテリアセルロースを直接培養してもよい。

【0030】

バクテリアセルロース層を整然と並んだアレイ要素からなるバクテリアセルロースアレイに加工する方法は幾つかある。たとえば、基板に貼り付けたシート状のバクテリアセルロースをレーザービーム等を使用してアレイ要素に切断・分割する方法を挙げることができる。基板に貼り付けたバクテリアセルロースをレーザービームで切断することにより、微細且つ精密に加工することができる。また、シート状のバクテリアセルロースを基板とは別の場所でアレイ要素に分割してから基板に貼り付けてもよい。

【発明の効果】

【0031】

本発明の製造方法によれば、超分子ヒドロゲル化剤のような人工合成剤を使用することなく、タンパク質をその活性を保った状態で基板上に固定したプロテインチップを製造することができる。

【0032】

本発明のプロテインチップによれば、タンパク質をその活性を保った状態で基板上に保持しているので、基板上のタンパク質と生体由来の分子との相互作用解析やスクリーニング等を正確に且つ効率良く実施することができる。

【0033】

本発明のプロテインチップ作成用プレートによれば、本発明のプロテインチップを容易に製造することができる。

【0034】

本発明のタンパク質保持方法によれば、バクテリアセルロースのフィブリル間に存在する水溶液中にタンパク質を浮遊させた状態で保持するようにしたので、タンパク質をその高次構造を壊すことなく活性を保った状態で基板上に保持できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

本発明を実施するための最良の形態について図面を参照して説明する。複数の図において共通の構成要素もしくは実質的に同一の構成要素については同一の符号を付してその説明を適宜省略する。

[プロテインチップの製造方法]

1.1 製造方法その1

1.1.1 構成

図1は本発明にかかるプロテインチップの製造方法の一例を示す製造工程図である。

【0036】

(1)基板洗浄工程：この工程では、ガラス基板1を洗浄して不純物を除去する。

【0037】

(2)バクテリアセルロース層形成工程：この工程では、バクテリアセルロース(BC)のシート2sをガラス基板1の表面に貼り付けることにより、バクテリアセルロースのシート2sからなるバクテリアセルロース層2をガラス基板1上に形成する。

【0038】

シート2sは、培養槽から取り出したバクテリアセルロース(ナタ)をシート状にスライスした物である。培養中にバクテリアセルロース内に存在していた生産菌の死骸や生産菌由来のタンパク質、DNA等は、バクテリアセルロースを清浄な水流中に置くことにより除去してある。水流だけでは生産菌の死骸等を除去できない場合は、バクテリアセルロースを適切な処理剤の溶液中に漬け込んだ後、水洗する方法が採られる。また、処理剤としては、タンパク質分解酵素、DNA分解酵素、希酸、アルカリ、次亜塩酸ソーダ、過酸化水素、界面活性剤(ラウリル硫酸ソーダ、デオキシコール酸、等)を挙げることができる。また、常温から200の範囲の加熱洗浄も有効である。

【0039】

(3)バクテリアセルロースアレイ形成工程：この工程では、バクテリアセルロース層2を、レーザービーム4で細かく縦横に切断することにより、マトリクス状に並んだアレイ要素3aからなるバクテリアセルロースアレイ3に加工する。レーザービーム4の照射ポイントを正確にコントロールできる自動微細加工装置(図示省略)を使用することにより、バクテリアセルロース層2をバクテリアセルロースアレイ3に精密に加工することができる。

【0040】

(4)クリーニング工程：この工程では、レーザービーム照射によって発生した塵(レーザービーム照射による燃え滓、灰などの粒)を水洗、送風、加振など何らかの方法により除去する。この工程をバクテリアセルロースアレイ形成工程と並行して実施してもよい。生産菌の死骸等の除去をこの工程で実施してもよい。

【0041】

(5)湿度調節工程：この工程では、バクテリアセルロースアレイ3の湿度(湿潤度、水分量)調節を行う。ここで、湿度調節の態様には、水分除去すなわち乾燥と水分添加とがある。乾燥とは、ほとんど水分を含まない程に乾いた状態だけでなく、生乾きの状態(

10

20

30

40

50

若干水分が残っている状態)や、水の中から取り出した直後よりも水分含有率が減少した程度の状態をも含む広い概念である。乾燥物に含まれる固形分(主にフィブリル)の重量に対して、水分量が約25%以下であれば、ほとんど乾いた状態といえる。

【0042】

バクテリアセルロースアレイ3を乾燥させる場合には、各アレイ要素3aを構成するセルロース内のフィブリル同士の癒着を防止する対策が講じられる。その方法として、バクテリアセルロースの水懸濁液を凍結乾燥や溶剤置換乾燥することによって、乾燥時にフィブリル間に水素結合に由来する結合を生じさせないようにする方法がある。さらに、バクテリアセルロースを含有する水性懸濁液に水以外の第3成分を加えた後に脱水乾燥する方法(特開平09-165402)や、攪拌培養により製造されたバクテリアセルロースを緊張下で脱水乾燥し、得られたバクテリアセルロースを離解処理する方法(WO97/48730)などもある。

10

【0043】

(6)プローブ生体分子固定工程:この工程では、タンパク質(レセプタ、ホルモン、酵素、抗体、等)を含む水溶液6を湿度調整したバクテリアセルロースアレイ3の各アレイ要素3aに滴下する。その際、互いに異なるタンパク質を含む複数種類の水溶液6を予め用意しておき、各アレイ要素3aに各々異なるタンパク質を含む水溶液6を滴下する。各アレイ要素3aに滴下された水溶液6は、そのアレイ要素3aを構成するバクテリアセルロースにしみ込む。その結果、滴下された各水溶液6中のタンパク質が各々のアレイ要素3a内に保持された状態でガラス基板1上に固定される。

20

【0044】

この工程において、各水溶液6の滴下ポイントおよび滴下量を正確にコントロール可能な自動滴下装置を使用することにより、各水溶液6をバクテリアセルロースアレイ3の各アレイ要素3aに正確に滴下することができる。また、各アレイ要素3a内に保持させるタンパク質の量は、各水溶液6中のタンパク質濃度および各アレイ要素3aへの水溶液滴下量をコントロール沸騰することにより自在に調節できる。自動滴下装置(スポッタ)として、スポット型DNAチップを製造する際に用いられる公知のアレイヤ(特表平10-503841、特表2002-507386、特表2003-515113、特表2004-512514、特開2003-156492、特開2003-344014、特開2004-045241、等参照)を利用することが可能である。バクテリアセルロースアレイ3を損傷しないようにするためには、非接触式スポッタを使用することが望ましい。ピンタイプのスポッタを使用する場合には、Spot-Pin-Over Travel値を最適化する必要がある。

30

【0045】

(7)後処理工程:以上の一連の工程により、タンパク質を含む水溶液6を含浸したバクテリアセルロース(アレイ要素3a)からなる多数のプローブセル3pをガラス基板1上にマトリクス状に配置して固定してなるプロテインチップ7が製造される(図5参照)。製造されたプロテインチップ7は、必要に応じて、合成樹脂製パッケージ(ケーシング)などに収められる。

1.1.2 作用・効果

40

バクテリアセルロースは、セルロース成分に対して数倍~数百倍の重量の水分を保持できる。バクテリアセルロースは、三次元的に複雑に張り巡らされたフィブリル2fのネット(フィブリルネット)を骨格として持つ(図2(a)参照)。水分を含んだバクテリアセルロースは、その水分の大部分をフィブリルネットの網目内に保持する。タンパク質5を含む水溶液6をバクテリアセルロースに含浸させると、その水溶液6の大部分はフィブリルネットの網目内に保持される(図2(b))。水溶液6内のタンパク質5は、フィブリルネットの網目内を充たす水溶液6中に浮遊しているため、その生体分子本来の立体構造を保つことができる。

【0046】

したがって、バクテリアセルロース層2をガラス基板1上に形成し、そのバクテリアセ

50

ルロース層 2 をマトリクス状に配置されたアレイ要素 3 a からなるバクテリアセルロースアレイ 3 に加工し、タンパク質 5 を含む水溶液 6 を各アレイ要素 3 a に滴下することにより、タンパク質 5 をその活性を保ちつつガラス基板 1 上にマトリクス状に配置して固定することができる。

【 0 0 4 7 】

このようにして製造されたプロテインチップ 7 を使用することにより、ガラス基板 1 上のタンパク質 5 と結合するタンパク質やその他の分子を効率良くスクリーニングすることができる。

【 0 0 4 8 】

上記の例では、マトリクス状に配置されたアレイ要素 3 a からなるバクテリアセルロースアレイ 3 を備えたプロテインチップについて説明したが、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるようにアレイ要素 3 a を配置することも可能である（図 6 参照）。

1 . 2 製造方法その 2

1 . 2 . 1 構成

図 3 は本発明にかかるプロテインチップの製造方法の別の例を示す製造工程図である。

【 0 0 4 9 】

(1) 基板洗浄工程：この工程では、ガラス基板 1 を洗浄して不純物を除去する。

【 0 0 5 0 】

(2) バクテリアセルロースアレイ形成工程：この工程では、バクテリアセルロース (B C) のシート 2 s (図 1 参照) を、レーザービーム 4 等を使用して細かく縦横に切断することにより、マトリクス状に並んだアレイ要素 3 a からなるバクテリアセルロースアレイ 3 に加工する。

【 0 0 5 1 】

(3) バクテリアセルロースアレイ固定工程：この工程では、バクテリアセルロースアレイ 3 を、洗浄したガラス基板 1 の表面に固定する。

【 0 0 5 2 】

(4) 湿度調節工程：この工程では、バクテリアセルロースアレイ 3 の湿度 (湿潤度、水分量) 調節を行う。

【 0 0 5 3 】

(5) プローブ生体分子固定工程：この工程では、タンパク質 (レセプタ、ホルモン、酵素、抗体、等) を含む水溶液 6 を湿度調整したバクテリアセルロースアレイ 3 の各アレイ要素 3 a に滴下する。その際、互いに異なるタンパク質を含む複数種類の水溶液 6 を予め用意しておき、各アレイ要素 3 a に各々異なるタンパク質を含む水溶液 6 を滴下する。各アレイ要素 3 a に滴下された水溶液 6 は、そのアレイ要素 3 a を構成するバクテリアセルロースにしみ込む。その結果、滴下された各水溶液 6 中のタンパク質が各々のアレイ要素 3 a 内に保持された状態でガラス基板 1 上に固定される。

【 0 0 5 4 】

(6) 後処理工程：以上の一連の工程により、タンパク質を含む水溶液 6 を含浸したバクテリアセルロース (アレイ要素 3 a) からなる多数のプロセル 3 p をガラス基板 1 上にマトリクス状に配置して固定してなるプロテインチップ 7 が製造される (図 5 参照) 。製造されたプロテインチップ 7 は、必要に応じて、合成樹脂製パッケージ (ケーシング) などに収められる。

1 . 2 . 2 作用・効果

バクテリアセルロースは、セルロース成分に対して数倍～数百倍の重量の水分を保持できる。バクテリアセルロースは、三次元的に複雑に張り巡らされたフィブリル 2 f のネット (フィブリルネット) を骨格として持つ (図 2 (a) 参照) 。水分を含んだバクテリアセルロースは、その水分の大部分をフィブリルネットの網目内に保持する。タンパク質 5 を含む水溶液 6 をバクテリアセルロースに含浸させると、その水溶液 6 の大部分はフィブリルネットの網目内に保持される (図 2 (b)) 。水溶液 6 内のタンパク質 5 は、フィブ

10

20

30

40

50

リルネットの網目内を充たす水溶液 6 中に浮遊しているため、その生体分子本来の立体構造を保つことができる。

【 0 0 5 5 】

したがって、バクテリアセルロースのシートをマトリクス状に配置されたアレイ要素 3 a からなるバクテリアセルロースアレイ 3 に加工してガラス基板 1 上に固定し、タンパク質 5 を含む水溶液 6 を各アレイ要素 3 a に滴下することにより、タンパク質 5 をその活性を保ちつつガラス基板 1 上にマトリクス状に配置して固定することができる。

【 0 0 5 6 】

このようにして製造されたプロテインチップ 7 を使用することにより、ガラス基板 1 上のタンパク質 5 と結合するタンパク質やその他の分子を効率良くスクリーニングすることができる。

10

【 0 0 5 7 】

上記の例では、マトリクス状に配置されたアレイ要素 3 a からなるバクテリアセルロースアレイ 3 を備えたプロテインチップについて説明したが、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるようにアレイ要素 3 a を配置することも可能である（図 6 参照）。

1 . 3 製造方法その 3

1 . 3 . 1 構成

図 4 は本発明にかかるプロテインチップの製造方法の更に別の例を示す製造工程図である。

20

【 0 0 5 8 】

(1) 基板洗浄工程：この工程では、ガラス基板 1 を洗浄して不純物を除去する。

【 0 0 5 9 】

(2) バクテリアセルロース層形成工程：この工程では、バクテリアセルロース (B C) のシート 2 s をガラス基板 1 の表面に貼り付けることにより、バクテリアセルロースのシート 2 s からなるバクテリアセルロース層 2 をガラス基板 1 上に形成する。

【 0 0 6 0 】

(3) 湿度調節工程：この工程では、バクテリアセルロース層 2 の湿度 (湿潤度、水分量) 調節を行う。

【 0 0 6 1 】

(4) プローブ生体分子固定工程：この工程では、タンパク質を含む水溶液 6 を湿度調整したバクテリアセルロース層 2 の上にマトリクス状にスポットする。

30

【 0 0 6 2 】

(5) 後処理工程：以上の一連の工程により、タンパク質を含む水溶液 6 をバクテリアセルロース層 2 上にマトリクス状にスポットしてなる、多数の検出スポット (プロブセル) 2 s p を有するプロテインチップ 8 が製造される (図 7 参照) 。製造されたプロテインチップ 8 は、必要に応じて、合成樹脂製パッケージ (ケーシング) などに収められる。

1 . 3 . 2 作用・効果

バクテリアセルロースは、セルロース成分に対して数倍～数百倍の重量の水分を保持できる。バクテリアセルロースは、三次元的に複雑に張り巡らされたフィブリル 2 f のネット (フィブリルネット) を骨格として持つ (図 2 (a) 参照) 。水分を含んだバクテリアセルロースは、その水分の大部分をフィブリルネットの網目内に保持する。タンパク質 5 を含む水溶液 6 をバクテリアセルロースに含浸させると、その水溶液 6 の大部分はフィブリルネットの網目内に保持される (図 2 (b)) 。水溶液 6 内のタンパク質 5 は、フィブリルネットの網目内を充たす水溶液 6 中に浮遊しているため、その生体分子本来の立体構造を保つことができる。

40

【 0 0 6 3 】

したがって、バクテリアセルロース層 2 をガラス基板 1 上に形成し、タンパク質 5 を含む水溶液 6 をバクテリアセルロース層 2 上にマトリクス状にスポットすることにより、タンパク質 5 をその活性を保ちつつガラス基板 1 上にマトリクス状に配置して固定すること

50

ができる。

【0064】

このようにして製造されたプロテインチップ8を使用することにより、ガラス基板1上のタンパク質5と結合するタンパク質やその他の分子を効率良くスクリーニングすることができる。

【0065】

上記の例では、検出スポット2spをマトリクス状に配置してなるプロテインチップについて説明したが、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるように検出スポット2spを配置することも可能である(図8参照)。

[プロテインチップ]

2.1 プロテインチップその1

2.1.1 構成

図5は本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す平面図である。このプロテインチップ7は、タンパク質を含む水溶液6を含浸したバクテリアセルロースからなる多数のプロブセル3pをガラス基板1上にマトリクス状に配置して固定してなる。このプロテインチップ7は、図1の一連の工程を経て製造された物である。

2.1.2 作用・効果

このプロテインチップ7の各プロブセル3p内には、タンパク質5が水溶液6中に浮遊した状態でその活性を保ちつつ保持されている(図2(a)、(b)参照)。

【0066】

したがって、このプロテインチップ7を使用することにより、ガラス基板1上のタンパク質5と結合するタンパク質やその他の分子を効率良くスクリーニングすることができる。

【0067】

上記の例では、マトリクス状に配置されたプロブセル3pからなるバクテリアセルロースアレイ3を備えたプロテインチップ7について説明したが、図6に示すように、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるようにプロブセル3p(3a)を配置したプロテインチップも本発明のプロテインチップに含まれる。

2.2 プロテインチップその2

2.2.1 構成

図7は本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す平面図である。このプロテインチップ8は、タンパク質を含む水溶液6をバクテリアセルロース層2上にマトリクス状にスポットしてなる多数の検出スポット2spを有する。このプロテインチップ8は、図4の一連の工程を経て製造された物である。

2.1.2 作用・効果

このプロテインチップ8の各検出スポット2sp内には、タンパク質5が水溶液6中に浮遊した状態でその活性を保ちつつ保持されている(図2(a)、(b)参照)。

【0068】

したがって、このプロテインチップ8を使用することにより、ガラス基板1上のタンパク質5と結合するタンパク質やその他の分子を効率良くスクリーニングすることができる。

【0069】

上記の例では、マトリクス状に配置された検出スポット2spを有するプロテインチップ8について説明したが、図8に示すように、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるように検出スポット2spを配置したプロテインチップも本発明のプロテインチップに含まれる。

2.3 プロテインチップその3

2.3.1 構成

図9(a)は本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す平面図、図9(b)は縦断面図である。このプロテインチップ9は、タンパク質を含む水溶液6を含浸したバクテ

10

20

30

40

50

リアセルロース（BC）からなる多数のプロブセル3pをガラス基板1上にマトリクス状に配置して固定してなる。プロテインチップ9のガラス基板1の表面には半球状の多数のピット1pがマトリクス状に形成されている。プロテインチップ9は、各ピット1p内でバクテリアセルロース（BC）を直接培養した後、各ピット1pのバクテリアセルロース（BC）にタンパク質を含む水溶液6を含浸させることにより製造された物である。すなわち、各ピット1p内の水溶液含有バクテリアセルロース（BC）がプロブセル3pを構成している。

2.3.2 作用・効果

このプロテインチップ9の各プロブセル3p内には、タンパク質5が水溶液6中に浮遊した状態でその活性を保ちつつ保持されている（図2（a）、（b）参照）。

【0070】

したがって、このプロテインチップ9を使用することにより、ガラス基板1上のタンパク質5と結合するタンパク質やその他の分子を効率良くスクリーニングすることができる。

【0071】

上記の例では、マトリクス状に配置されたピット1p内にプロブセル3pが形成されているが、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるように配置されたピット1p内にプロブセル3pを形成したプロテインチップも本発明のプロテインチップに含まれる。

[プロテインチップ作成用プレート]

3.1 基板その1

3.1.1 構成

図10は本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートの形態例を示す平面図である。このプロテインチップ作成用プレート11は、ガラス基板1上に、マトリクス状に配置された多数のアレイ要素3aからなるバクテリアセルロースアレイ3を形成してなる。このプロテインチップ作成用プレート11は、図1中の基板洗浄工程、バクテリアセルロース層形成工程、バクテリアセルロースアレイ形成工程、クリーニング工程、および湿度調節工程を経ることにより製造された物である。プロテインチップ作成用プレート11は、必要に応じて、合成樹脂製パッケージ（ケーシング）などに収められる。

3.1.2 作用・効果

このプロテインチップ作成用プレート11によれば、そのガラス基板1上に固定されたバクテリアセルロースアレイ3の各アレイ要素3aに、タンパク質を含む水溶液6を滴下することにより（図1中のプロブ生体分子固定工程に相当）、図5のプロテインチップ7を容易に作成することができる。

【0072】

上記の例では、マトリクス状に配置されたアレイ要素3aからなるバクテリアセルロースアレイ3を備えたプロテインチップ作成用プレート11について説明したが、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるようにアレイ要素3aを配置したプロテインチップ作成用プレートも本発明のプロテインチップ作成用プレートに含まれる。

【0073】

また、湿度調節工程を省略して製造した物をプロテインチップ作成用プレート11としてもよい。その場合、タンパク質を含む水溶液6を滴下するに際し、バクテリアセルロースアレイ3の湿度調節を実施することが望ましい。

3.2 基板その2

3.2.1 構成

図11は本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートの別の形態例を示す平面図である。このプロテインチップ作成用プレート12は、ガラス基板1上に、バクテリアセルロース層2を形成してなる。このプロテインチップ作成用プレート12は、図4中の基板洗浄工程、バクテリアセルロース層形成工程、湿度調節工程を経ることにより製造されたものである。プロテインチップ作成用プレート12は、必要に応じて、合成樹脂製パッケ

10

20

30

40

50

ージ（ケーシング）などに収められる。

3.2.2 作用・効果

このプロテインチップ作成用プレート12によれば、バクテリアセルロース層2の上に、タンパク質5を含む水溶液6をマトリクス状にスポットすることにより（図4中のプローブ生体分子固定工程に相当）、図7のプロテインチップ7を容易に作成することができる。

【0074】

また、バクテリアセルロース層2の上に、タンパク質5を含む水溶液6をライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるようにスポットすることにより、図8のような、ライン状、ハニカム状といったその他の整列状態となるように検出スポット2sを配置したプロテインチップを容易に作成することができる。

10

【0075】

また、湿度調節工程を省略して製造した物をプロテインチップ作成用プレート12としてもよい。その場合、タンパク質を含む水溶液6を滴下するに際し、バクテリアセルロースアレイ層2の湿度調節を実施することが望ましい。

3.3 基板その3

3.3.1 構成

図12(a)は本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートの更に別の形態例を示す平面図、図12(b)は縦断面図である。このプロテインチップ作成用プレート13は、ガラス基板1の表面に多数のピット1pをマトリクス状に形成し、各ピット1p内でバクテリアセルロース(BC)を直接培養してなる。このプロテインチップ作成用プレート13は、基板洗浄工程、バクテリアセルロース層形成工程、湿度調節工程を経ることにより製造されたものである。プロテインチップ作成用プレート13は、必要に応じて、合成樹脂製パッケージ（ケーシング）などに収められる。

20

3.3.2 作用・効果

このプロテインチップ作成用プレート13によれば、各ピット1pのバクテリアセルロース(BC)にタンパク質を含む水溶液6を含浸させることにより、図9のプロテインチップ9を容易に作成することができる。

【0076】

湿度調節工程を省略して製造した物をプロテインチップ作成用プレート13としてもよい。その場合、タンパク質を含む水溶液6を滴下するに際し、ピット1p内のバクテリアセルロース(BC)の湿度調節を実施することが望ましい。

30

[補足説明]

以上の説明では、プローブ生体分子としてタンパク質を保持したプローブセルまたは検出スポットのみをガラス基板上に形成したプロテインチップについて説明したが、タンパク質を含むプローブセルと、その他の物質（物体）たとえばペプチド、DNA、RNA、金属イオン、細胞、等を保持したプローブセルを同一基板上に形成してなるハイブリッド型のプロテインチップも本発明のプロテインチップに含まれる（図13参照）。

【0077】

また、上記の例では、プロテインチップおよびチップ作成用プレートの基板として、ガラス基板を使用することとしたが、合成樹脂基板、金属基板、バクテリアセルロース基板、等その他の材質の基板を用いてもよい。

40

【0078】

また、バクテリアセルロースアレイの各プローブセル（アレイ要素3a）の平面形状は、正方形である必要はない。長方形でも三角形でも五角形でも六角形でも八角形でも円形でも楕円形でもよいが、円形であることが望ましい（図14参照）。

【0079】

また、プローブセル（アレイ要素）のセルサイズおよびセル間隔は任意である。セルサイズ（直径）は、好ましくは十数ミクロン～数ミリメートルの範囲から選ばれる。既製のアレイヤによりスポットティング可能なセルサイズおよびセル間隔とすることが望ましい。

50

【0080】

また、バクテリアセルロース層あるいはプローブセル（アレイ要素）の厚さは任意である。好ましくは湿潤状態で十数ミクロン～十数ミリメートルの範囲から選ばれる。

【0081】

また、プロテインチップおよびチップ作成用プレートの形状（平面形状）は任意である。正方形、長方形、円形、楕円形、台形、等のような形状でもよい。

【産業上の利用可能性】

【0082】

本発明のプロテインチップは、その基板上的バクテリアセルロース内に生体細胞を導入もしくは培養することにより、細胞アレイとして利用することができる。すなわち、発現ベクターに挿入した状態のcDNAクローンをバクテリアセルロース（たとえば、図10に示すチップ作成用プレート11のアレイ要素3a、図11に示すチップ作成用プレート12のバクテリアセルロース層2、等）上にスポットし、その上で細胞を増殖させ、アレイされた遺伝子を導入することにより、外来遺伝子が発現した状態の細胞アレイを作成することができる。セルアレイ上の細胞に対しては蛍光免疫染色法、FISH法などの技術を使用することができる。バクテリアセルロースは含水性が極めて高いため、細胞の培養に必要な水分や栄養分を長時間保持することができる。

10

【0083】

本発明のプロテインチップは、その基板上的バクテリアセルロース上に生体組織標本（ティッシュ）を載せ置くことにより、ティッシュアレイとして利用することができる。バクテリアセルロースは含水性が極めて高いため、生体組織標本を長時間好適な湿潤状態に保つことができる。

20

【0084】

本発明のプロテインチップは、その基板上的バクテリアセルロースに糖鎖を含む水溶液を含浸させることにより、糖鎖アレイとして利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】本発明にかかるプロテインチップの製造方法の一例を示す製造工程図

【図2】（a）バクテリアセルロースの内部構造を示す概念図（b）バクテリアセルロース内においてタンパク質が水溶液中に浮遊した状態で保持されている様子を示す概念図

30

【図3】本発明にかかるプロテインチップの製造方法の一例を示す製造工程図

【図4】本発明にかかるプロテインチップの製造方法の一例を示す製造工程図

【図5】本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す平面図

【図6】（a）プローブセルがライン状に並べて配置されているプロテインチップの形態例を示す平面図（b）プローブセルが八ニカム状に配置されているプロテインチップの形態例を示す平面図

【図7】本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す平面図

【図8】（a）検出スポットがライン状に並べて配置されているプロテインチップの形態例を示す平面図（b）検出スポットが八ニカム状に配置されているプロテインチップの形態例を示す平面図

40

【図9】（a）本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す平面図（b）本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す縦断面図

【図10】本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートの形態例を示す平面図

【図11】本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートの形態例を示す平面図

【図12】（a）本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートの形態例を示す平面図（b）本発明にかかるプロテインチップ作成用プレートの形態例を示す縦断面図

【図13】本発明にかかるプロテインチップの形態例を示す概念図

【図14】本発明にかかるプロテインチップまたはチップ作成用プレートの形態例を示す平面図

【符号の説明】

50

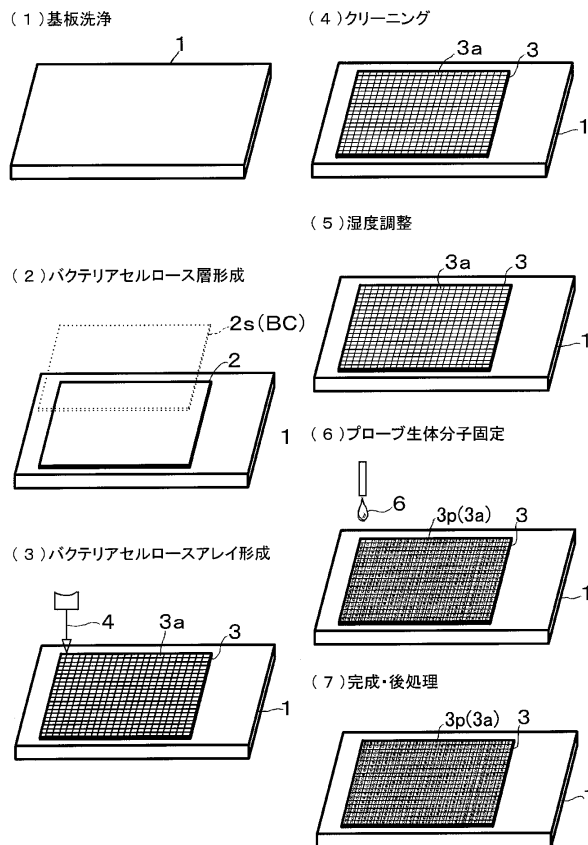
【 0 0 8 6 】

- 1 ガラス基板
- 1 p ピット
- 2 バクテリアセルロース層
- 2 f フィブリル
- 2 s シート
- 2 s p 検出スポット
- 3 バクテリアセルロースアレイ
- 3 a アレイ要素
- 3 p プローブセル
- 4 レーザビーム
- 5 タンパク質
- 6 水溶液
- 7 プロテインチップ
- 8 プロテインチップ
- 9 プロテインチップ
- 1 1 プロテインチップ作成用プレート
- 1 2 プロテインチップ作成用プレート
- 1 3 プロテインチップ作成用プレート
- B C バクテリアセルロース

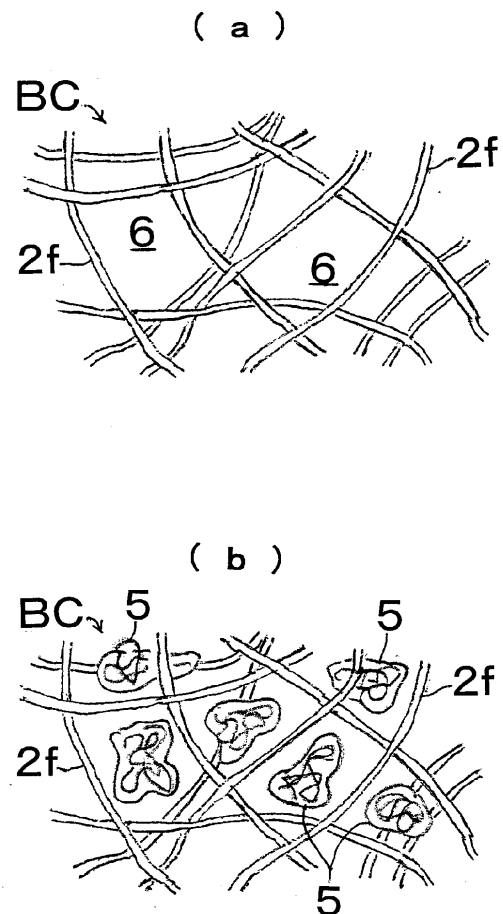
10

20

【 図 1 】

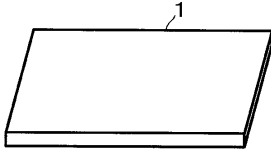


【 図 2 】

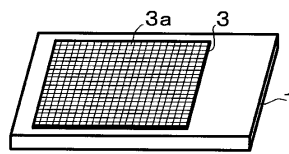


【図3】

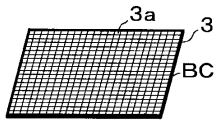
(1)基板洗浄



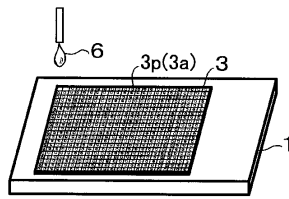
(4)湿度調整



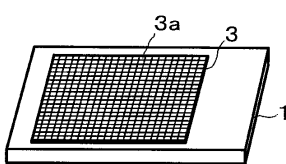
(2)バクテリアセルロースアレイ形成



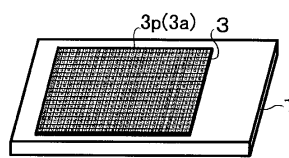
(5)プローブ生体分子固定



(3)バクテリアセルロースアレイ固定

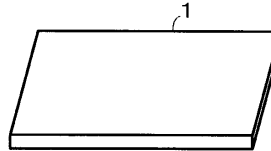


(6)完成・後処理

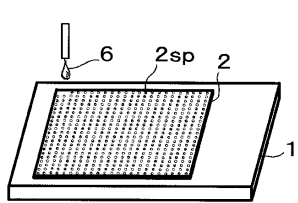


【図4】

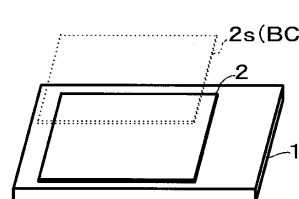
(1)基板洗浄



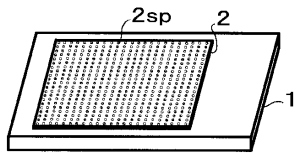
(4)プローブ生体分子固定



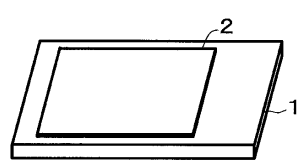
(2)バクテリアセルロース層形成



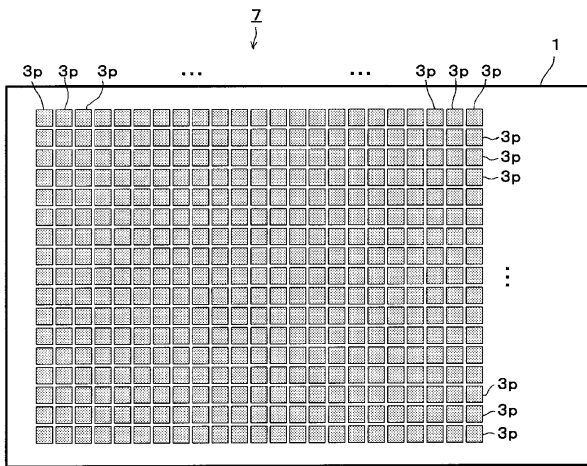
(5)完成・後処理



(3)湿度調整

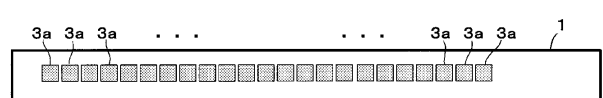


【図5】

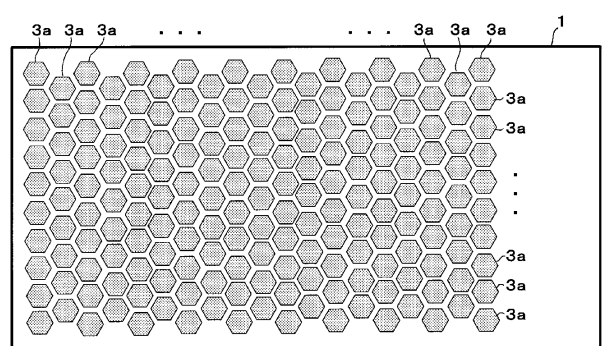


【図6】

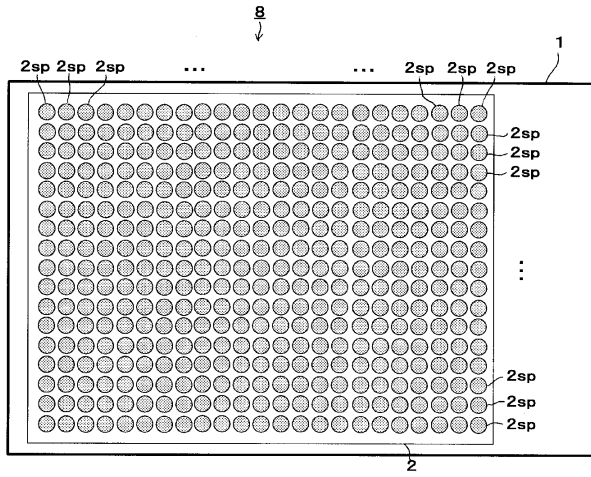
(a)



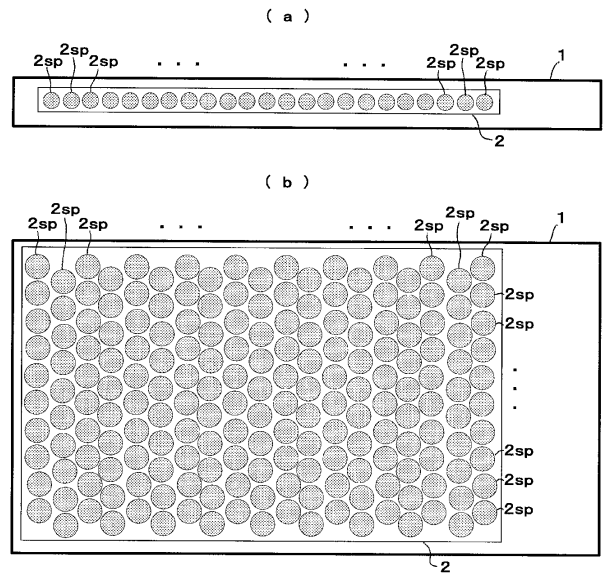
(b)



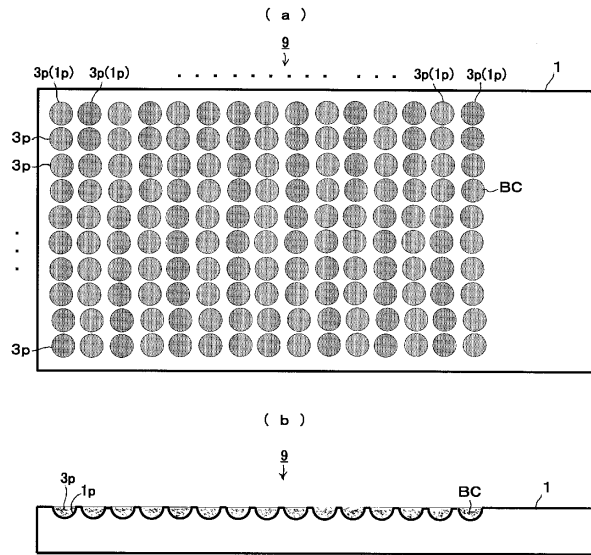
【 図 7 】



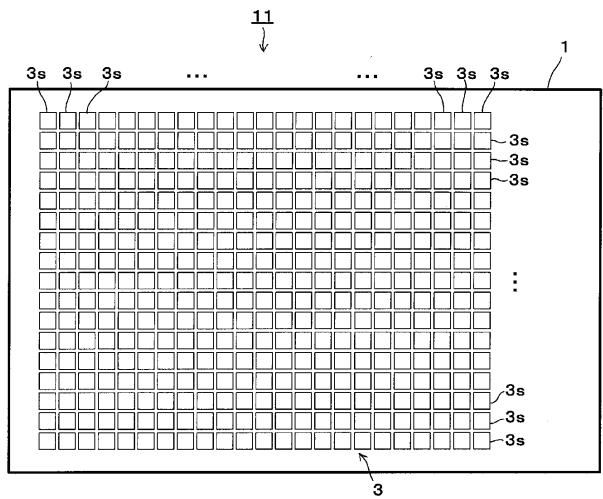
【 図 8 】



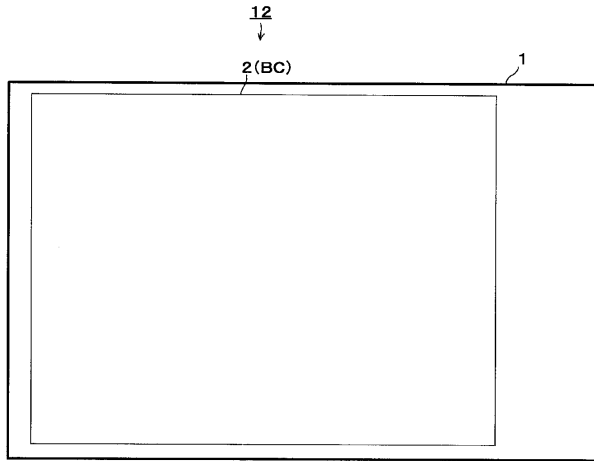
【 図 9 】



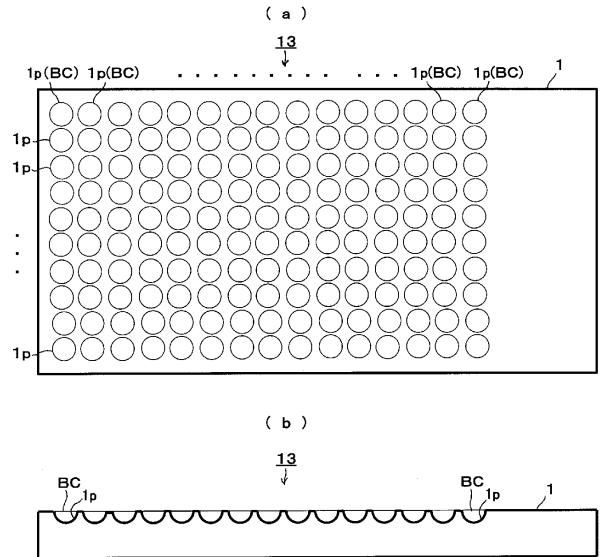
【 図 10 】



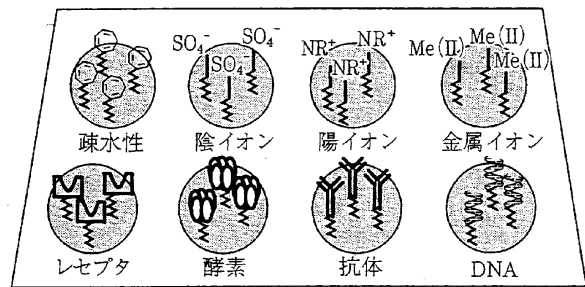
【図 1 1】



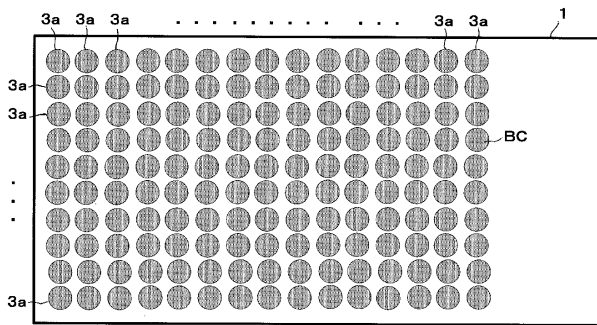
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2003-511041(JP,A)
特開平10-185923(JP,A)
特開平3-180170(JP,A)
特開平2000-504824(JP,A)
特開平2003-33177(JP,A)
特開平2004-500891(JP,A)
特開平2004-115616(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N33/48-33/98
G01N37/00
C12N15/00
C07K17/12