

# 全工程微量サンプル蛋白分析用化学 IC チップ群の開発

生田 幸士\*・佐竹 宣彦\*・大橋 竜也\*・柴田真由子\*

## New Biochemical IC Chips for Overall Protein Analysis using Micro Sampling

Koji IKUTA,\* Nobuhiko SATAKE,\* Tatsuya OHASHI,\* Mayumi SHIBATA\*

**Abstract** The concept of a biochemical IC chip based on modulo micro fluidics has been proposed and developed by Ikuta. We have developed a new type of biochemical IC chip for overall protein analysis at the micro-scale. Using a blue-color light-emitting diode (LED) chip as the excitation light source, whole chip-sets are as small as the size of the thumb. The separation and collection process driven by SGS-PAGE electrophoresis in the biochemical IC chips are verified experimentally. Specific protein from cells is collected successfully. This device enable us to develop finger-top analyzers.

**Keywords:** Biochemical IC, protein analysis, micro stereolithography, micro total analysis.

### 1. 緒 言

著者らは 1993 年より「化学 IC (化学集積回路) チップ」の概念を提案し、独自に開発を行ってきた。化学 IC とは、化学反応系、流体制御系、検出分析系といった化学装置の全構成要素すべてを集積化した汎用的なマイクロ化学デバイスである。近年は「モジュール型」化学 IC の開発を行っている。これは、各種機能を有する化学 IC チップ群 (チップセット又はチップファミリーとも言う) から適宜必要なチップを選択し、複数種を組み合わせて任意のマイクロ反応系を容易かつ高速に構築するという概念である。これにより多様な分析系・合成系に適応できる高い汎用性が実現できる。すでに無細胞蛋白合成用化学 IC チップ群など 20 種近いチップが開発されてきた [1-4]。

ヒト遺伝子をはじめとする多くの種の遺伝子が解明されつつある現在、遺伝子と蛋白の相互関係や、生体内の様々な対象を網羅的に解析するポストゲノム研究が注目を集めている。これらの研究の問題は、膨大な量の実験、解析を必要とすることである。そのため、自動化、小型化された高速・高効率な生化学実験装置が求められている。

しかし、従来の  $\mu$ -TAS やラボチップの分野におけるマイクロ化学分析デバイスは、実際には反応部のみ微小化されているものが大半である [5, 6]。例えば、蛋白分析の前処理工程や、液体輸送部を含めた全プロセスにおいて微量サ

ンプルのまま分析を行えるものは皆無であった。

全プロセスを通してサンプルが微量 (オールインワン) で分析可能であれば、低コストかつ高速・高効率な分析が可能であるだけでなく、装置全体も小型・軽量となり、ウェアラブルな応用まで可能となる。単なる分析装置の高度化の枠を超えた新規の医療デバイスとなる。さらに、生化学やバイオ分野の実験手法に大きな変革をもたらす可能性も秘める。そこで、本研究室では、分析に必要なプロセス全体をマイクロチップ化した「分析用化学 IC チップセット」を提案し、開発を行ってきた。

### 2. オールインワンマイクロ分析デバイスの提案・開発

ポストゲノム研究の一つであるプロテオーム解析に焦点を絞り、微量蛋白の分析をオールインワンで実施する分析装置を開発した。すでに著者らは、サンプルの前処理として微小な細胞や組織の破碎を行なう「ホモジナイザーチップ」[7, 8]、蛋白を分離する「電気泳動チップ」[9]を開発してきた。次の段階として、各化学 IC チップを組み合わせる分析装置全体を構築するコンセプトの実現段階に到達した。しかし本目的を達成するには、電気泳動チップに関して、蛋白のオンチップ検出や回収処理の課題が残されていた。

本報では、新しい電気泳動チップを考案し、装置全体が小型で簡素である新規化学 IC チップ群を開発した。蛋白をリアルタイムに蛍光検出し、約 3 分で 5 種類の蛋白を分離することに成功した。さらに、同じ化学 IC チップ上で 5 種類の蛋白から目的の蛋白 1 種類のための回収にも成功した。細胞内蛋白特定分画の回収をも実証し、プロテオーム解析への実用性を示した。

生体医工学シンポジウム 2006 発表 (2006 年 9 月, 新潟)  
2006 年 8 月 4 日受付, 2006 年 12 月 21 日改訂  
Received August 4, 2006; revised December 21, 2006.

\*名古屋大学大学院工学研究科

Graduate School of Engineering, Nagoya University

これら蛋白分離・回収用化学 IC チップ群と、開発済みの「ポンプチップ」[4], 「ホモジナイザーチップ」などを組み合わせることにより、全プロセスにおいて完全に微量サンプルのまま分析可能となる。

### 3. ハイブリッドマイクロ光造形法

ハイブリッドマイクロ光造形法[10]は、著者らが1992年に開発したマイクロ光造形法をさらに進化させたものである。マイクロ光造形法とは、光硬化性樹脂、光学系、露光強度、および液面規制法の大幅な改善、最適化を図り、数  $\mu\text{m}$  から 100  $\mu\text{m}$  の分解能をもつ3次元微細加工法である。

ハイブリッドマイクロ光造形法は、光硬化性樹脂で作製されたマイクロ流路やリアクタ構造に、形状記憶合金アクチュエータやシリコンバルブなどの機能性材料を内蔵したハイブリッド構造を一体成形する造形法である。ハイブリッドマイクロ光造形法のプロセスを図1に示す。

- (1) マイクロ光造形法により、部品を組み込む層まで積層する。
- (2) レーザ照射による造形を中断し、目的の位置に部品を組み込む。
- (3) 造形を再開し、最終層まで造形する。

この造形プロセスにより、容易に光硬化性樹脂以外の機能性部品を内蔵することが可能である。さらに、後から挿入した機能部品は、硬化した光硬化性樹脂（接着剤）で密閉されるため、接合部からの液漏れの問題はない。

化学 IC は本手法を使用するため種々の機能部品を容易にハイブリッド化でき、多種多様なチップを作製できる。

## 4. 蛋白分析

### 4.1 蛋白の分離手法

蛋白の分離手法としては、マイクロ化に適したキャピラリー SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法）を採用した。キャピラリー SDS-PAGE とは電気泳動法の一つで、SDS という界面活性剤を蛋白にコートして、キャピラリーに詰めた PAG（ポリアクリルアミドゲル）内で蛋白を分子量毎に分離する方法である。SDS 処理をすると、蛋白は直鎖状になって負に帯電するので、すべての蛋白は陽極側に移動する。また、その際

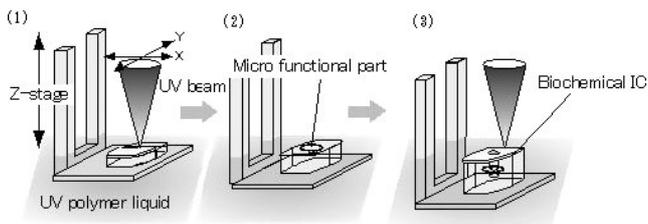


図1 ハイブリッドマイクロ光造形法  
Fig. 1 Process for hybrid microstereolithography.

蛋白の分子量が小さいほどゲルの網目構造を抜けやすいので、移動速度が速くなる。この移動速度の差を利用して蛋白を分子量ごとに分離する。

この分離法は、一般的に高分離能といわれており、PAG 濃度やキャピラリーの長さや内径を変更することで分離する蛋白の分子量範囲が可変であるため、幅広い分子量範囲に対応できる[11]。汎用性を目的とした化学 IC に適した手法である。

### 4.2 蛋白検出手法

蛋白の検出には、蛍光検出を採用した。この手法は、蛍光色素を蛋白に結合させて、励起光を当てると蛍光を発するため、蛋白分離の様子がリアルタイム観察できる。本手法により目的蛋白の位置を特定でき、オンチップで蛋白分離が確認できる。本報では、蛍光色素の励起光源に発光ダイオード（LED、波長 470 nm）を使用し、化学 IC チップに内蔵することで装置の小型化を図った。

図2(a)に示すように従来の蛍光を用いるマイクロ化学デバイスでは、キャピラリーの軸方向に対して垂直から、すなわち観察方向に対して垂直に励起光を照射していた（垂直照射方式）。この手法で長いキャピラリー全体に励起光を照射しようとするるとトランスイルミネーターなどの大きな励起光源が不可欠となり、装置全体の小型化が困難であった。本報では、小さい励起光源でキャピラリー全体の蛍光を観察可能とし、同時に装置の小型化を実現するために、図2(b)のように励起光をキャピラリーの軸方向から照射する方式（同軸照射方式）を考案した。

## 5. 分析用化学 IC チップ群の開発

### 5.1 蛋白分離チップ群の構成

蛋白分離チップ群は、アノードチップ、カソードチップ、光源チップ、ガラスキャピラリーから構成される。システム構成図を図3に示す。アノードチップ-カソードチップ

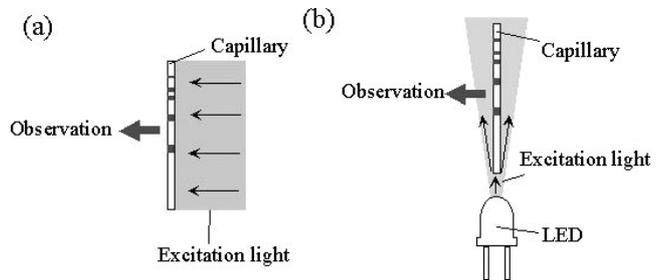


図2 蛍光観察のための励起光照射手法  
(a) 従来方法：励起光をキャピラリーの軸方向と垂直方向から照射、(b) 新方式：励起光をキャピラリーの軸方向から照射

Fig. 2 Comparison of irradiation method for the fluorescent detection.  
(a) Traditional method: Irradiation from the vertical direction of the capillary, (b) New method: Irradiation from the axial direction of the capillary.

間に電流を流し、キャピラリー内に詰められた PAG 内で蛋白を上から下にかけて分離する系である。本化学 IC チップ群の特長は、

- (1) LED 同軸照明法により装置全体を小型化
- (2) キャピラリーを交換するだけで再利用可能
- (3) キャピラリーの長さを分析対象に応じて可変である。

キャピラリー以外のアノードチップ、カソードチップ、LED チップは繰り返し使用可能なため、キャピラリーを交換するだけで繰り返し、サンプルの分離を行うことができ、高効率・低コストを実現する。また、キャピラリーの長さ、内径は自由に変更可能であるので、分離対象の蛋白の分子量範囲に応じたキャピラリーを使用することができる。

蛍光の検出器には CCD を使用し、キャピラリーの軸方向に対して垂直方向からフィルターを通して蛍光のみを観察する。

今回、作製したアノードチップ、カソードチップ、光源

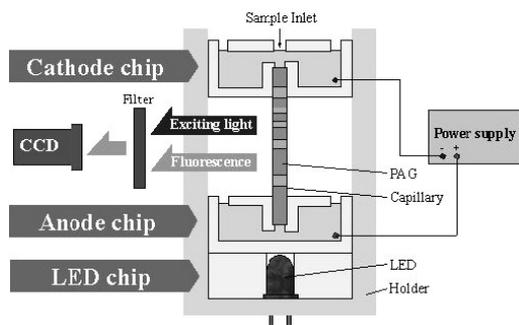


図 3 蛋白分離チップ群概略図

Fig. 3 Schematic design of a protein analysis chip-set.

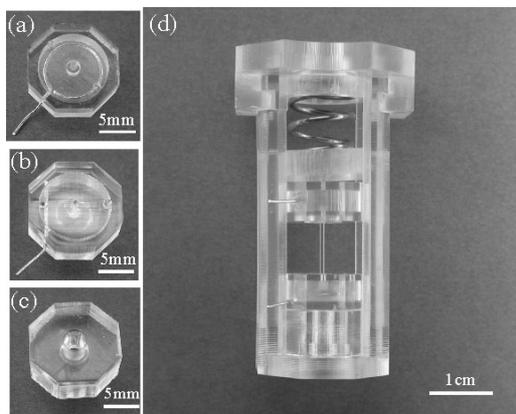


図 4 蛋白分離チップ群外観図

(a) カソードチップ, (b) アノードチップ, (c) LED チップ, (d) チップ組み立て図

Fig. 4 Protein analysis chips and chip assembly.

(a) Cathode chip, (b) Anode chip, (c) LED chip, (d) Chip assembly in a holder.

チップ, およびそれらをホルダーユニットで結合した蛋白分離チップ群を図 4 に示す。アノードチップとカソードチップは、Pt 電極を内蔵しており、光源チップは青色 LED を内蔵している。

### 5.2 蛋白回収チップ群

回収には、十字流路を利用した電気的な方法を採用した。回収原理を図 5 に示す。

まず、サンプルを注入して図 5(1)、電気泳動を開始して蛋白を分離する同図(2)。目的の蛋白が流路の交差点に到達した同図(3)と同時に、垂直方向に電流を流すのを止め、水平方向に電流を流す。すると、流路の交差点にあった目的の蛋白は水平方向の流路の陽極側に移動する同図(4)ので、これを回収槽へ導いて蛋白を回収する。

水平方向の電流を止めて再び垂直方向へ電流を流すと、電気泳動が再開されるので、同様の方法で連続的に蛋白を回収することができる。

この回収システムを実現すべく、先の分離システムの途中に、新たに回収チップを設けた。蛋白回収チップ群のシステム構成図を図 6 に、作製した回収チップおよび回収チップ群全体の概観を図 7 に示す。回収チップは、他の化学チップと同様ハイブリッドマイクロ光造形法で作製している。図 7(a)に示すように、回収チップは Pt 電極を内蔵した 2 つの電極槽とそれをつなぐ流路から成る。あらかじめ

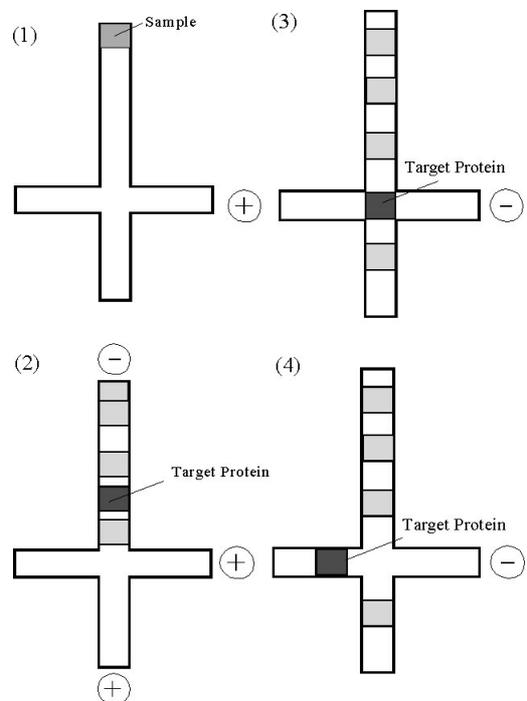


図 5 蛋白回収方法

(1) サンプル注入, (2) 泳動開始, (3) 電流の切り替え, (4) 蛋白回収

Fig. 5 Procedure of protein collection.

(1) Inject sample, (2) Start electrocataphoresis, (3) Switch current, (4) Collect target protein.

流路内を PAG で満たし、キャピラリーと結合させることで十字型の PAG を作製している。

この蛋白回収チップ群も、蛋白分離チップ群と同様の特長を有しており、キャピラリーと回収チップを交換するだけで再使用が可能で、高い汎用性を持つ。

## 6. 検証実験

### 6.1 蛋白分離実験

蛋白分離チップ群の機能を検証するため、図4のシステムで5種類の蛋白を含むマーカー蛋白の分離実験を行った。マーカー蛋白に含まれる蛋白とその分子量を以下に示す。

- ・ Ovalbumin, 45 kDa
- ・ Serum albumin, 66.2 kDa
- ・ Phosphorylase, 97.4 kDa
- ・  $\beta$ -galactosidase, 116.25 kDa
- ・ Myosin, 200 kDa

今回の実験の条件を以下に示す。

蛍光試薬は、蛋白にコートした SDS に結合する性質を持つ

NanoOrange (Molecular Probes, Inc) を使用した。 NanoOrange の励起波長および蛍光波長はそれぞれ 470 nm/570 nm である。励起光源には青色 LED を用いた。キャピラリーは内径 0.5 mm, 外径 0.7 mm, 長さ約 10 mm のものを使用した。ゲルのアクリルアミド濃度は 10%, 緩衝液には 1.5M Tris-HCl (pH8.8) を用いた。通常のキャピラリー SDS-PAG ではゲル中に SDS を混合するが、本実験では混合せず、電極液の Tris-Glycine バッファーに、SDS を 0.01% で混合したものを使用した。蛍光試薬は、この電極液に混合する。

以上の条件で PAG と電極液を作製し、チップに電極液を満たした後、図5のようにホルダー内にチップとキャピラリーを組み立てる。次に、チップ内にサンプル 5  $\mu$ l を注入後、電極間に 0.2 mA の定電流を流し、電気泳動を開始する。分離の様子は CCD でリアルタイムに観察する。

電気泳動開始 30 秒から 5 種類の蛋白の分離が完了する 180 秒まで、30 秒ごとに CCD から得られた画像を図8に示す。

図9は、CCD から得た画像情報を解析することで得られた三次元グラフである。縦軸は蛍光強度であり、横軸はそれぞれキャピラリーの長さ方向の pixel 数と経過時間である。時間経過は 30 秒ごとに表している。グラフの蛍光強度がピーク部分が蛋白の検出を表している。

図8と図9から、電気泳動開始から約3分後に5種類の蛋白が分離できていることが確認できる。ただし両図の、一番先頭の高輝度バンドは SDS に結合しなかった蛍光色素であり、蛋白ではない。

### 6.2 蛋白回収実験

6.2.1 マーカー蛋白からの蛋白回収実験 蛋白回収チップ群の機能を検証するため、5.2で述べた方法で5種

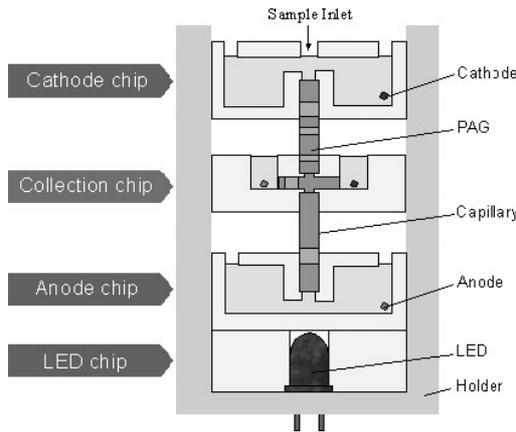


図6 回収チップ群の概略図

Fig. 6 Schematic design of the protein collection chip-set.

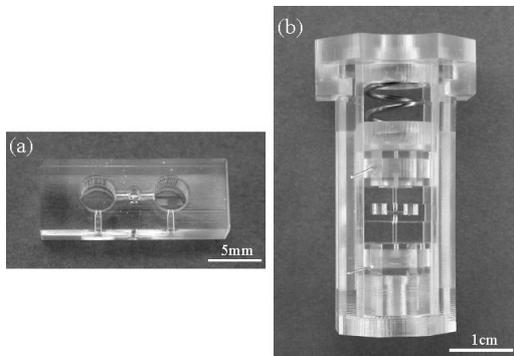


図7 蛋白回収チップと回収チップ群

(a) 蛋白回収チップ, (b) チップ組み立て図

Fig. 7 Protein collection chip and chip assembly.

(a) Protein collection chip, (b) Chip assembly in a holder.

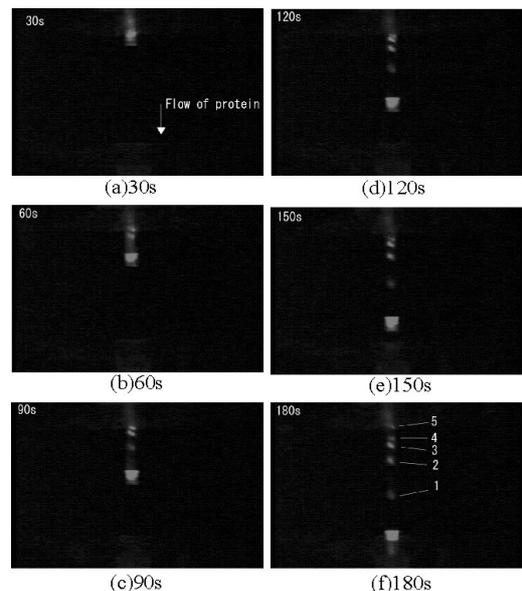


図8 蛋白分離の様子

Fig. 8 CCD camera image of protein separation.

類の蛋白を含むマーカーの内、1種類の蛋白を回収する実験を行った。実験条件は3・1と同じであり、細胞抽出液の量は5 $\mu$ lとした。回収目的とする蛋白は一番分子量が小さいOvalbuminとした。回収の確認のため、回収したサンプルを市販の電気泳動装置で泳動し、銀染色を施して観察した。CCDから得られた回収の様子を図10、回収サンプルの銀染色結果を図11に示す。

図10より、目的の蛋白が交差点に来た時に電流を切り換えることで、回収槽の方へ移動しているのが確認できる。図11から、(a)のサンプルと比べて、(b)の回収サンプルには目的の蛋白Ovalbuminのバンドのみが観察でき、他の蛋白のバンドが観察できないことから、目的の蛋白1種類のための回収に成功したことが実証された。

**6・2・2 細胞内蛋白回収実験** プロテオーム解析への応用を確認するため、細胞内蛋白の回収実験を行った。サンプルにはPC12細胞(ラット副腎髄質由来褐色細胞)の破碎液を使用した。本報では、蛋白回収チップ群の検証用のPC12細胞の破碎には市販のホモジナイザー(MISONIX Inc. XL2000)を使用した。

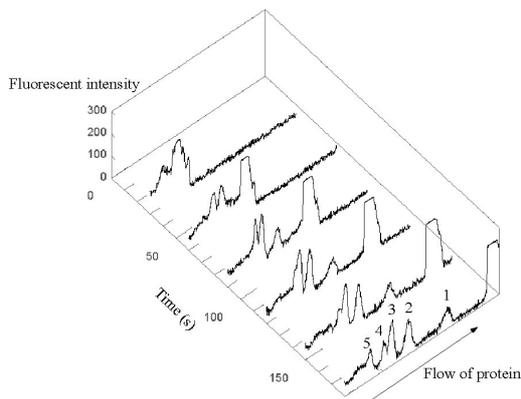


図9 蛋白のリアルタイム分離3Dグラフ

Fig. 9 3D graph of alteration in fluorescent intensity.

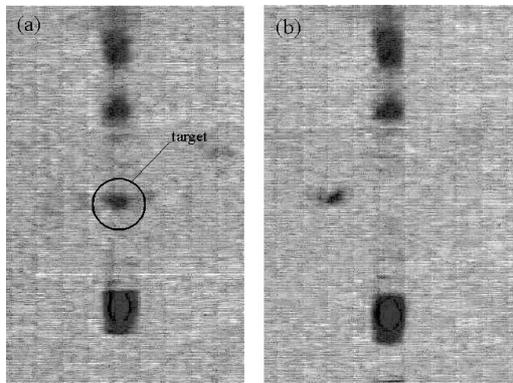


図10 蛋白回収の様子

(a) 目的の蛋白が交差点に到達, (b) 目的の蛋白を回収

Fig. 10 Appearance of protein collection experiment.

(a) Target arrived cross-point, (b) Collecting target.

一般に細胞内には、数百から数千種類の蛋白が含まれており、蛋白の種類が多すぎるため、現時点の本システム単体で個々の蛋白を分離、回収するのは困難である。しかし、数百から数千の蛋白の内、特定の分子量帯を回収することができれば、再度電気泳動を繰り返すことで、より詳細な解析ができるようになる。そこで、蛋白の特定分画の回収をするため、回収のタイミングは蛋白の位置ではなく泳動開始からの経過時間として回収を行った。今回は、回収のタイミングを電気泳動開始から5分とした。

検証実験として、回収サンプルを市販の電気泳動装置で泳動し、銀染色を施した結果を図12(a)に示す。図12

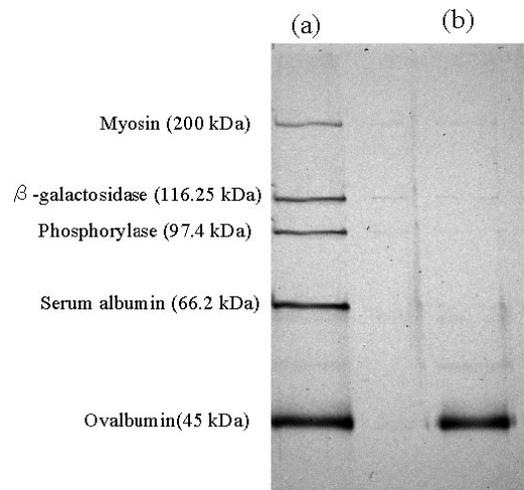


図11 銀染色による回収蛋白の電気泳動図

(a) マーカー蛋白, (b) 回収されたサンプル

Fig. 11 Electrophoretogram of protein markers with silver staining.

(a) Protein markers before collection, (b) Collected sample.

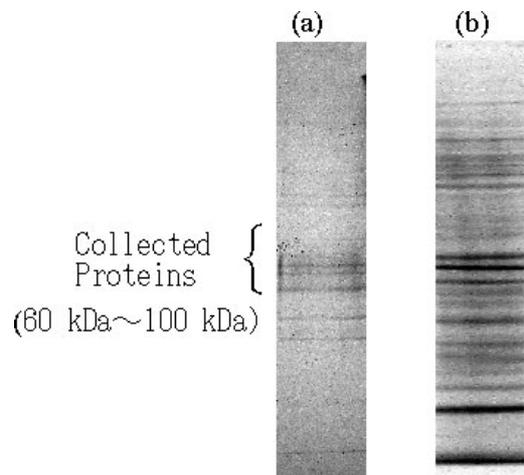


図12 銀染色によるPC12細胞破碎抽出液の電気泳動図

(a) 回収後, (b) 回収前

Fig. 12 Electrophoretogram of PC12 cells homogenate with silver staining.

(a) After collection, (b) Before collection.

(b)は、PC12細胞を市販のホモジナイザー装置で破碎したものを電気泳動で泳動し、銀染色を施した。図12から細胞内蛋白をおおよそ60 kDaから100 kDaの分子量範囲で選択的に回収できていることがわかる。この分子量範囲以外に薄く見えているバンドは、キャピラリーと回収チップの流路の交差点を通る際の拡散による混入が考えられる。

将来、この部分的に回収した蛋白をキャピラリーの長さや内径、ゲル濃度を変えるなどして、再び電気泳動を行うことでさらに一層精密に蛋白の回収を行うことができる。さらに回収操作を繰り返すことで図12で見られる薄いバンドも取り除かれると考える。

今回は回収のタイミングを5分としたが、あらかじめマーカー蛋白など分子量のわかっている蛋白を用いて分子量ごとの経過時間を調べておけば、目的の成分の回収が容易になる。

## 7. 考 察

従来のマイクロ分析チップを用いて、蛋白の分析を行う場合には、サンプルをチップに注入する前に細胞懸濁液をホモジナイザーなどで破碎しなければならない。そのため、分析には多量(約500  $\mu$ l)の細胞懸濁液が必要であった。

しかし、本報で開発した蛋白分離・回収チップ群では、細胞抽出液は5  $\mu$ lで十分であった。本チップファミリーは、すでに本研究室で開発されているホモジナイザーチップと整合性を持っているため、これらを結合して蛋白の前処理から分析までの全工程を連続的に行うことができる。ホモジナイザーチップに必要な細胞懸濁液の量は30  $\mu$ lであったため[5]、本チップ群を用いて蛋白の分析を行うのに必要な細胞懸濁液の量は若干増えて30  $\mu$ lとなるが、従来方法と比べると10分の1以下になったことがわかる。

## 8. ま と め

蛋白のオールインワン分離・回収のための化学ICチップ群を開発した。これらチップ群を用いて、5種類のマーカー蛋白を蛍光検出し、約3分で5種類の蛋白を分離し、リアルタイムに観察することに成功した。さらに、5種類のマーカー蛋白のうち目的の蛋白1種類のみを回収することに成功した。最後に、細胞内蛋白の選択的回収にも成功し、生化学分野への応用可能性を示した。

本研究のように機能ごとにモジュール化されたマイクロデバイスを結合して分離、回収を実現した例は世界に類を見ない。

今後、これらチップ群とホモジナイザーチップ、ポンプチップなど他の化学ICチップと組み合わせることにより、前処理を含む、蛋白の分離検出・回収の全プロセスをマイクロスケールで処理できる。これによりポストゲノム研究を担うモジュール汎用マイクロデバイスが実現できる単なる分析装置の軽量化や高効率化だけに留まらず、生化学分

析実験スタイルを一新してしまう足がかりができた。

**謝辞** 本研究を進めるにあたって、前駆研究で重要なサポート頂いた、生田研究室かつての大学院生の池田幸太氏、佐々木康祐氏、塩井正彦氏と池内真志博士に感謝の意を表します。論文作製の際に協力いただいた本研究室博士前期課程岩田裕樹氏にも深く感謝いたします。

## 文 献

- Ikuta K, Hirowatari K, Ogata T: Proc of IEEE International Workshop on Micro Electro Mechanical System (MEMS-94), 1994 pp. 1-6.
- Ikuta K: Artificial life V, 1997 pp. 17-24, MIT press.
- Ikuta K, Maruo S, Fukaya Y, Fujisawa T: Proc of the IEEE International Workshop on MEMS 98, 1998 pp. 131-136.
- Ikuta K, Hasegawa T, Adachi T, Maruo S: Proc of IEEE International Conference on MEMS2000, 2000 pp. 739-744.
- Vladislav Dolnik, Shaorong Liu, Stevan Jovanovich: Electrophoresis. **21** (1): 41-54, 2000.
- Jong Wook Hong, Teruo Fujii, Minoru Seki, Takatoki Yamamoto, Isao Endo: Electrophoresis. **22** (2): 328-333, 2001.
- Ikuta K, Sasaki Y, Maegawa H, Maruo S, Hasegawa T: Micro Total Analysis System (u-TAS2002), 2002 pp. 745-747.
- 生田幸士, 佐々木康祐, 佐竹宣彦: 第44回日本生体医工学会大会. PJ1-3-6, 2005.
- 生田幸士, 柴田真由子, 塩井正彦, 丸尾昭二: ロボティクス・メカトロニクス講演会2002論文集. IP1-H08, 2002.
- Ikuta K, Takahashi A, Ikeda K, Maruo S: Mat Res Soc Symp Proc. **758**: 193-204 2002.
- Vera JC: Analytical Biochemistry. **174**: 187, 1988.

生田 幸士 (イクタ コウジ)

1977年大阪大学工学部金属材料工学科卒業、1979年同基礎工学部生物工学科卒業、1981年同大学院博士前期課程物理系・生物学専攻修了、1987年東京工業大学大学院理工学研究科博士後期課程・制御工学専攻修了(工学博士)。1987年米国カリフォルニア大学サンタバーバラ校ロボットシステムセンター主任研究員、1989年東京大学工学部計数工学科専任講師、1990年九州工業大学情報工学部機械システム工学科助教授、1994年より名古屋大学大学院工学研究科マイクロシステム工学専攻教授。1996年より日本学術振興会未来開拓研究プロジェクトリーダー、2004年より科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業CRESTプロジェクトリーダー。専門研究分野はマイクロ・ナノ光造形法による3次元マイクロ・ナノファブリケーション、化学集積回路(化学IC)、医用ロボティクス。

日本生体医工学会代議員、日本コンピュータ外科学会理事、日本人工臓器学会、日本ロボット学会、IEEEなどの会員。



佐竹 宣彦 (サタケ ノブヒコ)

2004 年名古屋大学工学部航空機械コース卒業, 2006 年同大学院工学研究科マイクロナノシステム工学専攻博士前期課程修了, 医用マイクロメカトロニクス, 分析用化学 IC の研究に従事, 機械学会会員.



柴田 真由子 (シバタ マユコ)

2002 年名古屋大学工学部航空機械コース卒業, 2004 年同大学院工学研究科マイクロナノシステム工学専攻博士前期課程修了, 医用マイクロデバイス, 蛋白分析用化学 IC の研究に従事, 機械学会会員.



大橋 竜也 (オオハシ タツヤ)

2003 年名古屋大学工学部航空機械コース卒業, 2005 年同大学院工学研究科マイクロナノシステム工学専攻博士前期課程修了, 医用マイクロデバイス, 無細胞合成と蛋白分析用化学 IC の研究に従事, 機械学会会員.

