

Figure 7. Human leukocyte adhesion to anti-cluster of differentiation (CD) antibody-immobilized surface in the presence of serum. Because the leukocytes have CD4, CD8, and CD41b antigens on their surface, they adhered to the corresponding antibodies immobilized on the chip. The concentrations indicate the antibodies spotted onto the chip.

antigens were microarrayed onto a nitrocellulose membrane to detect CD antigens in human lymphocytes (68, 69). The lymphocytes of healthy individuals were then compared with the lymphocytes of patients who had different levels of expression of CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, and CD37. These results were confirmed by flow cytometry.

Figure 7 shows the immobilization of anti-CD antibodies by our photoimmobilization method for use in an assay of CD antigens in human monocytes. Glass slides were treated with octadecyltriethoxysilane, and the antibodies were microarrayed onto the surface with a photoreactive polymer. Human monocytes were then placed on the microarray glass for 90 min. After staining with Giemsa dye, it was demonstrated that human monocytes did not adhere to mouse IgG; however, they did adhere to CD4 and CD8 antibodies. Therefore, the microarray method is very useful for detecting multiple CD antigens.

Antibody Analysis

Allergen Microarray. The photoimmobilization method not only has the ability to covalently immobilize organic materials on a chip, it also orientates the immobilized materials more randomly than conventional methods, as illustrated in Figure 2. Therefore, the most suitable application for this technique is basic research that investigates various interactions between biological molecules and clinical diagnosis for the detection of polyclonal antibodies in blood. Because a polyclonal antibody has many recognition sites, the immobilized antigen also provides many recognition sites. Oriented immobilization must cover some of these recognition sites. Therefore, the photoimmobilization method is suitable for allergy diagnosis.

Allergy diagnosis using a microarray biochip was performed as follows (31). Various allergens were immobilized on a polymeric chip using the photoreactive polymer, and human serum was added to the chip. After 10 min, the chip was washed, and the bound IgE was detected by anti-IgE-antibody-containing peroxidase. Finally, a substrate for chemiluminescence was added to the chip. Chemiluminescent detection is useful for the construction of a relatively cheap measurement machine. Figure

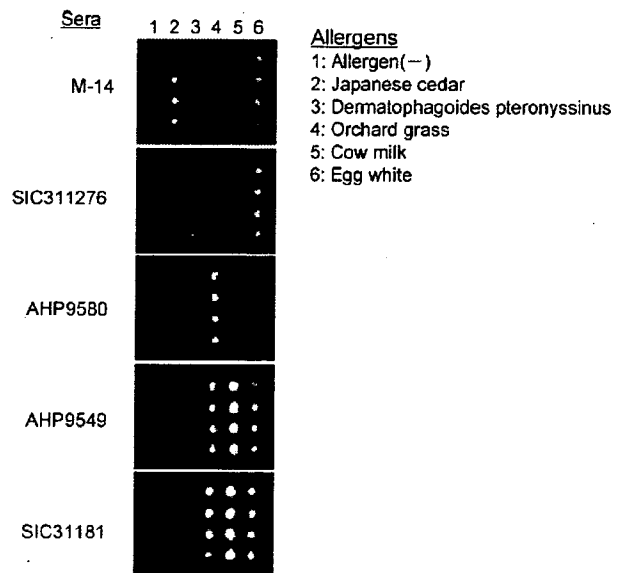


Figure 8. Microarray showing detection of adsorbed IgE from the sera of five different patients (M-14, SIC311276, AHP9580, AHP9549, and SIC31181) to five different allergens (Japanese cedar, *Dermatophagoides pteronyssinus*, orchard grass, cow's milk, and egg white).

8 shows the results of chemiluminescent detection of an allergy test using microarrays (31). Five allergens were microarrayed and the adsorption of IgE was investigated. Serum from five different patients had different reactivities to the five allergens.

To date, various types of allergen microarrays have been prepared (61, 73–83). However, as described above, there are some difficulties with some antigen arrays, as reported by Fall et al. (30). The photoimmobilization method provides a solution for this problem.

Panel Cell Microarray. Cells were also microarrayed using the photoimmobilization method. In addition to molecular immobilization, some pathogens or cells were microarrayed for multiple analyses (84–86). Schwenk et al. (86) prepared a

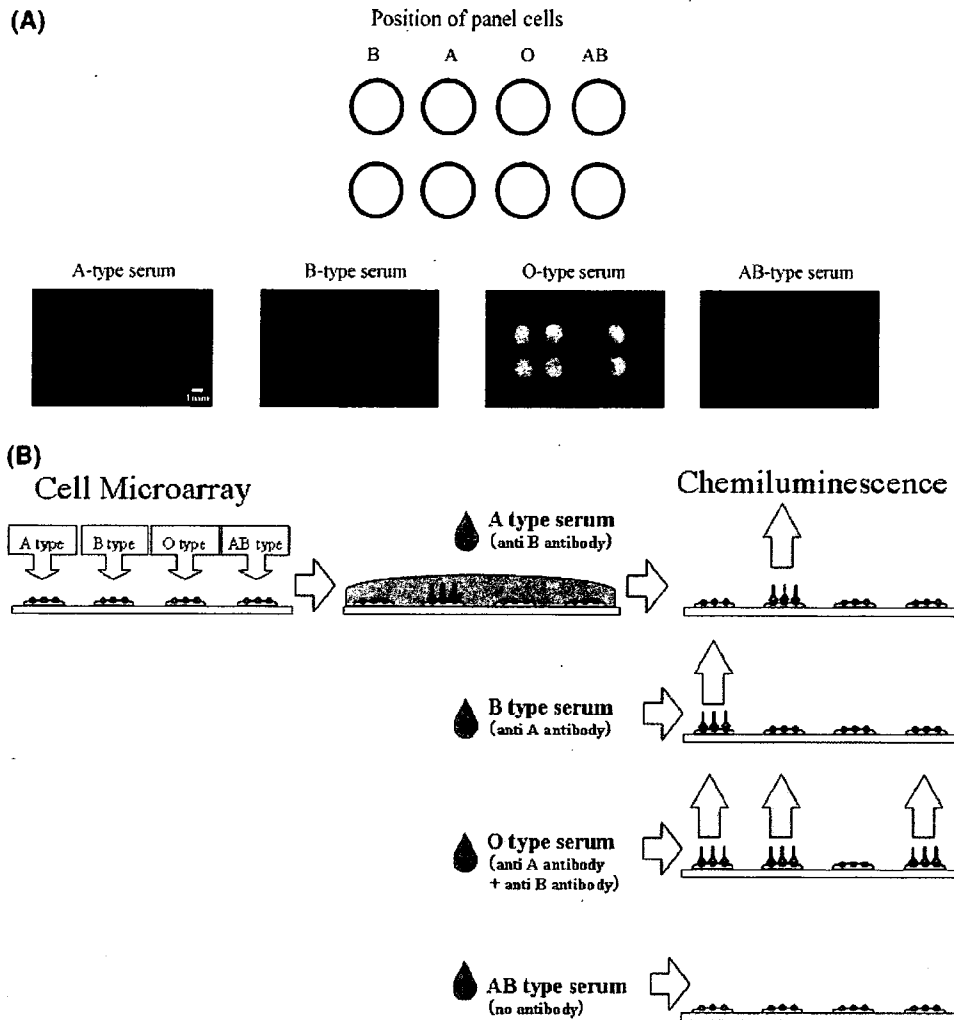


Figure 9. (A) Image of antibodies adsorbed onto blood cells microarrayed on a chip with photoreactive poly(phosphatidylcholine methacrylate). (B) Diagram of the image shown in (A). A-Type serum contained anti-B antibodies that adsorbed onto B-type blood cells, whereas B-type serum contained anti-A antibodies that adsorbed onto A-type cells. O-Type serum contained anti-A and anti-B antibodies that adsorbed onto A, B, and AB cells, and AB-type serum contained no antibodies to any of the cells.

microarray of cultured cell lines for antibody detection. Recently, a cell microarray for clinical analysis was performed (60); the target was the assay of antibodies in blood.

Usually, A-type blood does not have anti-A-type antibodies present; however, irregular antibodies are sometimes produced by previous transfusion or pregnancy. Blood containing irregular antibodies cannot be used for transfusion because the irregular antibodies aggregate with cells of the patient receiving the transfusion. Therefore, the presence of irregular antibodies is usually checked before transfusion. However, because the check is performed by an aggregation assay of blood cells, it is a time-consuming process and skill is required to interpret the results. If a cell array method was realized for detecting irregular antibodies, the assay system could be automated, reducing the time required to obtain results; therefore, we microarrayed a panel of cells that expressed the A, B, O, and AB antigens (60). The cells were mixed with photoreactive polymers and microspotted onto a polystyrene dish that was irradiated with UV light.

Antibody solution or serum was added to the microarray plate and incubated for some time. After washing, the array assay was used for human serum. Figure 9 shows the result of interactions of the cell microarray with antibodies. The O-type

human serum reacted with A-, B-, and AB-type cells, and the A- and B-type sera reacted with B- and A-type cells, respectively, although the reaction intensity was relatively low. This is because A- and B-type sera contain anti-B and anti-A antibodies, respectively. AB-type serum did not react with either type of cell, because it contains no antibodies to these antigens. Because O-type serum contains anti-A and anti-B antibodies, this serum reacted with the panel of cells, except for OD+ cells. These phenomena correspond to the results of an aggregation test for conventional blood types.

Conclusion

The possibility of miniaturizing and carrying out biological assays in parallel has had a great impact on the development of biomedical technologies. Here, we discuss how the photoimmobilization method can be employed for the microarray immobilization of various biological components such as proteins, antibodies, antigens, and cells. Microarray technology will increase in importance with the progress of bioinformatics and clinical informatics, and this progress will produce new applications for these technologies. Further efforts to combine chemistry, biotechnology, and nanotechnology are required for additional progress in this interdisciplinary field.

References and Notes

- (1) Kingsmore, S. F. Multiplexed Protein Measurement: Technologies and Applications of Protein and Antibody Arrays. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 310–320.
- (2) MacBeath, G.; Schreiber, S. L. Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science* **2000**, *289*, 1760–1763.
- (3) Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R. A.; Gerstein, M.; Snyder, M. Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips. *Science* **2001**, *293*, 2101–2105.
- (4) Service, R. F. Proteomics. A Proteomics Upstart tries to Outrun the Competition. *Science* **2001**, *294*, 2079–2080.
- (5) MacBeath, G. Protein Microarrays and Proteomics. *Nat. Gen.* **2002**, *32*, 526–532.
- (6) Mitchell, P. A. Perspective on Protein Microarrays. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 225–229.
- (7) James, P. Chips for Proteomics: A New Tool or Just Hype? *BioTechniques* **2002**, *33*, S4–S13.
- (8) Merkel, J. S.; Michaud, G. A.; Salcius, M.; Schweitzer, B.; Predki, P. F. Functional protein microarray: just how functional are they? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 447–452.
- (9) Seong, S. Y.; Choi, C. Y. Current Status of Protein Chip Development in Terms of Fabrication and Application. *Proteomics* **2003**, *3*, 2176–2189.
- (10) Weller, M. G. Classification of Protein Microarrays and Related Techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 15–17.
- (11) Predki, R. F. Functional Protein Microarrays: Ripe for Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 8–13.
- (12) Espejo, A.; Cote, J.; Bednarek, A.; Richard, S.; Bedford, M. T. A Protein-Domain Microarray Identifies Novel Protein–Protein Interactions. *Biochem. J.* **2002**, *367*, 697–702.
- (13) Newman, J. R.; Keating, A. E. Comprehensive Identification of Human bZIP Interactions with Coiled-Coil Arrays. *Science* **2003**, *300*, 2097–2101.
- (14) Kiyonaka, S.; Sada, K.; Yoshimura, I.; Shinkai, S.; Kato, N.; Hamachi, I. Semi-Wet Peptide/Protein Array using Supramolecular Hydrogel. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 58–64.
- (15) Chan, S. M.; Ermann, J.; Su, L.; Fathman, G.; Utz, P. J. Protein Microarrays for Multiplex Analysis of Signal Transduction Pathways. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 1390–1396.
- (16) Vorderwulbecke, S.; Cleverley, S.; Weinberger, S. R.; Wisener, A. Protein Quantification by the SELDI-TOF-MS-Based Protein Chip System. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 393–395.
- (17) Funeriu, D.; Eppinger, J.; Denizot, L.; Miyake, M.; Miyake, J. Enzyme Family Specific and Activity-Based Screening of Chemical Libraries using Enzyme Microarrays. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 622–627.
- (18) Fang, Y.; Frutos, A. G.; Lahiri, J. Membrane Protein Microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2394–2395.
- (19) Fang, Y.; Frutos, A. G.; Webb, B.; Hong, Y.; Ferrie, A.; Lai, F.; Lahiri, J. Membrane Biochips. *BioTechniques* **2002**, *33*, S62–S65.
- (20) Fang, Y.; Lahiri, J.; Picard, L. G. Protein-Coupled Receptor Microarrays for Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 755–761.
- (21) Groves, J. T.; Boxer, S. G. Micropattern Formation in Supported Lipid Membranes. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 149–157.
- (22) Kusnezow, W.; Hoheisel, J. D. Antibody Microarrays: Promises and Problems. *BioTechniques* **2002**, *33*, S14–S23.
- (23) Inamori, K.; Kyo, M.; Nishiyama, Y.; Inoue, Y.; Sonoda, T.; Kinoshita, E.; Koike, T.; Katayama, Y. Detection and Quantification of On-Chip Phosphorylated Peptides by Surface Plasmon Resonance Imaging Techniques using a Phosphate Capture Molecule. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3979–3985.
- (24) Houseman, B. T.; Huh, J. H.; Kron, S. J.; Mrksich, M. Peptide Chips for the Quantitative Evaluation of Protein Kinase Activity. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270–274.
- (25) Pellois, J. P.; Zhou, X.; Srivannavit, O.; Zhou, T.; Gulari, E.; Gao, X. Individually Addressable Parallel Peptide Synthesis on Microchips. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 922–926.
- (26) Kuruvilla, F. G.; Shamji, A. F.; Sternson, S. M.; Hergenrother, P. J.; Schreiber, S. L. Dissecting Glucose Signaling with Diversity-Oriented Synthesis and Small-Molecule Microarrays. *Nature* **2002**, *416*, 653–657.
- (27) Wang, D.; Liu, S.; Trummer, B. J.; Deng, C.; Wang, A. Carbohydrate Microarrays for the Recognition of Cross-Reactive Molecular Markers of Microbes and Host Cells. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 275–281.
- (28) Housemann, B. T.; Mrksich, M. Carbohydrate Arrays for the Evaluation of Protein Binding and Enzymatic Modification. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443–454.
- (29) Fukui, S.; Feizi, T.; Galustian, C.; Lawson, A. M.; Chai, W. Oligosaccharide Microarrays for High-Throughput Detection and Specificity Assignments of Carbohydrate-Protein Interactions. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011–1017.
- (30) Fall, B. I.; Eberlein-Konig, B.; Behrendt, H.; Niessner, R.; Ring, J.; Weller, M. G. Microarrays for the Screening of Allergen-Specific IgE in Human Serum. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 556–562.
- (31) Ito, Y.; Yamauchi, T.; Omura, K. Development of Microarray Biochip Using Photoimmobilization Method. *Kobunshi Ronbunshu* (in Japanese) **2004**, *61*, 501–510.
- (32) Ito, Y.; Kondo, S.; Chen, G.; Imanishi, Y. Patterned Artificial Juxtacrine Stimulation of Cells by Covalently Immobilized Insulin. *FEBS Lett.* **1997**, *403*, 159–162.
- (33) Chen, G.; Ito, Y.; Imanishi, Y. Photo-Immobilization of Epidermal Growth Factor Enhances its Mitogenic Effect by Artificial Juxtacrine Signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1358*, 200–208.
- (34) Ito, Y.; Chen, G.; Imanishi, Y. Micropatterned Immobilization of Epidermal Growth Factor To Regulate Cell Function. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 277–282.
- (35) Ito, Y. Surface Micropatterning To Regulate Cell Functions. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2333–2342.
- (36) Ito, Y.; Hasuda, H.; Yamauchi, T.; Komatsu, N.; Ikebuchi, K. Immobilization of Erythropoietin to Culture Erythropoietin-dependent Human Leukemia Cell Line. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2293–2298.
- (37) Chen, G.; Ito, Y. Gradient Micropattern Immobilization of EGF to Investigate the Effect of Artificial Juxtacrine Stimulation. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2453–2457.
- (38) Ito, Y.; Hasuda, H.; Terada, H.; Kitajima, T. Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells on Immobilized Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, *74*, 659–665.
- (39) Sigrist, H.; Collioud, A.; Clemence, J. F.; Luginbuhl, R.; Sanger, M.; Sundarababu, G. Surface Immobilization of Biomolecules by Light. *Opt. Eng.* **1995**, *34*, 2339–2348.
- (40) Barie, N.; Rapp, M.; Sigrist, H.; Ache, H. J. Covalent Photolinker-Mediated Immobilization of an Intermediate Dextran Layer to Polymer-Coated Surfaces for Biosensing Applications. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 855–860.
- (41) Chevolut, Y.; Marrins, J.; Milosevic, N.; Leonard, D.; Zeng, S.; Mallissard, M.; Berger, E. G.; Maier, P.; Mathieu, H. J.; Grout, D. H. G.; Sigrist, H. Immobilization on Polystyrene of Diazirine Derivatives of Mono- and Disaccharides: Biological Activities of Modified Surfaces. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2943–2945.
- (42) Caeole, I.; Gao, H.; Sigrist, H. Protein Density Gradients on Surfaces. *Langmuir* **2002**, *18*, 2463–2467.
- (43) Angeloni, S.; Ridet, J. L.; Kusy, N.; Gao, H.; Crevoisier, F.; Guinchar, S.; Kochhar, S.; Sigrist, H.; Sprenger, N. Glycoprofiling with Microarray of Glycoconjugates and Lectins. *Glycobiology* **2005**, *15*, 31–41.
- (44) Matsuda, T.; Sugawara, T. Photochemical Protein Fixation on Polymer Surfaces via Derivatized Phenyl Azido Group. *Langmuir* **1995**, *11*, 2272–2276.
- (45) Mizutani, M.; Arnold, S. C.; Matsuda, T. Liquid, Phenylazide-End-Capped Copolymers of Epsilon-Caprolactone and Trimethylene Carbonate: Preparation, Photocuring Characteristics, and Surface Layering. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 668–675.
- (46) Miller, J. C.; Zhou, H.; Kwekei, J.; Cavallo, R.; Burke, J.; Butler, E. D.; Teh, B. S.; Haab, B. B. Antibody Microarray Profiling of Human Prostate Cancer Sera: Antibody Screening and Identification of Potential Markers. *Proteomics* **2003**, *3*, 56–63.
- (47) Prucker, O.; Naumann, C. A.; Rihe, J.; Knoll, W.; Frank, C. W. Photochemical Attachment of Polymer Films to Solid Surfaces via Monolayers of Benzophenone Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8766–8770.
- (48) Kanoh, N.; Kumashiro, S.; Simizu, S.; Kondoh, Y.; Hatakeyama, S.; Tashiro, H.; Osada, H. Immobilization of Natural Products on Glass Slides by Using a Photoaffinity Reaction and the Detection

- of Protein–Small-Molecule Interaction. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 5584–5587.
- (49) Kanoh, N.; Honda, K.; Simizu, S.; Muroi, M.; Osada, H. Photo-Cross-Linked Small-Molecule Affinity Matrix for Facilitating Forward and Reverse Chemical Genetics. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3559–3562.
- (50) Kanoh, N.; Kyo, M.; Inamori, K.; Ando, A.; Asami, A.; Nakao, A.; Hiroyuki Osada, H. SPR Imaging of Photo-Cross-Linked Small-Molecule Arrays on Gold. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2226–2230.
- (51) Chen, G.; Ito, Y.; Imanishi, Y.; Magnani, A.; Lamponi, S.; Barbucci, R. Photoimmobilization of Sulphated Hyaluronic Acid for Antithrombogenicity. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 730–734.
- (52) Ito, Y.; Chen, G.; Imanishi, Y. Artificial Juxtacrine Stimulation for Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1998**, *8*, 879–890.
- (53) Park, Y. S.; Ito, Y. Micropattern Immobilization of Heparin To Regulate Cell Growth with Fibroblast Growth Factor (FGF). *Cytotecology* **2000**, *33*, 117–122.
- (54) Ito, Y.; Hayashi, M.; Imanishi, Y. Gradient Micropattern Immobilization of Heparin and its Interaction with Cells. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2001**, *12*, 367–378.
- (55) Kang, I.-K.; Kim, G. J.; Kwon, O. H.; Ito, Y. Co-culture of Hepatocytes and Fibroblasts by Micro-Patterned Immobilization of β -Galactose Derivatives. *Biomaterials* **2004**, *25*, 4225–4232.
- (56) Hasuda, H.; Kwon, O. H.; Kang, I.-K.; Ito, Y. Synthesis of Photoreactive Pullulan for Surface Modification. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2401–2406.
- (57) Ito, Y.; Nogawa, M. Preparation of a Protein Microarray Using a Photoreactive Polymer for a Cell Adhesion Assay. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3021–3026.
- (58) Ito, Y.; Nogawa, M.; Takeda, M.; Shibuya, T. Photoreactive Polyvinylalcohol for Photoimmobilized Microarray. *Biomaterials* **2005**, *26*, 211–216.
- (59) Konno, T.; Hasuda, H.; Ishihara, K.; Ito, Y. Photoimmobilization of a Phospholipids Polymer. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1381–1388.
- (60) Ito, Y.; Yamauchi, T.; Uchikawa, M.; Ishikawa, Y. Photoimmobilized Array of Panel Cells for Assay of Antibodies. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2502–2506.
- (61) Ohyama, K.; Omura, K.; Ito, Y. A Photoimmobilized Allergen Microarray for Screening of Allergen-Specific IgE. *Allergol. Int.* **2005**, *54*, 627–631.
- (62) Anderson, D. G.; Levenberg, S.; Langer, R. Nanoliter-Scale Synthesis of Arrayed Biomaterials and Application for Human Embryonic Stem Cells. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 863–866.
- (63) Anderson, D. G.; Putnam, D.; Lavik, E. B.; Mahmood, T. A.; Langer, R. Biomaterials Microarrays: Rapid, Microscale Screening of Polymer-Cell Interaction. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4892–4897.
- (64) Ito, Y.; Liu, S. Q.; Imanishi, Y. Enhancement of Cell Growth on Growth-Factor-Immobilized Polymer Film. *Biomaterials* **1991**, *12*, 449–453.
- (65) Ito, Y.; Zheng, J.; Imanishi, Y.; Yonezawa, K.; Kasuga, M. Protein-Free Cell Culture on Artificial Substrate with Covalently Immobilized Insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 3598–3601.
- (66) Ito, Y.; Li, L.-S.; Takahashi, T.; Imanishi, Y.; Okabayashi, Y.; Kido, Y.; Kasuga, M. Enhancement of the Mitogenic Effect by Artificial Juxtacrine Stimulation Using Immobilized EGF. *J. Biochem.* **1997**, *121*, 514–520.
- (67) Ito, Y.; Chen, G.; Imanishi, Y.; Morooka, T.; Nishida, E.; Okabayashi, Y.; Kasuga, M. Differential Control of Cellular Expression by Diffusible and Non-Diffusible EGF. *J. Biochem.* **2001**, *129*, 733–737.
- (68) Belov, L.; de la Vega, O.; dos Remedios, C. G.; Mulligan, S. P.; Christopherson, R. I. Immunophenotyping of Leukemias Using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4483–4489.
- (69) Belov, L.; Huang, P.; Barber, N.; Mulligan, S. P.; Christopherson, R. I. Identification of Repertoires of Surface Antigens on Leukemias Using an Antibody Microarray. *Proteomics* **2003**, *3*, 2147–2154.
- (70) Zhang, C. X.; Liu, H. P.; Tang, Z. M.; He, H. Y.; Lu, Z. H. Cell Detection Based on Protein Array Using Modified Glass Slides. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3279–3283.
- (71) Ko, I. K.; Kato, K.; Iwata, H. Antibody Microarray for Correlating Cell Phenotype with Surface Marker. *Biomaterials* **2005**, *26*, 687–696.
- (72) Ko, I. K.; Kato, K.; Iwata, H. Parallel Analysis of Multiple Surface Markers Expressed on Rat Neutral Stem Cells Using Antibody Microarrays. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4882–4891.
- (73) Robinson, W. H.; DiGennaro, C.; Hueber, W.; Haab, B. B.; Kamachi, M.; Dean, E. J.; Fournel, S.; Fong, D.; Genovese, M. C.; de Vegvar, H. E.; Skriner, K.; Hirschberg, D. L.; Morris, R. I.; Muller, S.; Pruijn, G. J.; van Venrooij, W. J.; Smolen, J. S.; Brown, P. O.; Steinman, L.; Utz, P. J. Autoantigen Microarrays for Multiplex Characterization of Autoantibody Responses. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 295–301.
- (74) Robinson, W. H.; Fontoura, P.; Lee, B. J.; de Vegvar, H. E.; Tom, J.; Pedotti, R.; DiGennaro, C. D.; Mitchell, D. J.; Fong, D.; Ho, P. P.; Ruiz, P. J.; Mavarakis, E.; Stevens, D. B.; Bernard, C. C.; Martin, R.; Kuchroo, V. K.; van Noort, J. M.; Genain, C. P.; Amor, S.; Olsson, T.; Utz, P. J.; Garren, H.; Steinman, L. Protein Microarrays Guide Tolerizing DNA Vaccine Treatment of Autoimmune Encephalomyelitis. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1033–1039.
- (75) Lueking, A.; Possling, A.; Huber, O.; Beveridge, A.; Horn, M.; Eickhoff, H.; Schuchardt, J.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. A Nonredundant Human Protein Chip for Antibody Screening and Serum Profiling. *Mol. Cell Proteomics* **2003**, *2*, 1342–1349.
- (76) Neuman de Vegvar, H. E.; Amara, R. R.; Steinman, L.; Utz, P. J.; Robinson, H. L.; Robinson, W. H. Microarray Profiling of Antibody Responses against Simian-Human Immunodeficiency Virus: Postchallenge Convergence of Reactivities Independent of Host Histocompatibility Type and Vaccine Regimen. *J. Virol.* **2003**, *77*, 11125–11138.
- (77) Kim, T. E.; Park, S. W.; Cho, N. Y.; Choi, S. Y.; Yong, T. S.; Nahm, B. H.; Lee, S.; Noh, G. Quantitative Measurement of Serum Allergen-Specific IgE on Protein Chip. *Exp. Mol. Med.* **2002**, *34*, 152–158.
- (78) Wiltshire, S.; O'Malley, S.; Lambert, J.; Kukanskis, K.; Edgar, D.; Kingsmore, S. F.; Schweitzer, B. Detection of Multiple Allergen-Specific IgEs on Microarrays by Immunoassay with Rolling Circle Amplification. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1990–1993.
- (79) Hiller, R.; Laffer, S.; Harwanegg, C.; Huber, M.; Schmidt, W. M.; Twardosz, A.; Barletta, B.; Becker, W. M.; Blaser, K.; Breiteneder, H.; Chapman, M.; Cramer, R.; Duchene, M.; Ferreira, F.; Fiebig, H.; Hoffmann-Sommergruber, K.; King, T. P.; Kleber-Janke, T.; Kurup, V. P.; Lehrer, S. B.; Lidholm, J.; Muller, U.; Pini, C.; Reese, G.; Scheiner, O.; Scheynius, A.; Shen, H. D.; Spitzauer, S.; Suck, R.; Swoboda, I.; Thomas, W.; Tinghino, R.; Van Hage-Hamsten, M.; Virtanen, T.; Kraft, D.; Muller, M. W.; Valenta, R. Microarrayed Allergen Molecules: Diagnostic Gatekeepers for Allergy Treatment. *FASEB J.* **2002**, *16*, 414–416.
- (80) Harwanegg, C.; Laffer, S.; Hiller, R.; Mueller, M. W.; Kraft, D.; Spitzauer, S.; Valenta, R. Microarrayed Recombinant Allergens for Diagnosis of Allergy. *Clin. Exp. Allergy* **2003**, *33*, 7–13.
- (81) Feng, Y.; Ke, X.; Ma, R.; Chen, Y.; Hu, G.; Liu, F. Parallel Detection of Autoantibodies with Microarrays in Rheumatoid Diseases. *Clin. Chem.* **2002**, *50*, 416–422.
- (82) Robinson, W. H.; Steinman, L.; Utz, P. J. Protein and Peptide Array Analysis of Autoimmune Disease. *BioTechniques* **2002**, *33*, S66–S69.
- (83) Fathman, C. G.; Soares, L.; Chan, S. M.; Utz, P. J. An Array of Possibilities for Study of Autoimmunity. *Nature* **2005**, *435*, 605–611.
- (84) Mezzasoma, L.; Bacarese-Hamilton, T.; Cristina, M. D.; Rossi, R.; Bistoni, F.; Crisanti, A. Antigen Microarrays for Serodiagnosis of Infectious Diseases. *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 121–130.
- (85) Bacarese-Hamilton, T.; Bistoni, F.; Crisanti, A. Protein Microarrays: From Serodiagnosis to Whole Proteome Scale Analysis of the Immune Response against Pathogenic Microorganisms. *BioTechniques* **2002**, *33*, S24–S29.
- (86) Schwenk, J. M.; Stoll, D.; Templin, M. F.; Joos, T. O. Cell Microarrays: An Emerging Technology for the Characterization of Antibodies. *BioTechniques* **2002**, *33*, S54–S61.

Accepted for publication May 17, 2006.

BP060143A

新機能性核酸・タンパク質を生み出す コンビナトリアル・バイオエンジニアリング

阿部 洋・和田 章・伊藤 嘉浩*

コンビナトリアル・バイオエンジニアリングは、化学とバイオテクノロジーを融合した新しい手法として、これからの「ものづくり」になくはならない。ダーウィンの進化論の「突然変異」、「自然淘汰」、「増殖」のサイクルをそのまま対応させたプロセスを分子レベルで試験管内で行うことで、さまざまな新しい機能性核酸やタンパク質・ペプチドの合成が可能であることがわかってきた。無生物で増殖させることができる DNA を有効に使うことで、図1に示すような進化分子工学が可能となる。試験管内で行えるため、有機合成した非天然ヌクレオチドや非天然アミノ酸を組み込むことも可能になる。ここでは、これら手法を用いた機能性高分子創製の最前線を解説する。

核酸のインビトロセクション

核酸の試験管内進化法 (*in vitro* selectionあるいは systematic evolution of ligands by exponential enrichment; SELEX) は、ランダム配列の核酸ライブラリー(「突然変異」)から出発し、アフィニティーカラムによる選別(「淘汰」)をへ、「増殖」にあたる PCR による核酸の増幅を行うことにより、1 サイクルが完了する。このサイクルを繰り返すことにより、標的分子に高い結合能を有する配列のみが生き残り、増殖することになる。本過程で得られる結合性の核酸分子は aptamer (アプタ

マー) と呼ばれる。現在までに、さまざまなタンパク質や低分子化合物に結合するアプタマーが得られている (<http://aptamer.icbm.utexas.edu/>)。

この試験管内進化法の選別のステップを工夫することにより、現在までに単に結合するだけに限らずさまざまな機能性分子が獲得されている^{1,2)}。その中でもとくに興味深いものが触媒機能をもつ核酸分子である。

触媒機能を有するオリゴ核酸を探索する方法には二つの方法がある。一つは間接法と呼ばれ、抗体触媒と同じように遷移状態アナログをターゲット分子として、これに結合する分子を得る方法である。たとえば、抗体触媒でも試された、平面状のポルフィリンが少し歪んだ構造をとるメチルメソポルフィリンを遷移状態アナログとして、これと結合する RNA や DNA が得られた。これらのメチルポルフィリン結合性核酸は、ポルフィリンに対するメタレーション反応を加速した³⁾。また、コレステロールとパラニトロベンゼンアルコールのリン酸ジエステルを遷移状態アナログとして、獲得された RNA は、同基質の炭酸エステルの加水分解反応を触媒した³⁾。

もう一つの方法は直接法と呼ばれる。たとえば、基質をビオチンでラベル化して、ランダム配列の核酸分子ライブラリーと反応させる。ライブラリーの中で基質と自己触媒反応により結合する核酸配列はビオチンラベル化され、アビジン結合担体で回収される。この方法では、アミド結合やエステル結合形成反応、さらには Diels-Alder 反応を触媒するオリゴ核酸などが得られている。我々の研究室では、この直接法を用いて、中性環境下でのみ活性のあるリボザイムを酸性条件下で活性を持つように調整することに成功している⁴⁾。

非天然核酸組み込み

天然ヌクレオチドは4種類に限られているが、新たに合成した非天然ヌクレオチドを用いて、進化分子工学により新しい機能性オリゴ核酸を合成することができる⁵⁾。

非天然核酸を機能性高分子に組み込むには、二つの方法がある。一つは、すでに機能がある天然オリゴ核酸の一部を非天然核酸に置換する方法で、ポスト修飾法とい

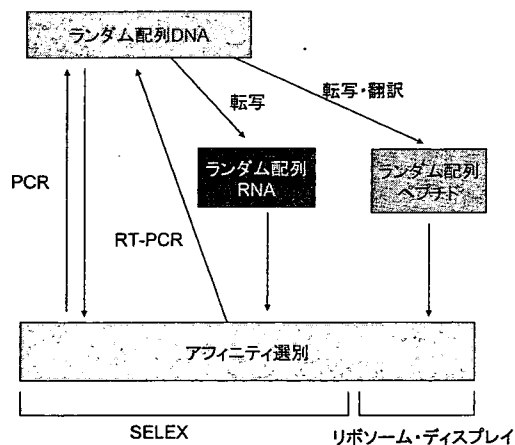


図1. 核酸とペプチドの進化分子工学

* 著者紹介 (独) 理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室 (主任研究員) E-mail: y-ito@riken.jp

える。Vesterらは、DNAzymeに彼らが開発したLNA (LOCKed nucleic acid) 構造に置換し、安定性の高いLNAzymeを考案している⁴⁾。

もう一つは、非天然ヌクレオチドアナログをポリメラーゼの基質として、直接試験管内分子進化の過程に組み込む方法である。これまでに、さまざまなヌクレオチドアナログを用いて本手法が適用されてきた。たとえば、Ellingtonらは、蛍光基を導入したヌクレオチドを用いて類似の選別を行い、分析対象物を分子認識すると蛍光強度が変化するセンサーアプタマーを獲得した⁵⁾。非天然ヌクレオチドを導入した核酸触媒の最初の例としては、イミダゾール基を導入したヌクレオチドを用いた試験管内進化法で、Diels-Alder反応を触媒するリボザイムが調製された⁶⁾。これは、非天然ヌクレオチドを用いた進化分子工学の最初の例で、大きなインパクトを与えた。我々は、2'位に水酸基の代わりにアミノ基をもつポルフィリン・メタレーションを触媒するリボザイムをRNAの代わりに得て、過酸化水素の還元反応を触媒するペルオキシダーゼとして働くことを示したり、

Ellingtonらは、最近、2'OMeリボヌクレオチドアナログを基質として効率よく鎖伸長できる変異型T7RNAポリメラーゼを開発した⁷⁾。さらに、Keefeらは、変異型T7RNAポリメラーゼを用いて、すべて2'-OMeRNA骨格からなるアプタマーを創出した⁸⁾。このアプタマーはVGEF (vascular endothelial growth factor) を標的としており、2'-OMeRNAの高い生体内安定性から有望な核酸医薬となり得る。今後、さまざまな非天然ヌクレオチドを含むオリゴ核酸ライブラリーが調製され、そこからの選別が行われるようになれば、これまで考えられなかった新しい機能性触媒も種々生まれてくる可能性がある。

タンパク質・ペプチドのインビトロセクション

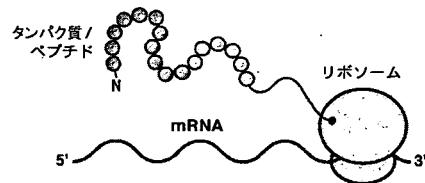
核酸のインビトロセクションは、PCRなどによる複製と増幅が可能であることから飛躍的に発展してきた。しかし、機能性タンパク質を選択する場合、この増幅法が適応できない。それゆえ、微量のタンパク質をいかにして回収し、どのようにアミノ酸配列を決定するかが大きな問題であった。そこで、表現型としてのタンパク質とその情報を記録している遺伝子型としてのmRNA/DNAを連結した複合体(対応付け分子)を作製し、それらを選択実験に利用するという概念が生まれた。つまり、対応付け分子のタンパク質部位の機能により選択した後、その核酸部位を回収・解析することで、目的の機能性生体分子を同定するという手法である。これにより、

対応付け分子の作製と選択操作以外は、核酸の試験管内進化サイクルの操作をそのまま適応することができるようになった。

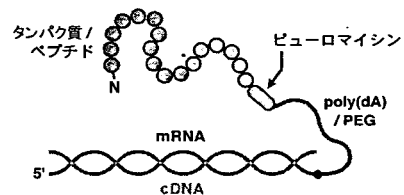
現在、この原理を基礎として開発された試験管内分子選択法⁹⁾として、リボソームディスプレイ法、mRNAディスプレイ/*in vitro* virus (IVV) 法、*in vitro* compartmentalization (IVC) 法が報告されている。これらの技術では、無細胞転写・翻訳系を採用しており、すべての実験操作が試験管内レベルで迅速に遂行できるように設計されている。

リボソームディスプレイ法 一般にリボソームは、タンパク質をコードするmRNA上を移動しながら翻訳を行い、終止コドンに出会うことで遊離し、翻訳は終了する。しかし、リボソームディスプレイ法では、mRNAの終止コドンを取り除くことでリボソームの遊離を抑制し、表現型と遺伝子型を結合させたタンパク質/ペプチド-リボソーム-mRNA対応付け分子を形成させる(図2-1)。そして、この対応付け分子に提示するタンパク質/ペプチドにランダム配列を導入したライブラリーを構築し、標的分子に対する結合性を条件にしてスクリーニングを行えば、目的の生体分子を選択することが可能となる。たとえば、Plückthum¹⁰⁾らは、超可変領域にラン

1. Ribosome display



2. mRNA display / in vitro virus (IVV)



3. in vitro compartmentalization (IVC)

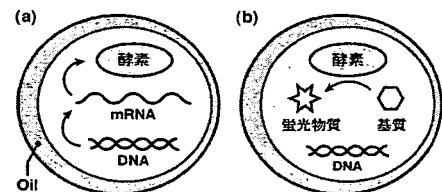


図2. 試験管内分子選択法における対応付け分子

ダム配列を挿入した一本鎖抗体scFvライブラリー(～10¹²種類)を作製し、各種抗原(インスリン/フルオレセイン/GCN4ペプチド)に対する親和性を指標にしたスクリーニング実験を行った。その結果、いずれの抗原においてもpMオーダーの解離定数を有する高親和性scFvの選択に成功した。

mRNAディスプレイ/*in vitro* virus (IVV) 法 これらの方法では、ピューロマイシンをmRNAの3'末端にpoly(dA)もしくはPEGリンカーを介して結合させた後、翻訳したタンパク質のC末端とピューロマイシンをリボソーム内にて反応させる。その結果、リボソームの解離により、表現型と遺伝子型が共有結合により連結したタンパク質-mRNA対応付け分子が形成される(図2-2)。さらに、高次構造を取りやすい一本鎖RNA部分を逆転写することにより、cDNA-mRNAの二本鎖核酸へと変換する。これにより、構造的剛直性の獲得と共にRNAアダプターの選択が抑制され、より信頼度の高い選択実験を行うことが可能となった。たとえば、Szostak¹¹⁾らは、80アミノ酸の完全なランダムペプチド配列(6×10¹²種類)のmRNAライブラリーから、新たなATP結合性タンパク質の選択に成功している。一方、柳川¹²⁾らは、IVV法をゲノムネットワーク解析に応用しており、マウスcDNAを元に作製したmRNAライブラリーから、Fosタンパク質と相互作用する既知および候補タンパク質を同定している。

***In vitro* compartmentalization (IVC) 法** この方法では、無細胞転写・翻訳に必要な因子と酵素をコードするDNAライブラリーをエマルジョン(w/o型)液滴内に閉じこめることで、表現型と遺伝子型を対応付けている(図2-3a)。つまり、1個のエマルジョン内(直径～2.6μm)に1分子のDNAのみが存在するように調整されており、翻訳された酵素を完全に区画化された環境で機能させることができる。これにより、液滴内の基質に対する反応性を条件にして、より高い触媒機能を発現する酵素を選択することが可能となった。Griffiths^{9,13)}らは、基質から蛍光性物質を生成する反応とその反応を触媒する酵素(DNAメチルトランスフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼなど)のライブラリーを組み合わせたIVC選択システムを数多く構築している。そこでは、ライブラリーとしてのエマルジョンの調整→転写→翻訳→酵素反応(図2-3b)を行った後、FACS(fluorescence activated cell sorting)

によりエマルジョン(w/o/w型)を単離する。このとき、触媒機能を反映した蛍光量を基準にしてエマルジョンを分取するため、触媒活性が向上・進化した酵素のみを選択することが可能となる。

非天然タンパク質・ペプチドへ

最近では、非天然アミノ酸をランダムな位置に導入したタンパク質/ペプチドライブラリーの開発と選択実験への応用も検討されている。たとえば、宍戸・芳坂ら¹⁴⁾は、4塩基コドン法とmRNAディスプレイ法(図2-2)を組み合わせることにより、非天然アミノ酸導入ペプチドを提示したmRNAライブラリー(1×10¹²種類)を作製した。そして、ストレプトアビジンに対する結合性を指標にしてスクリーニング実験を行ったところ、非天然アミノ酸としてベンゾイルフェニルアラニンを含む親和性ペプチドを選択することに成功した。

今後、新たな機能性非天然アミノ酸の合成と試験管内分子選択システムへの応用により、天然アミノ酸では獲得し得なかった性質・機能(蛍光性、光感受性、化学反応性など)を有する人工タンパク質の創出が可能となる。そして、上記の天然・非天然核酸/アミノ酸を利用したコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの更なる進展は、高感度バイオセンサー・ナノ抗体・人工核酸医薬などをテラーメイドに創製する新たなバイオ技術の開発において、重要な役割を果たすであろう。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩: 化学工業, **53**, 430 (2002).
- 2) 伊藤嘉浩: ナノバイオテクノロジーの最前線(植田充美), p.78, シーエムシー出版(2003).
- 3) Chun, S. M. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10844 (1999).
- 4) Jhaveri, S. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **18**, 1293 (2000).
- 5) Tarasow, T. W. *et al.*: *Nature*, **389**, 54 (2000).
- 6) Vester, B. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13682 (2002).
- 7) Chelliserrykattil, J. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **22**, 1155 (2004).
- 8) Burmeister, P. E. *et al.*: *Chem. Biol.*, **12**, 25 (2005).
- 9) Leemhuis, H. *et al.*: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 472 (2005).
- 10) Lipovsek, D. and Plückthun, A.: *J. Immun. Methods*, **290**, 51 (2004).
- 11) Keefe, A. H. and Szostak, J. W.: *Nature*, **410**, 715 (2001).
- 12) Miyamoto-Sato, E. *et al.*: *Genome Res.*, **15**, 710 (2005).
- 13) Mastrobattista, E. *et al.*: *Chem. Biol.*, **12**, 1291 (2005).
- 14) Muranaka, N. *et al.*: *Nucleic Acid Res.*, **34**, e7 (2006).

アレルギー診断用 抗原マイクロアレイ・チップ

Allergen Microarray Chip for Allergy Diagnosis

- 1) (独) 理化学研究所
- 2) (財) 神奈川科学技術アカデミー
- 3) ヒラソルバイオ (株)

いとう よしひろ おおむら かおる
伊藤 嘉浩^{1, 2)}, 大村 馨³⁾

Key words : Allergy Diagnosis, Allergen, Microarray,
Photo-immobilization, IgE

Abstract

アレルギー治療の第一歩は、起因アレルゲンの特定である。我々は、これまで様々なアレルゲンを同一の方法で一枚のチップ上に固定化できる光固定化法を開発してきた。アレルゲンとなる様々な生体分子、有機分子を固定化できるため、簡単な自動化装置で抗体検査が可能となった。この成果を、社会還元するためにベンチャー企業が設立され、通常は抗体検査できないアレルギー反応も受託できるようになっている。エピトープ分析も含め、きめ細かな診断法への応用に向け、臨床家、臨床研究者との連携が期待される。

の負担が大きいため、試験管内試験が現在のアレルギー検査の主流となっている。中でも、測定が簡便なうえ、結果が客観的な数値として表れることから、血中の特異IgE抗体の測定が最も多く用いられている。アレルギー治療の第一歩は起因アレルゲンの特定であるため、特異IgE抗体のスクリーニング検査が注目されている。

表1には、現在主に市販あるいは開発されている検査法をまとめる。著者らは、わずかな血液量で、様々な抗原に対するアレルギーを一括して一度に検査できる比較的安価なシステムを、新しいタイプの抗原マイクロアレイ・チップ(ヒラソルチップ)を用いて可能にしたので、これについて解説する。

はじめに

アレルギー検査は、皮膚試験と試験管内試験に大別される。皮膚試験として、即時型アレルギーの検査にはプリックテスト、遅延型アレルギーの検査としてはパッチテストが最もよく行われる。しかし、皮膚試験は患者へ

1. マイクロアレイ技術

最近のライフサイエンスの研究は、材料の微細加工やナノテクノロジーの発展により新しい展開をみせつつある。DNAマイクロアレイ(DNAチップ)の出現は、バイオテクノロジーと微細加工技術の融合の賜物であ

表1 アレルギー検査法

	CAP	MAST	DiaPack	イムファスト チェック	ケンタウルス	ヒラソルチップ
1回での 検査種類	1種類	26→33種類	1種類	3種類	1種類	50種類以上 受託可*
検査時間	2時間40分	20→4時間	16→11分	20分	47分	40分 [→20]
血清量	40μl / 1種類	200μl / 26種類	50μl / 1種類	30μl / 3種類	25μl / 1種類	200μl / 50種類 [→100]
方式	ニトロセルロ ースプレート	セルロース糸	多孔性ガラス フィルター	免疫クロマト	鉄微粒子	マイクロアレイ
保険 (価格)	10種類まで 120点/1種	2000点	(1050円)	(3000円)		
装置価格	295万円	400万円	900万円	—		200万円

[] 内は開発中を示す。

*研究用、試験用に受託で様々なアレルゲン固定化マイクロアレイ・チップを作製可能

る。現在、遺伝子を解析するゲノミクスから、プロテオミクス、グリコミクス、セロミクス、メタボロミクスと解析対象範囲は拡張を続けており、バイオインフォマティクスの発展とともにますます重要になってきている^{1, 2)}。臨床診断の分野では、DNAマイクロアレイが欧州で認可を受けた。抗体マイクロアレイや特殊なタンパク質マイクロアレイは一部研究用に市販されるようになってはいるものの、一般的な生体分子をマイクロアレイしたバイオチップは開発途上である。

その原因は、DNAを固定化する場合に比べて、タンパク質などの生体分子を固定化するには、本質的に困難な点があることによる。DNAは多様な遺伝情報を担うものの、化学構造としてはほとんど類似の4塩基の配列が変わるだけで、ほぼ均質な高分子と考えるとよく、末端修飾も容易で、原理的に多種類のDNAを同一の固定化法で固定化することが

可能である。これに対し、タンパク質は、化学的に多様で、官能基の種類、量が異なる上に、分子上での存在場所もそれぞれ異なる。このため、同一の方法で一つの基板上に固定化するのは非常に困難である。

2. 光固定化法

そこで、筆者らは、このような問題点を解決するために光固定化法を考案した^{3, 4)}。この方法は、三つの特徴をもつ。

第一は、有機分子であれば「なんでも」マイクロアレイ固定化できることである。これは、ラジカル反応による架橋固定化反応であるため、可能となった。

第二は、固定化する際のマトリックスに非特異的な相互作用を弱める高分子を用いている点である。これにより高S/N比の特異的な相互作用解析が可能になった。

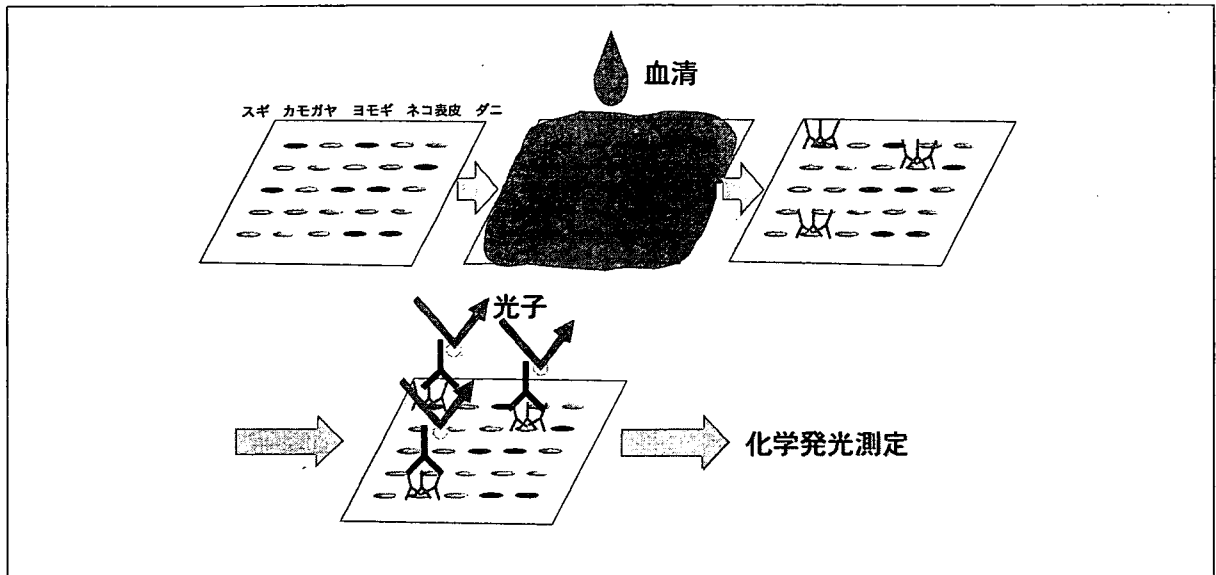


図1 アレルゲン・マイクロアレイを用いたIgEの検出法。マイクロアレイ・チップ上に血清を添加した後、洗浄し、抗ヒトIgEを反応させた後、化学発光のための試薬を加えて洗浄し、スポットの発光を測定する。

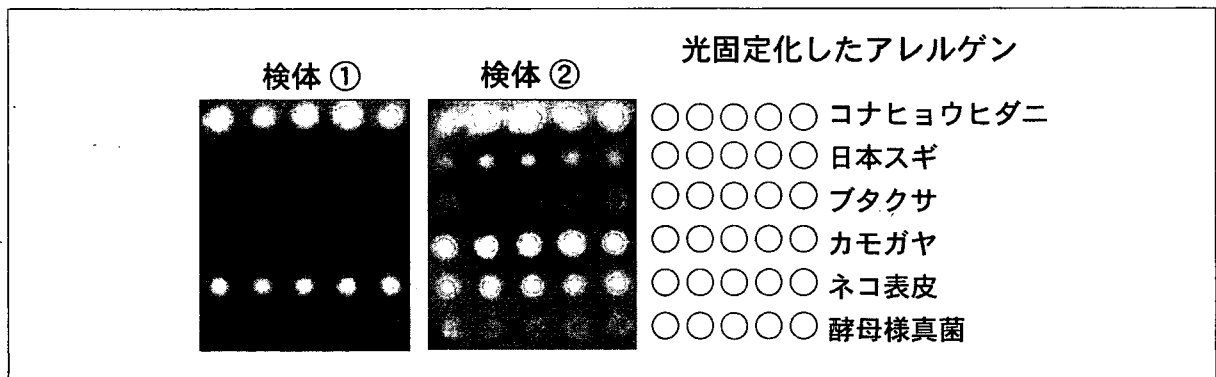


図2 アレルゲン・マイクロアレイを用いたIgEの検出例。発光量により検体中のIgE量を定量できる。

第三は、ランダムな配向性で固定化できることである。アレルゲンのように様々なエピトープ部位をもち、ポリクローナル抗体全体量を調べるためには、全エピトープ部位をランダムに露出させると非常に有利となる。

3. アレルゲン・マイクロアレイチップ

図1には、アレルゲンをマイクロアレイして、吸着するIgEを測定する方法を示す。マ

イクロアレイチップ上に血清を載せ、洗浄し、化学発光試薬を加えることで、どの固定化アレルゲンにIgEが吸着するかを特定することができる。図2には、測定結果の例を示す。

図3には、図1のプロセスを完全自動で行える装置を示す。チップを装填して、測定したい溶液（血清）を試験管に入れて装填するだけで、測定データを得ることができ、検体が、どのアレルゲンに対するIgEを含むかを一目で判定できる。

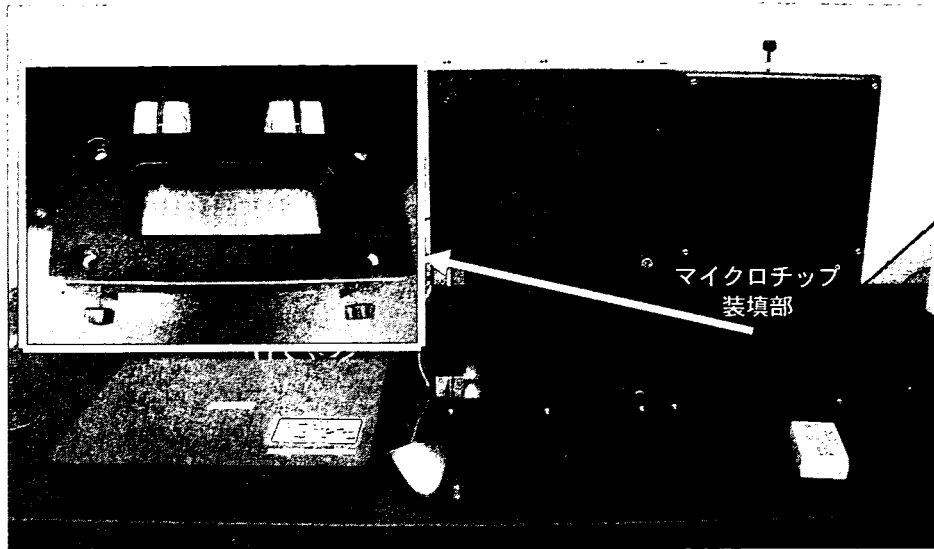


図3 光固定化マイクロチップ用自動測定装置。

おわりに

本研究は科学技術振興機構（JST）の大学発ベンチャー創出推進事業からの研究助成により行われた。現在、ヒラソルバイオ（株）がその成果を生かすために設立され、企業活動を行っている。多くの情報量を生み出すバイオチップは、これからの医療における重要性をますます増やすと考えられるが、まだチップ製造法には課題が多かった。

本稿で紹介した光固定化は、そのような問題を解決して、基盤技術としては完成できた。しかし、まだ搭載するコンテンツについては、

充分でないのが現状である。臨床家、臨床研究者の方々のご協力をいただき、日本発の世界初バイオチップ検査システムの構築を目指したい。

文献

- 1) 伊藤嘉浩：「バイオテクノロジー総覧」，通産資料出版会，p.662-670 (2005)
- 2) 伊藤嘉浩編集：「バイオインダストリー」特集，5,6月号，(2006)
- 3) 伊藤嘉浩，山内哲也，大村馨：高分子論文集，61：501-510，2004
- 4) Oyama, K., Omura, K., Ito, Y.: Allerg. Int. 54: 627-631, 2005

なんでも固定化バイオチップ

Everything-Immobilizable Biochip

伊藤嘉浩*¹ 大村 馨*²

光架橋反応で有機分子なら「なんでも」固定化できる方法を、マイクロアレイ・チップ作成に応用した。この方法により各種細胞、環境・食物アレルギー、自己免疫疾患関連抗原を固定化することができ、血液中に存在する各々に対応する抗体量を測定できた。さらに、測定を完全に自動化して行える装置も開発した。また、SPR や QCM 測定用のチップの固定化法にも利用できることを示した。

1. はじめに

最近のライフサイエンスの研究は、材料の微細加工やナノテクノロジーの発展により新たな展開が見られる。本特集でも主な部分を占める DNA マイクロアレイ (DNA チップ) の出現は、まさにバイオテクノロジーと微細加工技術の融合の賜物である。現在、遺伝子を解析するゲノミクスから、プロテオミクス、グリコミクス、セロミクス、メタボロミクスと解析対象範囲は拡張を続けており、バイオインフォマティクスの発展とともにますます重要になってきており、いよいよ臨床診断の分野でも DNA マイクロアレイは使用されるようになってきている。研究用には抗体マイクロアレイ、タンパク質マイクロアレイ、ペプチドマイクロアレイが市販され、多くの研究が行われているものの、まだ一般的なタンパク質や糖をマイクロアレイしたバイオチップは開発途上である¹⁾。

その原因は、DNA を固定化する場合に比べて、タンパク質などの生体分子を固定化するには、本質的に困難な点があることによる。DNA は多様な遺伝情報を担うものの、化学構造としてはほとんど類似の 4 塩基の配列が変わるだけで、ほぼ均質な高分子と考えてよく、末端修飾も容易で、原理的に多種類の DNA に同一の固定化法を利用することが可能である。これに対し、タンパク質は、化学的に多様で、官能基の種類、量が異なる上に、分子上での存在場所もそれぞれ異なる。このため、同一の方法で一つの基板上に固定化するのは非常に困難である (図 1)。

2. 光固定化法

そこで、筆者らは、このような問題点を解決するために光固定化法を考案した^{2, 3)}。この方法は、新たに合成した光反応性マトリックスを用いて生体分子を光架橋固定化するもので、次の 3 つの特

*¹Yoshihiro Ito 物理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員；(財)神奈川科学技術アカデミー 伊藤「再生医療バイオリアクター」プロジェクト プロジェクトリーダー

*²Kaoru Omura ヒラソルバイオ(株) 代表取締役

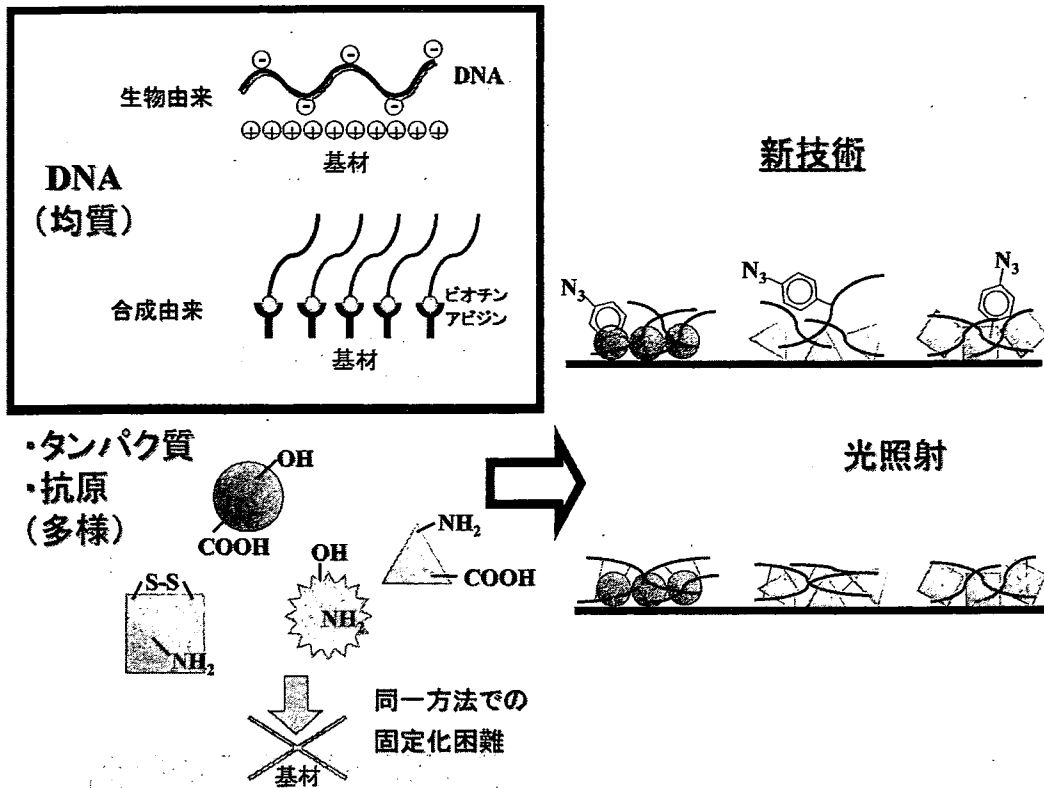


図1 DNAは異なる種類でも同じ方法でマイクロアレイ固定化できるが、タンパク質は種類が異なると同じ方法では困難なため、新しく光固定化法を開発した

徴をもつ。

①有機分子であれば「なんでも」マイクロアレイ固定化できること。ラジカル反応による架橋で固定化するため、可能となった。

②固定化する際のマトリックスにポリエチレングリコールのような両親媒性高分子を用い非特異的な相互作用を弱めている。これにより高S/N比の特異的な相互作用解析が可能になった。

③生体分子をランダムな配向性で固定化できることである(図2)。従来の共有結合による固定化法では、基板側にカルボキシル基を用いると固定化される生体分子のアミノ基を介して固定化することになり、固定化される分子の配向性はアミノ基の分布に依存する。タンパク質工学によって、固定化用の配列を導入しても、一定の配向性となる。このような従来の方法と異なり、様々な生体分子相互作用を相互作用部位に関係なく網羅的に調べ上げることができる。この技術が広く応用さ

れるようになると、従来の固定化技術を用いた生体分子相互作用研究が、果たして真の相互作用解析になっていたかさえ問題となる可能性がある。一方、応用的な側面からは、アレルゲンのように様々なエピトープ部位をもち、ポリクローナル抗体全量を調べるためには、全エピトープ部位をランダムに露出させることから非常に有利となる。

3. 光固定化マイクロアレイの展開

このような特徴をもつ光固定化法は、特に抗体を検出することに有効と考えられる。ここでは、これまでに行ってきた細胞固定化と、アレルゲンや自己免疫疾患関連抗原の固定化の場合について述べる。

3.1 細胞固定化マイクロアレイチップ

輸血の際には血液型の一致が重要になる。A型血液(赤血球)型のヒトは抗A抗体は持たな

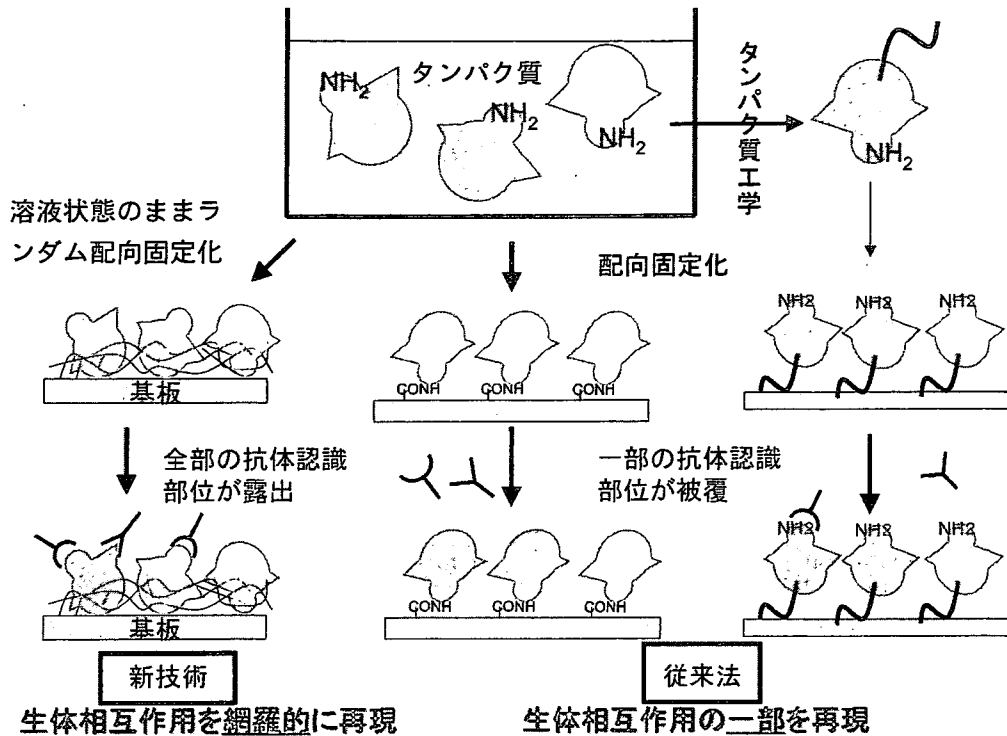


図2 光固定化法では、従来の化学固定化法や、組換えタンパク質を用いた方法と異なり、生体分子のランダム配向固定化が可能。通常の化学固定化法では、タンパク質中の官能基の分布によって配向性が決まる。タンパク質工学的にアンカー配列を導入した場合は、タンパク質のN端あるいはC端が基板に結合し、この周辺は表面には露出しないことになる

パネル血球の配置

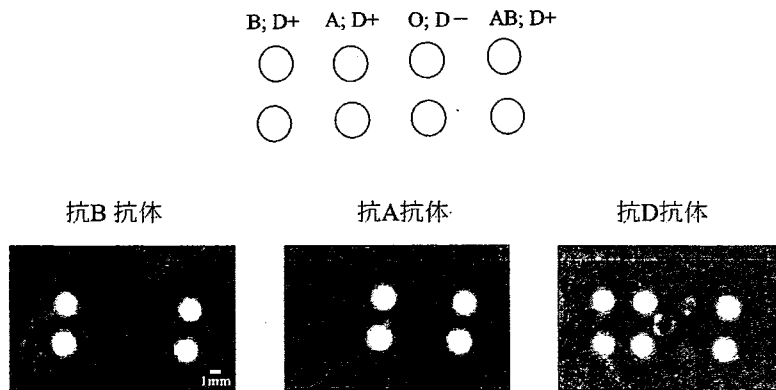


図3 パネル血球をマイクロアレイ固定化した基板への各種抗体の結合
 上段にはマイクロスポットした異なる血液型のパネル血球のチップ上での配置を示す。下段には、各々の抗体との接触後のチップの化学発光の様子を示す。抗体結合スポットで発光が観察された。(協力：日本赤十字社)

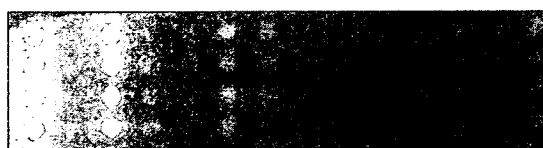
表1 アレルギー検査法の比較

	CAP	MAST	DiaPack	イムファスト チェック	ケンタウルス	ヒラソルチップ
1回での検査 種類	1種類	26→33種類	1種類	3種類	1種類	50種類以上 受託可*
検査時間	2時間40分	20→4時間	16→11分	20分	47分	40分 (→20)
血清量	40 μ l/1種類	200 μ l/26種類	50 μ l/1種類	30 μ l/3種類	25 μ l/1種類	200 μ l/50種類 (→100)
方式	ニトロセルロー スプレート	セルロース糸	多孔性ガラス フィルター	免疫クロマト	鉄微粒子	マイクロアレイ
保険(価格)	10種類まで	2,000点	(1,050円)	(3,000円)		
装置価格	295万円	400万円	900万円	—		200万円

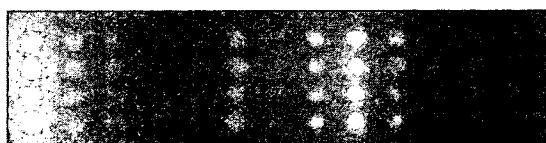
() 内は開発中を示す。

* 研究用, 試験用に受託で様々なアレルゲン固定化マイクロアレイ・チップを作製可能。

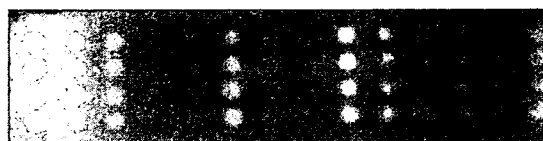
検体No.1
(スギ、カモガヤに対して陽性)



検体No.2
(スギ、牛乳に対して陽性)



検体No.3
(スギ、ダニに対して陽性)



スギ
カモガヤ
ヤケヒヨウダニ
ブタクサ
ヨモギ
カンジダ
イヌのフケ
ネコのフケ
牛乳
卵白
大豆
エビ
米
小麦

図4 アレルゲン・マイクロアレイを用いたIgEの検出例
発光量により検体中のIgE量を定量できる。(協力: 相模原病院)

いものの、抗B抗体を持つため、B型血液(赤血球)と混ぜると抗原抗体反応して凝集が起こる。B型のヒトの場合、抗A抗体をもつのでA型血液と混合すると凝集が起こる。このような現象を血液型のわかった赤血球を光反応性マトリックス

と混合し、マイクロアレイした後乾燥し、光を照射して固定化することにより調べることができた⁴⁾。図3には、パネル血球を固定化しておいて抗体を反応させた例を示す。

妊娠や過去の輸血により変わることがある不規

則抗体が現れる場合があり、輸血の際に調べる必要がある。そのために、現在は、凝集法による確認が行われているが、これを簡便にするために、本研究のようなパネル血球を光固定マイクロアレイしたチップを利用できるようになると、医療の進歩につながると期待される。

3.2 アレルゲン固定化マイクロアレイチップ

アレルギー検査は、皮膚試験と試験管内試験に大別される。皮膚試験として、即時型アレルギーの検査にはプリックテスト、遅延型アレルギーの検査にはパッチテストが最もよく行われる。しかし、皮膚試験は患者への負担が大きいため、試験管内試験が現在のアレルギー検査の主流となっている。中でも、測定が簡便なうえ、結果が客観的な数値として表れることから、血中の特異 IgE 抗体の測定が最も多く用いられている。アレルギー治療の第一歩は起因アレルゲンの特定であるため、特異 IgE 抗体のスクリーニング検査は重要である。

表 1 には、現在主に市販あるいは開発されている検査法をまとめる。筆者らは、わずかな血液量

で、様々な抗原に対するアレルギーを一括して一度に検査できる安価なシステムを、新しいタイプの抗原マイクロアレイ・チップ（ヒラソルチップ）を用いて可能にしたので、これについて解説する^{5,6)}。

この場合も上述の細胞マイクロアレイと同様、アレルゲンを光反応性マトリックスと混合した後、

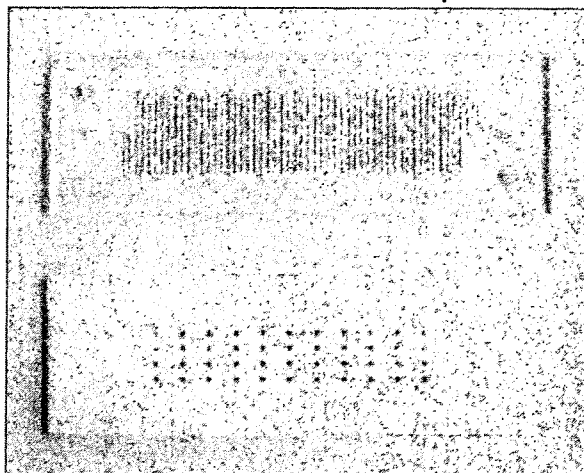


写真1 マイクロアレイ固定化板（下）にマイクロ流路を彫ったポリジメチルシロキサン製板（上）を張り合わせ、自動化装置（図6）に装填。

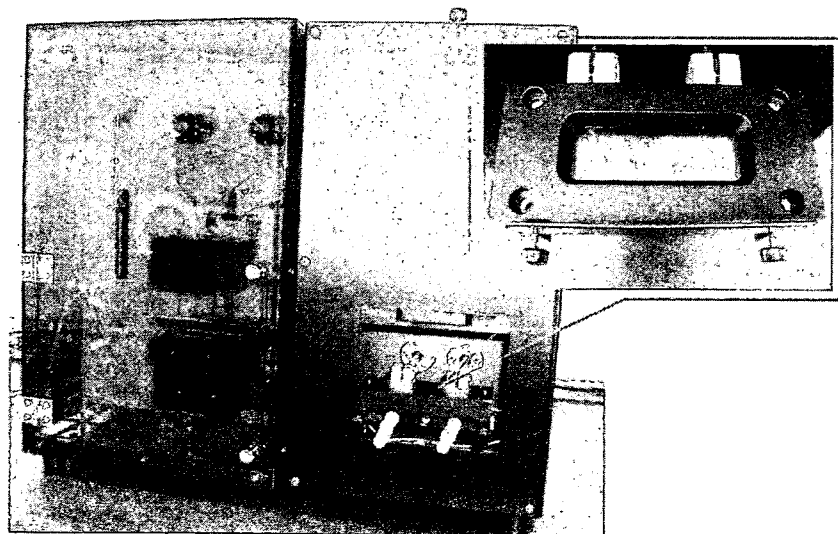
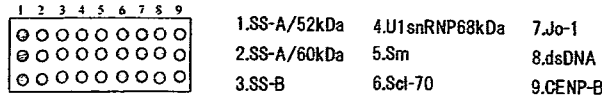


写真2 光固定化マイクロチップ用自動測定装置

送液部：シリンジポンプ1台、6方切り替えバルブ2台、使用サンプル量 90 μ l、速度 3.3 μ l/sec、検出部：高感度 CCD カメラ、反応：シリコン樹脂流路、重量：約 23kg、寸法：480(W)×360(D)×420(H)mm、電源：AC100V、制御用 PC：USB、RS232C、WindowsPC



	病名	患者血清中に見出される主な自己抗体と出現頻度	従来法による評価結果	化学発光法
No.4	SjS (シェーグレン症候群)	抗 SS-A/Ro 抗体：50-70% 抗 SS-B/La 抗体：20-30%	抗 SS-A/Ro 抗体陽性	
No.13	MCTD (混合性結合組織病)	抗 U1RNP 抗体：100%	抗 SS-A/Ro 抗体陽性 抗 SS-B/La 抗体陽性 抗 U1RNP 抗体陽性	
No.42	SSc (全身性硬化症)	抗 Scl-70 抗体：15-30% 抗セントロメア抗体：20-30%	抗セントロメア抗体陽性	
No.46	SLE (全身性エリテマトーデス)	抗 Sm 抗体：15-30% 抗 dsDNA 抗体：40-70%	抗 SS-A/Ro 抗体陽性 抗 U1RNP 抗体陽性 抗 Sm 抗体陽性 抗 dsDNA 抗体陽性	
No.51	SjS (シェーグレン症候群)	抗 SS-A/Ro 抗体：50-70% 抗 SS-B/La 抗体：20-30%	抗 SS-A/Ro 抗体陽性 抗 SS-B/La 抗体陽性	

図5 自己免疫疾患での抗原マイクロアレイでの患者の抗体検出
(協力：慶應義塾大学病院)

アレイヤーを用いてマイクロアレイして、光照射によって固定化してアレルゲン・マイクロアレイを作成する。測定では、まずマイクロアレイ・プレートを血清と接触させる。しばらくしてから洗浄し、酵素標識した抗 IgE 抗体を反応させ、最後に化学発光試薬を加えることで、どの固定化アレルゲンに IgE が吸着するかを特定することができる。図4には、測定結果の例を示す。検体中に固定化アレルゲンに対する IgE が存在すると、そのスポットが化学発光して、何に対するアレルゲンがあるかが一目瞭然となる。

このような測定を微量の血清で行えるようにするために、写真1に示すようなマイクロ流路プレートも作製した。このプレートはポリジメチルシロキサンからなり、これとマイクロアレイ固定化基板をはさんでから、装置に装填し測定を行う。送液を自動で行えるように製作した全自動測定装置

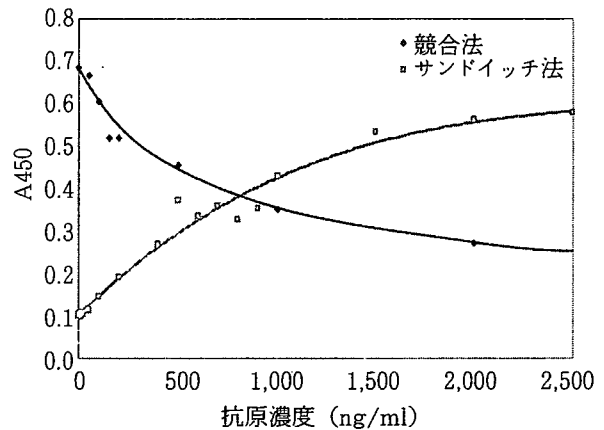


図6 ウシ血清アルブミン (BSA) を光固定化して競合法で BSA 量を定量した場合、通常のサンドイッチ法で BSA を定量した場合の比較

を写真2に示す。この装置では、チップを装填して、測定したい溶液(血液あるいは血清)を試験管に入れて装填するだけで自動的に測定データを

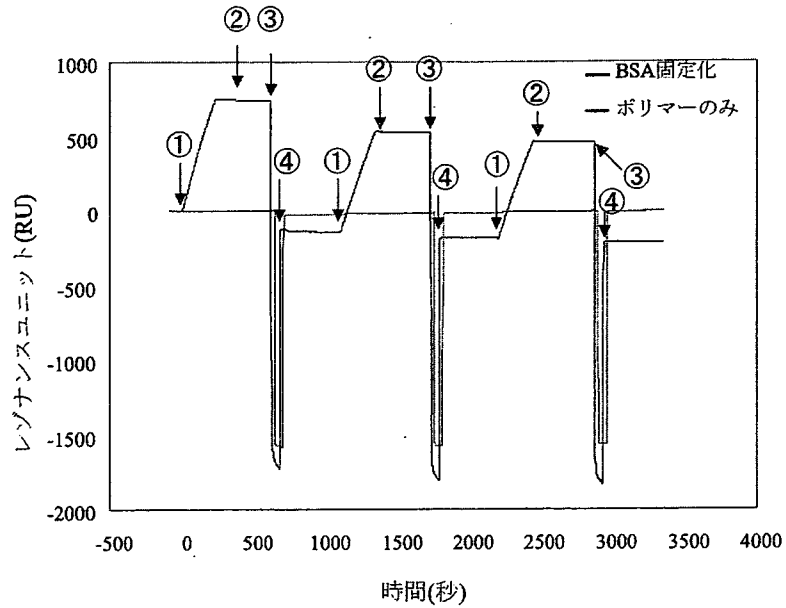


図7 ウシ血清アルブミンを光固定化して抗BSA抗体の吸着を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で調べた結果

BSA 固定化表面では、①抗体溶液を流し、②バッファーで洗浄した後、抗体の吸着が観測され、③塩酸処理をすると脱着し、④再度バッファーで洗浄し、新たな抗体溶液を流すとまた再現性よく吸着が始まる。ベースラインに若干変化があるものの、この一連の過程を繰り返すことができた。

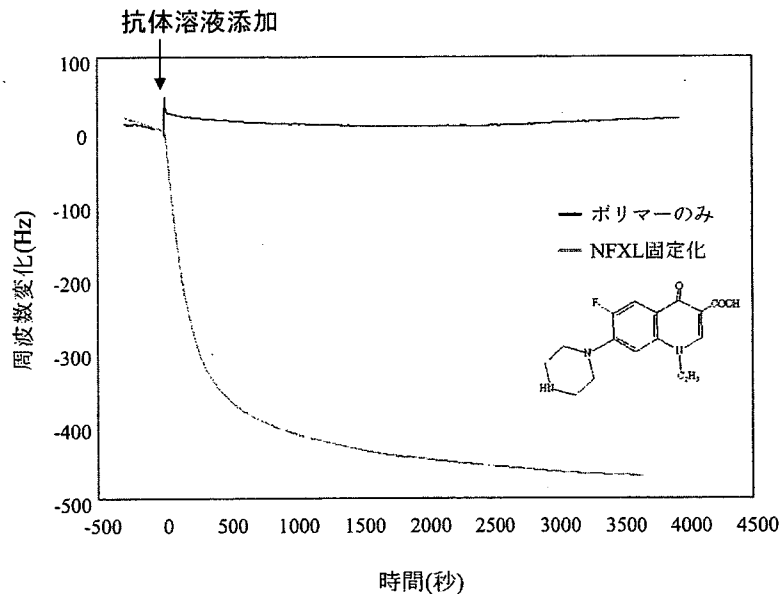


図8 ノルフルオロキサシン (NFXL) を金基板上に光固定化し、抗NFXL抗体の吸着挙動を水晶発振マイクロバランス (QCM) で測定した結果

光反応性マトリックスだけでは吸着 (振動数の変化) がみられなかったものの、固定化表面には吸着が観測された。

得ることができる。

3.3 自己免疫疾患抗原マイクロアレイ

自己免疫疾患に関連する複数の抗原も同様にマイクロアレイ状に固定化し、患者血清中の自己抗体を検出することも可能となった(図5)。生体には、自分の体の中に侵入した有害な異物や細菌、ウイルスに対して、防衛網を何重にも張り巡らし守る免疫機能がある。しかし、なんらかの原因で免疫の機構の一部が狂ってしまうことがある。その結果、本来、味方である、自分自身の体に向かって、攻撃を仕掛けてしまう。それが、自己免疫疾患である。症状が多彩であり、また、表現しにくいいため、伝えることが困難なことが多く、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、混合結合組織病、シェーグレン症候群、等が知られている。マイクロアレイ技術を用いれば、複数の抗体の種類を同時に知ることができる。

4. 研究用チップ

光固定化法は、以上のような診断応用への他に基礎研究用のチップへの利用も可能である。例えば、ELISA用プレートに定量したい物質を光反応性マトリックスを用いて光固定化することにより、ELISA測定への応用も可能となっている(図6)。

チオール化合物と組み合わせることにより、金基板上への光固定化も行うことができる。図7には、タンパク質を金基板上に光固定化してその抗体との相互作用を表面プラズモン共鳴(SPR)法で調べた結果を示す。あらかじめ金基板上に有機チオールを反応させて有機化した後、光反応性マトリックスとタンパク質を混合して固定化することができ、その上でのタンパク質吸着を測定するものである。図8には、低分子化合物であるノルフロキサシン(NFXL)を固定化し、抗体との相

互作用を水晶振動子マイクロバランス(QCM)法で調べた結果を示す。タンパク質のような高分子化合物ばかりでなく、低分子化合物も固定化できることから、より広い分野での利用が期待できる。

5. おわりに

筆者らの光固定化法を用いたバイオチップ開発は、科学技術振興機構の大学発ベンチャー創出促進事業からの研究助成により行われた。現在、ヒラソルバイオ(株)がその成果を生かすために設立され、企業活動を行っている。多くの情報量を生み出すバイオチップは、これからの医療における重要性をますます増すと考えられるが、チップ製造法にはまだ課題が多かった。本稿で紹介した光固定化は、そのような問題を解決して、基盤技術としては完成できた。しかし、まだ搭載するコンテンツについては、充分でない。臨床家、臨床研究者の方々のご協力をいただき、日本発の世界初バイオチップ検査システムの構築を目指したい。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩, バイオテクノロジー総覧, 通産資料出版会, p.662 (2005)
- 2) 伊藤嘉浩, 山内哲也, 大村馨, 高分子論文集, 61, 501 (2004)
- 3) 伊藤嘉浩, 大村馨, バイオニクス, 2, 70 (2005)
- 4) Y. Ito, T. Yamauchi, W. Uchikawa, M. Ishikawa, *Biomaterials*, 27, 2502 (2006)
- 5) 伊藤嘉浩, 大村馨, アレルギーと臨床, 印刷中 (2006)
- 6) K. Oyama, K. Omura, Y. Ito, Y. *Allerg. Int.*, 54, 627 (2005)

☆

☆

☆

The Movement of a Water Droplet on a Gradient Surface Prepared by Photodegradation

Yoshihiro Ito,*†‡ Mojgan Heydari,† Ayako Hashimoto,§ Tomohiro Konno,†
Ayaka Hirasawa,|| Satomi Hori,|| Kimio Kurita,|| and Akira Nakajima§

Regenerative Medical Bioreactor Project, Kanagawa Academy of Science and Technology, KSP East 309, 1-2-3 Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki, Kanagawa, 213-0012 Japan, Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, 2-1, Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan, Nano Wetting Project, Kanagawa Academy of Science and Technology, KSP East 310, 1-2-3 Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki, Kanagawa, 213-0012 Japan, and Department of Materials and Applied Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University, 1-8-14, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8308, Japan

Received August 24, 2006. In Final Form: November 4, 2006

A hydrophobic to hydrophilic gradient surface was prepared using the tuned photodegradation of an alkylsilane self-assembled monolayer (SAM) using irradiation of vacuum ultraviolet light (wavelength = 172 nm). The water contact angle on the photodegraded SAM surface was adjusted using the intensity and time photoirradiation parameters. The formation of a gradient was confirmed by fluorescent labeling. The water drop moved from the hydrophobic to hydrophilic surface with a velocity that depended on the gradient. The higher the gradient, the faster the water moved. For the first time, we have prepared a gradient surface using photodegradation where the movement of a water drop was regulated by the degree of gradation. Considering that the photodegradation technique can be applied to various surfaces and to lithography, this technique will be useful for various material surfaces.

1. Introduction

A gradient surface displays a gradual change in the chemical and physical properties along its length. Gradient surfaces have a wide range of applications in material science.^{1–20} A gradient in a surface can induce the net mass transport of liquids, which affords a driving force for operation of microfluidic devices and for biological cell motility *in vitro*.

Therefore, different preparation methods for gradient surfaces, including thermal,²¹ vapor-phase diffusion,^{1,4–9,11,12} electrochemical,^{22–24}

photolithographic,¹⁰ gradual immersion,^{14,15} photoinitiator-mediated photopolymerization,²⁵ corona treatment,²⁶ contact printing,²⁷ microfluidic device,²⁸ and microstructured²⁹ approaches have been developed. Not only the surface properties but also protein gradients^{30–36} have been devised, and these techniques are generally based on a generation process.

Recently, Sugimura and co-workers^{37–39} have reported on an effective method that can photopattern alkyl- and fluoroalkyl-

*To whom correspondence should be addressed.

† Regenerative Medical Bioreactor Project, Kanagawa Academy of Science and Technology.

‡ RIKEN.

§ Nano Wetting Project, Kanagawa Academy of Science and Technology.

|| Nihon University.

(1) Chaudhury, M. K.; Whitesides, G. M. *Science* 1992, 256, 1539–1541.

(2) Ichimura, K.; Oh, S.-K.; Nakagawa, M. *Science* 2000, 288, 1624–1626.

(3) Rosario, R.; Gust, D.; Garcia, A. A.; Hayes, M.; Taraci, J. L.; Clement, T.; Dailey, J. W.; Picraux, S. T. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 12640–12642.

(4) Daniel, S.; Chaudhury, M. J. *Langmuir* 2002, 18, 3404–3407.

(5) Daniel, S.; Chaudhury, M. J.; Chen, J. C. *Science* 2003, 291, 633–636.

(6) Suda, H.; Yamada, S. *Langmuir* 2003, 19, 529–531.

(7) Daniel, S.; Sircar, S.; Gliem, J.; Chaudhury, M. K. *Langmuir* 2004, 20, 4085–4092.

(8) Petrie, R. J.; Bailey, T.; Gorman, C. B.; Genzer, J. *Langmuir* 2004, 20, 9893–9896.

(9) Subramanian, R. S.; Moumen, N.; McLaughlin, J. B. *Langmuir* 2005, 21, 11844–11849.

(10) Wier, K. A.; Gao, L.; McCarthy, T. J. *Langmuir* 2006, 22, 4914–4916.

(11) Moumen, N.; Subramanian, R. S.; McLaughlin, J. B. *Langmuir* 2006, 22, 2682–2690.

(12) Clare, B. H.; Efimenko, K.; Fischer, D. A.; Genzer, J.; Abbott, N. L. *Chem. Mater.* 2006, 18, 2357–2363.

(13) Ueda-Yukoshi, T.; Matsuda, T. *Langmuir* 1995, 11, 4135–4140.

(14) Yu, X.; Wang, Z.; Jiang, Y.; Zhang, X. *Langmuir* 2006, 22, 4483–4486.

(15) Chen, G.; Ito, Y. *Biomaterials* 2000, 22, 24583–24587.

(16) Ito, Y.; Hayashi, M.; Imanishi, Y. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2001, 12, 367–378.

(17) H. Liu; Ito, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 67A, 1424–1429.

(18) Wong, J. Y.; Velasco, A.; Rajagopalan, P.; Pham, Q. *Langmuir* 2003, 19, 1908–1913.

(19) Harris, B. P.; Kutty, J. K.; Fritz, E. W.; Webb, C. K.; Burg, K. J. L.; Metters, A. T. *Langmuir* 2006, 22, 4467–4471.

(20) Gunawan, R. C.; Silvestre, J.; Gaskins, H. R.; Kenis, P. J. A.; Leckband, D. E. *Langmuir* 2006, 22, 4250–4258.

(21) Cazabat, A. M.; Heslot, F.; Troian, S. M.; Carles, P. *Nature* 1990, 346, 824–826.

(22) Gallardo, B. S.; Gupta, V. K.; Eagerton, F. D.; Jong, L. I.; Craig, V. S.; Shah, R. R.; Abbott, N. L. *Science* 1999, 283, 57–60.

(23) Terrill, R. H.; Balss, K. M. Z. Y.; Bohn, P. W. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 988–989.

(24) Sehayek, T.; Vaskevich, A.; Rubinstein, I. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 4718–4719.

(25) Harris, B. P.; Metters, A. T. *Macromolecules* 2006, 39, 2764–2772.

(26) Kim, M. S.; Seo, K. S.; Khang, G.; Lee, H. B. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 245–249.

(27) Choi, S.-H.; Newby, B. Z. *Langmuir* 2003, 19, 7427–7435.

(28) Jiang, X.; Xu, Q.; Dertinger, S. K. W.; Strook, A. D.; Fu, T.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* 2005, 77, 2338–2347.

(29) Shastry, A.; Case, M. J.; Bohringer, K. F. *Langmuir* 2006, 22, 6161–6167.

(30) Chen, C.; Hirdes, D.; Folch, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100, 1499–1504.

(31) Wu, M.-H.; Park, C.; Whitesides, G. M. *Langmuir* 2002, 18, 9312–9318.

(32) Hypolite, C. L.; McLernon, T. L.; Adams, D. N.; Chapman, K. E.; Herbert, C. B.; Huang, C. C.; Distefano, M. D.; Hu, W.-S. *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 658–663.

(33) Wijesundara, M. B. J.; Fuoco, E.; Hanley, L. *Langmuir* 2001, 17, 5721–5726.

(34) Jeon, N. L.; Dertinger, S. K. W.; Chiu, D. T.; Choi, I. S.; Stroock, A. D.; Whitesides, G. M. *Langmuir* 2000, 16, 8311–8316.

(35) Caelen, I.; Bernard, A.; Juncker, D.; Michel, B.; Heinzelmann, H.; Delamarche, E. *Langmuir* 2000, 16, 9125–9130.

(36) Caelen, I.; Gao, H.; Sigrist, H. *Langmuir* 2002, 18, 2463–2467.

(37) Sugimura, H.; Ushiyama, K.; Hozumi, A.; Takai, O. *Langmuir* 2000, 16, 885–888.

(38) Hong, L.; Sugimura, H.; Furukawa, T.; Takai, O. *Langmuir* 2003, 19, 1966–1969.

(39) Ito, Y.; Nogawa, M.; Sugimura, H.; Takai, O. *Langmuir* 2004, 21, 4299–4301.