

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6521255号  
(P6521255)

(45) 発行日 令和1年5月29日(2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/09 Z N A Z
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 C
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D
<b>G O 1 N</b>	<b>37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 37/00 1 O 2
請求項の数 20 (全 20 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2015-534114 (P2015-534114)	(73) 特許権者	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(86) (22) 出願日	平成26年8月5日(2014.8.5)	(73) 特許権者	000004112 株式会社ニコン 東京都港区港南二丁目15番3号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/070583	(74) 代理人	100161207 弁理士 西澤 和純
(87) 国際公開番号	W02015/029714	(74) 代理人	100140774 弁理士 大浪 一徳
(87) 国際公開日	平成27年3月5日(2015.3.5)	(74) 代理人	100175824 弁理士 小林 淳一
審査請求日	平成29年6月29日(2017.6.29)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	特願2013-180693 (P2013-180693)		
(32) 優先日	平成25年8月30日(2013.8.30)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(出願人による申告)平成24年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業チーム型研究(CREST)事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願			
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法、タンパク質アレイ又はペプチドアレイ、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 特定の開口形状を有したリアクターからなり、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に、タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子を備えたリアクターアレイにおいて、前記リアクター内に、無細胞合成系と、核酸が固定された固相担体と、を配置する工程と、

(c) 前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記核酸からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程と、

を含み、

前記リアクターアレイは、前記リアクターを10,000~500,000,000個有し、

前記工程(a)において、前記固相担体はリアクター1個当たり1個ずつ配置される、タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法。

【請求項2】

前記固相担体に固定された核酸は、前記固相担体1個当たり1種類の核酸である請求項1に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法。

【請求項3】

前記固相担体は磁気ビーズである請求項1又は2に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法。

## 【請求項 4】

前記タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子は、前記タンパク質又はペプチド中に存在するアミノ酸配列に親和性を有する分子である請求項 1 ~ 3のいずれか一項に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法。

## 【請求項 5】

前記タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子はタンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーであり、

前記工程 (c) は、前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記 DNA から mRNA を転写し、前記核酸リンカーにハイブリダイズした前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程を有する請求項 1 ~ 4のいずれか一項に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法。

10

## 【請求項 6】

更に、(b)前記工程 (a) と (c) の間に、前記リアクターを密閉する工程を有する請求項 1 ~ 5のいずれか一項に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法。

## 【請求項 7】

前記工程 (a) における核酸が固定された固相担体の配置は、前記リアクターアレイに、前記核酸を固定した前記固相担体を分散させた分散液を添加することにより行う請求項 1 ~ 6のいずれか一項に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の製造方法で製造されたタンパク質アレイ又はペプチドアレイを用いて機能性スクリーニングを行い、所定の機能を有するタンパク質又はペプチドが固定されたリアクターを特定する工程を含む、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

20

## 【請求項 9】

さらに前記特定されたリアクターに配置された固相担体に固定された核酸の塩基配列を決定する工程を含む、請求項 8 に記載の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

## 【請求項 10】

前記機能性スクリーニングの前又は後に、前記リアクター内の核酸を回収する工程を含む、請求項 8 又は 9 に記載の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

30

## 【請求項 11】

前記リアクター内の核酸を回収する工程は、前記固相担体を回収することにより行う、請求項 10 に記載の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

## 【請求項 12】

前記固相担体の回収は、前記タンパク質アレイ又はペプチドアレイ内の前記核酸が固定された固相担体を、前記リアクターアレイと同様の配列を有する第 2 リアクターアレイに配置することを含む請求項 11 に記載の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

## 【請求項 13】

前記固相担体の回収は、前記固相担体との親和性を有する基板を前記リアクターアレイと重ね合わせることにより、前記固相担体を前記基板上に捕捉することにより行う請求項 11 に記載の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

40

## 【請求項 14】

前記タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子はタンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーであって、

前記工程 (c) は、前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記 DNA から mRNA を転写し、前記核酸リンカーにハイブリダイズした前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程を有し、

50

前記リアクター内の核酸を回収する工程は、前記核酸リンカーを切断することにより行う、請求項 1 0 に記載の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

【請求項 1 5】

前記核酸リンカーは可逆的光連結性塩基を有する核酸であり、

前記核酸リンカーの切断は、光照射により行う請求項 1 4 に記載の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

【請求項 1 6】

( a ) 特定の開口形状を有したリアクターからなり、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に、タンパク質連結部分又はペプチド連結部分と可逆的光連結性塩基とを有する核酸リンカーを備えたリアクターアレイにおいて、前記リアクター内に、無細胞合成系と、DNA が固定された固相担体と、を配置する工程と、

10

( c ) 前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記 DNA から mRNA を転写し、前記核酸リンカーにハイブリダイズした前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記核酸リンカーに固定してタンパク質アレイ又はペプチドアレイを製造する工程と、

( d ) 前記タンパク質アレイ又はペプチドアレイを用いて、機能性スクリーニングを行い、所定の機能を有するタンパク質を有するリアクターを特定する工程と、

( e ) 光照射により前記核酸リンカーの可逆的光連結性塩基を光開裂させ、前記リアクターから核酸を解離し回収し、前記核酸の塩基配列を決定する工程と、

を含み、

20

前記リアクターアレイは、前記リアクターを 1 0 , 0 0 0 ~ 5 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 個有し、

前記工程 ( a ) において、前記固相担体はリアクター 1 個当たり 1 個ずつ配置される、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法。

【請求項 1 7】

特定の開口形状を有したリアクターからなるリアクターアレイと、

前記リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に固定された、タンパク質又はペプチドを捕捉するタンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子と、

前記タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子に捕捉されたタンパク質又はペプチドと、を備えるタンパク質アレイ又はペプチドアレイであって、

30

前記リアクターアレイは、前記リアクターを 1 0 , 0 0 0 ~ 5 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 個有すること特徴とするタンパク質アレイ又はペプチドアレイ。

【請求項 1 8】

前記タンパク質又はペプチドは、前記リアクター内に配置された、DNA が固定された固相担体を用いて、無細胞合成系によって合成されたものであり、

前記リアクターは、前記固相担体が前記リアクター 1 個当たり 1 個ずつ配置される大きさである、請求項 1 7 に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイ。

【請求項 1 9】

タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子は、特定の開口形状を有したリアクターからなるリアクターアレイと、前記 DNA から合成される mRNA 及びタンパク質又はペプチドを捕捉するタンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを含むこと特徴とする、請求項 1 8 に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイ。

40

【請求項 2 0】

請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイと、前記固相担体との親和性を有する基板と、を備えたことを特徴とする機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法、機能性タンパク質又は機

50

能性ペプチドの同定方法、タンパク質アレイ又はペプチドアレイ、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

新規機能性タンパク質は、医薬品、洗剤、食品加工、研究開発用試薬、臨床分析、さらにはバイオエネルギー、バイオセンサーなど様々なバイオ応用分野への貢献が期待されている。

【0003】

新規機能性タンパク質の取得に際しては、タンパク質の構造情報から人知によりデザインするタンパク質工学的手法が主流であったが、より有用な機能性タンパク質を取得するためには従来手法よりも効率的にスクリーニングする必要があり、タンパク質のランダムな分子構造改変と淘汰を繰り返す進化分子工学的手法が期待されている。

10

【0004】

例えば、バイオエタノールの製造では、原料のセルロースをセロビオースに分解し、更にグルコースに分解した後、アルコール発酵によりエタノールを得る。これらの分解工程において、セロビオースからグルコースへの分解反応が遅く、全工程を律速している。この分解反応における反応速度は、オリゴ糖分解酵素 - グルコシダーゼ(以下、BGLともいう。)に依存するため、より優れた活性を有する変異体の創出が求められている。

【0005】

酵素や抗体といったタンパク質の機能向上には、変異体ライブラリーを用いた高効率スクリーニングが必要である。効率的に有用タンパク質のスクリーニングを行うためには、膨大な数の変異体を同時並列的に評価する方法が望まれている。

20

【0006】

このような要望に対して、ウェル中に配置されたDNAから合成されたタンパク質をウェル壁面に固定するタンパク質アレイの製造方法が提案されている(特許文献1~2参照。)

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第02/014860号

30

【特許文献2】国際公開第2013/063126号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、特許文献1で提案されているタンパク質アレイは、高々1536ウェルフォーマットのアレイであり、膨大な数の変異体を同時並列的に評価するためのアレイとしては改良の余地がある。

【0009】

また、特許文献2で提案されているタンパク質アレイは、機能性タンパク質のスクリーニングの後、DNAの回収が困難であり、機能性タンパク質の効率的なスクリーニングに用いるのは改良の余地がある。

40

【0010】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの効率的なスクリーニングに適したタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法、タンパク質アレイ又はペプチドアレイ、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記の課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、アレイを構成するり

50

リアクター中に固相担体に固定した核酸からタンパク質又はペプチドを合成し、合成されたタンパク質又はペプチドをリアクターの壁面及び底面の少なくとも一部に固定することにより課題を解決できることを見出した。本発明の一実施態様は、下記(1)~(7)を提供するものである。

【0012】

(1) 本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法は、  
(a) 特定の開口形状を有したリアクターからなり、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に、タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子を備えたリアクターアレイにおいて、前記リアクター内に、固相担体に固定された核酸と無細胞合成系を用意する工程と、

10

(c) 前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記核酸からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程と、

を有することを特徴とする。

(2) 本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法は、  
(a) 特定の開口形状を有したリアクターからなり、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に、タンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを備えたリアクターアレイにおいて、前記リアクター内に、固相担体に固定されたDNAと無細胞合成系を用意する工程と、

(c) 前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記DNAからmRNAを転写し、前記核酸リンカーにハイブリダイズした前記mRNAからタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程と、

20

を有することを特徴とする。

(3) 本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、先に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法を用いて製造されたことを特徴とする。

(4) 本発明の一実施態様における機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法は、  
(d) 先に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイを用いて、機能性スクリーニングを行い、リアクターを特定する工程を有することを特徴とする。

(5) 本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、特定の開口形状を有したリアクターからなるリアクターアレイと、

30

前記リアクター内に配置された、固相担体に固定された核酸及び該核酸にコードされるタンパク質又はペプチドと、を有し、

前記リアクターは、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に固定された、前記タンパク質又はペプチドを捕捉するタンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子を有すること特徴とする。

(6) 本発明の一実施態様におけるタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、特定の開口形状を有したリアクターからなるリアクターアレイと、

前記リアクター内に配置された、固相担体に固定されたDNA及び該DNAにコードされるタンパク質又はペプチドと、を有し、

40

前記リアクターは、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に固定された、前記DNAから合成されるmRNA及びタンパク質又はペプチドを捕捉するタンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを有すること特徴とする。

(7) 本発明の一実施態様における機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キットは、先に記載のタンパク質アレイ又はペプチドアレイと、前記固相担体との親和性を有する基板と、を備えたことを特徴とする。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、機能性タンパク質又は機能性ペプチドのスクリーニングを効率よく行うことができる。

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0014】

【図1】本実施形態における、タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法の模式図である。

【図2】本実施形態における、タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法の模式図である。

【図3】本実施形態における、タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法の模式図である。

【図4】実施例における、石英ガラスリアクターの作製方法の模式図である。

【図5】実施例における、Ni-NTA修飾石英ガラスリアクターの作製方法の模式図である。

10

【図6】実施例における、BGLタンパク質アレイの共焦点顕微鏡観察像である。

【図7】実施例における、BGLタンパク質アレイの酵素反応の結果である。

【図8】実施例における、BGLタンパク質アレイの各リアクターにおける酵素反応の結果である。

【図9】実施例における、ガラスリアクター内の磁気ビーズのPDMSシートを用いた回収方法の模式図である。

【図10】実施例における、PDMSシートを用いた回収方法により回収されたPDMSシート上の磁気ビーズの顕微鏡観察像である。

## 【発明を実施するための形態】

20

## 【0015】

タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法

## [第1実施形態]

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法は、(a)特定の開口形状を有したリアクターからなり、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に、タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子を備えたリアクターアレイにおいて、前記リアクター内に、固相担体に固定された核酸と無細胞合成系を用意する工程と、

(c)前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記核酸からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程と、を有する。

30

以下、図1を参照しながら、本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法について具体的に説明する。

## 【0016】

本実施形態において、工程(a)は、特定の開口形状を有したリアクター2からなり、該リアクター2内の壁面2a及び底面2bの少なくとも一部に、タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子6を備えたリアクターアレイ1において、前記リアクター2内に、固相担体に固定された核酸と無細胞合成系9を添加する工程である。

## 【0017】

リアクターアレイ1に用いられる材料は、石英、ガラス、ポリマー材が好ましい。ポリマー材としては、リークを抑える目的からは、ポリジメチルシロキサン(以下、PDMSともいう)などのエラストマー材料がより好ましい。

40

## 【0018】

リアクターアレイ1は、複数のリアクター2からなることが好ましい。リアクター数としては、10000~500000000が好ましく、10000000~50000000がより好ましい。

本実施形態においては、個々に壁を有するリアクター2からなるリアクターアレイ1を用いるため、DNAアレイからタンパク質アレイを製造する際、又は、タンパク質アレイを用いて機能性スクリーニングを行う際に必要とされていた、基板をリアクターに重ね合わせる際のアライメントを取る必要がない。

## 【0019】

50

リアクター 2 の形状は一例としてウェル形状、微小凹部、溝部であり、リアクター 2 の底面は、例えば円又は正方形である。係る底面の直径又は一辺は、1 ~ 200  $\mu\text{m}$  が好ましく、1 ~ 50  $\mu\text{m}$  がより好ましく、1 ~ 5  $\mu\text{m}$  が特に好ましい。複数のリアクター 2 の中心間の距離としては、1.5 ~ 500  $\mu\text{m}$  が好ましく、1.5 ~ 150  $\mu\text{m}$  がより好ましく、1.5 ~ 15  $\mu\text{m}$  が特に好ましい。

また、リアクター 2 の深さとしては、1 ~ 200  $\mu\text{m}$  が好ましく、1 ~ 50  $\mu\text{m}$  がより好ましく、1 ~ 5  $\mu\text{m}$  が特に好ましい。

また、リアクター 2 は親水化処理が施されていてもよい。

#### 【0020】

工程 (a) において、リアクター 2 内に添加される核酸は、タンパク質又はペプチドをコードするものであれば特に限定されない。一例として DNA 又は RNA が挙げられ、取り扱いやすさの観点から例えば DNA である。

該 DNA は、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法 における後記工程 (d) で特定されたリアクター 2 に対応する核酸の塩基配列を解析する観点から、リアクターアレイ 1 において、核酸の位置情報が特定されており、本実施形態においては、DNA 13 が固相担体に固定化されている。また、一例として、固相担体に固定された核酸は、固相担体 1 個当たり 1 種類の核酸である。

固定化には、アビジン - ビオチン結合を利用する方法の他、DNA をアミノ基、アルデヒド基、SH 基、などの官能基で修飾し、固相担体をアミノ基、アルデヒド基、エポキシ基などを有するシランカップリング剤で表面処理したものを利用する方法などを用いることができ、特に、アビジン - ビオチン結合を利用した方法が好ましい。

#### 【0021】

前記固相担体は、後に DNA を回収する観点から、ビーズであることが好ましく、短時間でリアクターアレイ 1 中の各リアクター 2 に配列させることが可能であるという観点から磁気ビーズ 14 であることがより好ましい。

#### 【0022】

本実施形態において、固相担体として磁気ビーズを用いる場合には、リアクターアレイ 1 に用いられる基板材料下に、磁性体板が配設されていることが好ましい。

かかる構造のリアクターアレイ 1 を用いることにより、リアクター 2 内に磁気ビーズ 14 を容易にかつ確実に配置することができる。一例として、該基板材料の下部に磁石を配置し、該基板材料上に DNA 13 を固定した磁気ビーズ 14 を分散させた分散液を滴下する。磁石及び磁性体板による磁力の作用により、リアクター 12 内へ磁気ビーズが誘引されることにより配置されやすくなる。さらに磁石を適宜基板に対し平行方向に動かすことで磁気ビーズ 14 が分散し、リアクター 2 内への充填率が向上する。磁石によりビーズ配置用基板に印加する磁場の強さは、所望の効果を得る上で、好ましくは 100 ~ 10000 ガウスである。

また、磁石を取り除いた後も磁性体板の磁化は残るため、磁気ビーズ 14 は安定した配置を保持し続けることが可能となる。

#### 【0023】

かかる磁性体の材料としては、ニッケル、ニッケル合金、鉄および鉄合金などの金属を好適に用いることができ、本実施形態においては残留磁化の大きな磁性材料を用いることが好ましい。

#### 【0024】

磁気ビーズ 14 のリアクター 2 への充填率はリアクター 2 の直径又は一辺に依存する。充填率の観点から、リアクター 2 の直径又は一辺が磁気ビーズ 14 の直径又は一辺よりも若干広い方が好ましく、リアクター 2 の直径又は一辺は磁気ビーズの直径の 1 ~ 2 倍であることがより好ましい。

また、1 個のリアクター 2 に 1 個の磁気ビーズ 14 を充填する上で、リアクター 2 の深さは、磁気ビーズ 14 の直径の 1 ~ 2 倍であることが好ましい。

また、一例として、固相担体 1 個当たり 1 種類の核酸であり、1 個の固相担体に複数種

10

20

30

40

50

類の核酸は固定されていない。その場合、1個のリアクターには1種類の核酸が用意され、合成されるタンパク質も1種類である。

【0025】

DNAライブラリー等の複数種類のDNAの混合物としては、変異DNAライブラリーが好ましい。

変異DNAライブラリーとしては、Error-prone PCR (エラープローンPCR) を利用したライブラリー、Gene assembly mutagenesis を利用したライブラリー、Random insertion and deletion mutagenesis を利用したライブラリー、DNA shuffling を利用したライブラリー、Family shuffling を利用したライブラリー、Staggered Extension Process in vitro recombination を利用したライブラリー、ITCHY Hybrid protein libraries、SCRATCHY Hybrid Protein Libraries、Sequence Homology-independent Protein Recombination を利用したライブラリー等が挙げられる。

10

【0026】

本実施形態において、リアクターアレイ1は、リアクター2内の壁面2a及び底面2bの少なくとも一部に、タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子6を備えている。

タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子6としては、タンパク質又はペプチド7中に存在するアミノ酸配列に親和性を有する分子が挙げられる。一例として、マルトース；グアニンヌクレオチド；ニッケル、コバルト等の金属イオン；グルタチオン；抗原等が挙げられる。

20

【0027】

また、タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子6として、核酸リンカーを用いてもよい。核酸リンカーはタンパク質連結部分又はペプチド連結部分を含み、タンパク質連結部分又はペプチド連結部分としてはピューロマイシンが代表的である。(特開2008-116218号公報参照。)核酸リンカーの一例としてピューロマイシンリンカーが挙げられる。ピューロマイシンは、アミノアシル-tRNAの3'末端と類似する構造を有するタンパク質合成阻害剤である。タンパク質の連結部分としては、伸張中のタンパク質又はペプチドのC末端に特異的に結合する機能を有する限り、任意の物質を用いることができ、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド(PANS-アミノ酸)、または3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド(AANS-アミノ酸)などのピューロマイシン誘導体を用いることができる。図2に示すように、ピューロマイシンリンカー20は、DNA13を転写してなるRNAとハイブリダイズし得る配列と、タンパク質又はペプチド7を捕捉するピューロマイシン誘導体20aを有する。

30

【0028】

タンパク質又はペプチド7が、ニッケル、コバルト等の金属イオンに親和性を有するポリヒスチジンを有する場合、該ポリヒスチジンとしては、ヘキサマー以上のものが好ましく用いられる。タンパク質又はペプチド中にポリヒスチジンを含ませるためには、PCR等で予めDNAの末端に該ポリヒスチジンをコードする塩基配列を付加しておくことが好ましい。

40

【0029】

リアクター2が有する前記開口形状は任意であるが、少なくとも1つのビーズを充填可能な形状であることが好ましい。例えば、リアクター2が有する前記開口形状は、円形状、四角状、六角状、ライン状、などであってもよい。

【0030】

本実施形態においては、前記工程(a)と後記工程(c)の間に、リアクター2を密閉する工程(b)を有することが好ましい。

図1に示すように、工程(b)として一例として、基板15をリアクターアレイ1と重ね合わせる工程が挙げられる。また、基板15に替えて、オイル等を用いて密閉してもよ

50

い。

【0031】

前記工程 ( b ) において用いられる基板 1 5 としては、ガラス基板、シリコン基板、ポリマー基板、金属基板等が挙げられる。ガラス基板としては P D M S でコートされたガラス基板が好ましい。リアクター 2 を密閉する際には、例えばプレス機を用いて密閉する。

また、架橋が途中段階の P D M S でコートされたガラス基板を用いてもよい。架橋が途中段階の P D M S は、粘着性を有するため、リアクターアレイ 1 と重ね合わせることにより、リアクター 2 内の固相担体に固定された D N A が P D M S 上に凹版印刷される。これにより、後記工程 ( c ) で合成・固定されるタンパク質又はペプチド 7 に対応する核酸を、位置情報を変更することなく、P D M S 上にプリントすることができる。

10

【0032】

工程 ( c ) は、前記リアクター 2 内において、前記無細胞合成系 9 を用いて前記核酸からタンパク質又はペプチド 7 を合成し、前記タンパク質又はペプチド 7 を前記リアクター 2 内に固定する工程である。

【0033】

無細胞合成系とは、適当な細胞から抽出されたタンパク質合成能を有する成分からなるタンパク質翻訳系であり、この系にはリボソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、解離因子、アミノアシル t R N A 合成酵素等、翻訳に必要な要素が含まれている。このようなタンパク質翻訳系として、大腸菌抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液等が挙げられる。

20

更に、翻訳に必要な要素が独立に精製された因子のみからなる再構成型無細胞タンパク質合成系が挙げられる。再構成型無細胞タンパク質合成系は、従来の細胞抽出液を使用する場合よりもヌクレアーゼやプロテアーゼの混入を容易に防ぐことができるため、翻訳効率を高めることができる。

このような系を用いることにより、前記リアクター 2 内においてタンパク質又はペプチドが製造される。

【0034】

前記工程 ( c ) において、無細胞合成系 9 に用いられる核酸が D N A 1 3 である場合には、無細胞転写系を用いて前記 D N A 1 3 から R N A を合成する工程が含まれる。前記 R N A は、スクリーニングすべきタンパク質又はペプチドをコードする固定された D N A 1 3 から、R N A ポリメラーゼにより転写させることにより得られる。R N A ポリメラーゼとしては、例えば T 7 R N A ポリメラーゼが挙げられる。

30

また、簡便であることから、転写翻訳がカップルした系を用いてもよい。

【0035】

また、図 2 に示されるように、タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子として、ピューロマイシンリンカー 2 0 を用いる場合、D N A 1 3 から合成された R N A 2 1 がピューロマイシンリンカー 2 0 中の配列とハイブリダイズする。

ピューロマイシンリンカー 2 0 が、可逆的光連結性塩基を有する場合には、光照射によりリアクター 2 内に固定される。

【0036】

40

工程 ( c ) において、前記タンパク質又はペプチド 7 の合成に続いて、前記タンパク質又はペプチド 7 のリアクター 2 内への固定化が行われる。

一例として、工程 ( a ) において、リアクターアレイ 1 のリアクター 2 に、必要な試薬や材料 ( 核酸 ) を添加した後に、工程 ( b ) において、リアクターアレイ 1 に封をし、密閉状態にする。工程 ( c ) において、試薬を混ぜた先から、D N A R N A タンパク質又はペプチドの一連の転写 / 翻訳反応が進行し、さらに翻訳されたタンパク質又はペプチド 7 が、リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に固定されたタンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子 6 と結合する。

タンパク質又はペプチド 7 のリアクター 2 内への固定化の後、基材 1 5 又はオイルを除去して、リアクター 2 の密閉状態を解除することが好ましい。

50

## 【 0 0 3 7 】

工程 ( a ) ~ ( c ) を経て、タンパク質又はペプチド 7 が固定されたリアクターアレイ 1 を P B S 等で洗浄することが好ましい。

## 【 0 0 3 8 】

本実施形態のタンパク質又はペプチドの製造方法によれば、固相担体に固定された核酸を用いることにより、製造されたタンパク質アレイ又はペプチドアレイのリアクターに固定されたタンパク質又はペプチド 7 を同定することができ、リアクターに配置した核酸の情報を予め得ておく必要がない。

## 【 0 0 3 9 】

## [ 第 2 実施形態 ]

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法は、

( a ) 特定の開口形状を有したリアクターからなり、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に、タンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを備えたリアクターアレイにおいて、前記リアクター内に、固相担体に固定された D N A と無細胞合成系を用意する工程と、

( c ) 前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記 D N A から m R N A を転写し、前記核酸リンカーにハイブリダイズした前記 m R N A からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程と、を有する。

以下、図 2 を参照しながら、本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法について具体的に説明する。図 2 において、図 1 の模式図に示されたものと同じ構成要素には、同一の符号を付して説明を省略する。

## 【 0 0 4 0 】

第 1 実施形態で述べた前記タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子に替えて、本実施形態に係る工程 ( a ) では、タンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカー ( 特開 2 0 0 8 - 1 1 6 2 1 8 号公報参照。 ) を用いる。核酸リンカーの一例としてピューロマイシンリンカーが挙げられる。

図 2 に示すように、ピューロマイシンリンカー 2 0 は、固相担体に固定された D N A 1 3 を転写してなる R N A 2 1 とハイブリダイズし得る配列と、タンパク質又はペプチド 7 を捕捉するピューロマイシン誘導体 2 0 a を有する。

また、本実施形態に係る工程 ( a ) では、固相担体に固定された D N A を用いる。

## 【 0 0 4 1 】

本実施形態においても、前記工程 ( a ) と後記工程 ( c ) の間に、リアクター 2 を密閉する工程 ( b ) を有することが好ましい。

図 2 に示すように、工程 ( b ) として一例として、基板 1 5 をリアクターアレイ 1 と重ね合わせる工程が挙げられる。また、基板 1 5 に替えて、オイル等を用いて密閉してもよい。

## 【 0 0 4 2 】

工程 ( c ) は、前記リアクター 2 内において、無細胞合成系 9 を用いて前記核酸から m R N A を転写し、前記核酸リンカーにハイブリダイズした前記 m R N A からタンパク質又はペプチド 7 を合成し、前記タンパク質又はペプチド 7 を前記リアクター 2 内に固定する工程である。

前記工程 ( c ) において、無細胞合成系 9 に用いられる核酸が D N A 1 3 であり、無細胞転写系もしくは無細胞転写翻訳系中の R N A ポリメラーゼを用いて前記 D N A 1 3 から R N A 2 1 を転写する工程が含まれる。R N A 2 1 は、D N A 1 3 から、R N A ポリメラーゼにより転写させることにより得られる。R N A ポリメラーゼとしては、例えば T 7 R N A ポリメラーゼが挙げられる。

## 【 0 0 4 3 】

次いで、D N A 1 3 から合成された R N A 2 1 がピューロマイシンリンカー 2 0 中の配列とハイブリダイズする。

ピューロマイシンリンカー 20 が、可逆的光連結性塩基を有する場合には、光照射を行い、リアクター 2 内にピューロマイシンリンカー 20 - RNA 21 複合体を固定することが好ましい。

次いで、第 1 実施形態における工程 (c) と同様に無細胞翻訳系により、ピューロマイシンリンカー 20 - RNA 21 複合体からタンパク質又はペプチド 7 の合成が行われ、合成されたタンパク質又はペプチド 7 が、リアクター内の壁面 2 a 及び底面 2 b の少なくとも一部に固定されたピューロマイシンリンカー 20 と結合し、ピューロマイシンリンカー 20 - RNA 21 - タンパク質又はペプチド 7 複合体がリアクター 2 内に固定される。

タンパク質又はペプチド 7 のリアクター 2 内への固定化の後、基板 15 又はオイルを除去して、リアクター 2 の密閉状態を解除することが好ましい。

10

#### 【0044】

工程 (a) ~ (c) を経て、タンパク質又はペプチド 7 が固定されたリアクターアレイ 1 を PBS 等で洗浄することが好ましい。本実施形態によれば、第 1 実施形態と同様に、リアクターに配置した核酸の情報を予め得ておく必要がない。

#### 【0045】

##### [第3実施形態]

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法は、

(a) 特定の開口形状を有したリアクターからなり、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に、タンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを備えたリアクターアレイにおいて、前記リアクター内に、DNA と無細胞合成系を用意する工程と、

20

(c) 前記リアクター内において、前記無細胞合成系を用いて前記 DNA から mRNA を転写し、前記核酸リンカーにハイブリダイズした前記 mRNA からタンパク質又はペプチドを合成し、前記タンパク質又はペプチドを前記リアクター内に固定する工程と、を有する。

以下、図 3 を参照しながら、本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法について具体的に説明する。図 3 において、図 1 及び図 2 の模式図に示されたものと同じ構成要素には、同一の符号を付して説明を省略する。

#### 【0046】

第 2 実施形態で述べた固相担体に固定された DNA に替えて、本実施形態に係る工程 (a) では、固相担体に固定されていない DNA を用いる。

30

リアクターに DNA を分配する方法は固相担体を用いる方法に限られず、1 ウェル 1 分子になるように DNA を限界希釈してリアクターに展開する方法等が挙げられる。

#### 【0047】

本実施形態のタンパク質又はペプチドの製造方法によれば、タンパク質又はペプチド捕捉分子 6 及び磁気ビーズ 14 を用いずともピューロマイシンリンカー 20 のみを用いることにより、核酸及びタンパク質又はペプチドをリアクター内に固定化することができる。

また、第 1 ~ 2 実施形態と同様に、リアクターに配置した核酸の情報を予め得ておく必要がない。

#### 【0048】

40

##### 機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法

本実施形態の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法は、(d) 上述した製造方法を用いて製造されたタンパクアレイ又はペプチドアレイを用いて、機能性スクリーニングを行い、リアクターを特定する工程を有する。

#### 【0049】

##### [第1実施形態]

以下、図 1 を参照しながら、本実施形態の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法について具体的に説明する。

#### 【0050】

本実施形態において、工程 (d) は、上述した第 1 実施形態の製造方法により得られた

50

タンパク質又はペプチド7を用いて、リアクター2内に固定された前記タンパク質又はペプチド7に対して、機能性スクリーニングを行い、リアクターを特定する工程である。

機能性スクリーニング方法としては、リアクターアレイ上のリアクターから所望の特性を有するタンパク質を有するリアクターを特定するためのものであれば特に限定されない。

一例として、リアクター2内にタンパク質又はペプチド7及び核酸を保持したままリアクター2内の無細胞質合成系9を除去し、洗浄し、リアクター2内をタンパク質機能評価溶液で満たすことが好ましい。

次いで、基板15又はオイル等でリアクターを封止し、各リアクターを独立させ、タンパク質機能評価反応を行い、目的とする機能を有するタンパク質又はペプチドが固定化されているリアクターを特定することが好ましい。

#### 【0051】

例えば、スクリーニング対象のタンパク質が酵素である場合、機能性スクリーニングとしては、酵素活性測定系が挙げられる。具体的な手法としては、リアクター2内にタンパク質の活性を測定するために必要な溶液（酵素活性測定系）を添加し、酵素反応を生じさせることで、リアクターアレイ上のタンパク質の活性を測定する手法が挙げられる。

#### 【0052】

例えば、スクリーニング対象のタンパク質が抗体である場合、機能性スクリーニングとしては、抗原との結合活性測定系が挙げられる。

#### 【0053】

また、酵素活性又は結合活性の測定法としては、従来公知の方法が用いられ、例えば、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET法）、エバネッセント場分子イメージング法、蛍光イメージングアナライズ法、固相酵素免疫検定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay（ELISA））、蛍光偏光解消法、蛍光相関分光法、表面プラズモン共鳴法等が挙げられる。

#### 【0054】

本実施形態において、更に、前記工程（d）の前に、リアクター12内の核酸を回収する工程（e）を有することが好ましい。回収方法としては、リアクターアレイ1と同じ配列のリアクターアレイを用意し、該リアクターアレイに位置情報を変更することなく、磁気ビーズに固定されたDNAを再配置する方法が挙げられる。

工程（e）を有することにより、工程（d）において機能性スクリーニングの後に、特定したリアクター2に固定されたタンパク質又はペプチド7を同定することができ、リアクター2に配置した核酸の情報を予め得ておく必要がない。

また、リアクター2内に固定されたタンパク質又はペプチド7以外の夾雑物を取り除き、工程（d）に係る機能性スクリーニングの精度を高める観点からも、本実施形態において、工程（d）の前に核酸を回収する工程（e）を有することが好ましい。

#### 【0055】

また、前記工程（e）は、前記工程（b）で磁気ビーズとの親和性を有する基板を前記リアクターアレイと重ね合わせることにより、核酸を前記基板上にプリントする工程であってもよい。一例として、工程（b）で架橋が途中段階のPDMSでコートされたガラス基板を用い、リアクターアレイ1と重ね合わせることにより、核酸をPDMS上にプリントする工程が挙げられる。

#### 【0056】

また、工程（e）を有することにより、回収した核酸を再利用することができる。

#### 【0057】

次いで、本実施形態において、更に、前記工程（d）で特定されたリアクターに対応する核酸の塩基配列を解析する工程（f）を有することが好ましい。塩基配列の解析方法としては、回収した核酸をPCR等により増幅し、DNAシーケンサーを用いた従来公知の方法が挙げられる。

10

20

30

40

50

また、工程（f）に替えて、特定されたリアクターに固定されたタンパク質又はペプチドを、プロテアーゼを用いてペプチド分解し、分解されたペプチドをマススペクトルにより分析して、タンパク質又はペプチドの同定をしてもよい。

【0058】

[第2実施形態]

以下、図2を参照しながら、本実施形態の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法について具体的に説明する。

本実施形態において、工程d)は、上述した第2実施形態の製造方法により得られたタンパクアレイ又はペプチドアレイを用いて、リアクター2内に固定された前記タンパク質又はペプチド7に対して、機能性スクリーニングを行い、リアクターを特定する工程である。

10

【0059】

本実施形態においても、更に、前記工程（d）の前に、リアクター2内の核酸を回収する工程（e）を有することが好ましい。回収方法としては、上述した磁気ビーズに固定されたDNAを再配置する方法以外に、ピューロマイシンリンカー20が可逆的光連結性塩基を有する場合には、光照射により、可逆的光連結性塩基を光開裂させ、リアクター2から核酸を解離し、回収する方法が挙げられる。

他の工程については、第1実施形態と同様であるため説明を省略する。

【0060】

[第3実施形態]

以下、図3を参照しながら、本実施形態の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法について具体的に説明する。

本実施形態において、工程（d）は、上述した第3実施形態の製造方法により得られたタンパクアレイ又はペプチドアレイを用いて、リアクター2内に固定された前記タンパク質又はペプチド7に対して、機能性スクリーニングを行い、リアクターを特定する工程である。

20

【0061】

本実施形態においても、更に、前記工程（d）の前に、リアクター2内の核酸を回収する工程（e）を有することが好ましい。回収方法としては、ピューロマイシンリンカー20が可逆的光連結性塩基を有する場合には、光照射により、可逆的光連結性塩基を光開裂させ、リアクター2から核酸を解離し、回収する方法が挙げられる。

30

他の工程については、第1～2実施形態と同様であるため説明を省略する。

【0062】

従来の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法においては、個々に壁を有さないアレイを用いるため、合成したタンパク質又はペプチドの機能性スクリーニングの際に、別途リアクターアレイを必要とする。一方、本実施形態の機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法によれば、個々に壁を有するリアクターからなるリアクターアレイを用いるため、一枚のリアクターアレイでタンパク質又はペプチドの機能と配列を特定できる。また、DNAアレイからタンパク質アレイを製造する際、又は、タンパク質アレイを用いて機能性スクリーニングを行う際に必要とされていた、基板をリアクターに重ね合わせる際のアライメントを取る必要がない。

40

【0063】

タンパク質アレイ又はペプチドアレイ

[第1実施形態]

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、特定の開口形状を有したリアクターからなるリアクターアレイと、前記リアクター内に配置された、固相担体に固定された核酸及び該核酸にコードされるタンパク質又はペプチドと、を有するものである。

前記リアクターは、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に固定された、前記タンパク質又はペプチドを捕捉するタンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子を有する。

50

## 【 0 0 6 4 】

タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法 の第 1 実施形態で述べたように、本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、核酸が固相担体に固定されたものである。該核酸は、磁気ビーズに固定されたものであることが好ましい（図 1 参照）。

## 【 0 0 6 5 】

## [ 第 2 実施形態 ]

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、特定の開口形状を有したリアクターからなるリアクターアレイと、前記リアクター内に配置された、固相担体に固定された DNA 及び該 DNA にコードされるタンパク質又はペプチドと、を有するものである。

前記リアクターは、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に固定された、前記 DNA から合成される mRNA 及びタンパク質又はペプチドを捕捉するタンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを有する。

10

## 【 0 0 6 6 】

タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法 の第 2 実施形態で述べたように、本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、第 1 実施形態で述べたタンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子に替えて、タンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを用いたものである（図 2 参照）。

## 【 0 0 6 7 】

## [ 第 3 実施形態 ]

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、特定の開口形状を有したリアクターからなるリアクターアレイと、前記リアクター内に配置された、DNA 及び該 DNA にコードされるタンパク質又はペプチドと、を有するものである。

20

前記リアクターは、該リアクター内の壁面及び底面の少なくとも一部に固定された、前記 DNA から合成される mRNA 及びタンパク質又はペプチドを捕捉するタンパク質連結部分又はペプチド連結部分を有する核酸リンカーを有する。

## 【 0 0 6 8 】

タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法 の第 3 実施形態で述べたように、本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイは、第 2 実施形態で述べた固相担体に固定された DNA に替えて、固相担体に固定されていない DNA を用いたものである（図 3 参照）。

30

## 【 0 0 6 9 】

## 機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キット

本実施形態の機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キットは、上述した第 1 実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイ と、前記固相担体との親和性を有する基板と、を備える。

機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法 の第 1 実施形態で述べたように、固相担体との親和性を有する基板をリアクターアレイと重ね合わせるにより、核酸を前記基板上にプリントすることができる。

## 【 0 0 7 0 】

本実施形態のタンパク質アレイ又はペプチドアレイ、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キットによれば、所望の機能を有するタンパク質又はペプチドを迅速に同定することができるため、進化分子工学的用途に好適に用いられる。

40

## 【 0 0 7 1 】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 【実施例】

## 【 0 0 7 2 】

## [ 石英ガラスリアクターの作製 ]

石英ガラスを濃硫酸(15.5%)・過酸化水素水(15.5%)混合液に浸漬し、200 で15分間置き、石英ガラスをSPM洗浄した。超純水でリンス後、窒素ブローで石

50

英ガラスを乾燥させた(図4(a)参照)。

スパッタリング装置(Cannon ANELVA SPF-430H)を用いて、Ar気流下で石英ガラスへCrをスパッタし、石英ガラス上へ厚さ約4 $\mu$ mの薄膜を形成した(図4(b)参照)。

次いで、ポジ型フォトレジストAZP1350をCr薄膜上にスピコートして、10090秒プリベイクし、フォトレジスト膜を形成した(図4(c)参照)。

次いで、紫外線露光装置マスクアライナー(Double-View Mask Aligner PEM-800, union)を用いて、マスクパターンを介してUV露光した(図4(d)参照)。

次いで、AZ Developerを用いて60秒間現像し、超純水で洗浄後N<sub>2</sub>ドライし、1202minポストベイクし、パターンを現像した(図4(e)参照)。

次いで、Crエッチング溶液(硝酸ニアンモニウムセリウム65.8g, 過塩素酸17.2ml, 超純水400ml)を用いてCr薄膜のパターンエッチングを行った(図4(f)参照)。超純水に浸漬後、窒素ブローで乾燥させた。

次いで、アセトンに浸漬後、5分間超音波洗浄後してフォトレジストを除去し、窒素ブローで乾燥させた(図4(g)参照)。

次いで、C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>/SF<sub>6</sub>プラズマを用いて、深さ60 $\mu$ mまで石英をドライエッチングした(図4(h)参照)。

次いで、Crエッチング溶液に240min浸漬し、石英ガラスを濃硫酸(46.5%)過酸化水素水(15.5%)混合液に浸漬し、200で15分間置いてCr薄膜を除去した後、超純水でリンスし、深さ60 $\mu$ m、直径140 $\mu$ mのリアクターを有する石英ガラスリアクターを作製した(図4(i)参照)。

#### 【0073】

##### [石英ガラスリアクターのNi-NTA修飾]

SPM洗浄した石英ガラスリアクターを1%3-アミノプロトリエトキシシラン(以下、APTESともいう。)水溶液に浸し、9060分反応させた。エタノールと超純水で洗浄した後、110で1分間キュアリングし、石英ガラスリアクターをアミノ基で修飾した(図5工程(B1)参照)。

次いで、石英ガラスリアクターを12.5%グルタルアルデヒド水溶液に6060分間浸し、アルデヒド修飾を行った(図5工程(B2)参照)。

次いで、石英ガラスリアクターをN-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid(AB-NTA)2mg/mlに6060分間浸し、NTA修飾を行った(図5工程(B3)参照)。

次いで、石英ガラスリアクターを14mg/ml L-Lysineに室温で60分間浸して、未反応アルデヒド基をブロックした。

次いで、10mg/ml NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>Oに60分間浸して、Niイオンを付加し、超純水で洗浄後、窒素ブローで乾燥させた(図5工程(B4)参照)。

#### 【0074】

##### [無細胞転写翻訳溶液の製造]

配列番号1に記載のBGLおよびHisTagをコードしたDNA(1687bp)20ng、Fluorotect(Promega社)5 $\mu$ l、及び無細胞転写・翻訳システム(TNT(登録商標)Coupled Wheatgerm Extract System, Promega社)50 $\mu$ lを混合し、無細胞転写翻訳溶液を得た。

#### 【0075】

##### [BGLの合成及び固定化]

Ni-NTA修飾石英ガラスリアクター上に、上記無細胞転写翻訳溶液50 $\mu$ lを滴下し、この滴下表面に、プレス機を用いて、PDMS(東レ・ダウコーニング社)コートガラスを、302時間圧着させた。

次いで、PDMSコートガラスを除去し、このリアクターを有する石英ガラスリアクタ

10

20

30

40

50

ーを0.1% (v/v)のTweem 20を含むリン酸緩衝液で5分間洗浄した。洗浄後のガラスリアクター上に1xPBSを滴下し、カバーガラスを載せて共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡観察 (Ex: 488 nm, Em: 515 BP 30 nm)を行った。共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡観察 (Ex: 488 nm, Em: 515 BP 30 nm)を図6に示す。図6に示すように、石英ガラスリアクター上へのBGLの固定化を確認した。

#### 【0076】

次いで、窒素ブローで石英ガラスリアクター上のPBSを除去し、基質として、レゾルフィン標識したグルコース (2.5 μM resolfin - グルコース) 水溶液をリアクター上に滴下し、PDMSコートガラス基板を上面から押つけることで、リアクターのリアクター内に溶液を封入した。

10

これを30 で保持し、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡で経時観察した (Ex: 561 nm, Em: 590 BP 40 nm)。

酵素反応後の共焦点顕微鏡観察像を図7に示す。図6で示したBGLの固定が確認されているリアクター中に酵素反応の結果生じる蛍光が時間依存的に観察された。

#### 【0077】

また、同様に、BGLを固定化した石英ガラスリアクターの各リアクターにおける、酵素反応時間と、基質が分解することにより生じる蛍光強度との関係を示した結果を図8に示す。

図8に示すように、BGLを固定化したガラスマイクロウェルモールドでは、蛍光強度の上昇が時間依存的に上昇していることが観察された。

20

この結果から固定されたBGLが評価可能な酵素活性を有していることが確認された。

#### 【0078】

[ガラスリアクター内の磁気ビーズのPDMSシートを用いた回収]

ガラスリアクターに磁気ビーズを配置した。次いで、ガラスリアクターに、架橋が途中段階のPDMS (東レ・ダウコーニング社) コートガラスをPDMS面がガラスリアクターと接する様に重ね合わせた。次いで、PDMS (東レ・ダウコーニング社) コートガラスをガラスリアクターから剥がした (図9参照)。

結果を図10に示す。(a)はガラスリアクターの顕微鏡像であり、(b)はPDMSの顕微鏡像である。(a)に示すように、ガラスリアクター内の磁気ビーズは消失した一方、(b)に示すようにPDMS上に磁気ビーズがガラスリアクターに応じて回収されていることが確認された。また、図10に示すように、複数のリアクターを有するリアクターアレイを用いた場合には、磁気ビーズはリアクターアレイの配列と対応してPDMS上に配置される。このことから、PDMS上の磁気ビーズに固定された核酸とリアクター内に固定されたタンパク質との位置関係が確認できる (番地付け)。また、PDMS上の磁気ビーズは再利用することができる。

30

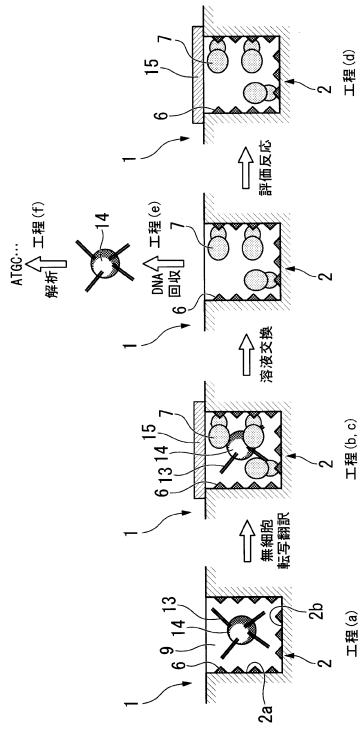
#### 【符号の説明】

#### 【0079】

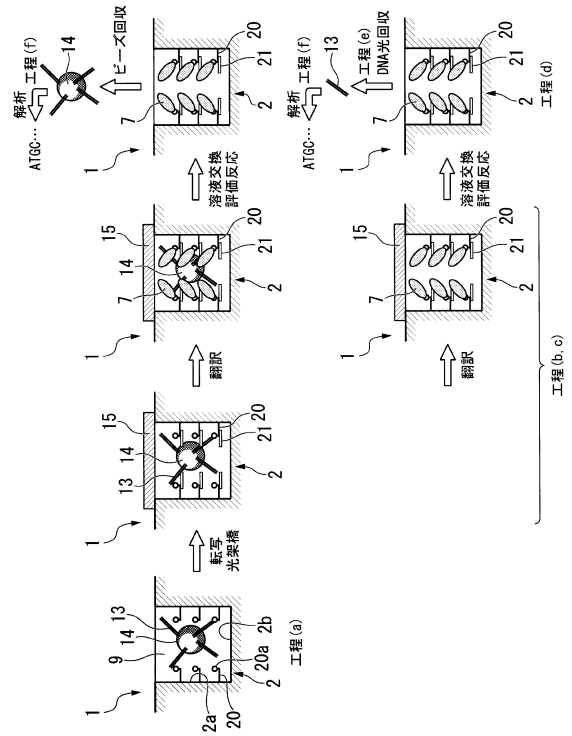
1 ... リアクターアレイ、2 ... リアクター、2 a ... 壁面、2 b ... 底面、6 ... タンパク質捕捉分子又はペプチド捕捉分子、7 ... タンパク質又はペプチド、9 ... 無細胞タンパク質合成系、13 ... DNA、14 ... 磁気ビーズ、15 ... 基板、20 ... ピューロマイシンリンカー、20 a ... ピューロマイシン誘導体、21 ... RNA。

40

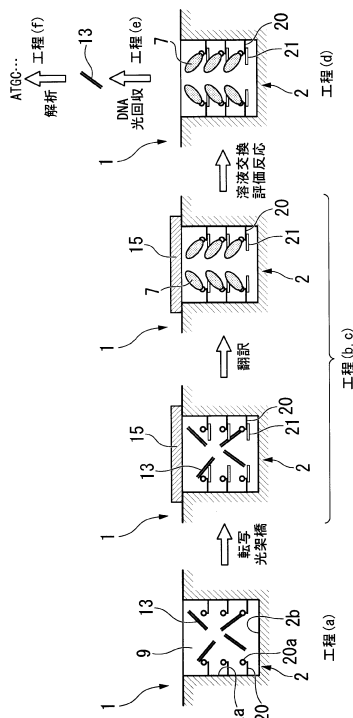
【図1】



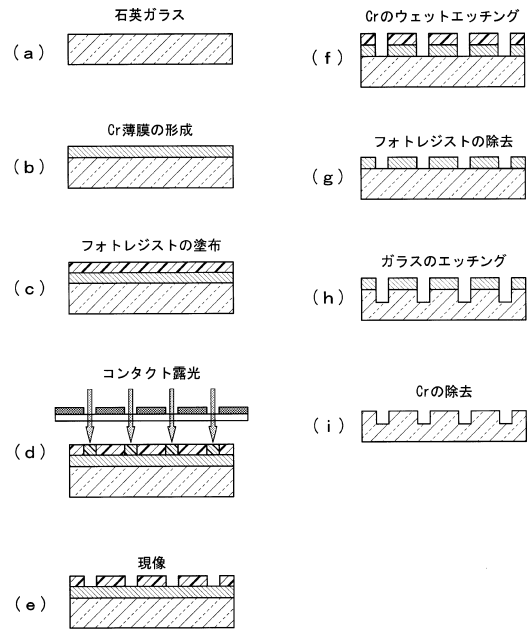
【図2】



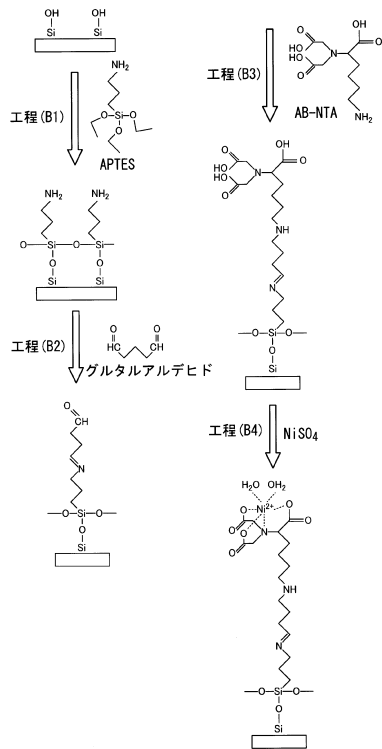
【図3】



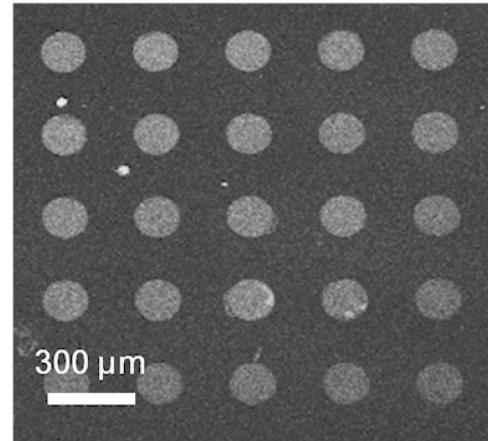
【図4】



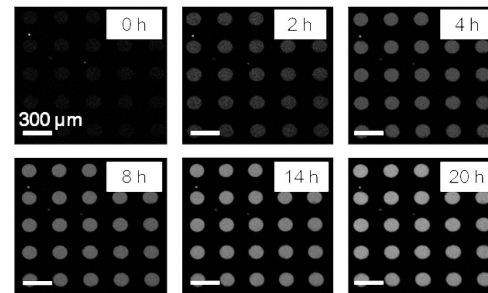
【 図 5 】



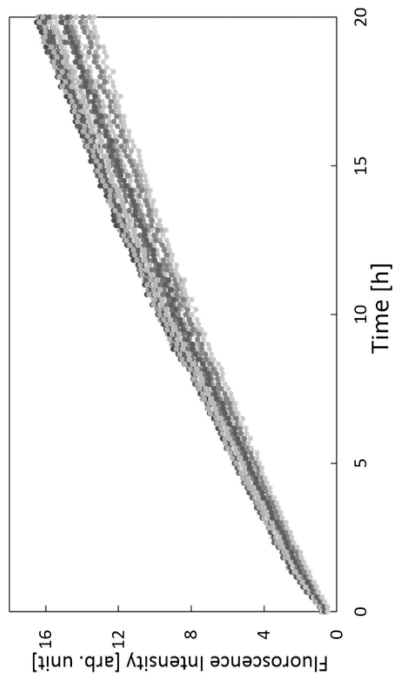
【 図 6 】



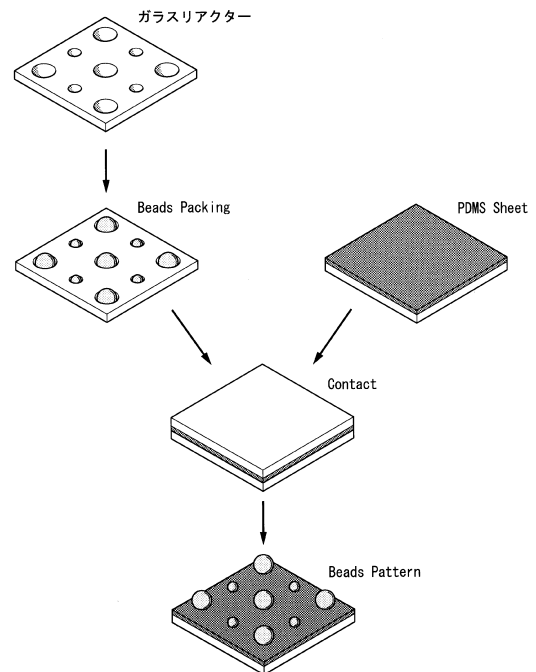
【 図 7 】



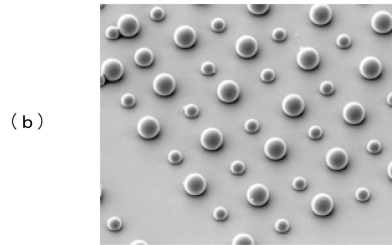
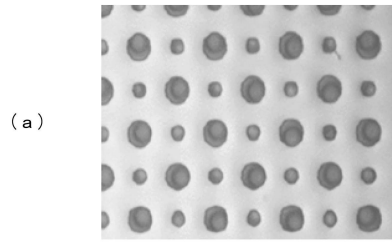
【 図 8 】



【 図 9 】



【図 10】



【配列表】

0006521255000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 0 7 K 17/14 (2006.01) C 0 7 K 17/14

(74)代理人 100108578

弁理士 高橋 詔男

(72)発明者 一木 隆範

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 上野 真吾

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 大澤 日佐雄

東京都千代田区有楽町一丁目12番1号 株式会社ニコン内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2004-506898(JP,A)

国際公開第2013/065782(WO,A1)

国際公開第2012/026541(WO,A1)

特開2012-070654(JP,A)

応用物理学学会学術講演会講演予稿集,2010年,p.12-401(15a-E-7)

応用物理学関係連合講演会講演予稿集,2011年,p.12-238(26p-CB-14)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00-15/90

C12P 21/00-21/08

C12M 1/00-1/42

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

(54)【発明の名称】タンパク質アレイ又はペプチドアレイの製造方法、機能性タンパク質又は機能性ペプチドの同定方法、タンパク質アレイ又はペプチドアレイ、及び、機能性タンパク質又は機能性ペプチド同定キット