

## DNA・抗体マイクロアレイの作製技術開発及びその作製・評価

### テーマ3の1 (J 1)

- ① DNAマイクロアレイ作製技術開発
- ② 改良型DNAアレイヤーの開発
- ③ 抗体アレイにおける固定化方法の実践及び評価
- ④ 抗体電極チップ及び検出装置の開発
- ⑤ がん関連遺伝子の解析

(財) 千葉県産業振興センター (主任研究員) 古閑 比佐志

#### 【目的と概要】

本サブテーマの目的は、整備された cDNA クローンや作製した抗体をアレイ化することで網羅的解析のプラットフォームを構築することにある。既存の技術の弱点を克服するイノベーションの開発と、それによって得られた産物を用いた、生物学的に有用な情報の蓄積という大きな2つの目標を抱え取り組んできた。後者は特に強力な共同研究者との共同研究によりもたらされたが、このテーマにおいても当初目標を上回る大きな成果を挙げることができた。具体的には約 2400 遺伝子を搭載した cDNA マイクロアレイを作製し、共同研究先に提供するとともに、コア研究室で様々な発現プロファイルの構築を行なってきた。抗体アレイに関しては、当初 SPR (Surface Plasmon Resonance Imaging 表面プラズモン共鳴解析法) を利用して系を確立したが、更に高感度、ハイダイナミックレンジを求めて科学発光系を検出系に用いたシステムの構築に至っている。フェーズ III においては、これらを更に発展させ臨床応用可能な域まで高めることを目指している。

#### 【研究成果の概要と今後の取り組み】

##### (1) cDNA マイクロアレイ

cDNA マイクロアレイに関しては今井一英雇用研究員を中心として作業を進めてきた。まず現在までに取得した全ての遺伝子(mKIAA, mFLJ)を搭載した cDNA マイクロアレイを、プロジェクトで開発した新規技術(テンプリファイによる cDNA クローンの簡便増殖法など)を用いて、ナイロン膜上にピン型スポットターを用いて固相化した。これを用いて、マウス脳の異なる部位(大脳皮質、海馬、小脳など)から抽出した mRNA からプローブを作製し、脳内局在別の発現プロファイルを作製した。既に mKIAA 遺伝子群が特に脳で発現が高いことを明らかとしているので、この実験により更に詳細な発現様式が明らかになると共に、我々が保有する長鎖遺伝子の機能予測が可能になった。

##### (2) オリゴ DNA マイクロアレイ

non-RI での検出・大量のアレイ作製やアレイ作製自体の外注・大量サンプルの解析自動化などを考慮するナイロン薄膜基板 cDNA マイクロアレイ以外の手法の開発も必要であるとの考えから、オリゴ DNA マイクロアレイの技術開発も行なった。500 種類のマウス KIAA 遺伝子に対し 65-75 mer のオリゴプローブをデザインした。用いたソフトは統合オリゴ DNA 設計システム ProbeQuest (ダイナコム社) で、一部その設計条件に手を加えた。コストの面を考慮しオリゴの修飾は行わず、ガラス基盤の選択とハイブリ条件の検討でその感度の上昇を目指した。その結果アミノ修飾オリゴ DNA 固定スライド(松浪硝子)と ArrayBooster™ (Advalytix 社) による hybridization の組み合わせで Cy5 で十分解析可能なシグナルを得ることができた。問題点としては蛍光色素でのダイナミックレンジの低さであるが、富士写真フィルムの協力を得て現在近赤外線用蛍光色素での検討も重ねている。近赤外線レーザー搭載検出装置がごく最近市場に投入された状況なので、新規近赤外線用蛍光色素の検討は使用者のニーズからみても極めて重要な位置になるだろう。このアレイを用いてコア研究室で蓄積した発現プロファイルは、GEO に登録するとともに国際誌 Gene に掲載の運びとなった。この論文では、神経分化モデルを用いて個々の mKIAA 遺伝子の関わりを検討した。用いた系はマウス神経芽腫細胞株のレチノイン酸による分化の系で、分化誘導開始後、1、3、6、12、24 時間後の細胞から抽出した RNA を Cy5 で標識してハイブリダイゼーションを行った。解析の結果、数%の遺伝子で有意な発現量の変化がみられ、いくつかの遺伝子では RT-PCR でも同様な変化が確認できた。これら遺伝子のうち、約半数の遺伝子は機能未知であり、アミノ酸構造からは IP3 ないしは G 蛋白関連のシグナルトランスダクションや細胞へのダメージ応答を解して神経分化に関与していることが予測された [図 1]。

### (3) 抗体アレイ

生物学的事象を体系的にとらえるための網羅的解析プラットフォームの重要性が指摘されてから10年以上が経過し、遺伝子発現レベルでの網羅的解析に関してはDNAマイクロアレイという技術でその技術的要素はほぼ達成された。一方、蛋白質の発現に関しては2次元電気泳動法を中心として網羅的解析が行われているが、操作の煩雑性や比較的高度な技術を要することから、遺伝子同様アレイプラットフォームでの解析技術の開発が望まれている。近年メンブレンベースの抗体アレイ技術の開発が報告されるようになったが、サンプル蛋白質のラベリングや結果を得るまでの操作が煩雑で長時間を要するなどの問題点も多い。このことを鑑み申請者らは、表面プラズモンレゾナンス技術（以下 SPR と略す）を用い、抗体アレイ技術開発のための基盤となる技術を開発してきた。本開発課題では、これら基本技術を生かし、実用に耐えうる抗体アレイプラットフォームの構築を目指した。

表面プラズモンレゾナンス技術を用いた多検体解析システムは、東洋紡株式会社のMultiSPRinterとHTS Biosystems社（米国コネチカット州）のFLEXCHIP Kinetic Analysis Systemの2システムしか現存しない。薄井一恵研究員を中心に、これらの既存のテクノロジーを抗体アレイ用に最適化すべく研究を重ねてきたが、様々な点において改良が必要であることを明らかにした(Proteomics 2005)。感度などの機器自身のスペックはMultiSPRinterが勝っていることと、FLEXCHIPの測定対象が分子のkineticsに傾倒していることを考えると、MultiSPRinterを基本とし改良を加えることで抗体アレイに特化した解析機器の開発は十分期待できることが判明した。しかしながら、独自のアレイ表面加工技術を駆使しても、感度は30ng/mlが限界であった。この結果はサンドイッチ法を用いる抗体アレイと比較すると数段悪いものであった。発現量の多い蛋白質に対しては、そのアッセイ速度（1時間以内に解析可能）と簡便性（サンプルのラベルが不要）から推奨できる方法であるが、発現量の低い蛋白質では更なる改良が必要と判断された。この点を考慮し検出に化学発光を用いたシステムを構築すべく計画を立てた。様々な基盤を検討し最終的に、最適基盤としてNunc社製マキシソープがバックグラウンドが低く固相化率も高い基盤であることが明らかとなった。また当初、サンプルをジゴキシゲニンで修飾しHRP修飾抗ジゴキシゲニン抗体を反抗後化学発光系で検出していたが、ビオチン修飾（同仁化学）の方がより検出感度が高いことも明らかとなったので、最終的にはこの組み合わせでシステムの構築を行った。さらに、検出に用いる化学発光系試薬の検討と、検出機器の組み合わせを検討し、検出試薬としてはロッシュ社製HRP conjugated 抗ビオチン抗体・ピアス社製SuperSignal®、検出機器としては富士写真社製LAS3000が選ばれた。この至適条件の組み合わせを用い、実際のサンプル解析を行ったところ、蛋白質の粗抽出物での50pg/mlの感度を達成するに至った〔図2〕。平行した抗体の前処理の実験から、Protein A精製後の抗体をGST蛋白質発現大腸菌の菌体成分をカラム化したものに通すことにより、その素通り画分にはほぼaffinity精製と同程度の精製度が得られることも確認できた〔図3〕。最終的に約960抗体をスポットした抗体アレイが完成し、成体マウス臓器での蛋白質の発現プロファイルを作製することができた。

#### 【特許】

##### 1. 液の転写装置

特許公開 2004-317189

出願人：科学技術振興機構、かずさDNA研究所、(株)カケンジェネックス

##### 2. マウス遺伝子に特異的な核酸分子

特許公開 2005-87116

出願人：科学技術振興機構、かずさDNA研究所、ダイナコム(株)

##### 3. 新規ポリペプチド、抗体及びそれをコードするDNA

PCT国際出願：PCT/JP2004/15997（2004年10月28日）

出願人：かずさDNA研究所、先端医療振興財団

##### 4. 細胞付着ポリペプチド

特許公開 05-287350

出願人：科学技術振興機構、かずさDNA研究所

##### 5. ヒトTh1/Th2分化誘導系及びその用途

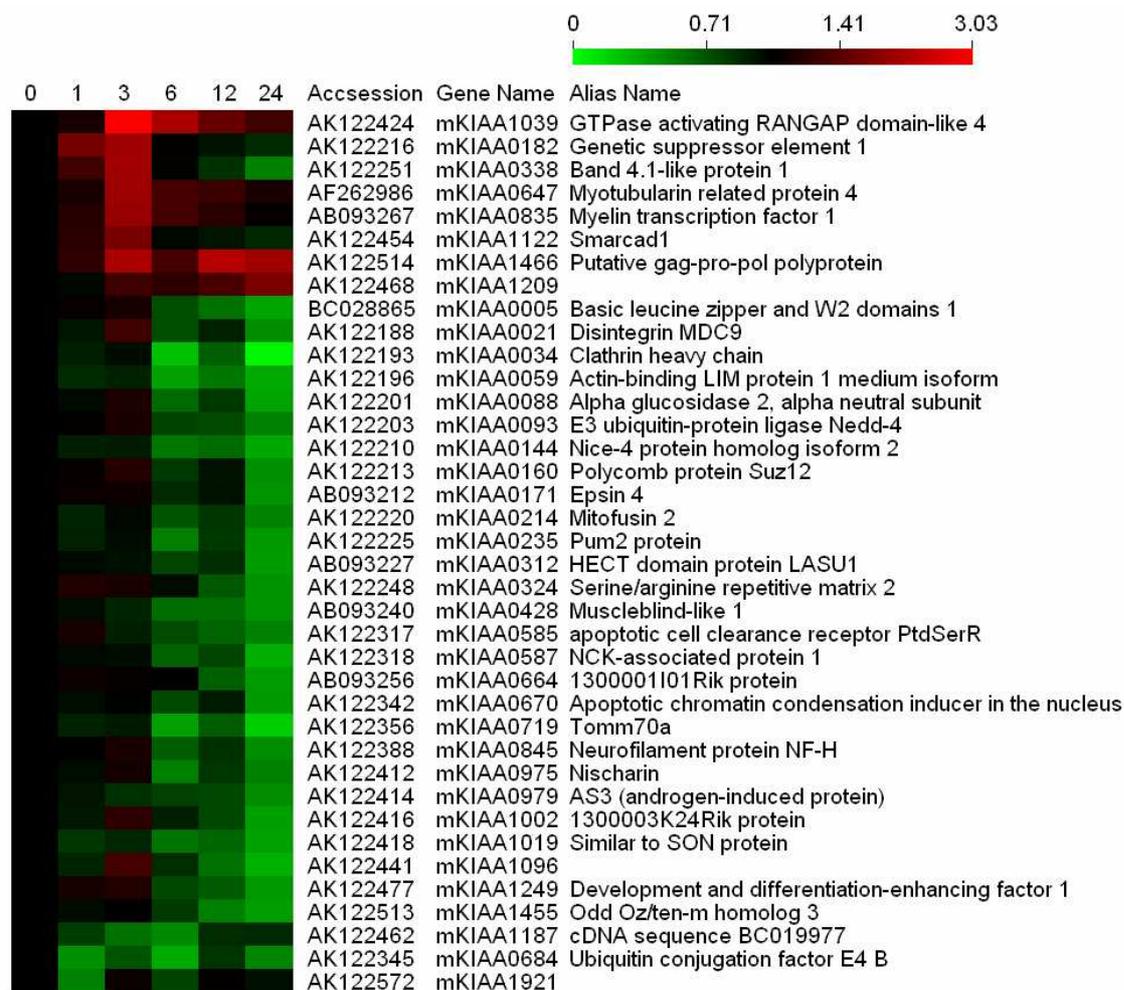
特願：2006-93086（2006年3月30日）

出願人：千葉大学、かずさDNA研究所

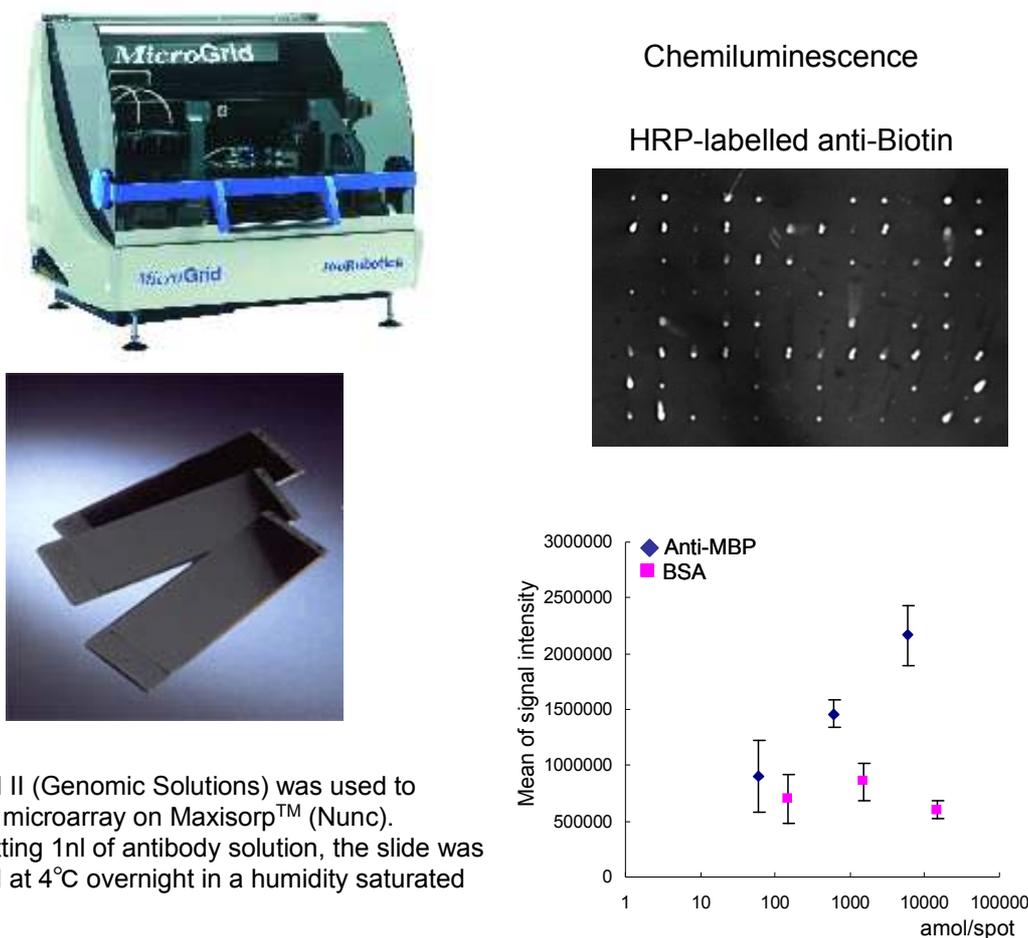
【2006年までの主な成果】

- 1 Yamamoto H, Kamegaya E, Takamatsu Y, Imai K, Yamamoto T, Hagino Y, Koga H, Ikeda K, PROLONGED CHANGES IN EXPRESSION OF GENES UNDERLYING METHAMPHETAMINE ABUSE, *New Research on Methamphetamine Abuse*, NY: Nova Science Publishers, Inc., 2006. (in press).
- 2 Usui-Aoki K, Kyo M, Kawai M, Murakami M, Imai K, Shimada K, Koga H, Protein and antibody microarrays: clues towards biomarker discovery, *Frontiers in Drug Design and Discovery* 2, 2006. Pp23-33
- 3 Koga H, Kyo M, Usui-Aoki K, Inamori K, A chip-based miniaturized format for protein expression profiling: the exploitation of comprehensively produced antibodies. *Electrophoresis* 27, 2006: 3676-3683
- 4 Yamamoto H, Imai K, Takamatsu Y, Kamegaya E, Hara Y, Shimada K, Yamamoto T, Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Ide S, Sora I, Koga H, Ikeda K. Changes in expression of the mouse homologues of KIAA genes after subchronic methamphetamine treatment. *Ann N Y Acad Sci.* 2004, 1025:92-101
- 5 Koga H, Yuasa S, Nagase T, Shimada K, Nagano M, Imai K, Ohara R, Nakajima D, Murakami M, Kawai M, Miki F, Magae J, Inamoto S, Okazaki N, Ohara O. A comprehensive approach for establishment of the platform to analyze functions of KIAA proteins II: public release of inaugural version of InGaP database containing gene/protein expression profiles for 127 mouse KIAA genes/proteins. *DNA Res.* 2004, 11(4):293-304
- 6 Yamamoto H, Imai K, Takamatsu Y, Kamegaya E, Kishida M, Hagino Y, Hara Y, Shimada K, Yamamoto T, Sora I, Koga H, Ikeda K. Methamphetamine modulation of gene expression in the brain: analysis using customized cDNA microarray system with the mouse homologues of KIAA genes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005, 137(1-2):40-46.
- 7 Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M, Kawai M, Koga H. A novel approach to protein expression profiling using antibody microarrays combined with surface plasmon resonance technology. *Proteomics.* 2005, 5(9):2396-2401
- 8 Imai K, Mimori T, Kawai M, Koga H. Microarray Analysis of Host Gene-Expression during Intracellular Nests Formation of *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. *Microbiol Immunol.* 2005, 49(7):623-631
- 9 Imai K, Kawai M, Tada M, Nagase T, Ohara O, Koga H, Temporal change in mKIAA gene expression during the early stage of retinoic acid-induced neurite outgrowth, *Gene*, 2005, 364: 114-122
- 10 Kyo M, Usui-Aoki K, Koga H, Label-free detection of proteins in crude cell lysate with antibody arrays by a surface plasmon resonance imaging technique, *Anal Chem.*, 2005, 77: 7115-7121
- 11 Okazaki N, Imai K, Kikuno RF, Misawa K, Kawai M, Inamoto S, Ohara R, Nagase T, Ohara O, Koga H, Influence of the 3'-UTR-length of mKIAA cDNAs and their Sequence Features to the mRNA Expression Level in the Brain, *DNA Res.*, 2005, 12; 181-189
- 12 Kai N, Iwase K, Imai K, Nakahira E, Soma M, Ohtsuka S, Yagi T, Kobayashi K, Koga H, Takiguchi M, Yuasa S, Altered gene expression in the amygdaloid subdivision of Fyn-deficient mice as revealed by cDNA array analysis, *Brain Research*, 2006, 1073-1074; 60-70

【図1】オリゴDNA マイクロアレイで得られた神経分化に関わる mKIAA 遺伝子



【図2】抗体アレイ用の基盤と実際の化学発光でのデータとその感度



MicroGrid II (Genomic Solutions) was used to construct microarray on Maxisorp™ (Nunc). After spotting 1nl of antibody solution, the slide was incubated at 4°C overnight in a humidity saturated chamber.

【図3】抗体アレイ用の網羅的抗体精製システム

