

<p>サブテーマ名： 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</p> <p>小テーマ名：① DNAマイクロアレイ作製技術開発</p> <p>② 改良型DNAアレイヤーの開発、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（別紙1補足資料参照）</p> <p>③ 化学発光を利用した抗体アレイ検出法の確立</p> <p>④ 抗体アレイにおける固定化方法の実践及び評価</p> <p>⑤ 抗体電極チップ及び検出装置の開発・・・（別紙2補足資料参照）</p> <p>⑥ がん関連遺伝子の解析・・・（別紙3補足資料参照）</p> <p>⑦ 免疫細胞の機能分化に関わる遺伝子並びに遺伝子産物の解析・・・（別紙4補足資料参照）</p> <p>⑧ 血管新生に関わる KIAA 遺伝子並びに KIAA 遺伝子産物の解析・・・（別紙5補足資料参照）</p> <p>⑨ 脳梗塞時におけるポリアミン代謝酵素の誘導機序・・・（別紙6補足資料参照）</p>
<p>サブテーマリーダー（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（研究員）今井 一英</p> <p>研究従事者（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（主任研究員）古閑 比佐志、（研究員）田村 学（H13-H17）、山本正義、須藤 幸夫、今井雄一郎、小野 さやか、薄井（青木）一恵</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>テーマ1において収集したヒトKIAA遺伝子に対するマウス相同遺伝子クローンをを用いてcDNAアレイを作製し、その解析における最適条件を決定し汎用マニュアルを作成した。最適条件決定後はテーマ1における地域側の負担としてcDNA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においても各種実験で発現情報を蓄積した。更にマウスKIAA遺伝子情報からオリゴプローブをデザインしオリゴアレイを作製するとともに、これに関してもその解析最適条件を決定し汎用マニュアルを作成した。また、アレイ作製に用いるアレイヤーも省スペース・高速なものを独自に開発し、研究の進展を早めた。抗体アレイに関しては、プロジェクトで作製する抗マウスKIAA抗体を用いて独自の抗体アレイを作製した。そのために基盤の選択や各種反応条件の決定など、予備的検討から開始して最適条件を決定するところまで到達した。最終的には、蛋白質粗抽出物でも満足しうる感度をもった抗体アレイが作製可能なまでの基盤整備を行った。</p> <p>②研究の独自性・新規性</p> <p>かずさDNA研究所で蓄積してきた長鎖の遺伝子(KIAA遺伝子)は、脳や免疫系での発現が高いばかりか疾患の原因遺伝子となっているものも多く存在する。このことから、これら遺伝子の発現を網羅的に解析できる手法を開発することは、脳研究や各種疾患の解析に極めて重要なことと思われる。このような長鎖遺伝子に特化したcDNAアレイの報告はなく、我々独自の研究基盤である。また近年ポストゲノム時代のツールとして抗体アレイに対する認識は生まれつつあるが、実際に抗体の作製からアレイ化まで一貫して行っている報告はない。この観点からも我々のプロジェクトは極めて新規な試みと言えよう。さらにアレイ作製を独自に開発したアレイヤーで行って行くことは、アレイに載せるコンテンツのみでなくアレイ技術そのものにも最新技術を取り入れることを可能とし、更なるプロジェクトの発展をもたらすに違いない。</p> <p>③研究の目標（各フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）</p> <p>フェーズⅠ（H13-H15）ではフェーズⅡ（H16-H18）以降本格的なcDNAアレイや抗体アレイの作製ができるよう予備的検討を済ませることを最重要課題とした。そのために平成13年度は最適基盤や最適評価検出法の決定を目標に掲げた。平成14年度はテーマ1における全長配列解析の結果と前記予備検討の結果を踏まえ、プロトタイプのcDNAアレイの作製と、それを実際に用い実用に耐えうるものかの検討を目標とした。平成15-16年度にかけて、テーマ2における抗体作製の進捗状況に合わせて、SPR技術を用いたプロトタイプの抗体アレイの作製とそれを用いた条件検討を行った。さらにフェーズⅡ（H16-H18）では化学発光を検出系に用いたより高感度の抗体アレイを試作し、実際の蛋白質粗抽出物でも解析可能なことを検証した。フェーズⅠ-Ⅱをとおり最終的には2400遺伝子搭載のcDNAマイクロアレイと960抗体搭載の抗体アレイを完成させた。</p> <p>フェーズⅢ（H18. 11. 25事業完了日以降）： cDNAマイクロアレイに関しては共同研究先からの更なる解析データの産出を期待している。抗体アレイに関しては、mKIAA抗体に制限せず開発した抗体アレイ技術自体を転用し、さらに研究の幅を広げていく。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>フェーズⅠでは目標どおりcDNAアレイにおける最適評価検出法を決定し、汎用マニュアルを作成した。それに引き続き400 KIAA遺伝子をアレイ化して検証実験を終え、フェーズⅡである現在は2400遺伝子を搭載したアレイを共同研究先への配布している状況である。改良型アレイヤーに関して小型化（デスクトップタイプ）・高速化（従来に比し2倍を達成）を達成し、目標に掲げた全てのDNAアレイに関する課題を解決している。本検討結果より、卓上型アレイヤー装置を担当参画機関であるカケンジェネックス（株）が商品化し既に複数台出荷</p>

している（当該特許に係る実施許諾契約済み）。
抗体アレイに関しては、フェーズⅡで960抗体搭載の抗体アレイを完成させ、蛋白質粗抽出物解析におけるその最適反応条件等を決定した。

主な成果

具体的な成果内容：

特許件数：3 論文数：6 口頭発表件数：13（海外5）

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

DNAマイクロアレイに関してはプロジェクト開始当初は商業レベルで利用できるものが極限られた。また廉価かつ利便性の高いアレイを提供している施設は皆無で、このことは我々のプロジェクトで強調できる点であるとともに、課せられた使命と考えていた。一方そのコンテンツであるがヒトの相同遺伝子としてクローニングしたものでマウスにおいては新規であるものがかなり含まれており、前記した脳や疾患での重要性に加え、従来のアレイにはない新規性も含んでいた。またEST(不確実な配列情報も含む遺伝子断片)などを含まず、搭載した遺伝子の全てにおいて公共データベース(Rouge; <http://www.kazusa.or.jp/rouge/>)を通して詳細な情報を付加している点も評価される点と認識していた。しかし近年の商業レベルでのオリゴDNAアレイの充実ぶりは、この分野における今後の我々の優位性を著しく低下せしめた。今後はcDNAアレイ自体ではなく、そのコンテンツ・作製技術の転用などで、これまでの成果を生かしていくべきと考える。

抗体アレイに関しては、現時点で予備的検討は終了し、960遺伝子遺伝子産物の解析が蛋白質レベルで可能な抗体アレイの完成をみている。Direct labeling 法だがサンドウィッチ法に劣らない感度(50pg/ml)を達成し、世界に類を見ない解析ツールを保有することとなった。

2 実用化に向けた波及効果

ヒトゲノム計画が終焉し、今後の研究がその転写産物(蛋白質)の解析へ進展していくことは自明の理である。この点から抗体アレイの解析ツールとしての開発と、その保有は次世代の研究へ向けて必須の課題であった。抗体アレイは極めて新しい技術のためDNAアレイのようなグローバルスタンダード(Affimetrix社のGeneChipなど)が存在しない。従って我々の研究成果は若干世界に先行しているため、十分のこの分野におけるグローバルスタンダードになり、極めて大きな波及効果を与える可能性を秘めている。

残された課題と対応方針について

今後、コンテンツとcDNAアレイ作製技術を転用して、機能的にサブグループ化した分子の解析手法を確立することは重要であるとともに、GeneChipなどに対抗しうる商品化の可能性を秘めている。そのためには適切な機能分類ができるようGene Ontologyに基づき遺伝子をサブグループ化していくこととコンテンツとなるcDNAの拡充が必要である。次期プロジェクトでは転写関連因子に集約した研究を提案しているため、このことを念頭に現在すでに作業に着手している。また抗体アレイは方法論として新しくその適応範囲が明確でない。今後は我々の抗体アレイを用いて、様々な解析に対するアプリケーションを模索すべく、共同研究の枠組みを広げていく。

	J S T負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	
人件費	1,878	7,703	10,784	20,164	17,085	7,921	65,535								65,535
設備費	22,544	464	495	2,092	4,154		29,749								29,749
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	4,920	8,513	28,225	7,078	6,423	6,700	61,859								61,859
旅費		44	75	99	463	334	1,015								1,015
その他															
小 計	29,342	16,724	39,579	29,433	28,125	14,955	158,158								158,158

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T負担による設備：タンパク質機能解析装置、核酸/タンパク質蛍光画像解析装置、化学発光画像解析装置、蛍光顕微鏡システムなど

地域負担による設備：ジーンチップ解析装置 (Affimetrix社)、大型コンピューターシステムなど

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。