

本コンテンツの著作権につきまして YODOSHA CO., LTD. 2007

・本コンテンツに掲載された著作物の複写権・複製権・転載権・翻訳権・データベースへの取り込みおよび送信（送信可能化権を含む）・上映権・譲渡権は、(株)羊土社が保有します。

・JCLIS <(株)日本著作出版管理システム委託出版物>

本コンテンツの無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に(株)日本著作出版管理システム (TEL 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199) の許諾を得てください。

ゲノム創薬・疾患診断を実現する **特集**

# 新世代 マイクロ アレイ

企画／稲澤譲治

(東京医科歯科大学難治疾患研究所)

<概論>マイクロアレイの進歩と診断技術の発展 稲澤譲治 280

【Ⅰ ゲノムアレイ解析の新展開】

高密度ゲノムアレイにより急速に進化する癌ゲノム解析

柴田龍弘 286

<協賛記事>クロマチン免疫沈降ー DNA チップ (ChIP-on-chip) 法を用いた Th2 細胞分化機構の解析

山下政克 292

【Ⅱ マイクロアレイ発現解析の新展開】

網羅的発現情報解析を利用した癌の新規治療薬開発への戦略

片桐豊雅, 中村祐輔 296

エキソンアレイを用いた癌特異的スプライシングバリエーションの探索

佐藤礼子, 山田哲司 302

【Ⅲ 医療での実用化を目指した応用】

神経芽腫診断用発現チップの開発と実用化

大平美紀, 中川原 章 308

食道癌化学放射線感受性予測チップの開発と実用化に向けた取り組み

嶋田 裕, 辻本豪三, 信正 均, 藤元治朗 315

【Ⅳ アレイプラットフォームで展開する新技術】

マイクロ RNA のハイスループット解析

間野博行 322

<協賛記事>新世代のフォーカストアレイ「Genopal® (ジェノパール®)」

三菱レイヨン株式会社 326

<協賛記事>高分子多孔質メンブレンを用いた核酸抽出技術の開発とマイクロアレイ解析への活用

富士フイルム株式会社 328

◆協賛企業◆

倉敷紡績株式会社

富士フイルム株式会社

ジーンフロンティア株式会社

プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

株式会社 DNA チップ研究所

三菱レイヨン株式会社

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

本記事のアンケートにご協力ください。抽選で  
羊土社オリジナルグッズをプレゼントいたします

本コンテンツの著作権につきまして YODOSHA CO., LTD. 2007

・本コンテンツに掲載された著作物の複製権・複製権・転載権・データベースへの取り込みおよび送信（送信可能化権を含む）・上映権・譲渡権は、(株)羊土社が保有します。

・JGCS <(株)日本著作出版管理システム委託出版物>

本コンテンツの無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に(株)日本著作出版管理システム (TEL 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199) の許諾を得てください。

■FAX ⇒ このページ

■WEB ⇒ こちらをクリック

☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆ アンケートにご協力ください ☆☆☆☆☆☆☆☆

抽選で毎月5名様に『羊土社ロゴ入り オリジナルタイマー』をプレゼント!!

プレゼント対象期間：2007年7月末日まで（当選者の発表は商品の発送をもってかえさせていただきます）



私どもバイオテクノロジージャーナル編集部では、皆様方の声をお聞きして、今後の雑誌や書籍発行の参考にさせていただきたいと存じております。ぜひ、アンケートへのご協力をいただけますようお願い申し上げます。

1) バイオテクノロジージャーナル5-6月号 特集「新世代マイクロアレイ」を読んだ感想を教えてください

☐ 役に立った ☐ 役に立たなかった ☐ どちらともいえない

◎理由

[

2) 本特集の中で、最も興味深かった、面白かった協賛企業記事はどれですか？

☐ 「クロマチン免疫沈降-DNAチップ (ChIP-on-chip) 法を用いたTh2細胞分化機構の解析」

ジーンフロンティア株式会社 (山下政克先生執筆)

☐ 「新世代のフォーカストアレイ「Genopal(R) (ジェノパール(R))」

三菱レイヨン株式会社

☐ 「高分子多孔質メンブレンを用いた核酸抽出技術の開発とマイクロアレイ解析への活用」

富士フイルム株式会社

◎選んだ理由

[

3) 本特集に掲載されているマイクロアレイ関連企業の詳しい資料をご希望される方は、☐ にレ印をご記入ください

※資料請求いただいた方については、羊土社がとりまとめ、該当広告主にお渡しします。それ以降は各社それぞれの責任において管理され、資料のご案内をさせていただきます

☐ 全ての資料を請求する

☐ 倉敷紡績株式会社

☐ ジーンフロンティア株式会社

☐ 株式会社DNAチップ研究所

☐ 日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

☐ 富士フイルム株式会社

☐ プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

☐ 三菱レイヨン株式会社

☐ 和光純薬工業株式会社

☐ 株式会社パーキンエルマージャパン

☐ 株式会社スクラム

4) 今後、製品特集として取り上げて欲しいテーマを教えてください

[

FAX 03-3292-1224 羊土社 バイオテクノロジージャーナル編集部 行

送  
付  
先  
・  
連  
絡  
先

ご住所 〒

ご所属

なまえ  
お名前

TEL

E-mail

※羊土社メール配信ならびに小社出版物のご案内に使用させていただきます。また、ご本人の許可なく第三者へ提供することはございません。内容のご確認、修正、削除のご希望ございましたら、弊社までお申し出下さい。万が一小社出版物のご案内がご不要の場合には下記チェック欄にレ印をお付けください。尚、羊土社の個人情報の取扱いに関しては次のURLをご覧ください。羊土社発行書籍の案内は不要です

<http://www.yodosha.co.jp/ppi/index.html>

☐ 羊土社発行書籍の案内は不要です

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1 神田三和ビル

TEL 03(5282)1215 (編集部)

E-mail: [btjournal@yodosha.co.jp](mailto:btjournal@yodosha.co.jp)

URL: <http://www.yodosha.co.jp/>

FAX番号: 03(3292)1224

発行

羊土社

「バイオテクノロジー ジャーナル」定期購読申し込み

本誌は定期でのご購読がお得です。定期購読をご希望でしたら、下記にご記入ください。

年 ・ 月号から 1 年間 6冊 14,175円 (10% OFF 税込) 定期購読する

# < 概論 > マイクロアレイの進歩と 診断技術の発展

稲澤 譲治

## はじめに

マイクロアレイは一度に数千～数万の遺伝子の変化を検出できる革新的なゲノム解析ツールとして1990年代半ばに登場した。2002年に出版されたマイクロアレイのテキストには、“all human illness can be studied by microarray analysis, and the ultimate goal of this work is to develop effective treatments or cures for every human disease by 2050”の一文が記述されている<sup>1)</sup>。癌はマイクロアレイ解析の中心的な対象であり、その治療や予防のブレークスルーとなる遺伝子情報を提供してくれるものと多大なる期待が寄せられた。2007年2月6日には、米国食品医薬品局（FDA）によって乳癌の予後予測を目的としたマイクロアレイの診断デバイス MammaPrint<sup>®</sup>の米国での発売が承認された<sup>2)</sup>。これはマイクロアレイの体外診断法としての最初の認可である。2005年からFDA主導で組織されたマイクロアレイの品質管理プロジェクト（MAQC）もフェーズⅠを終了し、マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイルの再現性が確認された<sup>3)</sup>。今後10年間で、慎重な対応のもとマイクロアレイは、乳癌だけでなく他の癌においても予後に加え薬剤応答性や副作用を予測する

癌のテーラーメイド医療の診断法として臨床現場で活用されるのは疑いのないところである。

## 1. マイクロアレイ技術と種類

マイクロアレイ技術の応用法の現状を簡単に表にまとめた。スポットの基盤は、初期にはニトロセルロース膜に始まり現在では特殊樹脂が主流である。発現解析に使用するマイクロアレイにはcDNAだけでなく20～120merのオリゴヌクレオチドをプローブDNAとしてスポットするタイプがある。Affymetrix社やIllumina社から提供されているDNAチップは後者によるものである。cDNAアレイを提供していた企業もコスト面や特異性から、現在ではオリゴアレイに転換したところもある。BACアレイはhybridization complexity\*の確保と高いS/N比から1コピーレベルの染色体欠失と重複を正確に検出することができる。異常を検出したBACクローンはFISH法のプローブに利用できる。このため、すでに臨床検査として利用されている染色体分析やFISH法などの細胞遺伝学的検査との対応が図りやすい（図1）。BACアレイによるCGH法は、米国で先天異常疾患の染色体検査を補完する診

\* : hybridization complexity

マイクロアレイでハイブリダイゼーションを行う場合、各スポットにおけるシグナル強度とその均一性は、スポットされているDNAの配列が特異的でありかつ多種類である場合に高い効率を示す。これは、サンプルDNA（またはRNA）に含まれるさまざまな配列がスポットDNAのさまざまな相補配列に特異的に結合できる（complexityが高い）ことに起因する。短いオリゴヌクレオチドをスポットしたアレイでは、数十塩基の配列にこれに相補のサンプルDNA（またはRNA）がハイブリダイゼーションするのみ（complexityが低い）であり、シグナルの評価には補正等が必要となる。

表●マイクロアレイ技術の応用例

マイクロアレイのタイプ	目的	応用例
発現アレイ	疾患に関与して変動する細胞や組織とこれらの対照との間で遺伝子発現の差をmRNAレベルで比較する	癌の層別分類 癌の予後や悪性度のバイオマーカーの探索 創薬の標的分子の探索 各種シグナル伝達カスケードの評価
SNP解析	遺伝的な多様性に関する塩基多型の検出 アレルの区別に基づくLOHの検出 Copy number variation（CNV）の検出	SNPに基づく疾患罹病性の評価 病気の進行のモニタリング 薬理遺伝学に基づく創薬
CGH	癌の遺伝子増幅、染色体欠失の検出 先天異常症などの染色体コピー数異常の検出 疾患遺伝子のコピー数異常診断 先天異常症の微細染色体コピー数異常の診断 Copy number variation（CNV）の検出	癌のコピー数異常に基づく層別分類 癌の予後や悪性度のバイオマーカーの探索 染色体検査の補完
リシーケンス	特定ゲノム領域の正確な塩基配列決定	個々の生殖細胞変異の分子進化 癌の体細胞変異のスクリーニング

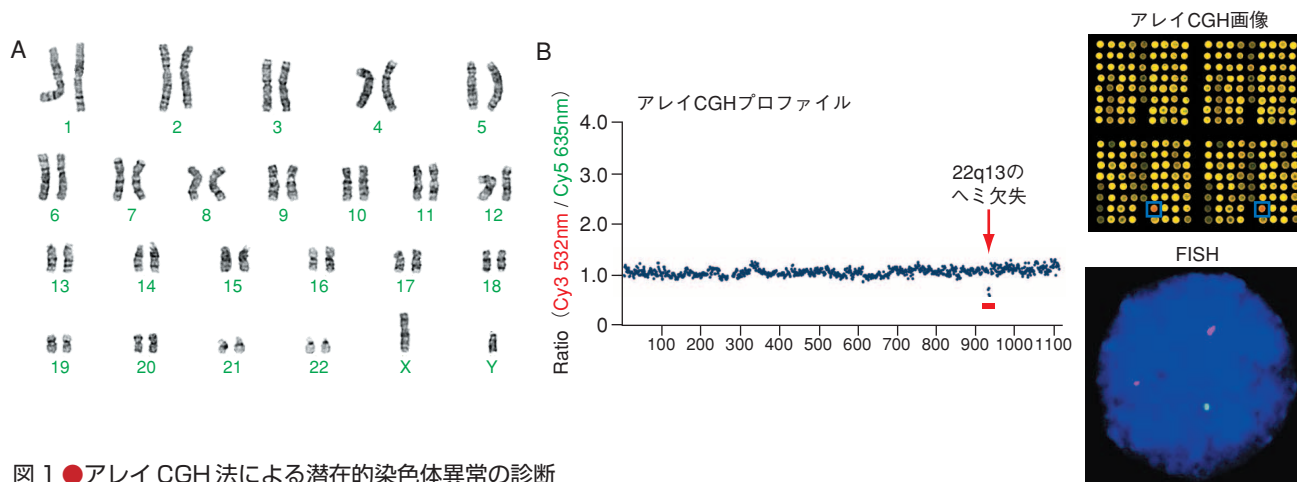


図1 ●アレイ CGH 法による潜在的染色体異常の診断

A) 第22番染色体長腕22q13領域の微細染色体欠失症候群の表現形を呈した患児であるが染色体分析では異常を検出しない。B) 左：東京医科歯科大学で作製したアレイCGHで同じ患児のリンパ球DNAを用いて解析をした。BACクローン2個分の微細なヘミ欠失が22q13.2に検出される。右上：そのアレイ画像では欠失スポットはオレンジのシグナルとして区別できる。右下：欠失を確認したBACクローンをプローブにしたFISHでは緑シグナルは間期核上に1個のみ検出し欠失を確認する

断法としてすでに実用化されている<sup>4) 5)</sup>。国内においてもわれわれは染色体コピー数異常の診断用アレイ（Genome Disorder array, 通称GDアレイ）を独自に開発し、臨床検査会社BMLに技術移転している。現在、臨床検査への導入を目的に国内の大学付属病院や小児病院の17施設からなるコンソーシアムでGDアレイの実用化検証が進められている。すでに250例以上においてGDアレイ診断が実施され、その約10%の症例で、従来の方法では検出できなかった病態形成に関与すると考えられる*de novo*の微細染色体コピー数異常が検出されており、研究面だけでなく検査法としての有用性も実証されてきている。

## 2. 乳癌の遺伝子発現プロファイルによる予後診断法

乳癌の予後予測のMammaPrint<sup>®</sup>はFDAが承認した最初のマイクロアレイによる癌の体外診断法である。そのもとになった乳癌のアレイ解析論文は2002年オランダ癌研究所のグループによってNew Eng J Medに報告されている<sup>7)</sup>。最初にAgilent社の25,000プローブのマイクロアレイで乳癌78例の発現解析を行い、53才以下のリンパ節転移陰性例の転移再発と強い相関を示す遺伝子セット70種類が選出された。次に、同様に53才以下でステージⅠ～Ⅱの女性乳癌でリンパ節転移陽性144例、陰性151例でエストロゲンレセプター（ER）発現を問わない合計295例を対象に検

証試験を行い、これら70個の遺伝子発現プロファイルが乳癌再発リスクを予測できることを確認した。このような実際の臨床検査への応用を目的とした遺伝子発現プロファイルによる乳癌のリスク診断法の開発への取り組みは、他の多くの研究施設でも実施されている。例えば、リンパ節転移陰性、ER陽性のタモキシフェン治療例での転移再発を予測する診断法として21種類（5種類はコントロール）の遺伝子発現をリアルタイムPCR法で検出するOncotype DX<sup>®</sup>アッセイがGenomic Health社によって開発され研究用に販売されている<sup>8)</sup>。このOncotype DX<sup>®</sup>はパラフィン包埋標本からサンプルのRNAを抽出するために、通常のアレイ解析で問題となる凍結サンプルから抽出した場合のRNAの不安定性を考慮する必要がない。このため検査としては大きな利点があり承認された場合には広い普及が予想される。また、米国のベンチャー企業Veridex<sup>9)</sup>と共同でオランダのエラスムス医療センターのWangらにより、やはりマイクロアレイ解析結果からリンパ節転移陰性乳癌の再発リスクを予測する76個の遺伝子セットが報告された<sup>10)</sup>。彼らのグループはその後もこれら76個のgene signatureによる確認試験を積極的に実施している。

## 3. マイクロアレイ解析の再現性への疑問

マイクロアレイは解析で得られる膨大な情報から数多くのバイオマーカーが見つかり、テラー



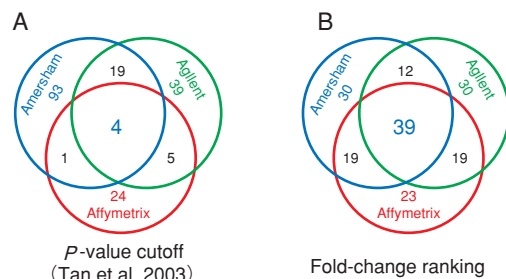


図2 ●マイクロアレイ発現解析データの比較

発現解析結果を Amersham 社, Agilent 社, Affymetrix 社の3社のマイクロアレイ間で比較した。

A) 従来の *P*-value によるランク付けで選択された計 185 個の中で共通する遺伝子はわずか4個であった。B) MAQC スタディでは Fold Change で発現に有意差のあるものをランキングして比較すると各アレイプラットフォームで得られた遺伝子の一致率は高く、マイクロアレイの性能の再現性が確認された(文献23より引用改変)

メイド医療に資する診断, 治療, 予防法の確立が加速され, 新しい分子標的治療薬もどんどん見つかるものと大きな期待が寄せられていた。しかし, マイクロアレイで得られた発現データは使用するアレイプラットフォームの違いにより, また, 同じプラットフォームでも施設間あるいは施設内でもしばしば大きな差があり, その再現性に疑問が投げかけられてきた。実際, Tan らは同一の RNA を用いて Amersham 社, Agilent 社, Affymetrix 社の3社のマイクロアレイで発現解析を行い, それぞれの結果を比較して再現性の乏しさを具体的に示した<sup>10)</sup>。その内容は, それぞれのアレイで発現に差がありとして浮上した計 185 個の遺伝子の中で共通するものはわずかに4個という惨憺たる結果であった(図2)。これは先に述べたテーラーメイド医療実現への期待にも不安を投げかけるものであった。

#### 4. MicroArray Quality Control (MAQC) プロジェクト

米国 FDA は 2005 年 2 月 11 日より, マイクロアレイの再現性, 性能, データ解析法などの品質管理を行うプロジェクト The MicroArray Quality Control (MAQC) Project をスタートさせた。このプロジェクトのフェーズ I スタディ (2005 年 2 月 ~ 2006 年 9 月) は, FDA に属する 6 部署と NIH, 環境保護局 (EPA), 標準技術研究所 (NIST) などの米政府機関に加え, マイ

クロアレイや RNA サンプルを製造する企業, 解析受託業者, さらに研究機関などの 51 組織から総計 137 名の参加を得て実施された<sup>3)</sup>。

この確認のために使用されたアレイは Affymetrix 社, Agilent 社など 6 社のプラットフォームで, 市販の2種類の RNA から調整した同一サンプルをリファレンスにして計 1,000 回以上の測定を実施してデータを取得し, この中で 1,000 種類以上の遺伝子に関して定量 PCR で測定した発現量と比較した。その結果, アレイ内, アレイ間とも, さらに Affymetrix 社で採用されている 1 色蛍光色素法でも, Agilent 社などの 2 色蛍光色素法でも発現差を検出する遺伝子は概ね一致しており, マイクロアレイの発現解析には再現性が得られることを確認した。さらに, プラットフォーム間で異なった遺伝子の顔ぶれがリストアップされた場合でも, それらは生物学的には類似であることを言及している。この MAQC プロジェクトで検証されたプロトコルや試薬, リファレンス RNA, ならびにこれらを用いて実施したアレイ解析の膨大なデータは, 今後, 新たに作製されるマイクロアレイと関連試薬, さらにプロトコルの客観的評価基準となるものと考えられる。

MAQC スタディによって, マイクロアレイ解析の過去の研究における再現性の欠如が, *P*-value の非常に厳しい有意水準で閾値を設定して発現差のある遺伝子をランキングしていたためであることが確認された。そして, Fold Change で発現に有意差が見られるものをランキングした場合に, 異なるプラットフォームで得られた遺伝子リストもよく一致することが確認され, 2006 年 9 月に MAQC フェーズ I は終了した。その成果報告は同年同月に発行された Nature Biotechnology 9 月号に 5 編の論文としてまとめられている<sup>12)~16)</sup>。

MAQC フェーズ I に続き, 実際にマイクロアレイを医療の現場や日常生活での安全性試験として利用できるか否かの可能性の追究が MAQC フェーズ II として始動している。

#### 5. 本特集号の紹介

マイクロアレイは初期には十分なパフォーマンスを持つものが市販アレイとして供給されず,

また、供給された場合でも非常に高価であった。このことから、多くの研究者はスポットするcDNAを購入するか、あるいは自身の手により調整してin-houseアレイの作製を計画した。実際、マイクロアレイ作製を目的に本邦でもかなりの数の研究施設にアレイスポッター装置が導入されたが、実際にこれを稼働させ自前のマイクロアレイを作製し、さらにこれを使いこなしてデータを取得するまで至った施設は限られている。東京大学医科学研究所ゲノム解析センター・中村祐輔教授らの研究グループは、独自に約23,000遺伝子のcDNAを調整しこれを配置したマイクロアレイを開発し、癌の網羅的発現解析を積極的に進めてきた。その結果、慢性骨髄性白血病(CML)におけるBCR-ABLチロシンキナーゼの選択的阻害薬グリーベックの感受性を高精度に予測するシステムや、14種類の遺伝子の発現情報から膀胱癌のMVAC (Methotrexate, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) 術前化学療法の感受性予測システムを構築するなど、癌のオーダーメイド医療に直結する成果が得られている<sup>17)18)</sup>。一方、マイクロアレイはバイオマーカーや創薬の標的分子の探索ツールとしても利用されている。本特集では、マイクロアレイを用いた網羅的発現情報にもとづく癌の標的分子の同定に至るロードマップが、乳癌治療標的分子候補のタンパク質キナーゼPBK/TOPKの発見を具体例に詳述されている(片桐, 中村の項)。

マイクロアレイでは、研究対象や目的により、スポットするDNAをカスタマイズすることで応用範囲を広げることができる。例えば、既知、あるいは予測される転写因子結合領域をカバーすることで網羅的プロモーターアレイを作製し、これにChIP-chipを行い特定転写因子やある条件下でDNAメチル化を受ける遺伝子のプロモーター領域をスクリーニングすることができる。また、反復を除く全ゲノム領域をカバーしたタイリングアレイやエキソン領域をすべてカバーするアレイでは癌特異的なスプライシングバリエーションを見つけることも可能である。癌特異的なスプライスバリエーションは有効なバイオマーカーであり、さらにスプライシングバリエーションのgene signatureは新たな指標による癌の病型分類を可能にするかも知れ

ない。エキソンアレイを用いた癌特異的なスプライシングバリエーションの解析は肝癌をモデルに佐藤, 山田の項で新しい成果が述べられている。

最近では翻訳制御に働くnon-coding RNAとして注目を浴びるマイクロRNAの発現解析用アレイ(間野の項)、さらにCNV (copy number variation)の解析を目的とするアレイなども作製されてきている。マイクロRNAはその発現プロファイルの解析からDNAメチル化により不活性化される場合や、逆に、遺伝子増幅の標的として活性化される場合は癌遺伝子機能を持つOncomir (oncogenic micro RNA: 癌マイクロRNA)として注目されている<sup>19)</sup>。また、多発奇形や精神発達遅滞、自閉症など、その病態形成に潜在的ゲノム異常の存在が示唆されていたが、実際にアレイCGHによるスクリーニングでCNVが関連異常として見つかるようになってきている<sup>20)</sup>。さらに、これら遺伝的な背景の強い疾患だけでなく、SLE患者に起こる糸球体腎炎やAIDSにおけるHIVの易感染性などにCNVが関与することが報告され、比較的ありふれた疾患の罹病性とCNVの関連が注目されてきている<sup>21)22)</sup>。

癌は遺伝子増幅や欠失など特異的なゲノム構造異常の存在が知られている。乳癌ではERBB2 (HER2/neu)の増幅の検出は、すでに抗ERBB2抗体治療薬であるハーセプチン®の適応を決める診断に使用されている。肺腺癌の治療薬イレッサの効果予測はEGFRの変異よりも増幅を確認することで、より高い信頼度があるとする報告もある。これらのことからマイクロアレイによるゲノムコピー数異常の検出は、実用化レベルの癌の体外診断法としても大きく期待されている。急速に進化を遂げるマイクロアレイによるゲノム構造異常の解析は、柴田の項で詳しく解説されている。

神経芽腫は頭蓋内腫瘍を除き小児で最も高頻度の固形腫瘍である。癌遺伝子MYCNの増幅は最も信頼できる予後不良を予測するマーカーである。しかし、実際にはMYCN増幅のない高ステージ群の中にも予後不良例が存在し、新しいリスク分類システムの構築が求められていた。千葉県がんセンター研究所の大平美紀、中川原章 両博士らは神経芽腫の網羅的発現解析から選択した70個の遺伝子を用い、予後予測の精度検

定に LTO (Leave two out) という手法<sup>3)</sup>を取り入れ、実用レベルの神経芽腫の予後診断チップを開発している。(大平, 中川原の項)

消化器系の癌は内視鏡生検が可能であることから、その治療前診断には生検標本を利用することができる。しかし、従来のマイクロアレイでは微量検体からの検討には遺伝子増幅が不可欠であり、この操作は発現プロファイルを変化させる可能性が残されていた。兵庫医科大学の嶋田裕博士らは独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援により、生検標本の発現遺伝子検出を遺伝子増幅することなく実施できる高感度 DNA チップを作製し、臨床応用への取り組みを開始している。この高感度 DNA チップには従来のガラス基板による発現遺伝子検出の約 100 倍の感度を示す東レ株式会社製「3D-Gene」基板が用いられている (嶋田らの項)。

## おわりに

筆者は 1996 年から 2 年間、東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターに在籍したが、1997 年、中村祐輔教授のラボでは 5、6 名の研究員で構成された特務部隊によって当時プレハブ小屋と呼ばれるゲノムセンター前の研究棟の一室で自前 (in-house) のマイクロアレイに配置する 2 万種類以上の遺伝子 cDNA の設計と PCR 増幅による合成が進められていた。完成を見届けることなく 1998 に現職に赴任したが、2000 年には中村研から卵巣癌のマイクロアレイ解析の論文が Cancer Research に掲載された。その後、筆者は BAC クローンによる CGH マイクロアレイの作製とサンプル解析、さらにデータを得てこれを分析して有意な結果を得るまでの道のりを経験した。その時、改めて中村祐輔ラボの powerful で convincing な仕

事を実感した。現在では、目的のプローブを希望どおりに配置してくれるカスタムアレイの受託サービスもごく当たり前になっており、これを含めあらゆる種類のマイクロアレイがコマーシャルベースで手に入る。マイクロアレイを自作する奇特的な研究室は筆者らを含め限られている。米国 NCI を拠点に 1997 年、個別化医療 “Personalized medicine” の実現を目標に Cancer Genome Anatomy Project が始動したが、体外診断用マイクロアレイの MammaPrint<sup>®</sup> はその 10 年後の 2007 年 2 月に FDA 認可のもとに発売された。今後、他の疾患においても発現プロファイルやマイクロアレイに関連した体外診断法の開発と実用化に拍車がかかるものと予想する。

## 参考文献

- 1) Microarray analysis. (Schena, M.), 21 : Wiley-Liss, New York, 2003
- 2) <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01555.html>
- 3) <http://www.fda.gov/nctr/science/centers/toxicoinformatics/maqc/index.htm>
- 4) <http://www.signaturegenomics.com/>
- 5) <http://www.bcm.edu/cma/index.htm>
- 6) Inazawa, J. et al. : Cancer Sci, 95 : 559-563, 2004
- 7) Van de Vijver, M. R. et al. : New Eng. J. Med., 347 : 1999-2009, 2002
- 8) <http://www.genomichhealth.com/oncotype/default.aspx>
- 9) <http://www.veridex.com/>
- 10) Wang, Y. et al. : Lancet, 365 : 671-679, 2005
- 11) Tan, P. K. et al. : Nucl. Acid. Res., 31 : 5676-5684, 2003
- 12) Canales, R. D. et al. : Nature Biotech., 24 : 1115-1122, 2006
- 13) Shippy, R. et al. : Nature Biotech., 24 : 1123-1131, 2006
- 14) Tong, W. et al. : Nature Biotech., 24 : 1132-1139, 2006
- 15) Patterson, T. A. Nature Biotech., 24 : 1140-1150, 2006
- 16) MAQC consortium. : Nature Biotech., 24 : 1151-1161, 2006
- 17) Kaneta, Y. et al. : Jpn. J. Cancer Res., 93 : 849-856, 2002
- 18) Takata, R. et al. : Cancer Sci, 98 : 119-117, 2006
- 19) Calin, G. A. & Croce, C. M. : Nature Rev. Cancer, 6 : 867-866, 2006
- 20) Hayashi, S. et al. : Am. J. Med. Genet. (in press)
- 21) Gonzalez, E. et al. : Science, 307 : 1434-40, 2005
- 22) Aitman, T. J. Et al. : Nature, 439 : 851-855, 2006
- 23) Shi, L. et al. : BMC Bioinformatics, 6 : 1-14, 2005



### 稲澤譲治 (Johji Inazawa)

東京医科歯科大学難治疾患研究所教授、医学博士。

1982 年 3 月京都府立医科大学卒業。5 年間の内科臨床の後、癌と遺伝疾患の分子細胞遺伝学的研究に従事し現在に至る。白血病臨床医としての経験が現在の研究活動の原点である。

1993 年 4 月京都府立医科大学医学部講師 (衛生学教室)。1996 年 1 月東京大学助教授 (医科学研究所ヒトゲノム解析センター)。1998 年 4 月東京医科歯科大学教授 (難治疾患研究所)。1991 年 5 月日本血液学会奨励賞。1997 年 2 月度高松宮妃癌研究助成金受領。2003 年 11 月度日本医師会医学研究助成費受領。2006 年 JCA-Mauvernay Award (日本癌学会)。2006 年 7 月ブルガリア国立科学アカデミー外国人会員。



## マイクロアレイをより正確に、再現性よく

### RNAサンプルが分解していると、マイクロアレイの結果が大きく変わってしまいます

実験データの再現性・信頼性を高めるためには、事前にRNAの品質を測定する必要があります(上図)。

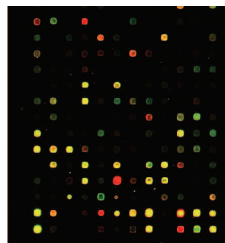
### RNAの品質測定にはRNA電気泳動が必須です

UV測定によるRNAの定量・純度測定では、RNAの分解の有無を確認することができません(下図)。

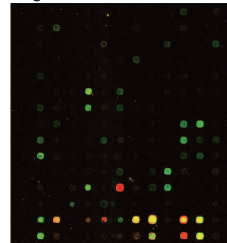
### ExperionはRNA電気泳動に要する時間と手間を大幅にカットします

- 電気泳動～解析が1ステップでわずか30分
- rRNA比の算出も全自動
- サンプル量はわずか1  $\mu$ l
- 有機溶媒や危険物を不使用

Intactサンプル

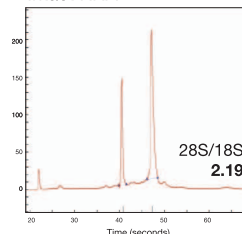


Degradedサンプル

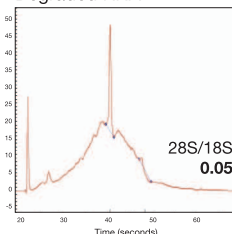


マイクロアレイ分析結果 subgrids  
下2段：コントロール

Intact RNA



Degraded RNA



Experion分析結果  
RNA StdSensキットを用いて得られた  
electropherogram

日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス事業本部 116-0014 東京都荒川区東日暮里 5-7-18

TEL : 03-5811-6270

FAX : 03-5811-6272

Visit us on the web at [discover.bio-rad.co.jp](http://discover.bio-rad.co.jp)

**BIO-RAD**



# クロマチン免疫沈降— DNA チップ (ChIP-on-chip) 法を用いた Th2 細胞分化機構の解析

山下政克 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学助教授

ChIP-on-chip 法は、クロマチン免疫沈降 (ChIP) と DNA チップ (chip) の 2 つの解析法を組み合わせることで、クロマチン修飾の変化や転写因子の結合を網羅的に検出することを可能にした新しい手法である。本稿では、アレルギーの病態に深く関与する T 細胞サブセット、Th2 細胞の分化機構の解析を例にし、ChIP-on-chip 法の有用性を概説する。

## はじめに

近年、クロマチンの高次構造の変化が、細胞分化や転写制御などを含む多くの生命現象において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。そのため、実際に生理的な条件下の細胞内で起きている DNA-タンパク質の相互作用やクロマチン状態を検出する方法の開発が求められていた。クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法は、この要望に応える実験手法で、実際に細胞内で起きている DNA-タンパク質の相互作用や分化に伴うヒストン修飾の変化を検出できる。しかしながら、ChIP 法は検出に PCR 法を用いており、広範囲にわたるヒストン修飾の変化や転写因子の結合を解析するには不向きであ

た。一方、DNA チップ (chip) は遺伝子発現を網羅的に解析するための先駆的な方法であり、現在では多くの研究室で用いられている手法である。

ChIP-on-chip 法は、ChIP の解析を PCR 法に変えて chip を用いて行うことで、網羅的でハイスループットな ChIP 解析を可能にした手法である。本稿では、ChIP-on-chip 法の原理を解説するとともに、われわれが行った Th2 細胞の分化機構の解析を例に、この手法の有用性を説明したい。

## ChIP-on-chip 法の原理

クロマチン免疫沈降法は、ホルムアルデヒドを用いて細胞内で DNA-タンパ

ク質を架橋し、目的のタンパク質に対する特異的な抗体を使った免疫沈降法と組み合わせることで、細胞内に実際に存在するクロマチン DNA 上での DNA-タンパク質の相互作用を検出する方法である。

実際のクロマチン免疫沈降の手順を、抗アセチルヒストン抗体の実験を例に図 1 に示した。転写因子の場合は、アセチル化を受けているヒストンの代わりに転写因子があり、用いる抗体は目的の転写因子に対する抗体と考えていただきたい。ホルムアルデヒドによる架橋は、添加後数分以内に起きるため、クロマチン上に存在しているタンパク質の分解や、脱修飾、拡散が進行する前の状態で DNA-タンパク質複合体を固定することができる。つまり、ホルムアルデヒドを培地中に直接添加することで、細胞内に実際に存在するヒストンの修飾や DNA-タンパク質の結合を解析することが可能になる。

まず、細胞のクロマチンを含む画分を可溶化し、固定されたクロマチンをソニケーションによって 200 ~ 1,000bp に断片化する。目的のタンパク質に対する抗体で免疫沈降を行った後、可逆反応により架橋をはずし、タンパク質を除き、DNA 断片を回収する。回収された DNA を鋳型にして、通常の ChIP 法では、知りたい DNA 配列の特異的プライマーを用いて PCR または、PCR / サザンブロットで解析を行う<sup>1)</sup>が、ChIP-on-chip 法では得られた DNA 断片がゲノムのどこに由来するのかを解析するために DNA

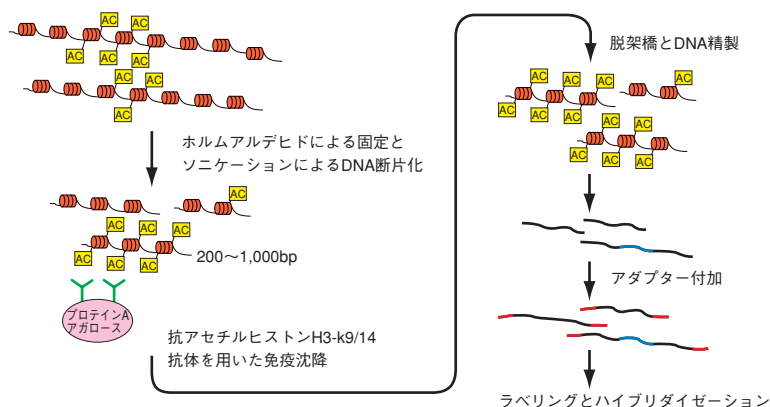


図 1 ● ChIP-on-chip 法の原理 (ヒストンアセチル化の検出を例にして)

ChIP 法の詳細なプロトコールは、文献 1 を参照して頂きたい

アレイを用いる。この解析を網羅的かつハイスループットに行うためには高密度タイリングアレイが最適であると考えられる。現在では、ヒトやマウスの全ゲノムをカバーしたタイリングアレイやプロモーター領域のタイリングアレイがジーンフロンティア社より発売されていることから、ChIP-on-chip 解析を容易に行うことが可能である。また、興味のある特定領域を解析するためのタイリングアレイの作製と受託解析のサービスも同社で利用可能である。

次節では、われわれが行ったジーンフロンティア社の受託解析サービスを用いた ChIP-on-chip 解析の具体例について述べる。

### Th2 サイトカイン遺伝子座 ヒストンアセチル化誘導部位 の ChIP-on-chip 法を 用いた網羅的な同定

ここで簡単に Th2 細胞の分化と役割について説明する。ヘルパー T (Th) 細胞は、主に IFN- $\gamma$  を産生する Th1 と Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) を産生する Th2 の 2 種類のサブセットに分けられる (図2)。Th1 細胞は細胞性免疫を誘導し細胞内感染病原体の排除に重要であるのに対し、Th2 細胞は液性免疫を誘導して細胞外感染病原体などの免疫反応を担うことがわかっている。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバランスをとりながら生体防御機構における中心的な役割を演じていると考えられている。しかし、一方では、感染症・自己免疫性疾患・アレルギーなどの免疫関連疾患において Th1/Th2 バランスの偏りが認められており、それがこれらの疾患の発症や病態の形成に大きく関与していると推測されている<sup>2)</sup>。すなわち、Th1 細胞の過剰な活性化は臓器特異的自己免疫疾患を誘発するのに対し、Th2 細胞の過剰な活性化は花粉症などのアレルギー性疾患につながると考えられている。

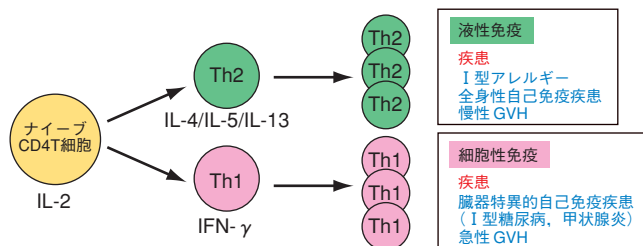


図2 ● Th1/Th2 細胞分化と免疫応答

Th1/Th2 細胞はともにナープ CD4T 細胞から分化してくると考えられている。ナープ CD4T 細胞が IL-12 存在化で抗原刺激を受けると Th1 細胞へ、IL-4 存在化で刺激を受けると Th2 細胞へと分化する。Th1/Th2 細胞のバランスが崩れると、図の右側に示したような免疫性疾患が発症しやすくなる。

IL-4, IL-13, IL-5 といった Th2 サイトカインは、ヒトでは第 5 染色体 (5q31) に、マウスでは第 11 番染色体上にクラスターを成して存在し、その領域は Th2 サイトカイン遺伝子座と呼ばれている。Th2 サイトカイン遺伝子座は 120kb にわたるクロモゾームの領域で、上記の Th2 サイトカイン遺伝子のほかに RAD50 遺伝子や KIF3A 遺伝子が存在する (図3-B)。このように Th2 サイトカインはクラスターを成して存在し、協調的な発現が認められることから、染色体上の 1 つの領域として共通の制御機構がある可能性が考えられていた。クロマチンリモデリング (遺伝子発現の活性化の場合) が誘導された遺伝子の特徴としては、①ヒストンのアセチル化、②ゲノム DNA の脱メチル化、③ DNase I に対する高感受性領域の誘導が起こるとされている。なかでも、ヒストンのアセチル化はクロマチンリモデリングのごく初期に起きると考えられていることから、その変化を解析することは Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導機構を理解するうえで非常に重要である。そこで、ジーンフロンティア社に NimbleGen System 社の技術を用いた Th2 サイトカイン遺伝子座を含む約 2.5Mb の領域のタイリングアレイの作製と受託解析を依頼して、Th2 サイトカイン遺伝子座のヒストンのアセチル化修飾の網羅的検出を行った。

図3-A の赤で示した箇所が Th2 サイト

カイン遺伝子座である。紫のボックスはその他の個々の遺伝子を示している。作製したアレイのプロープには 50mer を用い、インターバルは約 100bp とした。また、アレイはセンス/アンチセンス鎖を合成し、それぞれ 2 連のハイブリダイゼーションを行って平均化した。

図3 は、Th2 細胞と Th1 細胞のヒストンアセチル化状態を比較したものである。われわれの予想通り Th2 サイトカイン遺伝子座の周辺に Th2 細胞特異的なアセチル化領域が認められた (図3-A)。Th2 サイトカイン遺伝子座周辺の Th2 細胞特異的なアセチル化領域の拡大図が図3-B である。Th2 細胞特異的なアセチル化領域は、KIF3A 遺伝子の 3' 末端領域 (Th2-A)、IL-4/IL-13 遺伝子領域 (Th2-B)、RAD50 遺伝子 3' 末端領域 (Th2-C)、RAD50/IL-5 遺伝子領域 (Th2-D) の 4 領域に大別することができた。Th2-B、Th2-C、Th2-D の領域の Th2 細胞特異的なアセチル化はこれまでのわれわれを含めたグループから報告されているが<sup>3)-6)</sup>、Th2-A の領域は今回の解析により新たに見出された領域である。われわれは、これまでに IL-4/IL-13 遺伝子領域 (Th2-B の領域) のヒストンアセチル様式について ChIP 法を用いて解析してきた。その解析結果と今回の ChIP-on-chip 解析で得られた結果を比較したのが図3-C である。全体のパターンがほぼ一致していることから、ChIP-on-chip 法の高い精度が確認できた。また、図3-C に現在までに報告されている DNase I に対する高感受性部位を示しているが、ChIP-on-chip 解析で得られたヒストン高アセチル化部位とよく一致していることがわかる。このことから、

### 山下政克 (Masakatsu Yamashita)

千葉大学大学院医学研究院免疫発生学助教授。1991 年大阪大学大学院医学研究科修士課程修了、薬学博士。千葉大学医学部助手、さきかけ研究 21 研究員などを経て、2004 年より現職。研究テーマは、多様な反応を示す免疫系をエビジェネティックな側面から解明すること。

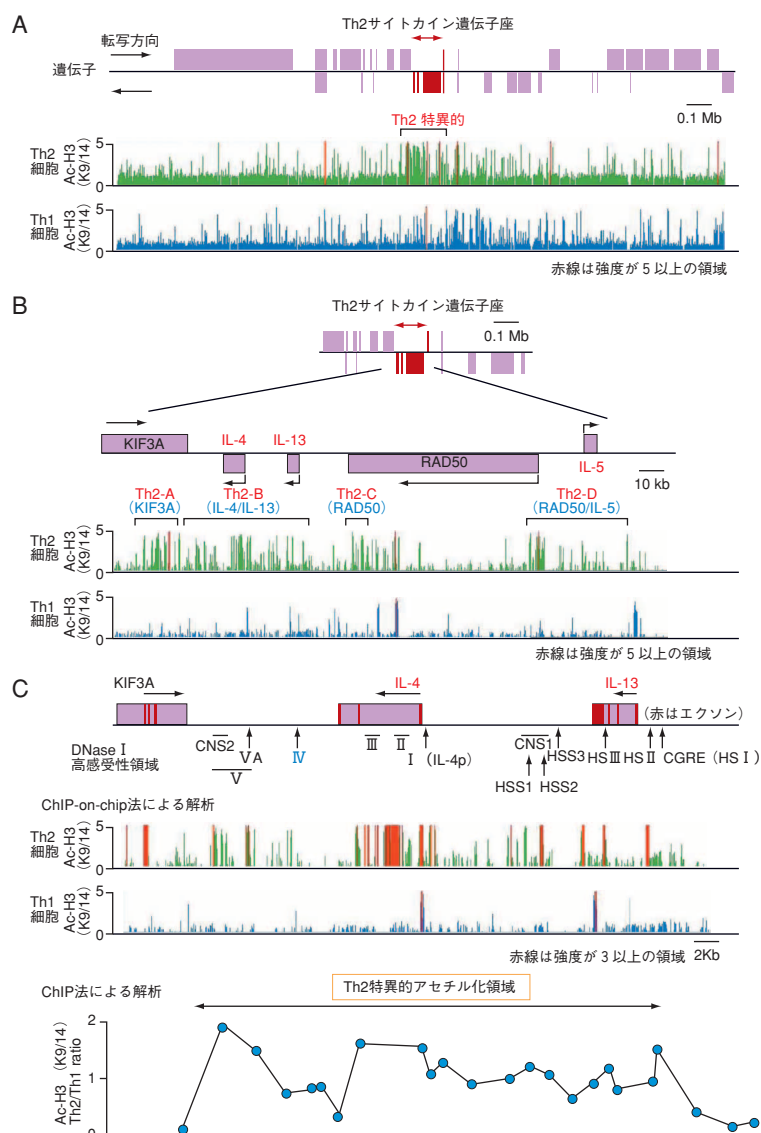


図3 ●マウス Th2 サイトカイン遺伝子座 (Chr11) 周辺領域ヒストンH3-K9/14 アセチル化の網羅的解析

A) 11 番クロモソーム (Chr11) に存在するマウス Th2 サイトカイン遺伝子座周辺、約 2.5 Mb の領域のヒストンアセチル化 (H3-K9/14) 状態を ChIP-on-chip 法で解析した。矢印は転写方向、ボックスは個々の遺伝子を表している。赤で示した遺伝子領域が Th2 サイトカイン遺伝子座である。作製したタイリングアレイのプロープには 50mer を用い、インターバルは、約 100bp とした。また、アレイはセンス/アンチセンス鎖を合成し、それぞれ 2 連のハイブリダイゼーションを行って平均化した。Th2 サイトカイン遺伝子座の周辺に Th2 細胞特異的なアセチル化領域が認められた。

B) Th2 サイトカイン遺伝子座周辺の Th2 細胞特異的なアセチル化領域の拡大図。Th2 細胞特異的なアセチル化領域は、KIF3A 遺伝子の 3' 末端領域 (Th2-A)、IL-4/IL-13 遺伝子領域 (Th2-B)、RAD50 遺伝子 3' 末端領域 (Th2-C)、RAD50/IL-5 遺伝子領域 (Th2-D) の 4 領域に大別することができた。Th2-B、Th2-C、Th2-D の領域の Th2 細胞特異的なアセチル化はこれまでのわれわれを含めたグループから報告されているが、Th2-A の領域は今回の解析により新たに見いだされた領域である。

C) ChIP 法と ChIP-on-chip 法の解析結果の比較。われわれは、これまでに IL-4/IL-13 遺伝子座における Th2 細胞特異的なヒストンアセチル化領域を ChIP 法によって解析し、CGRE 領域から KIF3A 遺伝子の一部にかけての広い領域において Th2 細胞特異的なヒストンアセチル化を見出している。その結果を下図に示した。結果は、ヒストンアセチル化のレベルを Th2/Th1 細胞の比で示している。全体のパターンにおいては、ChIP 法と ChIP-on-chip 法の解析結果は一致している。参考として、現在までに報告されている DNase I に対する高感受性部位を示してある。ChIP-on-chip 解析で得られたヒストン高アセチル化部位と一致していることがわかる。

ChIP-on-chip 解析で新たな感受性部位の同定も可能になると考えられる。

## おわりに

今回は誌面の関係上、抗ヒストンアセチル化抗体を用いた ChIP-on-chip 解析の結果しか紹介できなかったが、われわれの研究室では活性化クロマチンの維持に必要なとされているヒストンメチル基転移酵素 MLL の Th2 サイトカイン遺伝子座ならびに GATA3 遺伝子座における結合領域の同定<sup>7)</sup>や転写因子 GATA3、RNA ポリメラーゼ II 結合の網羅的な検出 (未発表) に成功している。今後、ChIP-on-

chip 解析を行う環境が整い、多くの研究室で解析が行われることで、転写因子の標的部位の同定やクロマチンリモデリング誘導機構の解析が飛躍的に進歩することが予想される。また、ChIP-on-chip 解析結果をもとに新たな疾患関連遺伝子の同定が行われることが期待できる。

## 参考文献

- 1) 山下政克, 中山俊憲: 「実験医学別冊 改訂第 4 版 新 遺伝子工学ハンドブック」(松村正實, 山本 雅/編) ppl19-123, 羊土社, 2003
- 2) Smale, S. T. & Fisher, A. G.: Annu. Rev. Immunol., 20: 427-462, 2002
- 3) Yamashita, M. et al.: J. Biol. Chem., 277: 42399-42408, 2002
- 4) Inami, M. et al.: J. Biol. Chem., 279: 23123-23133, 2004
- 5) Lee, G. R. et al.: Immunity, 19: 145-153, 2003
- 6) Lee, D. U. & Rao, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

101: 16010-16015, 2004

7) Yamashita, M. et al.: Immunity, 24: 611-622, 2006

**NimbleGen**  
SYSTEMS, INC.

ジーンフロンティア株式会社

〒103-0025

東京都中央区日本橋茅場町 3-2-10

TEL: 03-5652-7777

FAX: 03-5652-7770

URL: <http://www.genefrontier.com>

GeneFrontier



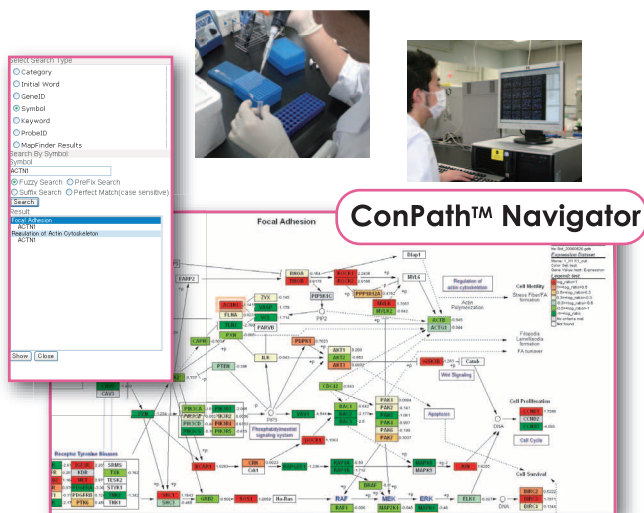


# 株式会社 DNAチップ研究所

**NEW** パスウェイ解析用チップ完成！ 実験受託解析サービス開始！

**ConPath™**  
Concise Pathway

多すぎるデータに埋もれていませんか？  
ヒトの各種生命現象に関わる重要な遺伝子を基に作製されたオリゴチップを使い、注目すべき生命現象へいち早くナビゲートします。



製品サイト <http://conpath.dna-chip.co.jp>

- 実験・解析時間を大幅に短縮  
発現解析・パスウェイ解析をトータルにサポート
- 使いやすい結果閲覧ツール  
**ConPath™ Navigator**  
膨大な発現データの中から見たいデータをパスウェイごとに検索・閲覧
- パスウェイ解析に特化したオリゴチップ  
**GenMAPP Contributed Pathway (Human、全100種類)**  
の約4000遺伝子を搭載

## アジレント社製マイクロアレイ受託実験サービス



正規代理店

Agilent Technologies

Authorized Distributor

DNAチップ研究所は、昨年11月に日本で初めてAgilent Technologies Inc.とマイクロアレイ関連製品について、正規代理店契約を締結しました。また同時に、アジレント社製マイクロアレイを用いた受託解析サービスを開始しました。

### サービス内容

- 遺伝子発現解析 ... 4x44Kアレイフォーマットで **コストダウン！**  
1色法、2色法ともに **少量のRNAに対応！**
  - アレイCGH解析 ... 244KCGHアレイで **高解像度な結果を取得！**  
(244Kフォーマットは、平均6.4kbでプローブを配置しています。)
- ※その他のフォーマットや生物種に関しましても対応可能です。ぜひお問い合わせください。

サービスサイト [http://www.dna-chip.co.jp/products/fiduciary\\_ea\\_agilent.html](http://www.dna-chip.co.jp/products/fiduciary_ea_agilent.html)

株式会社DNAチップ研究所

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町一丁目1-43

<http://www.dna-chip.co.jp>

ご購入についてのお問い合わせ

Tel : 045-500-5225 E-mail : [marketing@dna-chip.co.jp](mailto:marketing@dna-chip.co.jp)

技術的なお問い合わせ

Tel : 045-500-5218 E-mail : [dnachip-support@dna-chip.co.jp](mailto:dnachip-support@dna-chip.co.jp)



# 新世代のフォーカストアレイ 「Genopal® (ジェノパール®)」

三菱レイヨン株式会社

寺澤 薫／地紙 哲哉

「フォーカストアレイ」とは、絞り込まれた遺伝子を高精度に解析できるマイクロアレイのことであり、診断用途や、それを旨とした実用化研究に不可欠である。三菱レイヨンが独自に開発した「ジェノパール®」は、キャプチャープローブが高含水ゲル中に3次元的に広がった状態で固定された新しいタイプのDNAチップであり、「フォーカストアレイ」としての優れた特徴を備えている。ジェノパール®の特徴を中心に、マイクロRNA解析への応用例を併せて概説する。

## ① はじめに ～フォーカストアレイに求められる高い精度

DNAチップを用いた遺伝子解析は、これまでゲノムワイドな解析によるスクリーニングが主流であったが、現在は絞り込まれた特定の遺伝子群を、高精度に解析する方向へとむかっている。しかし、一般的なDNAチップは、性能面に関して発展途上にあるため、より正確で再現性の高いデータを取得できる「フォーカストアレイ」が必要不可欠である。

三菱レイヨンのDNAチップ「ジェノパール®」(図1)は、特定の遺伝子群(数十～数百)に着目した検査・診断用途や、それらを旨とした実用化研究に適した「フォーカストアレイ」である<sup>1)</sup>。再現性、相対感度、定量PCRとの相関などの詳細データや

使用方法については、成書<sup>2)</sup>、製品ホームページ(<http://www.mrc.co.jp/genome/>)も参考にされたい。本稿では他のDNAチップには無い「ジェノパール®ならではの」特徴を中心に説明する。

## ② 正確なハイブリダイゼーションに基づく優れた信頼性

「フォーカストアレイ」の信頼性に関わる性能項目としては、複数チップ間の再現性や、ダイナミックレンジなどが挙げられる。DNAチップの解析では、複数検体の強度プロファイルを比較し、その相対的な発現差をlog比として記述されることが多く、その解析結果の正確性を確保するためには、DNAチップのダイナミックレンジ(検体濃度とハイブリダイゼーション量が比

例する濃度範囲)が非測定物である検体の濃度範囲よりも十分に広いことが、極めて重要である。

基盤の2次元表面上にプローブを貼り付けた一般的なDNAチップでは、キャプチャープローブDNA同士や検体核酸との間の静電的な反発力が要因となり、必ずしも核酸濃度に比例した望ましい二本鎖形成が進行しないことが知られる。その結果、プローブ固定密度を高くするほど測定のダイナミックレンジが狭くなる傾向となり、また固定濃度をあまり高くすると、逆にハイブリダイゼーションの効率が下がってしまう<sup>3)</sup>。

一方ジェノパール®では、高含水ゲル中にキャプチャープローブが分子運動性に関する自由度を保持したまま、3次元的に広がって固定化されている(図2)。プ



図1.「ジェノパール®」

(写真は、約200個の遺伝子プローブを搭載したジェノパール®)

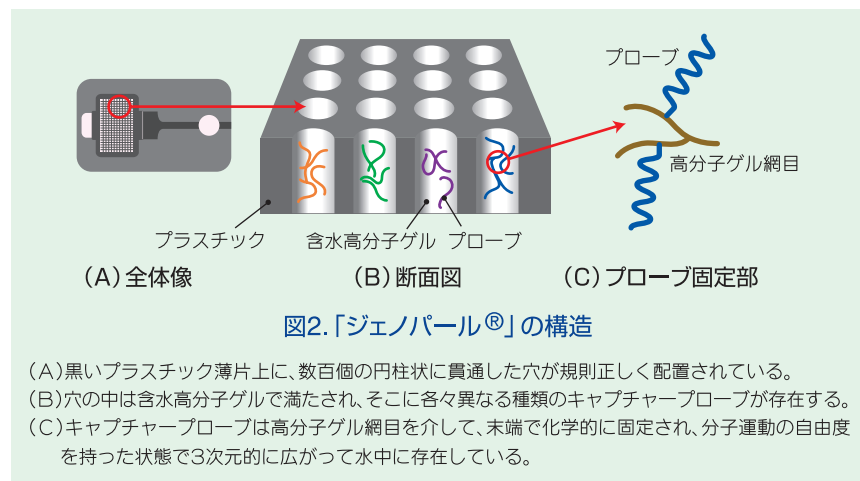


図2.「ジェノパール®」の構造

(A) 黒いプラスチック薄片上に、数百個の円柱状に貫通した穴が規則正しく配置されている。  
(B) 穴の中は含水高分子ゲルで満たされ、そこに各々異なる種類のキャプチャープローブが存在する。  
(C) キャプチャープローブは高分子ゲル網目を介して、末端で化学的に固定され、分子運動の自由度を持った状態で3次元的に広がって水中に存在している。

ローブ固定量を多くしても不都合な静電的反発が問題とならず、広いダイナミックレンジで正確なハイブリダイゼーション反応を行うことができるのである。結果として、ジェノパール®で行った遺伝子発現解析結果と、同一検体による定量PCRとの相関は、高いレベル( $R^2=0.92$ )にある。

### ③ ジェノパール®の特徴を活かした使用方法と高い操作性

ジェノパール®は、他のDNAチッププラットフォームとほぼ同様の方法で使うことができるが、「製造～ハイブリダイゼーション～検出の全過程においてキャプチャプローブを水中で取り扱う」点が特徴的で、ユーザーは、キャプチャプローブが常に3次元的に広がった分子運動性の高い状態で使用できる。水中に保ったまま洗浄～検出を繰り返すことも可能であり、一組のチップと検体試料があれば複数の洗浄条件下におけるハイブリダイゼーション状況の変化を正確に追跡することができる。詳しくは、下の囲み記事及び文献4)を参照頂きたい。

またジェノパール®は、検出～データ解析まで極めて簡単に行うことができる。各スポット部の含水高分子ゲルは水中ではほとんど透明となるため(ゲルの屈折率≒水の屈折率)、黒いマトリックス樹脂との光学的なコントラストを利用して、スポット位置認識から、蛍光強度の積分、数値化までを自動かつ正確に行える(図3)。

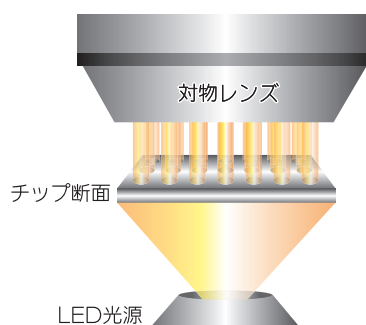


図3. 透過光によるジェノパール®の自動スポット認識

図は、チップ面下方向からLED照射スポットを位置認識するための「透過画像」を取得する様子を表したものです。蛍光強度検出の際は、チップ上方向からの落射光により3次元ゲルスポット中の全色素を励起し、その蛍光強度を積分して検出する。

### ④ マイクロRNA解析用DNAチップ

マイクロRNA解析については、倉敷紡績株式会社より受託解析サービスを提供しており、Total RNAを用意頂ければジェノパール®と専用システムによる解析結果を取得できるようになっている。本年4月からは、ユーザーの要望に応えた新しいジェノパール®(ヒト版:MICH07、マウス版:MICM07、Sanger Institute 'miRBase ver9.0' ベース)の利用が可能であり、この機会に是非利用いただきたい。

### ⑤ 最後に

三菱レイヨンでは、多数のサンプルにわたり正確なデータの蓄積を始める方のために「ジェノパール®」の受注製造(オーダーメイド)も承っています。絞り込まれた遺伝子の高精度な解析に、フォーカストアレイとしての優れた特徴を備えている「ジェノパール®」を是非ご活用下さい。詳しくは下記連絡先までお問い合わせ下さい。

### 参考文献

- 1) 秋田 隆：「DNAチップ活用テクノロジーと応用(久原哲監修)」, 41-58, シーエムシー出版, 2006.
- 2) 坂野邦彦、永田祐一郎：「DNAチップとリアルタイムPCR(野島博編)」, 124-133, 講談社, 2006.
- 3) Vainrub, A. and Pettitt, B. M. : J. Am. Chem. Soc., 125, 7798-7799, 2003.
- 4) Hohjoh, H. and Fukushima, T. : Gene, 391, 39-44, 2007.

**三菱レイヨン株式会社**  
研究開発統括部 ゲノムグループ

寺澤 薫 (Kaoru Terazawa)  
地紙 哲哉 (Tetsuya Jigami)  
〒108-8506 東京都港区港南1-6-41  
TEL: 03-5495-3156  
FAX: 03-5495-3228  
E-mail: genome@mrc.co.jp

### 〈ユーザーVoice:国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子工学研究部 北條浩彦室長〉

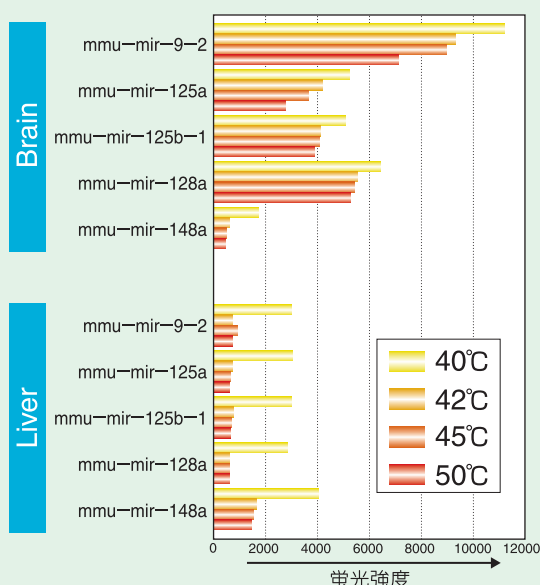


図. マウス脳・肝臓組織のマイクロRNA発現プロファイル

それぞれ一枚のジェノパールDNAチップを使って、図に示す温度条件下で洗浄した後のマイクロRNAのシグナルを示しています。

図はElsevier社の許諾を得て文献4)より抜粋し転載

# 高分子多孔質メンブレンを用いた核酸抽出技術の開発とマイクロアレイ解析への活用

富士フイルム株式会社

近年のマイクロアレイ技術の進歩と創薬、診断技術の発展に伴い、検体の前処理工程として必要不可欠である核酸抽出工程の迅速化、簡便化、自動化に対する要求もますます高まっております。本稿では、富士フイルム株式会社が開発いたしました核酸抽出技術についてご紹介させていただきます。本技術には独自の高分子多孔質メンブレンを用いており、生体試料から目的の核酸を迅速、簡便かつ高純度・高収量で抽出することが可能です。

## 多孔質メンブレンを用いた核酸抽出の原理

これまで核酸の抽出・精製のために核酸の種類、使用目的に合わせたさまざまな方式が採用されてまいりました。古くは、フェノール・クロロホルム法が用いられてきましたが、最近はシリカ担体を用いた方法が普及しております。

当社は、核酸を特異的に吸着トラップする独自の高分子多孔質メンブレン（以下メンブレン）を開発し核酸抽出に応用することで、迅速・簡便に核酸（DNA、RNA）を高収量・高純度で抽出することが可能な核酸抽出方式を開発いたしました。

### 基本原理

メンブレン表面の親水性を上げていくと、極性の小さい溶媒（アルコールなど）中の核酸はメンブレン表面に特異的に吸着するようになります（図1）。このメンブレン表面への吸着効果は溶媒の極性が上がると消失し、例えば水溶媒中では核酸が離脱するようになります。一方、タンパク質などの疎水的不純物はメンブレン表面に吸着しにくい性質があります。この性質を応用し、溶媒の極性を変えメンブレン表面への核酸の吸着性を制御した複数の工程の組み合わせにより、核酸を抽出することが基本的な原理となります。

核酸抽出工程について順を追ってご説明いたします（図2）。

### ①溶解工程

細胞から核酸を抽出するための前処理工程として、カオトロピック塩および界面活性剤を含有する溶解液に検体を分散し細胞を破壊することで、核酸（DNA、RNA）が溶離します。

### ②吸着工程

アルコールのような極性の小さい溶媒を含む溶解液中に分散した、核酸およびタンパク質などの含有液を、メンブレンに通過させることで、核酸のみが特異的にメンブレン表面に吸着し、溶媒中のタンパク質など不純物は流出することになります。

### ③洗浄工程

引き続き極性の小さい溶媒を主成分にする洗浄液を、メンブレンに通過させる

ことにより、核酸はメンブレン表面に吸着させたまま、膜中に残留している不純物やカオトロピック塩などの残留溶解液を完全に洗い流すことができます。

### ④溶出工程

極性の大きい溶媒（水など）を主成分とした抽出液をメンブレンに通過させることで、表面に吸着した核酸が容易に離脱・極性溶媒中に溶離し、核酸を回収す

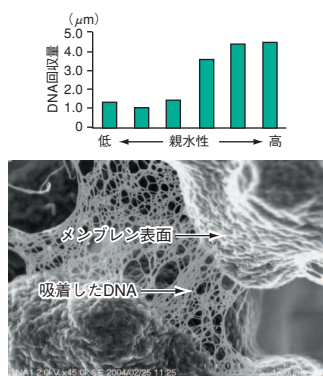


図1 ●メンブレン表面の親水性とDNA吸着量の関係

写真：メンブレンへの核酸の吸着状態

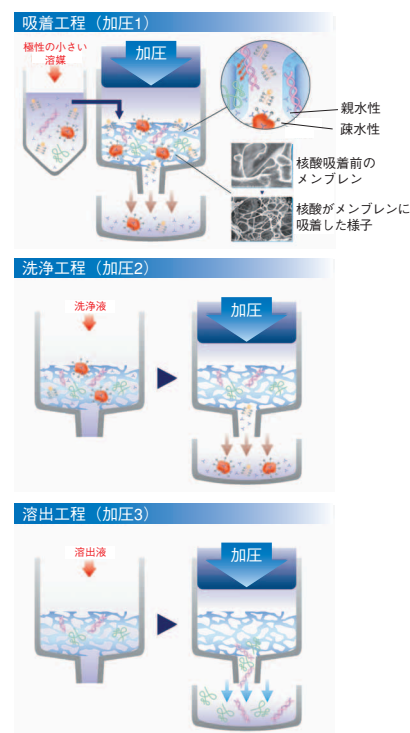


図2 ●多孔質メンブレンを用いた核酸抽出プロセス



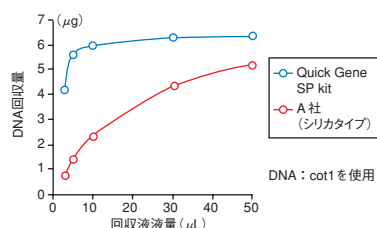


図3 ●回収量と核酸回収量の関係

ることができます。

### 表面特性および溶媒極性の最適化による高機能化

メンブレン表面の特性および、核酸を含むサンプル (Lysate) の極性を最適化することにより高機能化を達成することができます。

リボースであるRNAはデオキシリボースであるDNAにくらべ、水酸基を1つ多く有しており、より親水的です。この化学的特性の差を利用し、洗浄液の極性を制御することによって、DNAとRNAの混合液中からRNAを選択的に分離・抽出することが可能となります。

### 当社メンブレンを用いた核酸抽出法の主な特長

#### 高い簡便性

従来用いられているシリカ繊維フィルター (膜厚 1,000 μm) にくらべ、当社メンブレン (膜厚 80 μm) は膜厚が薄いため、液の通過圧力が低く、遠心分離を用いずに加圧送液での抽出動作が可能となります。

#### 高純度抽出

膜厚が薄いため、メンブレン中に残留する液量 (キャリーオーバー) が少なく、その分より純度の高い核酸の抽出、回収が可能です。

#### 高収量

多孔質メンブレンは均一で微細な穴が膜中を占めており、高い比表面積を誇ります。また、表面に高度な親水化処理を施していることでさらに、大量の核酸を一度に吸着させることが可能です。

#### 高濃度抽出

膜厚が薄いため、少ない液量での核



QuickGene-810,800	8試料同時処理可能なスタンダードタイプ
QuickGene-610L	2mlの全血からの抽出が可能な大容量タイプ
QuickGene-HT/BiomekNX	全血96試料を同時処理可能な全自動/ハイスループットタイプ
QuickGene-Mini80	クリーンベンチ内にも設置可能な簡易型タイプ
QuickGene SP kit	スピン方式に対応した核酸抽出キット

写真●QuickGene-Mini80 およびキットとその他のラインナップ

酸抽出が可能です。QuickGene SP Kit (スピン方式抽出キット) を用いた場合、10 μl というきわめて少ない抽出液量で、回収量を損わずに核酸を抽出することが可能です (図3)。

### QuickGene ラインナップ

QuickGene シリーズは、メンブレンを備えたカートリッジと各種処理液の専用キット、および専用抽出装置により構成されています (写真)。

### 使用例

ゲノム解析、発現解析、あるいはBACarrayの製作に応用可能な、3つの抽出例についてご紹介いたします。

#### 培養細胞からのゲノム DNA 抽出例

(Application Guide No.5) (表1)

使用キット: QuickGene DNA tissue kit S 使用。培養細胞  $0.5 \times 10^6$  の培養細胞からのゲノム DNA 抽出例。

#### 培養細胞 (Hela) からの RNA 抽出例 (Application Guide No.11) (表2)

使用キット: QuickGene RNA cultured cell kit S 使用 (DNase 処理あり)。各種培養細胞からの total RNA 回収例。

#### 大腸菌からの BAC, PAC DNA 抽出

表1

細胞名	収量 (μg)	純度 ( $A_{260/280}$ )
HepG2	5.2	1.7
Huh6	7.6	1.8

$A_{260/280}$ : タンパクの混入の程度の指標。小さいほど混入が少ない

表2

細胞名	収量 (μg)	純度 ( $A_{260/230}$ )
Hela ( $2 \times 10^6$ 個)	46.8	2.09
HEK293 ( $2 \times 10^6$ 個)	43.8	2.07
HL60 ( $3 \times 10^6$ 個)	34.2	2.02

$A_{260/230}$ : グアニジウム塩の混入の程度の指標。小さいほど混入が少ない

表3

細胞名	収量 (ng)
大腸菌:DH10B*	約50 (PAC) 約50 (BAC)

\*大腸菌: DH10B PACインサート: 140kbp  
BACインサート: 80kbp

#### (Application Guide No.10) (表3)

使用キット: QuickGene Plasmid kit S. BAC, PAC DNA をトランスファーした大腸菌を、2ml の LB 培地で16時間培養し、BAC および PAC DNA を抽出。

このようにさまざまな用途に対し、高純度、高収量での抽出が可能です。

### おわりに

今後も、特長ある商品開発を推し進め、皆様のニーズにお答えすることで、マイクロアレイ技術の発展、進歩の一助になれば幸いです。

### 参考文献

- 1) 日本化学会第85回春季年会講演予稿集, 473: 講演 3H6-31, 2005
- 2) 膜 (MEMBRANE), 31: 174-177, 2006
- 3) 臨床化学, 36: 33-39, 2007

**FUJIFILM**

富士フイルム株式会社

ライフサイエンス事業部

〒107-0052

東京都港区赤坂9-7-3

TEL: 03-6271-2158

FAX: 03-6271-3136

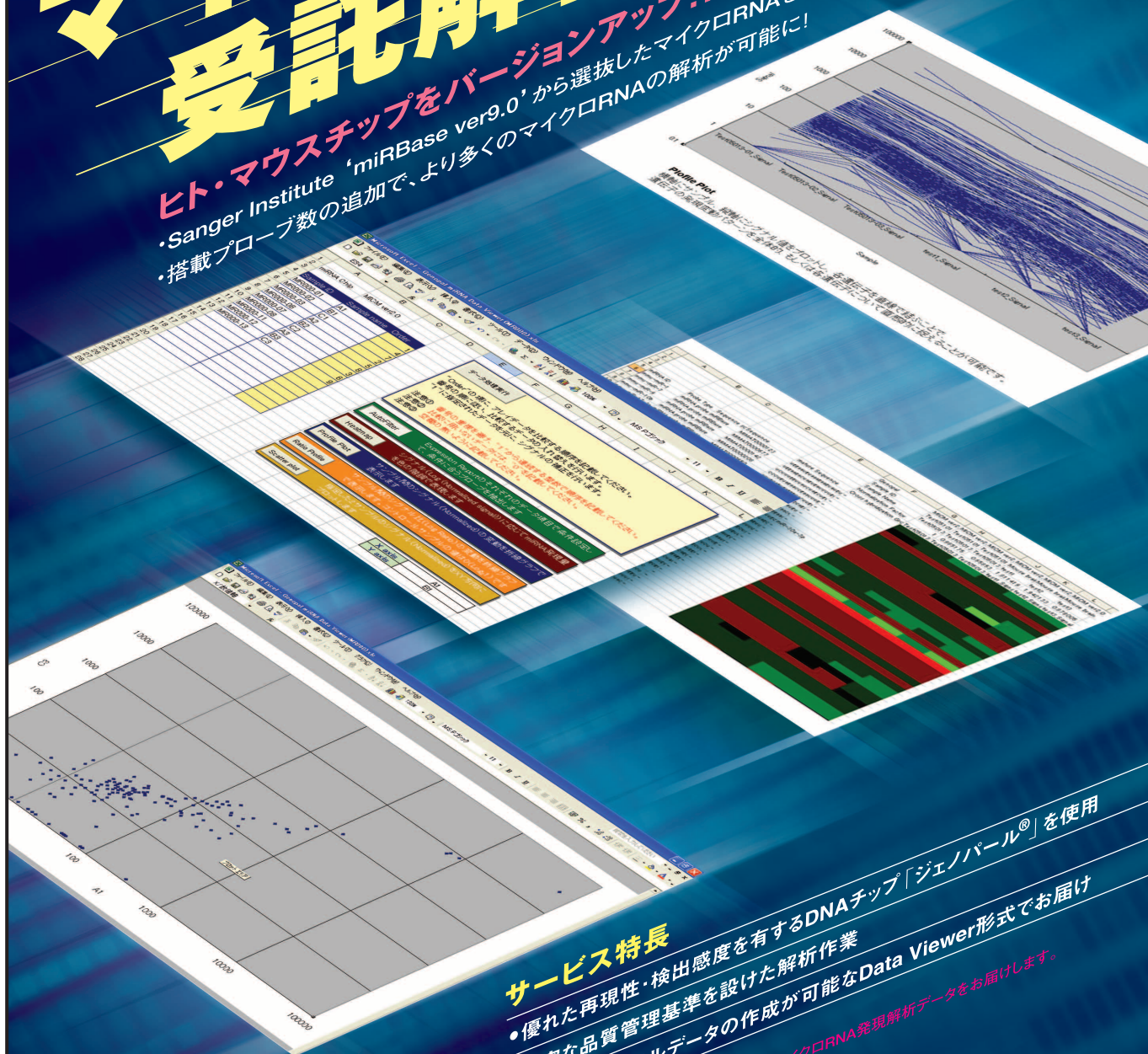
E-mail: [sginfo@fujifilm.co.jp](mailto:sginfo@fujifilm.co.jp)

URL: <http://lifescience.fujifilm.com/>



# マイクロRNA 受託解析サービス

**ヒト・マウスチップをバージョンアップ!!**  
 ・Sanger Institute 'miRBase ver9.0' から選抜したマイクロRNAを搭載  
 ・搭載プローブ数の追加で、より多くのマイクロRNAの解析が可能に!



## サービス特長

- 優れた再現性・検出感度を有するDNAチップ「ジェノパール®」を使用
- 厳密な品質管理基準を設けた解析作業
- 様々なビジュアルデータの作成が可能なData Viewer形式でお届け
- 様々なビジュアルデータを準備ください。  
 Total RNAをご準備ください。  
 高性能DNAチップ「ジェノパール®」によるマイクロRNA発現解析データをお届けします。

Genopal®

チップ製造元/三菱レイヨン株式会社  
 ジェノパール®は三菱レイヨンの登録商標です。

# Magtration® 12XP

DNAマイクロアレイのサンプル調製自動化装置



## 遺伝子発現解析研究のクォリティー・効率を大幅に改善します

マイクロアレイ実験はサンプル準備が煩雑で、実験者の技量差により、得られるデータに差異が生じてしまいます。しかも手操作では拘束時間が長い上に、ハイスループット化が出来ません。

Magtration 12XPは手作業における様々な問題点を解決し、遺伝子発現解析研究のクォリティー・効率を大幅に改善します。

**省力化** 煩雑な手作業の大幅に低減

**再現性** 実験者間のデータ差解消

**正確性** ヒューマンエラーの回避

**簡便性** 精製試薬のプレパック化



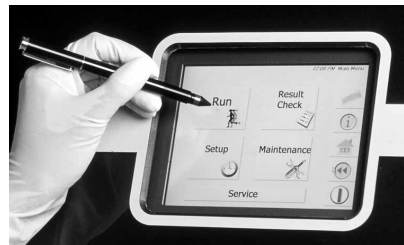
**簡単操作** プレパック試薬とタッチパネルでの操作により各工程作業を簡略化



① プレパック試薬の架設



② 消耗品類の架設

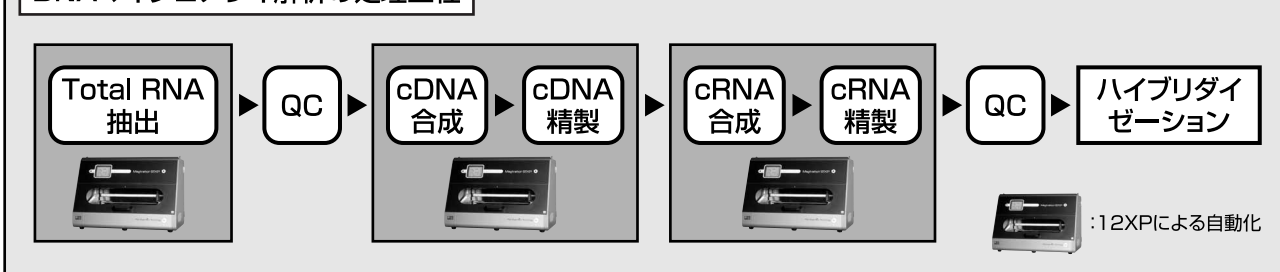


③ タッチパネルで簡単スタート

**Walk Away**

2日以上かかっていた複雑な操作の省力化を実現  
最短丸1日でサンプル調製完了

DNAマイクロアレイ解析の処理工程



自動化技術によるTotal System Innovationを提供する…  
**プレジジョン・システム・サイエンス株式会社**  
〒271-0064 千葉県松戸市上本郷88  
Tel.047-303-4801 Fax.047-303-4811  
URL : <http://www.pss.co.jp> E-mail : [service@pss.co.jp](mailto:service@pss.co.jp)

**ホームページをリニューアル**  
研究者に親切なホームページを目指しました  
左記URLよりぜひお越し下さい

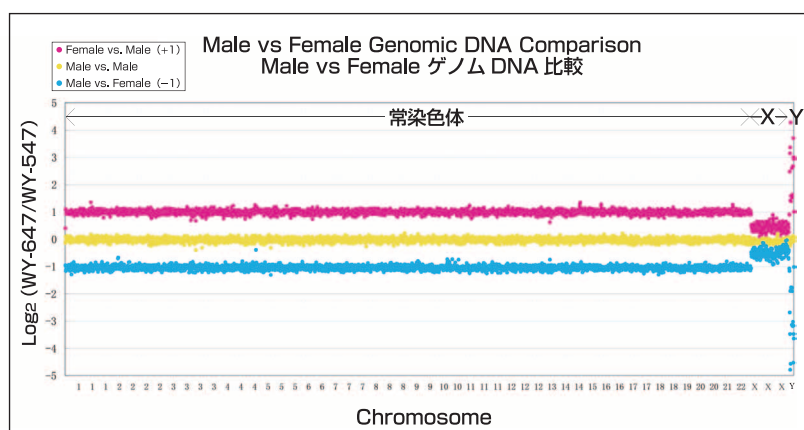
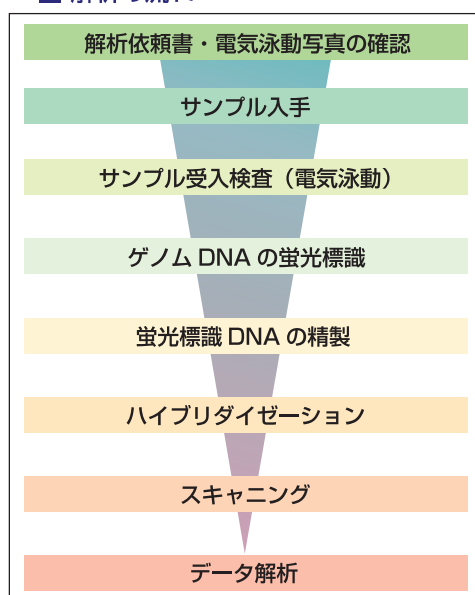


# ヒト染色体異常 CGH 解析 BAC アレイ CGH 解析 受託サービス

がん細胞などで生じている染色体コピー数の増加・欠失といった染色体異常のゲノムワイドなプロファイリングを行うサービスです。

- Macrogen 社ヒト用 MacArray™ Karyo 4000を使用:解像度～約1.0Mb
- 約 2 週間で解析結果をご提供
- 独自の蛍光色素と独自の技術で、再現性の高いデータをご提供
- トレーニングを受けた専任の研究員が対応
- オリゴ DNA を用いた CGH 解析に比べ、微細な変化をとらえることが可能

## ■ 解析の流れ



		Autosomes±S.D.	X±S.D.	Y
Female_WY-647	Male_WY-547	-0.0375±0.0689	0.500±0.165	-2.14
Male_WY-647	Female_WY-547	-2.24×10 <sup>-5</sup> ±0.0676	-0.562±0.146	1.69
Male_WY-647	Male_WY-547	-0.0171±0.0668	-0.0658±0.0666	-0.0309

## ■ 解析結果 以下のデータをご報告します。

- 画像データ (TIFF)
  - WY-547-WY-647 マージデータ (BMP)
  - 解析生データ (Excel, Text)
  - Log<sub>2</sub> スキャタープロット
- ※データは CD-R に保存し、納品します。基本は宅急便になります。

## ■ 納期

- サンプル受取り後、10 営業日
- ※サンプルが多数の場合は上記納期と異なりますので、ご照会下さい。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://wako-chem.co.jp/siyaku/jutaku/index.htm>

## 和光純薬工業株式会社

本社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号

東京支店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号

営業所：北海道・東北・筑波・横浜・東海・中国・九州

URL：<http://www.wako-chem.co.jp>

問い合わせ先

BACアレイ CGH 解析受託サービス窓口

E-mail：[bacarray@wako-chem.co.jp](mailto:bacarray@wako-chem.co.jp)

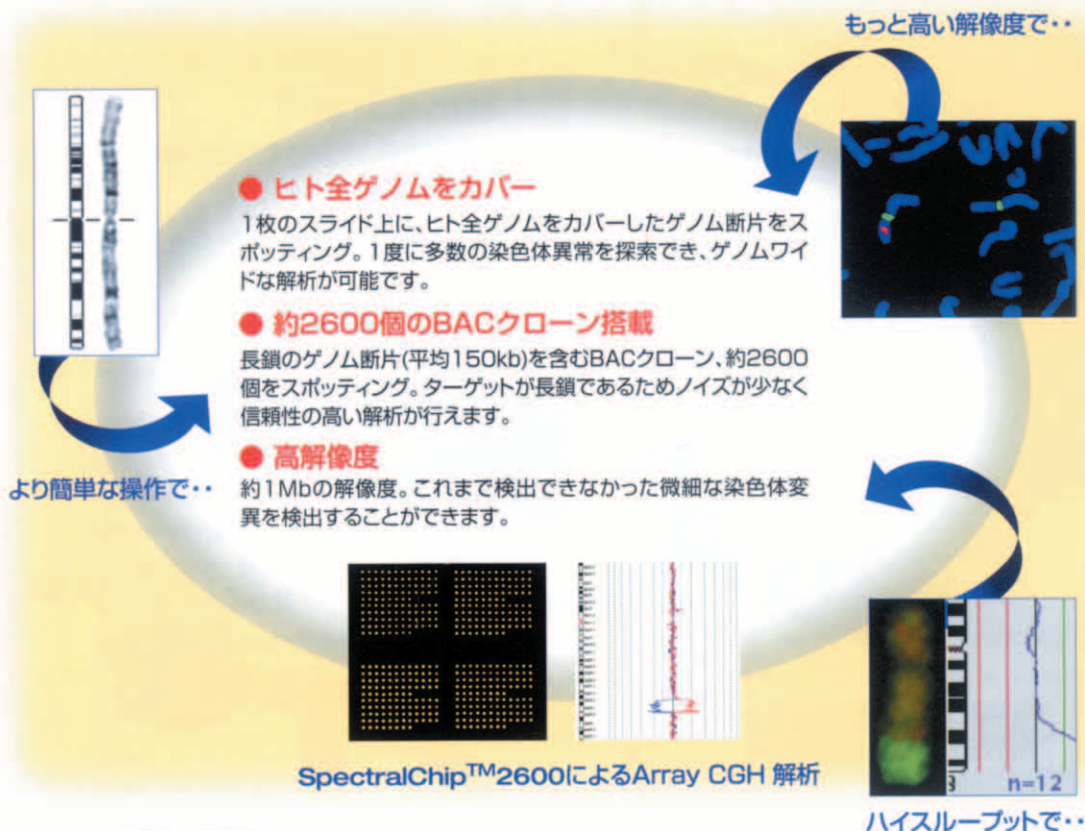
Fax：06-6201-5965

# CGHマイクロアレイ解析

## 染色体異常の検出

### SpectralChip™ 2600

SpectralChip™ 2600は、約2600個のBACクローンをスポッティングしたスライドガラスアレイです。ヒト全ゲノムを約1 Mb間隔でカバーしており、G-bandingやFISHといった従来の手法より、格段に高い解像度でかつ簡便に網羅的な核型分析が可能です。



#### ScanArray® シリーズ

ScanArray® シリーズはSpectralChip™ 2600をはじめ、あらゆるマイクロアレイ研究に対応するスライド型マイクロアレイスキャナーです。

様々な種類のアレイを最適な条件でスキャンし、解析・定量までの一連の作業を簡便に行うことができます。



株式会社パーキンエルマージャパン ライフサイエンス事業部

横浜本社 〒220-0004 横浜西区北幸2-8-4 TEL. (045) 314-8261 / FAX. (045) 314-8267  
大阪支社 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町5-3 TEL. (06) 6386-1771 / FAX. (06) 6386-6401

[www.perkinelmer.co.jp](http://www.perkinelmer.co.jp)



仏国 Innopsys 社

# マイクロアレイスキャナー

## InnoScan 700A 小型でハイパフォーマンス

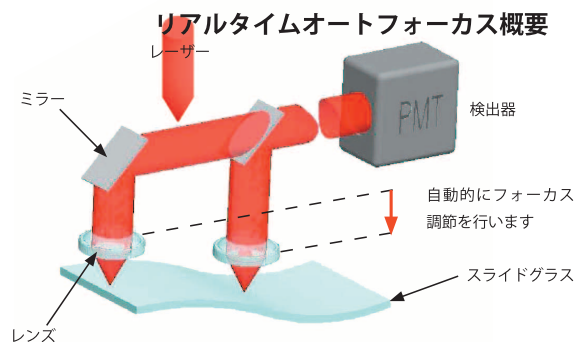
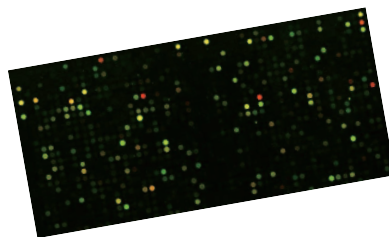


### そして正確に

- リアルタイムオートフォーカス
- 共焦点式 PMT 検出器
- 高解像度スキャン
  - 30 ~ 200  $\mu\text{m}$  のスポットの検出が可能
- 軽量・省スペース
  - 253 x 450 x 345 (W x D x H) mm
  - 12 kg

### 検出時間を短く

- 検出 4 分未満
  - 解像度 10  $\mu\text{m}$ /ピクセルの場合
- 2 波長同時検出
  - 励起波長 635 nm 及び 532 nm



### デモンストレーション受付中

製品名	製品内容	価格
InnoScan 700A	本体、PC ソフトウェア含む	¥7,900,000

製造元

**INNOPSYS**

<http://www.innopsys.fr/>

輸入元



株式  
会社

**スクラム**

本社 〒130-0021 東京都墨田区緑 1-8-9 A&Y ビル  
TEL. (03)5625-9711 FAX. (03)3634-6333  
大阪営業所 〒532-0003 大阪市淀川区宮原町 5-1-3 新大阪生島ビル 702  
TEL. (06)-6394-1300  
E-mail [webmaster@scrum-net.co.jp](mailto:webmaster@scrum-net.co.jp)  
Internet [www.scrum-net.co.jp](http://www.scrum-net.co.jp)