

DNA マイクロアレイ関連技術の開発

バイオ応用室 岡 千寿, 前田 浩, 鈴木 健, 藤枝 正之
千葉大学真菌医学研究センター 三上 襄, 五ノ井 透
東洋鋼板株式会社 岡村 浩, 磯貝 健次

Technological Development of Methods for DNA Microarray

Chitoshi OKA, Hiroshi MAEDA, Takeshi SUZUKI, Masayuki FUJIEDA¹⁾
Yuzuru MIKAMI, Tohru GONOI²⁾
Hiroshi OKAMURA, Kenji ISOGAI³⁾

¹Chiba Industrial Technology Research Institute

²Chiba University Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses

³TOYO KOHAN CO., LTD.

DNA マイクロアレイは、スライドガラス等の基板に多数の DNA 分子を所定の領域毎に整列固定させた高密度のアレイであり、核酸の塩基配列の決定、並びに遺伝子の発現、変異、多型性などの同時解析に非常に有用であり、DNA マイクロアレイの作製技術および得られたデータの解析システムのより一層の開発が望まれている。DNA マイクロアレイを用いた分析においては、検出対象であるターゲットポリヌクレオチドが微量であるため、高感度な検出が求められる。本事業においては、高感度な検出を可能にする手段を開発することを目的として行い、ある種の融解温度調節剤を添加することにより目的を達成することができた。次にマイクロアレイは高価であることから、解析後の DNA マイクロアレイよりポリヌクレオチドを除去して再生し、再利用することが望まれている。しかし DNA マイクロアレイの再利用は実質的に不可能であった。本事業においては、DNA マイクロアレイの再生・再利用を可能とする技術を開発することを目的として行い、DNA マイクロアレイ表面の水分条件を検討することにより目的を達成することができた。

1. はじめに

これまでに様々な生物種においてゲノム情報の解析が全世界的に行われてきており、今やポストゲノム時代に移行している。ポストゲノム研究開発において、遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が進む中で、DNA マイクロアレイ技術は有力なモニタリングデバイスとして認知されつつある。DNA マイクロアレイチップはスライドガラス等の基板に多数の DNA 分子 (>10,000 遺伝子) を所定の領域毎に整列固定させた高密度のアレイであり、遺伝子の発現、変異、多型性などの同時解析に非常に有用である。しかしながら本技術はコスト面、操作面などにおいて問題点を抱えており、さらに学術的な面においても従来のノー

ザンハイブリダイゼーションと比較して、信頼性に欠けるという認識がある。そこで本課題はマイクロアレイ技術の汎用化とそれに伴う普及性の構築というニーズに応えることを目的とした。

DNA マイクロアレイ解析においては、検出対象であるターゲットポリヌクレオチドが微量であるため、高感度な検出系が求められる。そのため、プローブポリヌクレオチドを高密度かつ強固に固定化する方法などが報告されている。本課題においてはプローブポリヌクレオチドとターゲットポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション効率を向上させることにより、検出感度を上げることを目的とした。また本課題において用いた DNA マイクロアレイチップには付加特性が認められたため、

併せてこのことについても報告する。

2. 実験方法

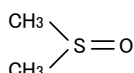
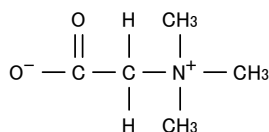
プローブポリヌクレオチドは麹菌 *Aspergillus oryzae* ゲノム遺伝子配列情報を基に、解糖系並びに TCA-サイクルを構成する酵素タンパク質をコードする遺伝子について 60 塩基長のものを 31 種合成した^{1, 2)}。今回選択した遺伝子群は *A. oryzae* を富栄養液体培地にて培養した際に発現することが確認されている²⁾。これらプローブポリヌクレオチドを、東洋鋼板株式会社製ジーンスライドにスポットティングし固定化した³⁾。

ターゲットポリヌクレオチドは *A. oryzae* を富栄養液体培地にて培養した菌体より mRNA を調製し、逆転写反応により Cy-3 蛍光ラベル化 cDNA を合成した。調製したラベル化 cDNA を、コントロールとして 5x SSC, 0.5 % SDS に溶解した。またコントロール反応系中に、終濃度にして 1 M となるように Betaine (トリメチルグリシン) または 5 % となるように DMSO (ジメチルスルホキシド) を添加したものに溶解させた。これら 3 種のターゲットポリヌクレオチド溶液を用いてハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイゼーション効率を蛍光強度を測定することで比較した。

次に、本課題にて用いたジーンスライドの特徴として、ガラス基板上にプローブポリヌクレオチドは共有結合、アミド結合を介して強固に結合している。そのことからハイブリダイゼーション後にターゲットポリヌクレオチドを解離させることができることが予想されたため、解離条件を検討した。

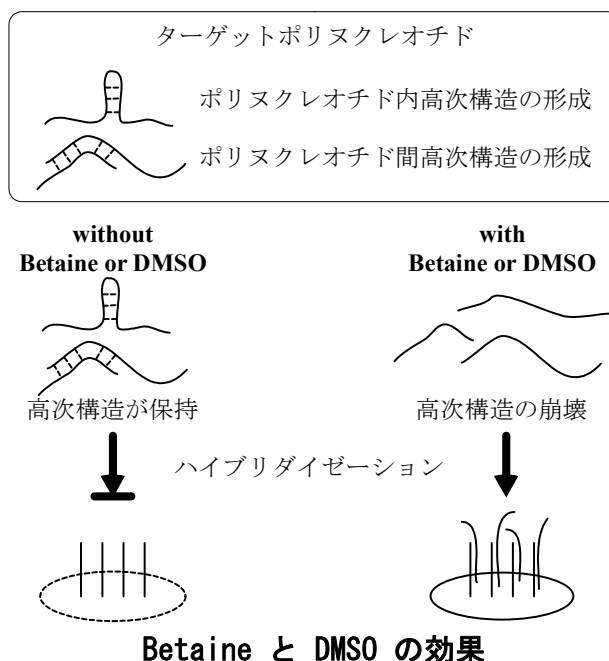
3. 結果及び考察

コントロールとして従来の溶解液に溶かした場合のハイブリダイゼーション後の蛍光強度に比較して、Betaine または DMSO を添加した場合には蛍光強度が 1.5-4 倍に向上した。Betaine と DMSO の構造を以下に示す。

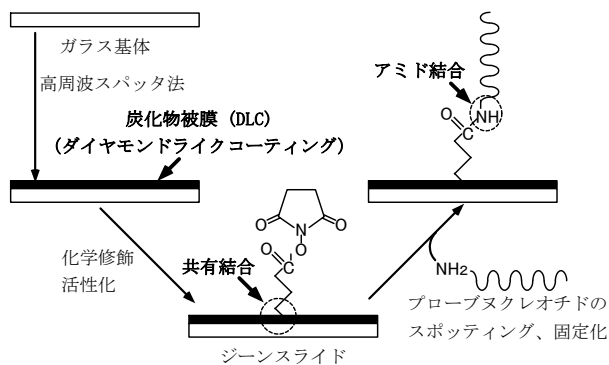


Betaine (*N, N, N*-trimethylglycine) DMSO (dimethyl sulfoxide)

両化合物は浸透性を有し、ポリヌクレオチド内やポリヌクレオチド間における G-C 間の結合エネルギーを A-T 間の結合エネルギーまで低下させる効果がある⁴⁾。その結果として、以下の図で示すように、ターゲットポリヌクレオチドの見かけ上の融解温度を低下させ、高次構造を解き、ハイブリダイゼーション時のプローブポリヌクレオチドへのアニール反応における立体障害が除去されハイブリダイゼーション効率が改善され、検出感度が向上したものと考えられる。



次にハイブリダイゼーション後のプローブポリヌクレオチドからのターゲットポリヌクレオチドの解離条件を検討した。以下に本課題で用いたジーンスライドの概略構造を示す。



ジーンスライドの製法ならびにプローブヌクレオチドの固定化の概略⁽³⁾

上記構造から、プローブポリヌクレオチドは熱処理を行っても基板上から剥離することはないと予

想された。そこでハイブリダイゼーション後、乾燥させた後、純水中、湯煎条件で 1 時間処理したところ 90 % 以上のターゲットポリヌクレオチドが解離し、さらに解離後もプローブポリヌクレオチドが基板上に保持されたままであり、再利用が可能であった。しかしながらハイブリダイゼーション後に乾燥過程を経ず上記処理を施すことにより解離効率は、ほぼ 100 % となった。以上のことからターゲットポリヌクレオチドの解離にはポリヌクレオチド間の水素結合の崩壊と、結合水の有無が重要と考えられ、さらに条件を検討しているところである。

4. まとめ

- ・DNA マイクロアレイ技術において汎用性のある検出感度を向上する方法を見出した。
- ・DNA マイクロアレイチップの再利用についての可能性を示した。
- ・本課題の結果を基に 2 件の特許出願を行った。(特願 2006-117137, 特願 2006-120641)

謝辞

本課題は、平成 17 年度千葉大学真菌医学研究

センター共同利用研究 (05-36) の補助を受けて行われました。

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を頂きました千葉大学真菌医学研究センター・三上襄先生、五ノ井透先生、東洋鋼板株式会社・岡村浩氏に感謝申し上げます。また麹菌ゲノム遺伝子解析情報について御提供を頂きました産業技術総合研究所・町田雅之先生、東北大学大学院・五味勝也先生に感謝申し上げます。最後に本課題の立ち上げ、並びに特許出願等のコーディネーターとして御尽力して頂いた前プロジェクト推進室・清水三弘上席研究員、東洋鋼板株式会社・山根啓二氏、磯貝健次氏、千葉大学知的財産本部・高橋昌義先生に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 22-29 (2005)
- 2) Maeda, H. *et al.*: *Appl Microbiol Biotechnol.* **65**, 74-83 (2004)
- 3) 丹花ら: 特開 2002-82116
- 4) Wolfgang, H. *et al.*: *Nucleic Acids Research*, **25** (19), 3957-3958 (1997)