

# DNAマイクロアレイ関連技術の開発 (第2報)

バイオ応用室 岡 千寿, 前田 浩  
千葉大学 真菌医学研究センター 五ノ井 透, 三上 襄

## Technological Development of Methods for DNA Microarray (2nd report)

Chitoshi OKA<sup>1)</sup> and Hiroshi MAEDA<sup>1,2)</sup>  
Tohru GONOI<sup>3)</sup> and Yuzuru MIKAMI<sup>3)</sup>

<sup>1</sup>Chiba Industrial Technology Research Institute

<sup>2</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

<sup>3</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University

DNAマイクロアレイは、網羅的な遺伝子の発現解析や変異、多型性などの同時解析に用いられており、ポストゲノム解析の強力なツールの1つである。しかしながら、このDNAマイクロアレイは高価であり、通常は、1回の解析実験で使い捨てられている。

今回我々は、DLCコーティング・スライドを用いたDNAマイクロアレイにおいて、蛍光ラベル化cDNAをハイブリダイズした後、アレイ・スライドにゼラチンやトレハロースの被膜を形成し、蛍光を検出した後、ハイブリダイズしていた蛍光DNAを完全に除去できること、さらにこのアレイ・スライドに、蛍光ラベル化cDNAが再度、ハイブリダイズできることを見出した。この技術によりDNAマイクロアレイの再利用が可能となり、解析実験コストの大幅な削減が可能になると考えられる。

### 1. はじめに

DNAマイクロアレイは、スライドガラス等の基板に特異的なポリヌクレオチドを多数整列固定化させたものであり、網羅的な遺伝子の発現解析や変異、多型性などの同時解析に非常に有用である。このDNAマイクロアレイを用いた遺伝子情報の解析は、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発などに極めて有用であるため、DNAマイクロアレイの作製技術、及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。

また、一般的にDNAマイクロアレイは高価であることから、蛍光ラベル化DNAをマイクロアレイに固定化したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて解析した後、蛍光ラベル化DNAを除去してマイクロアレイを再生し、再利用することが出来れば解析コストの大幅な低減が可能となるが、従来の方法では不可能とされてきた。

本研究では、蛍光ラベル化cDNAをマイクロアレイとハイブリダイズした後、非蛍光性被膜を形成

させるという新たな発想により、アレイスキャナーで蛍光を検出後、ハイブリダイズした蛍光ラベル化cDNAを完全に除去することで、DNAマイクロアレイの再利用を可能とする技術を開発したのでその概要を報告する。本実験の概略を図1に示す。

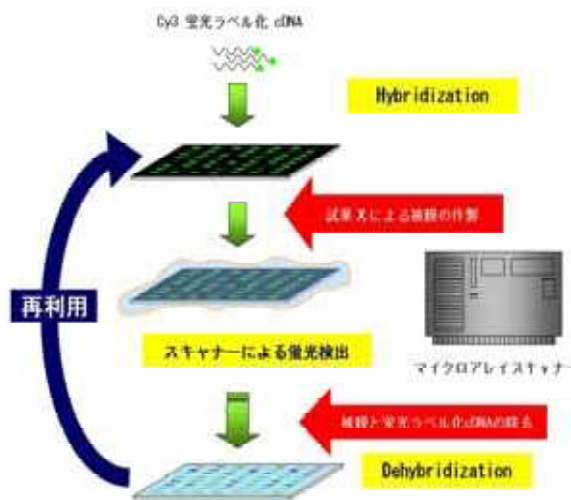


図1 今回の実験の概略

## 2. 実験方法

### 2.1 DNAマイクロアレイの作製

YPD液体培地（富栄養培地）における培養で発現することが確認されている30種類の*Aspergillus oryzae*の遺伝子<sup>1)</sup>を選択し、これらの遺伝子に特異的な60塩基長のオリゴヌクレオチドを合成した。また、ポジティブ・コントロールとしてヒストン遺伝子を、スポットティング・コントロールとしてCy3ラベル化オリゴDNAを用いた。これらのオリゴヌクレオチドを化学的共有結合でDLCコーティング・スライドに固定化することによりDNAマイクロアレイを作製した。DNAマイクロアレイの配置図を図2に示す。

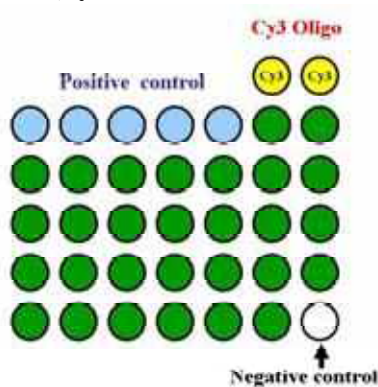


図2 実験に用いたマイクロアレイの配置図

### 2.2 蛍光ラベル化cDNAの調製

*A. oryzae* RIB40 株をYPD液体培地で培養した菌体からmRNAを調製し、CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit (GEヘルスケア バイオサイエンス社製)を用い、Cy3蛍光ラベル化cDNAを合成した。

### 2.3 ハイブリダイゼーション、及び洗浄

Cy3蛍光ラベル化cDNAを5×SSC/0.5%SDSに溶解し、ハイブリダイゼーション溶液とした。ハイブリダイゼーションは、60℃で16時間行い、その後の洗浄操作は、以下のように行った。アレイ・スライドを2×SSC/0.2%SDSに浸漬してカバーガラスを洗い落とし、2×SSC/0.2%SDSで15分間洗浄した。これを2×SSCで洗浄し、300rpmで、3分間遠心しアレイ・スライド表面の水分を除去した。

### 2.4 ゼラチンによる被膜形成

蛍光ラベル化cDNAとハイブリダイズし、洗浄したアレイ・スライドをあらかじめ50~60℃に加熱して溶解しておいた0.2×SSC/1mM EDTA/1.5%(W/V)ゼラチンに浸漬し、ただちに300rpmで、3分間遠心を行い、室温で遮光してゼラチンをゲル化した。

### 2.5 トレハロースによる被膜形成

蛍光ラベル化cDNAとハイブリダイズし、洗浄したアレイ・スライドを2×SSC/20%(W/V)トレハロース溶液に浸漬し、ただちに300rpmで、3分間遠心を行い、室温で遮光して放置した。

### 2.6 蛍光の測定、及び蛍光強度の数値化

アレイ・スライド上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたcDNAの蛍光をマイクロアレイ・スキャナー GeneTAC UC-4(Genomic Solutions社製)で測定した。蛍光強度の数値化は、解析ソフト ScanAnalyze ver. 2.50 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>)を使用した。

### 2.7 蛍光ラベル化cDNAの除去

50mL容の耐熱チューブに入れた超純水を湯浴上で加熱したものをあらかじめ準備し、蛍光強度を測定したアレイ・スライドをこの超純水に浸漬して洗浄した。この操作によりアレイ・スライド上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズした蛍光ラベル化cDNAを除去した。

本稿では、この操作をデハイブリダイゼーション (Dehybridization あるいは Dehybri) と呼ぶことにする。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 ゼラチン被膜の効果

従来の方法で処理した対照実験については、アレイ・スライドからの蛍光ラベル化cDNAのデハイブリダイゼーション後に蛍光ラベル化cDNAの残存が観察され、アレイ・スライドの再生操作としては不十分であった(図3)。

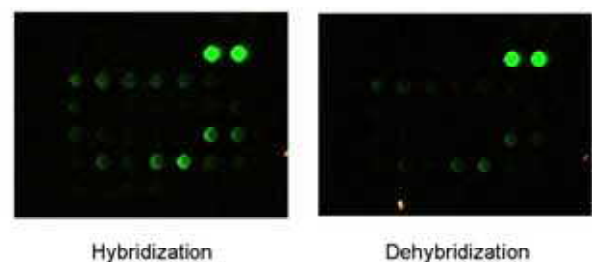


図3 対照実験のアレイ画像

それに対して、ゼラチンによる被膜形成を行ったアレイ・スライドは、蛍光ラベル化cDNAのデハイブリダイゼーションにより、アレイ・スライドにハイブリダイズした蛍光ラベル化cDNAがほぼ完全に除去されていた。さらに、このアレイ・スラ

イドを用いて2度目のハイブリダイゼーションを行ったところ、蛍光ラベル化cDNAがアレイ・スライド上のオリゴヌクレオチドに再度、ハイブリダイズすることも確認された（図4）。

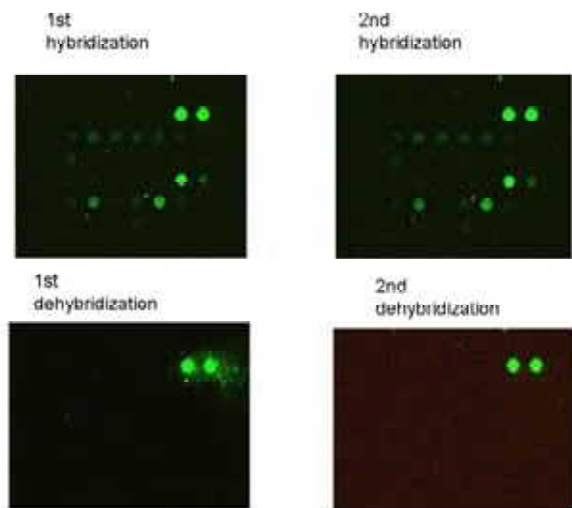


図4 ゼラチン被膜実験のアレイ画像

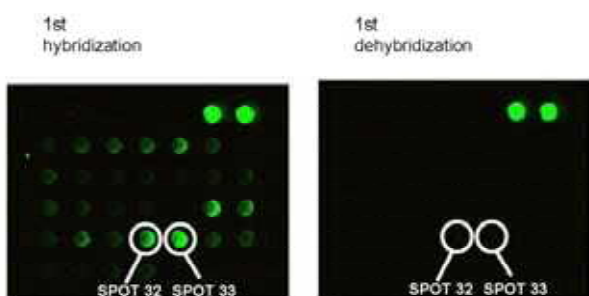


図5 グラフ化したスポット

これらの結果をScanAlyzeにより数値化して、図5におけるSPOT32、及びSPOT33について蛍光強度をグラフ化したものを図6、図7に示す。

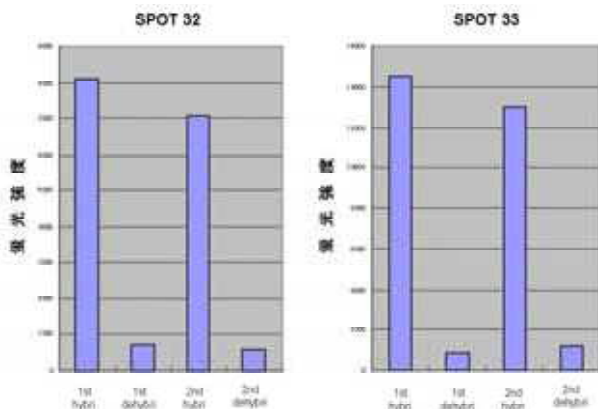


図6 対照実験の蛍光強度

ゼラチン被膜実験では、蛍光ラベル化cDNAのデハイブリダイゼーションによりアレイ・スライド上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしていた蛍光がほぼ完全に除去されていることが確認された（図7）。

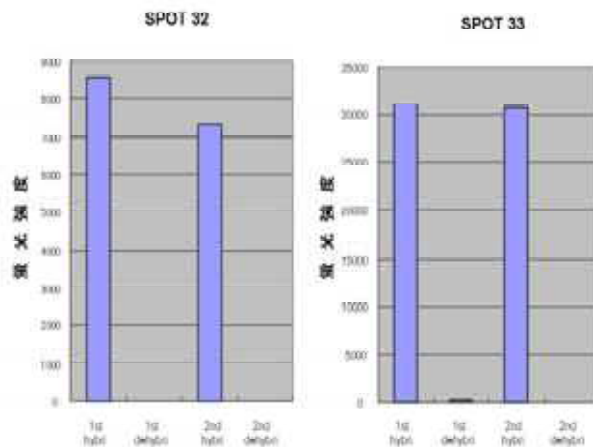


図7 ゼラチン被膜実験の蛍光強度

### 3.2 トレハロース被膜の効果

ゼラチン被膜と同様にトレハロース被膜を用いても同様の効果があり、ゼラチン被膜より良好な結果が得られることを確認した。

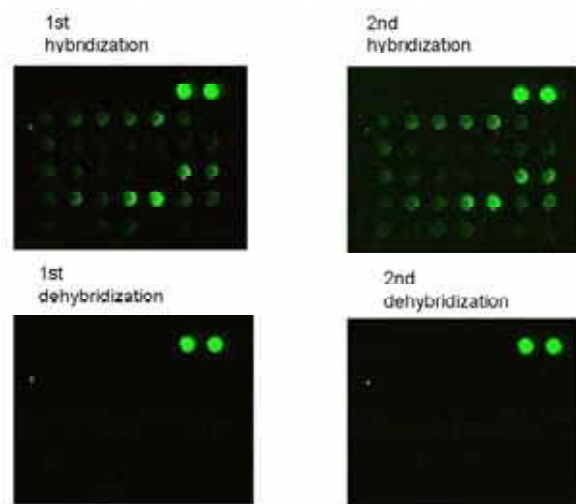


図8 トレハロース被膜実験のアレイ画像

トレハロースで被膜を形成したものでは、蛍光ラベル化cDNAのデハイブリダイゼーション後に、ほとんど蛍光が検出されず、また、2回目のハイブリダイゼーションの蛍光強度も良好であった（図8）。

トレハロース被膜実験の結果について蛍光強度を数値化し、SPOT32、及びSPOT33（図5参照）の蛍光強度をグラフ化したものを図9に示す。

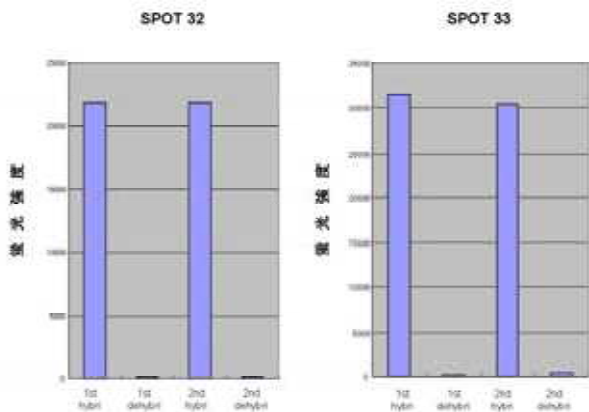


図9 トレハロース被膜実験の蛍光強度

トレハロースを用いて被膜を形成する実験では、同一のアレイ・スライドを用いて3回の繰り返し実験を行い、再使用が可能であるかどうかを検討した。この実験のアレイのスキャン画像を図10に示す。

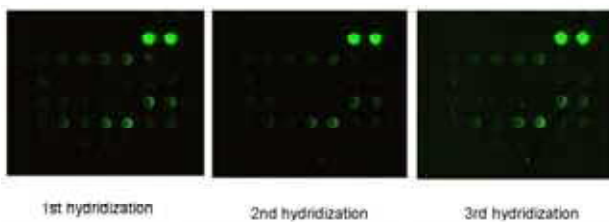


図10 3回の再使用におけるアレイ画像

アレイ・スライド再使用の可能性を数値的に検討するため、図10に示したアレイ・イメージから蛍光強度の強い10個のスポットについて、相対蛍光強度の平均値と標準偏差をグラフ化したものを図11に示す。

図11のグラフからも明らかなように、トレハロースで被膜を形成することにより、従来、不可能とされてきたDNAマイクロアレイの再使用が十分可能であると思われた。この技術は、従来高価であるマイクロアレイを用いた実験の大幅なコスト削減に役立つと考えられる。

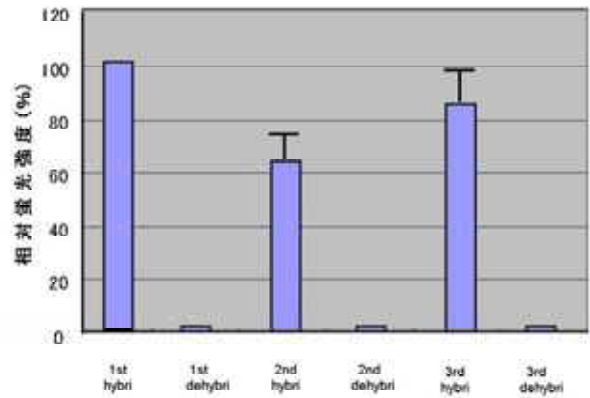


図11 繰り返し実験の相対蛍光強度の平均値

#### 4. まとめ

従来の多くのマイクロアレイ・スライドでは、DNA結合後の再使用は出来なかったが、オリゴヌクレオチドを強固に結合することができるDLCコーティング・スライドを用いてアレイ・スライドを調製し、さらにゼラチンやトレハロース等で被膜を形成させることにより、アレイ・スライドを複数回、再使用できることを確認した。

本研究を進めるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました（独）産業技術総合研究所の町田 雅之先生、東北大学 大学院 農学研究科の五味 勝也先生、阿部 敬悦先生に感謝申し上げます。また、特許出願にあたり、ご指導を賜りました千葉大学知的財産本部の高橋 昌義先生、本研究のコーディネーターとして終始ご尽力を賜りました当研究所プロジェクト推進室(当時)の清水 三弘氏に深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Maeda H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 74-83 (2004)