

を検討したところ、MAPにのみ乱用歴がある患者において有意な差が見られた。多剤乱用を形成している群は、MAP依存形成にいたる要因として、遺伝要因よりもむしろ環境要因の寄与が大きいのではないかと考えられる。

MAPは主にドパミン神経系を介してその作用を発現すると考えられてきた。一方、 $\mu$ オピオイド受容体は、アルコールやコカイン依存の形成に関与していることが近年の遺伝子改変マウスを用いた研究を中心として明らかにされてきており、さらにこれまでの様々な薬理学的研究からドパミン神経を介した薬物依存形成のメカニズムとオピオイド神経系の相互作用の存在が示唆されてきた(9-11)。本研究は、 $\mu$ オピオイド受容体の遺伝子多型がドパミン神経を介した覚醒剤依存形成に対し何らかの影響を与えることを示唆し、遺伝子多型の研究として初めて、両神経系の相互作用の存在を示唆している。

#### E. 結論

$\mu$ オピオイド受容体は薬物依存を始めとして様々な作用に関与しており、また、それらの $\mu$ オピオイド受容体を介した作用には個人差が多く存在する。今回の研究は、 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型が、薬物依存並びに覚醒剤精神病様症状に対する脆弱性と相関性を有することを示すと共に、 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型による何らかの機能変化が生体内で起こっていることを示唆している。今後、 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型と、オピオイドの副作用である依存並びに他の副作用との相関性、さらには主作用である鎮痛作用との相関性を検討す

ることで、テーラーメイド疼痛治療法の開発にあたり、非常に有用な知見を提供すると考えられる。

## 2. ATP受容体遺伝子多型と痛覚感受性の相関解析

### A. 研究目的

生体におけるエネルギー源として利用されているATPは、近年ではATP受容体(P2プリン受容体)を介して、細胞間における神経情報伝達物質としての役割を果たしていることが明らかとされている。ATP受容体は大きく二つのサブファミリー、P2XおよびP2Yに分類され、これまでにそれぞれ7つおよび8つの受容体サブタイプが同定されている。その生理的役割は多岐にわたると考えられているが、痛覚の発生並びにその情報伝達制御における役割が注目されている(12)。しかしながら、これまでにATPと痛みの研究は末梢レベルを中心に為されてきたが、疼痛関連遺伝子としてのATP受容体遺伝子多型に注目した研究は全く報告されていない。我々はこれまでに、P2X<sub>7</sub>受容体遺伝子(P2RX7) exon5に存在し、スレオニンからヒスチジンにアミノ酸変異を引き起こす一塩基多型(SNP) T463C(rs208294)に関して相関解析を行い、冷刺激誘発疼痛の感受性との間に有意な相関性を見出し、P2X<sub>7</sub>受容体は冷刺激による痛みの発生ないし末梢の痛覚情報伝達制御に関与する可能性を示している。本研究では、ATP受容体遺伝子の中でも疼痛に関連することが報告されているP2X<sub>7</sub>受容体に着目し、P2X<sub>7</sub>受容体遺伝子(P2RX7) exon5に存在し、スレオニンからヒスチジンにアミノ酸変異を引

き起こす一塩基多型 T463C に関して、健常人並びに術後疼痛治療を受けた患者のゲノムサンプルを用いて、遺伝子多型解析を行った。

## B. 研究方法

### ・研究対象

ゲノムサンプルは、日本人の健常人、並びに術後疼痛治療患者（東京歯科大病院、東大医科研病院・東邦大佐倉病院）より採取した血液もしくは口腔粘膜よりフェノール抽出法を用いて精製した。血液を採取する際に、全ての対象者に文書による同意を得て、広島国際大学、東京都精神医学総合研究所及び関連施設の倫理委員会により承認された研究指針に沿って実験を行った。

### ・多型解析

全てのゲノムサンプルに関して、下記 primer 配列を用いて、SNP T463C (rs208294) を含む全長 358 bp の遺伝子領域を PCR 法により増幅した後、制限酵素 Nla III (CATG 認識) を用いた特異的配列切断処理後、電気泳動により遺伝子多型を解析した。

U: 5' caaaagagccagcagaatccac 3'

L: 5' gagggccaactgtgtctctcc 3'

### ・各サンプルにおける痛覚感受性との相関

## 解析

健常人 (120 名)、東京歯科大病院 (40 名)、並びに東大医科研病院・東邦大佐倉病院 (125 名) のサンプルの臨床情報を基に解析を行った。

(1) 健常人 (P2RX7: 年齢 20~65 歳 (平均 34.4)、男/女=78/42)

痛覚感受性の指標として、手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間 (人差し指及び中指の付け根まで冷水に付けた際に疼痛を感知するまでの時間の両指の平均)、並びに手指に対する圧刺激負荷時の疼痛感知圧 (親指を除く 4 指にそれぞれ圧力を加えていく際に、疼痛を感知した圧力の平均) を健常人ボランティアの 120 名に関して測定した。

(2) 東京歯科大病院 (P2RX7: 年齢 18~47 歳 (平均 24.8)、男/女 = 13/27)

(P2RX3: 年齢 18~47 歳 (平均 25.0)、男/女 = 40/62)

下顎骨切り術を受けた 40 症例 (P2RX7) に関して解析を行った。痛覚感受性の指標として、術前・術後 (鎮痛薬投与後) の手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間 (手首まで冷水に付けた際に疼痛を感知するまでの時間) を測定し、術後のフェンタニル処置による疼痛感知時間の延長を maximal possible effect (%MPE) として評価した。

$$\%MPE = \frac{(\text{フェンタニル処置下の疼痛感知時間}) - (\text{術前の疼痛感知時間})}{(\text{Cut-off time (150 秒)}) - (\text{術前の疼痛感知時間})} \times 100(\%)$$

さらに術後3及び24時間後の痛みの強さを Visual analogue scale (VAS)で評価した。また、術後24時間以内のフェンタニルの投与量・投与回数、術中も含めたフェンタニル総投与量についても解析を行った。

(3) 東大医科研病院・東邦大佐倉病院 (年齢28~78歳(平均63.3)、男/女 = 72/53)

外科開腹手術を受けて麻薬による術後硬膜外鎮痛を受けた125症例 (*P2RX7*) (胃ガン: 51例、直腸ガン: 17例、大腸・小腸・結腸・盲腸ガン: 23例、肝・胆・腎ガン: 9例、他症例: 2例) に関して解析を行った。術後24時間の鎮痛薬必要回数、除痛下での痛みアンケート結果、鎮痛薬総投与量、並びにペンタゾシン換算鎮痛薬総投与量に関して解析を行った。

・統計解析

各サンプルに関して、T463C (*P2RX7*) の genotype 頻度は Hardy-Weinberg 平衡にある

ことを確認した。各サンプルにおける痛覚感受性に影響を与える因子に関して、SPSS プログラム (Tokyo, Japan) を用いた共分散分析により解析を行った。

C. 研究結果

・日本人における *P2RX7* 上の SNP、T463C 多型頻度

総計 285 サンプルを用いた解析により、日本人における *P2RX7* 上の SNP、T463C の多型頻度は 44.6%であった (Table 4)。この頻度は、これまでに欧米人のゲノムを用いて行われてきた解析における数値 (約 40%) と比較し大きな違いは見られなかった。また、今回解析を行った3グループ間においても、多型頻度に有意な差は見られなかった。

総計	健康人	東京歯科大	東大医科研・東邦大
<b>Genotypic Data</b>			
例数			
多型頻度	多型頻度	多型頻度	多型頻度
T 82 28.8%	T 35 29.2%	T 12 30.0%	T 35 28.0%
T/C 152 53.3% 44.6%	T/C 65 54.2% 43.8%	T/C 24 60.0% 40.0%	T/C 63 50.4% 46.8%
C 51 17.9%	C 20 16.7%	C 4 10.0%	C 27 21.6%
合計 285	合計 120	合計 40	合計 125
<b>Allelic Data</b>			
T 316 55.4%	T 135 56.3%	T 48 60.0%	T 133 53.2%
C 254 44.6%	C 105 43.8%	C 32 40.0%	C 117 46.8%
合計 570	合計 240	合計 80	合計 250

Table 4 *P2RX7* 上の SNP T463C の日本人における多型頻度。

また、日本人遺伝子多型情報のデータベース (JSNP: a database of common gene variations in the Japanese population) (13,14) より、T463C は *P2RX7* 上の他の高頻度 SNP

と比較的高い連鎖不平衡 ( $D' > 0.5$ ) を示していた (Fig. 2)。

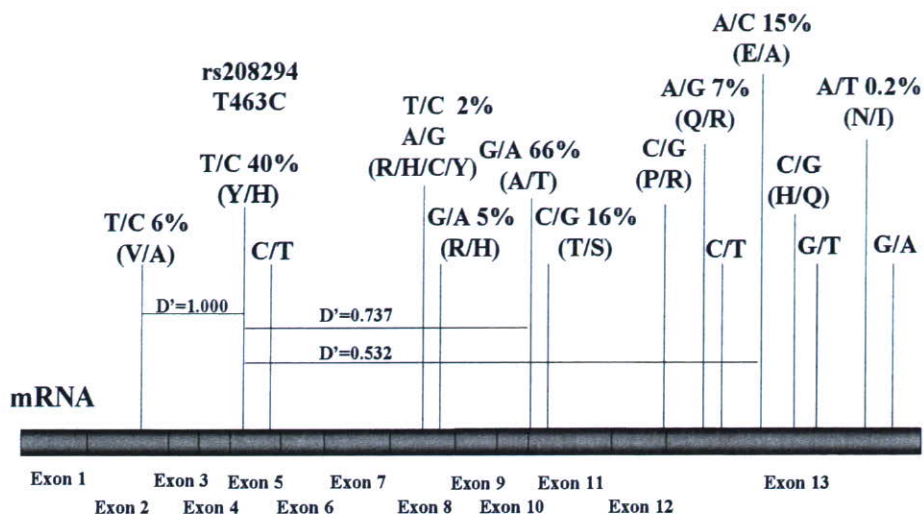


Fig. 2 human P2X<sub>7</sub> receptor mRNA 上の SNP 多型頻度と T463C の連鎖不平衡

・ 健常人を用いた痛覚感受性との相関解析  
健常人サンプルを用い痛覚感受性と P2RX7 exon5 上の SNP、T463C との相関性解析を行ったところ、TT 遺伝子型のサンプルは、TC 並びに CC 遺伝子型のサンプルと比較し、冷刺激に対する疼痛感受性が高い傾向が見られた (Fig. 3a)。そこで、C allele

を持つ群 (TC 並びに CC 遺伝子型) と持たない群 (TT 遺伝子型) にサンプルを分類し解析を行ったところ、両群間で手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間に有意な差が見られた (Fig.3b、P<0.05)。一方、手指に対する圧刺激負荷時の疼痛感知圧力は各遺伝子型間で有意な差は見られなかった (Fig. 3c,d)。

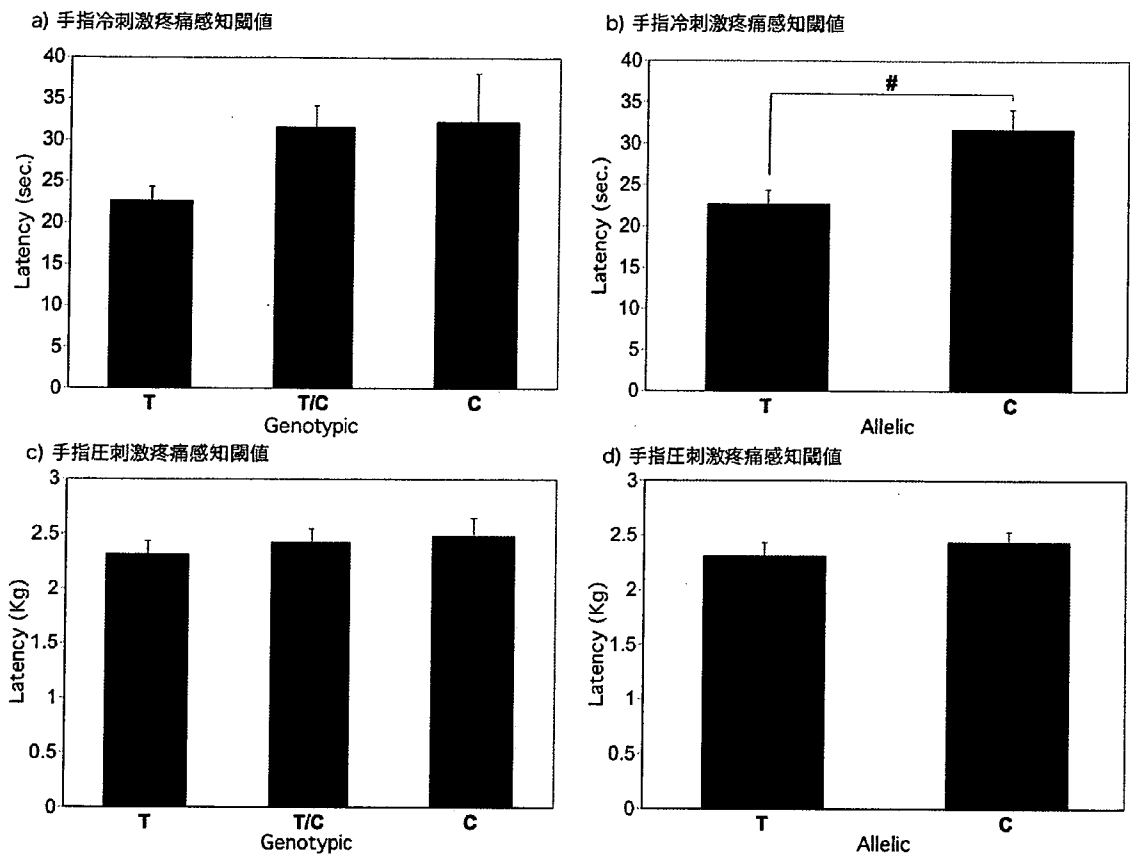


Fig. 3 日本人健常人における痛覚感受性と *P2RX7* 上の SNP、T463C との相関性

T463C の遺伝子型と手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間 (a,b)、並びに手指に対する圧刺激負荷時の疼痛感知圧力(c,d)の相関性を検討した。Allelic data (b,d) では C allele を持つ群 (TC,CC) と持たない群 (TT) で分類し解析を行っている。各データは平均±標準誤差で表している。#  $P < 0.05$ 。

・東京歯科大病院の症例サンプルを用いた痛覚感受性との相関解析

さらに、東京歯科大病院の症例サンプル

を用いた解析を行ったところ、術前の薬物無処置下における検討で、健常人サンプルと同様に、T463C の C allele を持たない群は有意ではないものの冷刺激に対する疼痛感受性が高い傾向が見られた (Fig. 4a,b)。一方、下顎骨切り術を受けた 40 症例に関して、術後の除痛処置のためフェンタニルを投与された状態で同様の冷刺激を負荷したところ、全ての遺伝子型で疼痛感知時間の延長が確認されたが、各遺伝子型間で %MPE に有意な変化は見られなかった (Fig. 4c,d)。

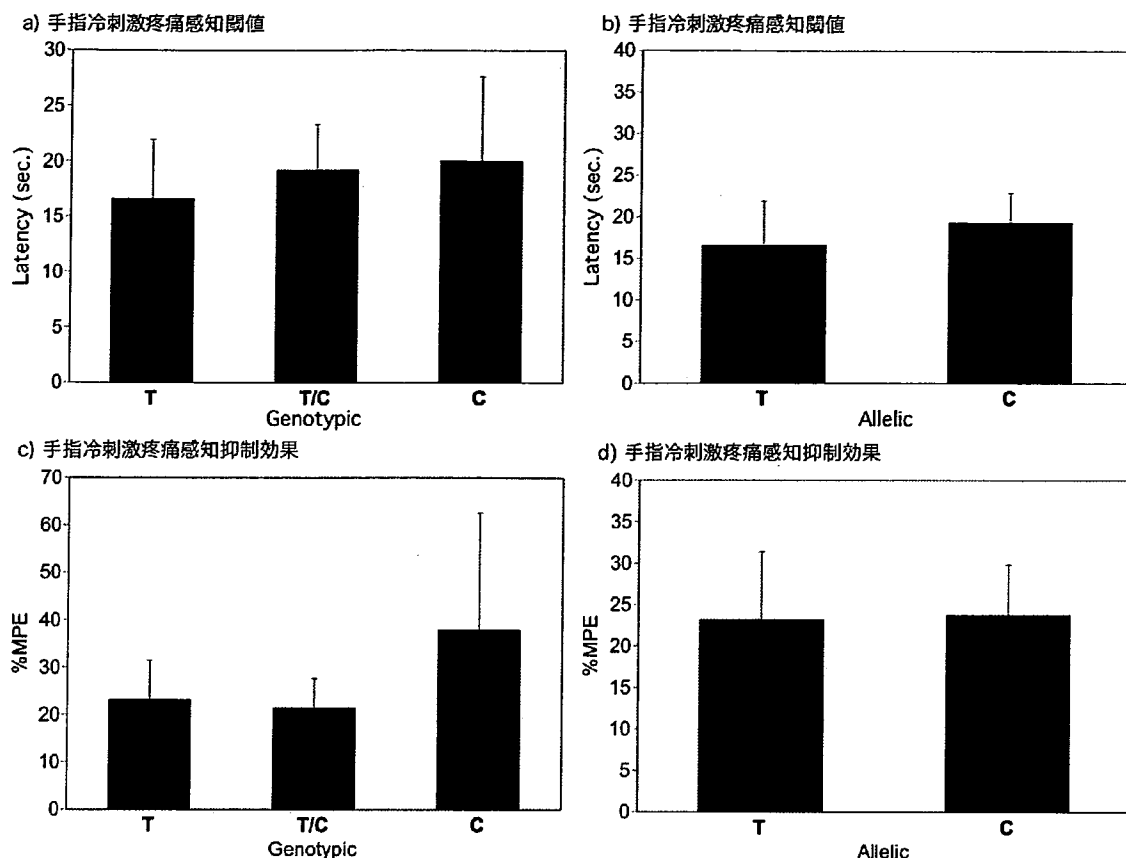


Fig. 4 痛覚感受性と *P2RX7* 上の SNP、T463C との相関性

T463C の遺伝子型と、薬物無処置時の手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間 (a,b)、並びにフェンタニル処置による手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間の延長効果 (%MPE) (c,d)の相関性を検討した。Allelic data (b,d) では C allele を持つ群 (TC,CC) と持たない群 (TT) で分類し解析を行っている。各データは平均±標準誤差で表している。

次に、術中・術後疼痛の抑制に必要なであったフェンタニルの総投与量 (Fig. 5a) 並びに術後 24 時間以内に必要であったフェ

ンタニル投与量 (Fig. 5b) に関して、T463C の遺伝子型との相関性を検討したが、各遺伝子型間で除痛に必要なであったフェンタニル量に有意な差は見られなかった。また、術後 3 及び 24 時間後にフェンタニルによる除痛下での痛みの強さを VAS を用いて検討したところ、CC 遺伝子型のサンプルで疼痛抑制効果が高い傾向は見られたものの、各遺伝子型間で有意な差は見られなかった (Fig. 5c,d)。

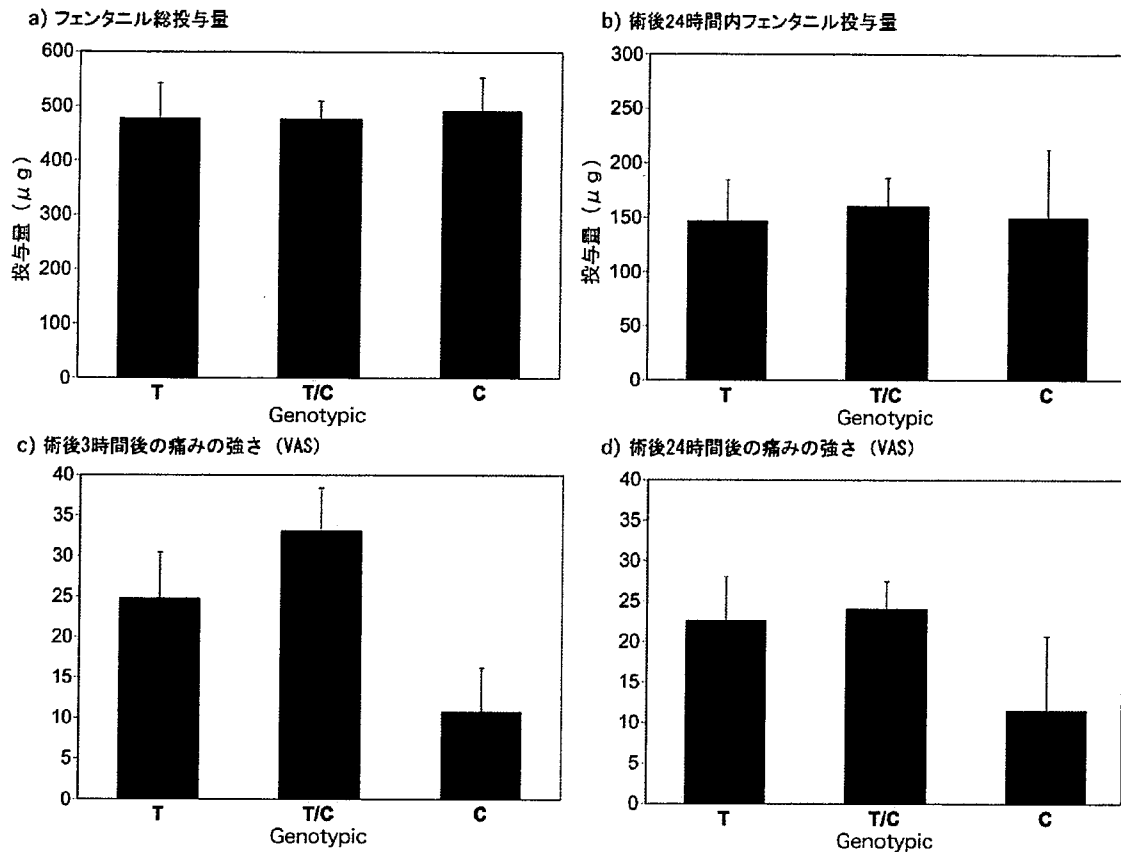


Fig. 5 術後疼痛制御に必要であった鎮痛薬量、並びに除痛下での痛みの強さと P2RX7 上の SNP、T463C との相関性

T463C の遺伝子型と、術中・術後に除痛に必要であったフェンタニルの総投与量 (a)、術後 24 時間以内のフェンタニル投与量 (b)、並びに術後 3 及び 24 時間後の痛みの強さ(c,d)の相関性を検討した。VAS は患者が考え得る最大の痛みを 100 とした際の、各時点での痛みの強さである。各データは平均±標準誤差で表している。

・東大医科研病院・東邦大佐倉病院の症例サンプルを用いた痛覚感受性との相関解析  
外科開腹手術を受けて麻薬による術後硬膜外鎮痛を受けた 125 症例に関して、術後

の疼痛治療に必要とされた鎮痛薬量、並びに術後 24 時間内の鎮痛薬必要回数を T463C の各遺伝子型間で比較をしたところ、いずれの項目に関しても遺伝子型と有意な相関性を示さなかった。(Fig. 6a-e)。さらに、除痛下の患者における痛みの強さを、患者自身に 5 段階で評価させたアンケート結果に関しても同様に解析を行ったが、各遺伝子型間で有意な差は確認されなかった (Fig. 6f)。

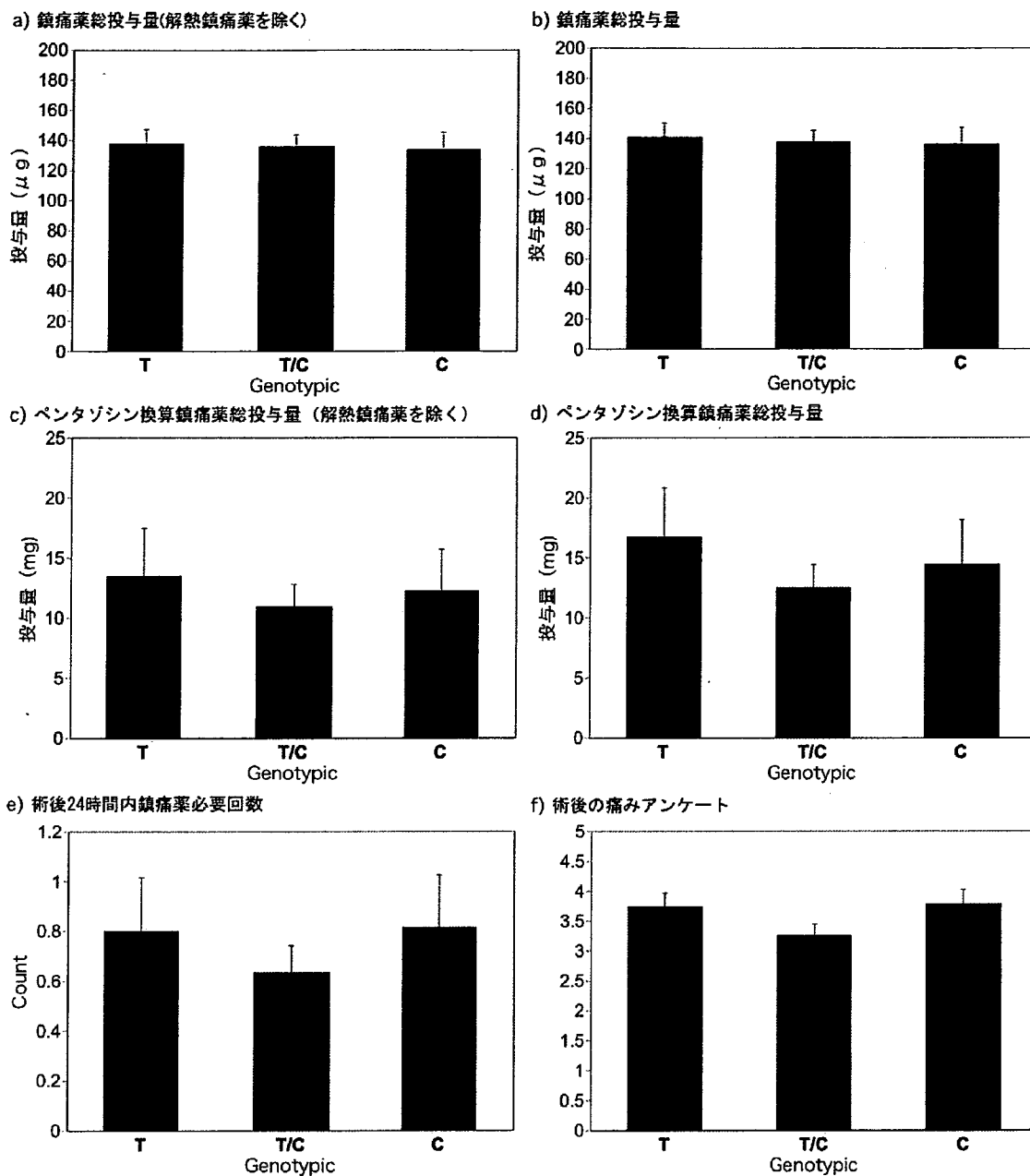


Fig. 6 術後疼痛制御に必要であった鎮痛薬量、並びに除痛下での痛みの強さと *P2RX7* 上の SNP、T463C との相関性

T463C の遺伝子型と、術中・術後に除痛に必要であった鎮痛薬の総投与量 (解熱鎮痛薬を除いたもの (a) と含めたもの (b))、使用した鎮痛薬をペンタゾシン換算した際の鎮痛薬総投与量 (解熱鎮痛薬を除いたもの

(c) と含めたもの (d))、術後 24 時間内に除痛のため鎮痛薬投与が必要であった回数 (e)、並びに術後疼痛の除痛下での各患者の痛みの強さのアンケート結果 (5 段階評価) との相関性を検討した。各データは



平均±標準誤差で表している。

#### D. 考察

今回の研究において、日本人における *P2RX7* 上の SNP、T463C の多型頻度は 44.6% であった。本多型は、*P2RX7* 上の他の高頻度多型と連鎖不平衡の関係にあるため (13,14)、今後、*P2X<sub>7</sub>* 受容体が痛覚感受性を含めた疼痛治療のみならず、種々の疾患・症状に影響を与えているのかを検討する上で、重要なマーカーになると考えられる。これまでに、*P2RX7* 遺伝子多型と双極性の情動障害やうつ病などの精神疾患との相関性が報告されているものの (15-17)、*P2RX7* を含め ATP 受容体サブタイプ遺伝子に関して、痛覚感受性や痛覚抑制機構に関しての相関性解析は殆ど為されておらず、今後これらの研究を進めることで非常に重要な知見を得ることが出来ると考えられる。

健常者のサンプルを用いて解析したところ、C allele を有する群は TT 遺伝子型群と比較して、冷刺激により痛みを感知するまでの時間が長いことが明らかとなり、冷刺激による疼痛感受性と T463C 多型の間に有意な相関性が存在することが明らかとなった。同様の解析を東京歯科大病院の患者に関して行ったところ、有意ではないもののやはり C allele を有する群で冷刺激誘発の疼痛に対して耐性が高い傾向が確認された。東京歯科大病院のサンプル数は今回 40 例と少数であったため、今後例数を増やしていき、この傾向が有意であるか確認する必要がある。一方で、圧刺激誘発疼痛感受性に関しては、各遺伝子型間で有意な差は確認されず、*P2X<sub>7</sub>* 受容体が冷刺激誘発の疼痛感受性に対して選択的に関与している可能

性が示唆される。

下顎骨切り術、並びに外科開腹手術後にオピオイドを用いた除痛処置を行った患者において、その疼痛治療に必要であった鎮痛薬の処方量・回数、並びに除痛時の痛みの強さ (VAS 並びに痛みに関するアンケート) と T463C の遺伝子型間の相関性を検討したところ、いずれの項目に関しても有意な相関性を示さなかった。このことは、*P2X<sub>7</sub>* 受容体はオピオイドによる鎮痛作用機序に対し影響を殆ど有さない可能性を示唆している。

*P2X<sub>7</sub>* 受容体は、中枢および末梢の免疫系細胞に主として発現し、それらの機能を担うことが知られているが、近年ではラット脊髄後根神経節の末梢グリア細胞に発現していることが確認され、末梢での痛覚伝達に関与する可能性が示されていた (18)。また、*P2X<sub>7</sub>* 受容体アンタゴニストの処置や *P2X<sub>7</sub>* 受容体遺伝子欠損により神経因性疼痛や炎症性疼痛が減弱することも報告されている (19-21)。今回の結果から、冷刺激に対する関与が示唆されたが、今後、本多型の神経因性疼痛並びに炎症性疼痛に関しての関与の有無を検討することは非常に重要な知見を提供すると考えられる。

#### E. 結論

ATP 受容体は、生体内において種々の薬理作用を調節する神経伝達を担っていることが明らかとなってきており、痛覚の発生並びにその情報伝達制御における役割を明らかにしていくことが期待される。今回の研究では、*P2X<sub>7</sub>* 遺伝子多型 T463C が、冷刺激誘発の疼痛感受性との間に相関性を有することを示した。*P2X<sub>7</sub>* 受容体は冷刺激によ

る痛みの発生ないし末梢の痛覚情報伝達制御に関与するものの、圧刺激誘発疼痛やオピオイドによる疼痛制御機構には影響が少ないことを示唆している。今後、さらに種々の痛みを持つ症例に加え、他の ATP 受容体サブタイプの遺伝子多型と、痛覚感受性、並びにオピオイド投与時の鎮痛作用や副作用との相関性を検討することで、テーラーメイド疼痛治療法の開発にあたり、非常に有用な知見を提供すると考えられる。

### 3. 参考文献

- 1) Becker, A., Grecksch, G., Kraus, J., et al.: Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 365(4):296-302, 2002.
- 2) Contarino, A., Picetti, R., Matthes, H.W., et al.: Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 446(1-3):103-109, 2002.
- 3) Hall, F.S., Sora, I., Uhl, G.R.: Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 154(1):43-49, 2001.
- 4) Bergen, A.W., Kokoszka, J., Peterson, R., et al.: Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol. Psychiatry*, 2(6):490-494, 1997.
- 5) Bond, C., LaForge, K.S., Tian, M., et al.: Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(16):9608-9613, 1998.
- 6) Franke, P., Wang, T., Nothen, M.M., et al.: Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am. J. Med. Genet.*, 105(1):114-119, 2001.
- 7) Gelernter, J., Kranzler, H., Cubells, J.: Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol. Psychiatry*, 4(5):476-483, 1999.
- 8) Sander, T., Gscheidel, N., Wendel, B., et al.: Human mu-opioid receptor variation and alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22(9):2108-2110, 1998.
- 9) King, M.A., Bradshaw, S., Chang, A.H., et al.: Potentiation of opioid analgesia in dopamine2 receptor knock-out mice: Evidence for a tonically active anti-opioid system. *J. Neurosci.*, 21(19):7788-7792, 2001.
- 10) Rouge-Pont, F., Usiello, A., Benoit-Marand, M., et al.: Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: Crucial control by D2 receptors. *J. Neurosci.*, 22(8):3293-3301, 2002.
- 11) Smith, J.W., Fetsko, L.A., Xu, R., et al.: Dopamine D2L receptor knockout mice display deficits in positive and negative reinforcing properties of morphine and in avoidance learning. *Neuroscience*, 113(4):755-765, 2002.
- 12) Sawynok J. : Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 177:309-28, 2007
- 13) JSNP: a database of common gene variations in the Japanese population. *Nucleic Acids Research*, 30:158-162, 2002.

- 14) Haga H., Yamada R., Ohnishi Y., et al. : Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project : identification of 190,562 genetic variations in the human genome. *Journal of Human Genetics*, 47(11):605-610, 2002.
- 15) Erhardt A., Lucae S., Unschuld PG., et al. : Association of polymorphisms in P2RX7 and CaMKKb with anxiety disorders. *J Affect Disord.*, 101:159-169, 2007.
- 16) Lucae S., Salyakina D., Barden N., et al. : P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet.*, 15(16):2438-45, 2006.
- 17) Barden N., Harvey M., Gagne B., et al. : Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*, 5;141(4):374-382, 2006.
- 18) Zhang XF., Han P., Faltynek CR., et al. : Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglia. *Brain Res.*, 1052(1):63-70, 2005.
- 19) Honore P., Donnelly-Roberts D., Namovic MT., et al. : [N-(1-((cyanoimino) (5-quinolinylamino) methyl) amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxy phenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.*, 319(3):1376-1385, 2006.
- 20) Chessell IP., Hatcher JP., Bountra C., et al.: Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain.*, 114(3):386-396, 2005.
- 21) Dell'Antonio G., Quattrini A., Cin ED., et al.: Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP. *Arthritis Rheum.*, 46(12):3378-3385, 2002.
- 【研究業績】
- (1) 論文発表
- 1) 井手聡一郎, 笠井慎也, 池田和隆 : 医療用麻薬の鎮痛薬の個人差. *日本神経精神薬理学雑誌*, 28: 43-48, 2008.
- 2) Ide S., Minami M., Ishihara K., et al.: Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology* 51: 651-658, 2006.
- 3) Ide S., Kobayashi H., Ujike H., et al.: Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J* 6: 179-188, 2006.
- 4) Kasai S., Han W., Ide S., et al.: Involvement of the 3' non-coding region of the mu opioid receptor gene in morphine-induced analgesia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 60 Suppl 1: S11-7, 2006.
- 5) Kobayashi H., Hata H., Ujike H., et al.: Association analysis of delta-opioid receptor gene polymorphisms in methamphetamine dependence/psychosis. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 141(5): 482-6, 2006.
- 6) Ikeda K., Ide S., Han W., et al.: How individual sensitivity to opiates can be predicted by gene analyses. *Trends in Pharmacological Science* 26(6): 311-317,

2005.

7) 井手聡一郎, 南雅文, 佐藤公道, et al.: 報酬効果と鎮痛効果の異なる作用機序. 日本薬理学雑誌 125(1): 11-15, 2005.

8) Ide S., Han W., Kasai S., et al.: Characterization of the 3' untranslated region of the human mu-opioid receptor (MOR-1) mRNA. *Gene* 364:139-45, 2005.

9) 池田和隆, 大谷保和, 西澤大輔, et al.: モルヒネ感受性の遺伝子解析. 日本臨床 63 増刊号 12: 463-466, 2005.

10) 曾良一郎, 渡邊秀和, 井手聡一郎, et al.: モルヒネの効き、副作用のでかたは個人で異なるか?. 患者の疑問に答えるオピオイドの要点 (真興交易(株)医書出版部): 53-60, 2005.

## (2) 学会発表

1) 井手聡一郎, 南雅文, 石原熊寿 et al.:  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いた麻薬拮抗性鎮痛薬の抗侵害受容作用の評価、第 28 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、札幌、8 月 31 日、2007.

2) 井手聡一郎, 南雅文, Uhl, G.R. et al.:  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いたブトルファノールの抗侵害受容作用の評価、第 80 回日本薬理学会年会、名古屋、3 月 15 日、2007.

3) 井手聡一郎, 南雅文, Uhl, G.R. et al.:  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスにおけるペンタゾシンの抗熱性・機械性侵害受容効果の消失と抗化学性侵害受容効果の維持、第 79 回日本薬理学会年会、横浜、3 月 10 日、2006.

4) 井手聡一郎, 南雅文, Uhl, G.R. et al.:  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いた

ブプレノルフィンとトラマドールの鎮痛・報酬効果の解析、日本薬学会第 126 年会、仙台、3 月 28 日、2006.

5) Sora, I., Ide, S., Minami, M., et al.: Exclusive expression of  $\mu$ -opioid receptors in noradrenergic neurons reverses the decrements in stress responses noted in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. 、International Narcotics Research Conference. (INRC)、Annapolis、7 月 15 日、2005.

## (3) 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 「遺伝子多型検査によるテーラーメイド疼痛治療法の開発」3年間のまとめ

## 遺伝子多型検出法の確立

分担研究者：古閑 比佐志

研究協力者：柳川 俊英

(財団法人 かずさDNA研究所 ヒトゲノム研究部 ゲノム医学研究室)

### 1. 研究目的

最終目標であるテーラーメイド疼痛治療を可能とする遺伝子検査キットの開発に先立ち、コストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法を開発することを目的として、この3年間本研究事業に従事してきた。

### 2. 研究方法とその結果

初年度である平成17年度においては、一分子蛍光検出法を利用した遺伝子多型検出法が、上記要件を満たした検出法となりうるかを、 $\mu$ オピオイド受容体1 ( $\mu$ OR1)の複数の多型領域をターゲットとして検証を行った。

一分子蛍光はオリンパス社の1分子蛍光分析システム MF20 で検出したが、具体的には sequence specific primer (SSP)-PCR 法により導入した異なる蛍光分子を、蛍光相関分光法(FCS: 約1フェムトリットル中で増幅した蛍光ラベルプライマーの1分子レベルの並進拡散時間を計測する)で解析した(図1)。FCS法は分子間相互作用などによって分子サイズが4倍以上変化する反応に適し、溶液中の3つの分子種について同時にデータ取得が可能である。対象としたのは $\mu$ OR1の多型の内、LD blockを代表すると考えられる5つのSNPs (A118G, G691C, G5953A, A8449G, A2109G)である。その結果、3つのSNPs (A118G, G691C, G5953A)に関してはほぼ至適条件の調整が可能で、97%以

上のサンプル(約650検体中)でシーケンス解析での結果を再現できた。2つのSNPs (A8449G, A2109G)に関しては、プライマーのデザインが困難で解析を断念した。HapMap Project(国際ハップマップコンソーシアムによるヒトゲノム上に存在する頻度の高い多型についての公共データベース作成プロジェクト)の日本人 Allele frequencyと比較しても、我々の結果はHapMap Projectのそれと比べて近時した結果であった。この点からも検出方法の信頼性が確認できた。

一分子蛍光検出法の検出機器は高価なことから、サンプルを一施設に集約して解析せざるを得ない。そこで平成18年度は、卓上の家庭用スキャナーがあれば、誰でもどこでもSNPsを検出可能な系を構築するため、MPEX(Multiple Primer Extension)法を改良することとした。

MPEX法は住友ベークライト株式会社のplastic基盤であるS-BIOにSNPs特異的オリゴを固相化し、基板上で伸長反応を行わせるというものである。本来は基板上で増幅反応も行なえるよう開発されたが、感度を高めることで基板上での増幅を行わずとも、肉眼で呈色反応を検出可能な系を構築し、modified MPEX法とした(図2)。この手法を用い、96 well plateの1 wellに $\mu$ OR1のLD blockを代表すると考えられる5つのSNPs (A118G, G691C, G5953A, A8449G, A2109G)に対応するオリゴ全てを固相化し、解析を行なった。これらの

SNPs は平成 17 年度、一分子蛍光法で判定しているので、その結果とも照合し、検出方法の信頼性を検証した。

その結果、一分子蛍光検出法で検出できなかった SNP A2109G を含む 4 つの SNPs で、再現性のある判定結果を得た。その再現性は 88 検体 352SNPs を用いた解析で 98%以上であった。1 つの SNPs (A8449G) に関して、一分子蛍光法の時と同様に、AT rich な配列のためプライマーのデザイン自体が困難であることが不成功の原因でと考えた。

この結果を踏まえ、平成 19 年度は modified MPEX 法にさらに改良を加えることとした。我々の方法では基盤上にサンプルをアプライする前に、別プレートで PCR により増幅反応を行なっている。この手法では、 $\mu$  OR1 に対する 4 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A, A2109G) を解析する際、増幅反応はそれぞれの SNPs に対して別々に行なわなければならない。このことは操作を煩雑にさせ、またコストパフォーマンスの面からも、改善の余地があった。そこで、これら 4 つの SNPs を multiplex PCR を用いて一度に前処理する系での解析が可能かどうか検討した。最終的に、SNPs 判定が正しかったかは前年度までにダイレクトシーケンスや一分子蛍光法、MPEX 法で判定した結果と照合し、その検証を行なった。

multiplex PCR 成功のために、以下のような項目を検討し最適条件を決定した。1) 鋳型の濃度：0.5-19.75 ng の範囲においては濃度に依存しない系を確立、2) polymerase：Multiplex PCR Mix (タカラバイオ株式会社) が最適、3) Primer 濃度：最終濃度が G5953A, A2109G(1.0  $\mu$  M)、C691G, A118G (0.2  $\mu$  M)、4) PCR 条件 (温度、サイクル数等)：サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice Model TP600) で行い、反応ステップは Step1: 94°C 60 秒, Step 2: 94°C 30 秒, 54.0°C 90 秒, 72°C 90 秒 Step 2 は 40 サイクル Step 3: 72°C 10 分で PCR 反応を行う。5) PCR 後の処理(残存 primer の

除去条件等)：昨年度と同様、PCR 産物精製キット (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) を使用して精製を行なうが、80%エタノールでの洗浄操作を加えることで primer の除去をより効果的にした。実際の PCR 産物のアガロースゲル上での泳動像を図 3 に示すが、均等な増幅が multiplex に行なわれているのがわかる。

SNPs 判定結果に関しては、残念ながら個別増幅に比較してその精度はやや落ちるようであるが、multiplex PCR の適応自体はほぼ成功した。

### 3. 考察

初年度において一分子蛍光検出法を選択したのは 1) 生体内に近い環境下で分子間相互作用を解析可能: 分子移動が自由な溶液中での計測 2) 固相化・洗浄が不要: 溶液のまま計測可能 3) 短時間での計測: 0.5 秒から数十秒の計測 4) 共焦点レーザ光学系による蛍光計測: 有色サンプル、蛍光ノイズに強い 5) 少量のサンプルで、全回収可能: 1 nM のサンプルが 50  $\mu$  l = 50 fmol 6) 異なる波長を検出可能: 488nm、543nm、633nm などの理由からである。

これらの特性は、384 ウェルベースでの解析を可能とし、至適条件の確立によってはコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法を確立させうる事が明らかとなった。しかし、班会議において特別なインフラの必要な点が欠点として指摘された。

この指摘を受け、平成 18 年度は MPEX 法の改良に取り組んだわけだが、インフラ整備が不要な外に以下に挙げるような利点もあることを明らかにできた。

1) 一分子蛍光検出法で判定困難であった SNP の同定 2) 一度に複数の SNPs を解析可能 3) コストパフォーマンスが高いなどである。ただ一分子蛍光検出法と同様 primer base の解析であるため、プライマー設計において AT の繰り返し配列が存

在するとその設計が困難であるという問題点は残った。また各 SNP に対して個別に増幅をかけねばならない点は、どうしても改善が必要と思われた。

そこで最終年度は multiplex PCR で前処理することで、modified MPEX 法の前記問題点を克服することを目指した。multiplex PCR の成功は手技の簡略化に留まらずコストパフォーマンスの更な

る改善ももたらした。SNPs に適切な固相化用 primer も決定できたので (A118G : F, G691C : F, G5953A : F/R, A2109G : R)、今後は GIRK チャネル、CYP2D6 などの他の疼痛関連遺伝子も、同一の well 内で解析できるよう、アッセイ系の更なる最適化に努めたい。

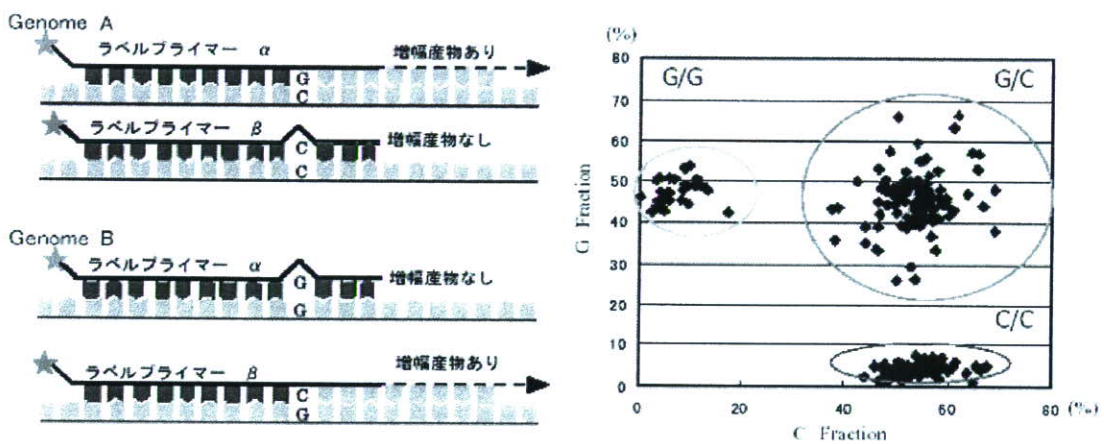


図 1 sequence specific primer (SSP)-PCR 法の概略図(左)と、タイピング解析例(右)

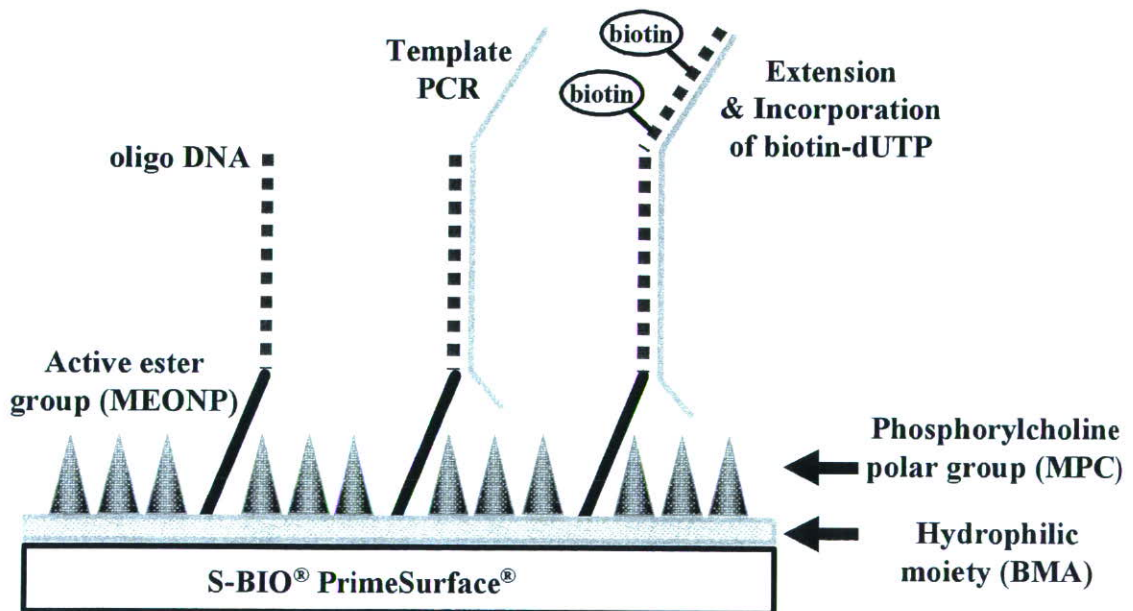


図2 S-BIO® PrimeSurface®を用いた modified MPEX (Multiple Primer EXtension)法の概略図:5'端のアミノ化した C6 と S-BIO®表面の活性化したエステル基を介してプライマーを固相化した。この基盤上で nucleotides (dNTP) と *Taq* DNA polymerase の存在下 SNPs 特異的伸長反応を行なわせる。

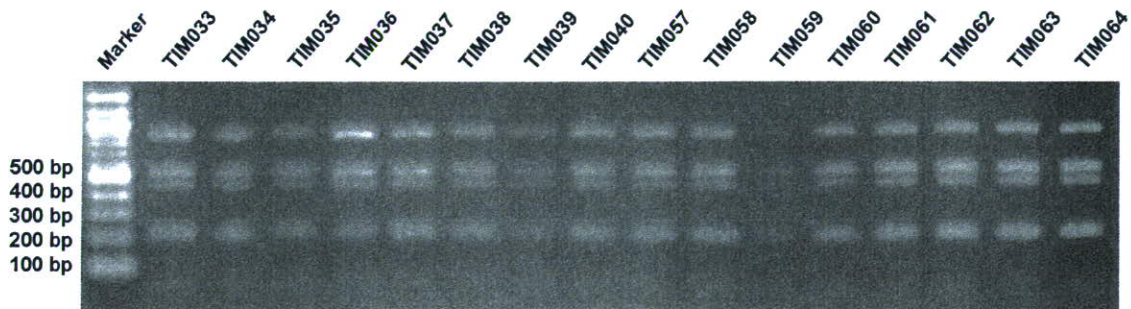


図3 multiplex PCR の産物の 2% agarose gel 上での泳動像:PCR 反応が終わった産物を 2  $\mu$ l (1/10 vol.)使  
いアガロースゲル電気泳動で確認を行なった。アガロースゲルは2%のゲルを使用し、100Vで30-40分  
泳動後、エチジウムブロマイドで30分染色をして、トランスイルミネーター上で検出した。

【研究業績】

(1)論文発表

- 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., pp149-182, 2007.
- 2 古閑比佐志、抗体マイクロアレイ、「マイクロアレイ・バイオチップの最新技術」、著書(分担、シーエムシー出版), pp218-228, 2007.
- 3 古閑比佐志、タンパク質間相互作用をターゲットとした新薬開発の戦略、生体の科学 増大特集「タンパク-タンパク相互作用」58, pp494-495, 医学書院, 2007.
- 4 古閑比佐志、抗体マイクロアレイ開発の現状と展望、実験医学増刊号「癌診断研究の最前線」25, pp149-156, 羊土社, 2007.
- 5 Usui-Aoki K, Shimada K, Koga H, A novel antibody microarray format using non-covalent antibody immobilization with chemiluminescent detection. **Molecular BioSystems**, 3(1):36-42, 2007 Jan.
- 6 Imai K, Ogai Y, Nishizawa D, Kasai S, Ikeda K, Koga H. A novel SNP detection technique utilizing a multiple primer extension (MPEX) on a phospholipid polymer-coated surface. **Mol Biosyst**, 3(8):547-53, 2007 Aug.
- 7 Yamamoto H, Kamegaya E, Irago M, Hagino Y, Imai K, Fujikawa A, Tamura K, Enokiya T, Yamamoto T, Yakashima T, Koga H, Uhl GR, Ikeda K, Sora I. Genetic deletion of vascular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic



- neurons in primary culture. *Neurochemistry International*, 237-244, 2007.
- 8 Koga H, Establishment of the platform for reverse chemical genetics targeting novel protein-protein interactions. *Molecular BioSystems*, 2:159-164, 2006.
  - 9 島田希代、古閑比佐志, cDNAを利用した網羅的抗体作製法, バイオテクノロジージャーナル5, pp639-642, 2006.
  - 10 古閑比佐志, 使ってみよう! バイオデータベース 連載 第4回 GENSAT. 細胞工学25, pp179-182. 2006.
  - 11 古閑比佐志, 抗mKIAAウサギポリクローナル抗体の網羅的作製と蛋白質レベルでの発現解析への展開、和光時報Vol.74,No.3, pp8-10, 2006.
  - 12 Nagase T, Koga H, Ohara O, Kazusa Mammalian cDNA Resources: Towards Functional Characterization of KIAA Gene Products. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 5:4-7, 2006.
  - 13 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, pp23-33, 2006.
  - 14 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, 3676-3683, 2006.
  - 15 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*, 1073-1074:60-70, 2006.
  - 16 Ohara R, Knappik A, Shimada K, Frisch C, Ylera F, Koga H, Antibodies for Proteomic Research: Comparison of Traditional Immunization with Recombinant Antibody Technology. *Proteomics*, 6:2638-2646, 2006.
  - 17 Oh-hashii K, Hirata Y, Koga H, Kiuchi K, GRP78-binding protein regulates cAMP-induced glial fibrillary acidic protein expression in rat C6 glioblastoma cells. *FEBS Letters*, 580:3943-3947, 2006.
  - 18 Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, Akira S, Iwamatsu A, Koga H, Murakami M, Hirano T. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J*, 25:4108-4119, 2006.
  - 19 Yamamoto H, Imai K, Kamegaya E, Takamatsu Y, Irigoien M, Hagino Y, Kasai S, Shimada K, Yamamoto T, Sora I, Koga H, Ikeda K. Repeated Methamphetamine Administration Alters Expression of the NMDA Receptor Channel {varepsilon}2 Subunit and Kinesins in the Mouse Brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1074:97-103, 2006 Aug.
  - 20 Murakami M, Shimada K, Kawai M, Koga H. InCeP: Intracellular pathway based on mKIAA protein-protein interactions. *DNA Res*. 12:379-387, 2005.
  - 21 Nakajima D, Saito K, Yamakawa H, Kikuno R, Nakayama M, Ohara R, Okazaki N, Koga H, Nagase T, Ohara O. Preparation of a set of expression-ready clones of mammalian long cDNAs encoding large proteins by the ORF trap cloning method. *DNA Res*, 12:257-267, 2005.
  - 22 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*, 12:181-189, 2005.
- 23 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.*, 77: 7115-7121, 2005.
- 24 Ozaki A, Nagase T, Watanabe A, Nakajima D, Shimada K, Nagano M, Ohara O, Koga H, Inamoto S. Utilization of mammalian cells for efficient and reliable evaluation of specificity of antibodies to unravel the cellular function of mKIAA proteins. *Gene*, 360:35-44, 2005.
- 25 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*, 364:114-122, 2005.
- 26 Shimada K, Nagano M, Kawai M, Koga H. Influences of amino acid features of glutathione S-transferase fusion proteins on their solubility. *Proteomics*, 5:3859-3863, 2005.
- 27 古閑比佐志、最新疾患プロテオミクス研究の現状と展望—かずさDNA研究所・地域結集型プロジェクト研究チーム、戸田年総、荒木令江、遺伝子医学Mook 疾患プロテオミクスの最前線-プロテオミクスで病気を治せるか-、メディカルドゥ、大阪、173-176、単著、2005。
- 28 古閑比佐志、cDNAプロジェクトから疾患プロテオミクスへの融合、戸田年総、荒木令江、遺伝子医学Mook 疾患プロテオミクスの最前線-プロテオミクスで病気を治せるか-、メディカルドゥ、大阪、354-360、単著、2005。
- 29 Koga H, Murakami M, Shimada K, Imai K, Kawai M, Usui-Aoki K, Miki F, Yuasa S, Inamoto S, Magae J, Okazaki N, Nagase T, Ohara O. InGaP and InCeP databases: A paradigm for identifying functions of mKIAA/KIAA proteins. *Amino Acids*. 29(1):51-52, 2005.
- 30 Imai K, Mimori T, Kawai M, Koga H. Microarray Analysis of Host Gene-Expression during Intracellular Nests Formation of Trypanosoma cruzi Amastigotes. *Microbiol Immunol*. 49(7):623-31, 2005.
- 31 Koga H, Izawa I, Araki N, Saya H, Mimori T. Observation of the intracellular behavior of recombinant Yersinia pseudotuberculosis invasin protein. *Microbiol Immunol*. 49(4):297-302, 2005.
- 32 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*. 5(9):2396-401, 2005.
- 33 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*. 137(1-2):40-6, 2005.

(2) 学会発表

- 34 H Koga, K Imai, K Fujimoto, A novel SNPs detection technique utilizing multiple primer extension (MPEX) on phospholipid polymer-coated surface, Lab-on-a-Chip World Congress、エジンバラ、2007年5月15日-5月16日
- 35 T Nagase, H Koga, O Ohara, Kazusa Mammalian Genome Resources: From Contents to Platform, International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 36 R Oose, T Nagase, O Ohara, H Koga, Functional prediction of KIAA genes by combination of two-dimensional gel electrophoresis and pathway-analysis、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 37 R Ohara, K Shimada, K Imai, S Yuasa, H Koga, The Precise Distribution of KIAA0445/Rootletin Protein in Mouse Brain-Possible Participation of Alternative Splicing in the Subcellular Localization-、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 38 Oh-hashii K, Araki T, Imai K, Shimada K, Ikeda S, Koga H, Hirata Y, Kiuchi K, Down-regulation of Transmembrane protein 132A contributes to ER stress responses and serum starved-cell death in Neuro2a cells、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 39 Yamamoto H, Kamegaya E, Takamatsu Y, Hagino Y, Tatsumi K, Yasumoto S, Yamamoto T, Mishina M, Koga H, Ikeda K, Phencyclidine-induced gene expression changes in the striatum of NMDA receptor  $\epsilon 4$  subunit knockout mice、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 40 Shimada K, Ohara R, Okazaki N, Ikeda S, Yanagawa T, Nagase T, Koga H, Establishment of the 'library' of antibodies to clarify transcriptional network、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 41 Okazaki N, Ikeda S, Ohara R, Shimada K, Yanagawa T, Koga H, Genome-wide analysis of SMARCAD1 (KIAA1122) targets by ChIP-on-chip、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 42 Mamada H, Shibano T, Hakuno F, Takahashi S, Koga H, Taira M, Analysis of a novel nuclear envelope protein, Nempl, in early Xenopus eye development、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 43 Yamakawa H, Tadokoro S, Nakajima D, Inoue S, Kikuno R, Koga H, Nagase T, Ohara O, Preparation of ORF Clones for Human Genes by a Restriction-Enzyme based High-Throughput Cloning Method、International Symposium on Advanced Functional Genomics、木更津、2007年10月11日-10月12日
- 44 古閑比佐志, 抗体マイクロアレイ、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月10日-12月15日
- 45 島田希代, 小原令子, 岡崎規理子, 池田俊, 柳川俊英, 長瀬隆弘, 古閑比佐志, 転写因子に対する抗体ライブラリーの構築、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会

- 大会 合同大会、横浜、2007年12月10日-12月15日
- 46 山川央、井上慎一、菊野玲子、中島大輔、古閑比佐志、長瀬隆弘、小原収、かずさORFeomeプロジェクト-FlexiクローニングシステムによるORF発現クローンの構築、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月10日-12月15日
- 47 村上正晃、守川英幸、古閑比佐志、長瀬隆弘、小原収、平野俊夫、亜鉛シグナル分子の網羅的スクリーニング、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月10日-12月15日
- 48 湯浅茂樹、前川素子、加藤怜子、相馬美歩、島田希代、小原令子、岡崎規理子、古閑比佐志、マウスKIAA長鎖cDNAがコードする蛋白質に対して網羅的に作製された抗体の神経科学研究への応用、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月10日-12月15日
- 49 大瀬壘、長瀬隆弘、小原収、古閑比佐志、二次元電気泳動をベースにしたKIAA遺伝子の機能予測システムの構築、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月10日-12月15日
- 50 Koga H, Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M, Antibody microarray is a expected tool to bridging the gap between gene and protein expressions, (シンポジウム) The International Conference on Proteomics:"Bridging the Gap Between Gene Expression and Biological Function"、ルクセンブルク、2006年10月10日-10月14日
- 51 Murakami M, Shimada K, Nagano M, Imai K, Okazaki N, Miki F, Inamoto S, Ohara R, Kikuno R, Nagase T, Ohara O, Koga H, InCeP: INTRACELLULAR PATHWAY BASED ON mKIAA PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS, Cold Spring Harbor; Meeting Name; SYSTEMS BIOLOGY: GLOBAL REGULATION OF GENE EXPRESSION, Cold Spring Harbor, New York, USA、2006年3月23日-26日 ポスター
- 52 Koga H, Usui-Aoki K, Kyo M, Inamoto K, CHIP-BASED MINIATURIZED FORMAT FOR PROTEIN EXPRESSION PROFILING, 10th International Symposium on Biochromatography, Lille France、2006年4月26日-28日 口演
- 53 Inamoto S, Watanabe A, Ozaki A, Watanabe M, Nankumo T, Shimada K, Nagano M, Koga H, Nakajima D, Nagase T, Ohara O, Taki K, Magae J, Kawakami Y, A set of comprehensively raised antibodies as a novel post-genomic tool to study endogenous mKIAA proteins, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、京都、2006年6月18日-23日 ポスター
- 54 Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M, Koga H, A protein expression analysis of mouse KIAA gene products using a noncovalently immobilized antibody microarray system, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、京都、2006年6月18日-23日 ポスター
- 55 Ozeki Y, Nogi A, Mizoguchi Y, Murakami M, Koga H, KeyMolnet Draw for InCeP (IntraCellular Pathway based on mKIAA protein-protein interactions) ~ The implementation of bidirectional communication system in the pathway database ~, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、京都、2006年6月18日-23日