

こうした付加体も考慮できるように、プロテオーム解析における付加体の網羅的解析に関する基礎的な検討を開始した。

まず最初に、既知の修飾の例として、ヘモグロビンの末端アミノ酸糖化ペプチド (HbA1c) の LC-MS による検出を試みた。ヒトおよびラットヘモグロビンサンプルを用いて、通常の LC-MS による解析を行い、Mascot による同定の際に、糖付加により予測される質量変化分を可変修飾として考慮して検索を行った結果、いずれの場合も、末端のバリン残基に糖修飾されたペプチド断片が同定された (図 14)。このペプチドは、対応する非修飾のペプチドと同じ溶出時間に検出されており、MS/MS スペクトルの帰属からも糖修飾ペプチドであることが確認された。

さらに、HbA1c と同様に血糖値のマーカーとなることが知られているアルブミンの糖修飾に関しても、ヒト尿サンプルデータを用いて網羅的な解析を行った結果、図 15 に示すように 10 種の糖化ペプチド候補が同定された。このうち、対応する非修飾ペプチドが確認された断片については、両者が同時に溶出していることが確認できた。これら以外の修飾に関しては、現在確認中である。

興味深いことに、これら検出された糖化ペプチドの量は個体差が大きく、図 16 に示したように特に発現の高い個体が肥満度の高いサンプルで観察された。さらに、これらと同じ個体差の挙動を示すペプチドがアルブミン以外のタンパク質の糖修飾ペプチドおよび非糖修飾ペプチドに観察された。

D. 考察：

高週齢の雄ラットに見られた個体差の要因になったタンパク質に関しては、精液と関連性のあるタンパク群が同定されたことより、尿中への精液の混入が示唆された。ラットの場合その混入のコントロールは難しいと考えられるため、実験には若いラットを用いることが望ましいと考えられる。

ヒト尿のプロテオーム解析により得られたデータは、ヒトでの個体差の大きさを示していたが、ラットが実験動物として比較的均一な遺伝的背景を持つことを考えると妥当な結果であるといえる。ただし、性差および年齢差を超えて個体間のばらつきの方が大きかった点は意外であり、この個体差の要因をつかむことが重要な課題となった。そのための一つの手がかりとして、肥満度による相関を調べたところ、性差、年齢差には認められなかったグループ化が主成分分析の第二主成分方向に認められたことより、ヒトの尿プロテオームに関する個体差の要因の一つとして、肥満

度が重要なファクターとなることが分かった。つまり、ヒト尿プロテオームにおいては、性差、年齢差以上に肥満度の差が個体差の原因となることが分かった。今後は肥満度の影響を受けにくいバイオマーカーの探索が重要であるとともに、主成分分析の第一成分方向に認められた個体差の要因の究明が課題である。

今年度より新たに修飾ペプチドを対象とした「プロテインアダクトーム解析」を立ち上げたが、糖化修飾をモデルとして、その確立にめどがついた。今後は糖化以外の修飾に関しても検討を行い、一般化を行いたい。また、今回検出された尿中の糖化ペプチドマーカーに関しては、新たな糖尿病の疾患マーカーとしての利用も期待でき、その有用性に関して検討を加えてゆきたい。

今回解析した糖付加においては、トリプシン消化部位であるリジンおよびアルギニン残基が反応のターゲットとなるため、修飾を受けたペプチドの消化が妨げられるという問題が生じた。このため、非修飾ペプチドとの比較が単純にできなくなるため、この点を改善するため他のアミノ酸を消化部位とする Glu-C プロテアーゼを用いた検討を行っている。

E. 結論

- ヒト尿プロテオームデータは、ラットに比べて個体差が大きい
- ヒトでは、性差、年齢差よりも肥満度により特徴的なプロファイルが認められた。
- バイオマーカーとしてのタンパクアダクトの検出法を確立した。
- 高週齢の雄ラットにおいては、精液の混入が原因と考えられる個体差が観察された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

誌上発表

- 1) 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 20-24. 2013
- 2) 中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子 ショットガンプロテオミクスによ

る加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 50-57. 2013

- 3) 鈴木孝昌 「網羅的な発現をみる マイクロアレイ解析との比較を例に」 実験医学別冊 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド (羊土社) 111-121. 2013

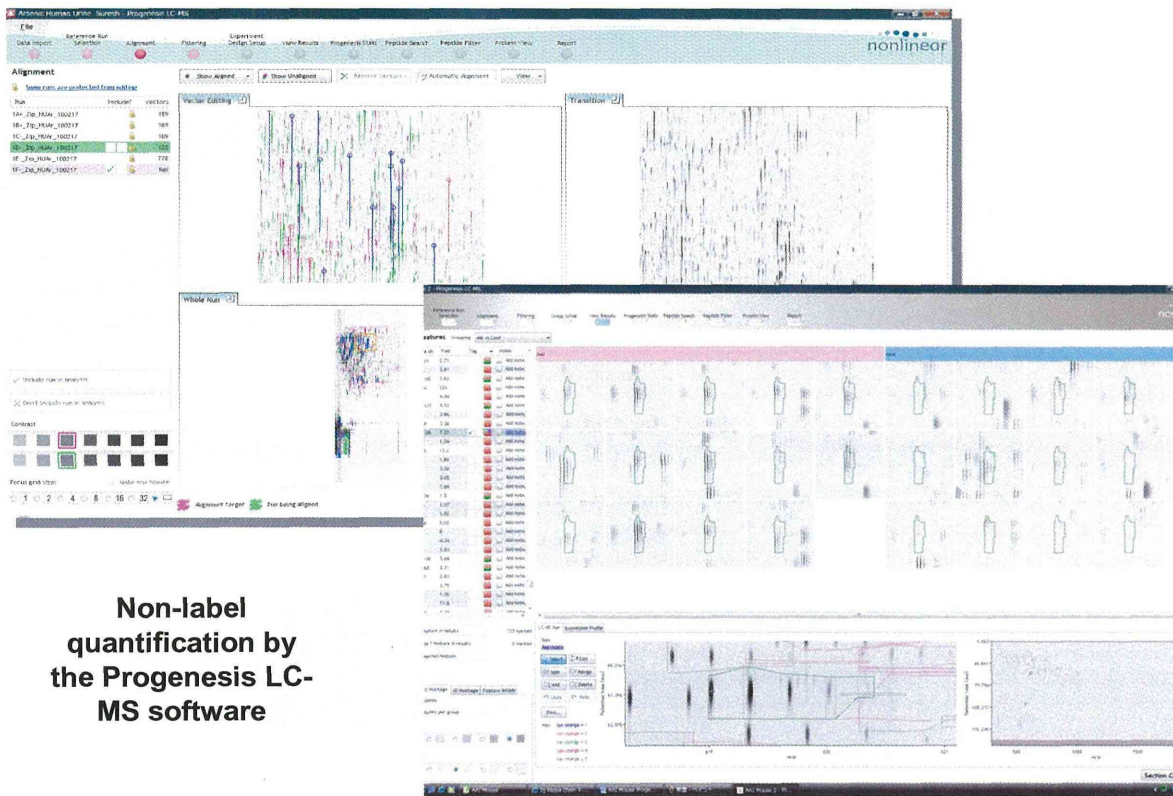
2. 学会発表

- 1) Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Improvement of Rat Urinary Proteomics by a Differential Precipitation of Proteins. Human Proteome Organization 12th World Congress (2013. 9) (横浜)
- 2) Suzuki T., Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y. Basic factors that influence the rat urinary proteome. 第13回国際毒性学会 (ソウル)
- 3) スレッシュ ティルパッティ、斎藤嘉朗、本間正充、佐藤陽治、鈴木孝昌 ヘモグロビンアダクトーム; 環境変異原に対する暴露マーカーとしての新しいアプローチ 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)
- 4) 降旗千恵、櫻井幹也、渡辺貴志、鈴木孝昌 Toxicogenomics/JEMS MMS V: クリセン投与48時間後までのマウス肝臓における遺伝子発現変化 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)

H. 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 特記事項なし

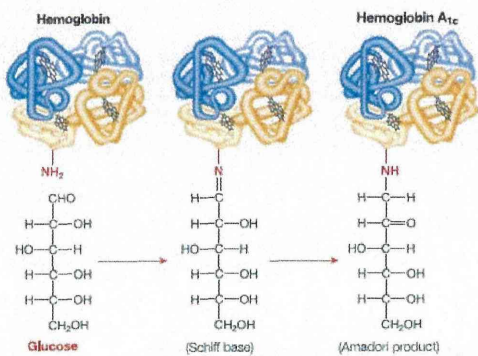
図1 Progenesis-LC/MSソフトウェアを用いた定量的プロテオーム解析



**Non-label
quantification by
the Progenesis LC-
MS software**

図2 タンパク質の糖化反応によるヘモグロビンおよびアルブミン付加体の形成

Human Hemoglobin A1c



Human Serum Albumin Glycation

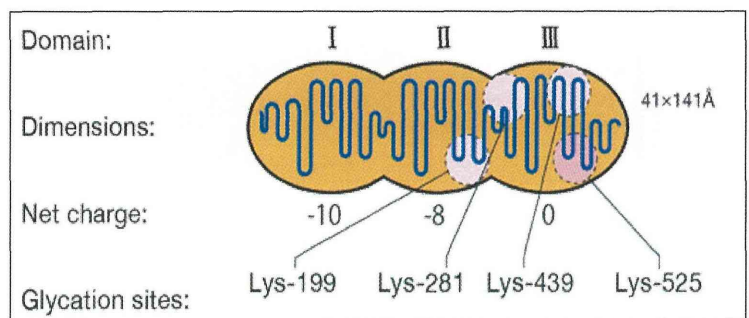


図3 ラット尿プロテオーム解析全データの主成分分析

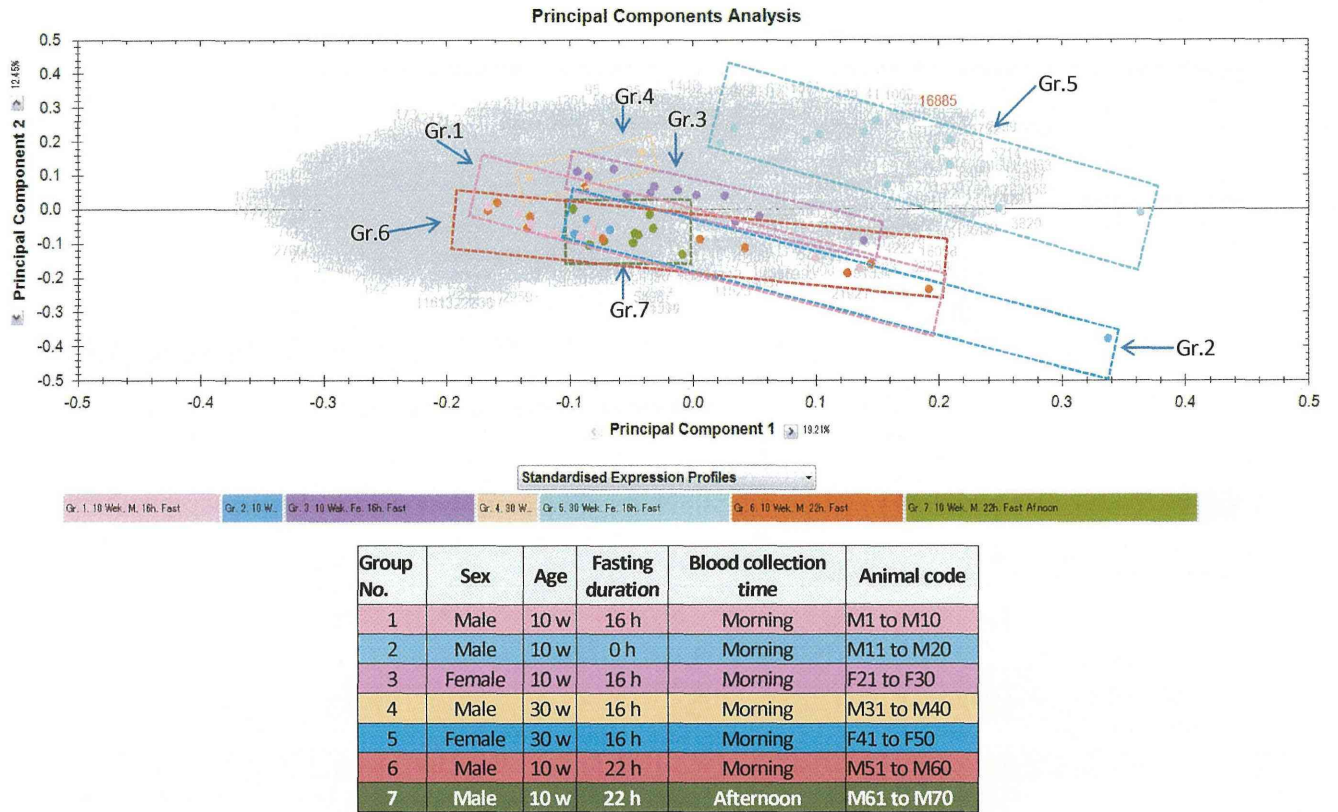


図4 30週齢雌雄ラット尿サンプルの解析データの主成分分析

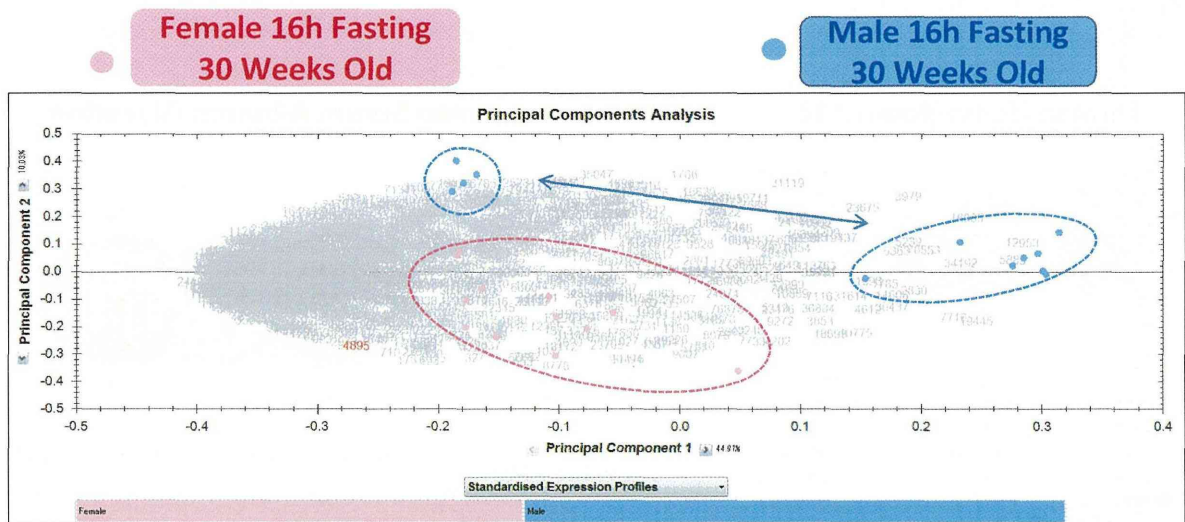
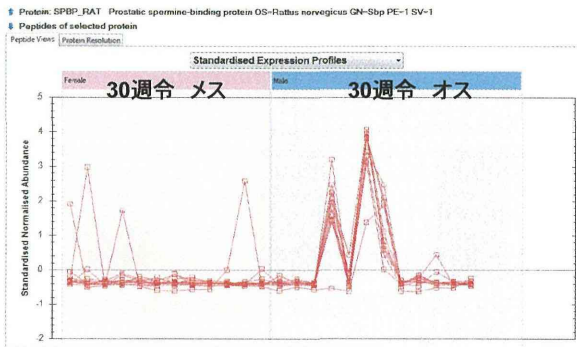


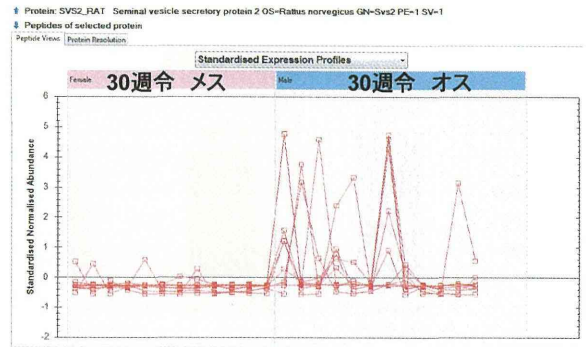
図5 30週齢雄ラットにおいてばらつきの原因となったタンパク質の同定



Prostatic spermine-binding protein

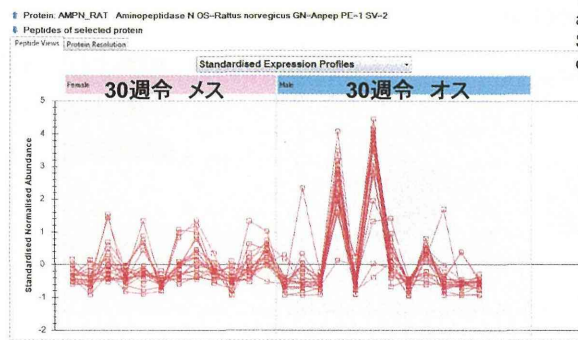
Spermine-binding protein is an androgen regulated ventral prostate glycoprotein that binds various polyamines

バラつきの要因となっていたタンパク質はいずれも精子(精液)に関係



Seminal vesicle secretory protein 2

The rat seminal vesicle contains six major androgen-dependent secretory proteins. The SVS II protein is a major component of the rat copulatory plug.



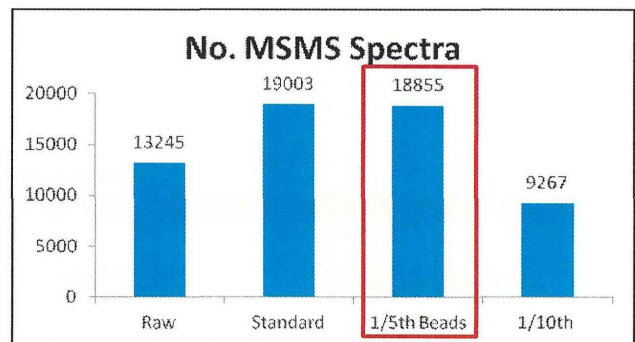
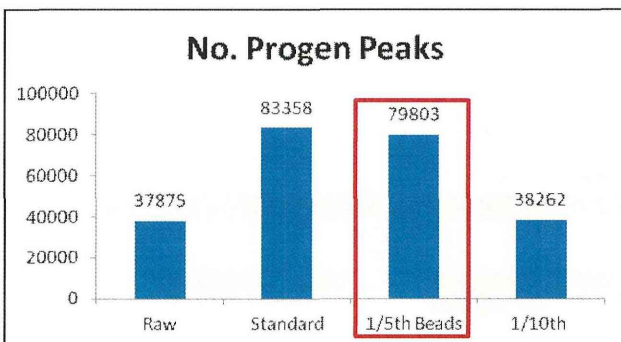
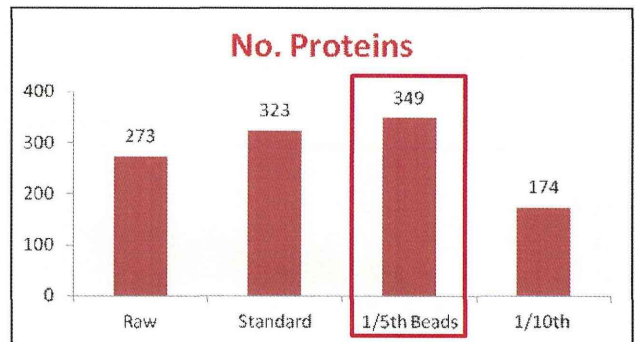
Amino peptidase N

Plays a role in the final digestion of peptides generated from hydrolysis of proteins by gastric and pancreatic proteases.

図6 ヒト血清に対する ProteoMiner 処理の影響

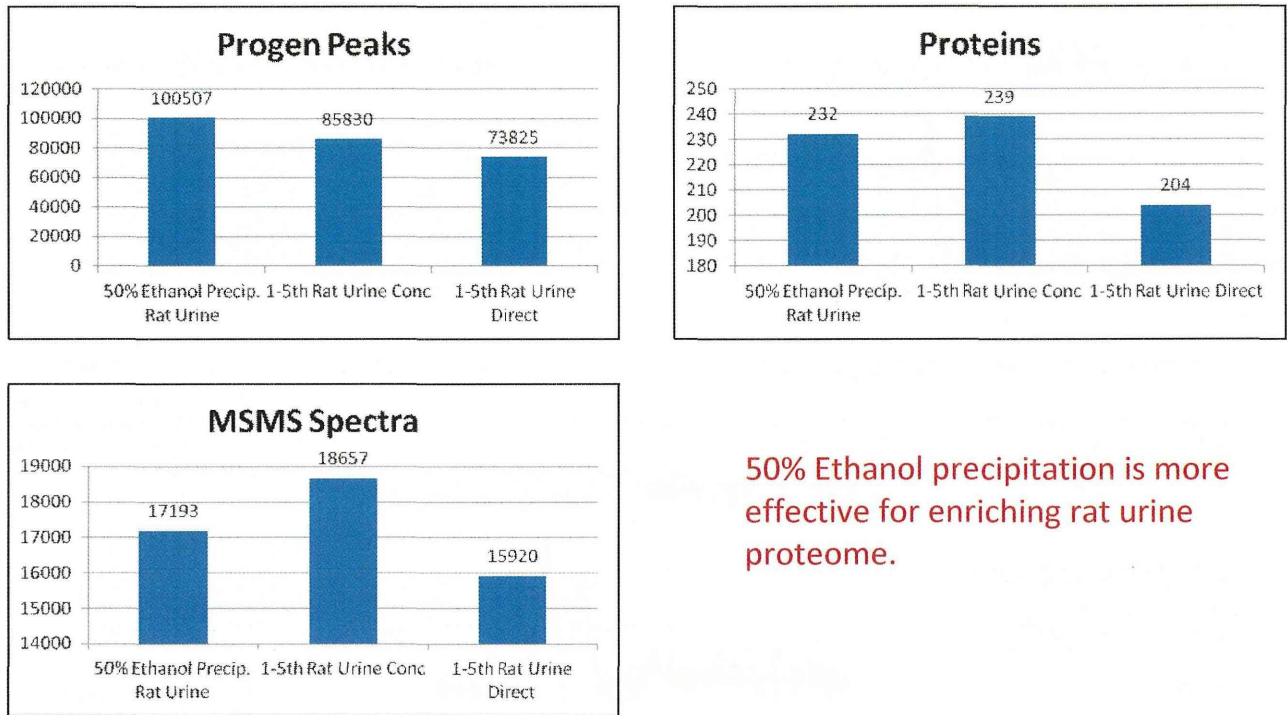
Trials were conducted with ProteoMiner with reduced amount of proteins and beads – 1/5th and 1/10th. To reduce the cost and sample requirement

1/5th amount was found to be effective for human serum



通常法(アセトン沈殿)に比べて、検出できる血清ペプチドの数が増加

図7 ラット尿サンプルに対する ProteoMiner 処理の影響



50% Ethanol precipitation is more effective for enriching rat urine proteome.

ラット尿に関しては我々が開発した50%エタノールによる方法のほうが有効

図8 ヒト尿サンプルプロテオーム解析データの主成分分析

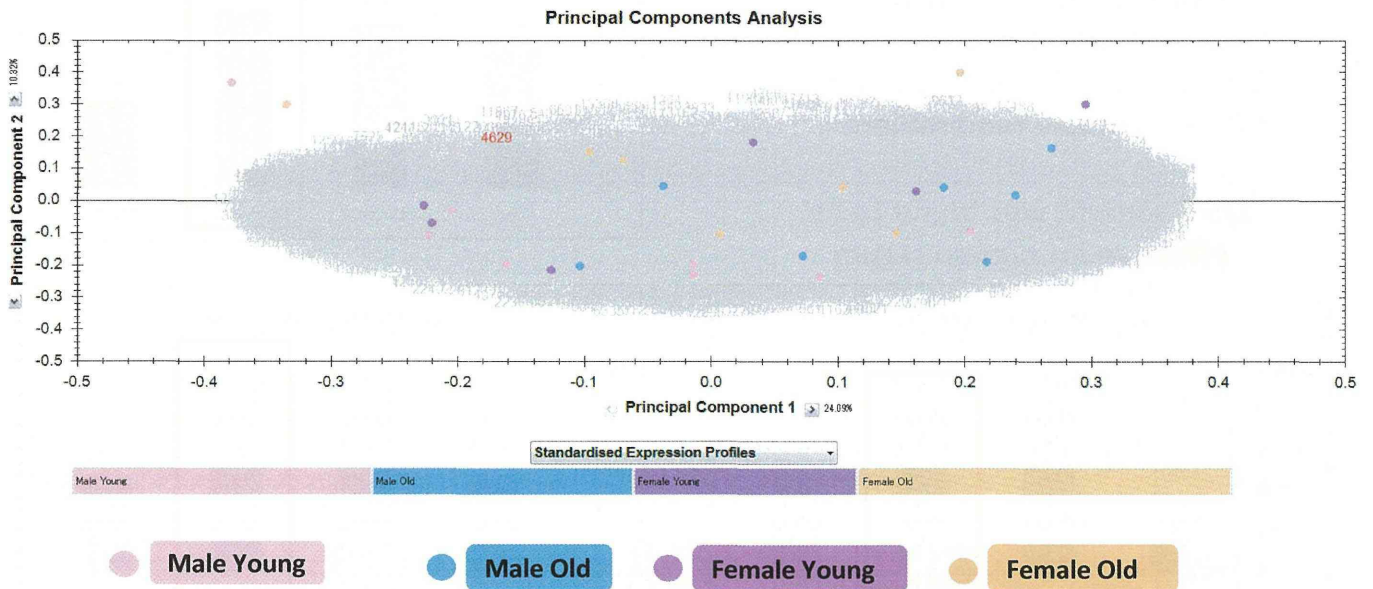


図9 肥満度によるヒト尿サンプルプロテオーム解析データの主成分分析結果の評価

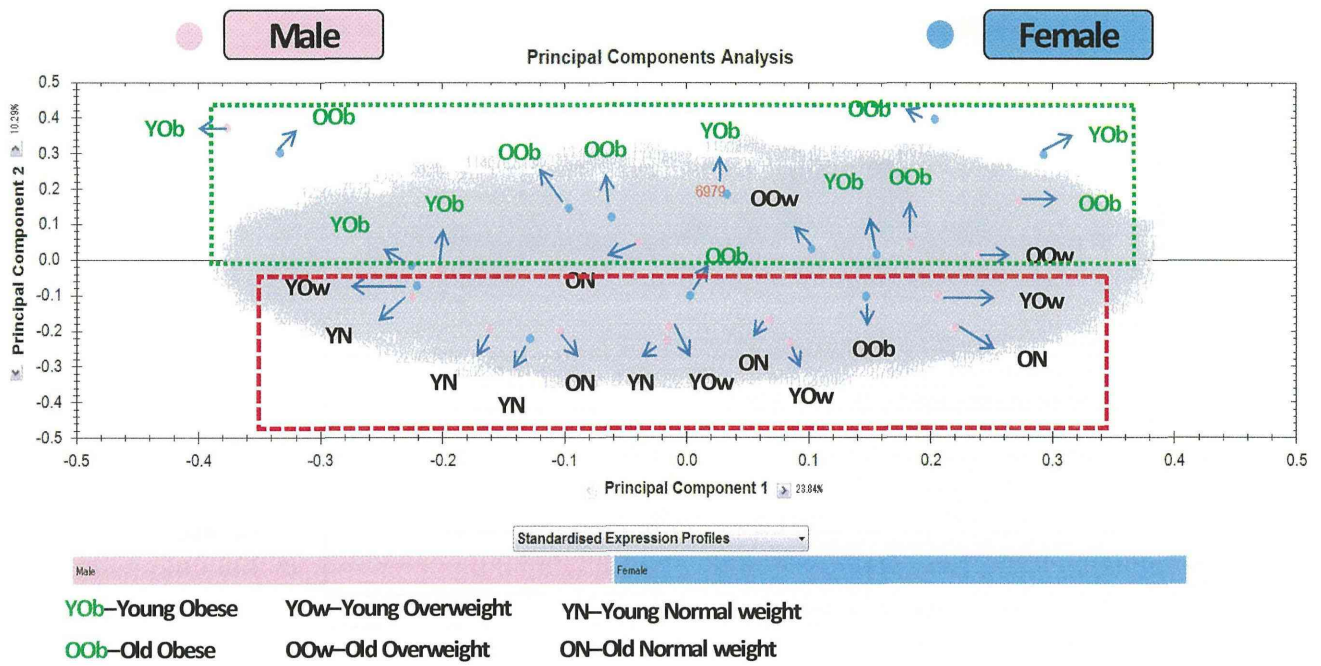


図10 ヒトおよびラット尿中のアルブミン発現量の比較

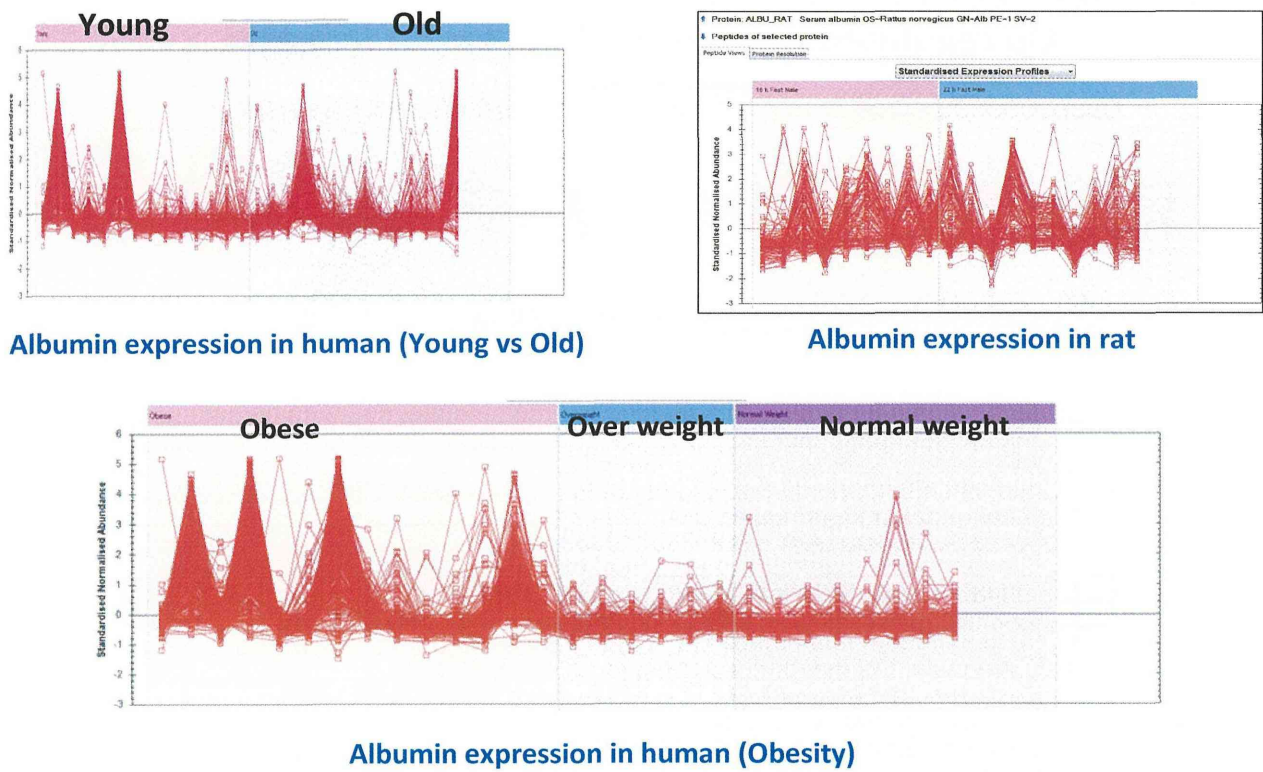
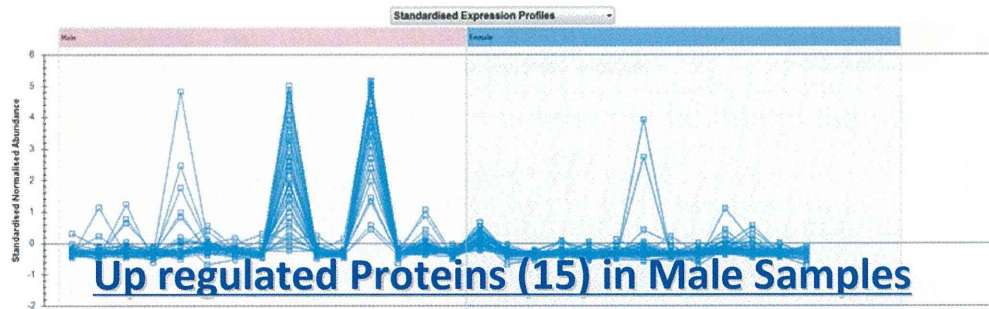


図 11-1 ヒト尿中の男性特異的なタンパク質

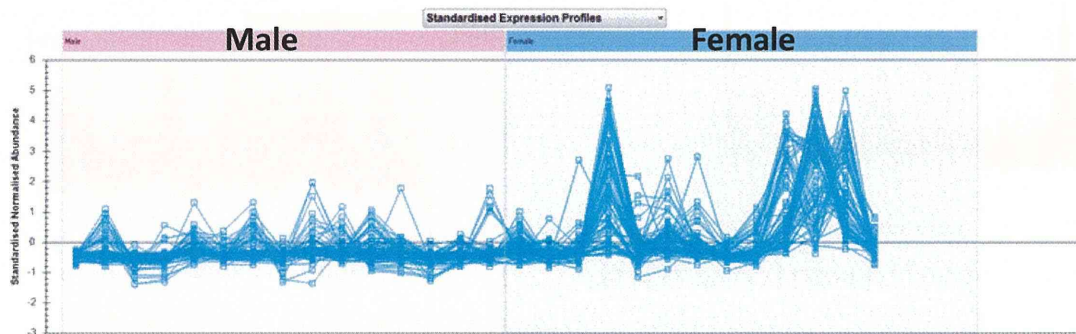


1	Glutamyl aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=ENPEP PE=1 SV=3
2	Bromodomain testis-specific protein OS=Homo sapiens GN=BRDT PE=1 SV=4
3	Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3
4	Protein FAM198B OS=Homo sapiens GN=FAM198B PE=2 SV=1
5	Keratin, type I cuticular Ha1 OS=Homo sapiens GN=KRT31 PE=2 SV=3
6	Keratin, type I cuticular Ha4 OS=Homo sapiens GN=KRT34 PE=2 SV=2
7	Keratin, type II cuticular Hb1 OS=Homo sapiens GN=KRT81 PE=1 SV=3
8	Keratin, type II cuticular Hb3 OS=Homo sapiens GN=KRT83 PE=1 SV=2
9	Keratin, type II cuticular Hb5 OS=Homo sapiens GN=KRT85 PE=1 SV=1
10	Keratin, type II cuticular Hb6 OS=Homo sapiens GN=KRT86 PE=1 SV=1
11	Keratin, type I cuticular Ha3-I OS=Homo sapiens GN=KRT33A PE=2 SV=2
12	Keratin, type I cuticular Ha3-II OS=Homo sapiens GN=KRT33B PE=2 SV=3
13	Low-density lipoprotein receptor OS=Homo sapiens GN=LDLR PE=1 SV=1
14	Myosin-13 OS=Homo sapiens GN=MYH13 PE=1 SV=2
15	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1 OS=Homo sapiens

- 8 of the 15 proteins were keratin.
- Men has more keratin!

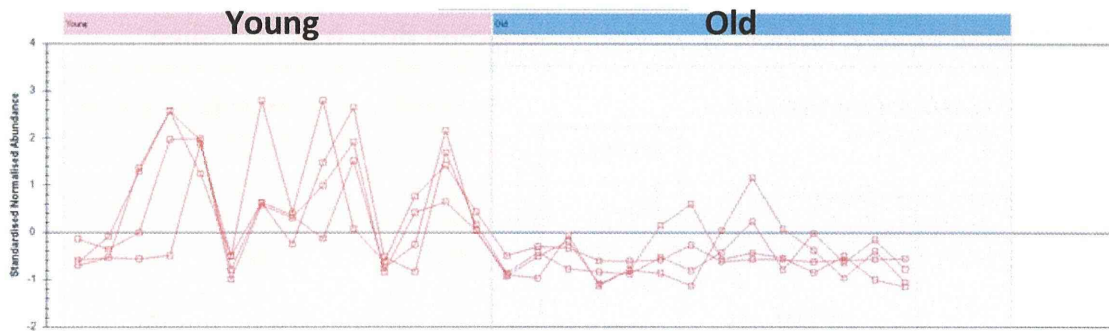
図 11-2 ヒト尿中の女性特異的なタンパク質

Up regulated Proteins (34) in Female Samples



1	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=A2ML1 PE=1 SV=3
2	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2
3	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2
4	Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2
5	Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2
6	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 OS=Homo sapiens GN=CD163 PE=1 SV=2
7	Cathelicidin antimicrobial peptide OS=Homo sapiens GN=CAMP PE=1 SV=1
8	Coiled-coil domain-containing protein 73 OS=Homo sapiens GN=CCDC73 PE=2 SV=2
9	Centromere protein F OS=Homo sapiens GN=CENPF PE=1 SV=2
10	Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=3
11	Centrosome-associated protein CEP250 OS=Homo sapiens GN=CEP250 PE=1 SV=2
12	Cornulin OS=Homo sapiens GN=CRNN PE=1 SV=1
13	Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1
14	Disabled homolog 2-interacting protein OS=Homo sapiens GN=DAB2IP PE=1 SV=2
15	Fatty acid-binding protein, epidermal OS=Homo sapiens GN=FABP5 PE=1 SV=3
16	Filaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3
17	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
18	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2
19	Serine protease inhibitor Kazal-type 5 OS=Homo sapiens GN=SPINK5 PE=1 SV=2
20	Integrin alpha-M OS=Homo sapiens GN=ITGAM PE=1 SV=2

図 12 ヒト尿中の年齢差特異的タンパク質

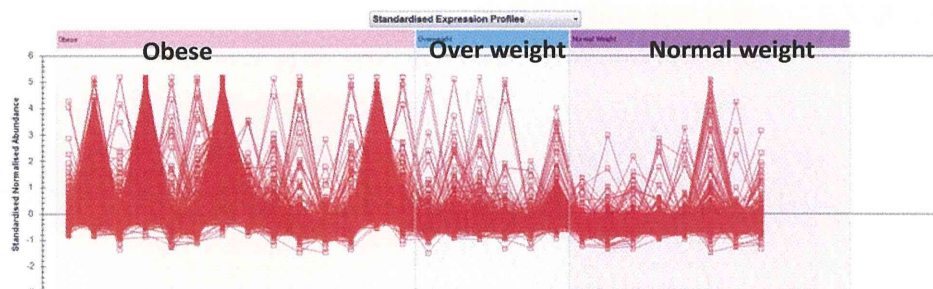


Protein expression pattern between young and old human were similar and fewer peptides/proteins could be related to.

1	CD59 glycoprotein
2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
3	Multimerin-1 OS=Homo sapiens
4	Sulfhydryl oxidase 1

図 13 ヒト尿中の肥満度特異的タンパク質

Up Regulated Proteins (~ 460) in Obese Samples



- 1 HLA class I histocompatibility antigen, A-80 alpha chain OS=Homo sapiens GN=HLA-A PE=1 SV=1
- 2 Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3
- 3 Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4
- 4 Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2
- 5 Amyloid beta A4 protein OS=Homo sapiens GN=APP PE=1 SV=3
- 6 ATP-binding cassette sub-family F member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCF1 PE=1 SV=2
- 7 Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN
- 8 Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2
- 9 Activin receptor type-1B OS=Homo sapiens GN=ACVR1B PE=1 SV=1
- 10 Aminoacylase-1 OS=Homo sapiens GN=ACY1 PE=1 SV=1
- 11 ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4
- 12 Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1
- 13 Alpha-galactosidase A OS=Homo sapiens GN=GLA PE=1 SV=1
- 14 Agrin OS=Homo sapiens GN=AGRN PE=1 SV=5
- 15 Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2
- 16 A-kinase anchor protein 17A OS=Homo sapiens GN=AKAP17A PE=1 SV=2
- 17 Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
- 18 Fructose-bisphosphate aldolase B OS=Homo sapiens GN=ALDOB PE=1 SV=2
- 19 Putative ALMS1-like protein OS=Homo sapiens GN=ALMS1P PE=5 SV=1
- 20 Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1

Too many proteins were up regulated in relation to obesity!

図 14 ヒトヘモグロビンサンプルにおける N 末端アミノ酸糖付加体 (Hb A1c) の検出

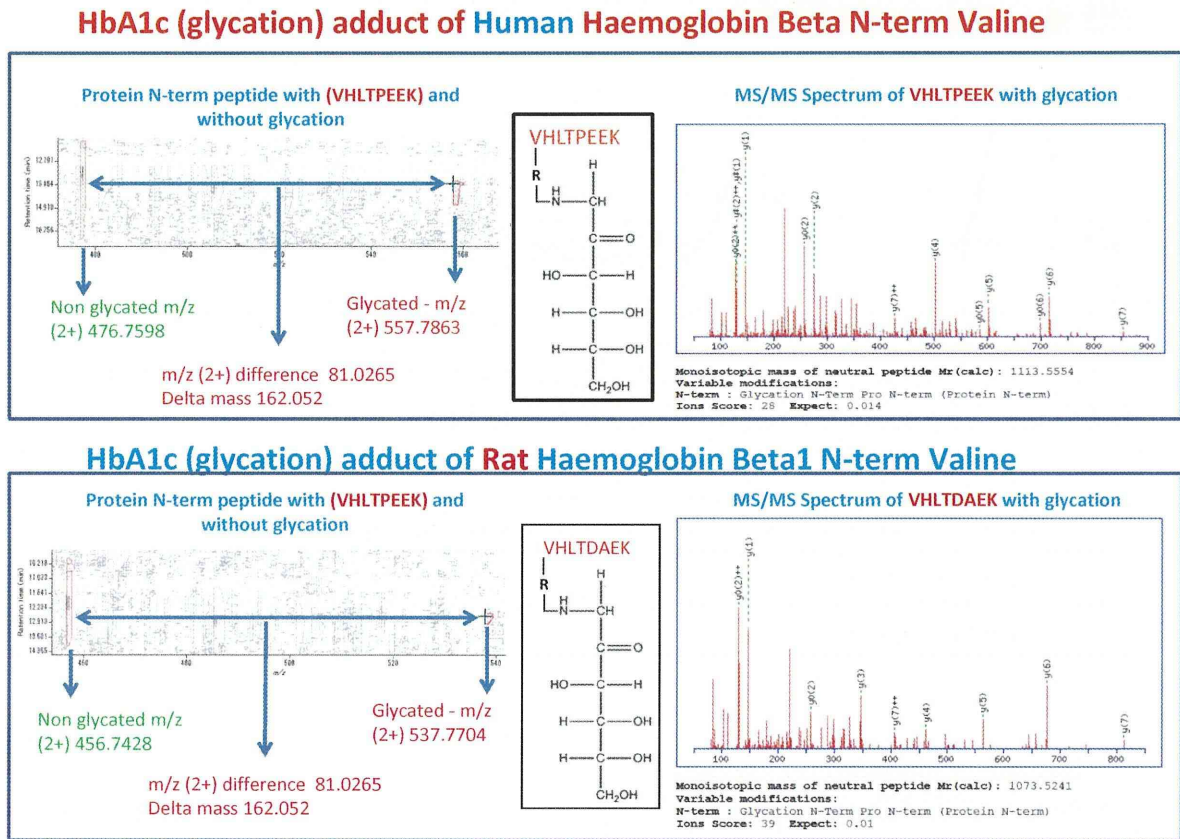


図 15 ヒトアルブミンの糖付加体の網羅的検出

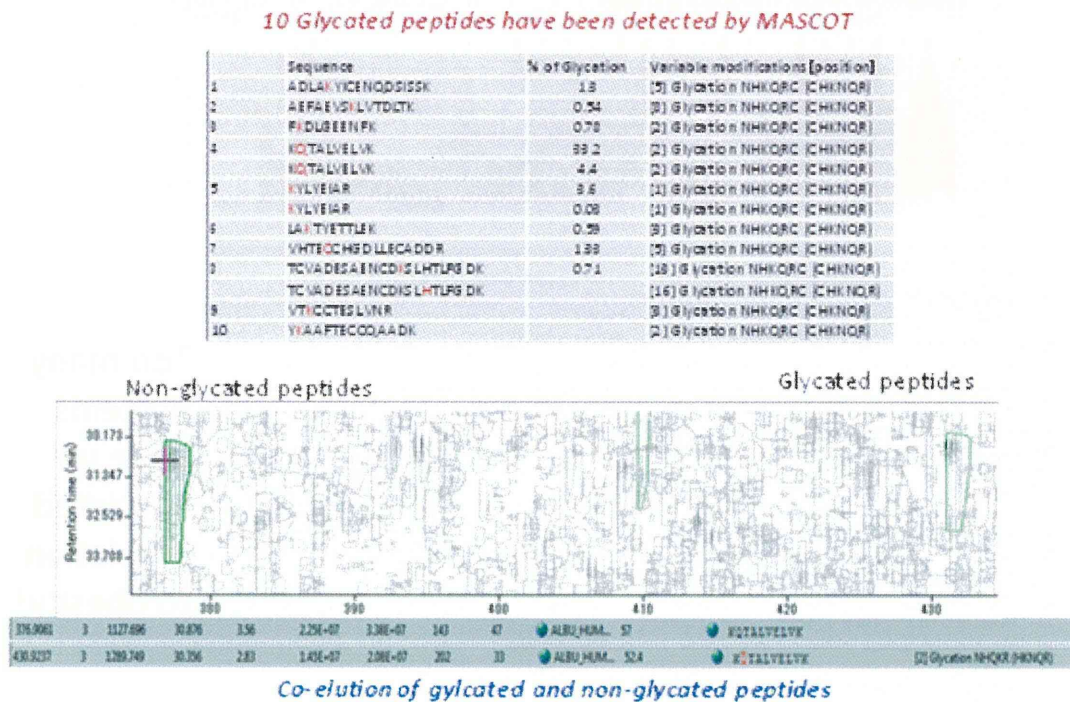
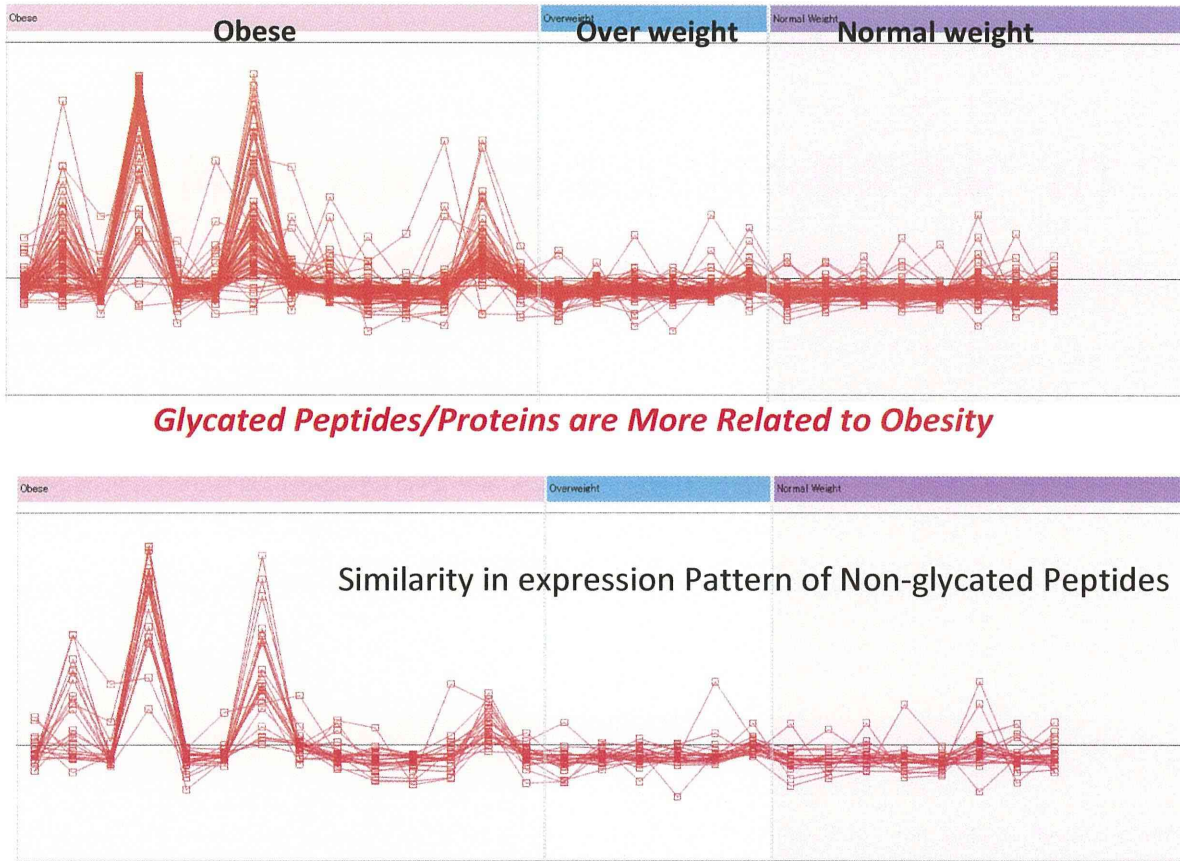


図 16 肥満度に 관련된 糖化および非糖化ペプチドの発現パターン



III. 研究成果の刊行に関する一覧表と別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木孝昌	網羅的な発現をみるマイクロアレイ解析との比較を例に	北條浩彦	実験医学別冊 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド	羊土社	東京	2013	111-121

雑誌

著者氏名	論文名	雑誌名	巻	ページ	刊行年
斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌	タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて	国立医薬品食品衛生研究所報告	131	20-24	2013
中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子	ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析	国立医薬品食品衛生研究所報告	131	50-57	2013
斎藤嘉朗, 佐井君江, 鹿庭なほ子, 田島陽子, 石川将己, 最上(西巻)知子, 前川京子	バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けて	薬学雑誌	133	1373-1379	2013
Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y	Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations	Metabolomics	10	402-413	2014
Ishikawa M, Maekawa K, Saito K, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Tajima Y, Kumagai Y, Saito Y	Plasma and Serum Lipidomics of Healthy White Adults Shows Characteristic Profiles by Subjects' Gender and Age	PLoS One	9	e91806	2014

5

網羅的な発現をみる マイクロアレイとの比較を例に

鈴木孝昌

リアルタイムPCR活用の目的とヒント

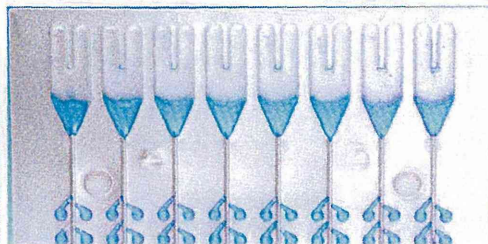
網羅的な遺伝子発現解析の目的にはDNAマイクロアレイを用いる方法が一般的であり、最近では次世代シーケンサーを用いた解析も行われているが、網羅的解析により指標となる遺伝子が絞り込まれた場合や、すでに調べたい遺伝子がある程度わかっている場合には、ハイスループットなリアルタイムPCR法がより有効な手段となる。また、最近ではマイクロRNAの発現解析も盛んになってきたが、この場合マイクロRNAの総数が数千と限られているため、最初からハイスループットなリアルタイムPCR法を用いる場合も多い。384ウェルのリアルタイムPCR反応をデザイン済みのTaqMan[®]プローブを用いてカード化したTaqMan[®] Array Cardsは、これら目的において非常に有用なツールである。最近ではさらに小型化されたマイクロアレイタイプのTaqMan[®] OpenArray[®]も利用可能となっている。また通常の96ウェルもしくは384ウェルプレートを利用したハイスループットRT-PCRシステムも利用可能であり、こちらのタイプではTaqMan[®] Array Platesの他にRT² Profiler[™] PCR Arrayも利用可能である。

リアルタイムPCRのマイクロアレイに対する優位性とは

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、網羅性という意味で非常に有効なツールであるが、個々の遺伝子発現の信頼性という面においてはリアルタイムPCR法が優れているため、アレイデータの確認の意味でよく用いられている。また、マイクロアレイの実験をしてみると、目的とする事象の解析に有効となる遺伝子の数は限られており、次のステップとしてはこうして絞り込んだ遺伝子を対象として解析を進めることになる。このターゲット遺伝子の数は一般に数十～数百であり、この程度の数になった場合にはマイクロアレイを使うよりもむしろリアルタイムPCRを用いた方が、迅速性、簡便性、信頼性の上でも有効である。

われわれは、遺伝子傷害性肝発がん物質のスクリーニング法の開発のため、GeneChipを用いた解析から選択した46種類の遺伝子についてTaqMan[®] Array Cards（以下、Array Cards）をデザインし、その有効性を検証した。本項ではArray Cardsを用いたリアルタイムPCRによる網羅的な遺伝子解析について解説する。

サンプルをアプライするローディングポート (Fill ポート)



47ターゲット遺伝子+コントロール

95ターゲット遺伝子+コントロール

380ターゲット遺伝子+コントロール

Format ID: P.N. 010261

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	SAMPLE	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	2
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	3
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	4
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	5
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	6
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	7
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	8
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	9
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	10

Format ID: P.N. 010260

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	SAMPLE	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	2
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	3
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	4
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	5
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	6
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	7
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	8
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	9
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	10

Format ID: P.N. 010265

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	SAMPLE	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	2
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	3
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	4
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	5
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	6
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	7
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	8
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	9
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	10

図1 TaqMan® Array Cardsの概要

ターゲット遺伝子はすでにデザインされた TaqMan® Gene Expression Assays, Inventoried (4331182) から自由に選ぶことができ、下の例を含めた 10 種類のフォーマットから自由にカスタマイズできる。Copyright © 2013 Life Technologies Corporation. Used under Permission.

Array Cards を用いたリアルタイム PCR の特徴

Array Cards では、図1に示すように 384 ウェルが 48 × 8 つのチャンパーにて構成されており、各ウェルにはすでにデザイン済みの TaqMan® プロンプがスポットされている。アレイのデザインとしては、最大 8 種類のサンプルを用いることができ、遺伝子数としては、11 ~ 最大 380 遺伝子 (1 種類は内在性コントロール遺伝子を含むため) まで、任意の組み合わせで選ぶことができる。遺伝子の選択はウェブ上ですでにデザインされたリストから選択する (図2)。当初は選択した遺伝子の中でリストにない遺伝子も存在したが、最近では急速にその数も充実してきており、逆に 1 遺伝子に複数プロンプがあつたりして選択に悩むケースもある。また、特定の目的のためにすでにカスタマイズされたカードも発売されており、これを使ってすぐに実験を開始することもできる (表1)。

① Array Cards のフォーマットを選択

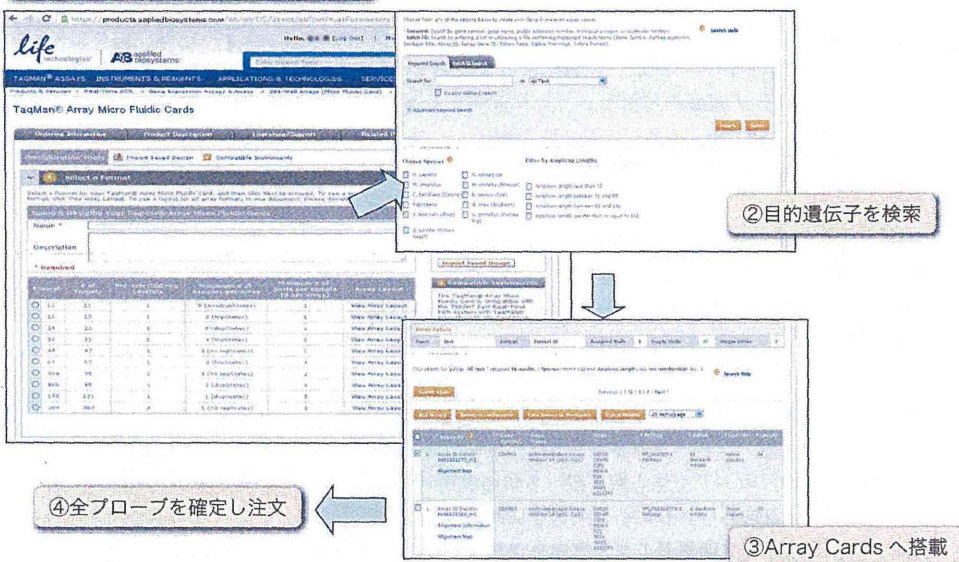


図2 ウェブを介したTaqMan® Array Cardsのデザインと注文の流れ

表1 既にデザイン済みのTaqMan® Gene Signature Cards
【ヒト】

商品名
TaqMan Array Human Immune Card
TaqMan Array Human Endogenous Control Card
TaqMan Array Human Protein Kinase Card
TaqMan Array Human GPCR Card
TaqMan Array Human ABC Transporter Card
TaqMan Array Human Apoptosis Card
TaqMan Array Human Phosphodiesterase Card
TaqMan Array Human Inflammation Card
TaqMan Array Human Angiogenesis Card
TaqMan Array Human Alzheimer's Card
TaqMan Array Human Nuclear Receptor Card
TaqMan Array Human Stem Cell Pluripotency Card
TaqMan Array Human MicroRNA A+B Card Set v2.0 (内訳) TaqMan Array Human MicroRNA A Card v2.0 と TaqMan Array Human MicroRNA B Card v2.0 のセット
TaqMan Array Human MicroRNA A Card v2.0
TaqMan Array Human MicroRNA B Card v2.0
TaqMan Array Human MicroRNA A+B Card Set v3.0 (内訳) TaqMan Array Human MicroRNA A Card v2.0 と TaqMan Array Human MicroRNA B Card v3.0 のセット
TaqMan Array Human MicroRNA B Card v3.0

【マウス】

商品名
TaqMan Array Mouse Immune Card
TaqMan Array Mouse Endogenous Control Card
TaqMan Array Mouse GPCR Card
TaqMan Array Mouse Alzheimer's Card
TaqMan Array Mouse Stem Cell Pluripotency Card
TaqMan Array Rodent MicroRNA A+B Cards Set v2.0
TaqMan Array Rodent MicroRNA A Card v2.0
TaqMan Array Rodent MicroRNA B Card v2.0

【ラット】

商品名
TaqMan Array Rat Endogenous Control Card
TaqMan Array Rat Phosphodiesterase Card
TaqMan Array Rat Inflammation Card
TaqMan Array Rat GPCR Card
TaqMan Array Rodent MicroRNA A+B Card Set v2.0
TaqMan Array Rodent MicroRNA A Card v2.0
TaqMan Array Rodent MicroRNA B Card v2.0

準備

□ カスタムデザイン TaqMan® Array Cards (4342247 など, ライフテクノロジーズ社)

GeneChip を用いて解析した遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝発がん物質投与マウス肝臓における, 特徴的な変化を示した遺伝子46種類を選択し, これらに対してデザイン済みの TaqMan® プローブをウェブ上で選択した, 規定のコントロール遺伝子として18S ribosomal RNAが含まれ, 新たに発現に差のみられなかった1遺伝子をコントロールとして追加した.

Array Cardsを使ううえで一番のネックとなるのが, 解析装置であり, 384ウェルのフォーマットが利用可能なABI PRISM 7900HT (2013年3月で販売終了) もしくはViiA™ 7およびQuantStudio™ 12K Flex システム (OpenArray® にも対応) が必須となる. われわれも Array Cards 発売当初からその有用性に注目していたものの, 実際の使用はこの機器の導入まで数年を待たなければならなかった. ABI PRISM 7900HTが利用可能であれば, Array Cards用のアップグレードキット (カード用サンプルブロックなどを含む) を購入することにより使用可能となる. このキットには, カードをシーリングするための専用シーラー (p.118 ⑩参照) と, カードを遠心機に掛ける際の専用ポケット*1も含まれている. その他, 試薬類としては, 通常のリアルタイムPCRと同様, 合成したcDNAサンプルとTaqMan® Universal PCR Master Mixが必要となる. なお, Array Cardsでは, ウェルあたりに必要な反応液量は2μLであり, マスターミックスを節約できるという利点もある.

*1 純正品はSorvall ST 40 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 遠心機用にデザインされており, 他社の遠心機でも比較的大きなタイプではこのポケットが使用可能であるが, われわれのラボでは中型の遠心機しかなかったため, Array Cards用に特注のローター (写真) を用いた.



himac CF 7D2 (HITACHI 遠心機) 用 Array Cards 専用ローター

□ 解析サンプル

遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝発がん物質をマウスに投与後, 4時間および24時間後の肝臓から調製したトータルRNAを解析対象とした. 今回は8×48遺伝子フォーマットを用いたため, 1つのカードで最大8サンプルについて48遺伝子のデータを解析.

機器・解析装置

□ ABI PRISM 7900HT (ライフテクノロジーズ社)

Array Cards用のアップグレードキット含む. なお現在は販売を終了しており, 後継はViiA™ 7およびQuantStudio™ 12K Flexシステムとなる.

□ サーマルサイクラー

PTC-200 DNAEngine Thermal Cycler (バイオ・ラッド社).

□ ポッター型ホモジナイザー

□ Agilent 2100 バイオアナライザ (アジレントテクノロジー社)

- 遠心分離器
himac CF 7D2 (HITACHI)

キット, 試薬類

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814など, ライフテクノロジーズ社)
必ずランダムヘキサマーを使用。
- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (4304437など, ライフテクノロジーズ社)
- クロロホルム
- イソプロピルアルコール
- TRIzol[®] Reagent (15596-018など, ライフテクノロジーズ社)

プロトコール

1. トータルRNA抽出

- ① マウスより摘出した肝臓の主葉を液体窒素にて急速凍結後, -80°C にて保存
- ② マウス肝臓 100 mg に対し TRIzol[®] Reagent 1 mL を用いて懸濁し, 氷上にて2分間ポッター型ホモジナイザーにてすりつぶす
- ③ ホモジナイズした溶液を5分間室温にて放置し, 1 mL の TRIzol[®] Reagent に対して 0.2 mL のクロロホルムを加える
- ④ サンプルチューブにしっかりと蓋をし, 手で15秒間激しく攪拌し, 室温で2~3分放置する
- ⑤ 5°C にて $1200 \times g$, 10分間遠心分離する
- ⑥ RNAは上部の透明な水相に含まれるので, これを新しいサンプルチューブにパスツールピペットを用いてそっと移す
- ⑦ 用いた TRIzol[®] Reagent 1 mL に対して, イソプロピルアルコール 0.5 mL を加え混和し, RNAを沈殿させる
- ⑧ 室温にて10分間放置後, 5°C にて $12,000 \times g$, 10分間遠心分離を行う
- ⑨ 沈殿したRNAを吸わないように上清をパスツールピペットで除き, 沈殿を1 mL の75%エタノールで洗浄した後, 100~500 μL の RNase-free water に溶解する
この際, ゲル状になって溶けにくい場合には, ピペッティング操作にて溶解を助けるとともに, $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ にて10分間インキュベートする。
- ⑩ バイオアナライザーにて, RNAのクオリティと量をチェックする
RNAのクオリティが心配な場合には, Isogen-LS (ニッポンジーン社) など, 別の抽出キットを用いて再抽出するとよい。

2. cDNA 合成

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて以下の手順にて行う。

- ① 2 μg のトータル RNA に対して 20 μL の反応液となるように、全サンプル量に必要な反応液量を計算し、少し余裕をもって以下の 2 \times RT master mix を氷上にて調製・混和する

【2 \times RT master mix】

10 \times RT Buffer	2.0 μL
25 \times dNTP Mix (100 mM)	0.8 μL
10 \times RT Random Primers	2.0 μL
MultiScribe	
Reverse Transcriptase	1.0 μL
Nuclease Free Water	4.2 μL *2
Total (per 20 μL reaction)	10.0 μL

*2 RNase Inhibitor 入りのキットを用いる場合 3.2 μL とし、RNase Inhibitor 1.0 μL をさらに加える。

- ② PCR チューブもしくは 96 ウェルプレートに、調製した 2 \times RT master mix をサンプル数だけ分注する
- ③ 10 μL の RNA サンプルを加え、ピペッティングにて 2 回ほど混ぜ合わせる
- ④ プレートまたはチューブに蓋をして、軽くスピンドウンし、泡を除き、サーマルサイクラーが準備できるまで氷上に置く
- ⑤ 5 $^{\circ}\text{C}$ にて 1,200 \times g, 10 分間遠心分離する
- ⑥ 以下の条件にて、逆転写反応を行う

< RT 反応条件 >		
アニーリング	25 $^{\circ}\text{C}$	10 分
↓		
cDNA 合成	37 $^{\circ}\text{C}$	120 分
↓		
反応停止	85 $^{\circ}\text{C}$	5 秒
↓		
保存	4 $^{\circ}\text{C}$	∞

- ⑦ 反応終了後、リアルタイム PCR 反応に使用するまでは冷蔵庫にて保存する
ただし、1 日以上置く場合は、-20 $^{\circ}\text{C}$ にて保管する。

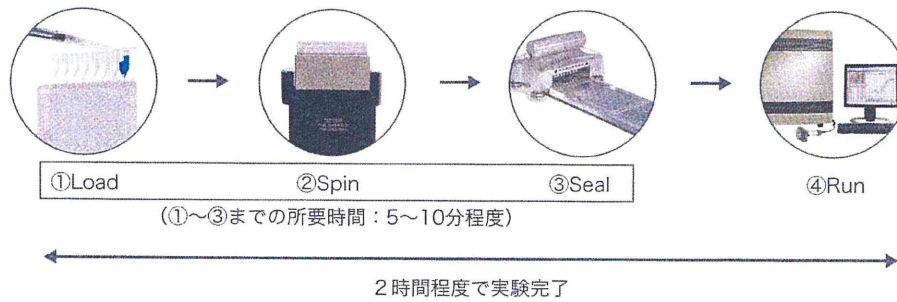


図3 Array Cards実験操作の流れ

Copyright© 2013 Life Technologies Corporation. Used under Permission.

3. Array Cardsを用いたリアルタイムPCR解析

① 冷蔵保存してある Array Cards を室温に戻す

② 8つあるポートに対し、1ポートあたり1~1000 ngのトータルRNAより変換されたcDNA量を注入するよう、以下の容量で反応液 (Reaction Mixture) をサンプルチューブに調製する

【Reaction Mixture】

1リザーバー (ポート) あたり	
cDNA サンプル	a μ L *3
RNase/DNase Free Water	50 - a μ L
TaqMan® Universal Master Mix (2x)	50 μ L
Total	100 μ L

*3 通常10 μ Lを使用

③ チューブを優しく攪拌し、スピンドウンする

④ Array Cardsをパッケージから取り出し、平らなアルミ側を下にして実験台に置く

⑤ 100 μ Lの反応液 (上記②で調製したもの) を、Fillポート *4からゆっくりとマイクロピペットにて注入する (図3①)

この際、液量にはかなり余裕が取ってあるので、全量を入れる必要はなく、むしろ泡が入らないように少しだけ残す程度がよい。あわててオーバーフローしないように注意する。(カードを立てて手でもちながら注入すると比較的スムーズに入りやすい)。

*4 リザーバー最上部左側にある少し大きい方の穴。右側はvent用ポート。

⑥ 8つあるサンプルポートすべてに対応するサンプルの反応液を注入する