

蛍光検出基礎知識 ~ Protein Array とは

Key Words : Protein Array、直接 / 間接検出、ビオチン化抗体

はじめに

組織・細胞間にみられるタンパク質発現差異のプロファイリングは、バイオサイエンス研究を進めるうえで非常に重要です。個体や細胞の種類の違い、薬物の投与や環境の変化、罹病に応じた定常状態との差異の解析はプロテオミクスの中核になっています。

サンプル間の発現差異を検出する手法としては、CodeLinkなどのDNAマイクロアレイを使用した遺伝子の発現解析のほか、従来のタンパク質解析法および2D DIGE法(蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動)などのタンパク質発現解析が用いられています。タンパク質の構造は核酸と比較して非常に多様性に富み、細胞の状態や環境に応じて絶えず変化しているため、タンパク質検出や発現差異解析を行ううえで、幅広いダイナミックレンジが必要になります。また、多サンプルを同時に解析できるハイスループット化も重要です。

Protein Array 解析は、こうした要件を満たす可能性を備えた技術として注目されています。

Protein Array とは

Protein Array にはさまざまな種類がありますが、一般に、タンパク質に特異的に結合する抗体のような分子をスライドガラスやメンブレンなどの支持体の上にアレイ(配列)状にスポットしたものを示します。反応原理はDNA

マイクロアレイと同様で、アレイ上の分子とサンプルを反応させ、アレイに結合したタンパク質を検出・定量します。

Protein Array は標識・検出方法の違いから、直接法と間接法に大別できます。

直接法の場合、一般的なタンパク質の発現差異解析と同様に、蛍光波長(色)の異なる複数のCyDye色素を標的タンパク質に直接結合させます。標識タンパク質をアレイ上の固定化タンパク質(抗体など)と結合させて、目的タンパク質の蛍光シグナル強度から発現差異を検出します(図1参照)。直接標識の利点は、操作ステップ数が少ないため、多くのタンパク質の発現差異のプロファイリングが行えることです。

一方、間接法の場合は、アレイ上に固定した抗体と検出用の標識抗体とで標的タンパク質をサンドイッチ状にはさんで解析を行います。まず、標的タンパク質(抗原など)を支持体(メンブレン、スライドガラスなど)に固定された抗体に結合させた後、CyDye標識抗体と標的タンパク質を反応させます。検出はCyDye標識抗体を用いて行います。間接検出法も蛍光の標識方法が間接的で1色解析である点を除けば、2D DIGE法など既存の多色蛍光ディファレンス解析とほぼ同じ手法になります。間接法によって発現量の少ないサイトカインでも検出感度を高めることが可能であり、また、特異性の高い抗体を二重に用いることで交差反応が起きにくく、発現解析の信頼度も増します。

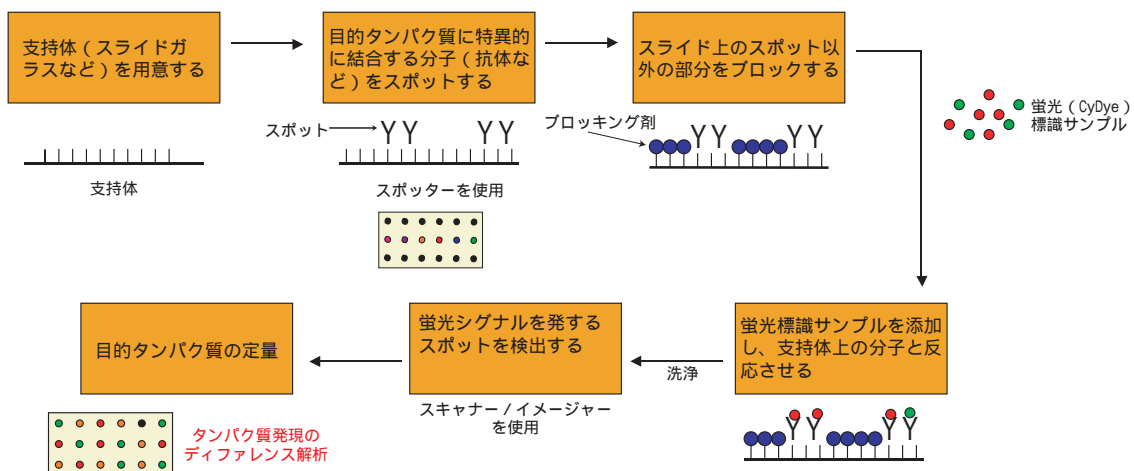


図 1. Protein Array 解析のワークフロー

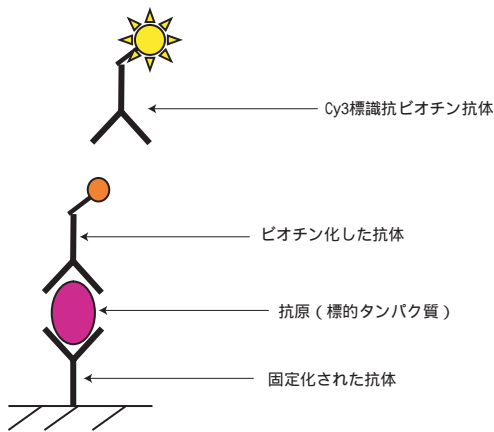


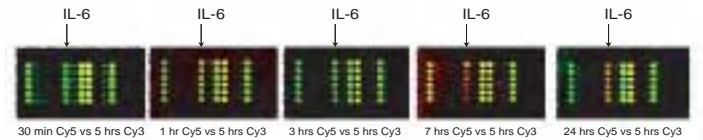
図 2. 間接検出法の一例

図2は間接法の一例で、蛍光標識サンプルの代わりに非標識サンプル(抗原)がスライド上の抗体に結合します。その後、標的タンパク質に特異的な第二の抗体が抗原/固定化抗体の複合体に添加されます。二番目の抗体としては一般的にビオチン化されたものが用いられ、検出にはCyDye標識抗ビオチン抗体やCyDye標識ストレプトアビジンが用いられます。この方法の場合、CyDyeは単色のみでの検出になります。

Protein Array による Cy3 / Cy5 ディファレンス解析例

CyDye 蛍光色素を用いることでタンパク質の発現差異を高感度で検出することができます。ここでは、血管形成、肺気道免疫反応および脳血液関門共培養などの多くの疾病プロセスの研究に用いられている培養細胞株 ECV304 (ヒト膀胱ガン由来) を使用した実験結果を示します。ECV304 に IL-1 を添加するとサイトカイン(主として IL-6 と IL-8) が放出されることが知られています(1)。図3は、Protein Array を使用して培養細胞の上清中のサイトカイン量の経時的な変化を観察した例です。今回の Protein Array 解析(図3a)では、刺激後30分、1時間、3時間、7時間、24時間経った培養上清からした採取したサンプルを Cy5 標識したものと、5時間の時点で採取した培養上清を Cy3 により標識したものとを同一アレイ上で反応させ、シグナル強度を比較しました。ELISA 法を用いて解析した結果との相関性もみられました(図3b)。

(a) Protein Array を使用した場合



(b) ELISA の結果

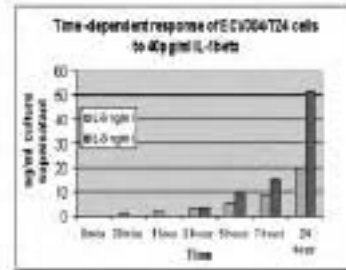


図 3. ECV304 上清の多色検出

細胞株 ECV304 を IL-1 で刺激し、サイトカインの放出を誘導しました。放出の経時変化を Protein Array のディファレンシャル解析により検出しました (IL-6 のみご紹介します)(a)。得られた結果については、ELISA 法の結果とも一致しました (b)。(図中 Cy3 は緑、Cy5 は赤; Cy3/Cy5 で標識された BSA マーカーが含まれています。)

おわりに ~ Protein Array の可能性

Protein Array は、当初、単にイムノアッセイの延長にすぎないと考えられていましたが、ゲノムプロジェクトの進捗やタンパク質研究の発展にともない可能性が広がっています。この手法により、抗原抗体反応、タンパク質間相互作用、タンパク質と薬物(リガンド)間の相互作用などさまざまな反応を網羅的にスクリーニングすることができるため、標的タンパク質の同定、毒性試験、代謝経路の解析(pathway 解析)、作用機序の解析または薬物耐性試験などの創薬プロセスへの応用も期待されます。

参考文献

1. Suda, K., et al. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 37, 505-514(2001).

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370

e-mail : Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。