

蛍光検出基礎知識 ~ Microarray とは その1

Key Words : マイクロアレイ解析、遺伝子機能解析、アレイスライド、CodeLink Bioarray

はじめに

ヒトをはじめ、多種多様な生物の全ゲノムシーケンス解読が完了し、現在は、その膨大なデータに基づく遺伝子機能解析、プロテオーム解析、細胞解析などポストゲノム研究のさまざまなアプローチが行われています。

今回は、遺伝子機能解析の代表的手法であるマイクロアレイ解析についてご紹介します。

生命現象のほとんどは、さまざまな遺伝子が環境の変化等に応じて複雑に関与して起こっているため、ノーザンブロット法やRT-PCR法などの従来法だけでは包括的な解析は不可能です。マイクロアレイ解析は、組織や細胞内の遺伝子の発現プロファイルを網羅的に把握する手法であり、従来法では得られなかった新しい知見を得ることができます。

マイクロアレイ解析の種類や搭載遺伝子数はこの数年間で飛躍的に増えたうえ、CodeLink Bioarray (図1)をはじめとするプレアレイスライドの充実、プロトコルの至適化、委託解析ビジネスの拡大等も進み、身近な手法になりつつあります。

マイクロアレイ解析とは

原理的には、従来のサザン/ノーザンブロットングを応用した技術であり、さまざまな遺伝子に相補的なDNA(プローブ)をガラスなどの基板上に高密度に配置(アレイ)したものにサンプルをハイブリダイズさせて、サンプルに含まれる遺伝子(ターゲットDNA)の発現状態を調べます。病理・生命現象のメカニズム解明、新しい診断法や治療薬の開発への応用が期待されている技術です。

マイクロアレイ解析技術が開発された当初、アレイ法の違いにより、チップ式とスライド(Microarray slide)式に大別されていました。"Affymetrix"式とも言われるチップ式は、半導体チップに使われている光リソグラフ(photolithography)技術を応用して基板上にオリゴヌクレオチドを合成する方法で、1990年代初頭にS.P.A.Fodorらが提唱した技法を基礎に開発されました。この場合、基板上で核酸を合成させるため基板との結合に安定性があること、実験条件が至適化されているのが特徴です。他方

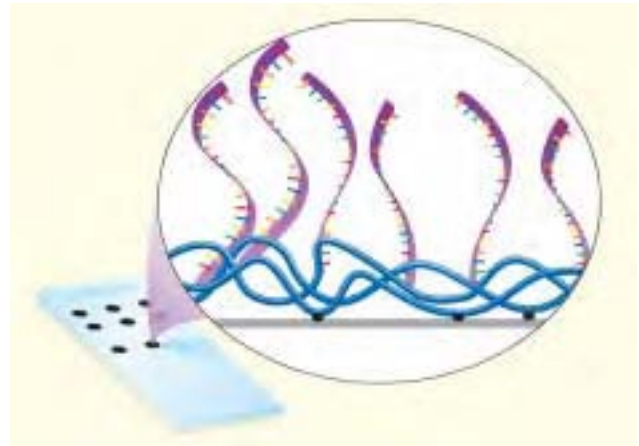


図1. CodeLink プレアレイスライドの表面構造(イメージ) スライドガラス上のポリアクリルアミド層にプローブが固定されています。そのためターゲットと自由度をもってハイブリダイズでき、感度・再現性が高く、低バックグラウンドの結果が得られます。

のスライド式("Stanford"式)は、一般に基板としてスライドガラスを使用し、アレイヤー/スポッター等の機器でDNAをスポットングします。アレイ密度はチップ式と比べてやや低いものの、スポットするプローブの塩基長に制限がないため、目的に応じてオリゴヌクレオチド、cDNAなど比較的自由にプローブの選択ができます。また、チップ式ではハイブリダイゼーション用ターゲット調製法としては単一蛍光標識法が主流ですが、スライド式の場合は二色蛍光標識法が一般的で、1枚のスライド上で複数サンプルの比較ができるディファレンシャル解析が可能です。

解析の手順

図2にマイクロアレイ解析の手順をまとめました。

アレイスライドを準備します。

自作スライドを作成する場合には、一般的に、スポットする遺伝子サンプルを用意して、濃度や量を至適化し、スライドに貼り付けます。しかしながらスライドを自作すると、ノウハウの蓄積や専用装置、熟練が欠かせず、再現性にも問題がある場合が少なくないため、これらの点を考慮してプレアレイスライドを選択する人が増えています。

スライドアレイの準備

CyDye 標識プローブ作製

画像の取り込みと解析

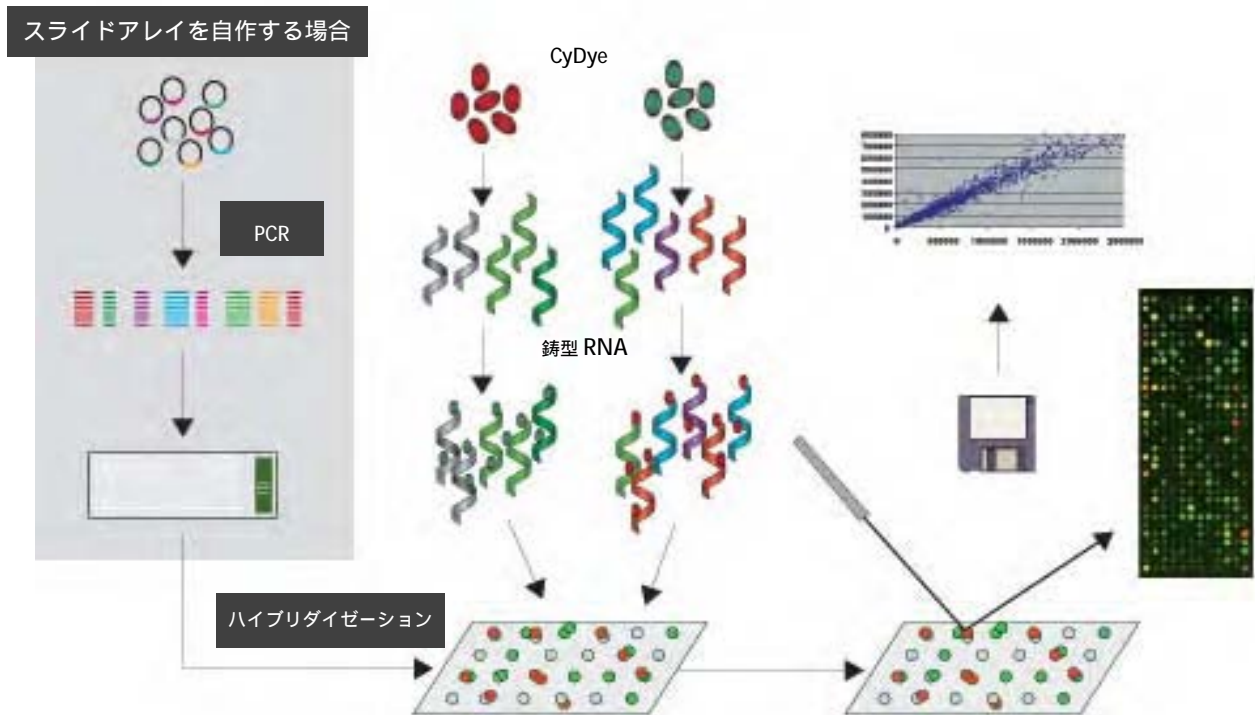


図 2. マイクロアレイ解析のワークフロー

ハイブリダイゼーション用の蛍光標識ターゲットを作製します。

蛍光色素の数の違いにより1色法と2色法に大別できます。スライド式アレイの場合、前述のように2色法が一般的です。2色法では、使用するアレイ間での品質やスポッティング精度のばらつき、実験誤差を最小限にするために1枚のスライドガラス上でコントロールサンプルと目的サンプルを比較できるのが最大の利点です。ただし、標識反応

には比較的多量の total RNA^{*1}もしくはmRNAが必要であり、また、取込み効率の違いを予め補正しておかなくてはなりません。一方、1色法の場合、別々にスキャンしたデータをコンピュータに取り込んでから、専用の解析ソフトウェアを使用して重ね合わせたうえで解析を行います。2色法とは異なり、蛍光色素の取込み効率や性質の違いによるデータ誤差を補正する検証実験(ダイスワップ法: サンプルAをCy3でサンプルBをCy5で標識して競合ハイ

表 1. CyScribe Labelling Kits 選択ガイド

	CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit	CyScribe cDNA Post Labelling Kit
1 反応あたりの mRNA 量	1 µg	0.5 µg
CyDye 取込み量 ^{*2}	30 ~ 100 pmol	80 ~ 200 pmol
Cy3 / Cy5 標識の均一性	ほぼ均一	均一
cDNA 標識方法	1 ステップ	2 ステップ

* 1 total RNA を使用する場合は、その中に含まれる mRNA 量を確認することをおすすめします (一般的に mRNA は total RNA の 1.5 ~ 2% を占めています)。

* 2 鋳型 mRNA 1 µg あたりの量 (pmol 量)。

ブリダイゼーションさせたものと、サンプルAをCy5でサンプルBをCy3で標識して競合ハイブリダイゼーションさせたものを比較して補正を行う方法)が不要です。ただし、使用するアレイ間のばらつきがある場合には正確な解析が難しくなります。したがって、CodeLinkなどのようにアレイ間にばらつきがない再現性の高いアレイには1色法が適していると言えます。研究の目的、研究室の設備、選択したアレイの品質などを考慮のうえ、最適な手法・手段を選択することが重要です。

さらに、標識サンプルの違いにより、CyDye標識ヌクレオチドをcDNAに直接取り込む方法、amino allyl修飾ヌクレオチドを取り込んだcDNAについてカップリング反応を行って間接的にCyDyeで標識する方法、mRNAに非酵素的にCyDyeを取り込ませる方法などがあります。表1は、CyDye標識cDNA作製用試薬CyScribe Labelling Kitsの選択ガイドです。

ハイブリダイゼーション後、画像を取込み解析します。マイクロアレイ解析において、ハイブリダイゼーションと洗浄のステップは信頼性の高いデータを得るうえで重要なポイントの一つです。いかに細心の注意を払ってそれまでのステップを進めてきたところで、ハイブリダイゼーション・洗浄で失敗してしまつては意味がありません。事前にハイブリダイゼーションの効率、反応後の安定性、作業時間などを加味して、温度とイオン強度(塩濃度)の設定などを至適化しておく必要があります。

画像の取込みには、通常は蛍光スキャナーを用います。蛍光スキャナーには、集光部にCCD (Charge Coupled Device)を用いたCCDカメラ型と、共焦点レーザーを用いたシステムがあります(スキャナーの違いについては、蛍光検出基礎知識 をご参照ください)。最近では、マイクロアレイ解析専用装置に加えて、ゲルやメンブレンのスキャンも可能な多目的システムも開発されています。



CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit (直接標識法)



CyScribe cDNA Post Labelling Kit (間接標識法)

図3. 検出結果(例)

直接標識法(上)と間接標識法(下)で標識したプローブを使用しています。間接標識法の場合CyDye取込み効率が高いために直接標識法では検出できなかったスポットの検出が可能になります。

注)間接標識法の結果と直接標識法の結果を単純に比較することはできません。例えばCyScribe cDNA Post Labelling KitとCyScribe First-Strand cDNA Labelling Kitによる標識プローブを用いてマイクロアレイ解析を行った場合には、同一の鋳型mRNAと同一のターゲットDNAサンプル(同一のアレイスライド)を用いても、Raw Data(標準化前のイメージ)は一致しません。実験の目的に応じてキット(cDNAプローブ標識法)をお選びください。

おわりに

かつてはゲルやメンブレンを用いる手法に限定されていた遺伝子発現解析のスループットは、マイクロアレイ解析の開発により飛躍的に増大しました。同時に処理できるサンプル数も多く、各ステップの自動化が進んでいるため、高度な知識や熟練を必ずしも必要としない、ハイスループット解析を実現します。環境条件、例えば投薬による変化や加齢などの経時的変化に応じた個々の遺伝子の発現の有無とその量、遺伝子間の発現差異などを解析できるため、これらの情報から生体内の遺伝子発現・制御のメカニズムの解明が可能です。疾病の原因遺伝子の検索や遺伝子診断への応用も実現しつつあります。

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 サンケンビルディング

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。