

## アレイインフォマティクスの進展

佐藤 準一

## Recent Progress in Bioinformatics for Microarray Analysis

Jun-ichi SATOH

Department of Bioinformatics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meiji Pharmaceutical University,  
2-522-1 Noshio, Kiyose City, Tokyo 204-8588, Japan

(Received June 23, 2008)

Following the completion of the Human Genome Project in 2003, we were able to clarify the comprehensive profile of the whole human genome on DNA microarray. KeyMolnet is a bioinformatics tool for analyzing molecular interactions on the curated knowledge database. It promotes genome-based drug discovery research aimed at mining the most relevant molecular target to personalized medicine. Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease with a relapsing-remitting clinical course, affecting exclusively the human central nervous system white matter. By DNA microarray, we identified a set of differentially expressed genes in T lymphocytes between MS and healthy subjects, and between acute relapse and complete remission. Hierarchical clustering of discriminator genes established the molecular classification of MS subgroups, associated with the therapeutic response to interferon- $\beta$ . The molecular network of the genes involved in development of MS and induction of acute relapse of MS was related to NF- $\kappa$ B-regulated gene expression. Prion diseases are an intractable neurodegenerative disease, mediated by an abnormal prion protein PrP<sup>Sc</sup>. The protein conformational conversion from the cellular prion protein PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> requires an as yet unidentified species-specific chaperone named "Protein X". By protein microarray, we identified a set of novel PrP<sup>C</sup> interactors, serving as the candidate for X. The molecular network of PrP<sup>C</sup> and interactors was closely associated with signaling pathways essential for cell survival, differentiation, proliferation and apoptosis. Thus, the molecular network analysis is highly valuable to extract biological implications from a huge amount of microarray data.

**Key words**—drug discovery research; KeyMolnet; microarray; molecular network; multiple sclerosis; prion disease

## 1. はじめに

2003年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、全ヒト遺伝子約22000の塩基配列が解読された。DNAマイクロアレイは、スライドガラス基板上に数万遺伝子のcDNAやオリゴヌクレオチドを高密度に固定したチップで、個々の細胞における全遺伝子発現情報を、包括的に解析できるツールである。最近、リコンビナントタンパク質をスライドガラス上に高密度に固定し、タンパク質間相互作用を網羅的に解析可能な、プロテインマイクロアレイも登場した。近年マイクロアレイを用いた網羅的解析により、癌や神経難病の診断のバイオマーカーや治療の

分子標的が次々明らかにされた。さらに薬物応答性の個人差を予測可能となり、薬理ゲノミクス(pharmacogenomics)の研究分野は急成長を遂げ、テーラメード医療(personalized medicine)の樹立に道が開かれた。すなわちマイクロアレイ解析は、臨床所見や画像のみでは鑑別困難な疾患の補助診断ツール、腫瘍悪性度や予後の予測、薬物応答や副作用の予測、治療効果の判定など幅広い臨床応用が可能であり、分子レベルの個人差に基づくポストゲノム時代の創薬に必須の研究手法となっている。またシステム生物学(systems biology)の観点から、ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステムの持つロバストネスの破綻に起因すると考えられている。したがって難病の病態解明のためには、ゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究課題となる。本稿ではDNAマイクロアレイやプロテインマイクロア

明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス(〒204-8588 清瀬市野塩 2-522-1)

e-mail: satoj@my-pharm.ac.jp

本総説は、日本薬学会第128年会シンポジウムS12で発表したものを中心に記述したものである。

レイによる網羅的解析の進歩を、神経難病である多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) とプリオン病 (prion diseases) を具体例としてまとめた。

## 2. マイクロアレイ解析法の特徴

ゲノムプロジェクトの完了により、ヒト全遺伝子塩基配列が解読され、DNA マイクロアレイを用いて、個々の細胞における数万遺伝子の発現情報を包括的に解析可能になった。ヒト以外では、既にゲノムプロジェクトが完了している生物種、マウス、ラット、アカゲザル、イヌ、ウシ、イネ、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、酵母、線虫、大腸菌でもマイクロアレイ解析が可能になっている。DNA マイクロアレイは、cDNA を基板上にスポットで固定するスタンフォード方式と、基板上で直接オリゴヌクレオチドをフォトリソグラフ合成伸長する GeneChip® (Affymetrix) に大別される。GeneChip では各遺伝子に対して 11-20 種類の 25-mer オリゴヌクレオチドのセットを用意、各セットは中央 1 塩基をミスマッチ置換したネガティブコントロールを含んでいる。発現解析用アレイ以外には、スプライズバリエーションの網羅的解析が可能なエクソアレイ、遺伝子多型マッピングや染色体コピー数を解析できるジェノタイピングアレイ、主として ChIP on Chip 解析に用いるゲノムタイピングアレイが市販されている。一方プロテインマイクロアレイは、基板上にリコンビナントタンパク質を高密度に固定し、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction; PPI) すなわちインターラクトーム (interactome) を、短時間で網羅的に解析可能なチップである。<sup>1)</sup> このプロテオーム解析手法は、酵母ツーハイブリッド (yeast-two hybrid; Y2H) 法に比較して、偽陽性率が低い。またリン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けたタンパク質との結合についても、鋭敏に検出できる利点がある。本稿では主として mRNA 発現解析用の DNA マイクロアレイと PPI 解析用のプロテインマイクロアレイに言及する。

初めに、DNA マイクロアレイでは、遺伝子発現レベルが異なる 2 種類以上の細胞や組織から mRNA 又は total RNA を抽出し、T7 RNA 増幅法で増幅する。スタンフォード方式では、比較対象の cDNA 又は cRNA を Cy3, Cy5 で標識、同一チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行うため、2 色法と呼ばれている。GeneChip では、cDNA から

*in vitro* transcription 反応によりビオチン標識 cRNA を作成、フラグメントに切断してハイブリダイゼーションを行い、ストレプトアビジン-フィコエリスリンで検出するため、1 色法と呼ばれ、1 サンプルに 1 アレイを使用してアレイ間の発現レベルを比較する。プロテインマイクロアレイではプローブタンパク質をタグやビオチンで標識し、アレイ上のターゲットタンパク質と反応させ、蛍光標識した抗タグ抗体やストレプトアビジンを検出系に用いる。すべての場合、アレイ専用スキャナーで蛍光を検出、シグナル強度を正規化し、サンプル間の遺伝子発現プロフィールを比較する。グローバルノーマライゼーションは、比較するチップ上の全遺伝子の発現強度の総和が等しいと仮定する正規化法である。DNA マイクロアレイ解析では、一度に多数の遺伝子の発現レベルを解析するため、遺伝子毎に *t* 検定で評価すると、多数の偽陽性遺伝子を拾ってしまう。通常は多重検定を行い、Bonferroni 補正を付加するか、偽陽性率 (false discovery rate; FDR) を評価する。<sup>2)</sup> データ解析のガイドラインに関しては、Dupuy and Simon の論文<sup>3)</sup> が参考となる。

有意な発現変動を呈した遺伝子に関しては、発現レベルをリアルタイム RT-PCR で定量的に検証する必要がある。DNA マイクロアレイ解析では、用いたサンプル RNA の質のよし悪しが結果に大きく影響する。また年齢、性、喫煙、飲酒、常用薬、嗜好品、精神的ストレス、日内変動の影響を考慮する必要がある。<sup>4)</sup> 解析データを公共データベース Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) に登録する場合は、Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) 形式に従い、実験デザイン・アレイデザイン・サンプル調整・ハイブリダイゼーション・測定法・ノーマライゼーション条件を明示する。<sup>5)</sup> 有意遺伝子に関しては、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースで、アノテーションを検索し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データ



佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス教授。昭和 63 年東京医科歯科大学医学部大学院医学研究科博士課程修了。医学博士。日本神経学会専門医。現在の研究テーマ：マイクロアレイによる神経疾患薬物応答遺伝子群の網羅的解析。

ベースで、パスウェイを同定することができる。KeyMolnet（医薬分子設計研究所）や Ingenuity Pathways Analysis®（Ingenuity Systems）を用いると、アレイデータに最も密接に関連している分子ネットワークを同定できる。KeyMolnet は、あらゆる生体分子に関して、レビュー（core contents）や PubMed（secondary contents）から、情報を収集して構築した生物情報統合プラットフォームである。<sup>6)</sup>

多数のサンプルを比較解析する場合は、データセットの要素特性を分類するため、GeneSpring®（Agilent）などを用いて、階層的クラスタ解析（hierarchical clustering analysis）を行う。<sup>2)</sup> サンプルに関する事前情報なしに、類似発現パターンを呈するサンプルをクラスタに分類する方法を、教師なし法（unsupervised method）と呼ぶ。またクラスタを特徴付ける指標遺伝子を抽出して、3次元空間に圧縮投射する方法を、主成分解析（principal component analysis; PCA）と呼ぶ。<sup>7)</sup> 非階層的クラスタ解析には、k-means クラスタリングや自己組織化マップ（self-organization map; SOM）がある。サポートベクターマシン（support vector machine; SVM）解析は、指標遺伝子の抽出に用いたデータを訓練セットとして機械学習し、パラメータ（Kernel 関数）を選出して、新規のデータセットにおけるクラスタを識別可能な超平面を同定する方法で、教師あり法（supervised method）である。<sup>8)</sup>

### 3. DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の病型分類と再発予測マーカーの解析

MSは主として若年成人に発症し、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発、様々な神経症状が再発を繰り返して、次第に進行する難病である。MSでは免疫寛容が破綻し、自己抗原に反応するI型ヘルパーT細胞（Th1）やIL-17産生細胞（Th17）が出現、血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤、マクロファージやミクログリアを活性化し、TNFなど炎症増強因子の産生を誘導して、脱髄を惹起する。<sup>9)</sup> 回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が高度で遷延すると軸索傷害を来し、不可逆的機能障害が残存する。近年大規模臨床試験により、インターフェロンベータ（interferon-beta; IFNB）のMS再発抑制効果が、エビデンスレベルIで立証された。<sup>10)</sup> 現在MSでは、急性増悪期に副腎皮質ステロイド

の短期間大量静脈内投与を行い、寛解期にIFNBの継続的皮下・筋肉内投与を行う治療法が選択されている。しかしながら、IFNBノンレスポnderや副作用の出現が問題となっている。このような治療反応の不均一性は、MSが多様な病態を呈する疾患群であることを示唆する。事実、MSは臨床経過から再発寛解型（relapsing-remitting MS; RRMS）、2次進行型（secondary progressive MS; SPMS）、1次進行型（primary progressive MS; PPMS）、病巣分布から脳型（conventional MS; CMS）、視神経脊髄型（optico-spinal MS; OSMS）に分類される。DNAマイクロアレイは、多様な病態の分子遺伝学的背景の解析に威力を発揮する。<sup>11)</sup>

最近われわれは、文書で同意を取得した72例のIFNB未治療の活動性MS患者（そのうち46例は初回採血直後から2年間IFNB治療を開始）と、年齢・性を一致させた22名の健常者の末梢血リンパ球から、AutoMACS®（Miltenyi Biotec）でCD3陽性T細胞とCD3陰性non-T細胞を分離し、DNAマイクロアレイ（Hitachi Life Science）を用いて、各細胞分画の遺伝子発現プロファイルを解析した。<sup>12)</sup> 両群間で発現差異を認めた上位30遺伝子では、T細胞で25遺伝子（NR4A2, TCF8上昇とMAPK1, SMARCA3, HSPA1A, TRAIL, TOP1, CCR5, BAG1, DAXX, TSC22, PARP低下）、non-T細胞で27遺伝子（ICAM1, CDC42, RIPK2, SODD, TOP2A上昇とBCL2, RPA1, NFATC3, HSPA1L, RBBP4, PRKDC低下）が、アポトーシス制御遺伝子に分類された。すなわち患者のリンパ球では、アポトーシス促進遺伝子と抑制遺伝子の拮抗的バランスが、常時存在している所見が得られた。

またわれわれは、MS患者と健常者の群間検定とBonferroni補正を行い、T細胞で有意な発現差異を示す286遺伝子を同定した。<sup>13)</sup> KeyMolnetによる286遺伝子の分子ネットワーク解析で、共通上流としてnuclear factor NF-kappa B（NF-κB）を介する遺伝子発現制御系を検出した。NF-κBはサイトカイン・ケモカインの発現を正に調節する転写因子で、炎症の増幅と遷延化に働く。MSではNF-κBを介する遺伝子発現制御系に異常があると考えられる。さらに286遺伝子を指標遺伝子として階層的クラスタ解析を行い、MS病型分類データベースを樹立し、臨床データとの関連性を評価した（Fig.

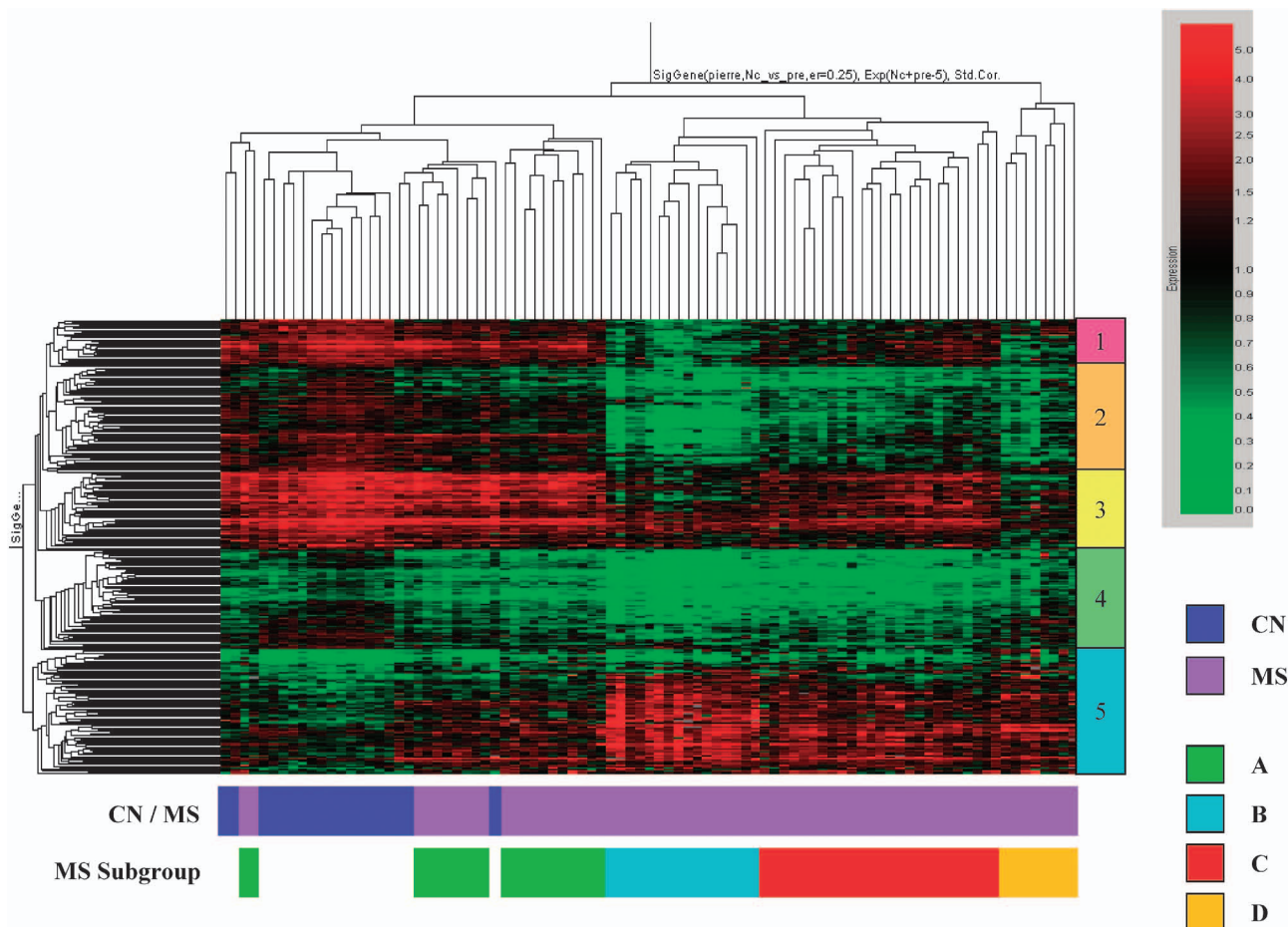


Fig. 1. Hierarchical Clustering Analysis of 286 Genes Differentially Expressed between Untreated MS Patients and Control Subjects

The gene expression profile of peripheral blood CD3<sup>+</sup> T cells was studied in 72 untreated MS patients and 22 age- and sex-matched healthy control (CN) subjects, by using a cDNA microarray of 1285 genes. Hierarchical clustering analysis was performed by selecting a set of 286 genes differentially expressed between MS and CN as a discriminator. The results are expressed in a matrix format, with each row representing the gene expression level (GEL) of a single gene in all the subjects and each column representing GEL of 286 genes in an individual subject. The matrix is shown by a pseudo-color, with red expressing upregulation, green expressing downregulation, and the color intensity representing the magnitude of the deviation from GEL 1.0 as shown on the upper right. Hierarchical clustering analysis separated MS (purple) from CN (dark blue), and classified the former into four subgroups named A (green), B (light blue), C (red) and D (yellow). The 286 genes were categorized into five classes numbered # 1 (pink) to # 5 (light blue). The figure is cited from the reference No. 13).

1). 遺伝子発現プロフィール上、286 遺伝子は 5 クラスに分類され、患者群は健常者群から識別され、さらに 4 グループ A, B, C, D に分類された。A 群は遺伝子発現プロフィールが最も健常者群に類似しており、軽症者が多く、B 群は臨床的活動性が最も高く、多数のケモカイン遺伝子が集積している c-class # 5 遺伝子群の発現レベルが最も高く、C 群は大脳限局病変を呈する患者が多く、D 群は神経学的機能障害度スコアが最も高値であった。IFNB 治療を開始した 46 例に関して 2 年間追跡し、治療前後 2 年間の再発回数・ステロイドパルス日数・入院日数・神経学的機能障害度・MRI T2 強調画像病巣数・患者の治療に対する満足度をスコア化して集計して、IFNB レスポンダーとノンレスポナーに分

類すると、レスポナーは A 群と B 群に集積していた。またレスポナーでは IFN 応答遺伝子群 (IFN-responsive genes; IRG) の発現レベルが、治療開始 6 ヶ月の時点でも高レベルに維持されていたが、ノンレスポナーでは低下する傾向を呈した。すなわち階層的クラスター解析による病型分類と IRG の発現レベルの経時的変化を組み合わせると、IFNB 治療反応性をある程度推測できることが分かった。

さらにわれわれは、末梢血リンパ球を IFNB で刺激した場合、3 時間以内に CXCR3 リガンドケモカインである CXCL11, CXCL10, CXCL9 と、CCR2 リガンドケモカインである MCP1, MCP2 の発現が、100 倍以上上昇することを見出した。<sup>14)</sup> 前者はエ

フェクター Th1 細胞, 後者は単球やマクロファージの遊走を促進し, 炎症を増強するケモカインである。すなわち多くのケモカインが, 早期 IRG であることが判明した。このようなケモカインバーストは, MS で IFNB 治療開始早期に出現する発熱・皮膚潰瘍形成・肝障害の発現と関連している可能性がある。

Achiron らは 26 例の RRMS 患者と 18 名の健常者の PBMC の遺伝子発現プロファイルを GeneChip® で比較解析した。<sup>15)</sup> 両群間で, 1109 遺伝子の発現差異を認め, MS における T 細胞活性化関連遺伝子 LEF1, TCF3, SLAM, ITGB2, CTSB の上昇を報告した。しかし 14 例の患者では, 採血時に IFNB, glatiramer acetate, intravenous immunoglobulins を投与中であり, 治療薬が遺伝子発現に直接影響した可能性がある。Stürzebecher らは 10 例の RRMS 患者で, IFNB 治療前後に末梢血リンパ球を解析し, レスポンダーで 25 遺伝子の発現変動 (IFI17, OAS, Stat1 などの上昇) を確認した。<sup>16)</sup> しかし, 彼らは一度凍結保存したリンパ球を解凍してから解析しており, 実験操作が遺伝子発現に影響した可能性を否定できない。最近われわれは, ハンガリー人一卵性双生児 MS ペア 4 組 (MS/MS, MS/MS, MS/MS, MS/健常者) より, 末梢血 CD3 陽性 T 細胞を分離, DNA マイクロアレイで解析し, MS 特異的 20 遺伝子を同定した。<sup>17)</sup> KeyMolnet による 20 遺伝子の分子ネットワーク解析で, 共通上流として T 細胞の生存と分化を制御する転写因子ファミリーである Ets を介する遺伝子発現制御系を検出した。

またわれわれは, 6 例の RRMS 患者を追跡して, 急性増悪期と完全寛解期に採血, CD3 陽性 T 細胞を分離, DNA マイクロアレイで比較解析し, 再発期特異的 43 遺伝子を同定した。<sup>18)</sup> この 43 遺伝子を指標遺伝子として, 階層的クラスター解析を行うと, 再発期サンプルと寛解期サンプルを独立したクラスターとして識別できた。すなわち 43 遺伝子セットは, MS の再発を予測するバイオマーカーとなり得る。KeyMolnet による 43 遺伝子の分子ネットワーク解析で, 共通上流として NF- $\kappa$ B を介する遺伝子発現制御系を検出した (Fig. 2; 原図は Ref. 18) 参照)。以上の知見は, 転写因子 NF- $\kappa$ B は, MS と健常者を識別する遺伝子群及び MS の再発期と寛解期を識別する遺伝子群のどちらの場合でも, 上

流に位置する転写因子として働いており, MS の治療薬や予防薬の創薬ターゲットとなり得ることを示唆している。実際に, NF- $\kappa$ B 特異的阻害薬は, MS のモデル動物系である自己免疫性脳脊髄炎において有効性が確認されている。<sup>19)</sup>

さらにわれわれは, MS 様の多発性大脳白質脱髄病変を呈した NMO の剖検例で, 病巣組織の遺伝子発現プロファイルを解析し, 病態形成に密接に関与するバイオマーカー遺伝子として CD163, IFI30 を同定した。<sup>20)</sup>

#### 4. プロテインマイクロアレイによるプリオン病の病態関連タンパク質インターラクトームの解析

正常型プリオンタンパク質 (the cellular isoform of prion protein; PrPC) は, 第 20 染色体上の遺伝子 PRNP にコードされ, 神経細胞で高レベル発現している糖タンパク質であるが, その生物学的機能は明らかではない。N 末端側には銅イオン結合ドメインが存在し, 神経細胞における銅代謝や酸化ストレス防御に関与していると推測されている。クロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease; CJD) は, 中高年期に急速進行性認知症を呈し, PrPC とアミノ酸配列が同一で, 高次構造が異なる異常型プリオンタンパク質 (the scrapie isoform of prion protein; PrPSc) が脳に蓄積して, 神経細胞死を来す。PrPC は  $\alpha$ -helix が主体, proteinase K 感受性, 非イオン性界面活性剤に可溶性, 一方 PrPSc は  $\beta$ -sheet が多く, proteinase K 抵抗性, 非イオン性界面活性剤に難溶性である。CJD は有効な治療法もなく死に到る難病で, プリオン病と呼ばれている。プリオン病は種々の哺乳動物でもみられ, 社会問題となっている新型 CJD は, ウシ海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy; BSE) に罹患した牛の異常型プリオンを経口摂取することにより, ヒトに伝播したプリオン病である。プリオン病では, 脳脊髄液で 14-3-3 タンパク質を検出し, 診断特異的なバイオマーカーとして用いられている。<sup>21)</sup> 14-3-3 タンパク質は, 種々の細胞内シグナル伝達系で分子アダプターとして働く。

PrPSc は神経細胞の細胞膜上の PrPC を次々と PrPSc に置換して増殖し, タンパク質自体が感染性を有するという点で特異である。<sup>22)</sup> プリオン遺伝子ノックアウト (PrP-KO) マウスは, PrPSc の感染に対して抵抗性を示し, 感染成立には宿主細胞に鑄



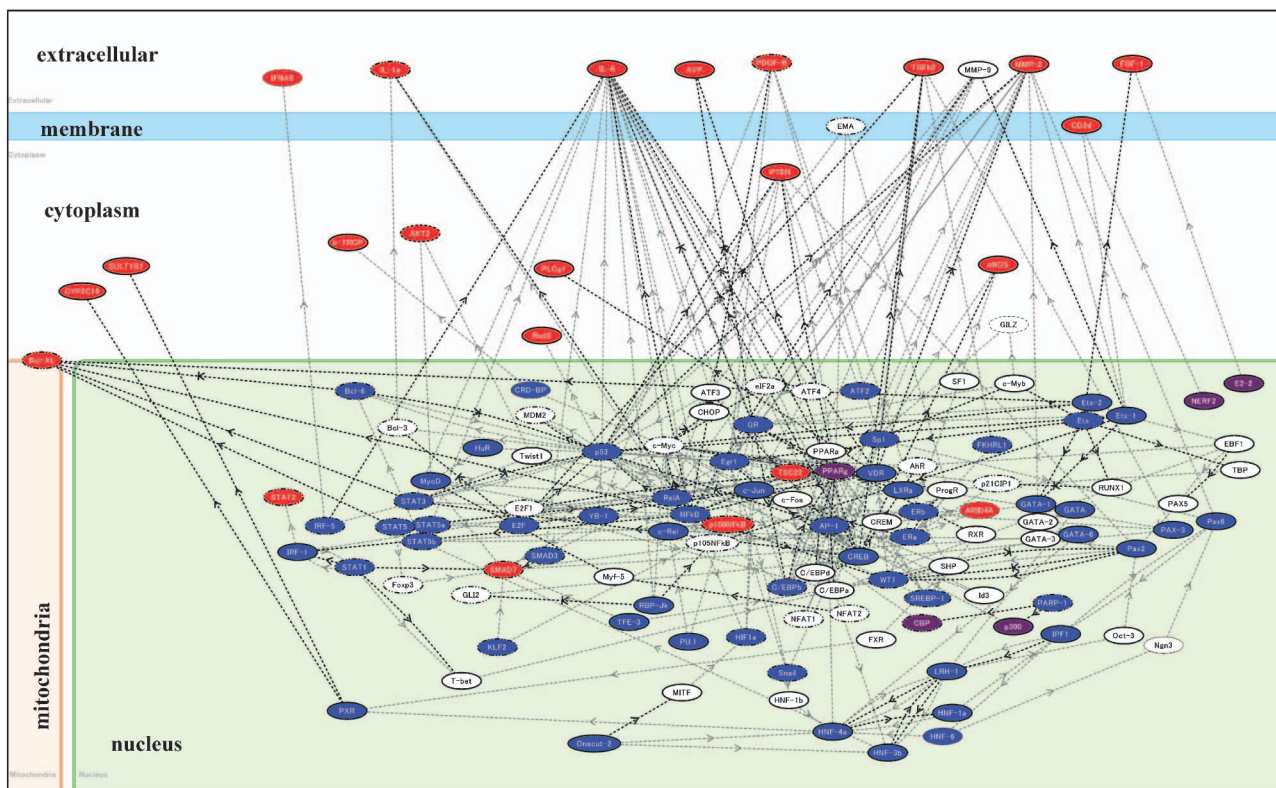


Fig. 2. The Common Upstream Search of Differentially Expressed Genes in T Cells between Relapse and Remission of MS

The GenBank accession numbers and expression levels of 43 genes were imported into KeyMolnet. The “common upstream” search of 43 genes generated a network composed of 128 fundamental nodes with 315 molecular relations. It is illustrated following the subcellular location of molecules. Red nodes represent starting point molecules, whereas blue nodes represent common upstream molecules. Purple nodes exhibit additional molecules extracted automatically from KeyMolnet core and secondary contents incorporated in the network to establish molecular connections. The direction of molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation) or dash line with arrow and stop (transcriptional repression). Thick lines indicate the core contents, while thin lines represent the secondary contents KeyMolnet. The statistical evaluation of the extracted molecular network indicated the most significant relationship with transcriptional regulation by the nuclear factor NF- $\kappa$ B. The figure is cited from the reference No. 18).

型となる PrPC の発現が必須である。また PrP-KO マウスでは、海馬神経細胞の GABA<sub>A</sub> receptor-mediated fast inhibition 障害, circadian rhythm 異常, 小脳 Purkinje 細胞死,<sup>23)</sup> Cu/Zn superoxide dismutase 活性低下, 培養神経細胞の細胞死促進<sup>24)</sup>を認める。われわれは、PrP-KO マウスから線維芽細胞株 (SFK) を樹立し、野生型マウス由来線維芽細胞株 (SFH) と比較した。熱ストレス負荷による熱ショックタンパク質 (heat shock proteins; HSP) の発現誘導は、SFK と SFH は同等であった。<sup>25)</sup> また PrP-KO マウス小脳では、興奮性アミノ酸トランスポーター (excitatory amino acid transporter-4; EAAT4) の発現が保持されていた。<sup>26)</sup> しかし DNA アレイ解析により、SFK における Ras-Rac シグナル伝達系遺伝子群の発現異常を見出した。<sup>27)</sup> 以上の報告は、PrPC が細胞の生存や機能遂行において、なんらかの重要な役割を果していることを示唆

する。

PrPC から PrPSc への構造変換過程には、宿主固有の因子である Protein X が分子シャペロンとして働くと報告されている。<sup>28)</sup> しかしながらいまだ X の本体は解明されていない。現在まで、PrPC 結合タンパク質 (PrPC-interacting proteins; PrPIPs) として、主として Y2H 解析により、GFAP, Bcl-2, Hsp60, APLP1, laminin receptor, Doppel などが同定された。しかし X の候補、すなわち PrPC の構造や機能を直接制御する PrPIPs は発見されていない。最近われわれは、プロテインマイクロアレイを用いて 20 種類の新規 14-3-3 結合タンパク質を同定した。<sup>29)</sup> このプロテオーム解析技術を用いて、PrPIPs の全貌の解明を試みた。<sup>30)</sup>

ヒト PrPC の N 末端と C 末端シグナルペプチドを除去したコンストラクト PrPC23-231 (PR209) を、pSecTag/FRT/V5-His-TOPO® (Invitrogen) に

クローニングした。Flp recombination target (FRT) siteを有する HEK293 細胞 (Flp-In-293; Invitrogen) に導入, 培養上清中に分泌された V5 タグ付き PR209 を HIS-Select Spin Column® (Sigma) で精製, Centricon-10® (Millipore) で濃縮した。プロテインマイクロアレイとしては, 5000 種類のタンパク質が固定された ProtoArray Human Protein Microarray v3.0® (Invitrogen) を用いた。チップ上の全タンパク質は, バキュロウイルスにより昆虫細胞 Sf9 で発現させた GST タグ付きタンパク質で, 翻訳後修飾を受けており, 生理的なタンパク質立体構造が保持されている。このアレイを V5 タグ付き PR209, 抗 V5 Alexa Fluor 647 抗体と順次反応させ, GenePix 4200A スキャナー® (Axon Instruments) で蛍光シグナルを検出した。解析ソフト Prospector

3.0® (Invitrogen) を用いて, 統計学的に有意な結合反応を呈する 47 種類の新規 PrPIPs を同定した。培養ヒト神経細胞モデル系 NT2N を用いて, 発現を確認できた family with sequence similarity 64, member A (FAM64A), polo-like kinase 3 (PLK3), N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG), homeobox A1 (HOXA1) に関しては, 免疫沈降法で PrPC との結合を確認し, 蛍光イメージングで細胞内共局在を確認した。

47 種類の PrPIPs の中 35 種類は, Allen Brain Atlas データベース (www.brain-map.org) では, マウス脳組織におけるオルソログの発現を認めた。Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) version 2007, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID),

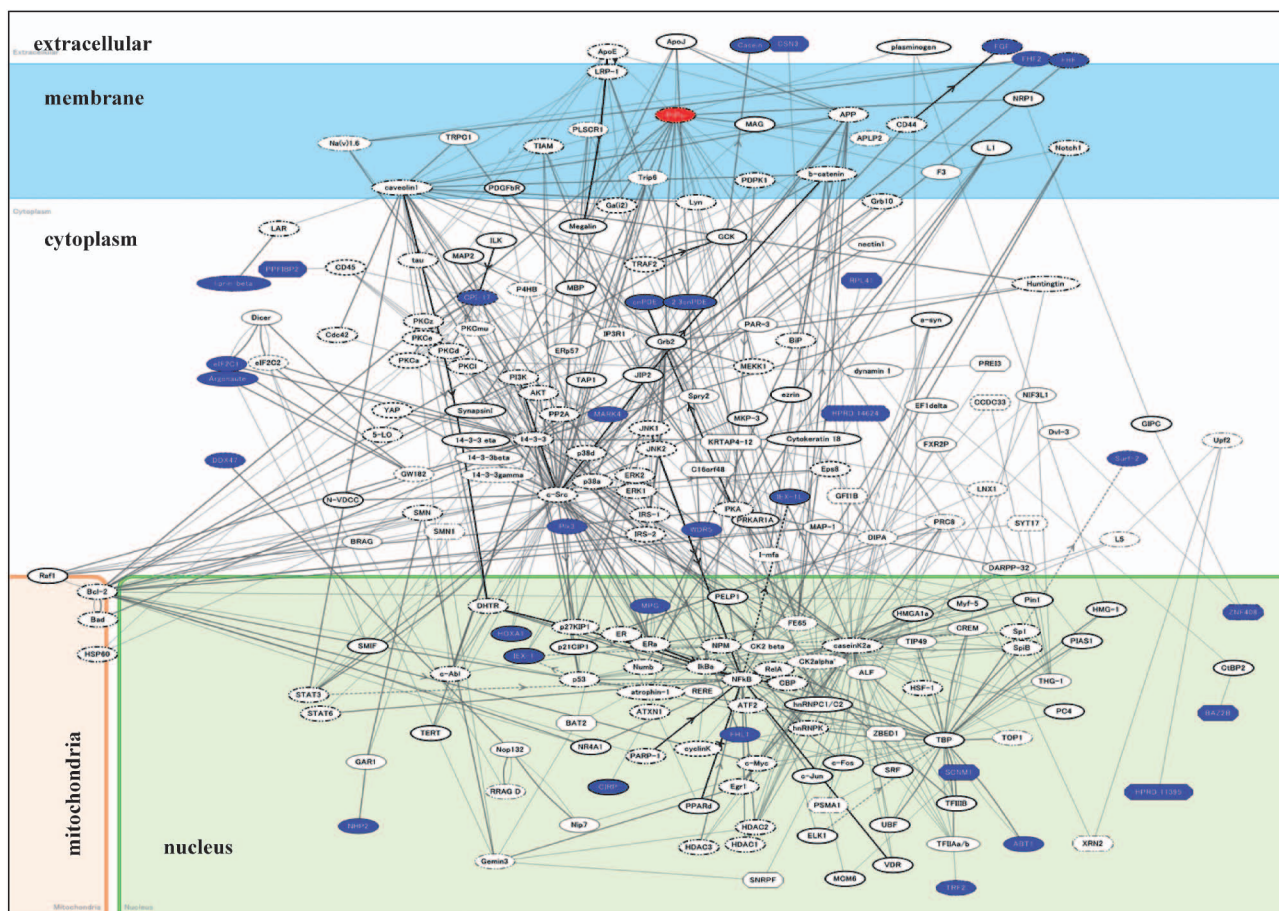


Fig. 3. Molecular Network of PrPC and the Interactors

By importing the list of Entrez Gene ID of 47 PrPIPs, KeyMolnet extracted 39 genes directly linked to 47 PrPIPs. Subsequently, the “N-points to N-points” search starting from PrPC ending with 39 genes generated a complex molecular network composed of 214 fundamental nodes and 579 molecular relations. It is illustrated following the subcellular location of molecules. The red node indicates PrPC on the cell-surface membrane as the starting point, while blue nodes represent PrPIPs. The direction of molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation), solid line with arrow (direct activation), or solid line without arrow (direct interaction or complex formation). Thick lines indicate the core contents, while thin lines represent the secondary contents of KeyMolnet. The statistical evaluation of the extracted molecular network indicated the most significant relationship with AKT, JNK, and MAPK signaling pathways. The figure is cited from the reference No. 30).

NIH データベース (david.abcc.ncifcrf.gov) で、アノテーションを検索すると、多くは核酸認識タンパクに分類された。KeyMolnet による PrPC(始点)-PrPIPs (終点) の分子ネットワーク解析では、AKT, JNK, MAPK シグナル伝達系との関連が、最も有意に示唆された (Fig. 3; 原図は Ref. 30) 参照)。すなわち PrPC は、神経細胞の生存や分化に必要な多数の重要なシグナル伝達因子と結合している。PrPC を中心とするインターラクトームの異常は、プリオン病脳でみられる広汎な神経細胞死を誘導する可能性が示唆された。

### 5. まとめ

2003 年に全ヒト遺伝子 22000 の塩基配列が解読され、マイクロアレイで個々の細胞における全遺伝子発現情報を網羅的に解析可能となり、創薬研究はゲノム創薬へパラダイムシフトした。すなわち、疾患関連遺伝子や薬剤応答遺伝子をトランスクリプトーム・プロテオームレベルで網羅的に解析、創薬標的タンパク質に最適ナリード化合物を探索、合理的な薬物デザインを行うことが重要な戦略となった。われわれは DNA マイクロアレイを用いて、MS 患者 T 細胞遺伝子発現プロファイルを解析、病型を分類、IFN $\beta$  応答遺伝子群を同定した。また MS 再発期特異的 43 遺伝子を同定、KeyMolnet による分子ネットワーク解析で、転写因子 NF- $\kappa$ B を介する遺伝子発現制御系の異常を見出した。またわれわれは、プロテインマイクロアレイを用いて、20 種類の新規 14-3-3 結合タンパク質、47 種類の新規 PrPC 結合タンパク質 (PrPIPs) を同定した。PrPC-PrPIPs の分子ネットワークは、神経細胞の生存や分化を制御する AKT, JNK, MAPK シグナル伝達系と関連していた。分子ネットワーク解析は、膨大なアレイデータの生物学的意味付けの際に、威力を発揮することが分かった。

**謝辞** 本稿執筆にあたり、検体収集・解析にご尽力いただきました国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部山村隆部長、古池史子先生、中西恵美先生、尾上祐行先生、南里悠介先生、山口大学医学部神経内科川井元晴先生、明治薬科大学天竺桂弘子先生および「難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究班」の班員諸氏に深謝申し上げます。上述の研究は、平成 17-18 年度厚生労働科学研究費

補助金こころの健康科学「遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究：H17-こころ-020」、平成 17-18 年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究：KH21101」、文部科学省基盤研究 B18300118「プロテインアレイによるプリオン結合タンパク質の網羅的解析」の補助を受けたものであることを記します。

### REFERENCES

- 1) Satoh J., "Functional Protein Microarrays in Drug Discovery, Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners," ed. by Predki P. F., CRC Press, Boca Raton, 2007, pp. 239-259.
- 2) Allison D. B., Cui X., Page G. P., Sabripour M., *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 55-65 (2005).
- 3) Dupuy A., Simon R. M., *J. Natl. Cancer Inst.*, **99**, 147-157 (2007).
- 4) Whitney A. R., Diehn M., Popper S. J., Alizadeh A. A., Boldrick J. C., Relman D. A., Brown P. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1896-1901 (2003).
- 5) Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C. A., Causton H. C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F. C. P., Kim I. F., Markowitz V., Matese J. C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M., *Nat. Genet.*, **29**, 365-371 (2001).
- 6) Sato H., Ishida S., Toda K., Matsuda R., Hayashi Y., Shigetaka M., Fukuda M., Wakamatsu Y., Itai A., *Curr. Drug Discov. Technol.*, **2**, 89-98 (2005).
- 7) Pomeroy S. L., Tamayo P., Gaasenbeek M., Sturla L. M., Angelo M., McLaughlin M. E., Kim J. Y. H., Goumnerova L. C., Black P. M., Lau C., Allen J. C., Zagzag D., Olson J. M., Curran T., Wetmore C., Biegel J. A., Pogglo T., Mukherjee S., Rifkin R., Califano A., Stolovitzky G., Louis D. N., Mesirov J. P., Lander E. S., Golub T. R., *Nature*, **415**, 436-442 (2002).
- 8) Brown M. P., Grundy W. N., Lin D., Cristianini N., Sugnet C. W., Furey T. S.,



- Ares M., Haussler D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 262–267 (2000).
- 9) McFarland H. F., Martin R., *Nat. Immunol.*, **8**, 913–919 (2007).
  - 10) Bermel R. A., Rudick, R. A., *Neurotherapeutics*, **4**, 633–646 (2007).
  - 11) Steinman L., Zamvil S., *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 483–492 (2003).
  - 12) Satoh J., Nakanishi M., Koike F., Miyake S., Yamamoto T., Kawai M., Kikuchi S., Nomura K., Yokoyama K., Ota K., Kanda T., Fukazawa T., Yamamura T., *Neurobiol. Dis.*, **18**, 537–550 (2005).
  - 13) Satoh J., Nakanishi M., Koike F., Onoue H., Aranami T., Yamamoto T., Kawai M., Kikuchi S., Nomura K., Yokoyama K., Ota K., Saito T., Ohta M., Miyake S., Kanda T., Fukazawa T., Yamamura T., *J. Neuroimmunol.*, **174**, 108–118 (2006).
  - 14) Satoh J., Nanri Y., Tabunoki H., Yamamura T., *BMC Neurol.*, **6**, 18 (2006).
  - 15) Achiron A., Gurevich M., Friedman N., Kaminski N., Mandel M., *Ann. Neurol.*, **55**, 410–417 (2004).
  - 16) Strürzebecher S., Wandinger K. P., Rosenwald A., Sathyamoorthy M., Tzou A., Mattar P., Frank J. A., Staudt L., Martin R., McFarland H. F., *Brain*, **126**, 1419–1429 (2003).
  - 17) Satoh J., Illes Z., Peterfalvi A., Tabunoki H., Rozsa C., Yamamura T., *Neurosci. Lett.*, **422**, 30–33 (2007).
  - 18) Satoh J., Misawa T., Tabunoki H., Yamamura T., *Dis. Markers*, **25**, 27–35 (2008).
  - 19) Pahan K., Schmid M., *Neurosci. Lett.*, **287**, 17–20 (2000).
  - 20) Satoh J., Obayashi S., Misawa T., Tabunoki H., Yamamura T., Arima K., Konno H., *Neuropathology*, (2008) (in press).
  - 21) Van Everbroeck B., Boons J., Cras P., *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **107**, 355–360 (2005).
  - 22) Aguzzi A., Polymenidou M., *Cell*, **116**, 313–327 (2004).
  - 23) Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N., Moriuchi R., Shigematsu K., Sugimoto T., Nakatani A., Kataoka Y., Houtani T., Shirabe S., Okada H., Hasegawa S., Miyamoto T., Noda T., *Nature*, **380**, 528–531 (1996).
  - 24) Kuwahara C., Takeuchi A. M., Nishimura T., Haraguchi K., Kubosaki A., Matsumoto Y., Saeki K., Matsumoto Y., Yokoyama T., Itohara S., Onodera T., *Nature*, **400**, 225–226 (1999).
  - 25) Satoh J., Yukitake M., Kurohara K., Nishida N., Katamine S., Miyamoto T., Kuroda Y., *Exp. Neurol.*, **151**, 105–115 (1998).
  - 26) Yukitake M., Satoh J., Katamine S., Kuroda Y., *Neurosci. Lett.*, **352**, 171–174 (2003).
  - 27) Satoh J., Kuroda Y., Katamine S., *Am. J. Pathol.*, **157**, 59–68 (2000).
  - 28) Kaneko K., Zulianello L., Scott M., Cooper C.M., Wallace A. C., James T. L., Cohen F. E., Prusiner S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 10069–10074 (1997).
  - 29) Satoh J., Nanri Y., Yamamura T., *J. Neurosci. Methods*, **152**, 278–288 (2006).
  - 30) Satoh J., Obayashi S., Misawa T., Sumiyoshi K., Oosumi K., Tabunoki H., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, (2008) (in press).