

## 高密度逆相タンパク質ライセートマイクロアレイ

西塚 哲<sup>1,2</sup>, 石田 和茂<sup>2</sup>, 野田 宏伸<sup>2</sup>, 高橋 正浩<sup>2</sup>, 若林 剛<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>米国国立がん研究所, <sup>2</sup>岩手医科大学医学部外科)

### 1. はじめに

転写レベルでのマイクロアレイ技術に代表されるように、探索子の高密度化による材料のハイスループット解析が一般的に行われるようになって久しい。一方、細胞内の分子反応の設計図であるゲノム情報に対し、実際の反応の主役であるタンパク質分子を多数のサンプルを対象に、しかも定量的に測定する技術は、その材料の取り扱いの難しさや既存の装置の試料互換性に問題があり開発が遅れていた。我々と米国オーションバイオシステムズ社のグループでは、通常探索子を多くプリントするフォーマットとは逆に、解析対象のサンプルを大量にプリントすることを目的とした超高密度逆相タンパク質ライセートマイクロアレイシステムを開発した<sup>1-2)</sup>。この技術は、多数のサンプルについて実験間の誤差による影響を最小限に抑え一度に処理することが可能であるため、時間軸や刺激の強さなどによって変化する細胞内のタンパク質レベルでの変化を定量的に捉えることに威力を発揮する。本稿では、細胞刺激としての培養がん細胞への抗がん剤の添加をモデルとした、同技術を用いた実験系について紹介する。

### 2. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験とは細胞を試験管内で培養し、それに濃度希釈系列を用いた薬剤などの刺激を添加することで、その刺激に応じた細胞増殖の度合いを判定する試験である。がん領域では、(抗がん剤としての)候補化合物の殺細胞効果のスクリーニングや、生体材料を用いた抗がん剤の感受性試験などに広く用いられている<sup>3,4)</sup>。培養細胞を用いるという点で、生体内で起こりえる反応を全て反映しているものではないが、定量性があり比較的簡便に行えるこ

とから、細胞生物学的、薬理学的情報の獲得には有用な技術である。

細胞増殖抑制の程度の判定はSDI (Succinic dehydrogenase inhibition) 法, CCK-8 (Cell Counting Kit) 法, ATP法などに基づいて間接的に細胞の酵素活性を測定しているものである。薬剤の感受性に関連した分子レベルでの変化を詳細に追跡するには、再現性の高い細胞レベルでの実験系が必要である。細胞増殖抑制試験は、細胞生物学的な判定によりその有用性が認識されてきたが、その再現性の高さと増殖抑制という明瞭な表現型の提示が可能であることから、その間に起こっている対応した細胞周期関連タンパクの変化やアポトーシスを誘導するシグナル伝達といった分子反応を解析することにおいても非常に適したモデル系であるといえる。本技術の詳細については他稿に譲るが、細胞生物学的実験系から得られる(薬剤の効果が有りと判定される)増殖抑制という表現型を分子レベルでの事象と比較するためのセット技術として、本稿でのRPA (Reverse-phase Protein Lysate Microarray)はこの実験系との比較を基にしたものを述べる。

### 3. 高密度逆相タンパク質ライセートアレイ

RPAは2001年にPawletzらにより、同一がん組織の組織学的進展度に応じた微量サンプルからのタンパク質量を可能にする技術として報告された<sup>5)</sup>。原理はドット方式のウェスタンブロットであり、ガラススライド上のニトロセルロース膜にサンプルをブロットすることで、電気泳動による分子量での展開を行わずに数百から数万のオーダーで一度に解析できる。従って、大量サンプルのスクリーニングや抗体の特異性が確定された検出系では既存のほとんどの技術を凌ぐスループットが実現されている。

RPAにプリントされるサンプルとしては細胞溶解液(ライセート)が主なものであるが、これは非常に粘張度が高く通常の液体処理の装置では回路の目詰まりなどにより対応できないことが多い。また、サンプルバッファーは揮発性のものを含まない、温度の変化にも沈殿を生じないなどの注意が必要である。これらの問題に対応するために、

High density 'reverse-phase' protein lysate microarray  
Satoshi Nishizuka<sup>1,2</sup>, Kazushige Ishida<sup>2</sup>, Hironobu Noda<sup>2</sup>,  
Masahiro Takahashi<sup>2</sup> and Go Wakabayashi<sup>2</sup> (U.S. National  
Cancer Institute, <sup>2</sup>Department of Surgery, Iwate Medical  
University School of Medicine, 19-1 Uchimarui, Morioka,  
Iwate 020-8505, Japan)

## テクニカルノート

表1 細胞ライセート作成用のバッファの組成

	Laemmli	Pink
変性剤	熱/SDS	9M urea
界面活性剤	2% SDS	4% CHAPS
還元剤	5% BME	65mM DTT
プロテアーゼ・ホスファターゼ阻害剤	使用	不使用
その他	0.06 M Tris HCl 10% glycerol bromphenol blue	2% Pharmalyte pH 8-10.5 bromphenol blue

SDS, sodium dodecyl sulfate; BME, beta mercaptoethanol; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; DTT, dithiothreitol.

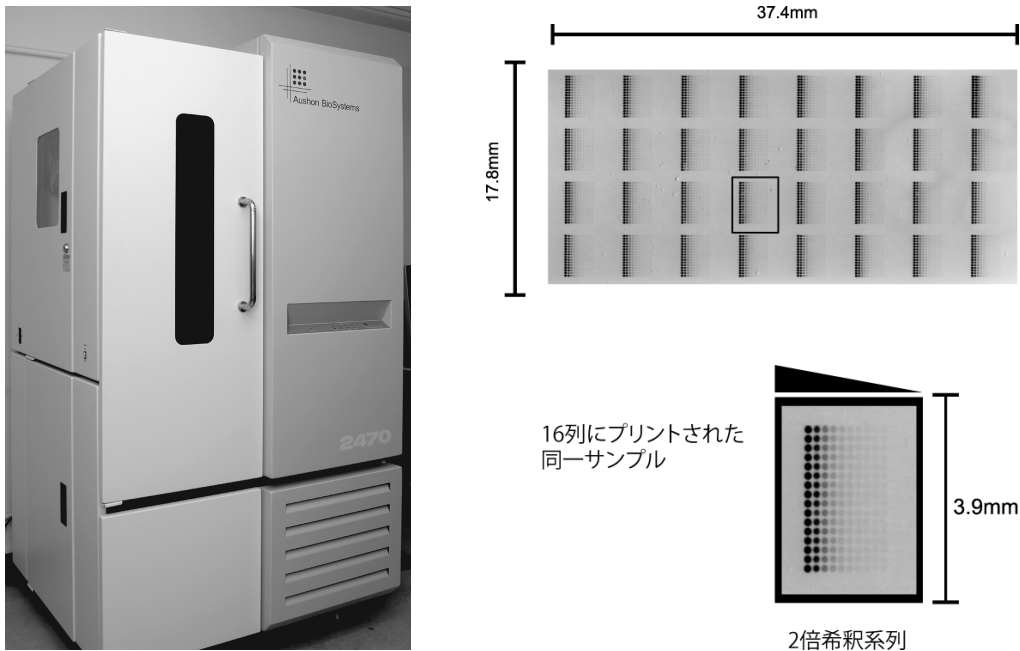


図1 オーションバイオシステムズ社製マイクロアレイヤーと RPA

(左図) オーションバイオシステムズ社製マイクロアレイヤー。大きさは94×89×185cm。前面および側面のドアを開けて最大30枚の384穴マイクロプレート、100枚のスライドを搭載することができる。(右上图) 作成されたテスト用RPA。同一サンプル(HCT116大腸がん細胞株ライセート)を32ピンのヘッドを使い15回繰り返してプリントした。(右図下) 単独のピンでプリントされた「フィールド」。2倍希釈系列でプリントされた列が16ある。

我々は Pink buffer という二次元電気泳動用のバッファの組成に近いものを用いている(表1)。尿素による加熱を必要としないタンパク質変性を行い、低揮発性の還元剤(DTT)を用いていることは長時間大気圧に暴露されるマイクロアレイのプリントにおいて有利である。また、SDSではなくCHAPSを界面活性剤として用いていることでライセートの凍結融解にも沈殿を生じずに対応できる。液体の時間当たりの蒸発は、温度・湿度が一定なら概ね体積に対する大気圧への接触面積によって決まる。従って、使用するバッファ、ウェルの形状の特性を理解し、プリント時の温度・湿度をよくコントロールしておくことが重要である<sup>6)</sup>。我々の検討では、V底384ウェルプレートに20 $\mu$ lのPink bufferで作製されたライセートを、室温で80%以

上の湿度に放置した場合、約2時間で10%以内の体積ロスに抑えることができた(実際には1時間以内にプリントを終了するように設定している)。このようにプリントサンプルに対する品質管理には十分な根拠を持っていることが重要である。

米国オーションバイオシステムズ社と我々のグループが共同で開発したAushon2470マイクロアレイヤー(図1)を用いれば、RPA作製に必要な各検体の量は1種類のアレイあたり380 $\mu$ l程度であるため、数十 $\mu$ lのサンプルをマイクロプレート中に準備することで理論的には数万スライドの作成が可能である。マイクロプレート内の各ウェルには、アレイヤーによるプリントの前に、予め10段階にわたる2倍の希釈系列を準備しておき、シグナルの読み取り

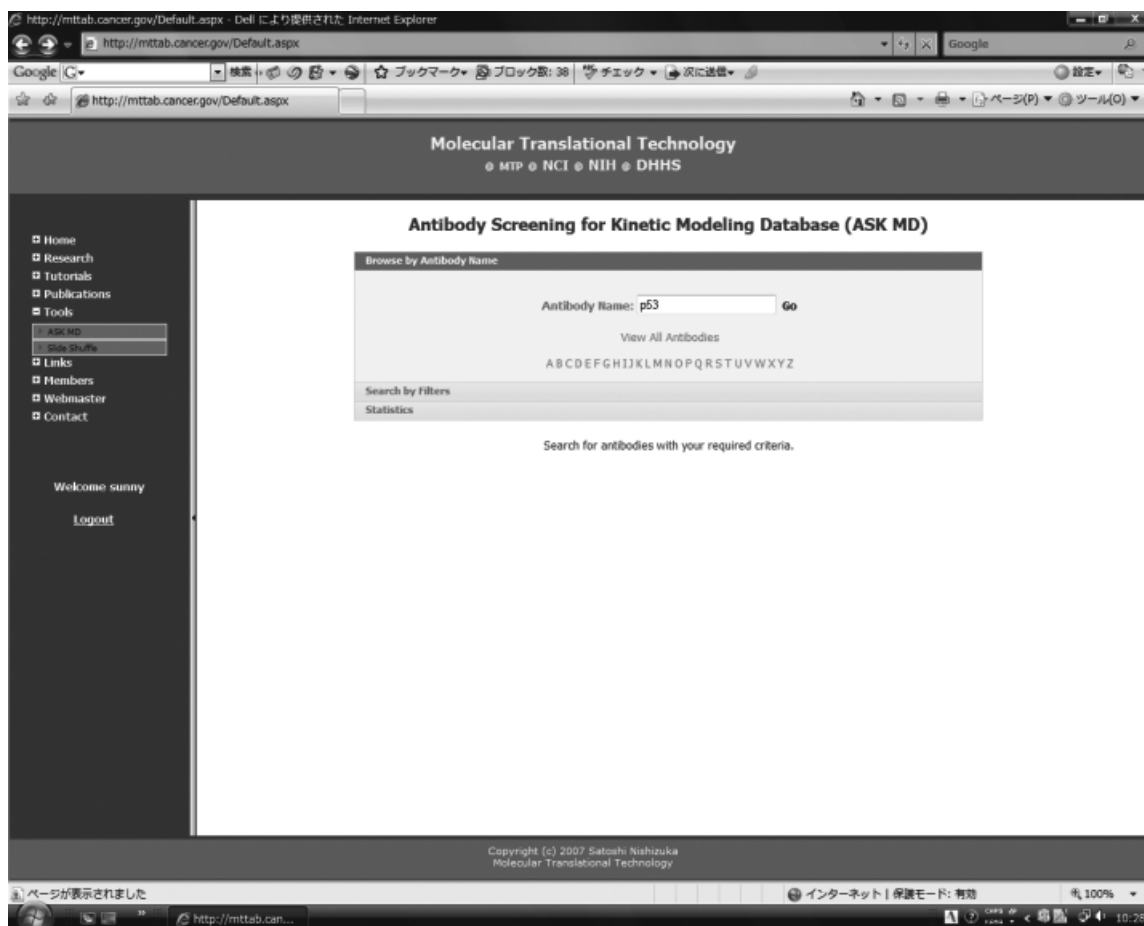


図 2A

を semi-log scale となるようにしておく。従って、1 枚のガラスライド上に 20,000 のスポットがある場合は、前述の希釈系列を用いたフォーマットでは 2,000 サンプルを解析できることになる。これにより、プリントされたサンプル中の総タンパク質濃度とシグナルとの関係から、最も線型性の高い部分をデータ抽出レンジとした極めて定量性に優れた解析が可能となる<sup>6,7)</sup>。

細胞の増殖の程度に対応した分子反応をモニタリングするために、我々は細胞増殖アッセイで 0%, 50%, 100% の増殖抑制効果が得られた細胞、薬剤の種類、薬剤の濃度の組み合わせ条件を T-25 フラスコで再現し、薬剤に暴露された細胞をペレットとして回収後、Pink buffer を用いてライセートを調整している。我々の経験では、T-25 フラスコで大腸がん細胞株 HCT116 を培養した場合、80% confluent (約  $2.0\text{--}3.0 \times 10^6$  細胞数) であれば、20–30 $\mu$ l 程度のライセートが得られる。この程度のライセート量でも、通常我々が解析対象としている 20–40 種類の特異的の一次抗体による染色に十分な RPA を作成できる<sup>1,8)</sup>。

同程度の細胞増殖抑制が見られても、細胞・薬剤の種類、薬剤の濃度によって反応しているタンパク質または細胞シグナルは異なっていると考えられる。しかしながら、これらの仮説を検証するには膨大な数のサンプルが必要となり、解析法もそれらを一度に処理できるものである必要がある<sup>9)</sup>。上記の様々な組み合わせを用いた細胞ペレットの回収を時系列で行うと、サンプルの数は直ちに数百から数千となる。回収は手作業で行うので、膨大な労力を要するが、様々な要因によって変化する細胞シグナルを詳細にモニタリングすることが可能となる。

#### 4. 抗体によるタンパク質の定量

RPA は電気泳動でのサンプルの分子量による展開を行わないドットプロット方式のウェスタンプロットであるため、特異性の高い抗体を用いることが肝要である。一つのドットから得られるシグナルは、ウェスタンプロットなどでは展開しうる分画にある全てのバンドの総和である。もし非特異的なバンドを含んでいれば、ドットから得られる

## テクニカルノート

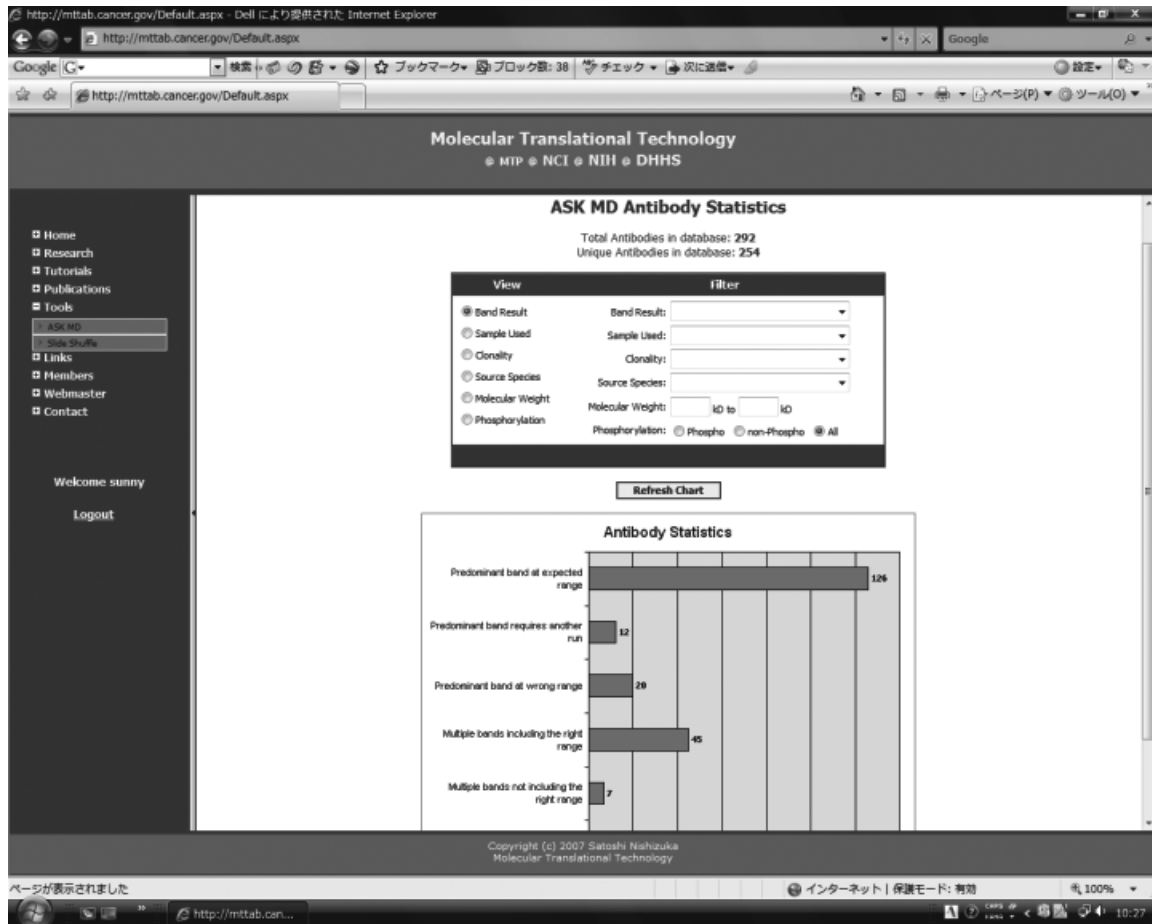


図 2B

シグナルは目的とする特異的なバンドの挙動を覆い隠してしまっている可能性がある。我々はこれらの RPA データの品質管理にかかわる問題を整理するため、抗体の特異性に関するデータベースを構築した (図 2)。これらのデータベースは、RPA で対象となるサンプルに対するそれぞれの抗体の特異性すなわちウェスタンブロット上でバンドが 1 本になるかに着目し、結果を 'single band at expected range' から 'no band' などを含んだ五つに分け、relational database の形式で整理している。これらに加えて市販されている抗体に付随する情報も入力してあり、RPA 以外のアプリケーションにも有用である。ここで重要なのは、抗体の特異性は抗体のみによってではなく、抗体とサンプルの組み合わせで決まるということである。ウェスタンブロットでその抗体特異性が確認されていないサンプルは、RPA を使用した際の解釈に注意を要する。我々が既に発表している二つのデータベースは、抗体のスクリーニングを行う際に、① 60 種類のがん細胞株の混合ライセート<sup>10)</sup>、および② 1 種類のがん細胞株の様々な刺激を加えたのち採取し

たライセート<sup>11)</sup>、を使用している。①のような、細胞が静的状態にある時のライセートはそれぞれのタンパク質のベースラインを知るのに適しており、構造タンパク質などによる細胞の分類には向いている。一方、細胞シグナルに関与するリン酸化などは常に活性化されているもの以外は、それらがどのように誘導されるかが重要であるため、刺激を加えた後に採取されたライセートを用いないと陰性の割合が多くなってしまう。RPA による細胞シグナルの実験的検証では、上記②をどのように効率よく行うかが、研究全体の鍵を握っている。

大量のサンプルがプリントされたスライドは、尿素などの残留バッファー成分を取り除くため、界面活性剤入りのトリス緩衝液で洗浄され、その後カゼインなどを主成分とするブロッキングバッファー中でインキュベートされる。その後、特異的抗体、TSA (Tyramide Signal Amplification) 法を用いた DAB (3,3'-diaminobenzidine) による発色を行い、市販の光学フラットベッドスキャナーでその度合いをデジタル化する。一連のプロトコルや画像の取り込

The screenshot shows the ASK MD web interface. At the top, it says 'Molecular Translational Technology' with logos for MTP, NCI, NIH, and DHHS. The main heading is 'Antibody Screening for Kinetic Modeling Database (ASK MD)'. Below this is a search form with 'Antibody Name: p53' and a 'Go' button. A 'View All Antibodies' link and an alphabet index 'ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ' are also present. A 'Search by Filters' section is partially visible. The main content is a table with columns: Antibody Name, Band Result, Sample Used, Wellers Dilution, Immunogen Species, Molecular Weight, Phospho, Vendor, and Catalog Number. The table lists various p53 antibodies and their characteristics. At the bottom, there is an 'Export to Microsoft Excel' button and a copyright notice for 2007 Satoshi Nishizuka.

Antibody Name	Band Result	Sample Used	Wellers Dilution	Immunogen Species	Molecular Weight	Phospho	Vendor	Catalog Number
Phospho-p53 (Ser15) 16G8 Monoclonal Antibody	Predominant band requires another run	HCT159 pool	1000	Mouse	53	Yes	Cell Signaling	2285
Phospho-p53 (Ser6) Antibody	Predominant band at wrong range	HCT116 IR pool	1000	Rabbit	53	Yes	Cell Signaling	2283
Phospho-p53 (Ser9) Antibody	Predominant band at expected range	A431 Growth Factor MIX	1000	Rabbit	53	Yes	Cell Signaling	2288
Phospho-p53 (Ser15) Antibody	Predominant band at expected range	HCT116 IR pool	1000	Rabbit	53	Yes	Cell Signaling	2284
Phospho-p53 (Ser15) 16G8 Monoclonal Antibody	Predominant band requires another run	HCT159 pool	2000	Mouse	53	Yes	Cell Signaling	2285
Phospho-p53 (Ser20) Antibody	Predominant band at expected range	A431 Growth Factor MIX	1000	Rabbit	53	Yes	Cell Signaling	2287
Phospho-p53 (Ser37) Antibody	Predominant band at expected range	A431 Growth Factor MIX	1000	Rabbit	53	Yes	Cell Signaling	2289
Phospho-p53 (Ser46) Antibody	Predominant band at expected range	ATRFLX IR	1000	Rabbit	53	Yes	Cell Signaling	2321
Phospho-p53 (Ser392) Antibody	Predominant band at expected range	HCT116 IR pool	1000	Rabbit	53	Yes	Cell Signaling	2322
Purified mouse anti-human p53 monoclonal antibody	Predominant band at expected range	HCT159 pool	250	Mouse	53	No	Transduction Laboratories	254293

図 2C

みに必要なソフトウェアは我々のウェブサイトから無料でダウンロードできる (<http://mttab.cancer.gov>)。

### 5. 実験による細胞シグナル理論の検証

多数のサンプルを同時に計測できるというRPAの最大の利点を現状で最もよく利用できるのは、細胞内タンパク質シグナルの解析である。理論生物学の発展と情報知識データベースの充実に伴い、シグナルを微分方程式群などの理論式で表し、perturbationモデルとの比較でパラメータを決定する手法が用いられている。これらのモデルに対応した実験系は、リン酸化を経時的定量的に追跡する必要があり、また複雑なネットワークを構築している分子を解釈するためにより多くのタンパク質の種類での観察が可能である必要がある。また、細胞シグナルに重要な役割を果たすタンパク質分子のリン酸化を簡便に測定するために抗キナーゼ抗体・抗リン酸化抗体を用いた系が便利である。抗体・ペプチドアレイや蛍光物質の減衰を利用した方法も報告されているが<sup>12-14)</sup>、RPAはそれらと比較しても細胞シ

グナル解析に必要なリン酸化に関する情報を効率よく解析できる点で優れている。

既に時系列でのタンパク質発現量の変化を基にシグナルを解析しようとする試みが報告されている。我々のグループでは、p53-Mdm2タンパク質のフィードバックループをモデルとして理論式を実験で検証した<sup>8)</sup>。始めに30Gyの $\gamma$ 線照射に対する野生型p53の細胞株から得られた細胞刺激に対するp53およびMdm2タンパク質の時系列反応をもとに微分方程式のパラメータを決定した。p53遺伝子をノックアウトした細胞のMdm2タンパク質量の変動をp53遺伝子およびその産物に該当する項を消去した数式群から得られる理論上のMdm2タンパク質量の変動と比較することで、理論式の確からしさを検証することができた(図3)。

### 6. がん治療への応用

長年にわたり用いられてきた抗がん剤に加え、分子標的薬に注目が集まっている。どのような抗がん剤でも標的と

## テクニカルノート

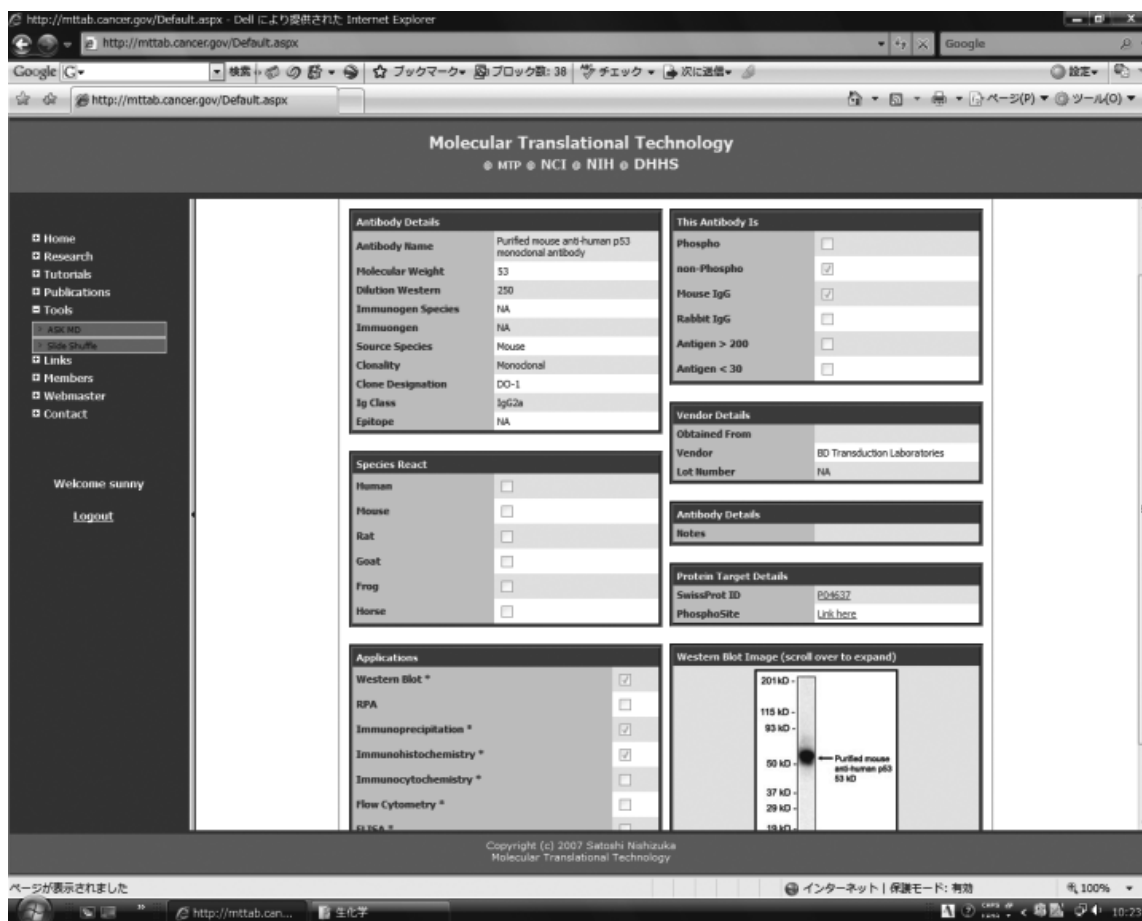


図 2D

図 2 RPA での定量解析に使用するための抗体スクリーニングデータベース「ASKMD」

(A) エントランスビューで目的とするタンパク質を入力、あるいはアルファベットごとにブラウジングする。(B) スクリーニング済み抗体の集計画面。特異的な抗体の割合やサンプルごとのウェスタンブロットの結果が表示される。(C) 抗原に対応した抗体のリストを表示。p53 タンパク質には複数の抗リン酸化抗体がある。(D) 各々の抗体の詳細。ウェスタンブロットの結果は写真で表されている。

なる特定の分子群があることは想定されるが、分子標的薬は創薬の時点から標的分子への結合や活性の阻害を目的にデザインされている点が従来の薬剤とは異なる。しかしながら、trastuzumab などの一部の例外を除いて、その標的分子の状態によって投与を決定するという段階へは至っていない。理由として、薬剤が標的分子に作用することで起こる副作用や細胞シグナルの阻害などは、標的分子以外の多数の因子が関与しており、従来法では網羅できる範囲に著しい制限があったため、分子状態と薬効との因果関係を明確にできなかったということが挙げられる。従って、分子標的薬もそれ以外の薬剤も効果予測や薬効機序の解明には同様の課題を持っていると言える。

RPA を用いた実験系の利点は、時間や薬剤の濃度などの因子を変化させた場合に起こりうる細胞内の反応を詳細

に観察できることである。我々のグループでは、このようなアプローチを確立するため、段階的に実験を進めている。最初に、放射線、紫外線、汎用薬剤など既知の細胞障害性の刺激を加え、予想される反応が RPA で観察されることの検証<sup>1)</sup>、次に知識ベースのタンパク質ネットワークモデルを用いた薬剤反応予測の実験的検証<sup>2)</sup>、複数の汎用薬剤を用いた分子レベルの反応の違いの検証、さらに薬剤抵抗性細胞集団による耐性獲得機序の解明などである。

これからの薬剤によるがん治療の要点として、投与前後の効果予測・判定を分子レベルで行うことが挙げられる。分子標的薬に限らず、どのような薬剤でも投与条件や対象臓器により、反応が惹起される分子経路がある程度確定される必要がある。モデル細胞を用いて RPA で検討することで、高い精度の薬効予測・判定が可能になるものと思わ

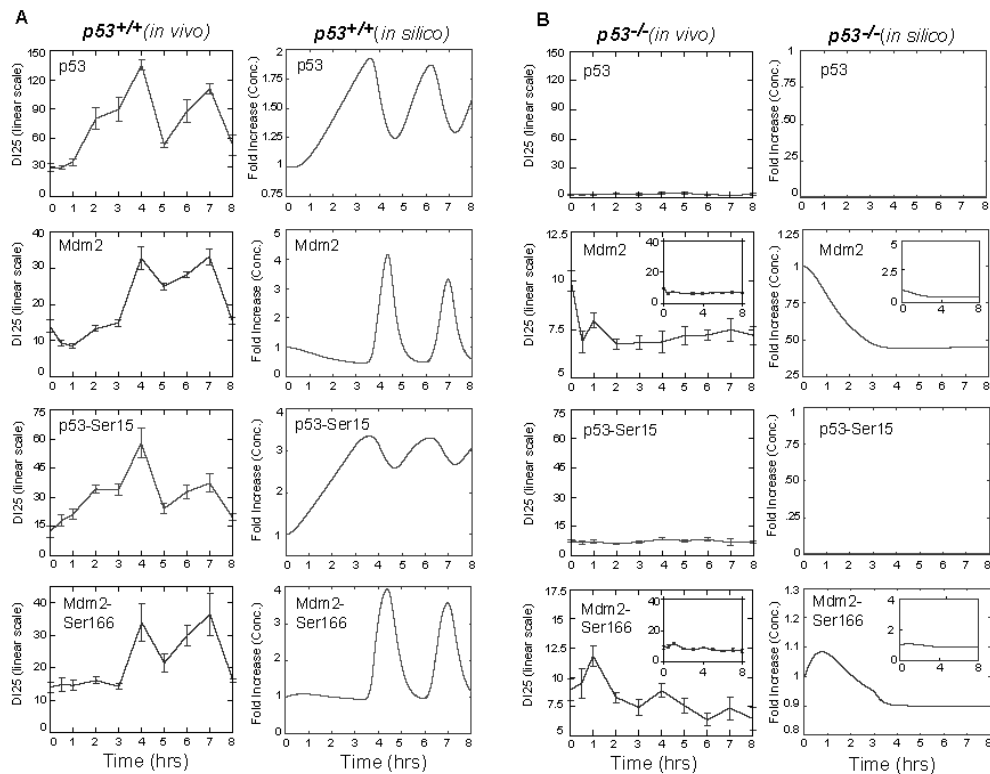


図3 p53-Mdm2 フィードバックループ数学モデルと時系列データとの比較

(A)野生型 p53 タンパク質の時系列における発現レベルの推移を元に数学モデルのパラメータを決定した。30Gy の  $\gamma$  線照射後 8 時間以内での二峰性の発現、照射直後の Mdm2 の分解、リン酸化 p53 タンパク質の迅速な上昇、および急性期でもレベルを一定に保つリン酸化 Mdm2 などの所見が再現されている。(B) p53 遺伝子ノックアウト株における Mdm2 タンパク質の発現。数学モデルでは p53 遺伝子に該当する部分が削除され、対応した Mdm2 の発現を観察できる。

れる。

## 謝辞

本稿は Brett Spurrier, Sundhar Ramalingam 両氏の業績を中心に紹介した。

- Nishizuka, S., Ramalingam, S., Spurrier, B., Washburn, F.L., Krishna, R., Honkanen, P., Young, L., Shimura, S., Steeg, P.S., & Austin, J. (2008) *J. Proteome Res.*, 7, 803-808.
- Nishizuka, S. & Spurrier, B. (2008) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19, 41-49.
- Weinstein, J.N., Myers, T.G., O'Connor, P.M., Friend, S.H., Fornace, A.J. Jr., Kohn, K.W., Fojo, T., Bates, S.E., Rubinstein, L.V., Anderson, N.L., Buolamwini, J.K., van Osdol, W. W., Monks, A.P., Scudiero, D.A., Sausville, E.A., Zaharevitz, D.W., Bunow, B., Viswanadhan, V.N., Johnson, G.S., Wittes, R.E., & Paull, K.D. (1996) *Science*, 275, 343-349.
- Yamori, T., Matsunaga, A., Sato, S., Yamazaki, K., Komi, A., Ishizu, K., Mita, I., Edatsugi, H., Matsuba, Y., Takezawa, K., Nakanishi, O., Kohno, H., Nakajima, Y., Komatsu, H., Andoh, T., & Tsuruo, T. (1999) *Cancer Res.*, 59, 4042-4049.
- Paweletz, C.P., Charboneau, L., Bichsel, V.E., Simone, N.L., Chen, T., Gillespie, J.W., Emmert-Buck, M.R., Roth, M.J., Petricoin III, E.F., & Liotta, L.A. (2001) *Oncogene*, 20, 1981-1989.
- Nishizuka, S., Charboneau, L., Young, L., Major, S., Reinhold, W.C., Waltham, M., Kouros-Mehr, H., Bussey, K.J., Lee, J.K., Espina, V., Munson, P.J., Petricoin, E. 3rd, Liotta, L.A., & Weinstein, J.N. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 14229-14234.
- Nishizuka, S. (2006) *Eur. J. Cancer*, 42, 1273-1282.
- Ramalingam, S., Honkanen, P., Young, L., Shimura, T., Austin, J., Steeg, P.S., & Nishizuka, S. (2007) *Cancer Res.*, 67, 6247-6252.
- Spurrier, B., Honkanen, P., Holway, A., Kumamoto, K., Terashima, M., Takenoshita, S., Wakabayashi, G., Austin, J., & Nishizuka, S. (2008) *Biotechnol. Adv.*, 26, 361-369.
- Major, S.M., Nishizuka, S., Morita, D., Rowland, R., Sunshine, M., Shankavaram, U., Washburn, F., Asin, D., Kouros-Mehr, H., Kane, D., & Weinstein, J.N. (2006) *BMC Bioinformatics*, 7, 192.
- Spurrier, B., Washburn, F.L., Asin, S., Ramalingam, S., & Nishizuka, S. (2007) *Proteomics*, 7, 3259-3263.
- Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hy-

## テクニカルノート

- 
- 
- land, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A.J., Rogers, A.M., Capuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B.E., Cantley, L.C., & Jänne, P.A. (2007) *Science*, **316**, 1039–1043.
- 13) Kung, L.A. & Snyder, M. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **7**, 617–622.
- 14) Ma, H., Deacon, S., & Horiuchi, K. (2008) *Expert Opin. Drug Discov.*, **3**, 607–621.
- 15) 西塚 哲, Spurrier, B., Honkanen, P., Austin, J., & 若林 剛 (2008) 癌と化学療法, **35**, 200–205.
-