PCR-Select™ cDNA Subtractionで得たライブラリーから *in vitro* での血管新生に関与する転写産物を検出

C. N. Hahn[1], Z.J. Su[1], C. J. Drogemuller[1], A. Tsykin[1,3], S. R.Waterman[1], P. J. Brautigan[1], S.Yu[1], G. Kremmidiotis[2], A. Gardner[2], P. J. Solomon[3], G. J. Goodall[1,4], M. A.Vadas[1,4] and J. R. Gamble[1,4]

[1] Human Immunology, Hanson Institute, Frome Rd, Adelaide, SA, 5000 Australia.
[2] Bionomics Limited, 31 Dalgleish St, Thebarton, SA, 5031 Australia.
[3] School of Mathematics, The University of Adelaide, Adelaide, SA, 5005 Australia.
[4] Department of Medicine, The University of Adelaide, Adelaide, SA, 5005 Australia.

本研究では、マイクロアレイ解析と組み合わせて*in vitro*の血管新生において制御される遺伝子を選択するために、SMART™ cDNA合成技術を用いて少量のtotal RNAを増幅し、PCR-Select™ cDNA Subtraction Kitによって、濃縮されたcDNAライブラリーを作製しました。この方法により、生理学上関連のある標的遺伝子が濃縮されているカスタムメイドのマイクロアレイの作製が可能となりました。SMART cDNAから得たバーチャルノーザン（VN）ブロットを用いて、遺伝子の発現レベルの違いを測定しました。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析は、発生過程における細胞レベルでのmRNAの全体的変化、または内因性、外因性の刺激に伴う全体的変化を研究するための強力なツールです。しかし、マイクロアレイでは、既知およびタンパク質をコードすると推定される遺伝子の大半を含むものであっても、発生過程や細胞タイプの違いあるいは刺激に伴って変化する可能性のある選択的スプライシング、プロモーター、およびポリアデニル化による調節の有無を提示することは出来ません。細胞または生理学的な現象に関連する、未知または予測される転写産物の同定を可能にする手法としては、ディファレンシャルディスプレイ、Serial analysis of gene expression（SAGE）、Suppression Subtractive Hybridization（SSH）がありますが、これらの手法はそれぞれ多量の開始試料（例：5～50 μgのtotal RNA）が必要となります。

PCR-Select™ cDNAサブトラクテッドライブラリーを用いた、血管新生研究用のカスタムメイドマイクロアレイの作製

カスタムメイドのマイクロアレイを設計し、毛細血管形成過程において発現が変化する遺伝子を同定する方法の概要を図1に示しています（1）。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を3次元コラーゲンマトリックスにプレーティングし、毛細血管形成を誘発しました。次に、0、0.5、3、6、24時間目のRNAを単離しました。ClontechのSMART PCR cDNA Synthesis Kit（Cat. No. 634902）を用いて、1μgのtotal RNAから十分なcDNAを調製しました。ここでのSMART法による1回の増幅では、cDNA存在比にほとんど変化はありません（2）。続いて、ClontechのPCR-Select™ cDNA Subtraction Kit（Cat. No. 637401）を使用し、0と0.5時間、0.5と3時間、3と6時間、6と24時間の組み合せでのSuppression Subtractive Hybridizationをサンプル、コントロールを入れ替え両方向（正、逆）に行いました。正と逆のライブラリーをそれぞれ4つ作製しました。

（22ページへに続く）

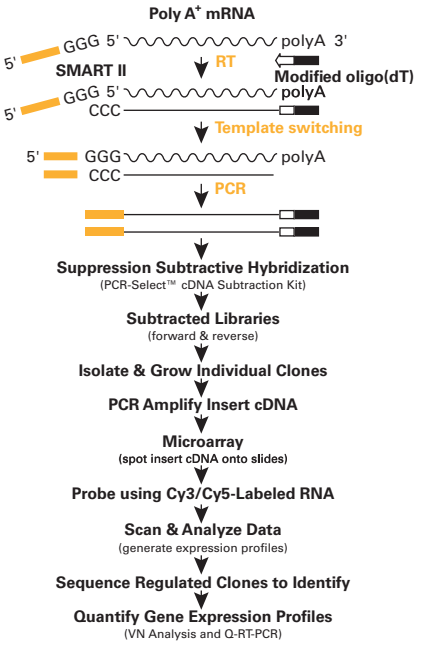

図1. SMART PCR cDNA Synthesis Kitを用いたcDNAの合成および増幅。
SMART cDNA合成技術と、PCR-Select™ cDNA Subtraction Kitを用いて作製したカスタムメイドのマイクロアレイによる*in vitro*での血管新生に特異的に発現する遺伝子の同定法を示すフローチャート。

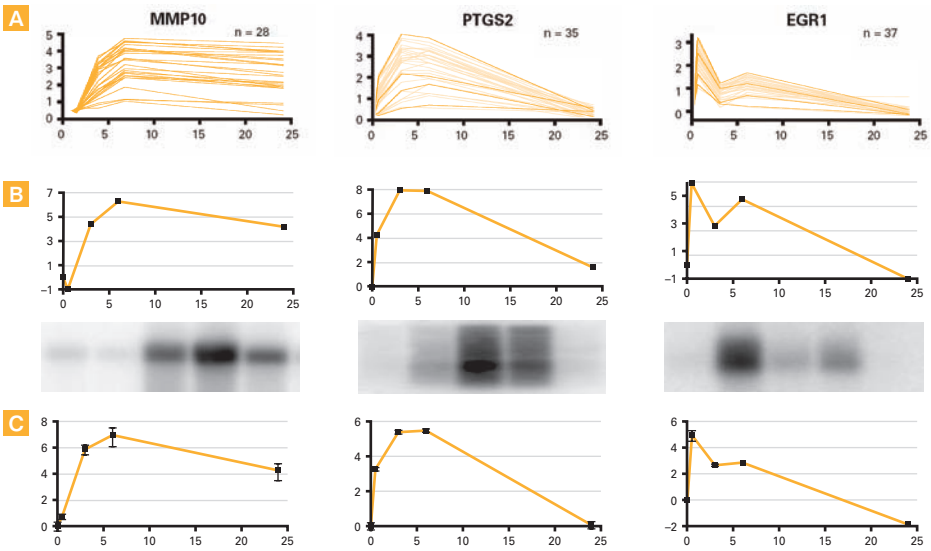

図2. マイクロアレイ、定量的RT-PCR（Q-RT-PCR）、およびバーチャルノーザン（VN）分析による血管新生の時間経過プロファイルの比較。
マイクロアレイからのMMP10、PTGS2およびEGR1の発現プロファイル（**パネルA**）をバーチャルノーザン（VN）分析（**パネルB**）およびQ-RT-PCR（**パネルC**）を用いて定量しました。ゼロ時間（y軸）に対する時間（hr：x軸）について誘導比（log2）をプロットしてあります。
パネルA：同じ遺伝子に関するcDNA断片からのプロファイルを重ねてあります。各クローンの各遺伝子にプロットしたプロファイルの総数（n）を右上に示しています。**パネルB**：VNブロットを蛍光イメージングにより定量し、時間でマッチさせた対照のペプチジルプロリル異性化酵素A（サイクロフィリンA）に対して正規化し、その結果を各ブロットの上に示しました。**パネルC**：Q-RT-PCRを3回実施し、平均を対照のPPIAに対して正規化しました。

PCR-Select™ cDNA Subtractionで得たライブラリーから *in vitro* での血管新生に関与する転写産物を検出 …続き

4つの正のサブトラクテッドライブラリーから個別のクローン（10,000）を選び、このインサートをPCRで増幅し、PCR産物をガラススライド上にスポットしました。0、0.5、3、6、24時間目に採取した細胞から単離し、Cy3/Cy5色素で標識したRNAで、これらのスライドを、ハイブリダイズしました。各時間の標識RNAを0時間のRNAと比較しました。

PCR-Select cDNAサブトラクテッドマイクロアレイにより、*in vitro* 血管新生に関連する既知および新規の遺伝子の同定が可能

バックグラウンドを差引いて、データを正規化した後、24時間の毛細血管形成における発現プロファイルを10,000個のクローン全てについてプロットしました。1,728個のクローンを配列決定のために選択しました。これらには500を超える遺伝子が含まれていました。多くの遺伝子は複数回出現し、同じ発現プロファイルを示しましたが、発現の程度には相当な差がありました。高度に制御されているMMP10、PTGS2およびEGR1遺伝子のプロファイルを示します（図2A）。SMARTで増幅したcDNAから得られたVNブロットを用いて、発現プロファイルを確認し、正確に定量しました（図2B）。

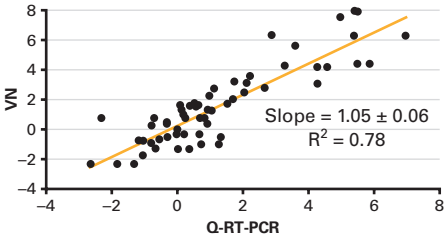

図3. バーチャルノーザン（VN）分析と定量的RT-PCR（Q-RT-PCR）との密接な相関。
毛細血管形成アッセイにおいて、VN分析およびQ-RT-PCRを用いて75試料（13種の異なる遺伝子を含む）について遺伝子発現レベルを測定しました。この結果を対照のPPIAに対して正規化し、0時間に対する誘導比として表しました。VNブロット定量値に対するQ-RT-PCR定量値として測定した誘導比（log2）をプロットした点を示しています。線形回帰を用いてベストフィットの直線の勾配を決定しました。

また、定量的RT-PCR（Q-RT-PCR）によるプロファイルの定量も行いました（図2C）。VN分析、Q-RT-PCRによるmRNAの定量結果の包括的比較から、極めて良好な相関が示されました（図3）。この方法におけるVN分析の利点としては、cDNA配列に関する事前情報が必要ないこと、または定量PCRのためのプライマーを合成する必要のないこと、および優れた感受性とブロットの複数回のリプローブ（今回の場合最大8回まで）が可能であることが挙げられます。

この手法により、血管新生において発現が変化する既知の遺伝子（例：PTGS2、EGR1、CMG2、ESM1、JAG1、FLT1）（図4）および毛細血管形成において以前に認められていなかったが（1）、現在では重要な役割を持つことが示されている（3）新規の遺伝子（例：ARHGAP24）の同定が可能となりました。可溶性のFLT1（sVEGFR1）を含む多くの遺伝子において、下流の選択的なpolyA$^+$の部位が同定され、その他においては、選択的スプライシングおよび5'UTRsの延長が認められました（データは示していません）。低発現と考えられる遺伝子の転写物も検出されるのは、おそらくサブトラクションの際に増幅の過程を経て濃縮されるためと考えられます。

限られた量のRNA試料からSMART cDNA合成法を用いることで、血管新生研究用のカスタムメイドのマイクロアレイに必要なサブトラクテッドライブラリーを作製することができました。これらのアレイ解析により、既知の血管新生遺伝子の確認、ならびに新規遺伝子、または候補となる遺伝子転写物の発現プロファイルの同定が可能でした。この実験例で示されるように、VN分析はQ-RT-PCRに代わるマイクロアレイデータの正確な定量化のための有効な選択肢となる場合もあります。またこの方法は明らかにノーザンブロット分析よりも感度が優れています。

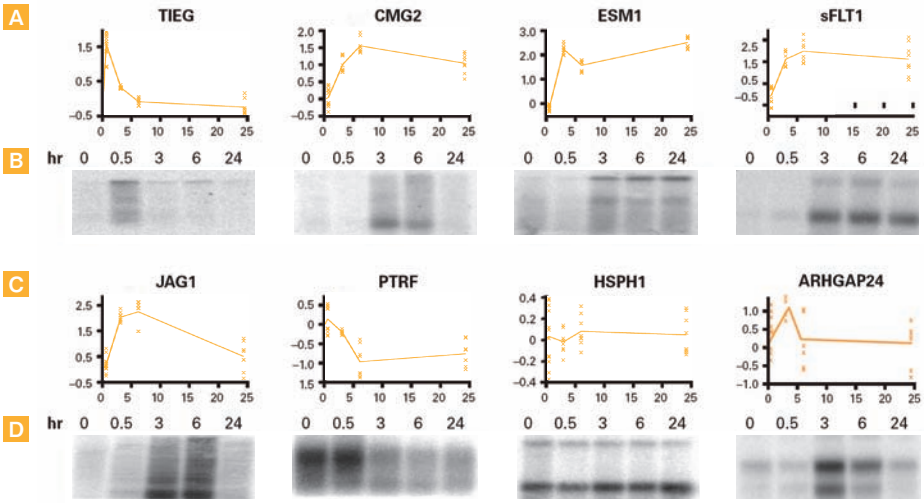

図4. マイクロアレイプロファイルのバーチャルノーザン（VN）ブロットによる正確性および再現性の確認。血管新生において調節されて変化する遺伝子発現のタイムコースを、マイクロアレイ（パネルAおよびC）およびVN分析（パネルBおよびD）を用いて定量しました。パネルAおよびCにおいては、誘導比（log2）を血管新生の刺激後の時間（hr）に対してプロットしています。パネルBおよびDでは、VNブロットと時間（hr）を示しています。様々なバンドパターンやスメアが認められますが、調節のプロファイルはマイクロアレイ分析を用いて得られた結果を忠実に反映しています。

参考文献

1. Hahn, C. N., *et al.* (2005) *Physiol. Genomics* **22**(1):57–69.
2. Puskas, L. G., *et al.* (2002) *BioTechniques* **32**(6):1330–1340.
3. Su, Z-J., *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **101**(33):12212–12217.

Notice to Purchaser
The Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction legal statements（27ページ参照）