

高感度なDNAチップの開発と応用

上田 洋二

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 システム細胞学分野

(小笠原 直毅 教授)

推薦教員	小笠原 直毅 教授		
氏名	上田 洋二	提出	平成 24 年 6 月 29 日
題目	高感度なDNAチップの開発と応用		

要旨

DNA チップ (DNA マイクロアレイ) は、スライドガラスまたはシリコン基板上に DNA の部分配列を高密度に配置し固定したものであり、多数の遺伝子情報を一括に解析できるツールとして、ゲノム関連の基礎研究に用いられてきた。DNA チップは、生物現象を研究するツールとして既に定着しており、網羅的に遺伝子発現やゲノム変異、マイクロ RNA の発現などを調べるために使われている。2008 年には 8000 報を超える論文で DNA チップが使用されており、今日でも使われ続けている。一方、競合する技術の台頭がめざましい。網羅的なゲノム解析が可能な次世代シーケンサーや、数千遺伝子を同時に定量できる PCR 法が開発され、一部の用途で DNA チップから置き換えが始まっている。今後、DNA チップやその競合技術は、基礎研究分野に加え、創薬研究やテーラーメイド医療を始め、環境検査、食品検査など様々な産業分野で利用すると期待されている。DNA チップ技術の特長を最大限に生かしながら、不足している検出感度、検出精度を向上させることが、競合技術との差別化において重要と考えた。

本研究では、DNA チップの検出感度、及び検出精度を向上させることを目的とし、新たな高感度 DNA チップの開発を行った。ハイブリダイゼーションの反応性を向上させるため、柱状構造 DNA チップとハイブリダイゼーション溶液をビーズで攪拌する方法を検討し、攪拌しない場合に比べ、3 倍の感度増強効果がみられた。また、DNA チップ基板に黒色粒子を添加し、自家蛍光を低減させることで、バックグラウンドノイズによる検出ばらつきを抑えた。さらに、基板上に固定するプローブ DNA を、固定化効率の高い修飾基を持つ新アミノ化オリゴ DNA を用いることで、感度性能を向上させた。これらの技術を組み合わせ、高感度かつ高精度に検出できる DNA チップを開発した。この高感度 DNA チップは、標識 RNA を 0.3amol/chip まで検出できることが分かった。

高感度 DNA チップの性能を生物材料を用いて評価するため、出芽酵母をモデルに検証を行った。プローブ設計には、特異性が高くなる設計アルゴリズムと、実験によってターゲット核酸との反応性の良いプローブを選択する方法を組み合わせ、特異性と反応性を確保したプローブ配列を設計し、高感度酵母チップを開発した。検証試験には、Onda *et al.* (2004) が構築した転写因子の強制発現による誘導遺伝子探索モデルを用い、誘導遺伝子数の検出数及び検出した遺伝子の妥当性を、GeneChip と比較評価した。高感度酵母チップは、CeneChip に比べ、多数の遺伝子を検出でき、低シグナルスポットでのばらつきが少なく、さらに GeneChip よりも多数の変動遺伝子を検出できた。変動遺伝子の Gene Ontology 解析、及び転写因子と誘導遺伝子の関連性を既知情報から評価し、妥当性の高い遺伝子が検出されたと

判断できた。以上のことから、高感度酵母チップは、GeneChip に比べ感度性能が向上したことが確認された。

次に、高感度 DNA チップを活用したアプリケーションの開発を行った。出芽酵母の染色体を分断し、ミニ染色体を創出する PCS 法(Sugiyama *et al.* 2005)を応用し、様々なゲノム構成を持つ株を作出できる Genome Reorganization Technology(GReO)法を開発した。GReO 法は、複数のミニ染色体を持った酵母細胞を培養し、培養中にミニ染色体が様々な組み合わせで脱落することを応用し、培養条件に応じたゲノム構成をもつ株を作出する方法である。本研究では GReO 法を実施し、複数のミニ染色体を持った酵母細胞を栄養培地で培養することで、19 種の異なるゲノム構成を持った株を作出することができることを実証した。さらに、GReO 法で作出した株を高感度酵母チップでゲノム構成の変化を調べたところ、ミニ染色体の脱落の検出に加え、ミニ染色体のコピー数増幅を検出した。また、ミトコンドリアゲノム及びリボソーム RNA 遺伝子クラスターのコピー数増加が観察され、GReO 法は、ミニ染色体のコピー数変動だけでなく、その他のゲノム領域に対しても影響を与えることが示唆された。GReO 法は種々の培養条件に応じた株の作出に有効な技術であり、今後の活用が期待される。また、GReO 法に高感度酵母チップを組み合わせることで、作出した株のゲノム構成を正確に知ることができ、ゲノム構成と細胞機能との関連性解析に有効である。

さらに、高感度性能を生かし、従来は解析が困難であったホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料中の RNA を解析可能とする開発を行った。FFPE 試料は長期保管が可能のため、臨床情報が付与されている検体を過去にさかのぼり収集でき、バイオマーカー探索に有用とされている。一般的に FFPE 試料から抽出した RNA は、分解が進んでおり、遺伝子発現解析は困難であるとされていた。本研究では、RNA 抽出作業によって RNA の分解が進んでいることを見だし、RNA 抽出方法を工夫することで、RNA の分解を低減させることができた。さらに、遺伝子発現解析を行う際に通常行われる RNA 増幅を、従来よりも増幅倍率を抑えることにより増幅バイアスを低減させた。本技術の有効性を検証するため、肺腺がんの臨床検体を用いて評価した。同一の臨床検体組織を凍結試料、及び FFPE 試料にし、それぞれから抽出した RNA を用いて、遺伝子発現解析を行った。凍結試料由来 RNA と FFPE 試料由来 RNA とで相関性の高い結果が得られ、肺腺がん組織に特徴的な遺伝子を抽出できることが分かった。また、同じ検体を用いてマイクロ RNA の解析を行ったところ、肺腺がんの既知のマーカである miR-21 を検出することができた。マイクロ RNA は、短い分子であり、FFPE 試料中でも分解しにくいとされているが、夾雑する他の RNA 分子によって DNA チップのデータに影響を受けることが示唆された。今後、抽出技術及び検出技術を改善することで、精度の高いデータを得られるようになり、バイオマーカー探索や診断用途で活用されることが期待できる。

本研究では、高感度 DNA チップ技術の開発と、出芽酵母での検証を行い、検出感度、検出精度が向上していることを確認した。さらに、GReO 法で作出した株の評価、FFPE 試料の解析に高感度 DNA チップを利用することで新しい知見を得ることが示された。今後、工業分野、医療分野での活用を念頭に、高感度 DNA チップの性能を活かした、PCR 法や次世代シーケンサーと差別化できるアプリケーションの開発が急務と考える。

目次

目次	2
第 1 章 緒論	
1.1 研究の背景	
a. DNA チップ技術	5
b. DNA チップと競合する技術	8
c. 位置づけ	10
1.2 研究の目的	11
第 2 章 高感度 DNA チップの開発	
2.1 目的	12
2.2 材料と方法	
a. ハイブリダイゼーションサンプルの調整	14
b. スパイク RNA の調整	14
c. 検出画像の数値化	15
2.3 結果	
a. 柱状構造基板とビーズ攪拌	15
b. プローブ DNA	21
2.4 考察	25
第 3 章 高感度酵母チップの設計とその検証	
3.1 目的	26
3.2 材料と方法	
a. 酵母株	28
b. キメラ転写因子による発現誘導	28
c. Total RNA の抽出	28
d. 標識核酸の調整	28
e. データ解析	28
3.3 結果	
a. プローブ設計	29
b. GeneChip との感度比較	31
c. 変動遺伝子の解析	35
3.4 考察	37

第 4 章	Genome Reorganization Technology(GReO)法の開発	
4.1	目的	38
4.2	材料と方法	
	a. プラスミドと株	39
	b. 使用したプライマー	41
	c. ゲノム DNA の調整	42
	d. DNAチップでのゲノムDNA検出	42
	e. タイリングマップの作成	42
	f. パルスフィールドゲル電気泳動による酵母染色体 DNA の分離	43
	g. サザンハイブリダイゼーション	43
4.3	結果	
	a. 第 4 染色体を分断した酵母細胞	44
	b. 30 本の染色体を持ったハプロイド株の作出	46
	c. ミニ染色体の組み合わせ脱落	47
	d. ゲノム再構成株の測定	49
	e. 一部遺伝子領域を欠損した D3、D4 株の変異検出	54
	f. ミトコンドリアゲノムおよび第 12 番染色体での増幅	55
4.4	考察	
	a. GReO 法の有用性	57
	b. ミニ染色体の脱落	57
	b. ミトコンドリアゲノムの増幅	57
	d. リボゾーム RNA 遺伝子の増幅	58
第 5 章	高感度 DNA チップの新たな応用技術開発	ホルマリン固定パラフィン包埋試料の解析
5.1	目的	61
5.2	材料と方法	
	a. Total RNA の抽出	61
	b. ホルマリン固定パラフィン包埋試料からの RNA 抽出	62
	c. RNA の電気泳動	62
	d. Total RNA 中の mRNA 標識	62
	e. Total RNA 中の miRNA 標識	62
	f. DNA チップ	62
5.3	結果	
	a. FFPE 試料からの RNA 抽出方法の検討	63

b. FFPE 試料から抽出した RNA の増幅	66
c. 臨床検体での検証	66
d. mRNA 発現解析、miRNA 発現解析のスキーム	68
e. FFPE 試料から抽出した mRNA の解析	68
f. FFPE 試料から抽出した miRNA の解析	72
5.4 考察	
a. FFPE からのバイオマーカー探索および利用の可能性	74
b. mRNA 発現解析の課題	75
c. miRNA 解析の課題	75
第 6 章 まとめと今後の展望	77
謝辞	79
参考文献	80
付表	87

第 1 章 緒論

1.1 研究の背景

a. DNA チップ技術

分子生物学では、種々の解析手法が考案され、実用化されている。DNA 断片を増幅する PCR 法(Mullis *et al.* 1987)、抗原・抗体反応によってタンパク分子の有無を同定するウエスタンブロット法(Burnette, 1981)、DNA の塩基配列を決定するマキシム・ギルバート法(Maxam *et al.* 1977)やサンガー法(Sanger *et al.* 1977)といったように、生体分子の特徴や性質を生かして生命情報を読み取る技術が創出され、実用化されている。今日では、これらの技術は一般的な解析手法として定着している。

1 本鎖 DNA が相補鎖配列を持つ他の 1 本鎖 DNA と対合反応(ハイブリダイゼーション)をする原理を応用し、試料溶液中の特定の DNA 配列を検出するサザンブロット法(Southern, 1975)、1 本鎖 DNA と相補配列を持つ 1 本鎖 RNA のハイブリダイゼーションを基本原理とし、試料溶液中の特定の RNA 配列を検出するノザンブロット法(Alwine *et al.* 1979)も同様に、多くの研究で用いられ、一般化した技術の一つである。サザンブロット法は、試料から抽出した DNA をアガロースゲル電気泳動などで塩基長による分離を行う。DNA はメンブレンに転写された後、あらかじめ用意した標識済みプローブとハイブリダイゼーションさせる。これにより、標識済みプローブとハイブリダイゼーションできる配列をもった DNA 断片の有無、その塩基長を同定することができる。ノザンブロット法は、ほぼ同様の原理であるが、電気泳動で分離する対象が RNA である点で異なる。これにより、標識済みプローブとハイブリダイゼーションする配列をもった RNA の有無、およびその塩基長を同定することができる。具体的には、mRNA を検出することで遺伝子発現状態や non-coding RNA を検出することができる。いずれの方法も、標識済みプローブはラジオアイソトープや、DIG、biotin 等による標識であったため、1 回の実験では、1 種類の配列に対してのみの検証しかできなかった。

1990 年代後半に入ると、複数の核酸分子を同時に解析するツールである DNA チップ(DNA マイクロアレイ)が考案された(Maskos *et al.* 1993)。DNA チップは、スライドガラスまたはシリコン基板などの支持体上にプローブ DNA を高密度に配置し固定したものである。上述したサザンブロット法、ノザンブロット法とは反対に、支持体上にプローブ DNA を固定し、検出対象の DNA、あるいは RNA を標識しておく。支持体上に標識済み核酸をアプライし、ハイブリダイゼーションすることで、試料溶液中に含まれる配列の有無を知ることができ、検出時の強度により数量を相対的に知ることができる。具体的には、2 万数千個の遺伝子に対して、それぞれ 1 つずつのプローブ DNA を用意し、スライドガラス上に配列させ固定した DNA チップを用いることで、1 回の実験の中で、試料に含まれる 2 万数

千個種の mRNA の量、あるいは DNA の量を測定することができる。標識方法が工夫されており、複数種類の発光特性の異なる蛍光色素(例えば Cy3, Cy5)を用い、同時に複数の試料を解析することができる。

DNA チップは発明された後、国内外の研究機関やメーカーで開発および製品化されてきた。製造方法は、大きく分けて 3 種類の方法が実用化されている。

最初に実用化された方法は、米国スタンフォード大学の Brown らによって考案されたピンによるスポットピン方式である(Schena *et al.* 1995)。96 穴プレートなどの容器に入れたプローブ DNA 溶液に、ステンレス製のピンを浸漬し溶液をピン先に付着させ、スライドガラスにピンを接触させることで、プローブ DNA 溶液を転着させる方法である (Schena *et al.* 1995)。プローブ DNA には、各種生物種由来の BAC ライブラリー、cDNA ライブラリーから調整した PCR 産物や、合成機で合成したオリゴ DNA を用いることができる。プローブ DNA の長さに制限はない。あらかじめ調整したプローブ DNA を用いるため、DNA プローブの濃度や純度を確かめることができる。スライドガラスあたりのスポット数は、数万スポットが一般的である。

Affymetrix 社の Fodor *et al.*が開発したフォトリソグラフィー合成法(Fodor *et al.* 1991)は、光照射で選択的に除去される保護基をもつ物質を使い、フォトリソグラフィー技術と固相合成技術を組み合わせることで、固相上に他種類のプローブ DNA 配列を高密度に合成する方法を開発した。原理は、光化学的に除去可能な保護基で修飾したリンカーを、アミノ基を介して固相に結合させておき、反応部位のみを照射できるようなフォトリソグラフィック・マスクに光を照射する。そして同様の保護基をもつ単量体を導入して最初のカップリング反応を行う。次の合成パターンに合わせフォトリソグラフィック・マスクを交換する。このサイクルを繰り返すことで目的とするプローブ配列をもった DNA チップを製作できる。プローブ DNA の長さは 25 塩基前後までが合成可能である。

また、インクジェットによって基板上に DNA の原料を滴下し、基板上で合成反応を進めるインクジェット方式が実用化されている (Hughes *et al.* 2001)。インクジェット法では 60 塩基前後のプローブ DNA を合成することができる。アジレント社が本方式を用いた DNA チップを製造・販売しており、現在では、スライドガラスあたり 100 万スポットが可能となっている。

フォトリソグラフィー合成法やインクジェット方式は、数百万のプローブ DNA を基板上に固定することができる。ゲノム DNA 全体から適切な間隔で塩基配列を選択し、基板上に固定したタイリングアレイが実用化され、遺伝子の欠損、重複、転座、一塩基多型などがゲノム全体で計測できるようになった。

DNA チップは、発明から数年を経て、ゲノム全体を測定するツールへと発展を遂げた。DNA チップを用いた研究数は飛躍的に増加している。論文数は、2000 年頃から増え始め、2008 年には 8000 報を超えている(図 1-1)。その後、研究ツールとして定着したためか、増加はしていないが、論文数を維持している。比較として、サザンプロットの報告数を図 1-1

に示した。サザンブロットは、最初に報告されて以降、急速に多くの研究で用いられはじめた。2000年代に入ると、報告数が減少し始めている。一部の用途において、DNAチップによって置き換えられた可能性が考えられる。しかしながら、今日であっても報告数はゼロにならず、使われ続けている。

複数のメーカー、研究機関から様々な方式で製造された、いわゆるプラットフォームが異なるDNAチップが多数登場し活用され始めたことで、プラットフォーム間でのデータ互換性が議論された。米国食品医薬品局(FDA: Food and Drug Administration)は、DNAチップが先進的な医療機器あるいはバイオマーカー検出による個別化医療に用いられることを想定し、プラットフォーム間のデータ比較検証のためMAQCプロジェクト(microarray quality control control)を推進し、Shi *et al.* (2006)の報告を含む数報の報告がなされた。報告の中で、DNAチップのプラットフォーム間で検出値を直接比較することはできないが、サンプル間の発現変動比(fold change)で比較することで、良い相関が得られることが報告されている。

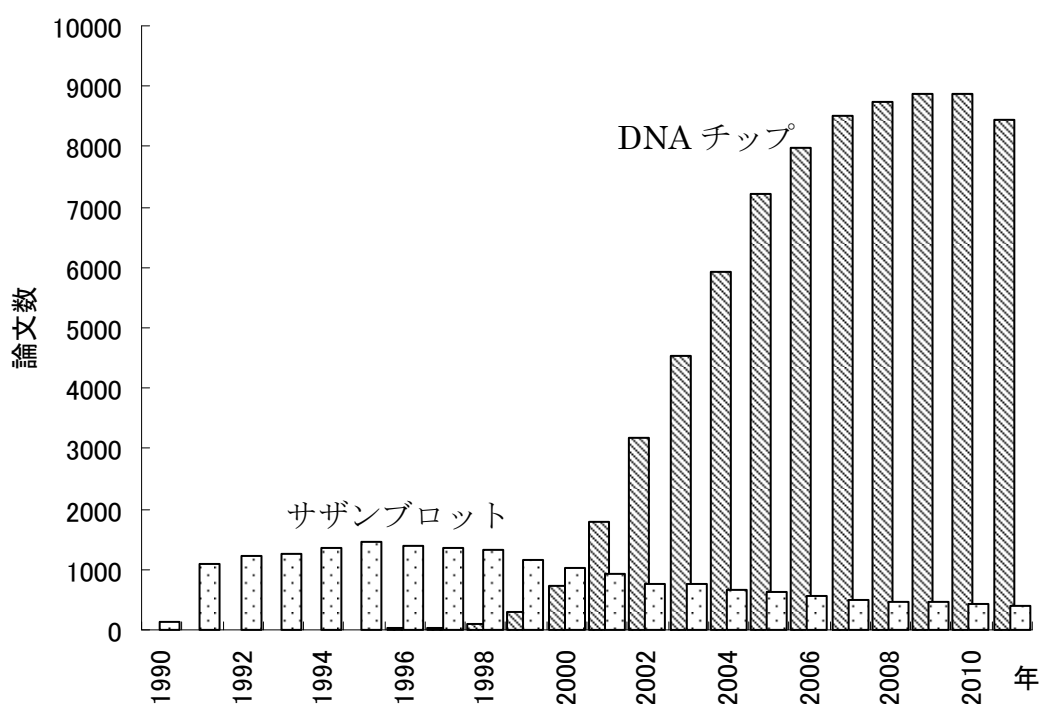


図 1-1 論文数の推移

論文検索キーワードを、「southern blot」「DNA chip」として検索し、結果を集計した。

b. DNA チップと競合する技術

上述したように、DNA チップは実用化に向け進展を進めている中、他方で、DNA や RNA の解析技術でも進展がみられる。特に塩基配列を決定するシーケンサー技術の発展がめざましい。従来用いられていたサンガー法(Sanger *et al.* 1977)は、PCR で増幅した DNA 断片にプライマー-DNA をアニールさせ、プライマーから DNA の伸長反応を行う。このときに、標識した核酸を取り込ませることで配列を読み取る方法である。1 反応あたり 1 配列の解析が可能であった。近年、発展している配列解析技術は、次世代シーケンサーと呼ばれている。イルミナ(Bentley *et al.* 2008)、ライフテクノロジー社の SOLiD システム(McKernan *et al.* 2009)、ロシュ 454 FLX シーケンサー (Margulies *et al.* 2005)、ヘリコス社の HeliScope (Shendure and Ji, 2008)、コンプリートゲノミクス社 (Drmanac *et al.* 2010)などを始め、日々進展を続けている。それぞれ異なる反応原理で配列を解析するが、試料中の核酸配列を網羅的に解析することができる。これまで、網羅的なゲノム解析は DNA チップのみでしか実施できなかったが、次世代シーケンサーの登場により、一部の用途では、DNA チップから次世代シーケンサーへの置き換えが進んでいる。

PCR は、増幅対象の DNA が含まれている溶液に、一对のプライマー-DNA と高温耐性 DNA ポリメラーゼを添加し、温度を上下させるサイクルを繰り返すことで DNA 断片を増幅する技術である。温度サイクルを 1 回経るごとに、DNA 断片の数が 2 倍に増えていくことから、元の核酸の量を増幅産物から推定することができる(定量 PCR)。従来は、96 穴プレートあるいは 384 穴プレートで定量 PCR 反応が行われていた。近年、多数の遺伝子を同時に定量 PCR で検出する技術が開発されている。約 5000 遺伝子を同時に検出できる Wafergen 社の Smartchip、約 3000 遺伝子を同時に検出できるライフテクノロジー社の OpenArray (Morrison *et al.* 2006)が開発されている。

PCR 法は定量的測定が可能な技術であり、シーケンサーは解析対象の塩基配列が分かるため正確な結果が期待できる。現在、それぞれの性質を維持したまま、網羅的に解析できる技術が開発され、実用化されつつある。

田代(2010)は、DNA チップと競合技術の関係について述べている。図 1-2 に田代が報告している DNA チップと競合技術との関係を一部改変して示した。図 1-2 は、横軸に搭載する遺伝子の数を、少、中、多と区分し、縦方向に、感度・精度の高低(左軸)、解析コストの高低(右軸)で表している。図の中には、大集積アレイ(プローブが 1 万種以上)、中集積アレイ(プローブが千から 1 万種)、フォーカスタレイ(プローブが数百種)、ミニアレイ(プローブが数十種)と搭載するプローブの数で 4 種類の DNA チップに区分している。大集積アレイには、affymetrix 社やアジレント社が製造するタイリングアレイが該当する。網羅的に解析できる反面、解析コストが高い。田代は、タイリングアレイはデータの精度が高いとは言えず、スクリーニングツールとして利用され定量 PCR で結果を検証されることが多いと指摘している。大集積アレイの競合技術である次世代シーケンサーの解析コストが低減

し、感度及び精度が向上した場合、大集積アレイは置き換えられる可能性がある。

一方、フォーカストアレイは、特定の生物現象や病態等の精密な解析・診断を目的とした DNA チップで、臨床診断や、産業におけるリスクアセスメントでの活用が想定されている。着目した遺伝子のみを DNA チップに搭載するため、コストを低減できる。また、遺伝子数が少ないため、実験条件、プローブ DNA の精度を調整しやすく、解析精度を向上させることができる。フォーカストアレイと、さらに遺伝子を絞り込んだミニアレイは、PCR 技術と競合する遺伝子数を対象としている。中集積アレイは、大集積アレイとフォーカストアレイの中間的な位置づけとされ、例えば、数千種の遺伝子発現パターンによる診断などでの利用を想定している。中集積アレイには、上述した SmartChip や OpenArray が競合技術となる。

以上のように、DNA チップは、プローブの数が少ないものから多いものまで、置き換えが可能な競合技術が登場していることが分かる。

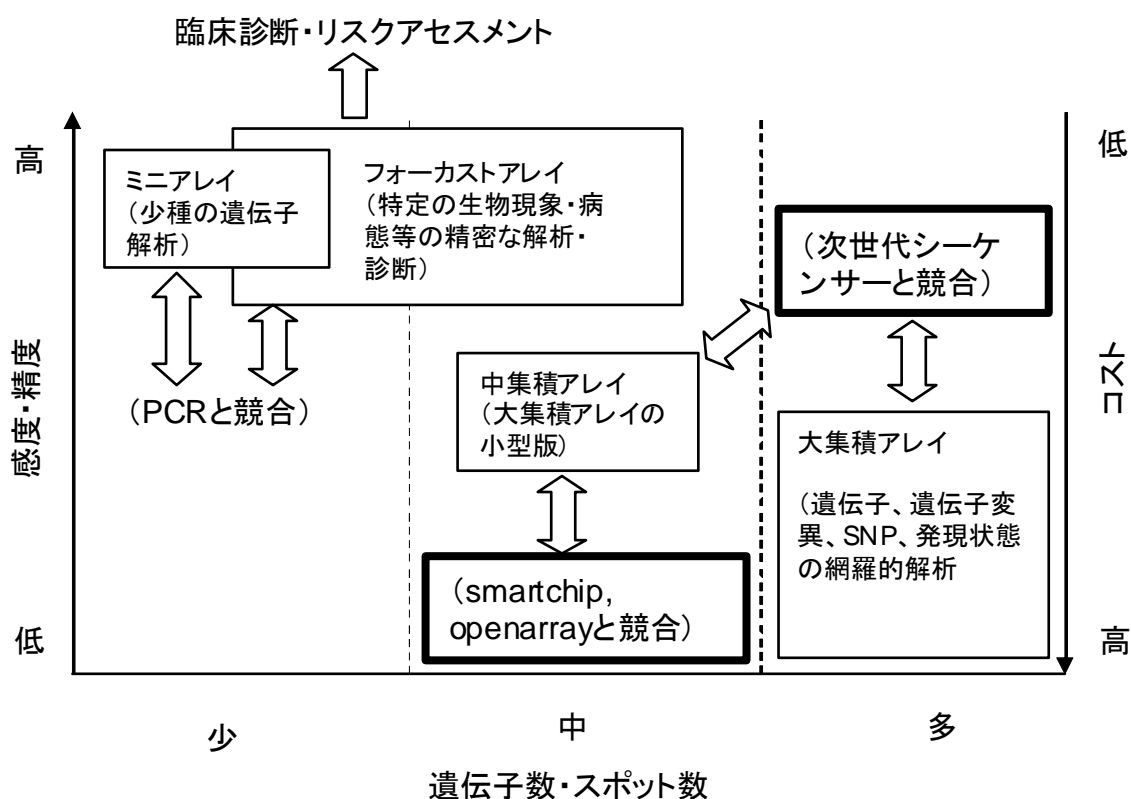


図 1-2 DNA チップと競合技術との位置づけ

田代(2010)より一部改変して引用。太線で囲った部分を追加した。

フォーカストアレイの例として、オランダ Agendia 社の MammaPrint(Glas *et al.* 2006) を挙げる事ができる。乳がんの予後予測診断キット(再発リスクの予測)として、2007 年に米国 FDA の承認を得た。組織試料から抽出した RNA を解析に用い、70 種の遺伝子発現

レベルを測定し、診断する。70種の遺伝子測定用プローブ DNA とは別に、ネガティブコントロール、データ補整用コントロールプローブ DNA が約千種搭載されている。

乳がんの予後予測解析法として、ジェノミックヘルス社の OncoTypeDX(Cobleigh *et al.* 2006)も FDA の承認を得ている。16種類のがん遺伝子と、5種類のリファレンス遺伝子の発現量を定量 PCR で解析し、再発リスクを判定する。解析には、ホルマリン固定パラフィン包埋試料から抽出した RNA を用いる。

DNA チップを用いて診断する MammaPrint と、PCR 法を用いて診断する OncoTypeDX は、同時期に FDA の承認を得たが、OncoTypeDX がシェアを獲得していると言われている。MammaPrint は生の組織から抽出した RNA を用いる必要があるのに対し、OncoTypeDX はホルマリン固定パラフィン包埋試料から抽出した RNA を用いることができる。病理診断では、採取した組織試料を病理検査のためにホルマリン固定したうえ、パラフィン包埋し、病理切片を作製する。OncoTypeDX は、ホルマリン固定パラフィン包埋試料(FFPE)を解析試料としているため、通常の検査の流れの一環で解析できる。一方、MammaPrint は、解析のために組織試料を用意しなければならず、利便性が低い。

c. 位置づけ

今後、DNA チップは、基礎研究分野に加え、創薬研究やテーラーメイド医療を始め、環境検査、食品検査など様々な産業分野で利用すると期待されている。一方、上述した網羅的に解析のできる PCR 法や次世代シーケンサーも同様の分野での利用を念頭に開発が進められている。

DNA チップ技術の利点は、反応原理がハイブリダイゼーションという単純な原理である点である。DNA チップ自体、及び装置の小型化、1枚のスライドグラスに複数のアレイを搭載したマルチアレイ化によるマルチプレックス検出が容易であると考えられる。また、試料中の核酸を、網羅的に解析できる上、同じ反応原理、装置を用いて少数遺伝子の検出にも対応できる。このような DNA チップの利点を最大限に生かしながら、不足している性能を向上させることが、競合技術との差別化において重要と考える。今後の DNA チップ技術の展開を想定し、DNA チップだからこそ解析できる解析対象あるいは分野への利用を検討する段階にさしかかっている。

1.2 研究の目的

網羅的な解析ツールとして活用されてきた DNA チップは、次世代シーケンサーや網羅的解析可能な PCR 技術の台頭により存在意義が低下しつつある。検出原理を比較すると、次世代シーケンサーや PCR 技術は、検出感度、検出精度において、従来の DNA チップを上回っていると考えられる。DNA チップが今後も活用され続けるには、検出感度、検出精度を向上させることが必要であると考え、両性能を向上させることを目的とし、第 2 章では高感度 DNA チップの基本技術の開発を行った。第 3 章では、開発した高感度 DNA チップの性能を検証するため、出芽酵母をモデルにし、高感度酵母チップを開発した。高感度酵母チップは、従来の DNA チップに比べ、どの程度感度が向上しているか評価し、検証した。

次に、第 4 章では高感度酵母チップを活用するアプリケーションの開発を行った。様々なゲノム構成を持つ酵母を作り出せるゲノム再構成技術(Genome Reorganization Technology)を開発し、酵母株の作出を行った。作出した酵母株のゲノム構成を、高感度酵母チップで評価することで、ゲノム再構成技術が酵母ゲノム全体に与える影響を調べた。

第 5 章では高感度 DNA チップの性能を生かしたアプリケーションの開発を行った。競合技術や従来の DNA チップ技術との差別化を念頭におき、これまで解析困難であったホルマリン固定パラフィン包埋試料中の RNA を解析可能とした。開発したアプリケーションの有用性を評価するため、臨床検体を用いたバイオマーカー探索を行った。

第2章 高感度DNAチップの開発

2.1 目的

DNAチップは、ゲノムDNAあるいは遺伝子発現レベルを網羅的に解析する研究用ツールとして定着している。しかし、数千遺伝子を同時に解析できる定量PCR法や、網羅的に配列情報を取得できる次世代シーケンサーといった競合技術の登場により、DNAチップの存在意義が薄れている。定量PCRは、少ないDNA分子を増幅し定量的に測定する技術である。次世代シーケンサーは、試料中に含まれる核酸を網羅的に解読できるため、核酸の有無及び量を塩基配列レベルで知ることができる。そのため、検出精度が高いとみられている。検出感度、検出精度の高い競合技術が登場している中で、今後もDNAチップが活用され続けていくためには、検出感度と検出精度を高めることが必要であると考える。

DNAチップの検出感度は、ハイブリダイゼーション溶液に含まれるRNAを検出することにおいて、検出できるRNA分子の数で定義することができる。MAQCプロジェクトの中で、Tong *et al.*(2006)は、ハイブリダイゼーション溶液に単一遺伝子由来の標識済みRNAを既知量で添加し、検出できる量を測定した(図2-1)。ハイブリダイゼーション溶液中に含まれるpolyA tailを持ったRNA分子のコピー数(すなわちmRNA)と、スパイクインした標識済みRNAのコピー数を比率で表記している。各メーカーのDNAチップ間(プラットフォーム)で検出感度を比較し、最も感度の良いプラットフォームでは、spike RNA: poly A RNA = 1:300Kまで検出できた。この検出値を指標に、DNAチップの検出感度を向上させる技術の改良を行う。

検出感度を向上させる方法として、ハイブリダイゼーション方法の改良が考えられる。従来のDNAチップのハイブリダイゼーション反応は、DNAチップ上に反応溶液を滴下し、一定温度下で一晩静置し反応させる。この時、反応溶液中の標識核酸は、溶液中を拡散運動によってのみ移動できるため、DNAチップ上全体で均一に反応することは困難であった。アフィメトリクスやアジレントは、DNAチップの反応空間をチャンバー構造にし、チャンバー内に反応溶液を満たしたのち、回転運動によりDNAチップ内の溶液を攪拌することをやっている(各社実験プロトコールに記載)。本研究では、従来よりも攪拌性能を向上させる、新しいハイブリダイゼーション方法の導入を検討した。

検出感度に影響を与える要因として、プローブDNAの品質が挙げられる。DNAチップに用いられるプローブDNAは、スポットピン方式であれば、あらかじめ核酸合成機で合成したものをを用いる。核酸合成機で合成したDNAは、HPLC精製によって高純度DNAプローブを得ることができる。しかし、HPLC精製には時間がかかり、高コストであるため、プローブDNAの本数が数千から数万本の場合には、HPLC精製は現実的ではない。コストを低減させるため、脱塩カートリッジ精製のみで使用されることが一般的である。しかし、脱塩カートリッジ精製では、合成反応中に反応が進まなかった合成不良オリゴDNAや、夾

雑物を十分に除くことができず、プローブ DNA の基板表面への固定化を妨げるため感度を低下させる要因となる(筆者研究データ、データは示さず)。一方、フォトリソグラフィ法、インクジェット法では基板上でプローブ DNA を合成するため、合成後にプローブ DNA を精製することができず、合成不良オリゴを除去することができない。そのため、プローブ DNA の品質を確保することが難しいと考えられる。以上のように、現状の技術では、品質の高い DNA プローブを低コストで入手することは困難であった。

検出精度に影響を与える要因の一つに検出時のバックグラウンドノイズのばらつきが挙げられる。バックグラウンドノイズがばらつくことで、検出結果に大きく影響を与える。バックグラウンドノイズを低く、ばらつきを抑えることで検出精度は向上する。

また、感度不足が根本原因にある検出精度低下もある。DNA チップで遺伝子発現解析を行う場合に必要とされる Total RNA 量は、10ng~1µg の範囲である(各社 DNA チップメーカーの実験プロトコルに記載)。IVT 反応(in vitro transcription)によって、total RNA に含まれる mRNA のみが増幅される。このとき、増幅しやすい配列を持った mRNA と、そうではない mRNA の間でバイアスが生じ、サンプルの性状を正確に反映することができなくなってしまう(Holman *et al.* 2009)。従来の DNA チップは検出感度が低いため、微量の total RNA を解析の出発試料にする場合には、RNA 増幅を 2 回繰り返すことがあった。2 回増幅することで増幅によるバイアスは大きくなり、データの精度を低下させる原因となっていた。検出感度が高ければ、2 回増幅することなく、精度良く検出できるかもしれない。

本研究では、従来の DNA チップよりも検出感度及び検出精度を向上させた DNA チップを開発することを目的とした。

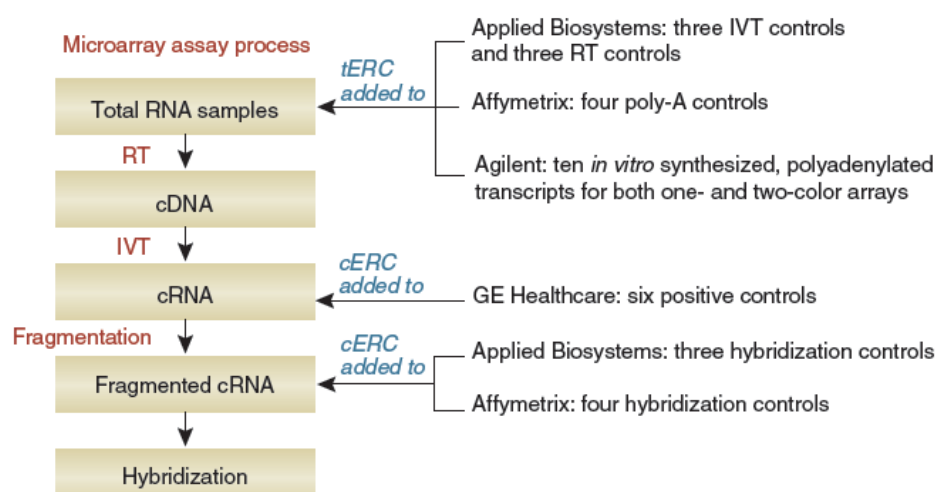


図 2-1 スパイクインの方法(Tong *et al.* 2006 より転載)。

2.2 材料と方法

a. ハイブリダイゼーションサンプルの調整

Total RNA は、Amino Allyl Message AMP II aRNA Amplificatin Kit (アプライドバイオシステムズ)によってアミノアリル aRNA を合成した。合成したアミノアリル aRNA 5 μ g を、100mM 炭酸バッファ(pH 8.0)中で、Cy3-NHS ester または Cy5-NHS ester を添加し、アミノアリル基と反応させ、aRNA を蛍光標識した。ハイブリダイゼーションには、500ng 標識済み aRNA をハイブリダイゼーションバッファに混和し、100 μ L とした。

b. スパイク RNA の調整

出芽酵母の *gpd1* 遺伝子 cDNA をクローニングしたプラスミド(DNA チップ研究所提供)から、各種基質とアミノアリル UTP 存在化で、SP6 RNA polymearse による *in vitro* 転写反応によって、アミノアリル標識した RNA を得た。転写産物はカラムで精製した後、100mM 炭酸バッファ(pH 8.0)中で、Cy3-NHS ester または Cy5-NHS ester を添加し、アミノアリル基に蛍光標識した。

c. 検出画像の数値化

検出画像の数値化は、GenePix ver.6(アクソン インストルメンツ)を用いた。柱状 DNA チップでは、スポット周辺部はフォーカスアウトし、バックグラウンドノイズ情報が得られない。DNA チップ上に複数ある、何も固定化されていないスポットのシグナル値の平均値をバックグラウンドノイズとして用いた。

2.3 結果

a. 柱状構造基板とビーズ攪拌

1) ハイブリダイゼーション溶液の攪拌方法

従来の DNA チップは、サンプルから調整した標識核酸を含む溶液中を、DNA チップに滴下後、カバーガラスをかぶせ、静置で反応させる。このとき、高分子である核酸の拡散が遅く反応効率が低いとされている(Politz *et al.* 1998)。特に希薄な溶液を用いた場合や低濃度の核酸を検出対象とした場合には十分な反応が期待できない。

そこで、私は、反応時に DNA の拡散を物理的に加速するコンセプトを検討した。まず、DNA チップ内に封入した気泡による攪拌方法を検証した。DNA チップ内にハイブリダイゼーション溶液とともに気泡を封入し、DNA チップを縦方向に回転させ、気泡の移動によって攪拌する方法を考えたが、高速で回転させた場合には、溶液よりも軽い気泡は常に回転軸側に寄ってしまい攪拌できなくなる。このため、気泡による攪拌方法には、溶液の攪拌に上限があると考えた。一方、Nagino *et al.* (2006)は、ハイブリダイゼーション中の溶液内に多数の微細なビーズを封入し、DNA チップを旋回運動させ、慣性力によりビーズが溶液内を移動し、溶液を攪拌する方法を考案した。DNA チップ上でビーズが移動することにより、基板表面に固定したプローブ DNA が損傷を受けることが考えられるが、Nagino *et al.*は基板に柱状構造を持たせ、柱の周囲でビーズを運動させることにより解決している。この方法であれば、DNA チップ上のプローブ DNA を劣化させることなく、ハイブリダイゼーション溶液をムラなく攪拌でき、効果的にハイブリ反応を促進させることが可能となると考えられた。Nagino *et al.* (2006) の DNA チップを図 2-2 に示す。

樹脂で成形された基板の上に、柱構造が設けられている。柱の上端面が、プローブ DNA を固定する位置である。柱上端面の直径は、約 100 μm であり、従来の DNA チップのスポット直径と同等の大きさである。柱間の距離は、数百 μm になるように設計されている。また、DNA チップの基板表面から発せられる自家蛍光を防ぐため、本基板には、黒色粒子を添加し、自家蛍光を低く抑えている。

本 DNA チップは、ハイブリダイゼーション時にチャンバー内に標識化 DNA と同時に直径数十 μm ~ 数百 μm の大きさのビーズを封入して、DNA チップを旋回運動させることで、ビーズを動かし、ハイブリダイゼーション溶液の攪拌を行う(図 2-3A)。ハイブリダイゼーション溶液がビーズによって攪拌されることで、静置時に比べて効率的に標識化 DNA がプローブ DNA と会合し、ハイブリダイゼーションが加速される。図 2-3B に、ビーズを充填した DNA チップの様子を示している。柱の間に、ビーズが点在している。ハイブリダイゼーション時、反応エリアに溶液を挿入後、挿入口はシールで密封され、空気の入りは無くなる。DNA チップは旋回攪拌できるシェーカーにセットされ、250rpm で旋回させる。

水より比重が大きなビーズは、旋回運動により柱の周囲を回転する。

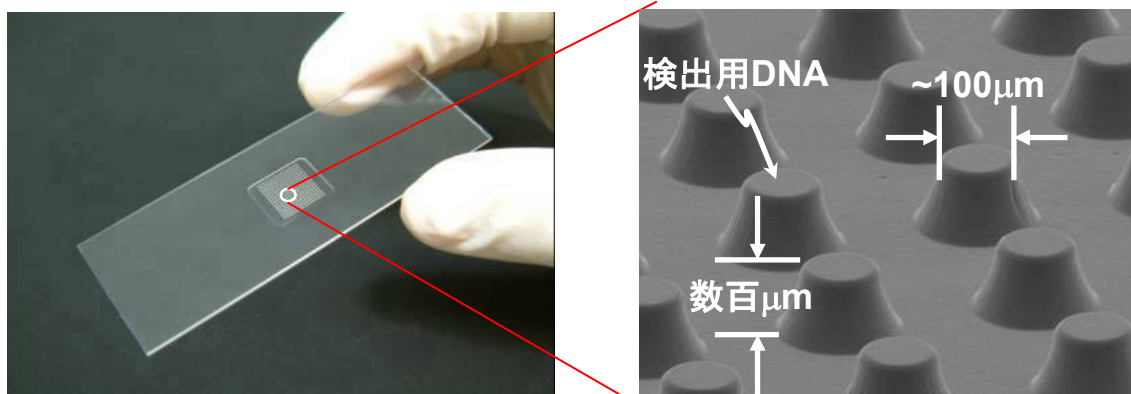


図 2-2 柱状構造を持つ DNA チップ基板

左：基板外観、右：基板表面の SEM 画像

さらに、ビーズ同士が衝突、または柱とビーズが衝突することにより、ビーズは複雑な運動をする。プローブ DNA が固定化されている柱構造の端面とカバーの間にはビーズが進入しない程度の間隔に設計されており、プローブ DNA 固定面がビーズによって損傷を受けることはない。図 2-3C に、Nagino らが取得したデータを示した。攪拌なし(静置反応)の場合、ハイブリダイゼーションの効率性が低いため、シグナル強度が低い。特にスポットの中央部においてシグナル強度の低下がみられる。攪拌を行った場合は、全体としてシグナル強度が高くなり、また柱上端面での反応ムラはなく、均一にハイブリダイズしている。

2) ビーズ攪拌による効果

Nagino *et al.* (2006)はビーズ攪拌の効果を検証しており、ビーズ攪拌が可能な柱状構造 DNA チップにおいて、ビーズ攪拌を行うことにより、ビーズ攪拌しなかった時に比べ、検出シグナルが 3 倍増加することを報告している。また、ビーズ攪拌が可能な柱状構造 DNA チップと従来型のスライドガラスにプローブ DNA が固定された DNA チップの性能を比較し、柱構造 DNA チップで顕著なシグナル強度の向上と、バックグラウンドノイズの低減が観察されたことを報告している。

私は、ビーズ攪拌の効果を、多数のプローブ DNA で評価する目的で、3D-Gene Human oligo chip 25K を用いて評価を行った。この DNA チップは、柱状構造をもった基板にオペロン社の設計したプローブ DNA 約 25,000 種が固定されている。同一の標識サンプルをアプライした 2 枚の DNA チップを用意し、攪拌しない条件(図 2-4A)とビーズで攪拌した条件(図 2-4B)でハイブリダイゼーションを行い、検出結果を比較した。蛍光検出の条件をそろえるため、検出スキャナの検出感度は同一にしている。

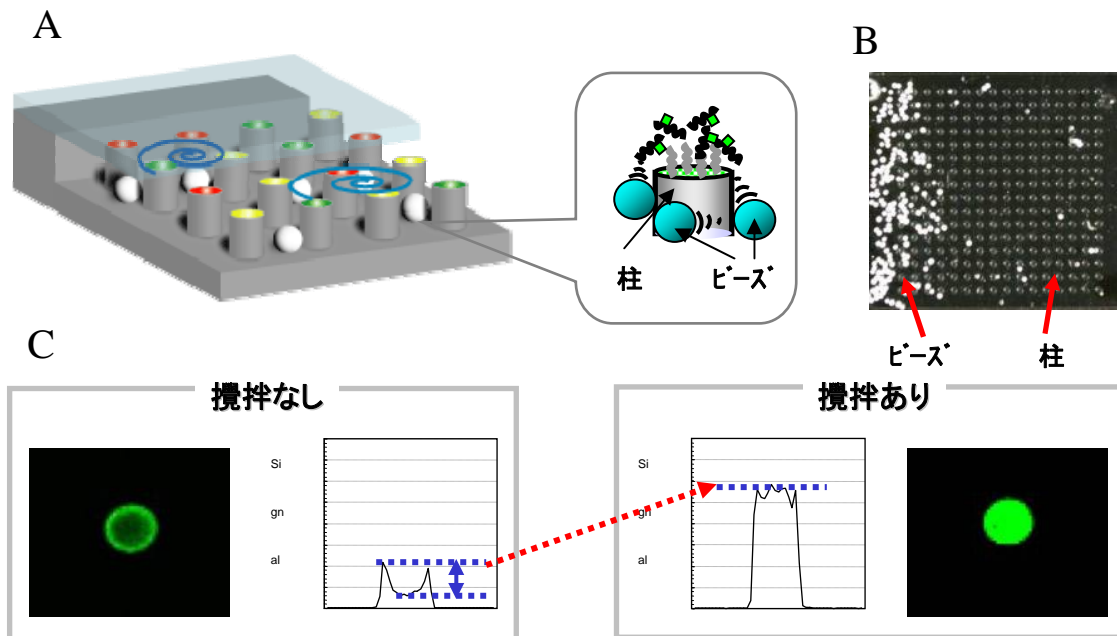
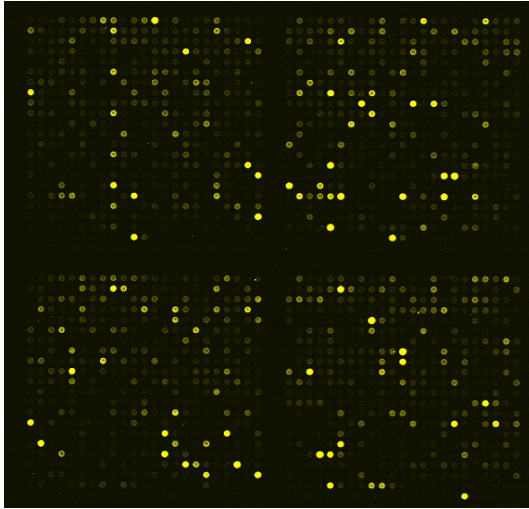


図 2-3 ビーズによる攪拌模式図と攪拌効果

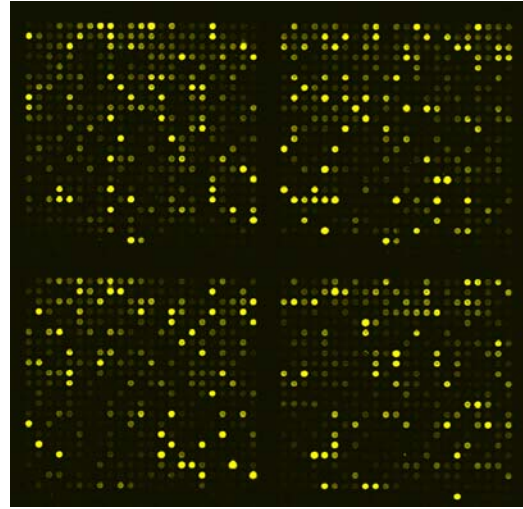
A ビーズ攪拌の模式図、B：ビーズが添加されている DNA チップ基板画像、C：スポット検出画像と検出値の分布

図 2-4A、B に検出画像の一部を示している。攪拌した場合は、攪拌しない場合に比べ、輝度が高いことがわかる。また、攪拌なしの条件では、スポット内でのシグナルムラが生じている様子が分かり、図 2-4C で示されたスポット内ムラが再現された。中央の各スポットの輝度を数値化し得られたシグナル値を図 2-4C に散布図で示している。ビーズ攪拌ありの条件は、攪拌無しの条件に比べ、ほぼ全てのプローブでシグナル強度が増加している。多くのプローブのシグナル強度が $y=3x$ のライン近傍にあることから、大半のプローブでシグナル強度が 2 倍～3 倍増強されているものと考えられた。同じ検出結果をシグナル強度のヒストグラムで示した(図 2-4D)。青線で示した攪拌あり条件のシグナル分布は、攪拌なし条件に比べ、グラフの右側にシフトしていることから、シグナル強度が増加していることが分かる。検出できた遺伝子の数(バックグラウンドノイズよりも有意に高いシグナル強度が得られたスポット)を比較すると、攪拌あり条件が 21,524 に対し、攪拌なし条件は 19,208 であった。ビーズ攪拌することで静置では検出できなかった約 2,000 遺伝子のデータを検出できた計算になる。これらの遺伝子は、ビーズ攪拌した条件でもシグナル強度が低いことから、攪拌することで、コピー数の少ない核酸のハイブリダイゼーション効率が改善し、検出できるようになったと考えられる。

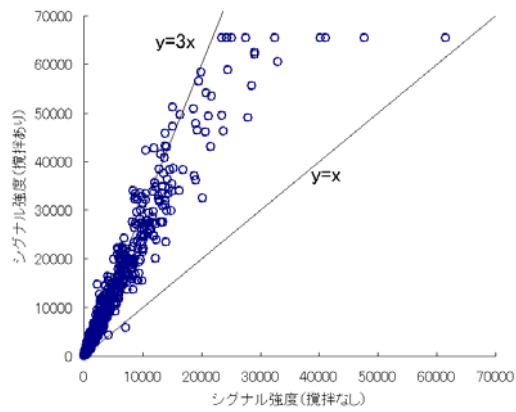
A 攪拌なし



B ビーズ攪拌あり



C



D

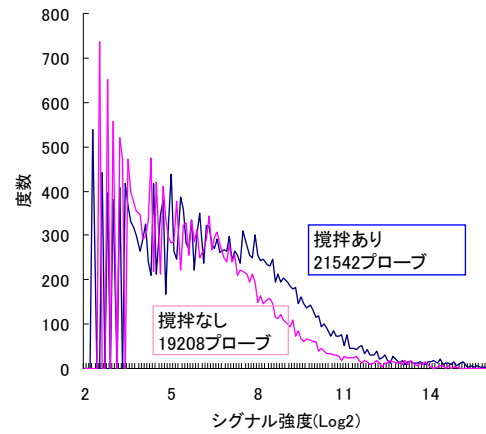


図 2-4 攪拌効果

A 検出画像(攪拌なし)、B: 検出画像(ビーズ攪拌あり)、C: シグナル強度の散布図 横軸が攪拌なし、縦軸がビーズ攪拌ありの条件で得られた検出シグナル強度 D: シグナル強度のヒストグラム

以上のように、ビーズ攪拌が可能な柱状構造 DNA チップを用い、ハイブリダイゼーション時にビーズで攪拌することにより、静置でのハイブリダイゼーションに比べ、検出シグナルが 2~3 倍の増加することが分かった。

3) スパイクイン実験による基本性能の検証

スパイクイン実験は、DNA チップで標識済み核酸を検出する際、既知量の標識済み RNA を添加し検出する方法で、投入した核酸量と検出シグナル値の関係を検証することができるため、感度を直接的に評価することができる。Tong *et al.* (2006)は、この方法を持ちいて、DNA チップのプラットフォーム間の性能の検証を試みた。本研究でも同様の手法を用い、感度性能を評価する。図 2-1 に実験のスキームを示した。Total RNA を逆転写し(RT)、cDNA を合成する。cDNA を鋳型に IVT(in vitro transcription)反応によって cRNA を合成する。cRNA は、蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションに用いる。本研究では、スパイクイン RNA をハイブリダイゼーションの直前(図中の Fragmented cRNA)で添加した。Tong *et al.* (2006)の報告では、最も微量の RNA を検出できたプラットフォームは、1:300k まで検出できていた。この値を指標に、開発した高感度 DNA チップの性能を評価する。

YPDA 培地で培養した酵母株(*gpd1* 欠損株)から抽出した Total RNA を標識し、標識サンプルを得た。スパイク RNA は、*gpd1* の cDNA をクローニングしたプラスミドから、in vitro 転写により *gpd1* mRNA を合成した。*gpd1* 欠損株由来の標識済み aRNA と、標識済み *gpd1* mRNA を、混和しハイブリダイゼーションした。混和に際して、以下の仮定を用いた。スパイク RNA と total RNA に含まれる mRNA とのモル比の計算には、Tong *et al.*(2006)に従い、次の仮定を用いた。10⁶ 個の細胞は、2.5ug の total RNA を持っており、そのうち mRNA は 2%である。mRNA の長さの平均を 2000 塩基であるとし、さらに、一塩基あたりの分子量は 330 g/mol であるとした。この仮定のもと計算すると、1 細胞あたりに 1 コピー存在する mRNA 分子と、それ以外の全ての mRNA とのモル比は、1/46k となる。すなわち、1 細胞あたりには、4 万 6 千分子の mRNA があると計算される。

標識済み *gpd1* mRNA のモル数と *gpd1* 欠損株由来の標識済み aRNA 中に含まれる mRNA の長さの平均を 2000 塩基であるとし、さらに、一塩基あたりの分子量は 330 g/mol であるとして、それぞれのモル濃度を算出し、混和に用いた。

標識済み *gpd1* mRNA のモル数:*gpd1*欠損株由来の標識済み aRNA 中に含まれる mRNA のモル数の比が 1:150k になるように混和したハイブリダイゼーション溶液を調整し、DNA チップにアプライした。図 2-5 にハイブリダイゼーション後の画像及びシグナル値の解析結果を示す。この実験に用いた DNA チップは 2 種類で、*gpd1* とハイブリダイゼーションするプローブ DNA を固定化させたビーズ攪拌可能な柱状構造 DNA チップ(3D-Gene)と、Agilent 社の出芽酵母 DNA チップである。Agilent 社 DNA チップは、スライドガラス基板にプローブ DNA が固定されているもので、気泡によってハイブリダイゼーション溶液を攪拌する方法を用いている。なお、どちらの DNA チップも、ハイブリダイゼーション溶液の量は、100μL 程度であることから、同じモル比で実験したときには、実験に供された標識済み *gpd1* mRNA のモル数は同一である。

検出結果から、*gpd1* mRNA に対応するプローブのシグナル値(S)とバックグラウンドノ

イズ(N)を求め、S/N比で比較した。比較のため Agilent 社の DNA チップにも同じサンプルをアプライし、検出した。Agilent 社 DNA チップでは、S/N 比が 3 であったのに対し、ビーズ攪拌可能な柱状構造 DNA チップでは、S/N 比が 10 であった。すなわち、ビーズ攪拌可能な柱状構造 DNA チップは Agilent 社 DNA チップよりも 3 倍以上の S/N 比を有していた。

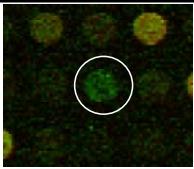
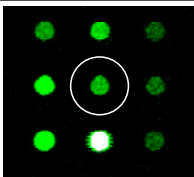
		1:150K
Agilent Protocol: Agilent	361 (S/N : 3)	
3D-Gene Protocol: 3D-Gene	1467 (S/N : 10)	

図 2-5 スパイクイン実験の検出画像

Agilent 社：出芽酵母 DNA チップ、3D-Gene：ビーズ攪拌可能な柱状構造 DNA チップのいずれも、*gpd1* のプローブ DNA(円で囲んだスポット)の他、酵母遺伝子検出用のプローブ DNA が固定されており、*gpd1* 欠損株由来の標識済み aRNA に含まれていた mRNA がハイブリダイゼーションしている。

さらに、ビーズ攪拌可能な柱状構造 DNA チップ(図 2-5 で用いた 3D-Gene とはプローブ DNA のスポット位置が異なる)を用いて感度検証を行った。標識済み *gpd1 mRNA* のモル数：*gpd1* 欠損株由来の標識済み aRNA の混和比を、1:15K, 1:75K, 1:300K, 1:600K, 1:1200K, 1:2400K の混和比の溶液をハイブリダイゼーションさせたときのシグナル強度を評価した。図 2-6 に検出結果を示している。1:15K, 1:75K, 1:300K の条件では、バックグラウンドノイズ(図中の青丸)に比べ、高いシグナルが得られており *gpd1 mRNA* を検出できている。1:600K, 1:1200K では、僅かではあるがシグナルが検出されている。一方、1:2400K では、シグナル強度がバックグラウンドノイズと差がみられない。Tong *et al.* (2006)では 1:300K の検出が限界であると報告されていた。高感度 DNA チップは、1:1200K でもシグナルを検出できていることから、他社 DNA チップ技術よりも高い感度性能を持つことが示された。

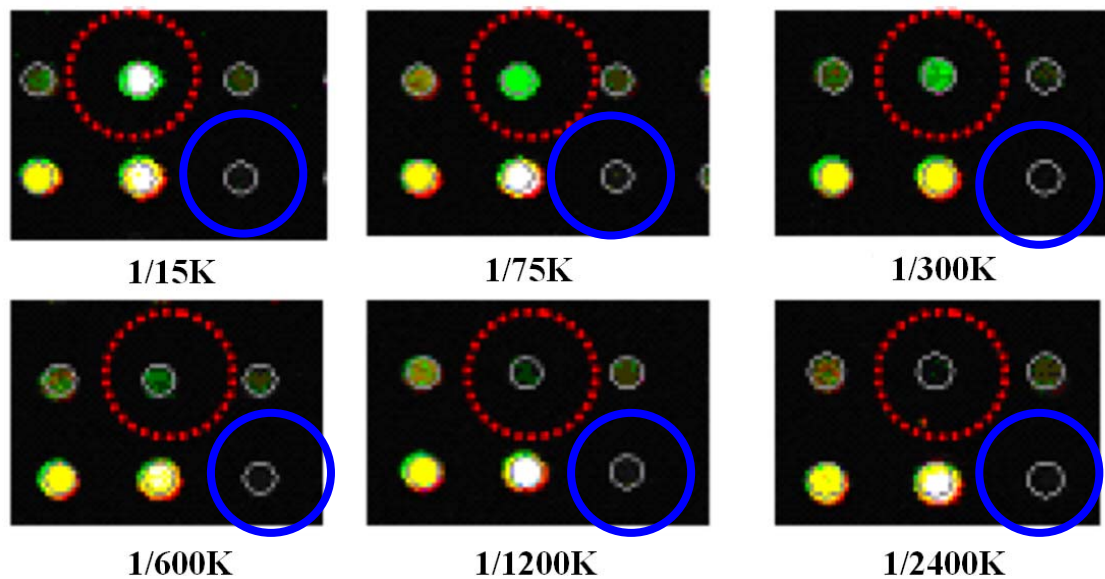


図 2-6 検出感度

各画像下の記載は、スパイクイン RNA と、mRNA とのモル比を示す。赤丸が *gpd1* 検出プローブ、青丸が何も固定化されていないスポット(バックグラウンドノイズ)を示す。その他のスポットは、*gpd1* 欠損株由来の標識済み aRNA に含まれている mRNA がハイブリダイゼーションしている。

b. プローブ DNA

1) 新規アミノ基修飾オリゴ

スポットピン方式で製造される DNA チップは、あらかじめ合成したプローブ DNA をスポットピンで基板上に転着させる。プローブ DNA と基板表面の結合は、プローブ DNA の 5'末端に付加されたアミノ基と、基板表面の官能基との共有結合による方法が用いられていた。従来、合成したプローブ DNA は、純度を高めるため HPLC 精製されたものを用いてきた。DNA チップ用に多数のプローブ DNA を用意する場合、HPLC 精製を用いるとコストが大きくなってしまい、数万種類のプローブ DNA を HPLC 精製で用意することは困難であり、実際にはカートリッジ精製による脱塩のみ施された DNA を用いることが多かった。Kojima *et al.*(2005) と Komatsu *et al.*(2008) は、新たなアミノ基修飾法を開発することで精製コストを低減しつつ、高純度なプローブ DNA が得られる方法を開発した。図 2-7 に、従来のアミノ基修飾オリゴと Kojima *et al.* (2005) と Komatsu *et al.* (2008)が開発した新アミノ化オリゴの合成および精製フローを示している。従来法では、オリゴ合成後、脱保護処理し、脱塩精製のみ施された低純度 DNA か、HPLC で逆相精製した高純度な DNA のいずれかが提供さる。新アミノ化オリゴでは、アミノ基修飾に加え、極性の強い官能基を付与することにより、逆送精製を簡易的なカラムで行えるようにし、短時間で高純度な精

製が可能となっている。

新アミノ化オリゴを用いることで、これまでよりも安価に高品質な DNA プローブを得ることができる。しかし、新アミノ化オリゴ DNA を市販の DNA チップで用いられた実績が無かった。そこで、私は、DNA チップへの固定化反応、ハイブリダイゼーション反応の効率を従来法と比較するため、評価を行った。

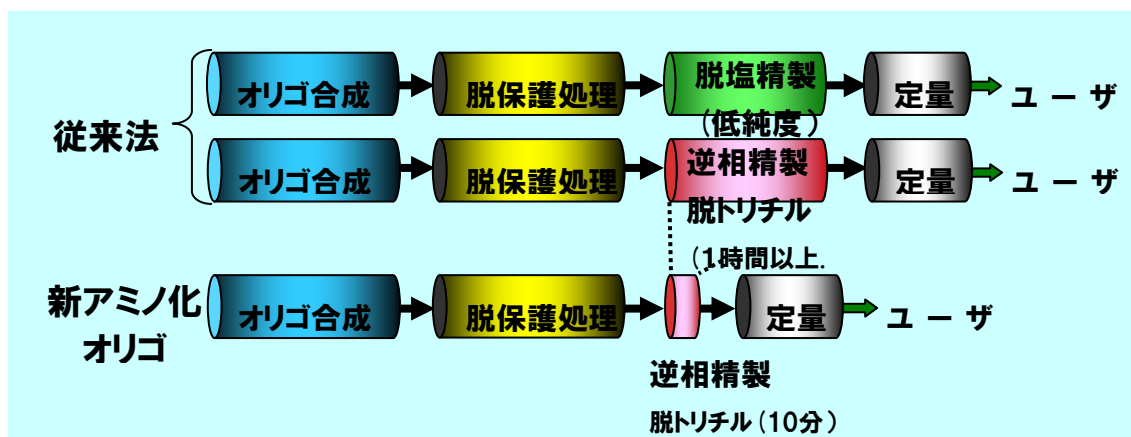
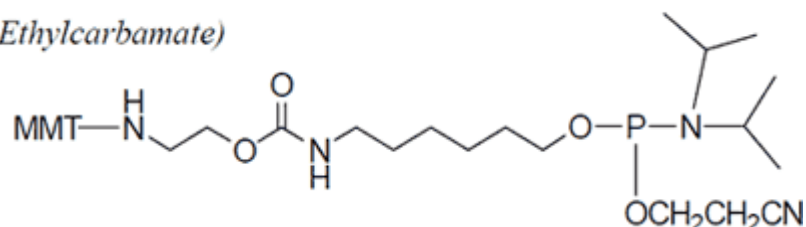


図 2-7 オリゴ DNA の合成・精製フロー

A 新アミノ化オリゴ

MMTr-EC Amino-linker

(EC = Ethylcarbamate)



B 従来のアミノ基修飾

MMTr-Amino Linker

(conventional)

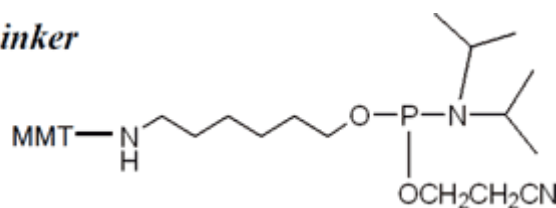


図 2-8 アミノ基修飾の違い

A 新アミノ化オリゴのアミダイト、 B 従来修飾塩基のアミダイト

2) 新アミノ化オリゴの反応性評価

まず、新アミノ化オリゴの 5'末端アミノ基の反応性を評価した。従型アミノ基修飾オリゴと新アミノ化オリゴを用意し、溶液中での FITC(fluorescein isothiocyanate)および biotin-NHS との反応産物量を比較した(図 2-9)。FITC のイソチアシアネート基、biotin-NHS のスクシニミジル基との反応性を評価する。FITC では、従来修飾オリゴが 10%程度のみ標識されたのに対し、新規アミノ化オリゴでは、50%強が反応している。また、Biotin-NHS との反応は、従来修飾オリゴが 50%弱の反応生成物量であったのに対し、新規アミノ化オリゴは 80%程度が反応している。以上のように、新規アミノ化オリゴは、溶液中の反応において、反応性が高いことが示された。

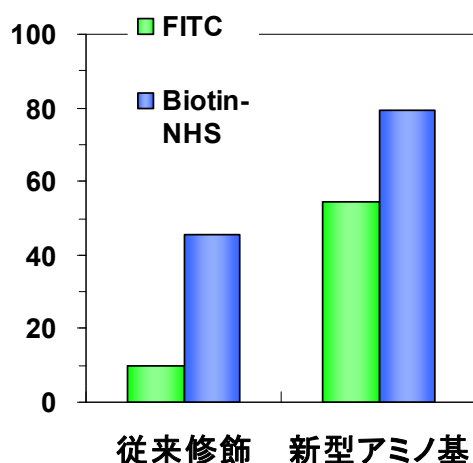


図 2-9 溶液中におけるアミノ基の反応性

縦軸：投入したオリゴ DNA の量に対する反応生成物の比率

3) オリゴ DNA の基板との結合量比較

従来型のアミノ基修飾(Con)と新規アミノ基修飾(ssH)の DNA チップ基板上への固定化効率を調べた。5'末端を従来型アミノ基で修飾したオリゴ DNA と、新規アミノ基で修飾したオリゴ DNA を用意し、DNA チップ基板上にそれぞれを共有結合で固定した。図 2-10 に基板上の固定化されたオリゴ DNA を 3'末端蛍光標識で検出した検出値を示している。従来型アミノ基修飾オリゴ(Con)は、スポット溶液濃度が 20 μ m あたりで、固定化量が飽和し始めている。一方、新規アミノ基修飾は、スポット溶液に含まれるオリゴ DNA の濃度に依存してシグナル強度が増加しているが、従来型アミノ基修飾に比べ、新規アミノ基修飾は、高い固定化量を示している。このことから、溶液中の反応と同様に、ssH は基板表面とも効率良く反応している。

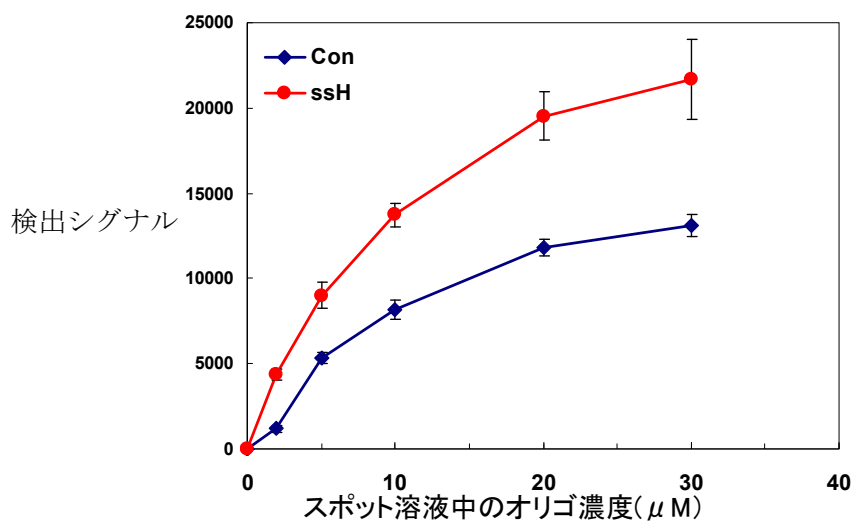


図 2-10 基板上への固定化量

4) ハイブリダイゼーション効率の比較

オリゴ DNA の末端修飾法の違いによる、ハイブリダイゼーションへの影響を評価するため、5'末端 Cy5 標識したアンチセンス鎖 DNA を、DNA チップ上のプローブ DNA にハイブリダイゼーションさせ、検出シグナルを得た(図 2-11)。新アミノ基修飾(ssH)では、スポット溶液濃度の増加に合わせて検出シグナル値も増加していく。従来型修飾(con)も同様、スポット溶液濃度依存的にシグナル強度が高まっている。図 2-11 で示したプローブ DNA の基板上への固定化量と図 2-11 の結果を合わせて考えると、基板上への固定化量を考慮すると、ssH と Con ではハイブリ効率は変わらず、ssH においてプローブの固定化量が相対的に多いため、ハイブリダイゼーションのシグナル強度が強くなっていると考えられた。30 μM スポット溶液を用いた場合、シグナル強度が 2 倍程度増強することが分かった。

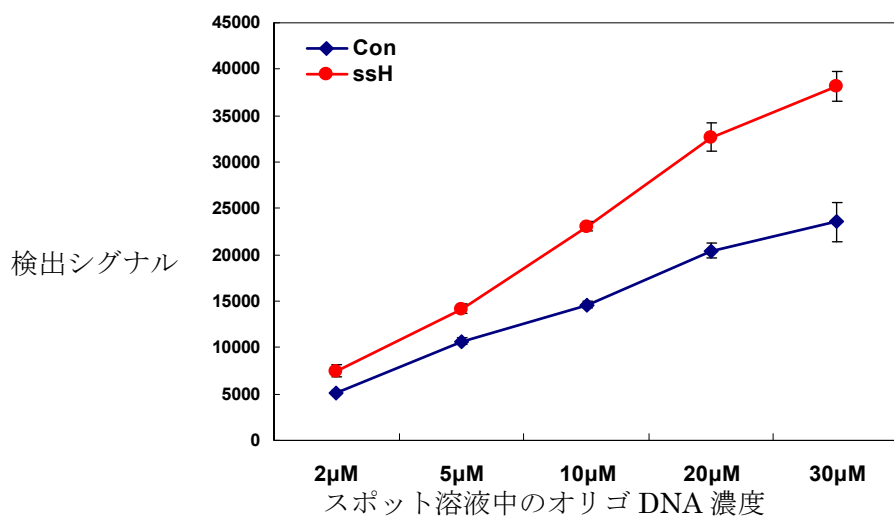


図 2-11 ハイブリ効率の比較

2.4 考察

本研究では、検出感度と検出精度の向上のために、2つの技術を組み合わせた。柱状構造を持った低バックグラウンドノイズの基板とビーズ攪拌による反応効率向上技術 (Nagino *et al.* 2006) と、低コストで品質の高い新規アミノ基修飾プローブ DNA (Kojima *et al.* 2005, Komatsu *et al.* 2008) である。これにより、従来の DNA チップよりも高感度な DNA チップを作製することができる。

ビーズ攪拌による検出感度評価を行った実験(図 2-6)では、標識済み *gpd1 mRNA* のモル数:*gpd1* 欠損株由来の標識済み mRNA の混和比が 1:1200K まで検出できることを示した。1 細胞あたりに 1 分子だけ発現している mRNA は、1:46K であるため、1:1200K は 26 細胞に 1 分子存在している mRNA を検出できる計算になり、発現量の低い遺伝子を検出できる。この検証実験では、既知量の標識済み *gpd1 mRNA* を混和した。材料と方法に記載したとおり、500ng の標識済み *gpd1 mRNA* に対して 1:1200K となる量の標識済み *gpd1 mRNA* を添加し、液量を 100uL とし、その全量を DNA チップにアプライした。すなわち、DNA チップ上には 0.6amol(3.6×10^5 分子)の標識済み *gpd1 mRNA* が存在したことになる。さらに、新規アミノ修飾オリゴを用いることで、感度は 2 倍程度増加できることから、0.3amol(1.8×10^5 分子)を検出できる計算となる。

臨床検査分野において、検査コストは重要な因子となる。ウイルスの核酸配列を PCR 法で増幅した上で検出すれば、DNA チップに感度性能は要求されない。しかし、PCR 法を実施することでコストが発生するため、増幅なしでウイルスの核酸配列を検出することが望ましい。Hsu *et al.* (2011)は、ウイルスの RNA を高感度に検出するため、金粒子と ICP-MS(誘導結合プラズマ マススペクトロメトリー)を利用し、0.08amol のウイルス由来の RNA の検出に成功している。Hsu らの方法は、PCR 法での増幅はしていないが、ICP-MS による検出が必要である。本研究では、一般的な標識方法に開発した DNA チップを組み合わせたのみで、0.6amol まで検出できた。DNA チップの検出感度は Hsu *et al.* (2011)に比べ、一桁低い。しかしながら、市販の蛍光標識試薬類(genispher 社 FlashTag)を用いて、検出シグナルを増強させることのできるため一桁向上は可能と考える。

本研究で開発した高感度 DNA チップは、臨床分野への活用が期待される。PCR 増幅せずにウイルスや細菌を検出するには、さらなる高感度化が必要であると考えられる。DNA チップ基板や、プローブ DNA については高感度化できたと考える。今後、検出対象ごとに最適化したプローブ配列や実験プロトコールなどについて、高感度化の取り組みが必要となってくる。

第3章 高感度酵母チップの設計とその検証

3.1 目的

従来の DNA チップよりも高感度な DNA チップ技術を開発した。本技術を生物現象の解析に用いた場合、どの程度の性能及びメリットが得られるのか検証するため、出芽酵母をモデルに、高感度酵母チップの設計とその検証試験を行った。

a. 酵母チップの設計

出芽酵母の全遺伝子に対応するプローブ配列を設計するにあたり、検出精度を考慮した。検出精度に影響を与える要因として、検出時のバックグラウンドノイズや、プローブ配列の特異性が挙げられる。バックグラウンドノイズは、樹脂基板に黒色粒子を添加し、自家蛍光を低く抑えることで解決している。プローブ配列には、検出対象の遺伝子以外の配列に対して、相同性が低く、ハイブリダイゼーションしないような設計である必要がある。特異的な設計でないプローブ配列を用いると、他の mRNA とハイブリダイゼーションしてしまい、検出結果が不正確となる。設計したプローブ配列は、blast 検索(Altschul *et al.* 1990)や clustalW(Thompson *et al.* 1994)等の手法により、特異性を評価することができる。しかし、クロスハイブリダイゼーションの可能性は、ハイブリダイゼーションの条件(バッファ組成、ターゲット核酸の濃度、反応温度など)によって変わってくるため基準値を設けることは難しい。本研究では、コンピューター上でのプローブ設計と実験によるプローブ性能評価を組み合わせたプローブ設計方法を行い、十分に評価されたプローブ配列を高感度 DNA チップに搭載した高感度酵母チップの開発を目的とする。

b. 高感度酵母チップの検証

高感度酵母チップが設計通りに高感度性能を持っているか、また高感度検出によってどのようなメリットが得られるか検証するため評価試験を行う。評価には、Onda *et al.* (2004) の構築した転写因子解析のモデル系を用いる。

転写因子の機能解析の鍵は標的遺伝子群の網羅的同定である。しかし転写因子の多くが活性化に上流からのシグナル伝達を必要とするため、活性化刺激を先験的に知ることが出来ない新規転写因子では破壊株や単純な過剰発現株を用いた標的探索には限界がある。恩田らは、この問題を克服するために、転写因子の DNA 結合ドメインを VP16 転写活性化ドメインとキメラ化することで恒常活性化して標的遺伝子の発現を強制誘導する戦略を考案し(図 3-1)、出芽酵母 Zn2Cys6 型転写因子をモデルにその有効性を検討している(Onda *et al.* 2004)。本方法は、キメラ転写因子を、その上流にある *Gal2* プロモーターによって発現誘

導し、キメラ転写因子の増加によって発現が誘導される遺伝子を同定する。同定した遺伝子の機能を調べることで、キメラ化した転写因子の機能を推定する方法である。本研究では、高感度酵母チップが従来の DNA チップに比べ、発現誘導が観察された遺伝子を多く検出できるか調べることを目的に行う。

また、検出した遺伝子候補が妥当なものであるか検証するために、Gene ontology 解析と、YEASTRACT(Teixeira *et al.* 2006)を用い、評価を行う。Gene ontology 解析は、遺伝子ごとに付与された機能情報をもとに、遺伝子を機能で分類する解析方法である。転写因子の役割を考えると、転写因子によって誘導される遺伝子は、その転写因子と同じ機能分類となっている可能性が高い。本研究では、誘導された遺伝子の Gene ontology が、転写因子の分類と同一であることを評価の指標に用いる。しかし、機能未知の遺伝子は、転写因子に Gene Ontology が割り振られていない。そのため、機能未知の転写因子は、誘導された遺伝子から、転写因子の機能を推定することを行う。YEASTRACT は、転写因子と遺伝子との関連性を、既知の情報とシスエレメントのモチーフ配列による予測の両者による解析が可能な公開されたデータベースである。DNA チップ実験で得られた発現が誘導された遺伝子群が既知の遺伝子であるか、あるいはモチーフ配列から予測可能な遺伝子であるかという 2 点から、検出された遺伝子の妥当性を検証する。

以上のように、本研究では、転写因子によって誘導される遺伝子の探索をモデルに、高感度酵母チップが従来の DNA チップよりも高感度であるか評価することを目的とした。

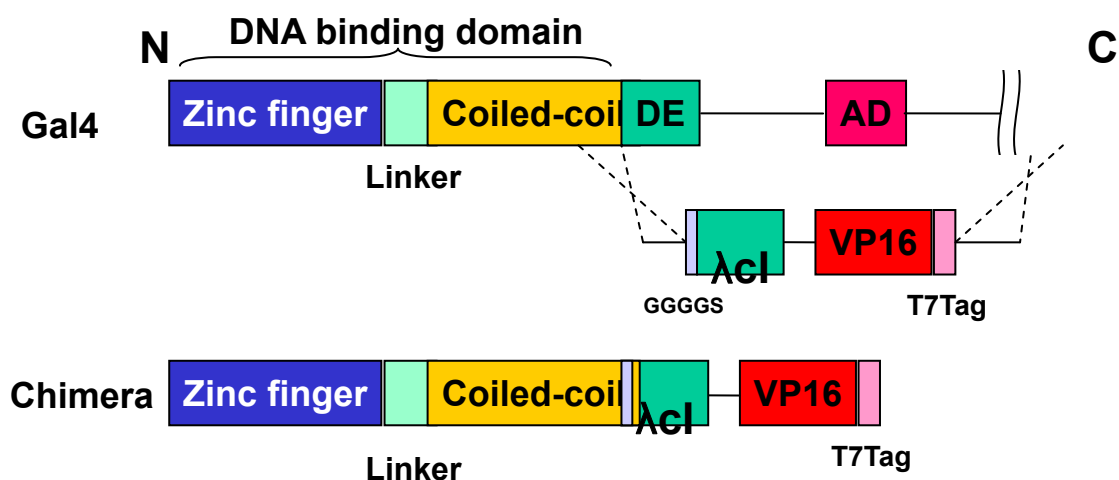


図 3-1 キメラ転写因子の構成

Onda *et al.* (2004).より引用して転載

3.2 材料と方法

a. 酵母株

Fy1679-28C(*MAT α* , *ura3-52*, *leu2- Δ 1*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *GAL2+*)を親株とし、合計 7 種類の Zincfinger 転写因子(Zn2Cy6 型: *Pdr1*, *Put3*, *Sef1*, *Lys14*, *Pip2*, *Oaf1*, *Cat8*)のキメラ遺伝子を、Gal1 プロモーターを用いて発現誘導を行った。

b. キメラ転写因子による発現誘導

1% yeast extract, 2% peptone, 2% raffinose, 0.004%adenine で 30°C、17 時間培養した後、同じ培地で 100 倍に希釈し、galactose を終濃度 0.1%になるように添加し、3 時間培養した。培養後、Total RNA を抽出した。

c. Total RNA の抽出

酵母細胞からの total RNA 抽出は次の手順で行った。酵母株は YPAD 培地で一晩、30°C で振とう培養(前培養)した後、OD660=0.1 になるように 150 ml の YPAD 培地に植菌、30°C で振とう培養した(本培養)。OD660 が 0.6 にまで増殖したところで集菌し、得られた細胞から、ホットフェノール法(Sambrook *et al.* 1989)で total RNA を調整した。

d. 標識核酸の調整

抽出した Total RNA を Amino Alkyl Message AMP II aRNA Amplificatin Kit (アプライドバイオシステムズ)を用いてアミノアルル aRNA を合成した。アミノアルル aRNA は Cy3-NHS ester または Cy5-NHS ester で標識した。

e. データ解析

検出したシグナル値は、バックグラウンドノイズ値を除いた後、LOWESS 法によって補正した。検出のカットオフ値は、バックグラウンドノイズ値の 2SD を用いた。遺伝子の GO 解析には GoTermFinder(SGD、<http://www.yeastgenome.org/>)を用いた。転写因子と発現誘導された遺伝子の関連性は YEASTRACT データベース(Teixeira *et al.* 2006)を用いた。

3.3 結果

a. プローブ設計

DNA チップに用いられるプローブ配列は、特異性と反応性が必要とされる。特異性とは、検出対象の遺伝子配列のみにハイブリダイゼーションする性質を持つことと定義できる。検出対象ではない遺伝子配列とハイブリダイゼーションすることをクロスハイブリといい、データの精度を低下させるノイズの原因となる。そのため、プローブの特異性は最も重要な性質であると言える。特異性は、プローブ設計アルゴリズムによってある程度は担保でき、また **Blast** 検索などの手法により、評価することは可能である。

反応性は、検出対象の DNA の濃度に応じた量の検出対象の核酸を捕捉できることと定義できる。すなわち、ターゲット核酸の濃度依存的に補足できる核酸量が増え、シグナル強度も向上する性質である。プローブ配列の二次構造によって決まるとされているが、どのような配列である場合に反応性が低下するか詳細は分かっていない。

そこで私は、設計したプローブ配列の反応性を実験で評価し、再度設計に反映させることを繰り返し行った。プローブ設計には、**Yamada et al.(2004, 2006)**の設計アルゴリズムを用い、出芽酵母の全遺伝子に対して、30 塩基の長さのプローブ配列を設計した。**Yamada et al.**の設計アルゴリズムは、ハイブリダイゼーションの状態を会合率で表現し、検出対象の配列とプローブの反応の会合率と、検出対象ではない配列とプローブの会合率との差が最大になるようなプローブ配列を選択する方法であるため、特異的な配列を選択することができる。設計後、プローブ配列を出芽酵母の全ての mRNA 配列に対して、**blast** 検索 (**Altschul et al. 1990**)し、特異性を評価した(図 3-2)。Blast 検索では、検出対象の mRNA の配列を除く、全ての酵母の遺伝子配列に対して、一致塩基数(相同な塩基の数)と連続一致塩基数(相同な塩基の連続している長さ)について評価した。一致塩基数が多い(図 3-2 の下側に近づく)ほど相同性が高く、クロスハイブリしやすくなる。反対に、図の上側に近づくにつれて一致塩基数が少なく、特異性が高い。図 3-2 は、設計したプローブ配列ごとに blast 検索した結果から、一致塩基数と連続一致塩基数を抽出し、マトリックス上でカウントしている。一致塩基数が 20~24 塩基、連続一致塩基数が 12~16 の範囲に、大半のプローブ配列が含まれていることが分かる。青枠で囲った、一致塩基数が 30 塩基中 25 塩基以上、あるいは 30 塩基中 24 塩基で連続して一致する場合は、再設計とした。条件を満たすまで再設計を実施した。

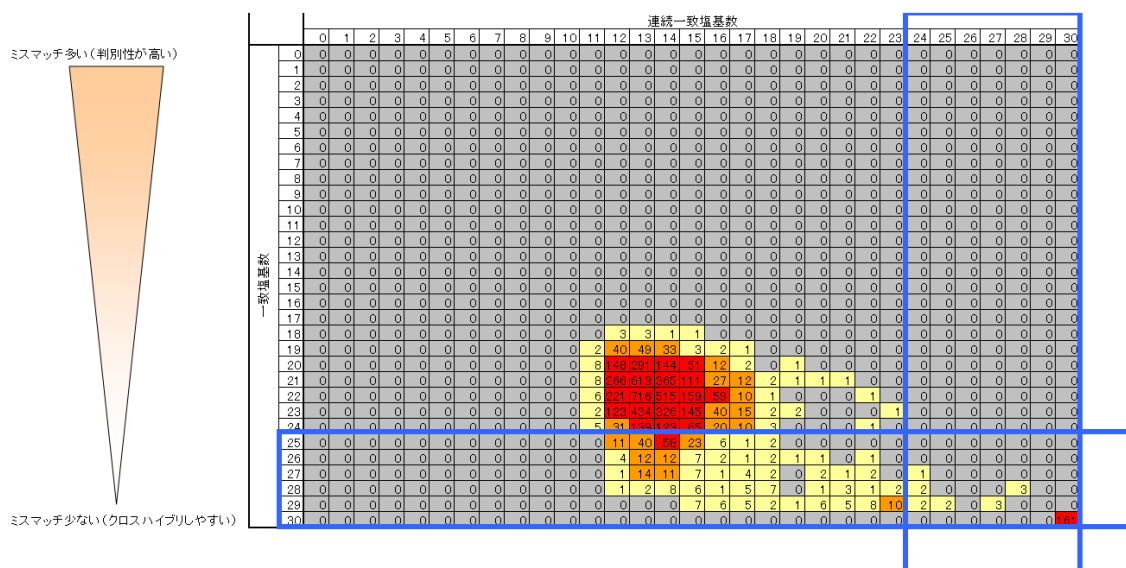


図 3-2 プローブ配列の特異性評価

縦方向：一致塩基数、横方向：連続一致塩基数 それぞれ 0 から 30 まで間の数値をとる。

マトリックスの中の数字は、一致塩基数及び連続一致塩基数が該当するプローブ配列の数を示す。

プローブ配列によっては、捕捉する標識 RNA の濃度依存的にシグナル強度が増加しないものがある。そこで、標識 RNA を、複数の濃度水準にし、それぞれを DNA チップで検出した。各プローブ配列について、濃度水準の数のデータセットが得られる。横軸を濃度、縦軸をシグナル強度にして、得られたデータをプロットしたものが図 3-3 である。図 3-3 の左のグラフでは、赤丸で囲った部分に濃度依存的にシグナル強度が変動しなかったプローブ配列が含まれている。これらのプローブ配列は再設計、再評価することで濃度依存的にシグナル強度が増加するプローブ配列を得た。図 3-3 右は、全てのプローブ配列で濃度依存的に検出シグナル値が得られていることを示している。

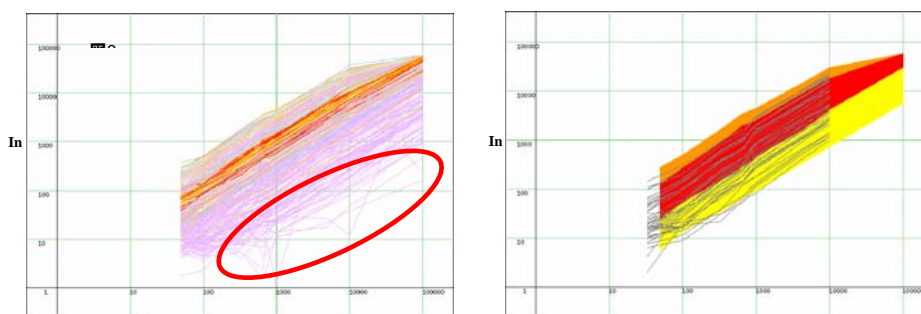


図 3-3 検出シグナル値と標識 RNA 濃度の相関性

左の赤丸で囲っている部分が濃度依存性のないプローブ配列

設計した出芽酵母用プローブ DNA を、高感度 DNA チップ技術に適用し、高感度酵母チップを作製した。高感度酵母チップは、出芽酵母の約 6000 遺伝子を検出できるプローブ DNA が搭載されている(図 3-4)。この高感度酵母チップは、現在、市販されており入手可能である(東レ <http://www.3d-gene.co.jp>)。

Yamada *et al.*の設計アルゴリズムを用いた特異性の高いプローブ配列の選択と、実験によって検出対象の配列との反応性を確認し、濃度依存的に反応しなければ再設計するという戦略は、酵母のみならず様々な生物種のプローブ設計に活用できる。

A



B

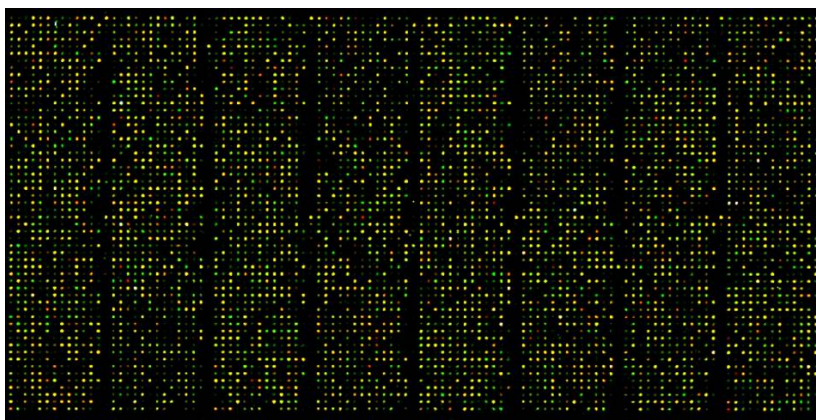


図 3-4 高感度 DNA チップ 3D-Gene yeast oligo DNA チップ

A 外観、B 高感度 DNA チップを用いた酵母 mRNA の検出画像例

b. GeneChip との感度比較

次に、高感度酵母チップの感度性能を評価するため、モデル系を用いて GeneChip(Affymetrix 社)との比較評価を行った。キメラ化した転写因子を強制的に発現

させ、誘導されてくる遺伝子を探索することで、転写因子の制御ネットワークを探索するものである。本研究で対象とした転写因子の Go Term を表 3-1 に示した。キメラ転写因子のうち、組み込んだ転写因子の Go term を表 3-1 に示す。Pip2 は脂肪酸代謝、Pdr1 は化合物への応答、Put3 はプロリン代謝、Lys14 はリジン生合成、Oaf1 は脂肪酸代謝、Cat8 は糖新生にそれぞれ関与している。いずれの転写因子も分子機能は、転写因子活性、あるいは DNA 結合性があると分類されている。Sef1 は転写因子と推定されているが、機能未知の遺伝子であるため GoTerm は付与されていない。

表 3-1 転写因子の Go term

転写因子	Biological process	Molecular function
Pip2	fatty acid metabolism	DNA binding
	peroxisome organization and biogenesis	transcriptional activator activity
	positive regulation of transcription	
Pdr1	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	DNA binding
	polymerase II promoter	
	response to drug	transcriptional activator activity
Put3	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	specific RNA polymerase II transcription
	RNA polymerase II promoter	factor activity
	proline catabolism	transcriptional activator activity
Sef1	unknown	unknown
Lys14	lysine biosynthesis via aminoadipic acid	transcriptional activator activity
Oaf1	fatty acid metabolism	DNA binding
	peroxisome organization and biogenesis	transcriptional activator activity
	positive regulation of transcription	
Cat8	positive regulation of gluconeogenesis	specific RNA polymerase II transcription
	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	factor activity

キメラ転写因子を発現誘導した 7 つの酵母細胞株(Pip2, Pdr1, Put3, Sef1, Lys14, Oaf1, Cat8)と、転写因子を組み込んでいない空ベクターを導入した酵母細胞をネガティブコントロールにおき、各々培養したのちに total RNA を抽出した。Total RNA は標識後、DNA チップで検出した。得られた検出シグナル値から、変動比(誘導株/ネガティブコントロール)を計算した。検出した遺伝子の数、及び変動比が 2 倍以上増加している遺伝子の数を表 3-2 に示した。高感度酵母チップは GeneChip に比べ、2 倍以上多くの遺伝子を検出できた。転写因子によって、誘導される遺伝子数にも大きな差がみられる。また、機能が

不明であった Sef1 でも発現誘導が観察されたことから、転写因子活性を持っているものと推定された。比較として、GeneChip での検出遺伝子数を示した(表 3-2)。どの遺伝子においても、高感度酵母チップの検出数が多いことから、高感度酵母チップは GeneChip よりも高感度であるといえる。

表 3-2 キメラ転写因子の過剰発現によって 2 倍以上発現量が増加した遺伝子の数

転写因子	高感度酵母チップ		GeneChip	
	検出遺伝子	変動遺伝子	検出遺伝子	変動遺伝子
Pdr1	5346	55	2904	25
Put3	5289	44	2653	17
Sef1	3710	31	2581	21
Lys14	4691	146	2636	50
Pip2	5344	277	1937	48
Oaf1	5364	271	1897	59
Cat8	5770	169	2251	110

図 3-5A に検出シグナルの Oaf1 を強制発現し、遺伝子の誘導を検出した結果を示した。高感度酵母チップの散布図は、低シグナルから高シグナルまで均等に分布している。2 倍以上変動している遺伝子も全体に存在している。桃色のドットは、信頼性の低いデータを示している。高感度酵母チップは、DNA チップ上に複数ある Blank スポットのシグナル値を元に計算した値を用い、Blank スポットのシグナル値の平均値+2×SD 値を下回っている場合に、信頼性が低いとしている。

一方、GeneChip の検出シグナルは、低シグナル域で広がっている。これは、検出時のノイズによってばらついたものと考えられる(図 3-5B)。2 倍以上発現変動している遺伝子は、低シグナル位置に集中している。GeneChip は、遺伝子ごとに複数のパーフェクトマッチプローブ(PM)と 1 塩基のミスマッチがあるミスマッチプローブ(MM)をそれぞれ複数搭載している。PM と MM のシグナル値に優位な差がないものを、桃色でプロットした。低シグナル域を中心に広がっており、変動比が大きな遺伝子も、桃色でプロットされている。

図 3-5C 及び D に、キメラ転写因子によって発現が誘導された遺伝子のヒストグラムを示した。高感度酵母チップは、反応性の良いプローブを選択することで高感度な DNA チップを開発した。検出した検出シグナル値は底が 2 の Log に変換しヒストグラムを作成した。高感度酵母チップは Log 変換した検出シグナル値 10 を中心に正規分布している。一方、GeneChip は、Log 変換した検出シグナル値 8 を中心にひろがっており、低シグナル域において膨らみがみられる。また、シグナルの分布が、高感度酵母チップに比べ狭く、ダイナミックレンジが狭いといえる。高感度酵母チップと GeneChip の検出結果を比較するため、GeneChip で Present あるいは Absent と判定された遺伝子が、高感度酵母チップでどの程

度のシグナル強度を得ているか調べた (図 3-6)。GeneChip で Present 判定の遺伝子は、高感度酵母チップでもシグナル強度が高い遺伝子群であることが分かる (図 3-6A, B)。一方、GeneChip で Absent 判定の遺伝子群は、高感度酵母チップではややシグナル強度の低い遺伝子群として検出されている。このことから、高感度酵母チップは、GeneChip で検出できなかった低発現遺伝子を検出できるといえる。

変動比 (誘導株/コントロール) のヒストグラムを図 3-7 に示した。高感度酵母チップは検出できた遺伝子の数が多いため、各階級の度数が GeneChip より大きい。また、高感度酵母チップは分布の広がり GeneChip に比べ大きいことが分かる。このため、2 倍以上変動した遺伝子が多く検出された。

以上のように、高感度酵母チップは GeneChip で検出できなかった遺伝子を多数検出することができる。このため、変動遺伝子数も多いと考えられる。なお、他の 6 つの転写因子についても同様の傾向が確認された(データは示さず)。

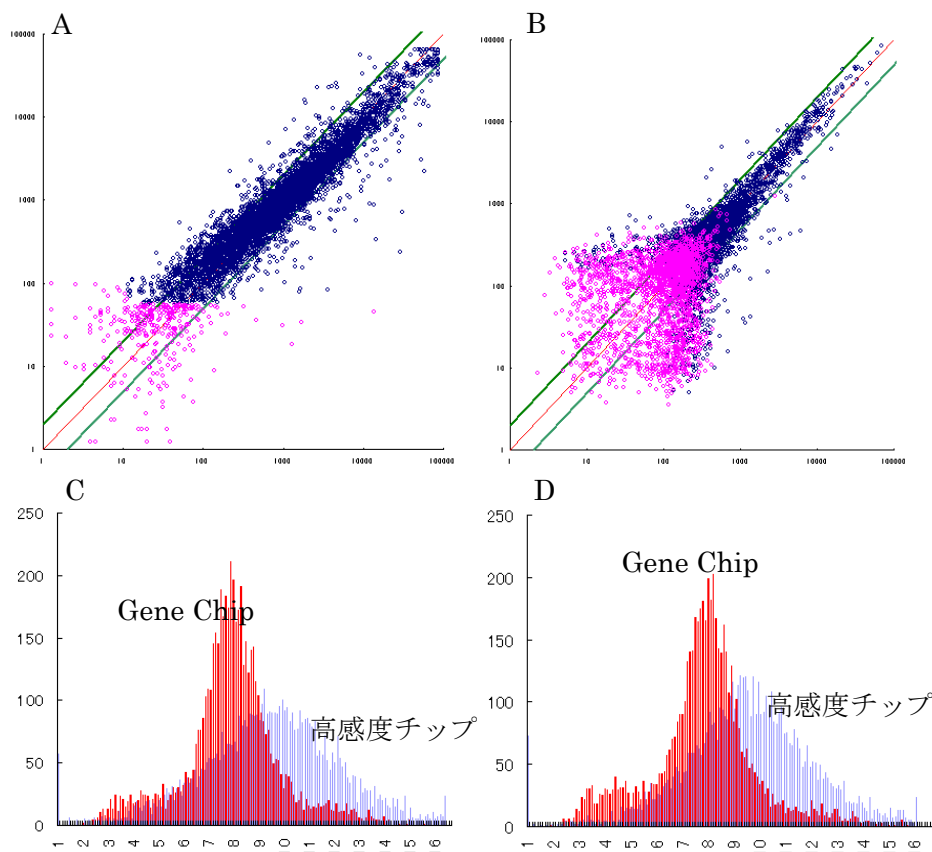


図 3-5 A. 高感度酵母チップ *oaf1* によって誘導された検出シグナル値の散布図 B. GeneChip 検出シグナル値の散布図、横軸側に誘導株のシグナル強度、縦軸に空ベクターのシグナル強度をプロットしている。緑線が 2 倍変動のライン、赤線が $y=x$ のラインを示す。C. キメラ転写因子によって発現が誘導された遺伝子のヒストグラム D. 空ベクター(コントロール)で検出された遺伝子のシグナル値のヒストグラム。横軸：シグナル強度、縦軸：頻度

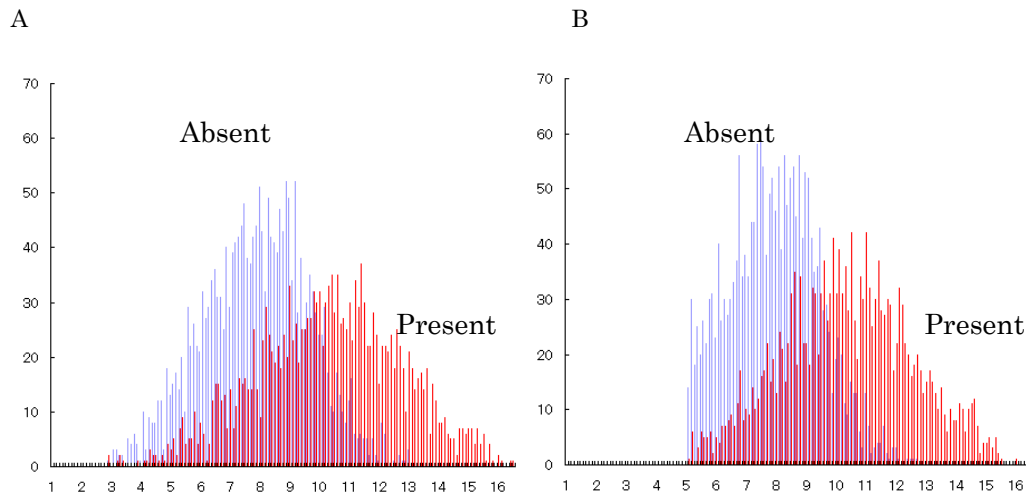


図 3-6 高感度酵母チップのシグナル強度分布と GeneChip の検出結果比較

横軸：シグナル強度、縦軸：頻度 A. 高感度酵母チップで検出した、キメラ転写因子によって発現が誘導された遺伝子のヒストグラム。GeneChip での検出結果 (Present、Absent) で分けし、プロットしている。B. 高感度酵母チップで検出した、空ベクター(コントロール)で検出された遺伝子のシグナル値のヒストグラム。GeneChip での検出結果 (Present、Absent) で分けし、プロットしている。

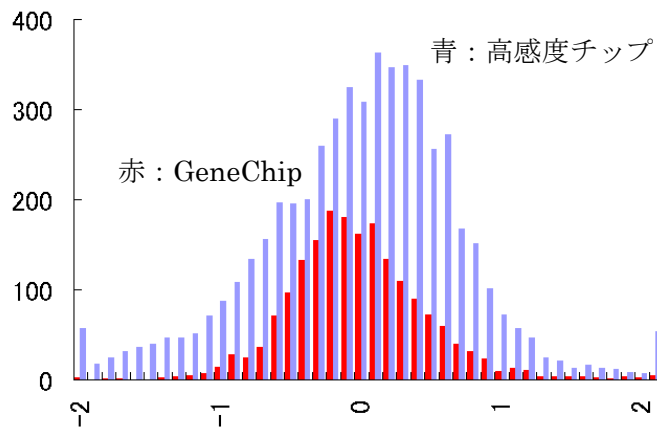


図 3-7 oaf1 強制発現により発現誘導された遺伝子の変動比ヒストグラム

c. 変動遺伝子の解析

高感度酵母チップは、GeneChip よりも多くの変動遺伝子を検出できた。検出した変動遺伝子が妥当であるか調べるため、Gene ontology による機能解析を行った。Gene Ontology は、全ての遺伝子に対して割り当てられており、表 4-1 に示したように転写因子についても付与されている。発現変動した遺伝子群の Go Term と、転写因子の Go Term が同一の分類、あるいは近傍の分類に該当するかを調べる。Go Term 解析には、SGD の Gene Ontology

Term Finder(Boyle *et al.* 2004) を用いた (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>)。

Gene Ontology 解析の結果、Pip2, Pdr1, Put3, Lys14, Oaf1 は、転写因子の Go Term と同じ Go Term が検出されたことから、検出結果は妥当であると判断した(付表 1, 2, 4, 5, 6)。Cat8-キメラ転写因子によって発現量が 2 倍以上増加した遺伝子の Go term 解析の結果を付表 7 に示す。Cat8 が含まれる糖新生は含まれておらず、炭水化物代謝に関連する遺伝子が多く含まれていることが分かる。

機能が分かっている転写因子である Sef1 について、Sef1-キメラ転写因子によって発現量が 2 倍以上増加した遺伝子の Go term 解析の結果を付表 3 に示す。”tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism”や”main pathway of carbohydrate metabolism”が誘導されており TCA サイクルとの関与が推察される。またカルボン酸を含む有機酸の代謝に関与している。

発現誘導された遺伝子の中には、キメラ転写因子によって直接的に発現誘導した遺伝子と、2 次的に誘導された遺伝子とが含まれているはずである。そこで、YEASTRACT データベース(Teixeira *et al.* 2006)を用い、関連性を解析した。YEASTRACT は、転写因子と誘導される遺伝子の関連性を、文献で発現誘導が報告されている既知遺伝子と、転写因子の結合塩基配列から予測した予測遺伝子の二つのアプローチで調べることができる。本実験で用いた転写因子と、発現誘導された遺伝子の関連性について YEASTRACT を用いて調べた(付表 8, 9)。GeneChip に比べ、高感度酵母チップでは、転写因子と関連性のある遺伝子を多く検出することができた。Pdr1 では、変動した 55 遺伝子のうち、35 遺伝子で転写因子との関連性を見いだせた。一方、機能未知の Sef1 については情報が登録されていなかった。

3.4 考察

本研究では、高感度 DNA チップに出芽酵母検出用のプローブ DNA を搭載した高感度酵母チップを開発した。検出精度を高めるため、特異性の高いプローブ設計と実験による評価を組み合わせ、特異性が高く反応性のよいプローブ設計を行った。本研究で実施したプローブ設計の最適化方法は出芽酵母に限らず、どのような生物種においても有効であると考えられる。高感度酵母チップの性能を評価するため、キメラ転写因子を強制的に発現させ、それにより発現誘導した遺伝子群を DNA チップによって探索するシステムを用い、7種類の転写因子のターゲット遺伝子の探索を実施した。高感度酵母チップでは多数の変動遺伝子を検出することができた。検出した遺伝子数を、GeneChip と比較したところ、どの転写因子条件でも、GeneChip より高感度酵母チップで多くの変動遺伝子を検出することができた。このことから、高感度酵母チップは、GeneChip よりも感度性能が高いことが示された。検出シグナル値の分布をみると、高感度酵母チップの方が、全体的にシグナル強度が高いことが分かった。高感度酵母チップは、特異性の高いプローブ設計と、実験により反応性の高いプローブのみを搭載している。そのため、シグナル強度が高く、低シグナル域におけるばらつきも少ない。また、転写因子と変動遺伝子の関連性を YEASTRACT で調べたところ、高感度酵母チップで関連性のある遺伝子が多数検出されていた。高感度であるからこそ得られた結果だと言える。

転写因子としての機能が不明であった Sef1 は、キメラ転写因子を用いた発現誘導により、追試は必要であるが、転写因子としての機能をもつことが示された。発現変動が検出された遺伝子数は 33 と少ない。Gene Ontology 解析の結果、TCA サイクルに関与する転写因子である可能性が示唆された。Sef1 は文献情報がなく、また転写因子結合配列も不明であるため、YEASTRACT データベースに情報が無かった。これまで解析の行われていなかった転写因子の機能解析には、本研究で用いたキメラ転写因子を用いた発現誘導のアプローチが有効であるのかもしれない。

開発した高感度酵母チップは、GeneChip よりも感度が高く、多くの遺伝子変動を検出することが示された。また、転写因子のターゲット遺伝子探索のように、多数の候補を検出する実験系では、有効であるといえる。

第 4 章 Genome Reorganization Technology(GReO)法の開発

4.1 目的

染色体およびゲノムの改変技術は、産業上の有益な株の育種のみならず、ゲノムの機能解析にとって有用である。近年、Sugiyama *et al.* (2005, 2009)は出芽酵母の染色体を断片化する技術である PCS 法を開発した。PCS 法は、セントロメアおよび分断株を選択するためのマーカーを 2 ステップの PCR で調整し、酵母に導入する方法で(図 4-1)、この技術を用いることで、簡単な形質転換の繰り返しで複数のミニ染色体をもった酵母細胞を構築できる。50kb 以下の染色体は有糸分裂の間に容易に脱落するので(Surosky *et al.* 1986)、酵母細胞は異なる条件で培養することで、様々なミニ染色体の組み合わせを持った酵母細胞を作り出すことができる。この技術を Genome Reorganization Technology(GReO)と名付けている。

本研究の目的は、GReO 法を評価することである。PCS 法によって複数のミニ染色体をもつ株を作り出し、実際に GReO 法によってミニ染色体の組み合わせ脱落を調べる。ミニ染色体を非必須遺伝子のみのゲノム領域で作らせば、脱落の頻度は、どのミニ染色体でも同一のはずである。脱落の組み合わせに特徴があるか調べた。

もう一つの目的は、GReO 法によって作り出された酵母細胞のゲノム構成が、どの程度多様性に富んでいるか調べることである。本研究で、出芽酵母の 14 の必須遺伝子を持たないミニ染色体を保持した株を用い、GReO 法によりミニ染色体が脱落し、ゲノム構成が変化した株を得た。この株から DNA を抽出し、高感度酵母チップによって網羅的にゲノム構成を検出することを試みた。GReO 法の原理では、ミニ染色体の脱落あるいは保持が検出されるはずである。一方、大規模にゲノム構成が変わった株では、ミニ染色体以外のゲノム領域においても変化が生じているかもしれない。網羅的にゲノムを調べることで、GReO 法がゲノム構成に与える影響を調べた。

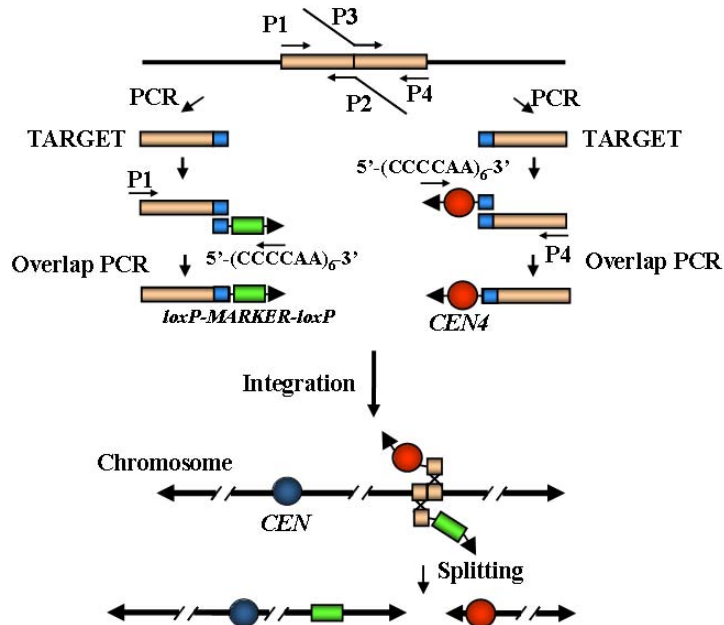


図4-1 PCS法の原理 Sugiyama *et al.* (2005)より引用

プライマーP1(20mer), P2(オーバーラップ配列30mer + 20mer), P3(オーバーラップ配列30mer + 20mer), P4(20mer)を用いて、1回目のPCRで30塩基のオーバーラップ配列(青四角)が付与された標的配列をそれぞれ増幅する(図中左右のTarget)。次に、あらかじめ調整しておいた5'-(CCCCAA)₆-3'とオーバーラップ配列を両端に持つ選択マーカー(*loxP*-MARKER-*loxP*, 緑四角)断片、及びあらかじめ調整しておいた5'-(CCCCAA)₆-3'とセントロメア(*CEN4*, 赤丸)断片と、1回目に増幅した標的配列を用い、それぞれオーバーラップPCRを行い、染色体分断に必要な2つの断片を調整する。その後、調整した2つの断片を同時に酵母細胞に導入すると、標的配列で相同組換えが起こり、染色体が分断される。

4.2 材料と方法

a. プラスミドと株

本研究に用いたプラスミド及び株は表 4-1 に記した。

表 4-1 使用したプラスミド及び株

Strain	Genotype	Remarks
Plasmids		
pUG6-CgLEU2	The <i>loxP</i> -CgLEU2- <i>loxP</i> module containing plasmid constructed by modifying pUG6	Sugiyama <i>et al.</i> 2005
pUG6-CgHIS3	The <i>loxP</i> -CgHIS3- <i>loxP</i> module containing plasmid constructed by modifying pUG6	Sugiyama <i>et al.</i> 2005
pUG6-CgTRP1-2	The <i>loxP</i> -CgTRP1- <i>loxP</i> module containing plasmid constructed by modifying pUG6	Sugiyama <i>et al.</i> 2005
pSH47	URA3 centromeric plasmid carrying a Cre expression cassette consisting of the <i>cre</i> ORF flanked by the galactose-inducible <i>GAL1</i> promoter	Guldener <i>et al.</i> 1996

表 4-1 使用したプラスミド及び株 (続き)

Strain	Genotype	Remarks
FY833	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63</i>	Winston et al. 1995
FY834	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63</i>	Winston et al. 1995
ZN1	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-932757. lys4) Ch4(hisG-URA3-hisG: lys4.931771-TEL)</i>	Derived from FY834
ZN3	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-511437. lys14: loxP-CgTRP1-loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-TEL)</i>	Derived from ZN1
ZN11	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-TEL)</i>	Derived from ZN3 by eliminating <i>CgTRP1</i> through transformation with pSH47
ZN12	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP-CgTRP1-loxP) Ch4(ade8.1288499-TEL)</i>	Derived from ZN11
ZN13	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-160868) Ch4(loxP-CgLEU2-loxP:160869-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP-CgTRP1-loxP) Ch4(ade8.1288499-TEL)</i>	Derived from ZN12
ZN14	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-160868) Ch4(loxP-CgLEU2-loxP:160869-258679) Ch4(loxP-CgHIS3-loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP-CgTRP1-loxP) Ch4(ade8.1288499-TEL)</i>	Derived from ZN13
ZN16	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-160868) Ch4(loxP:160869-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-TEL)</i>	Derived from ZN14 by eliminating <i>CgLEU2</i> , <i>CgTRP1</i> and <i>CgHIS3</i> through transformation with pSH47
ZN17	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP-CgLEU2-loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-TEL)</i>	Derived from ZN16
ZN22	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP-CgHIS3-loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP-CgLEU2-loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-TEL)</i>	Derived from ZN17
ZN23	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP-CgHIS3-loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP-CgLEU2-loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP-CgTRP1-loxP) Ch4(1501018-TEL)</i>	Derived from ZN22
ZN26	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL)</i>	Derived from ZN23 by eliminating <i>CgLEU2</i> , <i>CgTRP1</i> and <i>CgHIS3</i> through transformation with pSH47
ZN27	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-679709: CgTRP1-loxP) Ch4(679710-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL)</i>	Derived from ZN26
ZN37	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-630497: loxP-CgHIS3-loxP) Ch4(630498-679709: loxP-CgTRP1-loxP) Ch4(679710-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL)</i>	Derived from ZN27
ZN63	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-630497: loxP-CgHIS3-loxP) Ch4(630498-679709: loxP-CgTRP1-loxP) Ch4(679710-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL) Ch11(TEL-521612: loxP-CgLEU2-loxP) Ch11(521613-TEL)</i>	Derived from ZN37
ZN71	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-630497: loxP) Ch4(630498-679709: loxP) Ch4(679710-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL) Ch11(TEL-521612: loxP) Ch11(521613-TEL)</i>	Derived from ZN63 by eliminating <i>CgLEU2</i> , <i>CgTRP1</i> and <i>CgHIS3</i> through transformation with pSH47
ZN76	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-630497: loxP) Ch4(630498-679709: loxP) Ch4(679710-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL) Ch11(TEL-521612: loxP) Ch11(521613-556764: loxP-CgTRP1-loxP) Ch11(556765-TEL)</i>	Derived from ZN71
ZN81	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-630497: loxP) Ch4(630498-679709: loxP) Ch4(679710-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL) Ch11(TEL-521612: loxP) Ch11(521613-556764: loxP-CgTRP1-loxP) Ch11(556765-619189: CgLEU2-loxP) Ch11(619190-TEL)</i>	Derived from ZN76
ZN92	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch4(TEL-130674) Ch4(loxP:130675-160868) Ch4(loxP:160869-239739) Ch4(loxP:239740-258679) Ch4(loxP:258680-511437. lys14: loxP) Ch4(lys14.510818-630497: loxP) Ch4(630498-679709: loxP) Ch4(679710-932757. lys4) Ch4(hisG: lys4.931771-1288498. ade8: loxP) Ch4(ade8.1288499-1501017: loxP) Ch4(1501018-TEL) Ch11(TEL-21510) Ch11(loxP-CgHIS3-loxP:21511-521612: loxP) Ch11(521613-556764: CgTRP1-loxP) Ch11(556765-619189: loxP-CgLEU2-loxP) Ch11(619190-TEL)</i>	Derived from ZN81
SH6484	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 Ch1(TEL-42447) Ch1(loxP:42448-109579) Ch1(loxP:109580-137801: loxP) Ch1(loxP:137802-181215: loxP) Ch1(181216-TEL) Ch2(TEL-743158: loxP) Ch2(743159-TEL) Ch3(TEL-143982: loxP) Ch3(143983-182046: loxP) Ch3(182047-TEL) Ch8(TEL-22193) Ch8(loxP-CgLEU2-loxP:22194-TEL) Ch11(TEL-29631) Ch11(loxP:29632-624363: loxP) Ch11(624364-TEL) Ch13(TEL-903498: loxP-CgHIS3-loxP) Ch13(903499-TEL) Ch14(TEL-747342: loxP) Ch14(747343-TEL) Ch15(TEL-43069: loxP) Ch15(43070-672259: loxP) Ch15(672260-702304: loxP) Ch15(702305-1044846: loxP) Ch15(1044847-TEL) Ch16(TEL-27600) Ch16(loxP-CgTRP1-loxP:27601-TEL)</i>	Derived from FY833

b. 使用したプライマー

使用したプライマーは表 4-2 に記した。

表 4-2 使用したプライマー

Oligo nucleotides	Nucleotide sequence
Tr6-4	5' CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAGGCCACTAGTGGATCTGAT 3'
IoxP-F1	5' GGCCGCCAGCTGAAGCTTCG 3'
Split03-Lf	5' TCCAATGGCCAATTGGTATC 3'
Split03-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCATCTGTGCCGATATTAATC 3'
Split03-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTGCAGTTGGCTCAAGAAAGT 3'
Split03-Rr	5' AACCTTCTGCTCGCTCTAAA 3'
Split04-Lf	5' GGTCTGGATTTTACTTTTGA 3'
Split04-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCGTAATTGTGCGCATATATAT 3'
Split04-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCGTTCTTCAGCAATCAGTTAG 3'
Split04-Rr	5' ATAAGCGGCGATGCAAGTGA 3'
Split05-Lf	5' TTTTCTAACAGGGCTGTGT 3'
Split05-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTATTGAGTAAGCCAATATT 3'
Split05-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCATATCTTAAAGGGGGCAC 3'
Split05-Rr	5' GAAGTTTCAATCAACTCCAG 3'
Split06-Lf	5' ATGTCCAAGAAAGCATAACGA 3'
Split06-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTTCTGAAGAAGTTACCGCCC 3'
Split06-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCGAGAACGGACCCGCCATTAT 3'
Split06-Rr	5' ATGGGATGAGCGTATGTGAG 3'
Split07-Lf	5' GGTTACACCCACCGTGAG 3'
Split07-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTTCCCAGGCAAGGCTGGCC 3'
Split07-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCAAGTTAGGGGTCAGTTACTT 3'
Split07-Rr	5' AGGGAACTGTTGGGATATAC 3'
Split08-Lf	5' TAGTCCTTTATGCTCGCACT 3'
Split08-Lr	5' CCCC AACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCGATGCTTCCTAAAGGGTTT 3'
Split08-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCGAGCTGACAGAAATACCAA 3'
Split08-Rr	5' ATTACTCTATTACTGACGGA 3'
Split09-Lf	5' AATTGGAATCAGCAGGCCTG 3'
Split09-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCGATTGGATTTTAAAGCCCGC 3'
Split09-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTTTCGGTGAACACACCTT 3'
Split09-Rr	5' TGATGTCCTCCACACGTCTT 3'
Split10-Lf	5' TTCTCTTGATAATGGCTAG 3'
Split10-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCGCGGATCATTAGGATTAGGG 3'
Split10-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTAGCTAATGACGTGCTGAA 3'
Split10-Rr	5' CTATTGTCTGTCTCTATGCA 3'
Split11-Lf	5' GGAGAGGTGAAGATATAAGT 3'
Split11-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCACCGCCAAATTGCTATCCAA 3'
Split11-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCGGTAGTTTATAACGTGTGT 3'
Split11-Rr	5' GCGTAATGGCAAAACACATT 3'
Split12-Lf	5' AAAAATGGGCATAAACAGGG 3'
Split12-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCATATAACCGACCCTGACGCT 3'
Split12-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTCAAAAACACTCCATACCAG 3'
Split12-Rr	5' GGTGTCACATACCTGAAGAG 3'
Split13-Lf	5' CACAAATGAATGCCAATAGG 3'
Split13-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCAGGAAACAAAGATGGGAAGA 3'
Split13-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCTTCACTCTTGACATGAC 3'
Split13-Rr	5' GAATGAGACGGTAACCTTTA 3'
Split14-Lf	5' TGTGAAGTAAGTGATTGCAC 3'
Split14-Lr	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCGAGTCATTCTTTACGAATC 3'
Split14-Rf	5' CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCCAACGACTCCAATGATTTCT 3'
Split14-Rr	5' GATCTCCATCCAAATGACCA 3'

c. ゲノム DNA の調整

酵母細胞からのゲノム DNA の抽出は、Hoffman らの方法 (Hoffman *et al.* 1987) を改変して行った。5 ml の YPAD 培地に酵母菌を植菌し、飽和するまで振とう培養を行った。2,000 rpm、5 分間の遠心分離により集菌した菌体を酵母破碎用緩衝液 [2% Triton-X、1% SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM Na₂EDTA] 0.2 ml で懸濁し、液面までガラスビーズ (フジストン No.006、直径 0.25~0.3 mm ; 富士理科工業) を加えた。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール混合液を 0.2 ml 添加後、ミキサーで 15 分間混合した。チューブの底に穴をあけ、それを新しいチューブの上に載せて遠心分離を行い、ガラスビーズを取り除いた。室温で 12,000 rpm、5 分間の遠心分離を行い、上澄み液を新しいチューブに移した。これに 0.2 ml の滅菌水と 1 ml の 99%エタノールを加え、-20°Cで 20 分間冷却して沈殿を形成させた。4°Cで 12,000 rpm、5 分間の遠心分離を行った後、上澄み液を捨て、70%エタノールで沈殿を洗浄した。沈殿を乾燥させた後、10 µg/ml RNase A を含む TE 緩衝液 200 µl に溶解させ、DNA 試料とした。

d. DNA チップでのゲノム DNA 検出

酵母ゲノム DNA を、1× One-Phor-All buffer (GE ヘルスケア)、1.5 mM CoCl₂ を含む緩衝液に溶解させ、0.15 U deoxyribonuclease I (DNase I) [ギブコ、PCR グレード] を添加し、37°Cで 5 分間インキュベーションした。反応後、95°Cに加温し、DNase I を失活させ、エタノール沈殿法により、DNA を精製した。

標識反応には、BioPrime labeling kit (インビトロジェン) を用い、反応はメーカーの推奨プロトコールに従った。50µL 量での標識の場合、dNTP pool は次の組成となる。dATP、dGTP、dCTP はそれぞれ 120mmol/L、dTTP は 60mmol/L、Cy3-dUTP あるいは Cy5-dUTP(パーキンエルマー)は 60mmol/L とした。試験株は Cy3-dUTP を用いて標識し、コントロール株は Cy5-dUTP を用いて標識した。

標識した DNA は、マイクロコン YM-30 (ミリポア)で精製した。Cy3 標識した DNA と Cy5 標識した DNA をそれぞれ 1µg ずつ混和し、“3D-Gene” Yeast Oligo Chip 6K にアプライした。42°Cで、16 時間ハイブリダイゼーションさせた。マイクロアレイの検出には FLA8000(富士フイルム)を用いた。画像の数値化には DNASIS Array(日立ソフト)を用いた。

e. タイリングマップの作成

変異株から得られた数値データと標準株から得られた数値データの比率とした(変異株/標準株)。プローブごとに得られた変異株/標準株の比率を GeneSpring ver. 7.3.1 software (Silicon Genetics, CA, USA) に入れ、染色体位置に比率を当てはめたタイリングマップを

作成した。

f. パルスフィールドゲル電気泳動による酵母染色体 DNA の分離

Sheehan らの方法により調製したゲルプラグを適当な大きさに切断して使用した。パルスフィールドゲル電気泳動は CHEF-MAPPER (Bio-Rad Laboratories) を使用し、泳動条件は調べたい染色体の大きさに応じて設定した。14×13×0.5 cm、あるいは 21×14×0.5 cm の大きさの 1% アガロース (Pulsed Field Centrifuged Agarose ; Bio-Rad Laboratories) を使用し、冷却装置 (Coolong Module ; Bio-Rad Laboratories) によって 14°C に保冷した 0.5×TBE [45 mM Tris、45 mM Boric acid、1.25 mM EDTA (pH 8.3)] を泳動用緩衝液として用いた。泳動後、ゲルを臭化エチジウム水溶液 (0.5 µg/ml) で染色し、トランスイルミネーター NTFM20 (Ultra Violet Products Inc.) を用いて染色体 DNA バンドを観察した。写真はポラロイドカメラ DS-300 (フナコシ) によって撮影した。

g. サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションでは、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System を使い、その使用説明書に従った。42°C に温められたハイブリダイゼーションバッファ (0.5 M NaCl がキットに付属の Hybridization buffer に溶解した液体) を用いて、42°C で 15 分間以上プレハイブリダイゼーション反応を行った。その後 HRP で標識したプローブ DNA を加え、42°C で一晩ハイブリダイゼーション反応を行った。5×SSC で 5 分間洗浄した後、42°C に温められた一次洗浄バッファ [6 M Urea (和光純薬)、0.4% (w/v) SDS、0.5×SSC] で 20 分間洗浄した。再度、一次洗浄バッファで 20 分間洗浄した後、別の容器にメンブレンを移した。そこに二次洗浄バッファ (2×SSC) を加え、室温で 5 分間穏やかに振とうする操作を 2 回行った。メンブレンの余分なバッファを除いた後、サランラップ上にブロットした面が上になるように置いた。Detection reagent 1 と Detection reagent 2 を等量ずつ混合した溶液をメンブレンにかけ、1 分間放置した。メンブレンから余分な水分を除き、ハイブリパックに挟んで密封した。これをカセットに入れ、その上に X 線フィルム (Hyperfilm-ECL ; Amersham Biosciences) を置き、室温で 30 分間感光させた後、フィルムを取り出して現像した。現像と定着には、X 線フィルムプロセッサ (Model FPM60 ; 富士フィルム) を用いた。

4.3 結果

a. 第4染色体を分断した酵母細胞

FY834株から作出したZN1株を、第4染色体のLYS4とLYS14の位置で分断した株を作り、ZN3株とした(データは示さず)。このZN3を改変の出発株にし、PCS法を用いて、第4染色体を11本の染色体に分断することを試みた。オーバーラップエクステンションPCRを用いて、染色体に組み込むために必要な標的配列(650塩基)を増幅した。オーバーラップエクステンションPCRに用いる30塩基のオーバーラップ配列はloxP-FI sequence

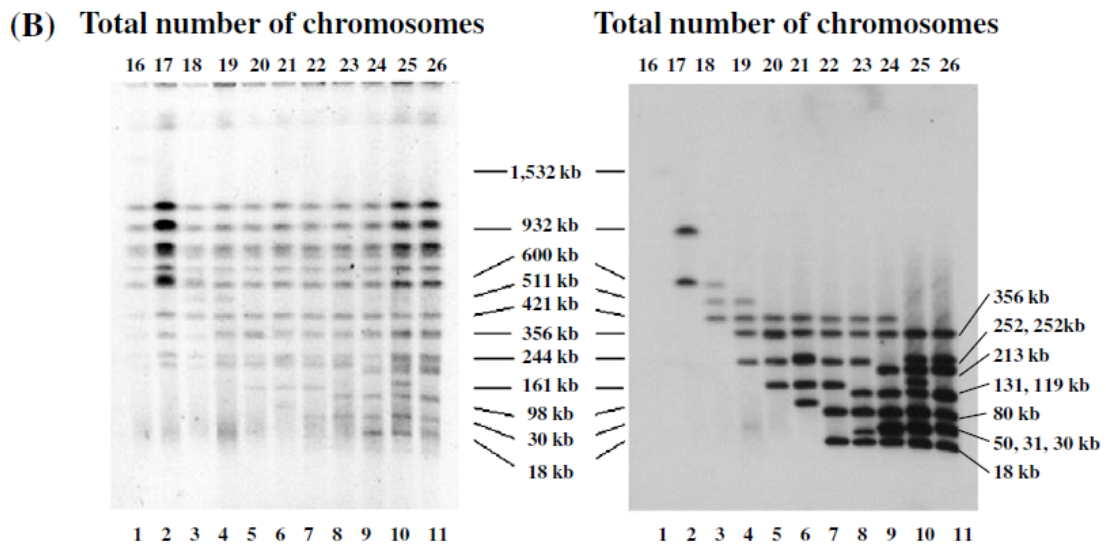
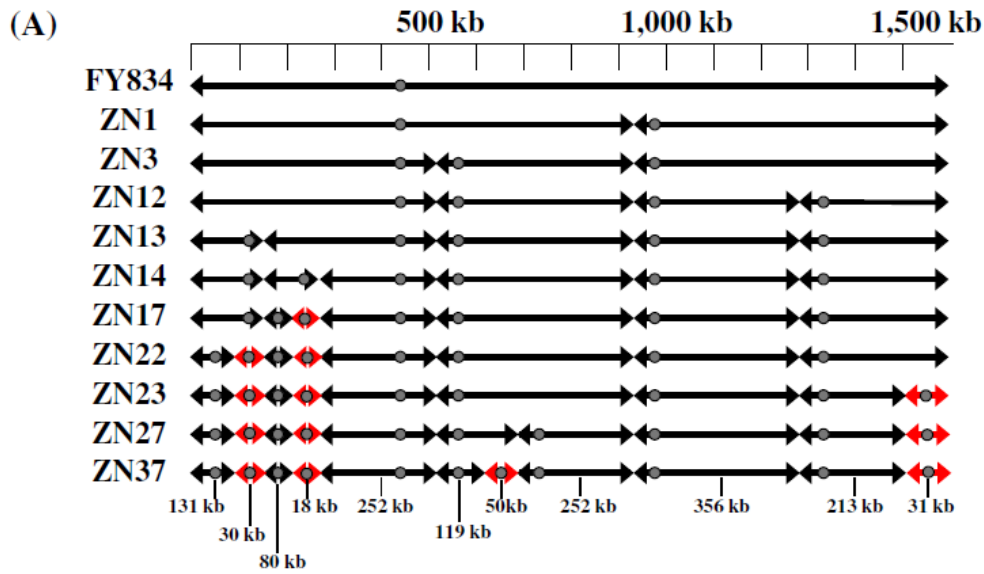
(5'-GGCCGCCAGCTGAAGCTTCG-3') and the Split03-Lr primer

(5'-CTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGGCGGCCATCTGTGCCGATATTAATC-3')に組み込んである。二つのDNA断片をオーバーラップエクステンションPCRの鋳型として用いた。一つは650塩基の標的配列で、形質転換株の選択マーカーと、テロメア配列として(5'-CCCCAA-3')を6回繰り返して持たせている。もう一方は、約800塩基で第4染色体のセントロメア(CEN4)を持っている。*Candida glabrata*由来の*CgTRP1*とターゲットDNAはTr6-4プライマー

(5'-CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAGGCCACTAGTGGATCTGAT-3')とSplit03-Lf (5'-TCCAATGGCCAATTGGTATC-3')プライマーで増幅した。別途、

CEN4を含む別のターゲットDNA断片を増幅した。これら二つのDNA断片を用いてZN3株をトリプトファン非要求性に形質転換した。トリプトファン非要求性株26クローンのうち、23クローンで予定した位置での分断に成功していた(データは示さず)。なお*CgTRP1*以外にも、*CgLEU2*と*CgHIS3*が選択マーカーとして用いることができる。

ZN3株の第4染色体は、繰り返してPCS法を用いることで図4-2に示した11本の新しい染色体を作り出した。作製した株をZN37株とした。50kb以下の長さのミニ染色体は18 kb, 30 kb, 31 kb, 50 kbであり、それぞれ12, 17, 13, 21の非必須遺伝子を持っている。いずれも必須遺伝子は含んでいない。



Pulsed Field Gel Electrophoresis Southern hybridization with a *CEN4* probe

図 4-2 (A) 第 4 染色体から作られた新しい 11 の染色体。新しい染色体は、第 4 染色体の左腕末端から始まり、それぞれの長さは 131kb, 30kb, 80kb, 18kb, 252kb, 119kb, 50kb, 252kb, 356kb, 213kb, 31kb である。灰色の円は、セントロメアを表している。赤矢印は、必須遺伝子を含んでいないミニ染色体を示す。(B) 作出した株のパルスフィールドゲル電気泳動とサザンブロット解析。(レーン 1: FY834、レーン 2: ZN1、レーン 3: ZN3、レーン 4: ZN12、レーン 5: ZN13、レーン 6: ZN14、レーン 7: ZN17、レーン 8: ZN22、レーン 9: ZN23、レーン 10: ZN27、レーン 11: ZN37; 泳動条件: 200~1700 kb)

b. 30本の染色体を持ったハプロイド株の作出

次に、PCS法を用いて、ZN37株の第11染色体を表4-3に記載の位置で分断し、新たに5本の染色体(22kb, 500kb, 35kb, 52kb, 47kb)を作った(図4-3)。5本の染色体のうち、3本は(22kb, 35kb, 47kb)は非必須遺伝子のみの領域で構成されている。このようにして、30本の染色体を持つZN92株を作出した。30本の染色体は、酵母が保持している染色体に加え、第4染色体から作り出した新しい11本の染色体と、第11染色体から作り出した新しい5本の染色体を保持している。ZN92株は必須遺伝子を持たない7本のミニ染色体を保持している。

表 4-3 染色体分断のターゲット位置と用いたプライマー

Host strain	Derived strain	Target site for split	Primer name
ZN11	ZN12	Chr. IV:1288498/1288499	Split03-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN12	ZN13	Chr. IV:160868/160869	Split04-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN13	ZN14	Chr. IV:258679/258680	Split05-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN16	ZN17	Chr. IV:239739/239740	Split06-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN17	ZN22	Chr. IV:130674/130675	Split07-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN22	ZN23	Chr. IV:1501017/1501018	Split08-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN26	ZN27	Chr. IV:679709/679710	Split09-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN27	ZN37	Chr. IV:630497/630498	Split10-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN37	ZN63	Chr. XI:521612/521613	Split11-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN71	ZN76	Chr. XI:556764/556765	Split12-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN76	ZN81	Chr. XI:619189/619190	Split13-Lf, Lr, Rf, Rv
ZN81	ZN92	Chr. XI:21510/21511	Split14-Lf, Lr, Rf, Rv

染色体の分断に用いるプライマーTr6-4とloxP-F1は表4-2に記載されている。

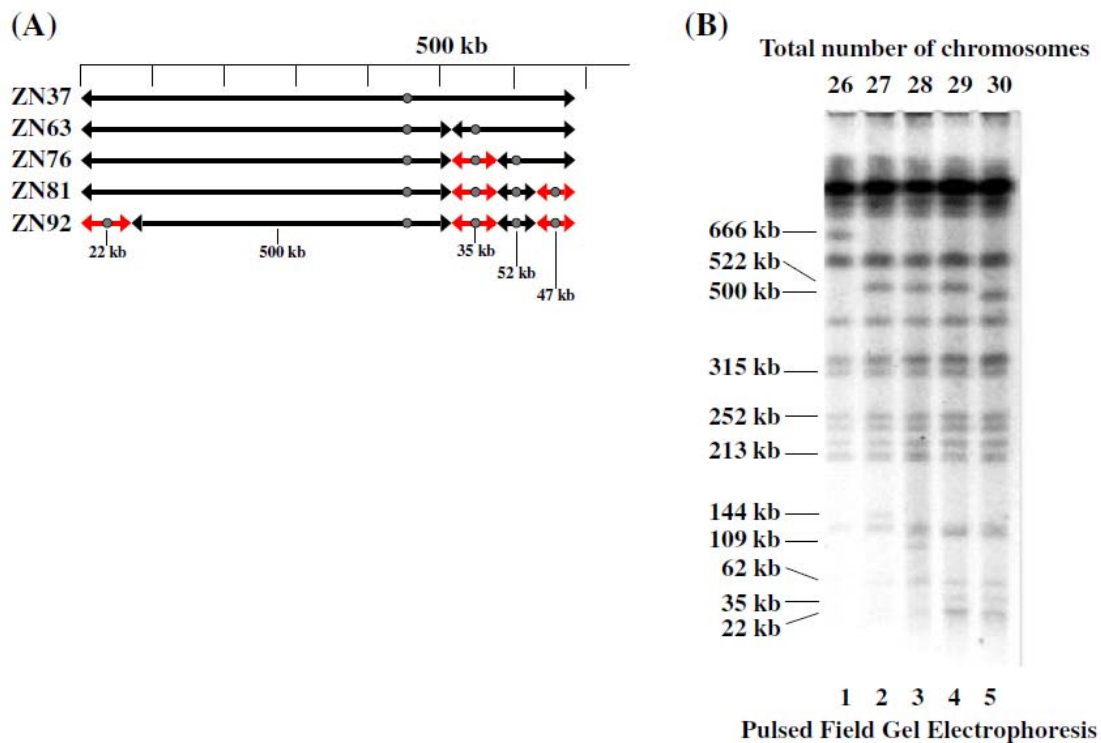


図 4-3 (A) ZN92 株における新しい 5 つの染色体。円はセントロメアを示す。赤矢印は必須遺伝子を持たないミニ染色体を示す。(B) パルスフィールドゲル電気泳動 レーン 1 : ZN37、レーン 2 : ZN63、レーン 3 : ZN76、レーン 4 : ZN81、レーン 5 : ZN92。

c. ミニ染色体の組み合わせ脱落

ZN92 株は、7 本の非必須遺伝子のみからなるミニ染色体を持っている。理論的には、128 通りの組み合わせ $\sum_{k=1}^7 2^k$ で脱落が生じる。ただし、特定の組み合わせによる合成致死は考慮していない。どのような組み合わせで脱落が生じるか調べるため、ZN92 株を YPDA 培地で培養後、酵母細胞を平板培地に塗布した。培養の結果、441 のコロニーを得た。理論的には 128 の組み合わせが生じるはずであるため、128 のクローンを選び、PCR でミニ染色体の脱落の有無を調べた(図 4-4)。

128 のクローンは、ミニ染色体の脱落の組み合わせによって、19 種のタイプに分かれた。19 種のタイプのうち、全てのミニ染色体を保持していた型は 128 クローン中 11 クローンであった(9%)。このことから、ミニ染色体は、有糸分裂成長において、安定であることが推定される。28 クローン(22%)はタイプ 2 に分類された。タイプ 2 は、17 遺伝子をもつ 22kb ミニ染色体が脱落している。最もたくさんの遺伝子を失ったのはタイプ 18 で、4 つのミニ染色体(30kb, 35kb, 47kb, 50kb)は 66 遺伝子を持つ。ミニ染色体の組み合わせ脱落の結果から、ミニ染色体に含まれる遺伝子が非必須遺伝子であるかわかる。7 本のミニ染色体のうち、

6本 22 kb, 30 kb, 31 kb, 35 kb, 47 kb, 50 kb)は、どれかのクローンで脱落している。18kb ミニ染色体は 12 の非必須遺伝子(*YDL114W*, *YDL114W-A*, *IWR1*, *NUP84*, *CYK3*, *YDL118W*, *YDL119C*, *YFH1*, *YDL121C*, *UBP1*, *SNA4*, *YDL124W*)を持っているが、128 クローンのうち全てで保持されていた。興味深いことに、ZN17株では18kb ミニ染色体のコピー数が親株であるFY834株に比べ、3倍になっている。18kb ミニ染色体のもつ12の遺伝子は、個別に評価すると非必須遺伝子であるが、12 遺伝子のうちのいずれかの組み合わせあるいは全ての遺伝子が、YPDA 培地での培養において必須遺伝子である可能性が考えられる。12 遺伝子との組み合わせで合成致死となる遺伝子をSGDで調べたところ、いくつかの遺伝子が報告されていたが、18kb ミニ染色体中の遺伝子同士の組み合わせは報告されていないため(表4-4)、新規の現象であると考えられる。

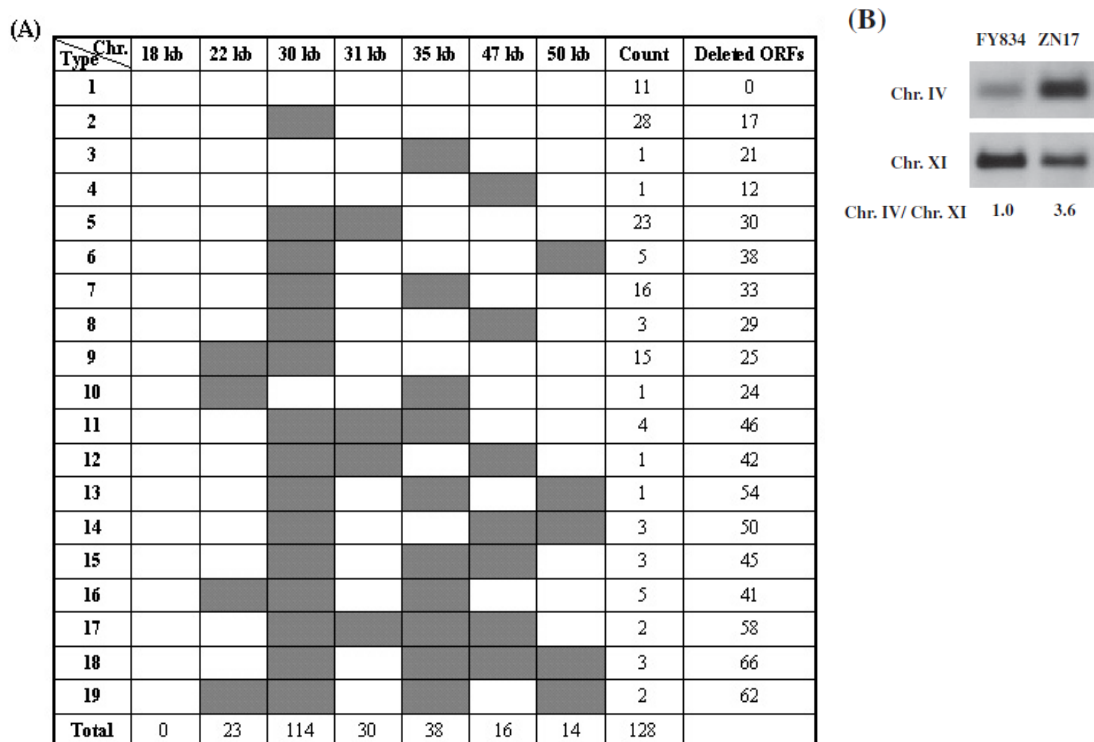


図 4-4 ゲノム再構成

A:ミニ染色体の組み合わせ脱落 黒塗りは脱落を示し、空欄は保持を示す。左のカラムに、タイプ番号を記載した。B: 18kb ミニ染色体のサザンプロットハイブリダイゼーション(ZN17株)サザンプロットのプローブは、第4染色体の251627-252254の間の627塩基を用いた。コントロールとして、第11染色体の32970-35978の間の3008塩基を用いた。

表 4-4 18kb 断片中の遺伝子と合成致死となる組み合わせ

遺伝子名	合成致死のペアとして報告されている遺伝子
YDL114W	YER113W
YDL114W-A	なし
IWR1	なし
NUP84	ASF1, BIM1, BUB3, CAC2, DBP5, DST1, GCR1, GET1, GLC7, HEH2, MRC1, MSI1, NEM1, NSP1, NUP116, NUP120, NUP133, RAD27, RAD51, RLF2, SAC3, SLX5, SPO7, SPT4
CYK3	BNI1, BNI4, CHS7, HOF1, INN1, MYO1, RVS161, RVS167
YDL118W	SBA1
YDL119C	なし
YFH1	なし
YDL121C	なし
UBP1	STU1
SNA4	なし
YDL124W	なし

d. ゲノム再編成株の測定

PCS 法で FY834 株から作出した SH6484 株は、FY834 株の第 1、第 2、第 3、第 8、第 11、第 13、第 15、第 16 染色体 から、新たに 30 本の染色体を作りだした株である(図 4-5)。30 本の染色体のうち、14 本のミニ染色体には必須遺伝子が含まれない(図 4-5)。

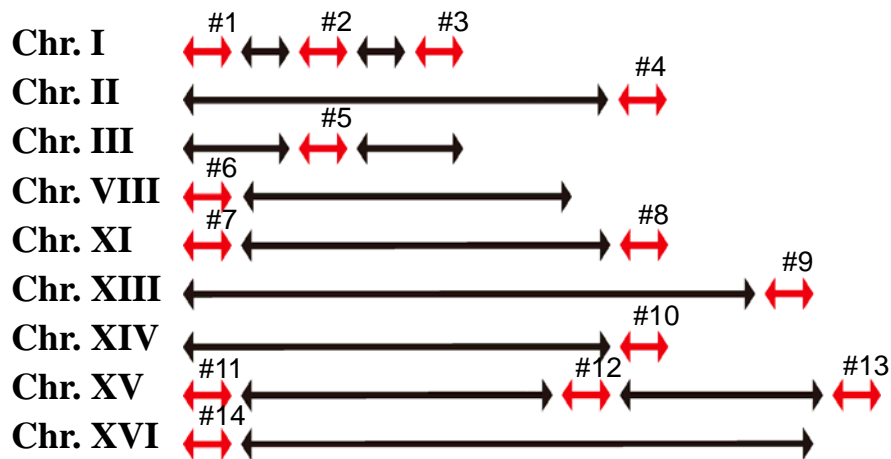


図4-5 SH6484株の染色体位置

14本のミニ染色体(赤矢印)は必須遺伝子を含んでいない。それぞれのミニ染色体の分断位置は材料と方法に記載している。ミニ染色体の長さとは必須遺伝子の数は次の通りである。#1, 42 kb, 20 ORFs; #2, 28 kb, 19 ORFs; #3, 49 kb, 23 ORFs; #4, 70 kb, 35 ORFs; #5, 38 kb, 22 ORFs; #6, 22 kb, 15 ORFs; #7, 30 kb, 11 ORFs; #8, 42 kb, 13 ORFs; #9, 21 kb, 15 ORFs; #10, 37 kb, 16 ORFs; #11, 43 kb, 19 ORFs; #12, 30 kb, 15 ORFs; #13, 46 kb, 23 ORFs; and #14, 28 kb, 14 ORFs.

SH6484 株、及び FY834 株を YPDA 培地で培養し、それぞれの酵母細胞から DNA を抽出した。各株の酵母細胞から抽出した DNA を、別々の蛍光色素で標識し、高感度 DNA チップで検出した。SH6484 株の DNA から得られたシグナル値を、FY834 株のシグナル値でノーマライゼーションし、散布図で示した(図 4-6)。X 軸側が SH6484 株、Y 軸が FY834 株である。大半のプローブは、 $y=x$ のライン(図中の赤線)周辺にプロットされている。ミニ染色体にコードされている遺伝子に対応するプローブから得られたシグナル値を桃色でプロットしている。 $y=x$ のラインから、X 軸側に多くの桃色のプロットが見られる。FY834 株に比べ、シグナル値が低下していることから、該当するゲノム領域が欠損、あるいは減少したものと考えられる。一方、2 倍以上増加したプローブもみられ、ゲノム領域のコピー数が増加した可能性がある。また、青のプロットは、ミニ染色体以外のプローブに由来するが、一部で 2 倍近く変動しているものがみられる。実験上のノイズ、あるいはコピー数変動の可能性が考えられた。橙の四角の中には、2 倍程度シグナル強度が増加している。これらのプローブは、リボソーム RNA 遺伝子に対応するプローブであった。

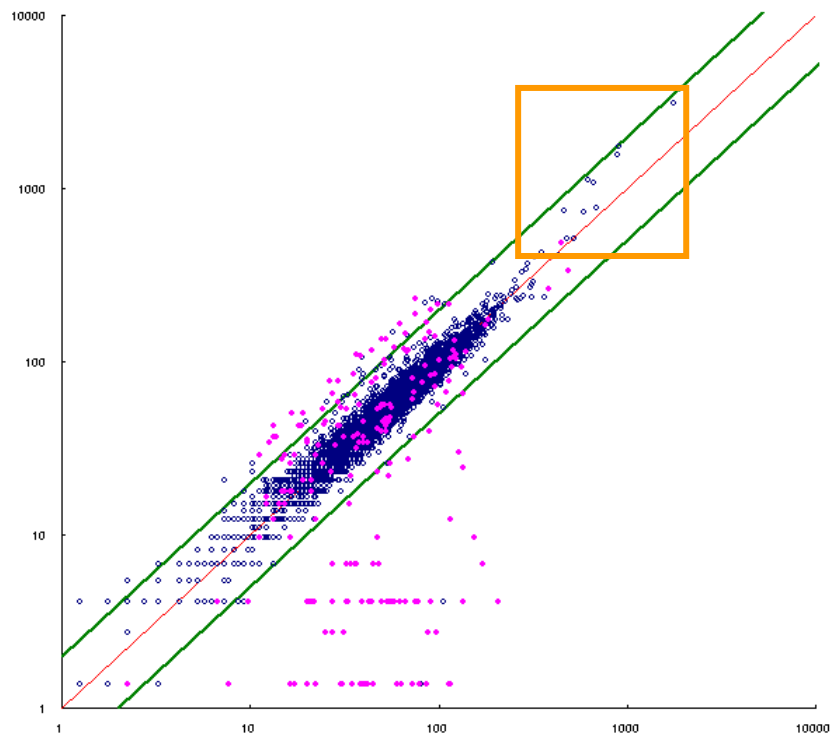


図 4-6 検出シグナルの散布図 縦軸：SH6484 株、横軸：FY834 株

赤線は $y=x$ を示し、緑線が 2 倍以上のシグナル変動を示す。桃色のプロットは、ミニ染色体に含まれる遺伝子のシグナル値を示す。橙四角の中は、リボソーム RNA 遺伝子のシグナル値を示す。

次に、プローブごとに変動比 Log_2 (SH6484/FY834) を計算し、染色体の左腕の端から順に並べ、変動比を折れ線グラフで示した (図 4-7)。また、SH6484 株から抽出した DNA を

PCR 法によってミニ染色体の有無を確認した。ミニ染色体:#1 及び#3 は、脱落 (青矢印)、#2 は保持されていることを確認した (赤矢印)。ただし、#2 は保持されていることのみを確認し、コピー数の増加については検証していない。

プローブごとに結果をみていくと、周囲と大きく異なる値が得られているプローブがある。*YAL068C* は、PCR 法で脱落が確認されたミニ染色体上の遺伝子で、同じミニ染色体上の他の遺伝子に比べ、変動比が大きく、0 に近い。*YAL068C* は検出シグナル値が 100 前後と高いため (データは示さず)、他のゲノム領域がクロスハイブリダイゼーションすることによって、変動比が大きく計算されたと考えられる。*YAL063C-A* は、周囲に比べて変動比が大きく、0 に近い。検出シグナル値が 1 前後と低いことから (データは示さず)、*YAL063C-A* のプローブ配列の反応性が低い、あるいは DNA チップ上にプローブが固定されていないといった原因が考えられ、そのため検出結果が周辺遺伝子と異なると考えられる。

一般的に、タイリングアレイ解析では、出力結果のノイズを低減させるため、ゲノム上の近接した位置に設計したプローブの検出値の移動平均を計算し、出力値として用いている。本解析においても、変動比をそのままプロットした場合 (図 4-7 青線) と、移動平均をプロットした場合 (図 4-7 桃線) とで比較した。移動平均を取ることで、全体としてノイズが目立たなくなり、検出結果が平準化されている。しかし、上述した *YAL068C* や *YAL063C-A* で得られた異常なデータまで平準化していることが分かる。

次に、図 4-7B に第 2 染色体に由来するミニ染色体の検出結果を示した。結果の解析方法は、上記第 1 染色体の方法と同一である。この領域には、ミニ染色体#4 が含まれている。PCR 法による解析結果から、#4 は保持されていることが分かった。DNA チップ実験で得られたミニ染色体#4 の変動比は、平均-0.08 とほぼ 0 であったことから、親株である FY834 とほぼ同じコピー数が存在していると推定された。

なお、*YBR033W* は、第 1 染色体の *YAL063C-A* と同様に、SH6484、FY834 の両者においてシグナル値が非常に低いため変動比が大きく計算されている。移動平均のグラフでは、*YBR033W* の周辺領域で増幅現象が起きているようにプロットされている。ノイズによって極端に大きな変動比が得られた場合、移動平均を用いると周囲のプローブの出力結果にも影響を与え、当該領域において増幅現象が生じたように計算されてしまう。

移動平均を用いた平準化は、データを視認しやすくするが、細かく評価する際には適していないことが分かったため、以後の解析では、移動平均は用いず、変動比を評価することとした。

PCR 法によって脱落が確認された#1 と#3 の変動比の平均値は、それぞれ-3.43 倍と-2.95 倍であった。このことから、変動比の平均値が、-2.95 倍以下であれば、ゲノム領域が脱落している可能性があると考えた。また、PCR 法で保持が確認された#2 と#4 は、それぞれ 1.41 倍と-0.08 倍であった。原理的に、親株とコピー数が同じであれば、変動比は 0

になるため、#4 は親株とコピー数が同一と判断でき、#2 はコピー数が増加していることが推定された。

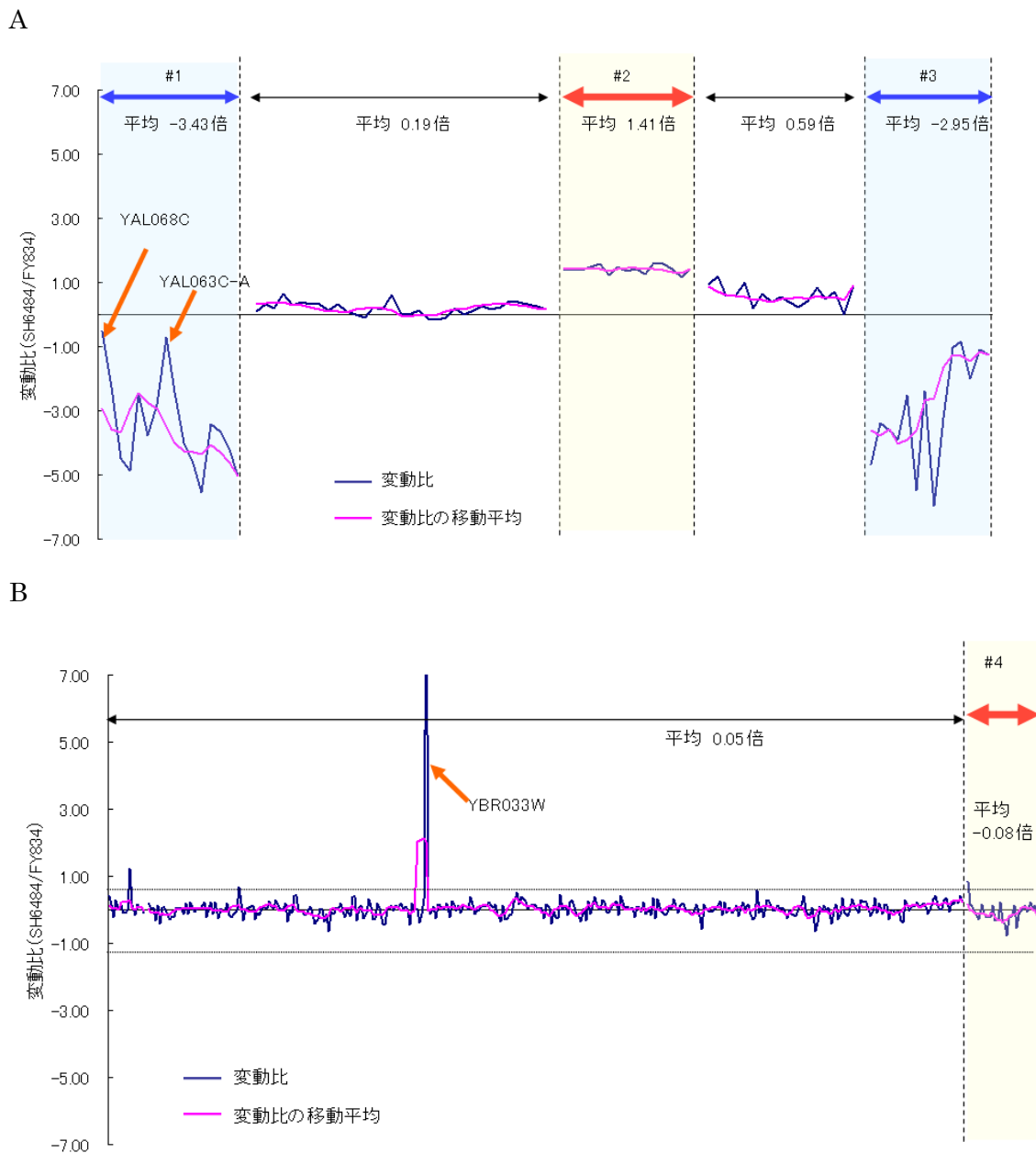


図 4-7 DNA チップ実験で得られた変動比と PCR 法で確認したミニ染色体の有無の関係

A. 第 1 染色体由来のミニ染色体、 B. 第 2 染色体由来のミニ染色体、青矢印は PCR 法で脱落を確認したミニ染色体、赤矢印は保持を確認したミニ染色体を示す。

次に、ゲノム全体でのタイリングマップを作成した。プローブごとに SH6484 株/FY834 株の比率を計算し、酵母細胞の 16 本の染色体とミトコンドリアゲノムに対して割り当てたタイリングマップを作成した。また、ミニ染色体の位置が分かるよう、該当箇所はギャップを設けて表示している。また、SH6484 株から抽出した DNA を PCR 法によってミニ染色体の有無を確認した。

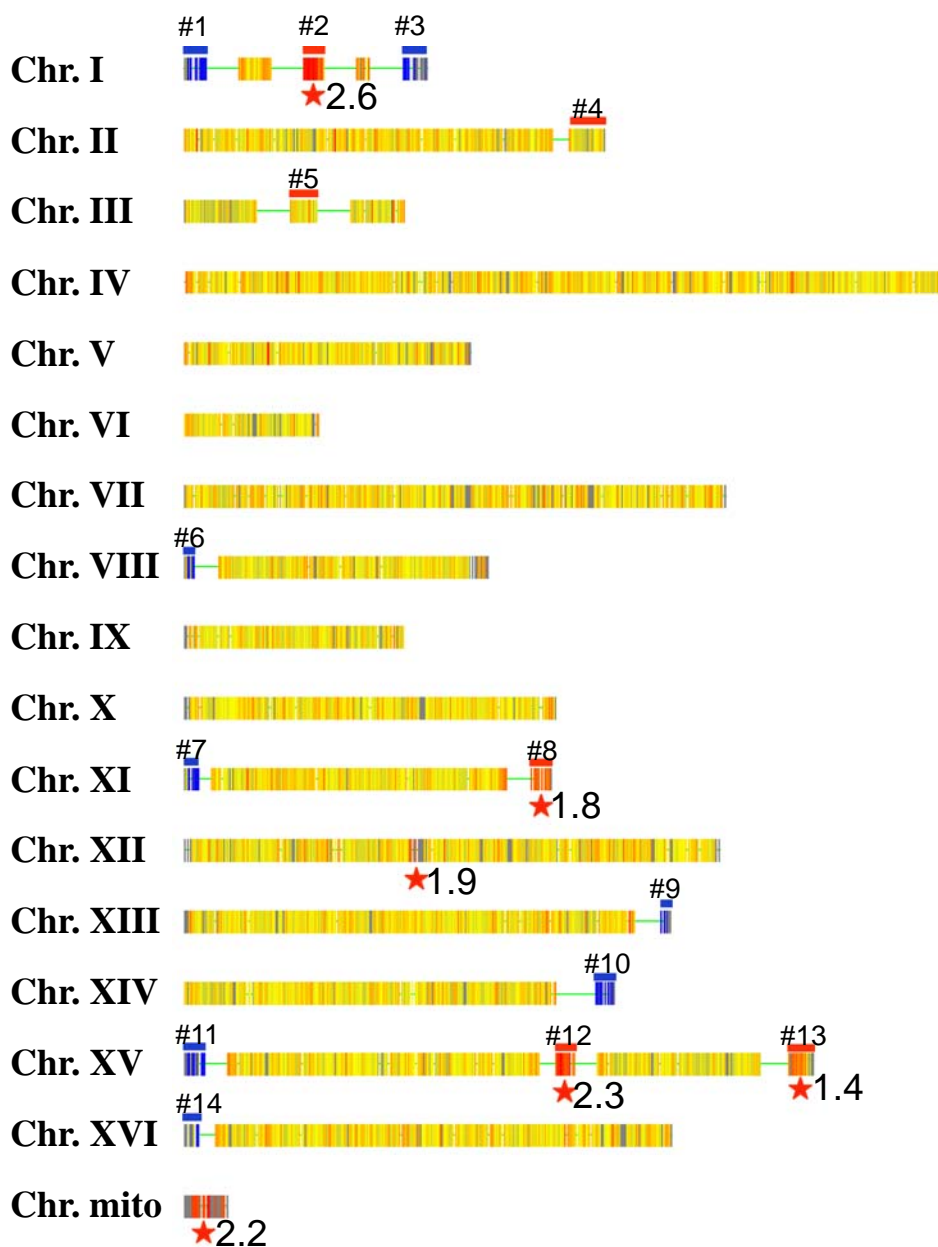


図 4-8 SH6484 株のタイリングマップ

青棒は有糸分裂時に脱落した領域。赤棒は保持されている領域を示す。赤星は当該領域が増幅していることを示し、その横の数値は当該領域の遺伝子の増幅倍率(SH6484/FY834)の平均値を示している。

PCR法で、ミニ染色体が保持されていると判定できれば赤棒、脱落していれば青棒で表示している(図4-8)。DNAチップでの検出結果とPCR法の結果は一致しており、14本のミニ染色体のうち、8本のミニ染色体(#1, #3, #6, #7, #9, #10, #11, #14)が脱落していることが分かった(図4-7 青棒)。また、残りの6本のミニ染色体(#2, #4, #5, #8, #12, #13)は保持されていることが分かった(図4-7 赤棒)。脱落した8本のミニ染色体に含まれる非必須遺伝子である133遺伝子は、全て同時に欠失しても酵母の増殖に必須ではないことを示している。さらに、保持されている6本のミニ染色体のうち4本(#2, #8, #12, #13)でコピー数の増加が観察された。増幅倍率は、#2 で2.6倍、#8で1.8倍、#12で2.3倍、#13で1.4倍であった。

e 一部遺伝子領域を欠損した D3、D4 株の変異検出

GReO法では、多数のミニ染色体を作り、培養中に脱落させることで様々なゲノム構成を持つ株を作り出すことができる。ゲノムの一部分が脱落したときの影響を調べるため、PCD法(Sugiyama *et al.* 2008)を用いて作出した、特定のゲノム領域を脱落させた株を用いて評価した。第15番染色体の477045~499855を欠損させた株D3と、15番染色体の555866~593616を欠損させた株D4株を評価に用いた。PCD法は、実験者が選んだ任意の遺伝子領域で酵母の染色体を分断し、セントロメア配列を持っていない断片に対してセントロメア配列を付与し、染色体分裂時に保持させることのできる方法である。すなわち、特定の領域のみ欠損させ、その他の領域は維持されたままにできる。D3株、およびD4株で欠損させた領域に含まれる遺伝子は、非必須遺伝子である。欠損は、PCR法で対象領域が欠損していることを確認している。

D3株、D4株および標準株FY834株から抽出したゲノムDNAを標識し、DNAチップを用いて検出した。検出結果から、プローブごとに変動比(D3株/FY834株、D4株/FY834株)を計算し、変動比を染色体マップ上に配置したタイリングマップを作成した。作成したタイリングマップのうち、欠損領域のある第15番染色体の結果を図4-9に示した。変動比を、第15番染色体の左腕の端から順にプロットしている。D3株、D4株のそれぞれで欠損させた領域を青矢印で示している。当該領域で、各株の変動比は小さくなっており、変動比の平均値は、D3株は-10.57倍、D4株は-5.19倍であった。両株で変動比が大きく異なる原因は、欠損領域から得られたシグナル値は非常に小さいため、変動比が大きな値として計算されたためである。以上のように、欠損領域はシグナル値が低くなるため、基準株との変動比はぶれやすくなるが、DNAチップによって欠損領域を検出できることを確認した。なお、FY834株との比率が大きく異なる領域は、欠損させた領域のみで、それ以外の領域では差が生じなかった(データは示さず)。

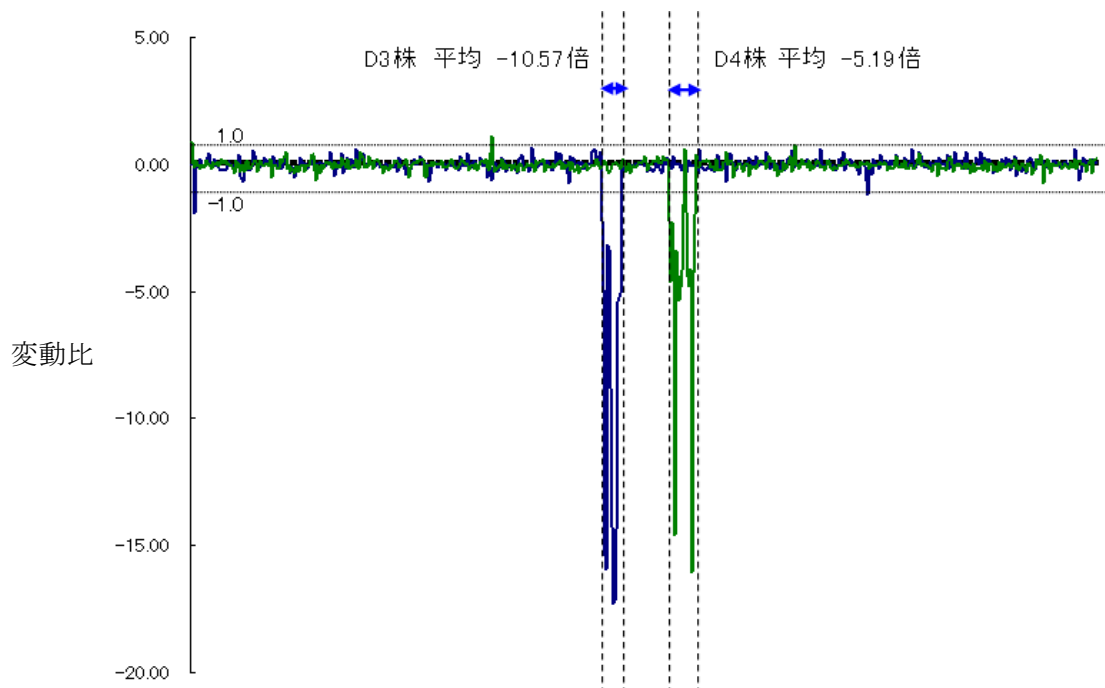


図4-9 D3, D4株の第15染色体の検出結果

変動比は、D3株/FY834株あるいはD4株/FY834株として計算し、底が2の対数に変換した。

f. ミトコンドリアゲノムおよび第12番染色体での増幅

ミトコンドリアゲノム(図4-8 chr.mito)および第12番染色体においても増幅があることを観察した。ミトコンドリアゲノムでは、プローブが設計された18遺伝子の全てでシグナル強度の増加が検出でき、増加率は平均1.15倍(真数に換算すると2.2倍)である(表4-5)。比較として、D3株、D4株についてもミトコンドリアゲノムのタイリングマップを示している。D3株は、18遺伝子のいずれでも増幅していないことが分かる。一方、D4株ではFY834株に比べ、コピー数が20%程度に減少している。D4株で欠損させた17遺伝子を表4-4に示した。ミトコンドリアの機能に関する遺伝子が *CAT5*, *ORT1*, *IDH2*, *LSC1* が含まれている。しかし、これらの遺伝子の **description** は、ミトコンドリアのコピー数維持に関与するものではなかったことから、直接的な因果関係は分からなかった。

表 4-5 ミトコンドリアゲノムにコードされている遺伝子の変動比

ORF Name	SH6484	D3	D4
Q0060	1.16	-0.30	-4.45
Q0055	0.92	-0.33	-4.53
Q0045	1.09	-0.29	-3.55
Q0070	0.86	-0.60	-3.57
Q0065	1.06	-0.14	-5.13
Q0050	1.42	-0.05	-3.93
Q0075	1.34	0.24	-2.88
Q0080	1.18	-0.65	-2.41
Q0085	0.92	-0.05	-2.18
Q0120	0.95	-0.28	-3.43
Q0110	1.19	-0.23	-2.39
Q0115	1.21	-0.44	-3.09
Q0105	1.35	0.07	-1.99
Q0130	1.36	-0.14	-1.53
Q0140	1.50	-0.19	-0.11
Q0160	1.04	-0.45	-2.70
Q0250	1.30	-0.16	-1.40
Q0255	0.95	-0.48	-2.10
Q0275	0.99	-0.42	-0.02
平均	1.15	-0.26	-2.70

第 12 番染色体で増幅した領域は、リボソーム RNA 遺伝子(*YLR154W-A*, *YLR154W-B*, *YLR154W-C*, *YLR154W-E*, *YLR154W-F*, *YLR154C-G*, *YLR157W-C*)の領域であった(表 4-6)。FY834 株と比較すると、SH6484 株ではリボソーム RNA の遺伝子平均で 0.93 倍(真数に換算すると約 1.9 倍)のシグナル強度の増加がみられたため、当該領域のコピー数増幅が示唆された。なお、D3 株、D4 株ではリボソーム RNA 遺伝子の変動比増加は観察されていないため、コピー数増幅は生じていないと推定された。

表 4-6 リボソーム RNA 遺伝子の変動比

rRNA遺伝子	SH6484	D3	D4
YLR154W-C	0.82	-0.46	0.05
YLR154W-B	0.93	-0.33	0.25
YLR154W-A	0.70	-0.35	0.29
YLR154W-E	0.67	-0.33	0.01
YLR154W-F	0.81	-0.36	0.31
YLR154C-G	0.85	-0.29	0.27
YLR157W-C	1.71	-0.71	-0.52

4.4 考察

a. GReO 法の有用性

本研究では、培養条件によってゲノム構成を変えることのできる GReO 法を開発した。ZN92 株を用いた評価から、栄養培地での培養条件下で 19 種のゲノム構成を持った株が生じた。ストレスをかけた状態で、本株を培養することで、状態に応じたゲノム構成になるものと期待される。SH6484 株の検討では、ミニ染色体の脱落だけでなく、増幅も検出された。さらに、ミニ染色体ではない領域の増幅も検出されていることから多様なゲノム構成を持った株を生み出すことができる。GReO 法は、工業的に有用な株を作出するだけでなく、ゲノムの機能とその構成の関係の解明に有用なツールであるといえる。

b. ミニ染色体の脱落

ミニ染色体の脱落は、細胞分裂時に生じていると推定される。Surosky *et al.* (1986) は 50 kb 以下の大きさに断片化された染色体は細胞分裂時に高頻度で脱落すると報告している。また、Hill *et al.* (1987) は、*GAL1* プロモーターの下流に *CEN3* を持ったプラスミドを用いた検討を行い、*GAL1* プロモーターの活性化により *CEN3* の活性が低下し、結果としてプラスミドの分配に異常をきたし、コピー数が増加する細胞が現れるとしている。各ミニ染色体中にコードされている遺伝子の発現レベルを調べることで、ミニ染色体の増幅、脱落について知見が得られるかもしれない。

c. ミトコンドリアゲノムの増幅

ミトコンドリアゲノムは、1 細胞あたりに数十から数千コピー存在することが知られており、細胞株や培養条件によって数変動する (Wiederhold *et al.* 2010)。SH6484 株、D3 株、D4 株のミトコンドリア染色体にコードされる遺伝子の変動比を表 4-5 に示した。各株でミトコンドリア染色体のコピー数に差があることが分かる。SH6484 株は FY834 株に比べミトコンドリア染色体が 2 倍程度増えている。反対に D4 株ではミトコンドリアが 1/4~1/5 程度に減少している。D4 株で観察されたミトコンドリアゲノムのコピー数減少は、興味深い。ミトコンドリア DNA の複製機構あるいは保持機構に異常が生じた可能性が示唆される。D4 株と同じ方法で染色体領域を脱落させた D3 株では、ミトコンドリア DNA のコピー数変化が起きていないことから、D4 株で欠損させた領域にミトコンドリア DNA のコピー数維持に関わる遺伝子が含まれている可能性がある。D4 株で欠損させた領域に含まれる遺伝子を表 4-5 に示した。この領域には、ミトコンドリアに関連する遺伝子として、*CAT5*, *ORT1*, *IDH2*, *LSC1* がある。中でも *CAT5* は、ミトコンドリア維持に関わっており、変異

が生じるとミトコンドリアコピー数が減少することが報告されている(Dimitrov *et al.* 2009)。本研究の成果は、Dimitrov *et al.*の成果と一致する。

また、酸化ストレスによって誘導された DNA 組み換えがミトコンドリアのコピー数増加につながると報告されている(Hori *et al.* 2009)。本研究では、栄養培地で培養したのみであるため酸化ストレスはかかっていないと考えられるため、SH6484 株で生じたミトコンドリアゲノムのコピー数増加は酸化ストレスが原因でないと考えられる。ミトコンドリアのコピー数が増えたことは、PCS 法によってミニ染色体を複数持つように改変したことにより、DNA 複製に何らかの影響を与えている、あるいは、脱落したミニ染色体が DNA 複製にとって重要な役割を担っていた可能性が考えられる。

d. リボゾーム RNA 遺伝子の増幅

PCS 法を用いて作出した SH6484 株で、リボソーム RNA 遺伝子領域が 1.9 倍に増幅している可能性が示唆された。第 12 番染色体上で増幅が示唆された領域にある遺伝子は、リボソーム RNA 遺伝子であった。リボゾーム RNA がコードされている 9.1kb のユニットが、150 コピーが程度タンデムに並んだ 1.5Mb の領域に渡って存在している(Petes, 1979)。SH6484 株では 1.9 倍に増幅している可能性があるため、リボゾーム RNA 遺伝子領域のコピー数は 285 コピーである可能性がある。リボゾーム RNA のコピー数の制御には SIR2 が必要であることが知られている(Benguria *et al.* 2003, Gottlieb *et al.* 1989, Kobayashi *et al.* 2004)。SIR2 タンパクは、減数分裂や有糸分裂時に、相同組み換えを抑制する働きを持っている。SH6484 株では、SIR2 は#8 のミニ染色体上にコードされており、#8 ミニ染色体のコピー数は 2 倍程度に増加している。SIR2 遺伝子の転写産物が 2 倍になっている可能性もあるが、ゲノム領域を分断したことで転写制御が異常となっている可能性も考えられる。相同組み換えを抑制する SIR2 遺伝子のコピー数が増加している点と、リボソーム DNA のコピー数増加の因果関係は不明である。SH6484 株から Total RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行うことで、リボソーム RNA 遺伝子のコピー数変化について情報が得られるかもしれない。

表 4-5 D4 株欠損領域に含まれる遺伝子

ORF Name	Locus Name	Description	Phenotype
YOR124C	UBP2	Ubiquitin-specific protease that removes ubiquitin from ubiquitinated proteins, cleaves at the C terminus of ubiquitin fusions; capable of cleaving polyubiquitin and possesses isopeptidase activity	Null mutant is viable. Null yuh1 ubp1 ubp2 ubp3 quadruple mutants are viable and retain the ability to deubiquitinate ubiquitin fusions.
YOR125C	CAT5	Mitochondrial inner membrane protein directly involved in ubiquinone biosynthesis, essential for several other metabolic pathways including respiration and gluconeogenic gene activation	Null mutant is viable, results in complete loss of glucose derepression affecting gluconeogenic key enzymes. Respiration, but not mitochondrial cytochrome c oxidase activity, are also affected; fails to synthesize ubiquinone
YOR126C	IAH1	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase, required in balance with alcohol acetyltransferase to maintain optimal amounts of isoamyl acetate, which is particularly important in sake brewing	The null mutant is viable but cannot hydrolyze isoamyl acetate.
YOR127W	RGA1	GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p; implicated in control of septin organization, pheromone response, and haploid invasive growth	Null mutant is viable but shows increased signaling in the pheromone pathway; haploid null mutants bud predominantly in a bipolar, rather than the normal axial, manner
YOR128C	ADE2	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalyzes a step in the 'de novo' purine nucleotide biosynthetic pathway; red pigment accumulates in mutant cells deprived of adenine	Null mutant is viable and requires adenine. ade2 mutants are blocked at a stage in the adenine biosynthetic pathway that causes an intermediate to accumulate in the vacuole; the intermediate gives the cell a red color.
YOR129C			
YOR130C	ORT1	Ornithine transporter of the mitochondrial inner membrane, exports ornithine from mitochondria as part of arginine biosynthesis; human ortholog is associated with hyperammonaemia-hyperornithinaemia-homocitrullinuria (HHH) syndrome	Null mutant is viable, arginine bradytroph
YOR131C			
YOR132W	VPS17	Subunit of the membrane-associated retromer complex essential for endosome-to-Golgi retrograde protein transport; peripheral membrane protein that assembles onto the membrane with Vps5p to promote vesicle formation	Null mutant is viable, exhibits defect in vacuolar morphology and protein sorting
YOR133W	EFT1	Elongation factor 2 (EF-2), also encoded by EFT2; catalyzes ribosomal translocation during protein synthesis; contains diphthamide, the unique posttranslationally modified histidine residue specifically ADP-ribosylated by diphtheria toxin	
YOR134W	BAG7	Rho GTPase activating protein (RhoGAP), stimulates the intrinsic GTPase activity of Rho1p, which plays a role in actin cytoskeleton organization and control of cell wall synthesis; structurally and functionally related to Sac7p	Null mutant is viable; overexpression suppresses sac7 null mutation
YOR136W	IDH2	Subunit of mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase, which catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate in the TCA cycle	
YOR137C	SIA1	Protein of unassigned function involved in activation of the Pma1p plasma membrane H ⁺ -ATPase by glucose	
YOR138C	RUP1	Protein involved in regulation of Rsp5p, which is an essential HECT ubiquitin ligase; required for binding of Rsp5p to Ubp2p; contains an UBA domain	
YOR140W	SFL1	Transcription repressor involved in regulation of flocculation-related genes, inhibits transcription by recruiting general corepressor Cyc8p-Tup1p to different promoters; negatively regulated by cAMP-dependent protein kinase A subunit Tpk2p	
YOR141C	ARP8	Nuclear actin-related protein involved in chromatin remodeling, component of chromatin-remodeling enzyme complexes	
YOR142W	LSC1	Alpha subunit of succinyl-CoA ligase, which is a mitochondrial enzyme of the TCA cycle that catalyzes the nucleotide-dependent conversion of succinyl-CoA to succinate	Null mutant is viable but grows slowly on minimal glycerol or pyruvate; mutant suppresses idh2 null mutants for growth on glycerol

第5章 高感度 DNA チップの新たな応用技術開発ー ホルマリン固定パラフィン包埋試料の解析

5.1 目的

病理検査で用いられるホルマリン固定パラフィン包埋試料(FFPE)は、細胞や核の染色、免疫染色、FISH 法など種々の方法で解析され、細胞の形態、がん細胞の有無、タンパクマーカ-の有無、染色体異常などを検出し、検査・診断に用いられている。FFPE 試料は、ヒトの検体組織を 10%緩衝ホルマリン溶液に一晩浸漬し、細胞が固定される。その後、パラフィンに包埋される。FFPE 試料は保存性に優れており、十数年間保管されることもある。そのため、組織採取から現時点までの患者の臨床情報が付加されている。過去にさかのぼって検体を採取できるため、予後情報の収集が容易である。また、検体を集めたいと考えても発症頻度の低い稀少な症例の解析にも有効である。さらに、保存安定性が高いことから、安定的に検体を輸送することができる。生の組織であれば、凍結保存や保存液に入れた状態で輸送しなくてはならず、輸送条件の管理が煩雑となる。

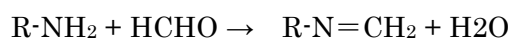
FFPE 試料から RNA を抽出し解析する手法は、実用化が進んでいる。乳がんの予後予測解析法として、ジェノミックヘルス社の OncoTypeDX(Cobleigh *et al.* 2006)も FDA の承認を得ている。FFPE 試料で輸送された試料を解析対象とし、16 種類のがん遺伝子と、5 種類のリファレンス遺伝子の発現量を RT-PCR で解析し、再発リスクを判定する。オランダ Agendia 社の MammaPrint(Glas *et al.* 2006)も同時期に乳がんの予後予測診断キット(再発リスクの予測)として米国 FDA の承認を得た。組織試料から抽出した RNA を解析に用い、70 種の遺伝子発現レベルを測定し、診断する。ネガティブコントロール、データ補整用コントロールプローブ DNA が約千種搭載されている。病理診断では、採取した組織検体を病理検査のためにホルマリン固定したうえでパラフィン包埋(FFPE)し、病理切片を作製する。OncoTypeDX は、FFPE 試料を解析対象としているため、通常の検査の流れの一環で解析できるが、MammaPrint は、解析のために組織検体を用意しなければならない。そのため、OncoTypeDX は利便性が高く、広く診断分野で使われている。

DNA チップを用いた、FFPE 試料からの RNA の解析が実用化されれば、臨床研究において画期的なツールを手に入れることとなる。OncoTypeDX は、定量 PCR を用いて 20 程度程度の遺伝子発現レベルを測定するが、検査対象遺伝子の数が増えてくると、操作が煩雑になると考えられ、DNA チップを用いた解析に置き換わる可能性が出てくる。

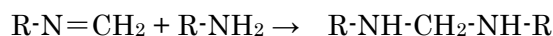
しかしながら、FFPE 試料から RNA を抽出し、DNA チップで解析を行うことは困難とされていた。ホルマリン固定処理は、組織の腐敗防止や細胞機能の停止のために行われる。分子レベルでの反応は、タンパクや核酸が持つ一級アミン同士で架橋反応を生じさせている。

ホルマリン(以下ホルムアルデヒド)固定の原理は次のとおりである。

まず、ホルムアルデヒドが一級アミンと反応し、シッフ塩基を生成する。



さらに、1級アミンと反応し、アミンがメチレンで架橋した構造が形成される。



タンパクや核酸は、多数の1級アミンを持つ生体分子であるため、ホルマリン固定によって分子内、分子間で架橋し、巨大なタンパクと核酸の複合体が形成される。FFPE 試料から核酸を抽出するには、タンパク・核酸複合体を **protease K(ProK)** で処理し、タンパクを加水分解する。次に、加熱で架橋部分を加水分解(脱架橋反応)する。RNA は、加温によりリン酸エステル結合が解離するため、脱架橋反応と同時に、RNA の分解も生じているはずである。さらに、FFPE 試料は、病理検査の記録として長期間保管されることが一般的に行われており、酸化による劣化も生じている。また、自然光が当たるような過酷な条件で保管されることもあり、生体分子の劣化が進んでいる場合がある。

以上のように、FFPE 試料は、生の組織検体に比べ、生体分子の状態が悪く、RNA の解析には使用できないと考えられていた。特に網羅的に遺伝子発現解析を行う用途には適していないとされていた。

一方で、FFPE 試料は、検体採取から数年間の臨床情報(例：術後の治療履歴、予後など)が付帯されているため、解析が可能になれば、検体準備に時間をかけずにマーカー分子の探索ができる。また、稀少な疾患も FFPE 試料であれば、同様の理由から症例を集めやすい。FFPE 試料から抽出した RNA の解析において課題であったのは、RNA の分解であった。RNA が分解していることにより、RNA の増幅反応が異常となっていた。従来の DNA チップは感度が不十分であったため、RNA の増幅反応を過剰に行っていた。

私は、高感度 DNA チップの性能を生かし、これまで困難であった FFPE 試料からの RNA 解析技術を構築することを目的とし研究を行った。

5.2 材料と方法

a. Total RNA の抽出

ヒト凍結組織及びマウス凍結組織からの total RNA 抽出は、RNeasy mini kit(キアゲン社)を用いた。また、miRNA 画分を含む total RNA の抽出には miRNeasy mini kit(キアゲン社)を用いた。作業手順はメーカー推奨方法に従った。

b. ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料からの RNA 抽出

FFPE 試料からの total RNA 抽出は、次の手順で行った。FFPE 試料から 10um 厚の薄切切片をキシレンに浸漬し、パラフィンを除去した。次に、エタノールで 2 回洗浄しキシレンを除去した。得られた組織に protease K を添加し、37°C で 16 時間処理した。80°C, 15 分間インキュベーションし、脱架橋処理を行った。遠心後、上清をシリカメンブレンカラム(東レ)で精製し、Total RNA を得た。

c. RNA の電気泳動

抽出した total RNA の電気泳動には、バイオアナライザー RNA nano 6000kit(アジレント)を用いた。凍結組織から抽出した RNA の品質は、バイオアナライザーが出力する RIN 値を参考にした。FFPE 試料から抽出した total RNA は、凍結組織から抽出した RNA の泳動パターンと大きくことなるため、泳動のみ行い、品質評価は行わなかった。

d. Total RNA 中の mRNA 標識

凍結組織から抽出した Total RNA を、Amino Allyl Message AMP II aRNA Amplification Kit (アプライドバイオシステムズ)を用いてアミノアリル aRNA を合成した。アミノアリル aRNA は Cy3-NHS ester または Cy5-NHS ester で標識した。

e. Total RNA 中の miRNA 標識

Total RNA 中の miRNA の標識には、miRCURY miRNA labeling kit(エキシコン)を用いた。Total RNA 500ng を、脱リン酸化酵素で 5'末端のリン酸基を除去した。次に、T4 RNA ligase で、miRNA の 3'末端に Hy5 色素を結合させた。

FFPE 試料から抽出した total RNA の標識は、3D-Gene® FFPE Gene Expression Analysis Reagent kit (東レ)を用いて増幅した。増幅反応はメーカーの推奨方法に従い、増幅した aRNA は Cy3-NHS ester または Cy5-NHS ester で標識した。

f. DNA チップ

遺伝子発現解析には、3D-Gene Human oligo chip 25k(東レ)を用いた。miRNA の発現解析には、3D-Gene human miRNA chip(東レ)を用いた。ハイブリダイゼーション及び洗浄方法は、メーカーの推奨方法に従い行った。

5.3 結果

a. FFPE 試料からの RNA 抽出方法の検討

FFPE 試料から抽出した RNA で、DNA チップによる解析が行われてこなかった原因として、RNA が保管時に分解していることが原因とされていた。一般的に、DNA チップで遺伝子発現解析を行うために mRNA を増幅する。原理は、mRNA の poly A tail に poly T プライマーをアニールさせて逆転写反応を行い、cDNA を合成する。cDNA を鋳型にし、あらかじめ poly T プライマーに連結させてあった T7 RNA polymerase プロモーター配列から、T7 RNA polymerase を用いて、in vitro 転写反応させ、RNA を合成する。mRNA が分解していると、逆転写反応によって伸長する長さが短くなる。プローブ配列は、mRNA の 3'末端側に設計されているが、遺伝子によって位置が異なる。分解した RNA では、mRNA の増幅産物が短くなってしまい、結果としてプローブ配列とハイブリダイゼーションできない。

図 5-1 に、マウスの肝臓と小脳の凍結組織、及びそれぞれの FFPE 試料から抽出した RNA の電気泳動パターンを示した。凍結組織から抽出した RNA は、約 2000 塩基の大きさの 18S、約 4000 塩基の大きさの 28S リボソーム RNA のバンドが検出されているのに対し、FFPE 試料から抽出した RNA では、バンドが検出されていない。100 塩基前後から 4000 塩基前後まで広い範囲でスメアーとなっている。肝臓と小脳から抽出した RNA で比較しているが、いずれの組織でも、同様の結果が得られており、FFPE 試料から抽出した RNA の泳動パターンがスメアーになることは、組織依存的ではない。様々なサイズの RNA が検出されていることは、凍結組織から抽出した RNA の泳動パターンを基準に考えると、FFPE 試料はホルマリンで架橋されており立体構造を取っているため泳動パターンが異なること、また、FFPE 試料を保存している間に RNA が分解しているものと考えられた。

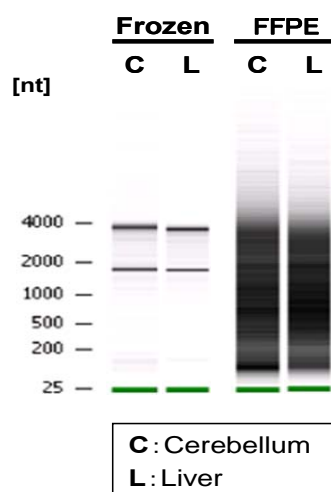


図 5-1 凍結組織(Frozen)と FFPE 試料切片から抽出した RNA の電気泳動パターン

FFPE 試料から RNA を抽出する方法は、市販されている Ambion 社製と キアゲン社製のプロトコールでは、脱パラフィン後に、プロテアーゼ K で 15 分間処理(Ambion 社製は 56°C、キアゲン社製は 50°C)し、タンパクを加水分解した溶液を、80°Cで 15 分間加温する(脱架橋)。次に、試料を遠心分離することで組織片を沈殿させ、核酸が溶解している上清を回収する。続いて、上清から核酸をシリカカラム等で回収するという流れである。

一般的な RNA の性質として、高温にさらすことで加水分解することが知られている。そこで、プロテアーゼ K 処理の温度を、56°C (図 5-2A)、46°C (図 5-2B)、37°C (図 5-2C) と 3 条件で処理し、抽出した RNA を電気泳動で比較した。56°Cと 46°Cでは、37°Cに比べて 28s rRNA (図中、赤矢印) のピークが相対的に低くなっている。プロテアーゼ K 処理中に RNA の分解が進んだと考えられた。次に、反応温度を 37°Cに固定し、反応時間を検討した。反応時間を 2h (図 5-2D) , 4h (図 5-2E) , 16h (図 5-2F) とし、抽出した RNA を電気泳動で評価した。その結果、いずれの条件でも、37°C15 分処理条件と比べ 28s rRNA のピークが高い。

各抽出条件の特徴を詳しく調べるため、図 5-2 の電気泳動パターンから低分子画分(青矢印)と高分子画分(赤矢印)のピークの高さの比率を計算し、比較した(図 5-3)。56°C15 分処理では比率が 1 であった。46°C15 分、37°C15 分処理条件では、1.5 前後であった。一方、2h, 4h, 16h 処理条件では、比率がおよそ 2 まで上がっている。すなわち、長時間処理することで、高分子画分が多く得られるようになったことを示している。メカニズムの解明はしていないが、プロテアーゼ K 処理を長時間行うことで、タンパクの加水分解が進み、長鎖の核酸分子も溶液中に溶け出すことができるようになったと推測した。

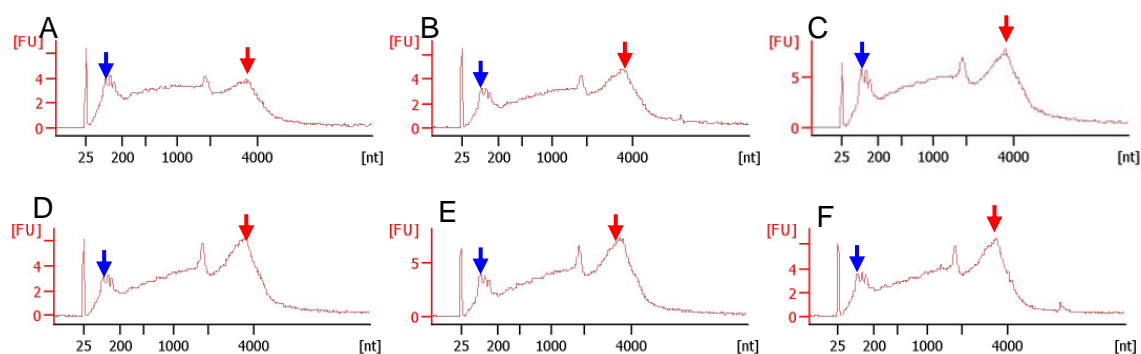


図 5-2 FFPE 試料からの RNA 抽出条件検討

ヒト肺癌組織の FFPE 試料 (10 μ m 厚、1 枚) から、各実験条件のもとに抽出した RNA を電気泳動で評価した。A : 56°C、15 分間、B : 46°C、15 分間、C : 37°C、15 分間、D : 56°C、2 時間、E : 56°C、4 時間、F : 56°C、16 時間 赤矢印 : 28S rRNA、青矢印 : 低分子画分

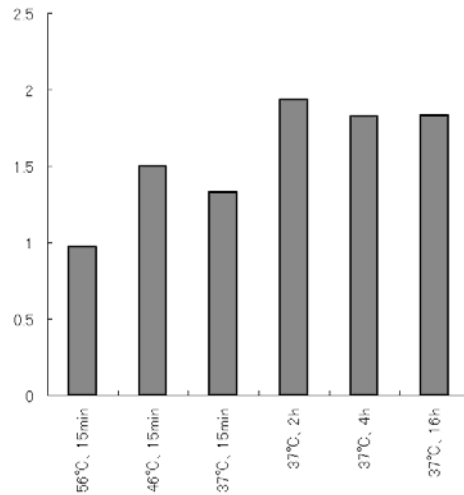


図 5-3 低分子画分と高分子画分の比率

図 5-2 の泳動パターン中の高分子画分（赤矢印）と低分子画分（青矢印）の高さを求め、比率（赤矢印の高さ/青矢印の高さ）を棒グラフで示した。

Toray 方法(ProK 処理を 37°C、16 時間)と Ambion 社製, キアゲン社製(従来の方法)で、FFPE 試料から抽出した RNA の電気パターンを図 5-4 に示した。肝臓および小脳の FFPE 試料を作成し、6 ヶ月保管したもの(6m)と 1 年間保管したもの(1y)を用いて比較している。6 ヶ月保管した肝臓 FFPE 試料由来 RNA の泳動パターンでは、Ambion 社製, キアゲン社製のプロトコールで抽出した RNA は、全体としてスメアーになっており、100 塩基前後の低分子 RNA が多く検出されている。Toray 法は、低分子画分は少なく、長鎖の RNA が検出されている。1 年間保管した肝臓 FFPE 試料から抽出した RNA の泳動パターンは、Supplier A, B のプロトコールで抽出した RNA は、低分子画分が増えており、RNA の分解が進んでいる。Toray 法で抽出した RNA は、分解が進んでいるものの、低分子画分が増えていない。次に、6 ヶ月保管した小脳 FFPE 試料の結果は、Ambion 社製, キアゲン社製の抽出方法では、低分子画分が多く検出されている。Toray 法では、1000 塩基前後を中心にスメアーに検出されており、低分子画分は僅かに検出されている。1 年間保管した小脳 FFPE 試料では、Ambion 社製, キアゲン社製で抽出した RNA では低分子画分が多く検出され、6 ヶ月保管に比べて、長鎖 RNA が少なくなっている。Toray 法で抽出した RNA でも 200 塩基前後を中心にスメアーに検出されており、低分子画分も検出されている。

以上の結果から、FFPE 試料は、保存期間によって RNA の分解が進むことが確認された。なお、組織依存的に分解の速度が変わるかどうかは分からなかった。同一の FFPE 試料から抽出した RNA であっても、抽出方法によって低分子画分の量が異なることから、抽出時の RNA の分解の程度は、抽出方法に依存していると考えられた。さらに、プロテアーゼ K 処理を低温で、かつ長時間行うことで RNA の分解を抑えつつ、長鎖 RNA の回収率を向上できることが分かった。

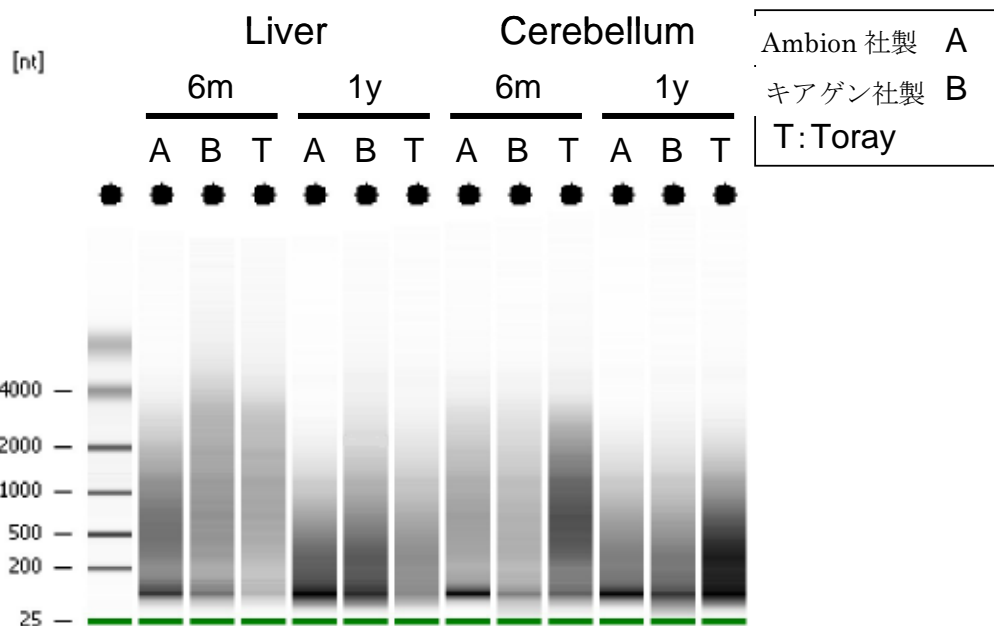


図 5-4 保存期間と抽出方法による比較

Ambion 社製は ProK 処理を 56°C、15 分間、キアゲン社製は ProK 処理を 50°C、15 分間、Toray は、ProK 処理を 37°C、16 時間行った。

b. FFPE 試料から抽出した RNA の増幅

通常、遺伝子発現を DNA チップで解析する場合には、mRNA を増幅させることが行われている。インタクトな RNA 用に用いている Ambion message AMP II(ライフテクノロジー)では、100ng の total RNA を、100 μ g 程度のアミノアリル aRNA に増幅する。100ng の Total RNA に含まれる mRNA の存在量を 2%(2ng)と仮定すると、増幅倍率は 5 万倍と計算できる。少ない分子数の mRNA を増幅することによって、検出できるようにしている。FFPE 試料から抽出した RNA は、抽出方法や保存条件によって程度の差はあるが、RNA の分解が進み、低分子画分の存在比が大きくなっている。分解の進んだ RNA を、インタクトと同じ増幅倍率で増幅したところ、実験間で検出結果に大きな差がみられ、再現性の低い結果となった(データは示さず)。増幅反応の条件を変え、100ng の抽出 RNA から数 μ g の増幅 RNA が得られる程度の増幅倍率に抑えたところ、実験間の再現性が改善された(データは示さず)。

c. 臨床検体での検証

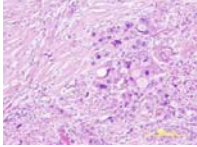
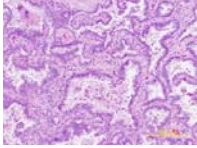
開発した FFPE 試料解析プロトコールを用いて臨床検体の解析を行った。肺がんの遺伝

子発現解析、及び miRNA 発現解析を対象とした。肺がんの出現頻度は、世界で増加する傾向にある。肺がんは、悪性となる頻度が高く、発生の初期に検出し処置を施すことが、治療の観点から重要である。病理診断の過程で FFPE 試料は作製され、保管されている。過去にさかのぼって症例を探ことができ、処置後の予後情報を得ることができるため、FFPE 試料から網羅的に遺伝子発現情報及び miRNA の発現情報を得ることができれば、バイオマーカー探索あるいはその足がかりとなると考えた。そこで、FFPE 試料から抽出した RNA を用いて、mRNA および miRNA を解析し、マーカー候補となり得る遺伝子を検出できるか試みた。

解析には肺腺がんの 4 検体を用い、がん部位とその周辺の正常組織を解析の対象として用いた(表 5-1)。4 検体のうち、検体番号 14 は遠隔転移した検体である。そのため、検体番号 14 の遺伝子発現プロファイルが他の検体と異なっている用であれば、転移に関与するマーカー遺伝子を検出できる可能性が示唆されると考えた。

近年 non coding RNA の一種である miRNA が注目されている。肺がんにおけるかかわりも研究されており let7 ファミリーや miR-21、miR17-92 クラスターなどの関与が知られている(Lin *et al.* 2010)。癌種によって報告される miRNA はことなり、肺腺がんでは、発現が上昇する miRNA として、miR-210、miR-21、miR-31、miR-182、発現が減少する miRNA として miR-126、miR-145 が報告されている(Guan *et al.* 2012)。報告されているマーカーを FFPE 試料から検出できることを評価の指標とした。

表 5-1 使用した検体と臨床情報

Sample No.	Age	Pathological Diagnosis	Metastasis	HE Stain
13	71	Well differentiated adenocarcinoma, Clinical Stage IB	-	No Image
14	54	Poorly differentiated adenocarcinoma, Clinical Stage IIB	distant	
16	79	Well differentiated adenocarcinoma, Clinical Stage IB	-	No Image
17	77	Well differentiated adenocarcinoma, Clinical Stage IA	-	

d. mRNA 発現解析、miRNA 発現解析のスキーム

本研究で行う遺伝子発現解析および miRNA 発現解析のスキームを図 5-5 に示した。凍結組織の解析データを指標に、FFPE 試料の解析データの品質を評価することを考えた。手術検体の一部を FFPE 試料とし、残りを凍結保存した。FFPE 試料からの RNA 抽出、凍結組織からの RNA 抽出は、材料と方法に記述した方法で行った。得られた RNA を二つにわけ、mRNA の解析と miRNA の解析に用いた。また、検体は、個体差があるため、がん部位 (Tumor) とその周辺部位 (NAT: Normal adjacent tissue) のペアで用意し、検体ごとにごん部位と周辺部位の比較を行い、がん部位で特徴的に変動する遺伝子、あるいは miRNA を検出することを試みた。

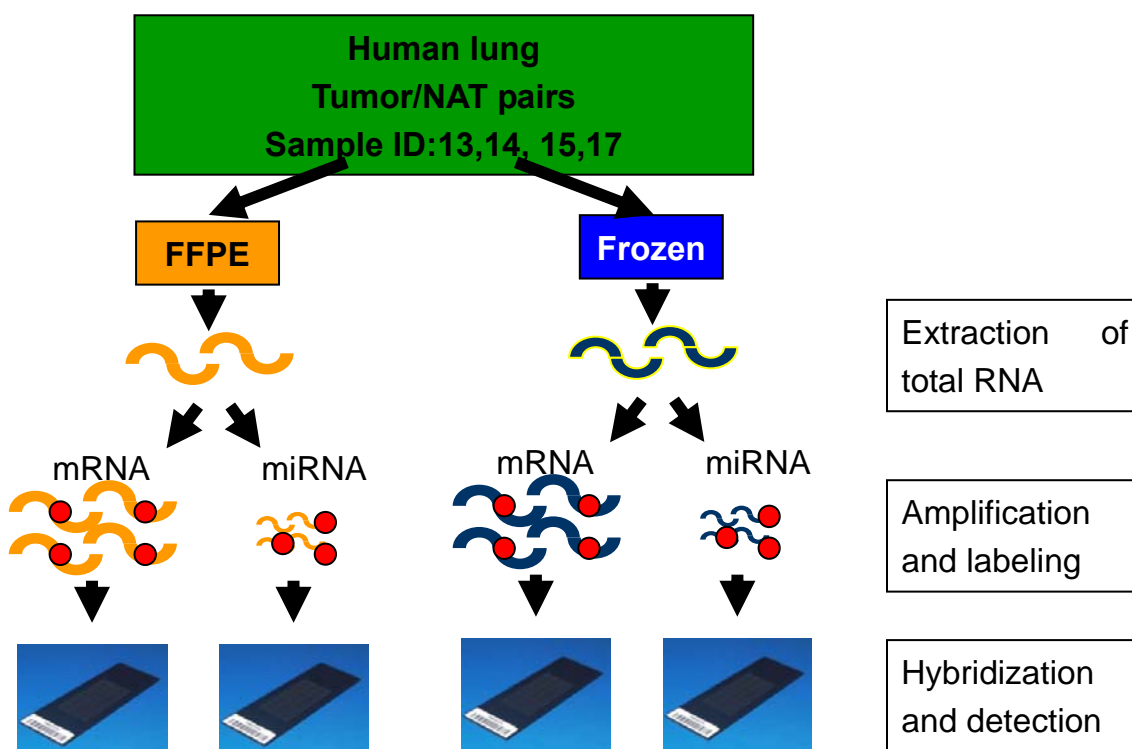


図 5-5 FFPE 試料の解析スキーム

e. FFPE 試料から抽出した mRNA の解析

凍結組織から抽出した RNA と FFPE 試料から抽出した RNA を、それぞれ DNA チップで検出した(図 5-6)。がん部位(Tumor)及び正常部位(NAT)の凍結組織から抽出した RNA の遺伝子発現解析結果を、散布図で図 5-6B に示している。多くの遺伝子において、がん部と正常部で発現変動がみられる。一方、FFPE 試料から抽出した RNA の解析結果を図 5-6A に示した。がん部位、正常部位の間で、発現変動のあった遺伝子がみられるが、凍結組織

に比べ相関性の高い結果が得られた。凍結組織、及び FFPE 試料から抽出した RNA の実験からえられた検出シグナル値から変動比 $\text{Log}_2(\text{Tumor}/\text{NAT})$ を算出し、グラフにしたものが図 5-6C である。相関係数は 0.43 であった。

FFPE 試料と凍結組織から得られた発現変動比の相関を低下させている原因を探ったところ、FFPE 試料の解析結果においてシグナル強度の低い遺伝子 (Tumor および NAT のシグナル強度の積が 100 未満) のデータが相関性を低下させていることが分かった。FFPE 試料の解析結果においてシグナル強度の低い遺伝子を除外し、散布図にした結果を図 5-6D、E に示した。除去した遺伝子は、凍結組織においてもシグナル強度が低い遺伝子が多いことが分かる(図 5-6E)。発現変動比を比較すると相関係数は大きく改善し、0.72 となった(図 5-6F)。次に、シグナル強度の積が 100 未満の遺伝子の特徴を調べるため、プローブ配列を評価した。図 5-7 に、各プローブの mRNA の 3' 末端からの距離の分布を示した。シグナル強度の積が 100 以上のプローブ群 (図中、赤棒) は、3' 末端からの距離が近いプローブが集約されている傾向がみられた。一方、シグナル強度の積が 100 未満のプローブ群 (図中、緑棒) は、mRNA の 3' 末端からの距離が 500 塩基以上の階級では、赤棒の群と同様の傾向を示しているが、500 塩基未満の階級において、赤棒の群に比べ頻度が少ない。このことから、mRNA の 3' 末端からの距離が 500 塩基未満のプローブにおいては、シグナル強度が高く検出できるが、500 塩基を超えるとシグナル強度が低くなるプローブの比率が上がってくるのがわかる。FFPE 試料から抽出した RNA は、抽出後、既に断片化しているため、mRNA の 3' 末端からの距離が遠いプローブについては、正しい検出結果を得られないと考えられた。すなわち、プローブの設計位置を mRNA の 3' 末端近傍に設計できれば、凍結組織のデータとの相関性が向上することが推測された。

しかし、本データにおいて、3' 末端からの距離が 500 塩基未満のプローブのみで、FFPE 試料データと凍結組織データを比較したところ、相関係数は向上しなかった。3' 末端からの距離が 500 塩基未満のプローブであっても、シグナル強度の低いプローブは存在し、それによって相関係数を下げていることが分かった (データは示さず)。プローブ設計位置以外にも、シグナル強度を低下させる要因があることが推測された。

以上のように、FFPE 試料においてシグナル強度の低い遺伝子を除去することで、凍結組織から得られた発現変動比との相関性が向上することが分かった。

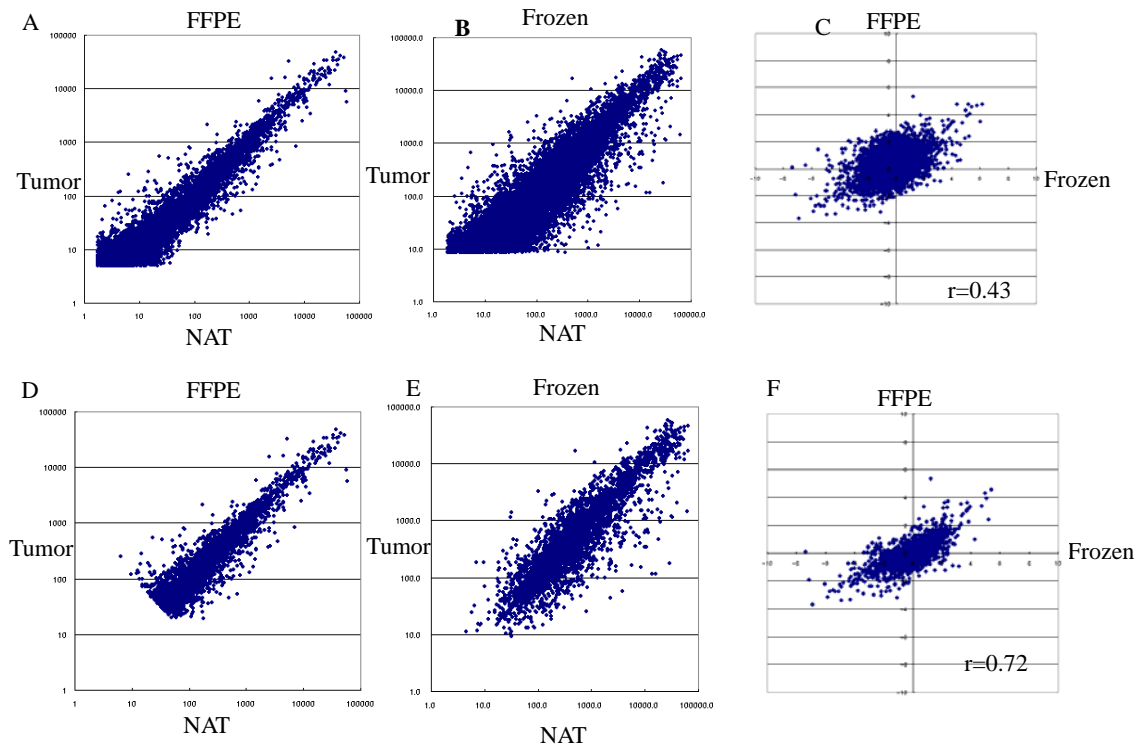


図 5-6 FFPE 試料から抽出した RNA から得た遺伝子発現解析結果

A, B, D, E : 縦軸、横軸ともに検出したシグナル強度、C, F : 縦軸、横軸ともに発現変動比

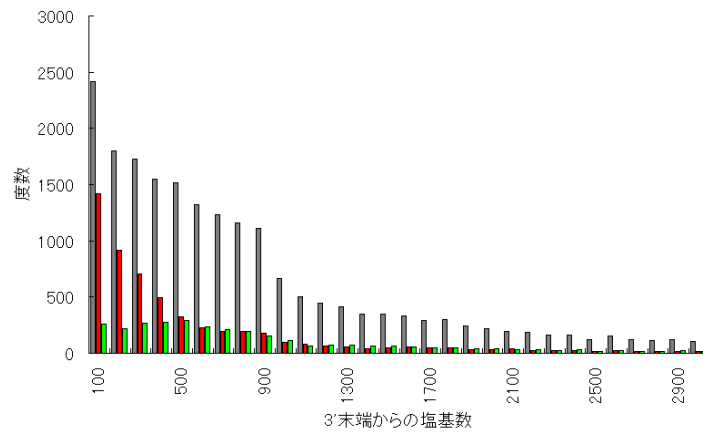


図 5-7 プローブ設計位置の分布

各プローブの mRNA の 3' 末端からの距離を求めた。灰: DNA チップに固定されている全てのプローブ。
赤: シグナル強度の積が 100 以上となったプローブ。緑: シグナル強度の積が 100 未満であったプローブ。

4 検体全てにおいて、凍結組織及び FFPE 試料から抽出した RNA の遺伝子発現を DNA チップで解析した結果を用い、クラスター解析を行った(図 5-8A)。サンプル間でのクラス

ター解析から、遠隔転移したサンプルである検体番号 14 のデータが、凍結組織(図 5-8A 中の Frozen_14T/N)、FFPE 試料(図 5-8A 中の FFPE_14T/N)ともに他の検体のデータとは異なるプロファイルを持っており、クラスターが分かれている。その他の検体については、同一検体由来の検出結果が近傍に位置している。このことから、同一検体に由来する凍結組織及び FFPE 試料の発現変動比は、よく似たプロファイルを示していることが分かる。

次に、検体番号 14 で特徴的に、がん部位で発現レベルが向上した遺伝子群を抜きだした。図 5-8A 中の黄色で囲った部分が、検体番号 14 でのみ、がん組織において発現量が向上している遺伝子である。抽出した遺伝子群のみで再度クラスター解析した結果を図 5-8B に示した。抽出された遺伝子が、遠隔性転移に関連している可能性が示唆された。

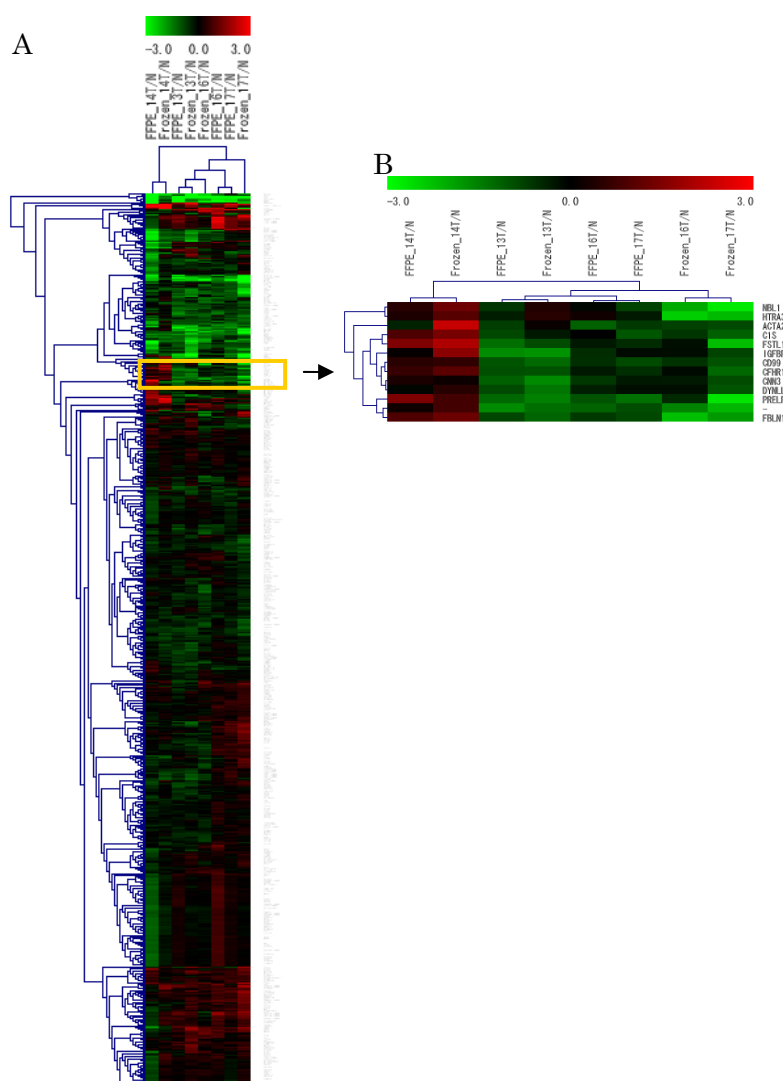


図 5-8 遺伝子発現データのクラスター解析

遺伝子ごとに $\log_2(\text{Tumor}/\text{NAT})$ を計算し、クラスター解析に用いた。A: DNA チップ実験において、全ての検体でデータの得られた遺伝子を抽出しクラスター解析した結果。B: 検体番号 14 において発現向上のみられた遺伝子を抽出しクラスター解析した結果。

f. FFPE 試料から抽出した miRNA の解析

次に、凍結組織から抽出した miRNA と FFPE 試料から抽出した miRNA の比較を行った。miRNA の解析は、3D-Gene miRNA oligo chip を用いた。ビーズで攪拌する技術を用いた高感度 DNA チップであり、感度性能及び精度について Sato *et al.* (2009) が評価し優れていることを報告している。凍結組織、および FFPE 試料から抽出した total RNA を標識し、DNA チップで検出した結果を図 5-5 に示す。FFPE 試料から抽出した RNA の miRNA 解析結果は、がん部位と正常部位で発現変動のみられるものがある(図 5-9A)。凍結組織から抽出した RNA の miRNA 解析結果も同様に、発現変動がみられた(図 5-9B)。FFPE 試料、及び凍結組織の検出シグナル値から変動比 $\text{Log}_2(\text{Tumor}/\text{NAT})$ を算出し、グラフにしたものが図 5-9C である。相関係数は、0.65 とやや低い値だが、おおむね相関のある結果が得られている。なお、遠隔転移した検体番号 14 は、miRNA データの質が低かったため以降の解析からは除外した。

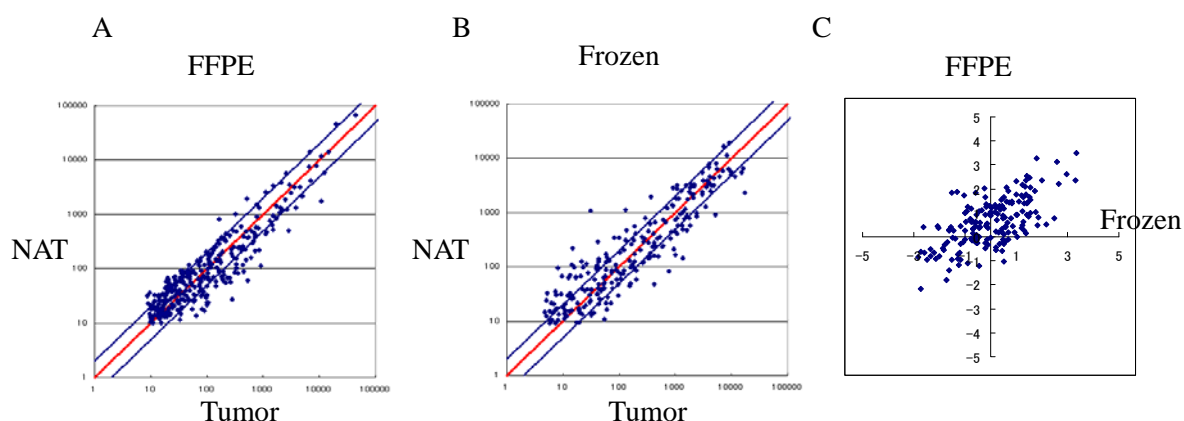


図 5-9 FFPE 試料から抽出した RNA から得た miRNA 発現解析結果

凍結組織及び FFPE 試料から抽出した RNA から得た miRNA の変動比 $\text{Log}_2(\text{Tumor}/\text{NAT})$ をクラスター解析した(図 5-10)。サンプル間のクラスター解析を行ったところ、凍結組織と FFPE 試料とでクラスターが分かれた(図 5-10A)。これは、図 5-9 で示されたように、凍結組織と FFPE 試料とで変動比の相関性がやや低いことに原因がある。FFPE 試料と凍結組織で共通して変動している miRNA を黄枠で囲っている。共通して上昇している miRNA 群を図 5-10B、共通して減少している miRNA を図 5-10C に示した。Guan *et al.* (2012) が報告されている miRNA のうち、FFPE 試料と凍結組織で共通して検出できたのは、miR-21 のみであり、報告どおりがん部位において発現量が上昇していた(表 5-2)。miR-31, miR-182 は FFPE 試料では検出されていない。miR-210 は、FFPE 試料および凍結組織ともに大きく変動していない。Guan *et al.* (2012) が、発現が減少すると報告した miR-126 と miR-145 は、大きく変動していない。

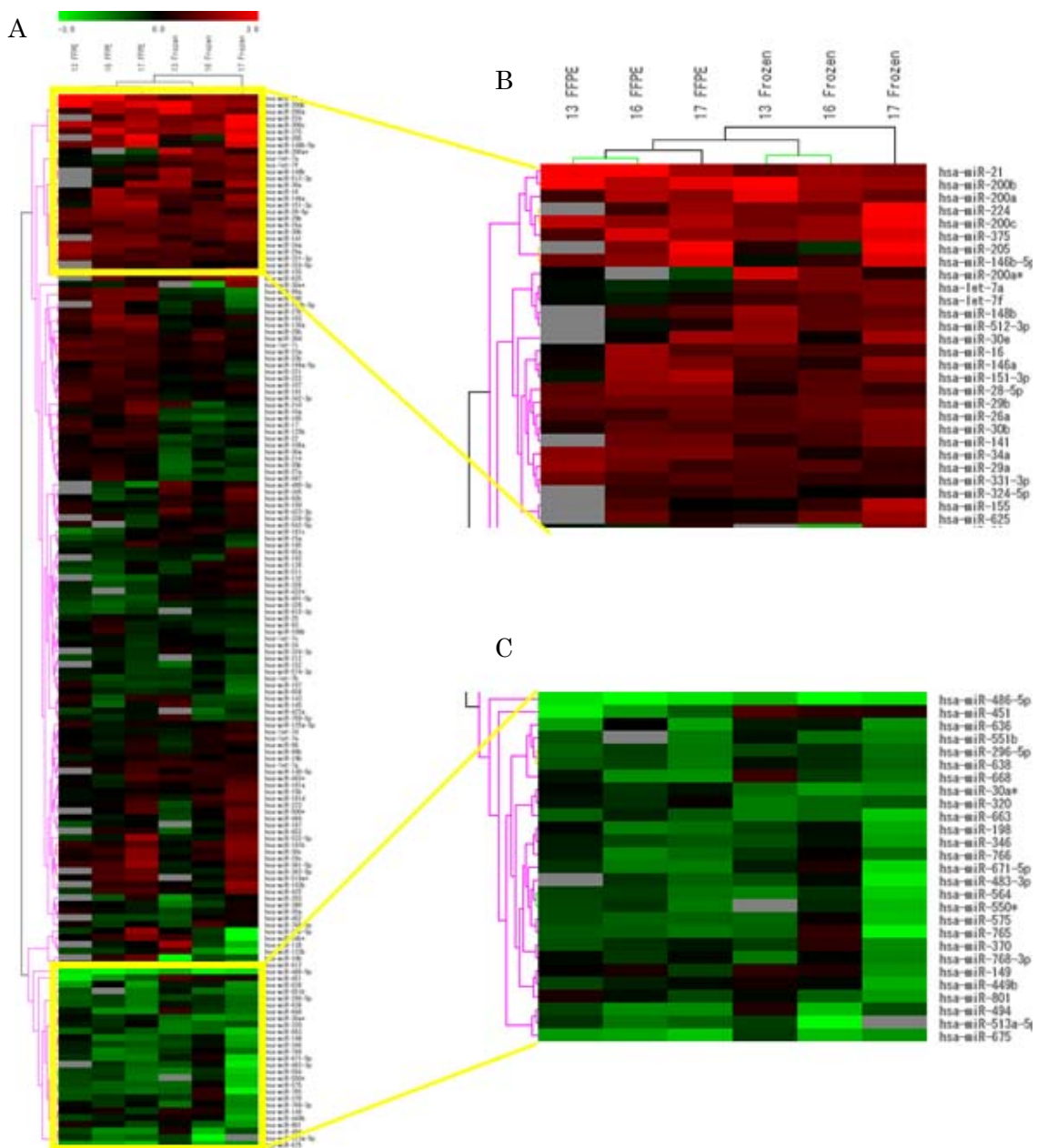


図 5-10 miRNA クラスター解析

A: 変動比 $\text{Log}_2(\text{Tumor}/\text{NAT})$ のクラスター解析、B: 全検体で、がん部位共通して上昇している miRNA、

C: 全検体で、がん部位共通して減少している miRNA

表 5-2 既知 miRNA マーカー(Guan *et al.*2012)の変動比 $\text{Log}_2(\text{Tumor/NAT})$

	FFPE			Frozen		
	No13	No16	No17	No13	No16	No17
hsa-miR-21	2.97	3.05	1.95	1.13	1.75	1.51
hsa-miR-31	ND	ND	ND	-0.23	-1.05	-0.63
hsa-miR-182	1.89	ND	ND	3.92	2.24	1.72
hsa-miR-210	0.46	0.34	1.17	0.77	-1.02	-0.23
hsa-miR-126	-0.61	-0.88	0.18	-0.64	0.41	0.24
hsa-miR-145	0.23	-1.18	-0.16	0.82	-0.72	-0.69

ND: not detected

5.4 考察

a. FFPE 試料からのバイオマーカー探索および利用の可能性

病理で用いられるホルマリン固定パラフィン包埋試料は、希な疾患の遺伝子情報の入手や、長期保存されているため術後の臨床情報が具備されているなど、臨床研究において有用な検体である。しかし、ホルマリン固定による核酸品質の劣化、長期保存による劣化により従来は解析に適さないとされてきた。

本研究では、従来は困難とされた FFPE 試料からの遺伝子発現解析が、RNA の抽出や増幅方法を工夫することで可能であることを示した。また、miRNA についても検出可能であることを示した。クロスハイブリとみられる影響はあるものの、肺がんで変動することが知られている miRNA である miR-21 の変動をとらえることができた。今後、標識技術の改良を加えることにより精度の高いデータを得ることができるようになると期待できる。

一方で、網羅的な解析分野において次世代シーケンサーの台頭がめざましい。FFPE 試料から抽出した RNA においても次世代シーケンサーで実施することが行われている(Shujun *et al.* 2010)。次世代シーケンサーであれば、RNA の分解の影響を受けることなく解析できるかもしれない。

DNA チップを検査・診断ツールとしての活用を考えた場合、FFPE 試料から抽出した mRNA を解析できたことは意義が大きい。乳がんの予後予測診断ツールとして先行している(Cobleigh *et al.* 2006)では FFPE 試料から抽出した mRNA を、定量 PCR で分析し、診断に用いている。同様の技術が DNA チップでもできるようになる可能性が高まったといえる。また、miRNA をバイオマーカーとして利用する動きがあり、マーカーの数が数十であれば DNA チップの強みを生かせる可能性がある。

b. mRNA 発現解析の課題

FFPE 試料から抽出した RNA を DNA チップで解析するにあたり、RNA 増幅時に増幅倍率を低く抑えることで増幅バイアスを低減させた。しかし、図 5-4C で示したように、FFPE 試料から得た発現変動比と、凍結組織から得た発現変動比は相関性が劣る。FFPE 試料から抽出した RNA から得られたシグナル強度データのうち、低いものを除去することで、発現変動比の相関性が改善することを見いだした。このことは、発現強度の高い遺伝子については、FFPE 試料から抽出した RNA で解析することができ、バイオマーカー探索可能であるといえる。一方、発現強度の低い遺伝子については解析対象から除外する必要があるため、発現量の低い遺伝子(例えば膜タンパク)などは、探索対象とできない。しかし、プローブの設計位置を mRNA の下流側に再設計することで、一部は改善する可能性がある。

低発現遺伝子において、FFPE 試料と凍結組織で相関性が低い原因を次のように考えた。DNA チップ実験では、抽出した RNA を、mRNA の末端に付加されている poly A tail を利用して、RNA 増幅反応を行う。そのため、完全長の mRNA が多く含まれている場合は反応性がよく、断片化された mRNA からは短い RNA が増幅されてくる。このため、分解度の異なるサンプル間を比較するとデータがばらついてしまう。また、発現量の多い遺伝子 A は(すなわち抽出した RNA 溶液中の分子数が多いことを意味するが)、インタクトな RNA であれば、RNA 溶液中に含まれる遺伝子 A の mRNA の大多数は完全長であると考えることができる。FFPE 試料から抽出した RNA 溶液中に含まれる遺伝子 A の mRNA は、不規則に断片化されているが、mRNA 分子の数が多いため、種々の分子長の RNA 分子が含まれており、場合によっては完全長も含まれているかもしれない。

一方、発現量の低い遺伝子 B は(すなわち抽出した RNA 溶液中の分子数が少ないことを意味するが)、インタクトな RNA であれば、RNA 溶液中に含まれる遺伝子 B の mRNA の大半は完全長であると考えることができる。しかし、FFPE 試料から抽出した RNA 溶液中に含まれる遺伝子 B の mRNA は、不規則に断片化されている。mRNA の分子数が少ないため、完全長の mRNA の分子数はさらに少ないと予想される。

上記のように考えると問題解決は難しい。しかし、増幅によって問題が生じるのであれば、DNA チップ実験の前提である RNA 増幅を行わないことで解消できるかもしれない。例えば、凍結組織あるいは FFPE 試料から抽出した RNA を、適切な長さまで断片化したうえで、直接標識しハイブリダイゼーションするような方法をとることができるかもしれない。RNA の分解度による影響を最小限にできるはずである。ただし、この場合、ハイブリダイゼーションに用いる RNA が少ないため、検出感度を高める必要がある。

c. miRNA 解析の課題

FFPE 試料中の miRNA は分解されにくく安定であるといわれているが(Xi *et al.* 2007)、

一方で図 5-5 に示したように凍結組織と FFPE 試料から抽出した RNA で、miRNA の解析結果の相関性はやや低く、さらにクラスター解析では、凍結組織と FFPE 試料で別のクラスターに分けられた(図 5-6)。

相関性が低い原因は、miRNA 以外の RNA 分子であると推測される。miRNA 自体は短い RNA 分子であるため、分解や修飾の影響を受けにくい。DNA チップ実験に用いるための miRNA 標識は、RNA の末端に T4 RNA ligase によって、1 塩基の蛍光標識済み核酸を結合させる方法で行われている。すなわち、反応溶液中にある 3'末端に OH 基をもつ RNA の全てが基質となる。FFPE 試料から抽出した RNA には、リボゾーム RNA や mRNA の分解物も多く含まれており、これらも同時に標識されることになる。さらにクロスハイブリダイゼーションすることでデータ品質を低下させていると考えられる。検証実験を行っており、インタクトな total RNA を加水分解したサンプルを用意し、miRNA を検出したところ、データ品質が低下した(データは示さず)。分解した RNA が含まれている溶液中の中から、miRNA だけを標識する技術が必要となる。例えば、DNA チップ上のプローブ DNA とハイブリダイゼーションした後に標識する方法や、miRNA の特徴に着目する方法が考えられる。前者は同様の技術が報告されており、DNA チップ基板上のプローブにハイブリダイゼーションさせた後、klenow fragment でビオチン標識した dATP を結合させ標識する方法である(Nelson *et al.* 2004)。後者は、例えば次のような方法である。miRNA は、5'末端にリン酸基を持っており、他の RNA 分子および分解した RNA の 5'末端にはリン酸基がない。本研究で用いた標識方法は、3'末端側の標識方法を用いているが、5'末端側への標識方法にすることで、分解 RNA を標識せずに済むと考える。

第6章 まとめと今後の展望

本研究では、DNAチップの検出感度、及び検出精度を向上させることを目的とした。ビーズでハイブリダイゼーション溶液を攪拌する柱状構造 DNA チップを採用し、基板表面への反応性を高めた修飾オリゴ DNA を用いた。これらの技術を組み合わせ、高感度かつ高精度に検出できる DNA チップを開発した。感度性能を評価したところ、従来の DNA チップに比べ、3 倍程度増加していることが分かった(図 2-5)。また、DNA チップ上にアプライし検出可能な分子数は 0.6amol であることが分かった。さらに、新規アミノ化オリゴを用いることで 0.3amol まで検出できることが示唆された。

高感度 DNA チップの性能を、出芽酵母を題材に評価した。特異性が高く、反応性のよいプローブ配列を設計し、高感度酵母チップを開発した。高感度性能を評価するため、GeneChip との比較実験を行った。過剰発現させたキメラ転写因子によって誘導される遺伝子の検出を行い、GeneChip に比べ、多くの変動遺伝子を検出でき、高感度であることが確認できた。また、検出された変動遺伝子は Gene ontology 解析、及び YEASTRACT による転写因子との関連性の解析により、妥当性の高い遺伝子群であることが分かった。また、機能未知の転写因子 Sef1 が TCA サイクルに関連している可能性を見いだせた。本方法は、機能未知の転写因子の働きを調べる方法として利用が期待される。

Genome Reorganization Technology(GReO)法を開発し、作出した株は、培養中にミニ染色体が脱落し、様々なゲノム構成を持つ株を得ることができた。さらに、予想していなかったミトコンドリアゲノムの増幅、リボソーム RNA 遺伝子領域の増幅も生じていた。GReO 法が、ミニ染色体の脱落だけでなく、その他のゲノム領域に対しても影響を与えることが示唆された。工業的に有用な株の作出のみならず、ゲノム構成の研究にも有用なツールであるといえる。

以上のように、本研究の目的とした高感度かつ高精度な DNA チップを開発することができ、さらに酵母の基礎研究、工業利用に有用なアプリケーションを開発することができた。

本研究のもう一つの目的は、競合技術や従来の DNA チップ技術との差別化できる技術を開発することである。これまで解析困難であったホルマリン固定パラフィン包埋試料中の RNA を解析可能とする検討を行い、データの精度に課題は残されているが、解析できることが分かった。肺腺がんが発現が増加することが知られている miR-21 を検出することができたが、その他の既知マーカーは検出されなかった。今後、検出技術を改善することで、精度の高いデータを得るようになると思われる。

遺伝子発現解析においては、FFPE 試料から抽出した mRNA を定量 PCR で解析する OncoTypeDX が市販されている。本研究で、FFPE 試料から抽出した RNA を DNA チップで解析できることが示せた。今後、DNA チップ技術は OncoTypeDX と競合できる可能性が出てきたといえる。

私は、網羅的にゲノム情報を解析できる次世代シーケンサーの解析コストが低下、感度及び精度が向上した場合、網羅的解析 DNA チップと置き換わる可能性があると考え。本研究では、酵母の mRNA 及びゲノム DNA の網羅的な解析、FFPE 試料から抽出した mRNA 及び miRNA の網羅的解析技術を開発し実用性を検証した。これらの解析は、次世代シーケンサーでも解析可能な分野である。仮に、次世代シーケンサーが発展を続け、解析コストの低下、操作性の向上が実現したときには、DNA チップは網羅的解析ツールではないかもしれない。その場合、DNA チップは図 1-2 で示した、フォーカストアレイでの活用を見いだすことになる。フォーカストアレイは、基礎研究用途ではなく検査、診断などの医療分野、あるいは産業分野での利用となると考える。用途に合わせ、DNA チップの特長を生かしたアプリケーションの開発を進めることになる。

DNA チップの特長は、検出原理が単純な点である。複雑な装置を使わず、試料から抽出した核酸を、DNA チップ上のプローブ DNA にハイブリダイゼーションするのみで、単純に検出することができる。感度、精度では PCR、次世代シーケンサーに劣る可能性はあるが、コスト面、簡便さでは優位性があると考えている。

本研究を通して、高感度 DNA チップの基本技術を開発できた。今後は PCR や次世代シーケンサーと競合できるプロトコール開発が急務と考える。

謝辞

本研究をまとめるにあたり細部までご指導いただき、さらに本研究の発表の機会を与えていただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞機能システム講座・小笠原直毅教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、また、本論文の作成にあたり、ご指導、ご助言を賜りました大阪大学工学部大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻ゲノム機能工学領域・原島俊教授、杉山峰崇准教授、大阪大学大学院工学研究科 酵母リソース工学寄附講座・金子嘉信教授、キリンホールディングス株式会社生嶋茂仁博士に深く感謝いたします

また、本研究を実施する機会を与えていただき、さらにご指導、ご助言を賜りました株式会社DNAチップ研究所・松原謙一名誉所長、的場亮代表取締役社長に深く感謝いたします。

本学位論文審査の副査としてご助言をいただくとともに本論文の細部にわたりご指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科真木壽治教授、森浩禎教授、塩崎一裕教授に感謝いたします。

本論文を完成させるにあたり、終始ご支援賜りました東レ株式会社新事業開発部門長・専任理事 佐野高男氏、同先端融合研究所所長・専任理事 米原徹氏、同新事業開発部門信正均氏に深く感謝いたします。また、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことができなかつた多くの方々に心より感謝申し上げます。

参考文献

- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW. and Lipman, DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410.
- Alwine, JC., Kemp, DJ., Parker, BA., Reiser, J., Renart, J., Stark, GR. and Wahl, GM. (1979) Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol*, 68, 220-242.
- Benguria, A., Hernandez, P., Krimer, D.B. and Schwartzman, J.B. (2003) Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 31, 893–898.
- Bentley, DR., Balasubramanian, S., Swerdlow, HP., Smith, GP., Milton, J., Brown, CG., Hall, KP., Evers, DJ., Barnes, CL., Bignell, HR., *et al.* (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456, 53–59.
- Boyle, EI., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, JM. and Sherlock, G. (2004) GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics*, 20(18), 3710-3715.
- Burnette, WN. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112(2), 195-203.
- Cobleigh, MA., Tabesh, B., Bitterman, P., Baker, J., Cronin, M., Liu, ML., Borchik, R., Mosquera, JM., Walker, MG. and Shak, S. (2005) Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. *Clin Cancer Res*, 11, 8623-8631.
- Dimitrov, LN., Brem, RB., Kruglyak, L. and Gottschling, DE. (2009) Polymorphisms in multiple genes contribute to the spontaneous mitochondrial genome instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C strains. *Genetics*, 183, 365-383.

Drmanac, R., Sparks, AB., Callow, MJ., Halpern, AL., Burns, NL., Kermani, BG., Carnevali, P., Nazarenko, I., Nilsen, GB., Yeung G, *et al.* (2010) Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science*, 327, 78–81.

Fodor, SP., Read, JL., Pirrung, MC., Stryer, L., Lu, AT. and Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251, 767-773.

Glas, AM., Floore, A., Delahaye, LJ., Witteveen, AT., Pover, RC., Bakx, N., Lahti-Domenici, JS., Bruinsma, TJ., Warmoes, MO., Bernards, R., Wessels, LF. and Van't Veer, LJ. (2006) Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*, 7, 278.

Gottlieb, S. and Esposito, RE. (1989) A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*, 56, 771–776.

Guan, P., Yin, Z., Li, X., Wu, W. and Zhou, B. (2012) Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 54.

Hill, A. and Bloom, K. (1987) Genetic manipulation of centromere function. *Mol Cell Biol*, 7(7), 2397-2405.

Hoffman, CS. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267-272.

Hori, A., Yoshida, M. and Shibata, T. (2009) Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. *Nucleic Acids Res*, 37(3), 749-761.

Holman, TJ., Wilson, MH., Kenobi, K., Dryden, IL., Hodgman, TC., Wood, AT. and Holdsworth, MJ. (2010) Statistical evaluation of transcriptomic data generated using the Affymetrix one-cycle, two-cycle and IVT-Express RNA labelling protocols with the Arabidopsis ATH1 microarray. *Plant Methods*, 15, 6-9.

Hsu, IH., Chen, WH., Wu, TK. and Sun, YC. (2011) Gold nanoparticle-based inductively coupled plasma mass spectrometry amplification and magnetic separation for the sensitive detection of a virus-specific RNA sequence. *J Chromatogr A*, 8, 1795-1801.

Hughes, TR., Mao, M., Jones, AR., Burchard, J., Marton, MJ., Shannon, KW., Lefkowitz, SM., Ziman, M., Schelter, JM., Meyer, MR., Kobayashi, S., Davis, C., Dai, H., He, YD., Stephanians, SB., Cavet, G., Walker, WL., West, A., Coffey, E., Shoemaker, DD., Stoughton, R., Blanchard, AP., Friend, SH. and Linsley, PS. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*, 19(4), 342-347.

Kobayashi, T., Horiuchi, T., Tongaonkar, P., Vu, L. and Nomura, M. (2004) SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell*, 117, 441-453.

Kojima, N., Sugino, M., Mikami, A., Nonaka, K., Fujinawa, Y., Ueda, Y., Sato, K., Ohtsuka, E., Matsubara, K. and Komatsu, Y. (2005) High throughput purification of amino-modified oligonucleotides and its application to novel detection system of gene expression. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 49, 181-182.

Komatsu Y, Kojima N , Sugino M, Mikami A, Nonaka K, Fujinawa Y, Sugimoto T, Sato K, Matsubara K, Ohtsuka E. (2008) Novel amino linkers enabling efficient labeling and convenient purification of amino-modified oligonucleotides. *Bioorg Med Chem*, 16, 941-949.

Lin, PY., Yu, SL., Yang, PC. (2010) MicroRNA in lung cancer. *Br J Cancer*, 103(8), 1144-1148.

Luo, S., Khrebtukova, I., Perou, C. and Schroth, GP. (2010) Complete RNA-seq analysis of cancer transcriptomes from FFPE samples. *Genome Biol*, 11(Suppl 1), P35.

MAQC Consortium, Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, Luo Y, Sun YA, Willey JC, Setterquist, RA., Fischer, GM., Tong, W., Dragan, YP., Dix, DJ., Frueh, FW., Goodsaid, FM., Herman, D., Jensen, RV., Johnson, CD., Lobenhofer, EK., Puri, RK., Schrf, U., Thierry-Mieg, J., Wang, C., Wilson, M., Wolber, PK., Zhang, L., Amur, S., Bao, W.,

Barbacioru, CC., Lucas, AB., Bertholet, V., Boysen, C., Bromley, B., Brown, D., Brunner, A., Canales, R., Cao, XM., Cebula, TA., Chen, JJ., Cheng, J., Chu, TM., Chudin, E., Corson, J., Corton, JC., Croner, LJ., Davies, C., Davison, TS., Delenstarr, G., Deng, X., Dorris, D., Eklund, AC., Fan, XH., Fang, H., Fulmer-Smentek, S., Fuscoe, JC., Gallagher, K., Ge, W., Guo, L., Guo, X., Hager, J., Haje, PK., Han, J., Han, T., Harbottle, HC., Harris, SC., Hatchwell, E., Hauser, CA., Hester, S., Hong, H., Hurban, P., Jackson, SA., Ji, H., Knight, CR., Kuo, WP., LeClerc, JE., Levy, S., Li, QZ., Liu, C., Liu, Y., Lombardi, MJ., Ma, Y., Magnuson, SR., Maqsodi, B., McDaniel, T., Mei, N., Myklebost, O., Ning, B., Novoradovskaya, N., Orr, MS., Osborn, TW., Papallo, A., Patterson, TA., Perkins, RG., Peters, EH., Peterson, R., Philips, KL., Pine, PS., Pusztai, L., Qian, F., Ren, H., Rosen, M., Rosenzweig, BA., Samaha, RR., Schena, M., Schroth, GP., Shchegrova, S., Smith, DD., Staedtler, F., Su, Z., Sun, H., Szallasi, Z., Tezak, Z., Thierry-Mieg, D., Thompson, KL., Tikhonova, I., Turpaz, Y., Vallanat, B., Van, C., Walker, SJ., Wang, SJ., Wang, Y., Wolfinger, R., Wong, A., Wu, J., Xiao, C., Xie, Q., Xu, J., Yang, W., Zhang, L., Zhong, S., Zong, Y., Slikker and W Jr. (2006) The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol*, 24(9), 1151-1161.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, WE., Attiya, S., Bader, JS., Bemben, LA., Berka, J., Braverman, MS., Chen, Y-J., Chen, Z., *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376–380.

Maskos, U. and Southern, EM. (1993) A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support. *Nucleic Acids Res*, 21(20), 4663-4669.

Maxam, AM. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(2), 560-564.

McKernan, KJ., Peckham, HE., Costa, GL., McLaughlin, SF., Fu, Y., Tsung, EF., Clouser, CR., Duncan, C., Ichikawa, JK., Lee, CC., *et al.* (2009) Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Res*, 19, 1527–1541.

Mullis, KB. and Faloona, FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350.

Morrison, T., Hurley, J., Garcia, J., Yoder, K., Katz, A., Roberts, D., Cho, J., Kanigan, T., Ilyin, SE., Horowitz, D., Dixon, JM. and Brenan, CJ. (2006) Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 34(18), e123.

Nagino, K., Nomura, O., Takii, Y., Myomoto, A., Ichikawa, M., Nakamura, F., Higasa, M., Akiyama, H., Nobumasa, H., Shiojima, S. and Tsujimoto, G. (2006) Ultrasensitive DNA chip: gene expression profile analysis without RNA amplification. *J Biochem*, 139(4), 697-703.

Nelson, PT., Baldwin, DA., Scearce, LM., Oberholtzer, JC., Tobias, JW. and Mourelatos, Z. (2004) Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods*, 1(2), 155-61.

Onda, M., Ota, K., Chiba, T., Sakaki, Y. and Ito, T. (2004) Analysis of gene network regulating yeast multidrug resistance by artificial activation of transcription factors: involvement of Pdr3 in salt tolerance. *Gene*, 332, 51-59.

Park, AH., Sugiyama, M., Harashima, S. and Kim, YH. Creation of an ethanol-tolerant yeast strain by genome reconstruction based on chromosome splitting technology. *J Microbiol Biotechnol*, 22(2), 184-189.

Petes, T.D. (1979) Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 76, 410-414.

Politz, JC., Browne, ES., Wolf, DE. And Pederson, T. (1998) Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6043 -6048.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) "Molecular cloning" a laboratory manual, Cold Spring Harbar Laboratory Press, Cold spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.

Sato, F., Tsuchiya, S., Terasawa, K. and Tsujimoto, G. (2009) Intra-Platform Repeatability and Inter-Platform Comparability of MicroRNA Microarray Technology.

PLoS ONE, 4(5), e5540.

Schena, M., Shalon, D., Davis, RW. and Brown, PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-470.

Shendure, J. and Ji, H. (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26(10), 1135-1145.

Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, SG., Cyertm M., Hughes, TR., Boone, C., Andrews, B. (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell*, 21(3), 319-330.

Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98(3), 503-517.

Sugiyama, M., Ikushima, S., Nakazawa, T., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2005) PCRmediated repeated chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechniques*, 38, 909–914.

Sugiyama, M., Nakazawa, T., Murakami, K., Sumiya, T., Nakamura, A., Kaneko, Y., Nishizawa, M. and Harashima, S. (2008) PCR-mediated one-step deletion of targeted chromosomal regions in haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80(3), 545-553.

Sugiyama, M., Yamagishi, K., Kim, YH., Kaneko, Y., Nishizawa, M. and Harashima, S. (2009) Advances in molecular methods to alter chromosomes and genome in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(6), 1045-1052.

Surosky, RT., Newlon, CS., Tye, BK. (1986) The mitotic stability of deletion derivatives of chromosome III in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 414-418.

Teixeira, MC., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, AR., Mira, NP., Alenquer, M., Freitas, AT., Oliveira, AL. and Sá-Correia, I. (2006) The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 34, 446-451.

Thompson, JD., Higgins, DG. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22), 4673-4680.

Tong, W., Lucas, AB., Shippy, R., Fan, X., Fang, H., Hong, H., Orr, MS., Chu, TM., Guo, X., Collins, PJ., Sun, YA., Wang, SJ., Bao, W., Wolfinger, RD., Shchegrova, S., Guo, L. and Warrington, JA, SL. Evaluation of external RNA controls for the assessment of microarray performance. *Nat Biotechnol*, 24(9), 1132-1139.

Wiederhold, E., Veenhoff, LM., Poolman, B. and Slotboom, DJ. (2010) Proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* Organelles. *Mol Cell Proteomics*, 9(3), 431-445.

Winston, F., Dollard, C. and Ricupero-Hovasse, SL. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, 11, 53-55.

Xi, Y., Nakajima, G., Gavin, E., Morris, CG., Kudo, K., Hayashi, K. and Ju, J. (2007) Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*, 13(10), 1668-1674.

Yamada, T. and Morishita, S. (2004) Computing Highly Specific and Noise Tolerant Oligomers Efficiently. *J Bioinfo Comput Biol*, 2(1), 21-46.

Yamada, T., Soma, H. and Morishita, S. (2006) PrimerStation: a highly specific multiplex genomic PCR primer design server for the human genome. *Nucleic Acids Res*, 34, 665-669.

田代英夫 (2010) バイオチップ実用化ハンドブック, 8, 20-28

付表 1 pdr1 による誘導遺伝子の GO 解析

GO_term	Frequency	Genome Frequency	Probability	Gene(s)
response to drug	4 out of 55 genes, 7.2%	36 out of 7292 annotated genes, 0.4%	0.00016	YOR1 PDR10 PDR16 SNQ2
aldehyde metabolism	3 out of 55 genes, 5.4%	20 out of 7292 annotated genes, 0.2%	0.00048	YPL088W CIT2 AAD10
response to water	2 out of 55 genes, 3.6%	8 out of 7292 annotated genes, 0.1%	0.00171	YJL144W HSP12
response to water deprivation	2 out of 55 genes, 3.6%	8 out of 7292 annotated genes, 0.1%	0.00171	YJL144W HSP12
response to desiccation	2 out of 55 genes, 3.6%	8 out of 7292 annotated genes, 0.1%	0.00171	YJL144W HSP12
response to abiotic stimulus	8 out of 55 genes, 14.5%	314 out of 7292 annotated genes, 4.3%	0.00235	YOR1 PDR10 PDR16 YJL144W SNQ2 RPN4 HSP82 HSP12
response to stimulus	11 out of 55 genes, 20%	593 out of 7292 annotated genes, 8.1%	0.00428	GRE2 YOR1 PDR10 HSP30 PDR16 YJL144W SNQ2 HIM1 RPN4 HSP82 HSP12
carboxylic acid transport	3 out of 55 genes, 5.4%	50 out of 7292 annotated genes, 0.6%	0.00648	BTN2 ADY2 SFC1
organic acid transport	3 out of 55 genes, 5.4%	51 out of 7292 annotated genes, 0.6%	0.00684	BTN2 ADY2 SFC1
response to chemical stimulus	6 out of 55 genes, 10.9%	233 out of 7292 annotated genes, 3.1%	0.00808	YOR1 PDR10 PDR16 SNQ2 RPN4 HSP12
protein amino acid dephosphorylation	2 out of 55 genes, 3.6%	27 out of 7292 annotated genes, 0.3%	0.01787	RTS3 GIP2
glutamine family amino acid biosynthesis	2 out of 55 genes, 3.6%	27 out of 7292 annotated genes, 0.3%	0.01787	ARG5,6 CIT2
regulation of pH	2 out of 55 genes, 3.6%	28 out of 7292 annotated genes, 0.3%	0.01913	BTN2 PMA2
dephosphorylation	2 out of 55 genes, 3.6%	36 out of 7292 annotated genes, 0.4%	0.03044	RTS3 GIP2
glutamine family amino acid metabolism	2 out of 55 genes, 3.6%	43 out of 7292 annotated genes, 0.5%	0.04202	ARG5,6 CIT2

付表 3 put3 による誘導遺伝子の GO 解析

GO_term	Frequency	Genome Frequency	Probability	Gene(s)
proline catabolism	3 out of 44 genes, 6.8%	4 out of 7292 annotated genes, 0.0%	2.14E-06	PUT1 PUT4 PUT2
glutamine family amino acid metabolism	5 out of 44 genes, 11.3%	43 out of 7292 annotated genes, 0.5%	6.39E-06	PUT1 PUT4 PUT2 IDP2 ARG3
proline metabolism	3 out of 44 genes, 6.8%	7 out of 7292 annotated genes, 0.0%	1.13E-05	PUT1 PUT4 PUT2
glutamine family amino acid biosynthesis	4 out of 44 genes, 9.0%	27 out of 7292 annotated genes, 0.3%	2.26E-05	PUT1 PUT2 IDP2 ARG3
amino acid biosynthesis	6 out of 44 genes, 13.6%	103 out of 7292 annotated genes, 1.4%	3.53E-05	PUT1 ALD3 PUT2 IDP2 AGX1 ARG3
amine catabolism	4 out of 44 genes, 9.0%	31 out of 7292 annotated genes, 0.4%	3.87E-05	PUT1 PUT4 ALD3 PUT2
nitrogen compound catabolism	4 out of 44 genes, 9.0%	31 out of 7292 annotated genes, 0.4%	3.87E-05	PUT1 PUT4 ALD3 PUT2
nitrogen compound biosynthesis	6 out of 44 genes, 13.6%	112 out of 7292 annotated genes, 1.5%	5.61E-05	PUT1 ALD3 PUT2 IDP2 AGX1 ARG3
amine biosynthesis	6 out of 44 genes, 13.6%	112 out of 7292 annotated genes, 1.5%	5.61E-05	PUT1 ALD3 PUT2 IDP2 AGX1 ARG3
<u>proline catabolism to glutamate</u>	2 out of 44 genes, 4.5%	2 out of 7292 annotated genes, 0.0%	7.06E-05	PUT1 PUT2
glutamine family amino acid catabolism	3 out of 44 genes, 6.8%	13 out of 7292 annotated genes, 0.1%	7.10E-05	PUT1 PUT4 PUT2
glutamate biosynthesis	3 out of 44 genes, 6.8%	13 out of 7292 annotated genes, 0.1%	7.10E-05	PUT1 PUT2 IDP2
organic acid metabolism	9 out of 44 genes, 20.4%	305 out of 7292 annotated genes, 4.1%	7.32E-05	PUT1 PUT4 ALD3 PUT2 IDP2 FUM1 FBP1 AGX1 ARG3
carboxylic acid metabolism	9 out of 44 genes, 20.4%	305 out of 7292 annotated genes, 4.1%	7.32E-05	PUT1 PUT4 ALD3 PUT2 IDP2 FUM1 FBP1 AGX1 ARG3
nitrogen compound metabolism	8 out of 44 genes, 18.1%	241 out of 7292 annotated genes, 3.3%	8.69E-05	PUT1 PUT4 ALD3 PUT2 IDP2 ATO2 AGX1 ARG3
amino acid metabolism	7 out of 44 genes, 15.9%	184 out of 7292 annotated genes, 2.5%	0.0001	PUT1 PUT4 ALD3 PUT2 IDP2 AGX1 ARG3
glutamate metabolism	3 out of 44 genes, 6.8%	16 out of 7292 annotated genes, 0.2%	0.00013	PUT1 PUT2 IDP2

付表 3 sef1 による誘導遺伝子の GO 解析

GO term	Frequency	Genome Frequency	Probability	Gene(s)
tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism	5 out of 31 genes, 16.1%	19 out of 7292 annotated genes, 0.2%	1.92E-08	FUM1 IDP2 IDH2 ACO1 AAT2
main pathways of carbohydrate metabolism	6 out of 31 genes, 19.3%	73 out of 7292 annotated genes, 1.0%	5.97E-07	FUM1 IDP2 IDH2 ACO1 AAT2 MLS1
glutamate metabolism	4 out of 31 genes, 12.9%	16 out of 7292 annotated genes, 0.2%	6.95E-07	IDP2 IDH2 ACO1 AAT2
<u>propionate metabolism</u>	3 out of 31 genes, 9.6%	5 out of 7292 annotated genes, 0.0%	1.42E-06	PDR12 PDH1 ACO1
carboxylic acid metabolism	9 out of 31 genes, 29.0%	305 out of 7292 annotated genes, 4.1%	3.40E-06	PDR12 PDH1 FUM1 IDP2 IDH2 ACO1 AAT2 MLS1 PEX11
organic acid metabolism	9 out of 31 genes, 29.0%	305 out of 7292 annotated genes, 4.1%	3.40E-06	PDR12 PDH1 FUM1 IDP2 IDH2 ACO1 AAT2 MLS1 PEX11
glutamate biosynthesis	3 out of 31 genes, 9.6%	13 out of 7292 annotated genes, 0.1%	2.45E-05	IDP2 IDH2 ACO1
glutamine family amino acid metabolism	4 out of 31 genes, 12.9%	43 out of 7292 annotated genes, 0.5%	3.34E-05	IDP2 IDH2 ACO1 AAT2
acetyl-CoA catabolism	3 out of 31 genes, 9.6%	15 out of 7292 annotated genes, 0.2%	3.74E-05	FUM1 IDH2 ACO1
tricarboxylic acid cycle	3 out of 31 genes, 9.6%	15 out of 7292 annotated genes, 0.2%	3.74E-05	FUM1 IDH2 ACO1
generation of precursor metabolites and energy	7 out of 31 genes, 22.5%	233 out of 7292 annotated genes, 3.1%	4.54E-05	FUM1 IDP2 IDH2 ACO1 AAT2 MLS1 TAZ1
coenzyme catabolism	3 out of 31 genes, 9.6%	17 out of 7292 annotated genes, 0.2%	5.42E-05	FUM1 IDH2 ACO1
cofactor catabolism	3 out of 31 genes, 9.6%	18 out of 7292 annotated genes, 0.2%	6.41E-05	FUM1 IDH2 ACO1
acetyl-CoA metabolism	3 out of 31 genes, 9.6%	20 out of 7292 annotated genes, 0.2%	8.75E-05	FUM1 IDH2 ACO1
energy generation by oxidation of organic compounds	6 out of 31 genes, 19.3%	195 out of 7292 annotated genes, 2.6%	0.00015	FUM1 IDP2 IDH2 ACO1 AAT2 MLS1
cellular carbohydrate metabolism	6 out of 31 genes, 19.3%	207 out of 7292 annotated genes, 2.8%	0.0002	FUM1 IDP2 IDH2 ACO1 AAT2 MLS1

付表 4 lys14 による誘導遺伝子の GO 解析

GO term	Frequency	Genome Frequency	Probability	Gene(s)
lysine metabolism	7 out of 146 genes, 4.7%	9 out of 7292 annotated genes, 0.1%	9.10E-10	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 LYS4
lysine biosynthesis	7 out of 146 genes, 4.7%	9 out of 7292 annotated genes, 0.1%	9.10E-10	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 LYS4
aspartate family amino acid biosynthesis	8 out of 146 genes, 5.4%	19 out of 7292 annotated genes, 0.2%	6.50E-09	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4
lysine biosynthesis via amino adipic acid	6 out of 146 genes, 4.1%	8 out of 7292 annotated genes, 0.1%	1.85E-08	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS21 LYS4
amino acid biosynthesis	12 out of 146 genes, 8.2%	103 out of 7292 annotated genes, 1.4%	1.35E-06	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 ALD2 SER33 PRS5
amine biosynthesis	12 out of 146 genes, 8.2%	112 out of 7292 annotated genes, 1.5%	3.16E-06	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 ALD2 SER33 PRS5
nitrogen compound biosynthesis	12 out of 146 genes, 8.2%	112 out of 7292 annotated genes, 1.5%	3.16E-06	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 ALD2 SER33 PRS5
carboxylic acid metabolism	20 out of 146 genes, 13.6%	305 out of 7292 annotated genes, 4.1%	3.38E-06	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 UBP14 ARO8 ALD2 SER33 BIO3 DLD3 PRS5 UGA2 BIO4 FBP1
organic acid metabolism	20 out of 146 genes, 13.6%	305 out of 7292 annotated genes, 4.1%	3.38E-06	LYS9 LYS2 PEX11 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 UBP14 ARO8 ALD2 SER33 BIO3 DLD3 PRS5 UGA2 BIO4 FBP1
aspartate family amino acid metabolism	8 out of 146 genes, 5.4%	45 out of 7292 annotated genes, 0.6%	4.16E-06	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4
amino acid metabolism	14 out of 146 genes, 9.5%	184 out of 7292 annotated genes, 2.5%	2.25E-05	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 ARO8 ALD2 SER33 PRS5 UGA2
amine metabolism	15 out of 146 genes, 10.2%	223 out of 7292 annotated genes, 3.0%	4.64E-05	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 ARO8 ALD2 SER33 PRS5 DAL2 UGA2
amino acid and derivative metabolism	14 out of 146 genes, 9.5%	200 out of 7292 annotated genes, 2.7%	5.52E-05	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 ARO8 ALD2 SER33 PRS5 UGA2
nitrogen compound metabolism	15 out of 146 genes, 10.2%	241 out of 7292 annotated genes, 3.3%	0.0001	LYS9 LYS2 LYS1 LYS20 LYS12 LYS21 MET1 LYS4 CIT2 ARO8 ALD2 SER33 PRS5 DAL2 UGA2
hexose transport	4 out of 146 genes, 2.7%	19 out of 7292 annotated genes, 0.2%	0.00062	HXT4 HXT1 HXT10 HXT8

付表 5 oaf1 による誘導遺伝子の GO 解析

GO_term	Frequency	Genome Frequency	Probability	Gene(s)
fatty acid oxidation	7 out of 271 genes, 2.5%	11 out of 7287 annotated genes, 0.1%	2.48E-07	FOX2 ECI1 POX1 MDH3 TES1 POT1 PEX11
fatty acid metabolism	11 out of 271 genes, 4.0%	46 out of 7287 annotated genes, 0.6%	1.67E-06	FOX2 ELO1 SCS7 ECI1 POX1 MDH3 TES1 POT1 EHT1 PEX11 SPS19
<u>fatty acid beta-oxidation</u>	5 out of 271 genes, 1.8%	9 out of 7287 annotated genes, 0.1%	2.56E-05	FOX2 ECI1 POX1 MDH3 POT1
lipid metabolism	23 out of 271 genes, 8.4%	233 out of 7287 annotated genes, 3.1%	2.60E-05	FOX2 RSB1 SFK1 YPC1 ELO1 FAA2 ERG1 SCS7 ECI1 POX1 ERG3 MDH3 TES1 IZH1 POT1 HMG1 EHT1 PEX11 ARE2 LCB1 SPS19 SWH1 PLB1
vitamin metabolism	12 out of 271 genes, 4.4%	78 out of 7287 annotated genes, 1.0%	4.52E-05	SNZ3 MDH3 IAH1 ZWF1 SNZ3 CAT2 GND2 THI2 BNA2 YOR356W RIB4
water-soluble vitamin metabolism	12 out of 271 genes, 4.4%	78 out of 7287 annotated genes, 1.0%	4.52E-05	SNZ3 MDH3 IAH1 ZWF1 SNZ3 CAT2 GND2 THI2 BNA2 YOR356W RIB4
carboxylic acid metabolism	26 out of 271 genes, 9.5%	305 out of 7287 annotated genes, 4.1%	8.75E-05	FBP1 FOX2 ICL1 IDP2 ELO1 AGX1 SCS7 ECI1 POX1 MDH3 TES1 POT1 MDH2 EHT1 PEX11 MET13 YAT1 CAT2 PDR12 PUT4 LYS1 PUT1 YIL168W SPS19 ALD3 PUT2
organic acid metabolism	26 out of 271 genes, 9.5%	305 out of 7287 annotated genes, 4.1%	8.75E-05	FBP1 FOX2 ICL1 IDP2 ELO1 AGX1 SCS7 ECI1 POX1 MDH3 TES1 POT1 MDH2 EHT1 PEX11 MET13 YAT1 CAT2 PDR12 PUT4 LYS1 PUT1 YIL168W SPS19 ALD3 PUT2
cellular lipid metabolism	21 out of 271 genes, 7.7%	220 out of 7287 annotated genes, 3.0%	9.36E-05	FOX2 RSB1 SFK1 YPC1 ELO1 ERG1 SCS7 ECI1 POX1 ERG3 MDH3 TES1 POT1 HMG1 EHT1 PEX11 ARE2 LCB1 SPS19 SWH1 PLB1

付表 6 Pip2 による誘導遺伝子の GO 解析

GO_term	Frequency	Genome Frequency	Probability	Gene(s)
organic acid metabolism	28 out of 277 genes, 10.1%	305 out of 7287 annotated genes, 4.1%	1.88E-05	POT1 FOX2 SPS19 POX1 MDH2 CAT2 MDH3 FBP1 LYS1 GLN1 TES1 YAT1 CIT2 MET13 MET2 CEM1 EEB1 CYS3 HIS7 AGX1 PYK2 CAR1 BJO3 MAE1 MET1 ILV6 SCS7 VHR1
carboxylic acid metabolism	28 out of 277 genes, 10.1%	305 out of 7287 annotated genes, 4.1%	1.88E-05	POT1 FOX2 SPS19 POX1 MDH2 CAT2 MDH3 FBP1 LYS1 GLN1 TES1 YAT1 CIT2 MET13 MET2 CEM1 EEB1 CYS3 HIS7 AGX1 PYK2 CAR1 BJO3 MAE1 MET1 ILV6 SCS7 VHR1
<u>fatty acid oxidation</u>	5 out of 277 genes, 1.8%	11 out of 7287 annotated genes, 0.1%	7.30E-05	POT1 FOX2 POX1 MDH3 TES1
<u>fatty acid metabolism</u>	9 out of 277 genes, 3.2%	46 out of 7287 annotated genes, 0.6%	8.12E-05	POT1 FOX2 SPS19 POX1 MDH3 TES1 CEM1 EEB1 SCS7
water-soluble vitamin metabolism	11 out of 277 genes, 3.9%	78 out of 7287 annotated genes, 1.0%	0.00023	CAT2 MDH3 ZWF1 SNO1 THI12 YAT1 BNA2 YOR356W BJO3 GND2 VHR1
vitamin metabolism	11 out of 277 genes, 3.9%	78 out of 7287 annotated genes, 1.0%	0.00023	CAT2 MDH3 ZWF1 SNO1 THI12 YAT1 BNA2 YOR356W BJO3 GND2 VHR1
<u>fatty acid beta-oxidation</u>	4 out of 277 genes, 1.4%	9 out of 7287 annotated genes, 0.1%	0.00042	POT1 FOX2 POX1 MDH3

付表 7 cat8 による誘導遺伝子の GO 解析

GO_term	Frequency	Genome Frequency	Probability	Gene(s)
carbohydrate metabolism	14 out of 169 genes, 8.2%	228 out of 7287 annotated genes, 3.1%	0.00094	AMS1 CIT2 GDB1 ARA1 DOG2 YPR1 GRE3 SHC1 STD1 GID8 TPS3 MSS11 GID7 ICL1
intracellular sequestering of iron ion	2 out of 169 genes, 1.1%	2 out of 7287 annotated genes, 0.0%	0.00103	SSQ1 SMF3
sequestering of metal ion	2 out of 169 genes, 1.1%	2 out of 7287 annotated genes, 0.0%	0.00103	SSQ1 SMF3
cellular carbohydrate metabolism	12 out of 169 genes, 7.1%	208 out of 7287 annotated genes, 2.8%	0.00358	CIT2 GDB1 DOG2 YPR1 GRE3 SHC1 STD1 GID8 TPS3 MSS11 GID7 ICL1

付表 8 高感度酵母チップで検出した発現誘導された遺伝子と転写因子の関連性

転写因子	変動遺伝子	既知遺伝子	予測遺伝子	既知遺伝子、予測遺伝子から重複を除いた遺伝子数 (%)
pdr1	55	35/55	26/55	35/55 (64%)
put3	44	6/44	15/44	18/44 (41%)
sef1	31	0/31	0/31	0/31 (0%)
lys14	146	4/146	17/146	20/146 (14%)
oaf1	271	55/271	31/271	69/271 (25%)
pip2	277	27/277	26/277	41/277 (15%)
cat8	169	7/169	14/169	18/169 (11%)

付表 9 GeneChip で検出した発現誘導された遺伝子と転写因子の関連性

	変動遺伝子	既知遺伝子	予測遺伝子	既知遺伝子、予測遺伝子から重複を除いた遺伝子数 (%)
pdr1	25	18/25	11/25	20/25(80%)
put3	17	2/17	5/17	7/17 (41%)
sef1	21	0/21	0/21	0/21 (0%)
lys14	50	4/50	9/50	11/50(22%)
oaf1	59	9/59	7/59	15/59(25%)
pip2	48	5/48	5/48	10/48(21%)
cat8	110	3/110	6/110	6/110(6%)