

ゲノムBACマイクロアレイを用いたゲノム構造解析法の確立

●村山 裕治

慶應義塾大学医学部

＜研究の目的と進め方＞

ゲノムBAC-DNAマイクロアレイを用いて、染色体の(部分)増幅・欠失による疾患原因関連領域を迅速かつ網羅的に解明する方法を確立し、癌や遺伝病、各種症候群などのゲノム構造解析を行う。遺伝子発現解析やDNA・クロマチンのメチレーション検出によるゲノム機能解析など、包括的生命情報を元にがんの原因関連領域を網羅的かつ迅速に解析し、がんの個性の分子診断法を確立する。さらに得られた知見をもとに、遺伝子異常に基づくがん臨床診断(個別の治療方針決定や予後予測)、がん発症前診断による個別化予防への応用を目指す。

具体的な方法として、以下の計画を推進する

- 1、ヒト全ゲノムBAC-DNAマイクロアレイの作製
- 2、ゲノム一次構造変化の検出
- 3、各種がん組織における遺伝子発現解析
- 4、DNA・クロマチンのメチレーション部位検出によるゲノム機能解析
- 5、タンパクの修飾・構造解析
- 6、マイクロアレイ用基盤の開発
- 7、ゲノムBAC-DNAマイクロアレイ解析用アプリケーションの開発

＜研究開始時の研究計画＞

2002年度の研究の当初計画

- 1) BACクローンの単離：
LOH領域にマップされたSTS/ESTマーカーを1,000種類用いてDHスクリーニング法によりBACクローンを単離する。
- 2) マイクロアレイの作製：
疾患関連遺伝子を含むBACクローンより調製したBAC-DNAそのものをスライドガラス上にスポットする。
- 3) 実験手法の改良：
様々な疾患患者由来の細胞株などを用いてマイクロアレイに対するCGH法の基礎的実験技術を確立する。
- 4) CGH解析：
癌組織を用いてCGH解析を行う。また、ゲノムに含まれる反復配列など、実験データに影響する因子を同定する。

2003年度の研究の当初計画

- 5) 臨床応用への基礎実験：
先ず206種類の癌関連遺伝子に対応するBAC-DNAマイクロアレイの臨床への応用を目指し、肺癌、胃癌、大腸癌などの癌患者由来細胞株から得られたゲノムDNAを用いてCGHを行う。
- 6) 新規癌遺伝子の同定：
データベースより新たに癌関連遺伝子を検索し、これまでに単離したものと合わせたBAC-DNAマイクロアレイを作製する。
- 7) 全ヒトゲノムBAC-DNAマイクロアレイの作製：

当研究室に所有しているBACライブラリーより無作為に約4万クローンを末端シーケンスし、データベース検索して整列化する。

8) BAC-DNA調製：

PCR法などを駆使して微量なBAC-DNAからでも増幅できる簡便なDNA調製方法を確立する。また、ダイナミックレンジ向上のため、高濃度DNAの安定した固定方法を確立する。

9) スライドガラスの開発：

ゲノムBAC-DNAマイクロアレイにおけるシグナル強度、ダイナミックレンジの向上を目指し、より多くのDNA分子数をスライドガラス上へ固定するため、DNAの修飾方法に合わせたスライドガラスの開発を行う。

10) 解析用データベース：

CGH法によって得られたデータを解析し、各疾患において選択的に増幅、欠失している領域を検出し、同時に近隣遺伝子の情報も考慮に入れたデータベースを構築する。

＜研究期間の成果＞

2002年度

がん関連領域を解析するために8, 17, 18番染色体を優先的にカバーするBACクローンの収集を目指していたが、範囲を広げて、がん関連遺伝子を含む203種類507BACクローンと、8番染色体のほとんどをカバーする4,000クローンを収集した。

上記BACクローンから直接DNAを抽出し、マイクロアレイを作製した。

CGH解析法に関しては、A431細胞株を用いて再現性よく検出できるようになった。また、重なり合うクローンにおいて異なる蛍光強度比が再現性よく得られたのでクローンに含まれる配列による現象と予測されるのでこの配列を詳細に解析した。

2003年度

全ヒトゲノムBAC-DNAマイクロアレイを作製するため、慶應BACライブラリーよりランダムにクローンの末端シーケンスを解読し、ヒトゲノム完成シーケンス上へのマッピングを進めた。約8500クローンのマッピングを完了し、全ゲノムの約3分の1を偏りなくカバーした。例えば、我々が注目しているWilliams症候群(7q11.23; 約1.6Mb欠失)の約3Mbにおける領域については、のべ14クローン(平均長150kb)により約2分の1の領域をカバーしていることがわかった。

各染色体をカバーするBACクローンの収集目標においては疾患関連遺伝子も解析することを視野に入れ、全ゲノムを約41.6%カバーするBACを7,718クローン得た。これにより、国内で開発中のゲノムアレイとして最も詳細なデータを得られる。

BAC-DNAを調製する方法として、独自に設計したアダプターを用いてBACクローンDNAをPCRで増幅する方法を確立し、21番染色体をカバーする258個のBACクローンを増幅を終え、マイクロアレイを作製した。

マイクロアレイ実験のダイナミックレンジや再現性の向上、高感度化を図るため、プローブ（アレイ上のDNA）を3次的に保持するメンブレンコーティングのスライドガラスを用いる実験系の開発を行った。そしてメンブレンを用いた際に発生するバックグラウンド低減の特殊処理の開発を行った。これにより、RI並みの高感度を誇るインビトロジェン社（旧キアゲン社）のDNA標識方法（RLS法）を用いることが可能になり、超高感度なシグナルが得られるようになった。この技術は肉眼で蛍光灯下においてもそのシグナルを確認することが出来るため、将来、診断キットになったとき専用スキャナーを必要としない簡単な検出系でマイクロアレイを利用することが出来る。アレイに使用しているBACクローンは、ゲノムシーケンスデータベースに検索して染色体上の位置情報を得て、BACクローンに含まれる遺伝子などの情報をデータベース化しており、マイクロアレイCGHのデータを図示・解析できる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

BACライブラリーを独自に構築したものを使用するため、レプリカの継代回数は少なく、継代に伴うコンタミネーションやクローン中の配列が欠失するなどのトラブルはほとんど無い。そのため高品質なBAC-DNAマイクロアレイを作製することができる。また、アレイに使用したBACクローンを直接FISH解析などに使用することができるので確認実験を容易に行うことが出来る。

本研究においてマッピングした7,718個のBACクローンは、国内ではトップレベルの数である（現在は慶應義塾大学医学部外科学教室との共同研究により臨床検体を収集して実験を行っている）。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初の計画した方法から方針転換したが、目標はほぼ達成した。

〈今後の課題〉

BACマイクロアレイを用いてSmith-Magenis症候群（17p11.2；欠失）、Prader-Willi症候群（15q11-13；欠失）、DiGeorge症候群（22q11.2；欠失）の各領域におけるクローンの配置を詳細に解析する。解析済みのWilliams症候群領域も含め、これら患者由来細胞株を用いて欠失領域を精度よく検出する条件の確立を行う。また、21番染色体をカバーする258クローンのBAC-DNAマイクロアレイを用いてダウン症候群患者由来細胞株2種類（21番染色体トリソミー、リング状21番染色体）を遺伝子発現解析も含めて解析を行う。

今後さらに2万クローンの末端シーケンスを行うことによりゲノムを80%程度カバーすることを目指す。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

この研究期間に公表した成果は無い