

## 論文の内容の要旨

論文題目 DNA エンコード技術を用いた遺伝情報解析法の開発  
(Development of genetic information analysis method  
based on DNA encoding technology)

氏名 西田 奈央

### I. 目的

2001年2月、ヒトゲノムのドラフト配列が Nature 誌、Science 誌で同時に発表された。ヒトゲノムのドラフト配列が明らかになったことで、遺伝子マッピングや SNP マッピングといった遺伝情報の蓄積が盛んに行われている。現在では、50万を超える SNPs を同時に解析する技術も確立され、疾患感受性候補領域の探索に大きな役割を果たすと期待されている。しかしながら、これらのゲノムワイド連鎖分析あるいはゲノムワイド関連分析によって検出された候補領域において、第一義的な疾患感受性遺伝子多型を特定するためには、数十から数百種類の SNPs をもれなくタイピングできる技術確立することが求められている。また、遺伝子の機能解析を行う際には、発現している遺伝子の種類や量を正確に調べることでできる遺伝子発現解析法が非常に重要になる。DNA チップやマイクロアレイを用いた解析で検出された数十から数百種類の機能的に重要な遺伝子について正確な発現量を知ることのできる技術確立することが求められている。本研究は DNA エンコード技術を用いて、数十から数百種類の SNPs や発現遺伝子を対象とした成功率の高い遺伝子多型解析法および正確な遺伝子発現解析法を確立することを目指している。

### II. 方法

DNA エンコード技術を用いた遺伝情報解析では、SNPs の対立遺伝子型や発現遺伝子の

種類や量といった遺伝情報を「DCNs (DNA coded numbers)」と呼ばれるオリゴ DNA へと変換する (エンコード)。DCNs は DNA コンピューティングのために開発されたオリゴ DNA で、DNA 分子反応が正確に進むよう設計されている。遺伝情報を DCNs へ変換して解析を行う技術を、「DNA エンコード技術」と呼んでいる。

DNA エンコード技術を用いた遺伝子多型解析法 (DigiTag 法) では、SNP の対立遺伝子型を DCNs へと一対一に変換する。DigiTag 法で用いる DCNs は 3 つの部分配列 (名称: SD、D1、ED) で構成されている。SD、ED はすべての DCNs に共通な配列で PCR を行う際にプライミング部位として使用する。D1 は各 DCNs に特異的な配列とし、DCNs の種類を識別するために用いる。SNP 情報から DCNs へのエンコードステップはライゲーション反応で行い、複数の SNP 部位から同時に SNP 情報を DCNs へ変換することができる。変換された SNP 情報は共通のプライマーペア (SD、ED) で一様に増幅し、DNA キャピラリーアレイを用いて DCNs の読み出しを行うことで対立遺伝子型が決定される。

DNA エンコード技術を用いた遺伝子発現解析法 (GepDen 法) では、発現している遺伝子産物を DCNs へと一対一に変換する。遺伝子発現解析法で用いる DCNs は 4 つの部分配列 (名称: SD、D1、D2、ED) で構成されており、DCNs の種類を識別するための部分配列として D1 と D2 の 2 種類を用意した。DCNs は共通のプライマーペア (SD、ED) で一様に増幅した後、D1 と D2 の組み合わせをデコード反応により明らかにする。最後に、DNA チップを用いて D1 と D2 の組み合わせを読み出すことにより発現している遺伝子の種類と量が明らかとなる。

## □. 結果

28 箇所の SNPs を対象としたマルチプレックス SNP タイピングを 40 検体で行った。その結果、多型が見られなかった SNP#13 とクラスター分離が悪かった 3 箇所の SNPs (#6、#9、#19) を除く全 24SNPs においてコール率は 99.2% となることが分かった。また、シークエンシング結果との一致率は 100% となり、2 回の独立した実験から再現性は、2 箇所の SNPs を除いて、R 二乗値で 0.99 以上となることが分かった (SNP#2: 0.96、SNP#20: 0.96)。解析した 27SNPs のうち、24 箇所の SNPs では 3 つのクラスターに分離されている様子が観察され、SNP タイピングに成功していることが分かった (タイピング成功率 88.8%)。しかし、SNP#6、#9、#19 ではクラスター分離が悪く、SNP タイピングに失敗していることが明らかとなった。ここで、多型の見られなかった SNP#13 は解析から外した。

また、エンコードステップに用いる 5'クエリープローブにミスマッチを導入してマルチプレックス SNP タイピングを行った結果、SNP#6 と SNP#9 においてクラスター分離が改善され SNP タイピングに成功することが明らかとなった。この結果、ミスマッチ導入プローブを用いた際のタイピング成功率は 96.3% となることが分かった。

続いて、7種類のマウス GvHR 遺伝子 (*IGTP*、*TGTP/Mg21*、*Nedd5*、*PRCC*、*vitronectin*、*Mn-SOD*、*activin beta C*) をターゲット遺伝子として、GepDen法の有効性を検証した。ターゲッ

ト遺伝子に特異的な 30 塩基長の合成 DNA を使った実験により本手法が特異的に進むことが確認され、また、同じ合成 DNA を使った実験により 3 桁の濃度範囲で定量的な解析が行えることが明らかとなった。さらに、GvHR マウスの肝細胞から抽出した 2  $\mu\text{g}$  のトータル RNA を使った実験では、半定量的 PCR 法の結果とよく一致することが明らかとなった。最後に、濃度未知の逆転写産物 (*Mn-SOD*, *activin beta C*) に加えて、濃度既知の合成 DNA を 3 種類、3 pM ~ 30 fM の濃度範囲で混ぜて解析することにより、その校正曲線から濃度未知の遺伝子産物の絶対量を明らかにできることを示した。

#### □. 考察

DigiTag 法では、解析対象となる SNP の対立遺伝子型を DCNs へと変換してから解析を行う。物理化学的性質が一樣となるように設計された DCNs を用いて解析を行うことにより、SNP タイピングを正確にかつ高い再現性で行えることが明らかとなった。また、エンコードステップに用いる 5'クエリープローブにミスマッチを導入することにより、より高い成功率で SNP タイピングを行えることが分かった。一方、クラスター分離の悪かった SNP#19 では、シグナル強度が弱く検出されたために解析が難しくなっている様子が見られた。これは、マルチプレックス PCR における増幅産物量が不十分であったことが原因であると考えられる。

DigiTag 法の特徴のひとつとして汎用性の高さが挙げられる。解析対象となる SNPs に対して自由に DCNs を割り当てられることから、エンコードステップ以降は共通の素材および実験条件で解析を行うことができる。また、解析対象を SNPs ではなく cDNA とすることで遺伝子発現解析を行うことが可能であることが確認できた。これらの特徴は本手法がより安価な遺伝情報解析のプラットフォームとなりうることを示している。