

論文の内容の要旨

論文題目 : Quantitative gene expression profiling method
based on DCN encoding technology

(DCN エンコード技術を用いた定量的遺伝子発現分析法)

氏名 後藤理

背景・目的

医学や生物学の研究において、遺伝子発現分析の重要性が高まっている。現在、このための分析方法として、ゲノムワイドな分析が可能なDNA マイクロアレイ法が広く使われている。DNA マイクロアレイは、スライドガラスなどの基板に数十～数万種類の遺伝子に対するプローブがスポットされたものである。分析サンプルから抽出された mRNA は、蛍光標識された後、DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションされる。その後、DNA マイクロアレイはスキャナでデジタル画像化され、各スポットの蛍光強度からターゲット遺伝子の発現量に応じた測定値が得られる。しかし、この測定値は、個々のターゲットのサンプル間の相対的な発現量を示しているのに過ぎず、分析プラットフォームや RNA レファレンスの種類に依存してしまう。そのため、測定値の標準化は、様々なデータを相互に比較する上で、重要な課題となっている。

この課題を解決するために、MAQC プロジェクトや ERCC プロジェクトにおいて、分析工程レファレンスやユニバーサル・ハイブリダイゼーション・レファレンスの開発が行われ、データを相互に比較するための標準化方法が示された。この方法は、各ターゲットのサンプル間での相対的な発現量に着目した研究には適している。しかし、その適用は、同じ品質のユニバーサル・ハイブリダイゼーション・レファレンスや DNA マイクロアレイが使用可能な期間に限られるため、測定値の標準化問題に対する根本的な解決策にはなっていない。そのため、こうしたレファレンスには依存しない分析法、即ち、遺伝子発現の絶対量が測定できる分析方法が求められている。しかし、DNA マイクロアレイでは、絶対量の決定に必要な標準物質を調製するのが困難なため、絶対量の測定は実現していない。

遺伝子発現の絶対量が測定できる既存の方法には、定量的PCR法がある。この方法で絶対量を測

定するためには、濃度既知の標準物質を用いた検量線が分析ターゲット毎に必要となる。使用する標準物質は、PCR 増幅部位の DNA で、その長さは、通常、化学合成可能な範囲を超えているため、事前の PCR 増幅によって調製される。さらに、高い正確度で定量するためには、サンプル毎に実験条件を細かく調節しなければならない。そのため、多数の遺伝子発現の絶対量を正確に測定するためには、数多くの実験が必要となり、長時間の分析、および、高い分析コストといった問題がある。

そこで、本研究では、cDNA のコピー数(絶対量)を測定できる定量的遺伝子発現分析法(GEP-DEAN 法: Gene expression profiling by DCN-encoding-based analysis)を開発し、既存の分析法では実現することができなかった、絶対量を並列的に分析できる方法を実現することを目的とした。

結果

GEP-DEAN 法は DCN エンコード技術を利用して遺伝子の発現量を測定する分析法である。分析対象をひとたび DCN (DNA-coded numbers)に変換すれば、その後は、分析対象によらず、共通の試薬・手法で分析できる。GEP-DEAN 法は、4 ステップ(エンコード、増幅、デコード、検出・定量)に分かれる(図 1)。分析操作は、測定対象の cDNA サンプルだけでなく、遺伝子特異的な配列を含んだ濃度既知のレファレンスを並行して操作する。検出時に、これらを競合ハイブリダイゼーションさせ、サンプル/レファレンスの比の値を用いることで、反応効率のバイアスを回避する。①エンコードステップでは、各遺伝子の発現量(cDNA)は、5'-MTT と 3'-MTT で構成された MTT(Molecular translation table)の cDNA 特異的ライゲーションによって、対応する DCN の量に変換される(図 2)。DCN は、4 部位(SD、D1、D2、ED)から構成される。SD と ED は全 DCN に共通で DCN 増幅のプライマーとして使用される。また、D1 と D2 は 2 桁の DCN の値を示すために使用される。DCN は、 T_m などの熱力学的特性が揃い、分子内二次構造形成や配列間のミスハイブリダイゼーションが少なくなるように設計されている。ライゲーションされた MTT は、さらに、共通のプライマー(CS と cED)を用いた PCR によって、特異的に増幅される。②増幅ステップでは、MTT の DCN 部分が、全 DCN に共通なプライマー(SD と cED)を利用して増幅される。③デコードステップでは、増幅された DCN が D2 の値でデコードされる。その際、サンプルは Cy5 で、レファレンスは Cy3 で標識される。④サンプル及びレファレンス由来のデコード産物は、DNA キャピラリレイ上で競合ハイブリダイゼーションされる。検出値には、Cy5/Cy3 の比の値が用いられる。

GEP-DEAN 法の定量性を調べるために、まず、検出値(Cy5/Cy3)の DNA 量依存性を調べた。30 塩基長の合成 DNA291 種類を様々な濃度に混合したサンプルを分析したところ、0.1 amol ~ 100 amol の範囲において DNA 量に比例した値が得られた(図 3a、b)。さらに DNA 量を減らすと、DNA 量に比例した Cy5/Cy3 値が得られなくなった(図 3c、d)。この原因は、諸条件の検討の結果、エンコードステップにおける 3'-MTT の非特異的持ち越しであることが分かった。3'-MTT の非特異的持ち越しを考慮したモデル式

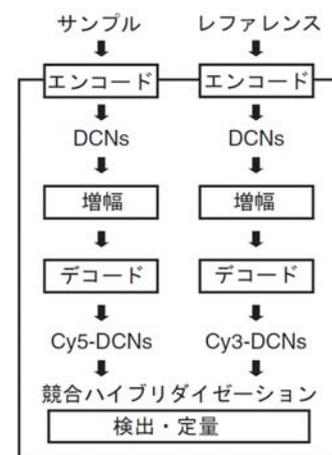


図 1: GEP-DEAN 法の概略

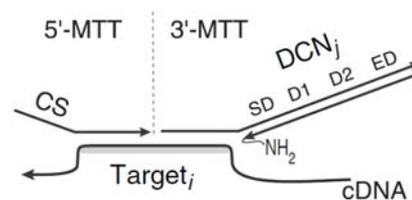


図 2: Molecular translation table (MTT)

を測定データにフィッティングさせたところ、このモデル式の妥当性が示された (図 3d)。そこで、このモデル式を用いて本手法の検出感度を調べた。バックグラウンドのノイズから3倍の Cy5/Cy3 ratio 値を検出限界とすると、その値は 18 zmol であることが分かった。

ターゲットの絶対量は、3'-MTT の非特異的持ち越しを考慮したモデル式から決定される。モデル式のパラメータは、分析サンプルに加えられた濃度既知の合成 DNA 量とその検出値(Cy5/Cy3)の関係から求められる。図 3 で用いたデータの内、27 種類を濃度既知の標準物質、残り 264 種類を測定サンプルとして分析法を検証したところ、高い正確度で測定できることが分かった。

次に、本手法を定量的 PCR 法と比較した。99塩基長の合成 DNA 57 種類を 1~100 amol の範囲で様々な濃度に混合したサンプルを用いて比較したところ、両手法とも再現性の高い結果が得られた。ところが、測定値の正確度では、GEP-DEAN 法の方が正確に定量できることが分かった(図 4)。また、GEP-DEAN 法は、全種類のターゲットを一度の実験で測定できるのに対し、定量的 PCR 法は、別々の実験で測定しなければならない。したがって、GEP-DEAN 法による絶対量の測定は、定量的 PCR 法に比べて効果的であることが示された。

さらに、実際の cDNA サンプルでも正確に定量できるかを調べた。この検証には、マウスの肝臓から調製された cDNA サンプルを用いた。トータル RNA 2 μg 相当の cDNA サンプルを用いて 273 種類の遺伝子について本手法の再現性を調べたところ、再現性の高い結果が得られた。この再現性は、895 種類の遺伝子の分析においても同様であった。続いて、cDNA サンプルを用いた定量値の正確度を調べた。cDNA サンプルは、UV 吸収測定で濃度を決定できる合成 DNA とは異なり、各 cDNA 鎖の真の濃度は分からないので、真の値と定量値の比較によって定量の正確度を調べることはできない。そこで、cDNA 定量の正確度は、cDNA サンプルの希釈系列を用いて、元の濃度のサンプルで測定した値と希釈率の関係から調べることにした。cDNA サンプルの希釈系列を定量したところ、希釈率に比例して測定値は減少した。したがって、cDNA サンプルでも正確に定量できることが分かった。

絶対量として測定されたデータは、従来のような複雑な規格化や共通のコントロールを用いることな

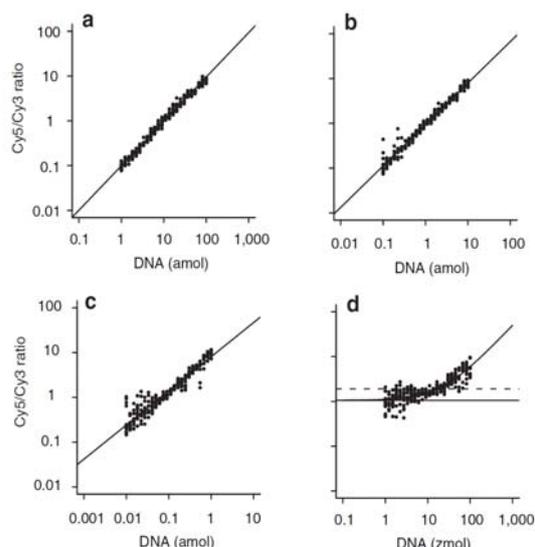


図 3: 検出値(Cy5/Cy3)の DNA 量依存性

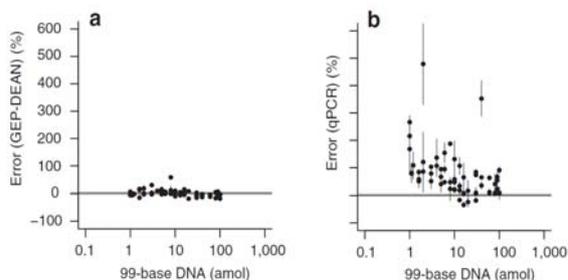


図 4: (a)GEP-DEAN 法と(b)定量的 PCR 法の比較

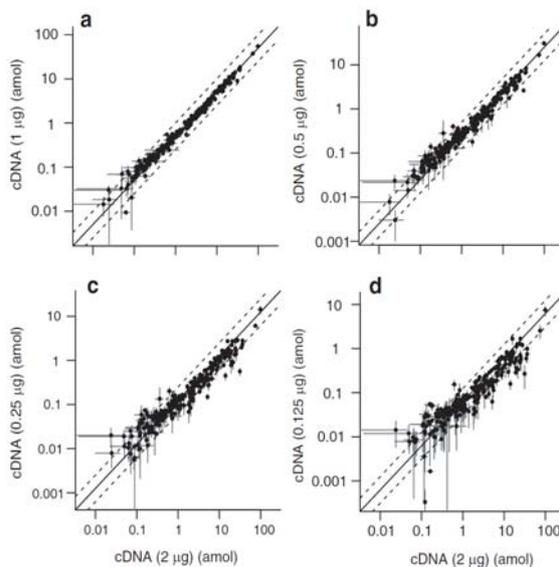


図 5: cDNA サンプル希釈系列の定量

く、直接的な比較が行えるようになる。風邪薬の成分として有名なアセトアミノフェン(APAP)で処理されたマウス肝臓で特異的に変動した遺伝子を Welch の t 検定 (p -value < 0.05) で求めたところ、分析した 223 種類の遺伝子の内、有意に変動した遺伝子 20 種類が得られた。

考察

高い正確度で並列的に cDNA の絶対量を測定できる GEP-DEAN 法の開発に成功した。本手法の分析感度は 18 zmol で、7 時間以内で分析を完了できる。また、どのようなターゲットに対しても、同じ DCN および DNA キャピラリアレイを用いて分析できる汎用性がある。本手法で得られる測定値は絶対量であるので、DNA マイクロアレイが抱えていたデータ標準化の問題を解決することができる。また、様々な場所で得られた測定値であっても、複雑な規格化なしで、直接的に比較できるようになる。

本手法は、今後、エンコード方法を改良することによって、RNA の絶対量が測定できるようになると期待される。たとえば、RNA を鋳型としたライゲーションによるエンコード方法が確立されれば、RNA の直接定量は容易に実現できる。したがって、GEP-DEAN 法は non-coding RNA や mRNA の同時分析にも応用可能な拡張性の高い分析法と言える。