

「生命活動のプログラム」
平成7年度採択研究代表者

林崎 良英

(理化学研究所 主任研究員)

「汎生物高速遺伝子同定法の開発と

遺伝的背景を支配する遺伝子群への応用」

1. 研究実施の概要

あらゆる生命現象の本態解明を目指す基本的戦略の最も重要な研究方法のひとつとして、すべての遺伝情報の総体である全ゲノムをスコープにいれ、表現形質とその原因遺伝子を結び付けるための高速ゲノム解析技術をベースとした研究を総括的に行う必要がある。我々の研究室では、制限酵素の認識サイトをランドマークとし、ゲノム上の 2000 以上の座位を同時に検出する restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法を開発し、それをベースとして任意の生物の任意の突然変異体の原因遺伝子を高速に単離する事を目的とした第一世代の RLGS ポジショナルクローニング法を確立してきた。さらに我々は、新世代の高速ゲノム解析技術が不可欠であると判断し、高速に塩基配列を決定するシステム、高速にゲノムの多数の座位（転写単位）をスクリーニングし、標的の遺伝子を同定する技術開発を目標とし研究を進めてきた。また、標的遺伝子としては、医学の分野では、単一遺伝子によって発症する 10 大遺伝病の原因遺伝子は既に単離同定され、21 世紀には成人病や癌にかかりやすさを支配する形質などの遺伝的背景をコントロールする遺伝子群を選んだ。本プロジェクトは理化学研究所のゲノムプロジェクトと共に、ラフマップまでを RLGS, cSNP, メチル化等のゲノムスキャニング法を用いて、これらの遺伝子に迫る物である。

2. 研究実施内容

当プロジェクトでは、表原形質の原因遺伝子をラフマップ、その後、1) 染色体上の位置情報 2) 発現情報 cDNA マイクロアレイ 3) 完全長 cDNA 構造からの機能予測を用いて候補遺伝子のリストアップを行い、ポジショナルキャンディデートクローニングを行うシステム開発を目的とする。具体的には、1) 高速シーケンスのシステム確立、2) 大規模遺伝子エンサクロペディアの作成、3) 転写単位マップ、発現マップの作成、4) RLGS によるメチル化のスクリーニングを行い、

動脈硬化、糖尿病、高血圧、などの成人病や癌にかかりやすさを支配する形質などの多因的な遺伝的背景をコントロールする遺伝子群を対象とする。

(1) 高速シーケンシング技術の開発

1) 多本架キャピラリーシーケンサーの開発と稼動

これまでのシーケンス法とは異なる独自のシーケンス反応系を確立し、高速大量シーケンス技術の構築のため、384 検体を同時にしかも高速に処理できるキャピラリーシーケンサーを開発した。1997 年 10 月に RISA I (プロトタイプ 1 号機) 2 台を製作し、1 台を RISA II 開発用、1 台をデータ生産パイロットスタディー用とした。完全長 cDNA の量産から 1 pass シーケンスによる cDNA の分類までのシステムが 1998 年 4 月より稼動が始まった。さらに、1998 年 11 月に RISA II 10 台を製作し、大規模エンサイクロペディアの作製を進行中である。RISA II は RISA I の操作性を良くしたものであり、バッファー回収等を自動化したシステムである。

a) シーケンサーシステムの概要；本システムは、ゲノムプロジェクト仕様のシーケンサーであるため、ゲルの充填の時間を完全節約することを目的とし、ゲル充填したキャピラリーカセットを他の場所で作り、泳動終了後即座に交換するようなデザインになっている。そのため、シーケンサー本体(RISA)以外にキャピラリーアレイ製造機 (CAS I, II)、ゲル充填機 (GVT I, II) を開発作製した。キャピラリーアレイは使い捨てである。

b) シーケンサーの基礎構造の検討；シーケンサーの泳動 lane は各 lane の独立性、Sampling loading の簡便性の設計思想により、384 本キャピラリーアレイを用いることとした。

c) 光学系の基礎構造；大きく 2 つのタイプが考えられる。

ア) イメージ系；冷却 CCD カメラで静止したまま画像でキャピラリーアレイの泳動状況を追跡する。しかし、キャピラリーより対物レンズがはなれる為、光量をかせぐことに限界があり、また市販の 512×512 画系の CCD カメラでは 96 本キャピラリーが限界であることがわかった。検体量が CCD 素子能力に依存する。

イ) Scan 系；キャピラリーの本数を 96 本ではなく 384 本をターゲットとした。自力開発がやりにくい CCD 素子に、開発の力点がないため、Scan 系の方が自己努力による開発が行いやすい。

以上の結果から、384 本キャピラリーアレイの scan 系を採用し、装置の作成を行いプロトタイプが完成した。

d) 泳動系の開発；現在はポリアクリルアミドゲルやアクリルアミド誘導体からなる(低頻度クロスリンク)を媒体として用いているが、現在新規な泳動系も開発中である。

短鎖解読用のゲル； 2時間で400—500bpの解読長（完成）
中鎖解読用ゲル； 3時間から3時間半で600—650bpの解読長（完成）
長鎖解読用ゲル； 3時間-4時間前後で700bp以上の解読長（ほぼ完成、現時点では安定性にかける）

2) データマネジメントシステムの開発と大規模遺伝子エンサイクロペディアの作製
完全長 cDNA の 5' 3'から読まれたシーケンスをもとに分類分けし、各々のシーケンスを既知のデータベースと対応づけるデータマネジメントシステムを開発した。また、フェーズ2で完成された完全長 cDNA のシーケンスより完全自動的に系統的にサブセラーな局在（サイトプラズマ、プラズマメンブレン、核、など）と機能を予測するシステムのプロトタイプを開発した。現在のところ、約 110 の組織から完全長 cDNA ライブラリーを作成し、分類分けした結果 50000 種類以上の完全長 cDNA(全遺伝子の半分)を単離した。

(2) 大規模遺伝子エンサイクロペディアの作成

1) マウスの各臓器・ステージにおける組織材料の調整
マウス (C57BL/6) のあらゆるステージの組織を 300 種類以上調整した。始源生殖細胞未受精卵(5515 個)、受精卵(6303)、2cell(5784)、4cell(1751)、8cell(5880)、blastocyst(5337)はひとつずつ手作業で単離するのに、2年半要した。マウス成体組織はできる限り細かく分離した。老化過程における各組織も分離した。

2) 完全長 cDNA ライブラリーの生産
各臓器において 110 以上の完全長 cDNA ライブラリーを作成し、RISA I, II で cDNA のキャラクタライゼーションを約 33 万個行った。その結果、50000 種類の遺伝子（全遺伝子の半分をカバーする）を単離した。

(3) cDNA マイクロアレイの作成
上記の 20000 種類の cDNA をマイクロアレイ化し、遺伝子の発現パターンを調べられるような系を作成した。これにより、発現パターンにより候補遺伝子の絞り込みが行われるようになった。現在のところ、20000 種類の独立した遺伝子がスポットされたマイクロアレイを作成したところである。

・転写単位の window 作成とマイクロアレイの感度向上
生体内の各組織では、それぞれ異なった種の遺伝子が転写されている。chip を使って発現のパターンを解析を行う際、転写単位の window 化により complexity を減らすことができれば、chip の感度の向上が期待できる。

そこで、ライブラリーを重複なく 12 個の window に分ける技術を開発した。我々は mRNA から cDNA を合成する際に、オリゴ dT プライマーの 3'末端に 12 通りの 2 塩基配列を付したプライマーを別々に使うことにより、mRNA をポリ A 直前の 2 塩基配列の異なる 12 種類の集団に分類する方法を検討した。12 種類のプライ

マーを別々に用いて従来の方法で逆転写反応を行っただけでは逆転写酵素の特異性が低いために、mRNAを12個の集団に重複無く分類することができない。そこで我々は、逆転写反応系に前述したトレハロース添加により酵素を耐熱化し、高温下でアニーリング、伸長反応を行った。さらに、一種類のNMプライマーの他に、他の11種類のプライマーに酵素的な伸長が不可能な処理を施して、反応系に同時に加えて競合反応を行わせ、非特異的な逆転写合成反応を抑制して、window間での重複を抑えることに成功した。

(4) 遺伝子の探索

- 1) RLGSを用いた表現形質の原因遺伝子のラフマップ作成システム
 - ・二次元RLGSオートラジオグラフィーの比較ソフトウェアの開発
現在、X-ray線フィルムにより³²Pから放出されるベータ線を検出している。しかしこの方法で読みとられる二次元RLGSパターンにおけるスポットを比較する作業は非常に手間がかかる。われわれは、スキャナーにより読みだしたパターンをコンピュータにより比較するシステムのプロトタイプを開発した。そして、その評価と実際のゲノムマップを行うため、recombinant inbred strainであるSMXAのRLGSパターンを本システムを用いて比較検討を行った。
 - ・電気泳動法によるゲルからのベータ線を直接測定し、ゲノム断片の位置を映像とする検出器の開発
ファイバーシンチレータによる検出器と二次元読み出しの開発を進め電気泳動ゲルの実寸全体をカバーできる、検出器を作製した。1024本のプラスチック・シンチレーション・ファイバーを用いた物で、50cm x 50cmの範囲をカバーし、1mmの位置分解能でゲノム断片の位置を決定できる。種々のテストの結果、基本性能としては、読み出しの方法、位置分解能、検出効率すべてを含めて満足できるものが制作可能であることが判明した。ただその過程で、現在、使用している光電子増倍管では光のクロストークが多く、クロストークが起こったデータを捨てなければならないために検出効率が下がっているという不都合が判明した。この性質は、重イオンを用いたテストにより詳しく解析したところ、光電子増倍が、カタログ性能よりもチャンネル分離が悪いことが判明した。
- 2) マウス系統導入、および、系統維持
遺伝解析を目的とし、マウスの家系を導入維持し、糖尿病家系を用いて疾病遺伝子感受性形質の違いを支配する遺伝子座の同定を目標としている。
- 3) ゲノム上のメチル化の変化を利用したヒトのインプリンティング遺伝子の単離
ヒトのインプリンティング遺伝子についてはこれまでにRLGS-M法を用いて、2つのインプリンティングスポットを発見している。この内一方のスポットがGNAS1由来であることを明らかにし、この遺伝子がインプリンティング遺伝子で

あることを確認した。

4) 癌特異的にメチル化される遺伝子の単離

RLGS-M 法によって同定された”マウス肝臓癌組織特異的にメチル化されるゲノム領域”をカバーする BAC クローンのショットガンシーケンスを行い、データベースとのホモロジー検索・遺伝子予測等を行った。その結果、肝臓癌組織で特異的にメチル化・発現抑制させる新規遺伝子が同定された。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Kato M.V., Ikawa Y., Hayashizaki Y. and Shibata H. Paternal imprinting of mouse serotonin receptor 2A gene *Htr2* in embryonic eye; A conserved imprinting regulation on the *RB/Rb* locus, *Genomics*, 47, 146-148 (1998)
- Naas, T.P., DeBerardinis R.J., Moran J.V., Ostertag E.M., Kingsmore S.F., Seldin M.F., Hayashizaki Y., Martin S.L. and Kazazian, Jr. H.H., An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements, *EMBO*, 17, 590-597 (1998)
- Sasaki N., Izawa M., Watahiki M., Ozawa K., Tanaka T., Yoneda Y., Matsuura S., Carninci P., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Transcriptional sequencing: A method for DNA sequencing using RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3455-3460 (1998)
- Sasaki N., Nagaoka S., Itoh M., Izawa M., Konno H., Carninci P., Yoshiki A., Kusakabe M., Moriuchi T., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Characterization of gene expression in mouse blastocyst using single-pass sequencing of 3995 clones, *Genomics*, 49, 167-179 (1998)
- Carninci P., Nishiyama Y., Westover A., Itoh M., Nagaoka S., Sasaki N., Okazaki Y., Muramatsu M. and Hayashizaki Y., Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 520-524 (1998)
- Shibata H., Yoda Y., Kato R., Ueda T., Kamiya M., Haraiwa N., Yoshiki A., Plass C., Pearsall R. S., Held W.A., Muramatsu M., Sasaki H., Kusakabe M. and Hayashizaki Y., A methylation imprint mark in the mouse imprinted gene *Grf1/Cdc25 Mm* locus shares a common feature with the *U2afbp-rs* gene; An association with a short tandem repeat and a hypermethylated region, *Genomics*, 49, 30-37 (1998)
- Pearsall R.S., Imai K., Shibata H., Hayashizaki Y., Chapman V.M., Held W.A.

- and Plass C., The *Rasgrf1*-repeat sequence (*D9Ncvs53*) maps between *Mod1* and *Rbp1* on mouse chromosome 9 and may define a putative imprinted region, *Mammal. Genome*, 9, 261-262 (1998)
- Izawa M., Sasaki N., Watahiki M., Ohara E., Yoneda Y., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Recognition sites of 3'-OH group by T7 RNA polymerase and its application to transcriptional sequencing, *J. Biol. Chem.* 273, 14242-14246 (1998)
- Sugahara Y., Akiyoshi S., Okazaki Y., Hayashizaki Y. and Tanihata I., An automatic image analysis system for RLGS films, *Mammal. Genome*, 9, 643-651 (1998)
- Hayward B.E., Kamiya M., Strain L., Moran V., Campbell R., Hayashizaki Y. and Bonthron D.T., The human *GNAS1* gene is imprinted, and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 10038-10043 (1998)
- Sasaki N., Izawa M., Sugahara Y., Tanaka T., Watahiki M., Ozawa K., Ohrara E., Funaki H., Yoneda Y., Matsuura S., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Identification of stable RNA hairpins causing band compression in transcriptional sequencing and their elimination by use of inosine triphosphate, *GENE*, 222, 17-24 (1998)
- Seki M., Carninci P., Nishiyama Y., Hayashizaki Y. and Shinozaki K., High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper, *Plant Journal*, 15, 707-720 (1998)
- Mori M., Akiyoshi S., Mizuno Y., Okuizumi H., Okazaki Y., Hayashizaki Y. and Nishimura M., Genetic profile of the SMXA recombinant inbred mouse strains revealed with restriction landmark genomic scanning, *Mammalian Genome*, 9, 695-709 (1998)
- Mizuno Y., Carninci P., Okazaki Y., Tatenō M., Kawai J., Amanuma H., Muramatsu M. and Hayashizaki Y., Increased specificity of reverse transcription priming by trehalose and oligo-blockers allows high-efficiency window separation of mRNA display, *Nucleic Acides Res.*, 27, 1345-1349 (1999)
- Sugahara Y., Akiyoshi S., Okazaki Y., Tanihata I. Nishimura M. and Hayashizaki Y., Application of RLGS image analysis tool (RAT) to the construction of a genetic linkage map of recombinant inbred strain SMXA, *Mammal. Genome*, 10, 611-616 (1998)

- Tateno M. and Hayashizaki Y., Construction of large-insert BAC library from C57BL/6J mouse, *Bioimages*, 6, 117-125 (1998)
- Itoh M., Kitsunai T., Akiyama J., Shibata K., Izawa M., Kawai J., Tomaru Y., Carninci P., Shibata Y., Ozawa Y., Muramatsu M., Okazaki Y. and Hayashizaki Y., Automated filtration-based high-throughput plasmid preparation system, *Genome Res.*, 9, 463-470 (1999)
- Pearsall R.S., Plass C., Romano M.A., Garrick M.D., Shibata H., Hayashizaki Y. and Held W.A., A direct repeat sequence at the *Rasgrf1* locus and imprinted expression, *Genomics*, 55, 194-201 (1999)
- Carninci P. and Hayashizaki Y., High-efficiency of full-length cDNA cloning, "Methods in Enzymology" Academic Press, Inc. San Diego, vol. 303, 19-44 (1998)
- 水野洋介, 岡崎康司, 林崎良英, RLGS 法を用いた癌関連遺伝子探索法, がん遺伝子・がん抑制遺伝子, 中外医学社, 160-167, 1998
- 岡崎康司, 林崎良英, RLGS 法を用いた高速ポジショナルクローニングシステム, 化学と生物, 学会出版センター, 36, 34-41, 1998
- 渡辺幸彦, 林崎良英, ヒトゲノム計画とその展開, 現代医学の基礎 分子・細胞の生物学 I, 上代淑人・村松正實 (編), 岩波書店, 東京, 200-215, 1998
- 館野美成子, 岡崎康司, 村松正實, 林崎良英, Cancer genome anatomy から見た発癌研究, *Molecular Medicine*, 中山書店, Vol. 35 No. 6, 738-745, 1998
- 林崎良英, 1) ゲノムスキヤニングとランドマークの概念, 最新 電気泳動実験法 7章 2次元電気泳動法 I 編 電気泳動方法論 2. ゲノム解析(1), 医歯薬出版 (株), 91-94, 1999
- 水野洋介, Piero Carninci, 林崎良英, 4) ゲノムスキヤニングにおける window の設定法, 最新 電気泳動実験法 7章 2次元電気泳動法 I 編 電気泳動方法論 2. ゲノム解析(1), 医歯薬出版 (株), 108-112, 1999
- 館野美成子, 林崎良英, パルスフィールド電気泳動法と BAC ライブラリー作製, 最新 電気泳動実験法 7章 2次元電気泳動法 I 編 電気泳動方法論 3. ゲノム解析(2), 医歯薬出版 (株), 112-120, 1999
- 秋山純一, 伊藤昌可, 林崎良英, 高速多検体プラスミド調製装置を開発 1日4万サンプルの試料作成が可能に, 日経サイエンス, 日経サイエンス社, 28, 122, 1998
- 岡崎康司, 三木理雅, 林崎良英, マウス cDNA マイクロアレイを用いた発現プロファイル解析, 細胞工学 DNA マイクロアレイ, 秀潤社, 18, 877-885, 1999
- 林崎良英, 序章, シリーズ: ゲノム解析プロトコール, *Molecular Medicine*,

中山書店, 36, 672-675, 1999

○館野美成子, 林崎良英, 1. BAC ライブラリー作製, シリーズ:ゲノム解析プロトコール, Molecular Medicine, 中山書店, 36, 676-683, 1999

○Piero Carninci, 柴田裕子, 綿引玲, 林崎良英, 2. 包括的完全長 cDNA ライブラリー作製 第1回, シリーズ:ゲノム解析プロトコール, Molecular Medicine, 中山書店, 36, 807-815, 1999

○Piero Carninci, 柴田裕子, 綿引玲, 林崎良英, 3. 包括的完全長 cDNA ライブラリー作製 第2回, シリーズ:ゲノム解析プロトコール, Molecular Medicine, 中山書店 36, 937-945, 1999

○林崎良英, 科学者は何をしたいのか, 科学者に何が問われているのか, 今, 科学者へチャレンジ, 科学, 岩波書店, 69, 564-565, 1999

他1件