「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

（理化学研究所ゲノム科学総合研究センター　プロジェクトリーダー）

「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。

２．研究実施内容

当プロジェクトでは，表現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イクロペディアの作成（理研ゲノムとの共同)、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。

⑴　ｃDNAマイクロアレイを用いたインプリント遺伝子の探索

これまで多数の遺伝子の中から大規模にインプリンティング遺伝子を検出することは、技術的な問題から一般的に困難であった。我々はマウスエンサイクロペディア・プロジェクトで得られたnon-redundant cDNAクローン中の約1.7万種類を

スポットしたcDNAマイクロアレイを用いて、インプリンティング遺伝子を大規模にスクリーニングする系の開発を行った。実験サンプルにはマウス雌核発生胚（parthenogenote）と雄核発生胚（androgenote）を用いた。雌核発生胚では雄由来の、雄核発生胚では雌由来の遺伝子がそれぞれ欠如しているため、これらの胚においてはインプリントされた遺伝子はどちらか一方の胚でしか発現されないと考えることができる。この2つのサンプルよりトータルRNAを抽出し、それぞれ異なる蛍光色素（Cy3, Cy5）で標識した後、cDNAマイクロアレイに競合的にハイブリダイゼーションさせて、各スポットについて2色の蛍光の強度比を測定した。強度比の著しく大きいスポットをリストアップしたところ、既知のインプリンティング遺伝子がいくつか含まれていた。また、ESTなどの機能未知の遺伝子や、既知遺伝子だがこれまでインプリンティングの報告が無いものなども同様に含まれていた。これらの遺伝子はインプリンティング遺伝子の強力な候補であると考えられる。このうちのいくつかのクローンについては、RT-PCR法により両胚で実際に発現量が著しく異なっていることが確認され、インプリンティングの候補遺伝子を広くスクリーニングする系として、この方法は非常に有効性が高いことが示された。

⑵　インプリンティング遺伝子

本研究は、RLGS-M （Restriction Landmark Genomic Scanning for Methylation）法を用いて、ヒト単為発生キメラ由来の単為発生細胞と雄核生殖を原因とする胞状奇胎のゲノム上のメチル化状態を比較し、インプリント遺伝子を単離することを目的としている。

我々はまず，メチル化がインプリントの挙動を示す二つの座位を発見し、その内一方がインプリント疾患であるpseudohypoparathyroidism（PHP）type Iaの原因遺伝子*G-protein- α -subunit 1（GNAS1）* であることを確認し，さらにもう一方の座位について解析を進めた。この領域には、インプリント疾患である新生児一過性糖尿病（transient neonatal diabetes mellitus, TNDM）がマップされている。近傍の遺伝子を調べ、*ZAC / PLAGL1*が父親由来のアリールから特異的に発現するインプリント遺伝子である事を明らかにした。*ZAC / PLAGL1*はZinc-Finger蛋白質をコードしており、転写因子である事、癌抑制遺伝子である事、さらに、アポトーシスを起こす事などが既に示されている。最も興味深い点として、PACAP-type1 receptorを誘導することが報告されている。PACAP（pituitary adenylate cyclase activating polypeptide）は視床下部から分泌され、下垂体でcAMPを介して、GHやLHを分泌させるペプチドであるが、膵臓では、グルコース存在下でインスリンの分泌を促進する事が報告されている。一方、TNDMはUPD6や6q24領域の重複の研究から父方アリール特異的に発現している遺伝子の発現量が増加することが原因

と考えられている。*ZAC/PLAGL1*が父親由来のアリールから特異的に発現していること、さらに、インスリンの分泌に関与していることを考えると、この遺伝子がTNDMの原因遺伝子として非常に有望であると考えられた。

⑶　シーケンサーの開発

我々は、384フォーマットMulti capillary sequencing system （ RISA sequencer ）を開発した。このシステムは、384本のcapillary column からなる array の作成、arrayのcolumn洗浄処理及びゲル充填、分析の３プロセスから成り、それぞれのプロセスに使用する装置として、CAS, GVT, RISA sequencerを開発した。今年度、我々は、RISA シーケンスシステムの性能向上を目指し、capillary column の高性能化、新規ゲル媒体の開発等の開発を行った。

capillary column 高性能化：未処理の capillary 内にシーケンス用ゲルを作成すると気泡ができ capillary column が使用不可になる。これを回避し同時にシーケンシング性能をあげるカラム効率の改良を試みた。弱アルカリ性溶液、HCl、純水を用いた新洗浄法によりゲル作成時の気泡発生抑制とＤＮＡの分離向上に成功し、384本 RISA capillary column の高性能化が達成され、実際に利用している。

RISAシーケンス用ゲル媒体：我々は300種類ほどの分離媒体の作成/新規合成を通じて２種類の高性能ゲルを開発した。一方は分離安定性が高く384本の capillary column の殆どで 600ベース を越す分離ができ、既に日常の配列決定作業に活用している。また他方は、500b のDNA検出シグナルでみるとメートルあたりの理論段数が二千万というシーケンス用媒体中では最高の分離能力を示し３ 時間で 900ベース まで分離できた。なお後者は分離安定性にかける為に重合条件などを更に検討中である。

我々は上記の開発の成果を基に、現在、CAS 7 台、GVT 10 台、RISA-2 20 台で構成されたシステム運用を行っている。我々は、このシステムを用いてマウス完全長ｃDNAクローンの配列情報を産出し、その配列情報を基に、クローンの分類、及び、全長配列決定を行っている。

なお、本研究で開発されたシーケンサは、1999年11月に、㈱島津製作所から、「RISA－384」、「CAS－384」、「GVT－384」として市販された。

⑷　がんにおけるDNA変化の検出

RLGS-M（Restriction Landmark Genomic Scanning for Methylation）法によって同定した“ マウス肝がん組織で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クエンスを行い、座位近傍に存在する遺伝子のクローニングを試みた。その内の一つであるB236と呼ばれる座位は、ヒトのがん組織数種類において高頻度に欠失・組み換えが報告されている領域で、がん抑制遺伝子が近傍に存在する可能性が示唆された。我々はこの領域を含むBACクロー

ン（176kb）の約6 fold相当のショットガンシークエンスを行い、B236座位（390bp）全長を含む約8.4kbのコンティグを得た。Genescanによる解析の結果、B236座位の下流64bpから始まる約1.5kbのCDSが予測された。B236座位はこの予測遺伝子のプロモーター領域に含まれていて、プロモーター領域の後半からCDSの最初にかけては、CG配列に富んだCpG islandが存在していることがわかった。

我々はこの遺伝子をmlc 1（methylated in liver cancer 1）と名付け、シークエンスを登録した（AB032418）。Northern hybridizationの結果、mlc 1は正常成人マウスでは脳で発現がもっとも高く、脾臓、胃、肝臓でも発現が認められた。MT-D2マウス（SV40T抗原を肝臓で特異的に発現し、肝がんを誘発するトランスジェニックマウス）を用いた解析では、mlc 1は肝がん組織では発現が消失していた。また、mlc 1のプロモーター領域は、正常組織ではメチル化されていないが、肝がん組織では解析した11個体中すべてでメチル化されていた。mlc 1は神経芽腫由来細胞株においてもメチル化・発現抑制されていて、脱メチル化剤（5-aza-deoxycytidine）処理によって発現が誘導されることが観察された。よってmlc 1は、がん化とともに特異的にメチル化され、発現が抑制される遺伝子であると考えられる。mlc 1は493アミノ酸から成るタンパクをコードしていて、このタンパクのN末にはSNAG（Snail/Gfi 1）モチーフ、C末側には５つのC_2H_2タイプzinc finger DNA結合モチーフが認められる。SNAGモチーフは、SNAG転写抑制因子ファミリーに共通に見られる配列で、転写抑制活性に必須の配列である。よって、mlc 1はSNAGファミリーの新メンバーと考えられる。分子進化系統樹によれば、SNAGファミリーは、発生期の形態形成に必須のSnail/Slugグループ、がん遺伝子のGfi 1グループ、機能は未解析だががん組織で特異的に発現パターンが変化するIA-1（Inslinoma associated protein 1）とmlc 1から成るグループ、の３グループへと分化したことが示唆された。転写抑制因子としてのmlc 1の解析及び標的となる遺伝子の同定などが、肝がん形成のメカニズムを解くカギになることが期待される。残る座位についても、BACショットガンシークエンス法を用いて、座位近傍に存在する遺伝子をクローニングする予定である。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Fukunishi Y., Suzuki H., Yoshino M., Konno H. and Hayashizaki Y., Prediction of human cDNA from its homologous mouse full-length cDNA and human shotgun database, FEBS Lett., 464, 129-132, 1999

○Takada S., Kamiya M., Arima T., Kagebayashi H., Shibata H., Muramatsu M., Chapman V.M., Wake N., Hayashizaki Y. and Takagi N.,Detection and cloning of an X-linked locus associated with a NotI site that is not methylated on mouse inactivated X chromosome by the RLGS-M method, Genomics, 61, 92-100, 1999

○Kadota K., Miki R., Okazaki Y., Shimizu K., Hayashizaki Y., Development of an efficient data processing method for cDNA microarray and its application to tissue expression profiling, Genome Informatics Series, No.10, 221-222, 1999
○Konno H., Fukunishi Y., Endo T., Hayashizaki Y., Construction and application of mouse full-length cDNA database, Genome Informatics Series, No.10, 288-289, 1999
○Endo T., Yamanaka I., Konno H., Fukunishi Y., Kawai J., Suzuki H., Ozawa Y., Shibata K., Yoshino M., Itoh M., Carninci P., Okazaki Y., Hayashizaki Y., Systematic analysis on mouse genome encyclopedia, Genome Informatics Series, No.10, 338-339, 1999
○Kamiya M., Judson H., Okazaki Y., Kusakabe M., Muramatsu M., Takada S., Takagi N., Arima T., Wake N., Kamimura K., Satomura K., Hermann R., Bonthron D.T., Hayashizaki Y., The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted - a strong candidate gene for transient neonatal diabetes, Hum. Mol. Genet., 9, 453-460, 2000
○Komatsu S, Okazaki Y., Tateno M., Kawai J., Konno H., Kusakabe M., Yoshiki A., Muramatsu M., Held W.A. and Hayashizaki Y., Methylation and downregulated expression of mac 25/insulin-like growth factor binding protein-7 is associated with liver tumorigenesis in SV40T/t antigen transgenic mice screened by Restriction Landmark Genomic Scanning for Methylation (RLGS-M), BBRC, 267, 109-117, 2000
○水野洋介，三木理雅，岡崎康司，林崎良英，4.cDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロフィール解析，シリーズ：ゲノム解析プロトコール，Molecular Medicine，中山書店，36，1068-1077，1999
○河合純，林崎良英，5.スラブゲルをもちいた蛍光DNAシーケンシング，シリーズ：ゲノム解析プロトコール，Molecular Medicine，中山書店，36，1191-1200，1999
○伊澤真樹，石川友一，林崎良英，6.転写シーケンス法，シリーズ：ゲノム解析プロトコール，Molecular Medicine，中山書店，36，1339-1345，1999
○三木理雅，岡崎康司，林崎良英，DNAチップ，別冊実験医学　ザ・プロトコールシリーズ　non-RI実験の最新プロトコール，羊土社，158-160，1999
○奥泉久人，林崎良英，RLGS法，実験医学別冊　新遺伝子工学ハンドブック改訂第３版，羊土社，297-303，1999
○林崎良英，ゲノムエンサイクロペディアとポストシーケンスEra，第7回分子循環器研究会講演会講演記録集，37-50，1999
○吉野正康，林崎良英，基礎：ゲノム解析のモデル生物：マウスゲノムエンサイクロペディア，現代医療，現代医療社，32，181-188,2000
○横田倫子，福西快文，吉野正康，林崎良英，10.ショットガン・シーケンス，シリーズ：ゲノム解析プロトコール，Molecular Medicine，中山書店，37，358-363，2000

○福西快文，横田倫子，福田史郎，吉野正康，林崎良英11.ショットガン・シーケンス（Ⅱ）－アセンブリ，シリーズ:ゲノム解析プロトコール，Molecular Medicine，中山書店，37，483-487，2000
○今野英明，林崎良英，12.完全長cDNAデータベース，シリーズ：ゲノム解析プロトコール，Molecular Medicine，中山書店，37，597-603，2000
○林崎良英，巻頭言　序：ポストシーケンスにおけるSNPと遺伝子発現情報，特集　新世紀医療をめざして－SNPとDNAチップ，遺伝子医学，メディカル　ドゥ，4，23，2000
○林崎良英，SNP研究の意義，特集　新世紀医療をめざして－SNPとDNAチップ，遺伝子医学，メディカル　ドゥ，4，26-36，2000
○外丸靖浩，岡崎康司，林崎良英，SNPタイピング技術（SNP typing），特集　新世紀医療をめざして－SNPとDNAチップ，遺伝子医学，メディカル　ドゥ，4，44-51，2000
○岡崎康司，三木理雅，水野洋介，門田幸二，外丸靖浩，今野英明，橘内徳司，林崎良英，RIKEN完全長マウスcDNAマイクロアレイを用いた発現プロフィール解析，特集　新世紀医療をめざして－SNPとDNAチップ，遺伝子医学，メディカル　ドゥ，4，85-92，2000
○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解析，細胞工学別冊　ゲノムサイエンスシリーズ１　DNAマイクロアレイと最新PCR法，43-54，2000