

学位論文題名

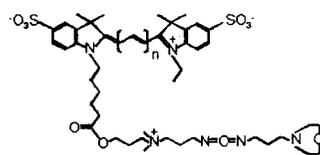
Study on a fabrication of new carbodiimide-based DNA microarray systems and their applications to genetic diagnoses

(カルボジイミドを基盤とする新規DNAマイクロアレイシステムの構築と遺伝子診断への応用に関する研究)

学位論文内容の要旨

近年、DNA マイクロアレイは遺伝子の発現頻度解析、一塩基多型解析やメチル化解析を包括的かつ迅速に行うためのツールとして注目を集めており、今後、個人の体質に合わせた健康管理や医薬品処方を行うテーラーメイド医療の現場での計測技術として普及が期待されている。しかし、現在のDNA マイクロアレイ解析では、擬陽性・擬陰性を生じ易いことや比較的高価な試薬や機器を必要とすることが普及を妨げる要因の一因となっており、今後の遺伝子解析技術の発展には安価で操作性に優れた高性能解析システムの創製が鍵となっている。

本研究では、カルボジイミド基が核酸と高い反応性を有することに着目し、核酸を効率良く標識できる新規蛍光試薬の分子設計と合成、さらにその生化学的評価について検討を行なった。この化合物はシアニンの基幹構造の末端にカルボジイミド基を有する誘導体



n = 1: Cyanine3-carbodiimide
n = 2: Cyanine5-carbodiimide

Fig. 1 Structure of cyanine dye-carbodiimides

あり(Fig. 1)、カルボジイミド基がチミンあるいはグアニンと共有結合する反応を利用することによって、従来1時間以上必要であった反応時間を10分間に短縮でき、これ

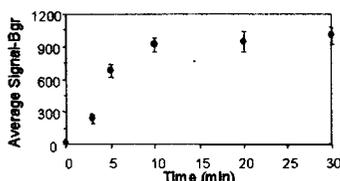


Fig. 2 Effect of reaction time on hybridization efficiency. Reverse-transcribed cDNA from mouse liver total RNA (5 μ g) was labeled by cyanine5-carbodiimide and hybridized to the oligo arrays. Each data point is the average from two hybridizations. The error bars indicate standard deviation.

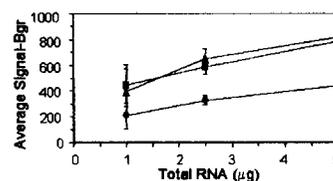


Fig. 3. Comparison of hybridization data. Average fluorescence signal intensities shown as a function of the input mass of total RNA. The products from triplicate labeling reactions using cyanine5-carbodiimide and cDNA resulting from increasing amounts of mouse brain total RNA were hybridized to arrays. Each data point is the average from three hybridizations. Direct (●), indirect (▲) and carbodiimide labeling (■). The error bars indicate standard deviation.

ら蛍光物質をDNAに導入することを可能とした(Fig. 2)。また、マウスの脳及び肝臓由来のtotal RNAから逆転写反応によって生じたcDNAにこれら蛍光物質を

導入して、DNA マイクロアレイを用いたハイブリダイゼーション法による遺伝子の発現頻度解析を行い、従来法と比較した結果、本方法が direct labeling 法に比べて約 4 倍高い S/N 比を示し、indirect labeling 法と同等の S/N 比を示すことを明らかにした(Fig. 3)。さらに、RT-PCR 法を用いて遺伝子発現頻度解析結果の検証を行なった結果では、本方法が RT-PCR 法と最も高い相関(Pearson coefficient = 0.73)を示すことを明らかにした。

一方、DNA 塩基配列中の SNP やメチル化をマーカーとして利用する、迅速かつ簡易な遺伝子診断方法の開発も医療分野において急務の課題となっている。本報では、スライド表面をポリカルボジイミドで処理した DNA マイクロアレイを作製して

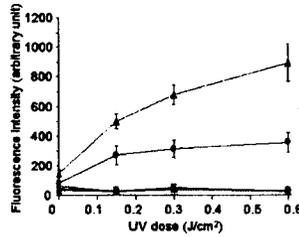


Fig. 4 Effect of UV-irradiation on hybridization efficiency. Signal intensities produced upon hybridization of HEX-labeled oligonucleotide targets to eight different spotted oligonucleotide probes at 0 to 0.6 J/cm² of UV-irradiation. Oligonucleotide probe sequences were as follows: 5'-GAGTATATGAG-3', X is thymine (Probe 1), adenine (Probe 2), guanine (Probe 3) and cytosine (Probe 4), respectively; 5'-CGCATXACGC-3', X is thymine (Probe 5), adenine (Probe 6), guanine (Probe 7) and cytosine (Probe 8), respectively. The slides were hybridized in parallel with two different HEX-labeled oligonucleotides (12-mer and 10-mer), and washed briefly. Oligonucleotide target sequences were as follows: 3'-CTCATAA TACTC-5' and 3'-GCCTAA TGCG-5'. Positions of nucleotide substitutions are underlined.

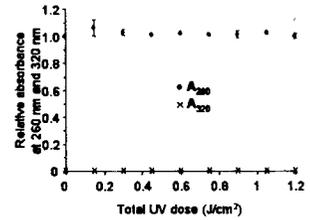


Fig. 5 Relative absorbance in UV-irradiated oligonucleotide (Probe 1) ranging from 0 to 1.2 J/cm². The doses are plotted as the sum of doses at each absorbance (260 nm and 320 nm).

DNA との反応性の検討を行った結果、紫外線照射が DNA とカルボジイミド基の反応を促進させてハイブリダイゼーションシグナルを約 7 倍増加できること及び DNA の一塩基違いをより明瞭に区別することができることを初めて見出した (Fig. 4)。さらに特記すべきは、本方法論では二量化したチミンが生成せず (Fig. 5)、

表面に固定したオリゴマーが核酸塩基を特異的に認識している点である。次に、この方法論を大腸癌の発現に

関与する遺伝子のメチル化解析に拡張して検討を行なった。検出系に Avidin-Biotinylated peroxidase Complex 法を選択し、臨床検体を用いて検討を行なった結果、本法は腫瘍組織での遺伝子の連続的なメチル化を特異的に検出できることを見出した (Fig. 6)。この結果は bisulfite sequencing 法によっても支持され、本法は広範囲な配列に適用可能であること、また、実配列にも適用可能であることが明らかとなった。

以上本研究により、カルボジイミド基を利用した新規蛍光物質合成法と紫外線照射による核酸との新規な反応系の確立、並びにそれらを活用した遺伝子解析法を開発した。

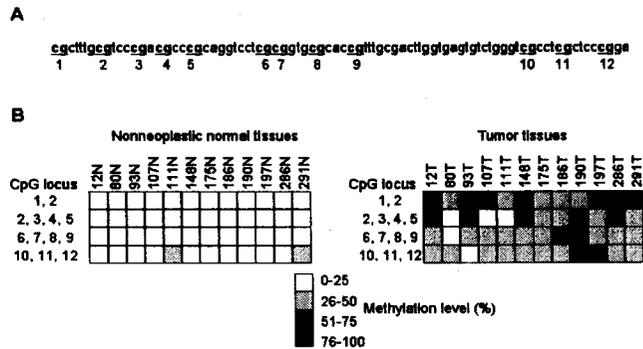


Fig. 6 The 12 CpG sites located in exon 1 tested in this study were underlined and shown in bold and the CpG islands (A). Methylation analysis of 12 CpG sites in *MGMT* promoter on DNA extracted from human colorectal cancer tissue and counterpart non-neoplastic normal mucosa by oligonucleotide microarray (B).

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 田 中 勲
副 査 助 教 授 門 出 健 次
副 査 特任助教授 福 原 法 夫

学 位 論 文 題 名

Study on a fabrication of new carbodiimide-based DNA microarray systems and their applications to genetic diagnoses

(カルボジイミドを基盤とする新規DNAマイクロアレイシステムの構築と遺伝子診断への応用に関する研究)

近年、DNA マイクロアレイは遺伝子の発現頻度解析、一塩基多型解析やメチル化解析を包括的かつ迅速に行うためのツールとして注目を集めており、今後、個人の体質に合わせた健康管理や、医薬品処方を行うテーラーメイド医療の現場での計測技術として普及が期待されている。しかしながら、現在のDNA マイクロアレイ解析では、解析するDNAに高価で煩雑な化学修飾を施す工程が必要であることや、解析結果に擬陽性・擬陰性を生じ易いこと、あるいは、解析に比較的高価な試薬や機器を必要とすることが、この技術の普及を妨げる要因の一因となっており、今後の遺伝子解析技術の発展には、安価で操作性に優れた高性能解析システムの創製が鍵となっている。

本研究は、カルボジイミド基が、安価な未修飾の核酸と高い反応性を有することに着目し、核酸を効率良く標識できる新規蛍光試薬の分子設計と合成、さらにその生化学的評価について検討を行なったものである。この化合物はシアニンの基幹構造の末端にカルボジイミド基を有する誘導体であり (Fig. 1)、カルボジイミド基がチミンあるいはグアニンと共有

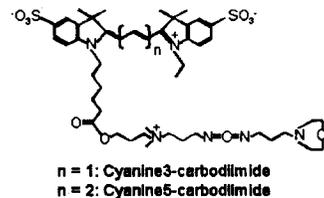


Fig. 1 Structure of cyanine dye-carbodiimides

結合する反応を利用することによって、従来1時間以上必要であった反応時間を10分間に短縮でき、これら蛍光物質をDNAに簡便に導入することを可能にした (Fig. 2)。また、マウスの脳及び肝臓由来の total RNA から逆転写反応によって生じた cDNA にこれら蛍光物質を

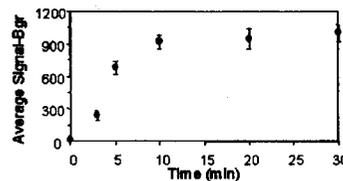


Fig. 2 Effect of reaction time on hybridization efficiency. Reverse-transcribed cDNA from mouse liver total RNA (5 μ g) was labeled by cyanine5-carbodiimide and hybridized to the oligo arrays. Each data point is the average from two hybridizations. The error bars indicate standard deviation.

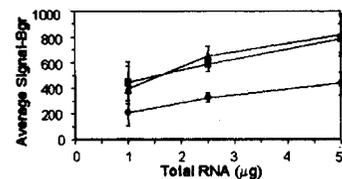


Fig. 3. Comparison of hybridization data. Average fluorescence signal intensities shown as a function of the input mass of total RNA. The products from triplicate labeling reactions using cyanine5-carbodiimide and cDNA resulting from increasing amounts of mouse brain total RNA were hybridized to arrays. Each data point is the average from three hybridizations. Direct (●), indirect (▲) and carbodiimide labeling (■). The error bars indicate standard deviation.

導入して、DNA マイクロアレイを用いたハイブリダイゼーション法による遺伝子の発現頻度解析を行い、従来法と比較した結果、直接標識法に比べて2~4倍高いシグナル強度を示し、間接標識法と同等のシグナル強度を示すことを明らかにした(Fig. 3)。さらに、RT-PCR 法を用いて遺伝子発現頻度解析結果の検証を行なった結果では、これら従来法に比べて、RT-PCR 法と最も高い相関(Pearson coefficient = 0.73)を示すことを明らかにした。

一方、DNA 塩基配列中の SNP やメチル化をマーカーとして利用する、迅速かつ簡易な遺伝子診断方法の開発も医療分野において急務の課題となっている。本研究は、スライド表面をポリカルボジイミドで処理したDNA マイクロアレイを作製して、安価な未修飾DNA との反応性の検討を行っている。この検討の過程で、紫外線照射がDNA とカルボジイミド基の反応を促進させて、ハイブリダイゼーションシグナルを約7倍増加できること、且つハイブリダイゼーションの特異性に悪影響を及ぼすことなく、DNA の一塩基違いをより明瞭に区別できることを初めて見出した (Fig. 4)。さらに特記すべきは、DNA 固定反応に紫外線照射を利用して二量化したチミンが生成せず(Fig. 5)、表面に固定した DNA が核酸塩基を特異的に認識できる点である。

さらに、この方法論を大腸癌の発現に関与する遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析に拡張して検討を行い、診断利用を目的とした、新しいマイクロアレイ技術の構築を目指した検討を行なっている。マイクロアレイ解析で一般的に使われている高価なレーザースキャナーの代わりに、シグナルを目視あるいは安価な OA 用スキャナーで解析できることが期待できる

Avidin-Biotinylated peroxidase Complex 法を検出系に選択し、臨床検体を用いて検討を行なった結果、腫瘍組織での遺伝子の連続的なメチル化を特異的に検出できることを見出した(Fig. 6)。この結果は bisulfite sequencing 法によっても支持され、この方法論は広範囲な配列に適用可能であること、また、実配列にも適用可能であることを明らかにした。この手法を利用することにより、これまで研究用途中心だったマイクロアレイ技術が、より厳密で低コストが求められる診断用途へ応用できることが期待できる。

これを要するに、筆者は、カルボジイミド基を利用した新しい DNA 標識方法の確立とそれを活用した遺伝子解析技術の道を開拓した。さらに、カルボジイミド基の特性を利用した新規 DNA 固定方法の開発を行なう過程で、紫外線照射によってカルボジイミド基と DNA との反応が促進されるとい新見を得たものであり、且つ従来のマイクロアレイ技術に比べて、コスト的に安価で操作性やハイブリダイゼーションの感度及び特異性に優れた方法論を確立したという成果も挙げている。これらの知見は、診断利用を含めた遺伝子解析技術の発展に大いに貢献するものである。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。

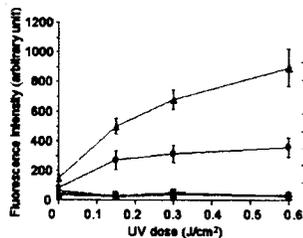


Fig. 4 Effect of UV-irradiation on hybridization efficiency. Signal intensities produced upon hybridization of HEX-labeled oligonucleotide targets to eight different spotted oligonucleotide probes at 0 to 0.6 J/cm² of UV-irradiation. Oligonucleotide probe sequences were as follows: 5'-GAGTATCATGAG-3', X is thymine (Probe 1), adenine (Probe 2), guanine (Probe 3) and cytosine (Probe 4), respectively; 5'-CGCATXACGC-3', X is thymine (Probe 5), adenine (Probe 6), guanine (Probe 7) and cytosine (Probe 8), respectively. The slides were hybridized in parallel with two different HEX-labeled oligonucleotides (12-mer and 10-mer), and washed briefly. Oligonucleotide target sequences were as follows: 3'-CTCATAATATC-5' and 3'-GCCTAATGCG-5'. Positions of nucleotide substitutions are underlined.

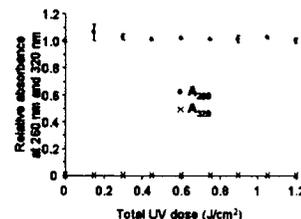


Fig. 5 Relative absorbance in UV-irradiated oligonucleotide (Probe 1) ranging from 0 to 1.2 J/cm². The doses are plotted as the sum of doses at each absorbance (260 nm and 320 nm).

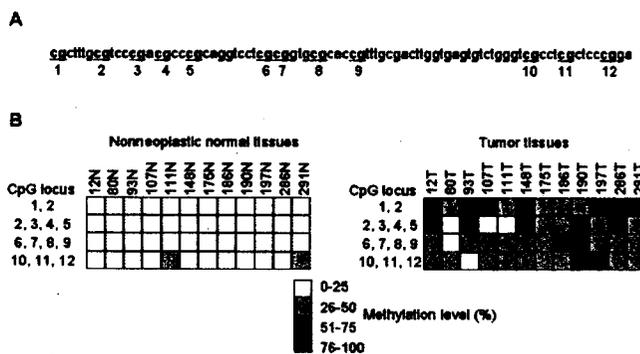


Fig. 6 The 12 CpG sites located in exon 1 tested in this study were underlined and shown in bold and the CpG islands (A). Methylation analysis of 12 CpG sites in *MGMT* promoter on DNA extracted from human colorectal cancer tissue and counterpart non-neoplastic normal mucosa by oligonucleotide microarray (B).