

極微量重差分化法の開発と応用

Development and application of nano-subtraction technique

野島 博 (Nojima Hiroshi)

大阪大学・微生物病研究所・教授



研究の概要

チャム RNA (Chum-RNA) と名付けた小さな RNA 分子を考案することにより、1 個のヒト細胞由来の mRNA から PCR 増幅無しに高品質な cDNA ライブラリーを作製する技術を開発した。この技術は、重要な生理機能を持つ遺伝子単離に有用な重差分化法 (多段差引法) の極微量実験系での展開を可能にするのみでなく、幅広い極微量分野に応用できる。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：cDNA ライブラリー、極微量、T7 RNA ポリメラーゼ、Chum-RNA、多段差引法

1. 研究開始当初の背景・動機

申請者はこれまでに新しいコンピテントセル作製法や重差分化法 (段階的サブトラクション法; 多段差引法) という独創的な技術を開発してきた。本研究の動機は、この技術を 1 個の細胞を対象とした極微のレベルで実現したいと望んだ事である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)極微量多段差引法を実践的に可能とする独自の技術を開発すること、(2)多段差引法の有用性を証明するため、多段差引法によって単離した新規な遺伝子の機能解析を進めること、(3)多段差引法の応用範囲を拡充することである。

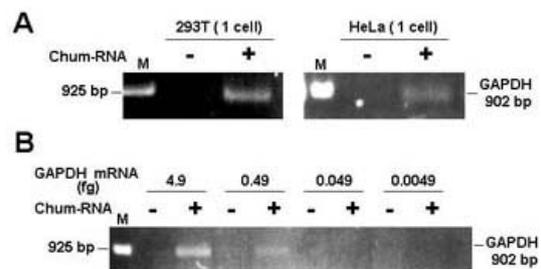
3. 研究の方法

高性能の顕微鏡システムや遺伝子導入機器を導入し、分子細胞生物学、生化学、分子遺伝学的な技術を駆使して個体・細胞・分子レベルでの研究を展開した。

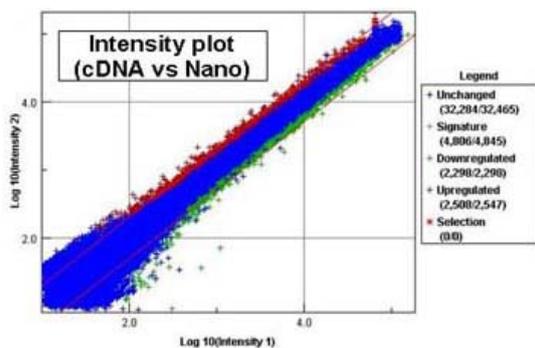
4. 研究の主な成果

(1) 1 個のヒト細胞に存在する全 RNA 量は約 15pg (0.27 pM) と極微量なので至適基質濃度が μM 程度の cDNA ライブラリー作製用酵素を働かせるには増幅が必要となる。ここで PCR による指数関数的増幅に頼ると遺伝子ごとの偏った増幅が起こるため、極低濃度では反応が開始しない RNA ポリメラーゼを使った線形増幅を進めることが必要となる。この困難を解決するため、私は魚釣りに使う撒き餌 (チャム; Chum)

を真似た小さな RNA 分子 (Chum-RNA: 5'-AAUUCGUCUGGACACGA₂₅-3') を考案した。これを $3\mu\text{M}$ 加えて 1 個相当のヒト細胞 (293T・HeLa) 由来の極微量 mRNA を反応開始基質として逆転写酵素を働かせたところ、Chum-RNA を加えた場合にのみ cDNA が生合成された (ここでは生合成された GAPDH の cDNA を PCR により検出した) (下図 A)。さらに、*in vitro* でプラスミドより T7 RNA ポリメラーゼを用いて生合成・純化した GAPDH mRNA を基質にして逆転写酵素を働かせたところ、Chum-RNA を加えさえすれば、わずか 0.47 フェムト (10 のマイナス 15 乗) グラム (femtogram: fg) の GAPDH mRNA に対してさえ逆転写酵素反応が開始することが分かった (下図 B)。これは、730 分子数の GAPDH mRNA に相当する低濃度であり、一個のヒト細胞には平均して 200 万分子 (2×10^6 個) の mRNA が存在するというデータを考慮すると、0.04% という 1 個のヒト細胞の中でも存在量の少ない種類の mRNA でも十分に逆転写酵素反応を開始させる事ができることを示唆する。



次に、1個相当のヒト細胞(293T)由来の極微量 mRNA を出発点として Chum-RNA を加えながら cDNA ライブラリーを作製した。すると4回の増幅過程を進めた後で 6.6×10^5 cfu の独立クローンを持つ高品質な cDNA ライブラリーを作製できた。この cDNA ライブラリーより抽出した cDNA を基質とし、T7 RNAポリメラーゼを用いて蛍光試薬(Cy3)で標識しながら mRNA を *in vitro* で生合成した。対照として100万個の293T細胞由来の mRNA を出発点として増幅なしで cDNA ライブラリーを作製し、蛍光試薬(Cy5)で標識しながら mRNA を *in vitro* で生合成した。まず、両者のサイズ分布を Agilent 2100 Bioanalyzer (G2940BA) により比較したところ、両者は区別が付かないほど同程度に万遍無い広範囲に亘るサイズ分布を示した。さらに Agilent の DNA マイクロアレイ(Hu44K)を用いて、両者を2色法にてスクリーニングしたところ、両者とも同等の多様性をもって多数の cDNA とハイブリダイズした。すなわち、90% (37,327)以上のスポットの偏差が2倍以内に収まった(下図C)。この結果は Chum-RNA の存在下で作製した1個相当の293T細胞由来の cDNA ライブラリーは、非常に高品質であり、サイズ分布のみでなく cDNA の多様性においても100万個の293T細胞由来の cDNA ライブラリーと比べて遜色ないことを示す。



(2)多段差引法によって単離してきた遺伝子群の機能解析によって、この技術の有用性を証明してゆくことができた。その内容は、(A) 分裂酵母における減数分裂制御機構の解析、(B) G0 期制御機構の解析、(C) Tisp40 の精子形成における機能解析、(D) Lats2 の細胞周期制御における機能解析、(E) GAK/CyG/PP2A 複合体の機能解析、(F) ヒト ES 細胞特異的遺伝子の包括的な単離、である。

(3)ゲノム情報を利用して多段差引法の応用範囲を拡充することができた。その内容は、(G) 癌自然転移阻害薬の開発研究、(H) 新たな RNA 血液診断システムの開発研究、(I) 自己免疫疾患への応用研究である。上記、研究成果の詳細は冊子体の基盤 S 報告書に記述した。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト
これら成果を発表した論文のうちインパクトファクター(IF, 2006年)が5.5以上なのは、Cell, Genes Dev, Blood, JCB, JCS 3報, NAR 2報, JBC 2報である。3つの論文は発表した雑誌の表紙を飾った。また特許を2件取得し、12件を新たに申請した。これらのことは、本研究成果の学術的な位置づけとインパクトの高さを示している。

6. 主な発表論文

- (研究代表者は太字、研究分担者には下線)
- (1) Ohba Y, Kanao Y, Morita N, Fujii E, Hohrai M, Takatsuji M, Hirose H, Miura D, Watari A, Yutsudo M, Zhao H, Yabuta N, Ito A, Kita Y, **Nojima H**. Oleamide derivatives suppress the spontaneous metastasis by inhibiting connexin 26. *Int J Cancer* 121(1):47-54, 2007.
 - (2) Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, Fujimori A, Okuzaki D, Zhao H, Ikawa M, Okabe M, **Nojima H**. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J. Biol. Chem.*, 282(26):19259-71, 2007.
 - (3) Saito TT, Okuzaki D, **Nojima H**. Mcp5, a meiotic cell cortex protein, is required for nuclear movement mediated by dynein and microtubules in fission yeast. *J. Cell. Biol.*, 173(1): 27-33, 2006.
 - (4) Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, **Nojima H**, Looijenga LH, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 124(6):1169-1181, 2006.
 - (5) Nagamori I, Yomogida K, Adams PD, Sassone-Corsi P, **Nojima H**. Transcription factors CREM and Tisp40 act in concert in post-meiotic transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 281(22): 15073-15081, 2006.
 - (6) Aylon Y, Michael D, Shmuel A, Yabuta N, **Nojima H**, Oren M. A positive feed back loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Gene Dev.*, 20(19): 2687-700, 2006.
 - (7) Yabuta N, Onda H, Watanabe M, Yoshioka N, Nagamori I, Funatsu T, Toji S, Tamai K, **Nojima H**. Isolation and characterization of the *TIGA* genes, whose transcripts are induced by growth arrest. *Nuc. Acids Res.*, 34(17): 4878-4892, 2006.

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/molgenet/>