

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 水上 里美

2. 養成カリキュラム名: マイクロアレイ技術を用いた革新的バイオアッセイ法開発技術者の養成

3. 養成カリキュラムの達成状況

今年度前期でマイクロアレイの技術や解析方法を習得し、後期で酵母 cDNA マイクロアレイの基礎的なデータ解析について検討を行い、トキシコゲノミクスにおける酵母 cDNA マイクロアレイの標準化を試みた。またこの解析方法をもとに、酵母 cDNA マイクロアレイを用いたトリウム毒性評価を行った。前者においては現在論文を投稿中であり、今年度の養成カリキュラムは達成していると考えられる。

4. 成果

近年トキシコゲノミクス分野において、マイクロアレイは強力な道具の一つになりつつある。しかしマイクロアレイは未だ発展段階にあり、標準的な解析方法は確立されていないのが実状である。遺伝子発現プロファイリングにおいて、これら解析方法の違いはデータのばらつきの原因になると考えられる。この問題を解決するため多くの解析方法が提案されているが、これらの方法をトキシコゲノミクス分野に用いた場合、環境サンプルが少ないこと、実験コストが高いことなどの問題点から、実際に用いることが難しいと考えられる。本研究ではトキシコゲノミクスにおける cDNA マイクロアレイ解析の標準化を試みるため 1) 酵母 cDNA マイクロアレイの基礎的なデータ解析について検討を行い、次に実際に 1) で確立された解析方法を用いて 2) 酵母 cDNA マイクロアレイを用いたトリウム毒性評価を行った。

1) 酵母 cDNA マイクロアレイの基礎的なデータ解析についての検討

マイクロアレイデータの“ばらつき”の要因として、2つの要因が挙げられる。ひとつは“技術的ばらつき”であり、アレイのデザイン、RNAの抽出、ハイブリダイゼーションやCyダイの取り込みが、原因であると考えられる。他方は“生物学的ばらつき”であり、扱う生物の属や種、その培養条件や生育ステージが原因であると考えられる。そこで本研究ではこれら“ばらつき”の要因を取り除き正確なデータを得ることを目的に、マイクロアレイの基礎的なデータ解析について検討を行った。

1 - A) 信頼度の高いスポットを選択する方法

同じロットの酵母細胞から抽出した total RNA を等分し、それぞれ mRNA を精製した。mRNA をそれぞれ Cy3 と Cy5 でラベルしマイクロアレイを行い、得られたデータについて検討を行った。同じサンプルを用いてマイクロアレイを行うので、“誘導”と“抑制”遺伝子の数は 0 になると予想されたが、“誘導”と“抑制”遺伝子(ばらつき)が数%検出された。そこでバックグラウンドの平均値(Av)と標準偏差(Sd)からカットオフ値を算出し、信頼度の高いスポットを選択する方法を検討した。その結果、Sd 値を 1 倍から 3 倍に増加させることで、“ばらつき”の数が減少することが明らかになった。バックグラウンド強度が低い場合、Sd 値は 1 倍で良いが、バックグラウンド強度が高い場合は 3 倍にする必要があった。これらの結果からカットオフ値(Av + Sd < カットオフ値 < Av + 3 Sd)を利用することにより、信頼の高いデータが得られると考えられる。

1 - B) データの信頼性と実験回数との関係

“技術的ばらつき”と“生物学的ばらつき”を取り除き正確なデータを得るため、データの信

信頼度と実験回数との関係を検討した。始めに“技術的ばらつき”について検討した。同じロットの酵母細胞から抽出した total RNA を等分し、それぞれ mRNA を精製した。その mRNA をそれぞれ Cy3 と Cy5 でラベルし、マイクロアレイを行った。同じサンプルを用いてマイクロアレイを行うので、“誘導”と“抑制”遺伝子(ばらつき)の数は0になると予想されたが、全スポットの数%に相当する“ばらつき”が検出された。この結果に対し以下3つの解析方法、各スポットの発現率を平均する方法、各スポットの発現強度を平均し発現率を求める方法、再現性の高い結果を採用する方法、を用いて解析を行い、データの信頼度と実験回数との関係について検討を行った。その結果いずれの方法でも実験回数に比例し、“ばらつき”の数が減少することが明らかになった。また2回以上独立した実験を行うと、全ての解析方法で99.7%の信頼度を持つデータが得られることが明らかになった。次に“生物学的ばらつき”について検討した。異なるロットの酵母細胞から total RNA を抽出し、それぞれ mRNA を精製した。その mRNA をそれぞれ Cy3 と Cy5 でラベルし、マイクロアレイを行った。先の実験同様“ばらつき”の数は0になると予想されたが、全スポットの数%に相当する“ばらつき”が検出された。この結果に対し3つの方法を用いて解析を行い、データの信頼度と実験回数との関係を検討した。いずれの方法も実験回数に比例して“ばらつき”の数は減少したが、特にの方法が有効であり、3回以上独立した実験から99.7%の信頼を持つデータを得ることができた。以上の結果から“技術的ばらつき”と“生物学的ばらつき”が除かれた信頼度の高いデータを得るためには、「独立した3回の実験のうち2回以上の実験において2.0倍以上の遺伝子を選択する」方法が有効であることが明らかになった。

2) 酵母 cDNA マイクロアレイを用いたトリウムの毒性評価

先で確立したマイクロアレイデータの解析方法を用い、実際に毒性評価を試みた。化学物質のひとつであるトリウムに着目し、酵母 cDNA マイクロアレイを用いた毒性評価を行った。OD 660nm=1の酵母培養液に硝酸トリウム(0~20mM)を加え、好氣的に振とう培養し(2時間、4時間)、酵母細胞の生育に対するトリウムの影響を検討した。その結果トリウム濃度の増加に比例し、酵母の生育に影響が生じることが明らかになった。トリウム濃度5mMの場合、細胞の増殖に影響はみられたが生菌数に影響はみられなかったため、この条件下の細胞を用いて酵母 cDNA マイクロアレイによるトリウムの影響を検討した。検出された4296個の遺伝子のうち、138遺伝子が誘導遺伝子として検出された。これら誘導遺伝子について MIPS を用いた機能分類を行ったところ、炭素代謝に関与する遺伝子が最も多く誘導され、次にエネルギー、輸送系に関与する遺伝子、セルレスキューに関与する遺伝子が多く誘導されることが明らかになった。セルレスキューに関与する遺伝子では DNA ダメージに関与する遺伝子(DDR48、DDR2)や、酸化ストレスに関与する遺伝子(SOD1、SOD2)が誘導され、またエネルギーに関与する遺伝子ではエタノール発酵に関与する遺伝子(ACS1、ADL6、PDC5、TDH1)が誘導された。輸送系に関与する遺伝子ではグルコースの取り込みに働く遺伝子(HXT5、6、12、13、16)やマルトース、ガラクトースなど糖の取り込みに関与する遺伝子(JEN1、MAL31、GAL2、MAL11)が誘導された。酵母はトリウムにより酸化ストレスとDNAダメージを生じるが、それを回避するため好気呼吸から嫌気呼吸へ移行し、酸化ストレスの少ないエタノール発酵でエネルギー合成を行うことが推察される。現在我々の研究室では酵母 DNA マイクロアレイを用いた化学物質の毒性評価を行い、100種類以上の化学物質についてデータベース化を試みている。そのうち、数十の化学物質データについては、既にホームページ上で公開している (<http://kasumi.nibh.go.jp/~egenomix/>)。これらデータベースを用い、トリウムの遺伝子発現データに対する階層的クラスター解析を行った。その結果トリウムは既存の化学物質と異なる位置にクラスターを形成することが明らかになった。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表(論文掲載済、または査読済を対象。)

水上里美、岩橋均 「放射線による遺伝子発現 DNAマイクロアレイによる解析」
第5回環境放射能・放射線 夏の学校 論文集

(2) 口頭発表(発表済を対象。)

・ 日本農芸化学会 2004年大会 2004年3月

「トリウム酵母に対する影響」水上里美、R Rakwal、岩橋均

・ 情報計算化学生物学会 2003年9月

「Fundamental examination of data evaluation for Yeast cDNA microarray」

S Mizukami, Y Suzuki, H Iwahashi

・ 日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会日本農芸化学会 2003年8月

「酵母DNAマイクロアレイによる環境毒性評価とその標準化」水上里美、金賢珠、岩橋均

(3) 特許等の出願件数

なし