2次元ディファレンシャルディスプレイ法を用いた 甲状腺癌における遺伝子発現の解析

浅川順一*・小平美江子*・石川直文**・伊藤国彦**
伊藤公一**・長瀧重信*

SUMMARY

We have developed a novel two-dimensional display method of cDNA and compared the gene expression profile between human normal thyroid and papillary carcinoma. The cDNAs were synthesized with a *Not* I anchor primer from mRNAs prepared from surgery materials. The cDNAs were digested with three restriction enzymes, *Not* I, *Eco* RV, and *Pvu* II. The protruding *Not* I ends were filled in with ^{32}P deoxynucleotides and the isotope-labeled cDNA fragments were separated into two dimensions. The cDNAs were *in situ* digested with *Hinf* I before the second dimension electrophoresis. Using our conditions, approximately 500 cDNA fragments were visualized as major discrete spots on a single autoradiogram without probes. We cloned two cDNA spots selected from among a number of spots which showed apparently different intensities between normal thyroid and papillary carcinoma. One spot (Nc-4) was more intense in the normal tissue than in the tumor and the other (Pc-1) was more intense in the tumor. A Northern blot analysis with clone Nc-4 showed high expression in a normal thyroid sample but low expression in a papillary carcinoma sample. A Northern blot analysis with the Pc-1 clone confirmed the over-expression of this mRNA in papillary carcinomas. This method of separating the labeled cDNA into two dimensions is much more accurate and powerful than conventional differential display methods. In addition, this method is quite rapid; one can conduct a series of experiments, gel preparation and cloning, within about 10 days. We believe that this approach, in combination with 2D genomic DNA analysis, is useful for cancer research.

Key words: gene expression, mRNA, cDNA, two-dimensional electrophoresis.

はじめに

甲状腺乳頭癌は原爆被爆者で増加の見られる最初の固形癌の一つである。癌と正常細胞、あるいは悪性と良性腫瘍細胞の間には、当然発現している機能蛋白に差があると考えられる。甲状腺組織においては正常組織と癌組織との差を蛋白質レベルで調べるよりも、その前駆体である mRNA レベルで調べるほうがより簡単である。甲状腺乳頭癌の成因やマーカーを明らかにする目的で cDNA の 2 次元解析法を用いてヒト正常甲状腺と乳頭癌での遺伝子発

現プロファイルを比較検討した。手術試料より抽出した mRNA より *Not* I 認識配列を組み込んだオリゴ (dT)_n プライマーを用いて cDNA を合成した。cDNA は 3 種類の制限酵素: *Not* I, *Eco* RV, および *Pvu* II で消化した。*Not* I 突出末端を T7 polymerase でラディオアイソトープ標識した cDNA 断片を 2 次元分離した。1 次元目の電気泳動後 *Hinf* I でゲル中の cDNA を制限酵素消化し、2 次元目の電気泳動を行った。私たちの条件では、1 枚のゲル当たり約 500 個の cDNA 断片を明瞭なスポットとしてブロープなしで検出できる。著者の開発した方法は PCR を

Analysis of gene expression in thyroid cancer by using a novel two-dimensional display method of cDNA.

* Jun-ichi Asakawa, Mieko Kodaira, Shigenobu Nagataki; 放射線影響研究所

** Naofumi Ishikawa, Kunihiro Itoh, Koichi Itoh; 伊藤病院 (東京都・渋谷区)

Correspondence address: Jun-ichi Asakawa, Department of Genetics, Radiation Effects Research Foundation, 5-2, Hijiyama park, Minami-ku, Hiroshima 732-0815, Japan.

第 50 回日本電気泳動学会総会・サテライトシンポジウム

用いずに合成した cDNA を末端標識し 2 次元に分離するもので、検出されるスポット濃度は mRNA 量を正確に反映している。通常の 1 次元ディファレンシャルディスプレイ法に比べ定量性と分離能の点で優れており、発現量の異なる遺伝子を効率よく検索できると考えられる。既存の RLCS (Restriction Landmark cDNA Scanning) 法¹⁾に比べて操作が簡便になるように、より高感度に cDNA 断片が検出できるよう改良を行った。ゲノム DNA 断片の 2 次元電気泳動と同じ方法でオートラジオグラフィー後の乾燥したゲルの目的スポットから cDNA を回収し、クローニングも可能である。本法は極めて迅速であり、ゲルの準備からクローニングといった一連の実験を 10 日以内で行うことができる。このアプローチは、比較的容易に取りかかれる有効な癌研究法であると考えられる。

試料および方法

1. 試料

研究に用いた甲状腺組織は伊藤病院（東京）での手術で得られたものであり、患者の同意の元に研究試料として供与された。試料は -80°C に保存し、用時 RNA の抽出を行った。

2. 方法

cDNA の 2 次元ディファレンシャルディスプレイ法の

概要を図 1 に示した。この方法では PCR を用いないので約 $100\text{ }\mu\text{g}$ の RNA を必要とする。ヒト甲状腺の場合、 $0.1\sim 0.2\text{ g}$ の凍結組織を粉末にし、GIBCO BRL 社の TRIZOL 試薬を用いた酸性グアニジン-フェノール-クロロフォルム法で RNA を抽出する。mRNA はオリゴ dT セルロースカラムを用いて調製する。2 本鎖 cDNA の合成は 4 種類の RT オリゴプライマー: GACTAGTTCTAGATCGC-GAGCGGCCCGCCCT₁₅MN (M は G, A, C のミックス, N は G, A, T, C のどれか一つ) と, SUPERScriptII を用い BRL 社の cDNA 合成キットと組み合わせている。できるだけ分解の少ない RNA から純度の高い mRNA を調製することが実験の正否を大きく左右する。合成した cDNA は RNase 処理, フェノール処理を行う。エタノール沈殿して回収した cDNA は *Not* I/*Eco* RV/*Pvu* II を加えて制限酵素消化する (この組み合わせだと同じ条件で一度に反応させられる。しかもアイソトープは *Not* I 切断点のみに取り込まれる)。私たちは独自に開発したクローニング法²⁾を用いているので、制限酵素消化反応液の 1/5 量をラジオアイソトープ標識している。*Not* I 切断点を標識後、未標識の反応液と合わせて 2 次元電気泳動を行う。電気泳動法の詳細はゲノム DNA の 2 次元電気泳動法³⁾に従った。クローニングを目的としない場合には約 $20\text{ }\mu\text{g}$ の RNA に相当する mRNA (約 $0.2\text{ }\mu\text{g}$) で 1 枚のゲルを作製できる。

結 果

4 種類の RT プライマーを用いて合成した cDNA の 2 次元電気泳動パターンを図 2 に示した。KODAK 社 BIO MAX 高感度フィルムと増感紙を用いて -80°C でオートラジオグラフィーを行った。前述したように約 $0.2\text{ }\mu\text{g}$ 相当の mRNA より合成したものであるが、発現量の多い遺伝子 cDNA は数時間のオートラジオグラフィーで十分に観察できる。図に示したパターンは 2 日間オートラジオグラフィーを行ったもので、約 300~400 個のスポットが検出された。当然のことであるが暴露時間を長くすれば可視化される個数は増えてくるが、バックグラウンドも高くなってくる。cDNA は *Not* I 切断点のみを標識しているため、個々のスポットの濃度は遺伝子コピー数すなわち遺伝子量を定量的に反映していると考えられる。しかしながら、シングルスポットに見えるものでも、いくつかの遺伝子断片が同じ所に電気泳動され重複している場合がある。また、遺伝子塩基配列に *Not* I 認識部位がある場合にはその遺伝子は複数のスポットとして可視化される。異なる RT プライマーを用いたが、図 2 に見られるように多くのスポットが濃度に差はあるものの別のプライマーを用いたパターンにも同じ位置に認められた。これらのスポットは必ずしも同じ cDNA 断片ではないかもしれない。こうい

図 1. cDNA 2 次元電気泳動法概要模式図。

った観察事実より、プライマーごとに poly T (私たちのプライマーでは T15) に続く 2 塩基を特異的に設定することで、poly A RNA の poly A テールに続く 2 塩基配列特異的 mRNA のみを検出することは困難と考えられた。少ない試料の場合には 4 種類のプライマーを等量ずつ混合

して用いるのが良いと思われる。cDNA のサイズをそろえるために *Not* I と組み合わせている制限酵素の種類を変えてみる試みで、より多くの cDNA を分離検出できると思われる。

同一患者由来の正常甲状腺と乳頭癌における遺伝子発現を RT プライマー A を用いて比較した。非常によく似たパターンが認められたが、特に正常と癌との間で顕著な濃度差が認められた部分の拡大を図 3 に示した。一つのスポット (Nc-4) は正常組織でより強いスポットとして、もう一つのスポット (Pc-1) は癌でより強いスポットとして認められた。オートラジオグラフィー後の乾燥ゲルより cDNA を抽出し *Hinf* I ベクターにクローニングした²⁾。クローン化しスポットの塩基配列を調べたところ、Nc-4 は 3 種類以上の cDNA の混ざったものであり、Nc-4-12 と命名したクローンが主成分であった。発現量を調べるためにノザンプロット解析を行った。

実験開始当初に調製した RNA では、組織の長期保存や凍結融解を繰り返したことによる mRNA により正確な推定はできなかった。正常組織・乳頭癌それぞれ 2 例より抽出した分解の少ない良質の RNA を用いたノザンプロット解析例を図 4 に示した。コントロールとして β アクチンと GAPDH の発現量を最下段に示した。Pc-1 についてのノザンプロット解析では、この mRNA は乳頭癌で大過剰に発現していた。Nc-4-12 をプローブとしたノザンプロット解析でこの遺伝子は正常甲状腺で発現量が高く、乳頭癌では発現量が低いことが確認された。これらの結果は cDNA の 2 次元電気泳動で得られた結果とよく一致しており、この方法の精度の高さを示している。これら二つの遺伝子は塩基配列も決定しており、PCR で簡単に増幅できるしクローン化も行っているの、甲状腺乳頭癌判定のマーカーとして有用であると考えられる。

図 2. 異なる RT プライマーを用いた cDNA 2 次元電気泳動像。

Normal Thyroid

Papillary Thyroid Carcinoma

図 3. 正常甲状腺および乳頭癌 cDNA 2 次元電気泳動像比較：部分拡大図。

図4. ノザンプロット法による正常甲状腺および乳頭癌での2遺伝子の発現量比較.

まとめ

1. 新規に開発した *Not* I 末端を標識した cDNA の2

次元電気泳動法を用い、同一患者正常甲状腺と乳頭癌における遺伝子発現プロファイルを比較検討した。

2. 目的のスポットから cDNA を回収しクローニングする方法を確立した。癌組織で正常組織のものに比べ、より小さなスポット (Nc-4)、より大きなスポット (Pc-1) のクローン化を行った。

3. Nc-4 をプローブとしたノザンプロット解析でこの遺伝子は正常甲状腺で発現量が高く、乳頭癌では発現量が低いことが確認された。

4. Pc-1 のノザンプロット解析でこの遺伝子は乳頭癌で大過剰に発現していることが確認された。

5. 本法は通常のディファレンシャルディスプレイ法に比べ高分離で、より多くの情報が得られる。さらに極めて迅速であり、ゲルの準備からクローン化までの実験を10日以内で行うことができる。ゲノム DNA の2次元電気泳動法と組み合わせたこのアプローチは、癌研究において簡便かつ有効な方法であると考えられる。

文 献

- 1) Suzuki H, Yaoi T, Kawai J, Hara A, Kawajima G, Watanabe S. Restriction landmark cDNA scanning (RLCS): A novel cDNA display system using two-dimensional gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res* 1996; 24: 289-294.
- 2) 浅川順一. 2次元電気泳動のゲルからの蛋白・核酸の回収と同定; 核酸-DNA クローニング. 最新電気泳動実験法(日本電気泳動学会編). 東京: 医歯薬出版, 1999: 250-255.
- 3) 浅川順一. 2次元電気泳動法; ゲノム解析(1)ゲノムスクリーニング-RLGS 法. 最新電気泳動実験法(日本電気泳動学会編). 東京: 医歯薬出版, 1999: 95-103.