

## マウス長鎖 cDNA の取得・構造解析とそのための効率化技術の開発

### テーマ1の2 (地域分)

- ①マウス長鎖 cDNA クローンを効率的取得技術の開発
- ②脳由来 cDNA ライブラリー作製
- ③cDNA クローン取得
- ④マウス長鎖 cDNA アレイの作製
- ⑤mKIAA 遺伝子の完全長化
- ⑥マウス長鎖 cDNA クローン(mKIBB)の全長塩基配列決定

(財) かずさ DNA 研究所 (室長) 長瀬 隆弘

#### 【目的と概要】

本サブテーマの目的は、他のサブテーマに先行し最も基本的なリソースたる cDNA を効率的に取得し、その構造解析をバイオインフォマティクスのノウハウを生かし達成することにある。具体的には、テーマ1-1で全長配列解析を行なうクローンの選り出しをするための、遺伝子ソースとなる各種 cDNA ライブラリーの構築からコンピュータによる解析までを本サブテーマの本幹とした。これに加え、末端配列解析では同定できないマウス相同遺伝子に対して、hybridization 技術を利用して新たな方法も確立した。フェーズ I から II へのプロジェクトに進行に伴い、クローン選り出し以外にも、テーマ1で精製したクローンとテーマ3で確立した技術を用いて cDNA マイクロアレイの作製も行った。さらに完全長でないものに関しては平成 16 年のより、本サブテーマにおいてその全長化も図った。最終年度においては全長配列解析を本サブテーマにも適応し、既知マウス長鎖 cDNA(mKIBB)クローンの全長配列解析も行なった。

#### 【研究成果の概要と今後の取り組み】

##### (1) cDNA ライブラリーの構築からコンピュータによる解析まで

小原らの開発した *In vitro* Recombination-Assisted Method(Methods Mol Biol. 2003;221:59-71, Nucleic Acids Res. 2001 Feb 15;29(4):E22)を用いて、複数の成体マウス組織由来のライブラリーを作製した。具体的には図1に示すように、相同組換え技術で cloning vector へ組み込む前後の実験段階で2度にわたり、アガロースゲル上でサイズ分画することで、目的にサイズの cDNA 断片のみが含まれたライブラリーを作製した。実際これらのライブラリーを末端配列解析に供する、ヒト遺伝子との相同性からそのサイズ分画に存在が期待された遺伝子が効率に取得できるようになった。

##### (2) 末端配列解析では同定できないマウス相同遺伝子の同定

3'または5'末端配列結果をヒトの遺伝子に対して blast search することで約97%のマウス KIAA 遺伝子が取得できたが、約170,000末端配列プールからも同定できない遺伝子が存在することが分った。そのうちあるものはヒト特異的遺伝子である可能性があったので、様々な種の DNA をブロットした Zoo blot を用いて、その存在そのものを確認した。その結果、図2に示すごとく mKIAA0955などは、緩い hybridization の条件でもヒトプローブに結合するのはヒト遺伝子しかなく、ヒト特異的遺伝子であることが明らかとなった。このこと自体は新たな知見として重要だが、マウスに存在するにも関わらず取得できない遺伝子に対する新たな方法の確立が必須であり、それに対しても本事業で取り組んだ。そして確立した方法が図3にその概略を示した、MUCH という手法である。簡単に説明すると、ターゲットとするヒト KIAA cRNA を合成しナイロン膜にスポットング後、PCRによって増幅したマウス cDNA 短フラグメントをハイブリダイズする。ハイブリダイズした短フラグメントを PCR で増幅後、再度ハイブリダイズを行ってこの断片を濃縮していく。複数回のハイブリダイズで、目的のマウス cDNA 断片が得られるというものである。最終的にはこの断片をプローブに全長クローンを screening する必要はあるが、この手法で複数の mKIAA 遺伝子が同定可能となった。

#### 【特許の出願】

#### 【2006年までの主な成果】

- 8 Ohara R, Koga H, Kikuno R, Ohara O. Method for systematic targeted isolation of homologous cDNA fragments in a multiplex format. *Biotechniques*. 2004, 36(5):798-800, 802, 804 passim
- 9 Kikuno R, Nagase T, Nakayama M, Koga H, Okazaki N, Nakajima D, Ohara O. HUGE: a database for human KIAA proteins, a 2004 update integrating HUGEppi and ROUGE. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32(Database issue):D502-504
- 10 Nakajima D, Saito K, Yamakawa H, Kikuno R, Nakayama M, Ohara R, Okazaki N, Koga H, Nagase T, Ohara O, Preparation of a set of expression-ready clones of mammalian long cDNAs encoding large proteins by the ORF trap cloning method, *DNA Res.*, 2005, 12 257-267
- 11 Nagase T, Koga H, Ohara O, Kazusa Mammalian cDNA Resources: Towards Functional Characterization of KIAA Gene Products, *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 5, 2006. Pp4-7

