

高速塩基配列解読技術を SuperSAGE 法に活用した  
網羅的遺伝子発現解析法マニュアル

2010年3月

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム

## 目次

1. はじめに	・・・	3
2. 発現タグライブラリー作製に必要な試薬および消耗品	・・・	6
3. 本解析法で使用するオリゴヌクレオチドの調製	・・・	7
4. 発現タグライブラリーの作製プロトコール	・・・	9
5. 塩基配列解読結果からの発現タグの抽出	・・・	17
6. カウント数差の比較による遺伝子発現の変動解析	・・・	19
7. タグ配列の発現遺伝子への対応付け	・・・	21
8. 参考文献	・・・	22
9. 問い合わせ先等	・・・	23

## 1. はじめに

### 1) 背景

シロイヌナズナ、イネ等、モデル植物では発現遺伝子情報の蓄積により、マイクロアレイによる遺伝子発現変動の網羅的な解析が可能となった。しかし、農作物をはじめとする多くの生物種では発現遺伝子情報の整備がほとんど進んでおらず、網羅的なアレイプローブの設計ができないため、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析は不可能である。

Sereal Analysis of Gene Expression (SAGE)法は、遺伝子の発現量を発現遺伝子を代表する「発現タグ (以下タグ)」のカウント数により評価する手法である (Velculescu *et al.*, 1995)。SAGE 法は前もって発現遺伝子配列の情報を必要としないため、農作物のような生物種においても網羅的な遺伝子発現解析が可能である。しかし、従来のサンガー法に基づく塩基配列解読によるタグ配列取得には、多大な時間・労力・コストを要するという問題があった。近年、次世代シーケンサーの登場により塩基配列解読技術が飛躍的に進歩し、SAGE 法にもその応用が試みられた結果、タグ取得の効率が大幅に向上した。しかし、従来法では取得できるタグの塩基長は最大でも 21 塩基にとどまるため、取得したタグ配列には複数の発現遺伝子に由来するタグが縮重している可能性があり、遺伝子発現変動の厳密な生理学的解釈は困難であった。

SuperSAGE 法は、タグの生成に制限酵素 *EcoP15I* を用いることにより、より長鎖のタグ配列 (最大 27 塩基) を取得することができる SAGE 法の改良法である (Matsumura *et al.*, 2003)。独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所では、SuperSAGE 法と高速塩基配列解読技術を融合させることにより、タグ配列と発現遺伝子との厳格な対応付けを可能とする新たな網羅的遺伝子発現解析手法を開発した。本マニュアルでは、「高速塩基配列解読技術を SuperSAGE 法に活用した網羅的遺伝子発現解析法」のための発現タグライブラリーの構築方法と、遺伝子発現変動の解析方法を解説する。

### 2) 本解析法の特徴

#### (1) 発現遺伝子の配列情報が不必要

マイクロアレイ解析はプローブ設計の為に網羅的な発現遺伝子の配列情報が必要であるが、本解析法を利用することにより、農作物等、発現遺伝子情報の

整備が進んでいない生物種でも網羅的な遺伝子発現解析が可能である。

(2) 次世代シーケンサーを利用した超高速な発現タグ取得

従来の SAGE 解析ではサンガー法により発現タグを取得するため、多大な時間・労力・コストを要した。本解析法ではイルミナ社次世代シーケンサー Genome Analyzer II (GAII) を利用することにより、一度の解析で 400 万を超える発現タグの取得が可能である。

(3) 24 塩基長のタグ配列の取得が可能

従来法では最大 21 塩基しかタグ配列を取得できなかったが、SuperSAGE 法を応用することにより最大 27 塩基（通常 24 塩基で解析を行う）のタグ配列の取得が可能である。これにより、タグ配列と発現遺伝子との厳格な対応付けが可能になるとともに、RACE PCR による cDNA のクローニングが容易になった。

3) 本解析法の概略

本解析法のフローチャートを図 1-1 に示した。

植物組織から調製した mRNA より cDNA を合成し、2 つの制限酵素 *Nla*III、*Eco*P15I を利用して発現遺伝子に固有の発現タグを切り出し、イルミナ社次世代シーケンサー Genome Analyzer II (GAII) で解析可能な発現タグライブラリーを構築する (図 1-2)。GAII による発現タグライブラリーの解読塩基配列結果から、発現タグを抽出し、ライブラリー識別配列による分類後、処理区ごとに発現タグ種の出現頻度をカウントする。各発現タグ種の各処理区におけるカウント数は、対応する発現遺伝子の発現量の大小を反映しており、カウント数の処理区間差を統計的に検定することにより、発現量の変動を検出することができる。web ベースのプログラム等を使用することにより、発現タグのデータセットから、網羅的に発現変動遺伝子群を抽出することも可能である。また cDNA 配列等、参照できる発現遺伝子情報があれば、タグ配列を実際の発現遺伝子と対応づけることができ、遺伝子



図 1-1 本解析法のフローチャート

発現変動の生理学的な解釈を行うことができる。本解析法では、24塩基という長鎖のタグ配列を取得するため、興味深い発現変動を示す遺伝子を RACE PCR により直接クローニングすることも可能である。

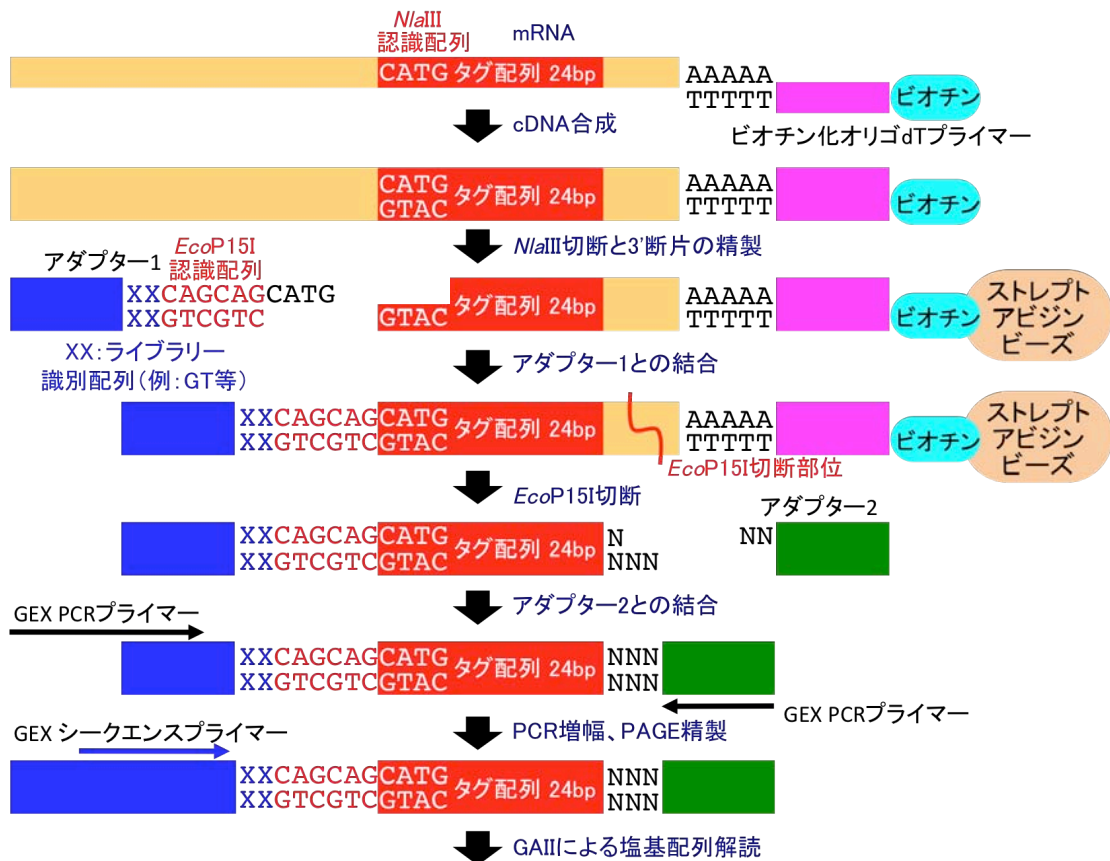


図 1-2 発現タグライブラリー構築の概略図

植物組織から抽出した mRNA からビオチン化オリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成し、*Nla*III で切断する。ストレプトアビジンマグネティックビーズを用いて cDNA の 3' 断片を精製し、アダプター1 を結合させる。*Eco*P15I で切断後、アダプター2 を結合し、アダプター-タグ断片を精製した後に GEX PCR プライマーにより PCR 増幅する。増幅産物を PAGE 精製し、GAI による塩基配列解読に供試する。

## 2. 発現タグライブラリー作製に必要な試薬および消耗品

### 1) 必要な試薬および消耗品

品名	メーカー	カタログ番号
TRIzol試薬	Invitrogen	15596-026
mRNA purification kit	GEヘルスケアバイオサイエンス	27-9258-01
SuperScript® 2本鎖 cDNA合成キット	Invitrogen	11917-010
分子生物学用グリコーゲン	ロシュ・アプライド・サイエンス	901393
NlaIII	NEB	#0125S
T4 DNAリガーゼ (高濃度)	Invitrogen	15224-041
LigaFast™ Rapid DNA Ligation System	Promega	M8221
EcoP15I	NEB	#R0116S
Ligation high Ver. 2	東洋紡	LGK-201
Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic particles	Promega	Z5482
アルカリフォスファターゼ	バイオダイナミクス研究所	DE110
Costar® Spin-X® Centrifuge tube filter	SIGMA-ALDRICH	CLS8163
KOD -Plus-	東洋紡	KOD-201
SYBR green I核酸ゲル染色液	Invitrogen	S7563

### 2) バッファー類

LoTE 3mM Tris-HCl pH7.5, 0.2mM EDTA

2x B&W 10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 2M NaCl

10M 酢酸アンモニウム

### 3. 本解析法で使用するオリゴヌクレオチドの調製

#### 1) 合成オリゴヌクレオチド

・本手法で用いるプライマー配列はイルミナ社によって権利保護されており、その使用についてはイルミナ社が定める条件に従う必要がある。詳細についてはイルミナ社にお問い合わせください。

・合成オリゴヌクレオチドはPAGE精製等により高度に精製されたものを使用する。

#### 2) プライマーおよびアダプター配列

○ビオチン化アダプターオリゴ dT プライマー

ビオチン-5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC**CAGCAG**TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

○アダプター1

アダプター1\_XX\_Aは無標識オリゴヌクレオチド、アダプター1\_XX\_Bはリン酸化オリゴヌクレオチドを用いる。青字のXXはライブラリー識別配列を示し、混合解析を行う場合はライブラリーごとに異なる配列にする。

*EcoP15I* 認識配列

アダプター1\_XX\_A 5'-ACAGGTT**CAGAGT**TCTACAGTCCGACATG**XXCAGCAG**CATG-3'

アダプター1\_XX\_B 3'- CAAGTCTCAAGATGTCAGGCTGTAC**XXGTCGTC**-P-3'

○アダプター2

アダプター2\_Aは無標識プライマー、アダプター2\_Bはリン酸化プライマーを用いる。

アダプター2\_A 5'-CAAGCAGAAGACGGCATA**CGA**-3'

アダプター2\_B 3'-GTTTCGTCTTCTGCCGTATGCT**NN**-P 5'

○GEX PCR プライマー

GEX PCR プライマー1 5'-CAAGCAGAAGACGGCATA**CGA**-3'

GEX PCR プライマー2 5'-AATGATACGGCGACCACCGACAGGTT**CAGAGT**TCTACAGTCCGA-3'

○GEX シークエンスプライマー 5'-CCGACAGGTT**CAGAGT**TCTACAGTCCGACATG-3'

### 3) アダプターの調製

#### ○アダプター1\_XX (200ng/μL)

200μL チューブに以下の試薬を加えよく混ぜる。

アダプター1_GT_A(1μg/μL)	1μL
アダプター1_GT_B(1μg/μL)	1μL
滅菌水	8μL
<hr/>	
合計	10μL

95°Cで2分間インキュベートした後、室温で20分間静置する。

#### ○アダプター2 (1μg/μL)

200μL チューブに以下の試薬を加えよく混ぜる

アダプター2_A(2μg/μL)	5μL
アダプター2_B(2μg/μL)	5μL
<hr/>	
合計	10μL

95°Cで2分間インキュベートした後、室温で20分間静置する。

#### ○アダプター1\_XX、アダプター2 のセルフライゲーションチェック

以下の反応液を調整する

上記で調製したアダプター1_XX 溶液	
またはアダプター2 溶液	1μL
2x Rapid Ligation Buffer	5μL
滅菌水	3μL
T4 DNA ligase(2u/μL) (Promega)	1μL
<hr/>	
合計	10μL

16°Cで一晩インキュベートする。

反応液を TAE-8%アクリルアミドゲル電気泳動で分離し、確実にセルフライゲーションされているかチェックする。



#### 4. 発現タグライブラリーの作製プロトコール

##### 1) mRNA の精製

組織より TRIzol 法 (Invitrogen) 等により total RNA を抽出する。

1mg の total RNA を 1mg/mL となるように nuclease free water に溶かし、mRNA purification kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて poly(A)+ RNA を精製する。

##### 2) cDNA 合成

cDNA 合成は、ビオチン化アダプターオリゴ dT プライマー、SuperScript 2 本鎖 DNA 合成キット (Invitrogen) を用いて行う。

##### ○1st strand cDNA 合成

1.5mL チューブに以下の反応液を調整する。

5x first strand buffer	4 $\mu$ L
10mM dNTP	1 $\mu$ L
ビオチン化オリゴ dT プライマー (5 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
0.1M DTT	2 $\mu$ L
poly(A)+ RNA (5 $\mu$ g)	7 $\mu$ L
SuperScript II RTase	5 $\mu$ L
<hr/>	
合計	20 $\mu$ L

37°C で 1 時間インキュベートする。

##### ○2nd strand cDNA 合成

1st strand cDNA 反応液	20 $\mu$ L
5x 2nd strand reaction buffer	30 $\mu$ L
10mM dNTP	3 $\mu$ L
E. coli ligase (10U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
E. coli DNA Polymerase (10U/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L
E. coli RNaseH (2U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
<hr/>	
合計	150 $\mu$ L

16°C で 2 時間インキュベートする。

○フェノール/クロロホルム抽出

反応液と等量のフェノール/クロロホルムを加え、30 秒ほどボルテックスする。

14,000rpm、4°C で、5 分間遠心し、上清を新しい 1.5mL チューブに移す。

反応液と等量のクロロホルムを加え、30 秒ほどボルテックスする。14,000rpm、4°C で、5 分間遠心し、上清を新しい 1.5mL チューブに移す。

以下フェノール/クロロホルム抽出は同様に行う。

○エタノール沈殿

cDNA 溶液	400μL
10M Ammonium Acetate	100μL
20mg/mL 分子生物学用グリコーゲン (Roche)	3μL
エタノール	1000μL
<hr/>	
合計	1503μL

を加え混ぜる。

-80°C、1 時間

14,000rpm、30 分遠心

70% EtOH で 2 回洗い、乾燥後、20μL の LoTE に溶かす。

○cDNA 合成の確認

cDNA 合成後アガロースゲル電気泳動 (0.7% TAE アガロースゲル) により cDNA の合成を確認する (5μL 1st strand cDNA, 10μL 2nd strand cDNAを泳動後、EtBr 染色により確認)。

3) *Nla*III による cDNA の切断

○*Nla*III 切断

以下の反応液を調整する。

cDNA	20μL
100xBSA	2μL
LoTE	153μL
10xNEB buffer4	20μL
<i>Nla</i> III (10U/μL)	5μL

---

合計 200 $\mu$ L

37°C、1.5 時間インキュベートする。

○フェノール/クロロホルム抽出

○エタノール沈殿

反応液	200 $\mu$ L
10M NH <sub>4</sub> OAc	100 $\mu$ L
グリコーゲン	3 $\mu$ L
エタノール	700 $\mu$ L

---

合計 200 $\mu$ L

-80°C、1 時間

14,000rpm、40 分間遠心

70%エタノールで洗う。

4) cDNA 断片のマグネットビーズへの結合

○マグネットビーズの調整

懸濁した 1mL のストレプトアビジンマグネティックビーズ (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic particles、プロメガ) を 1.5mL チューブにとり、マグネットスタンドにチューブを 1 分間静置し、上清を捨てる。

チューブに 200 $\mu$ L の 1x B&W を加え、マグネットスタンドから取り外し、マグネットビーズをよく懸濁させた後、再度マグネットスタンドに 1 分間静置し上清を捨てる。以下のマグネットビーズを洗う操作も同様にして行う。

1.5mL チューブに以下の溶液を調整する

cDNA 溶液	20 $\mu$ L
2x B&W	100 $\mu$ L
滅菌水	80 $\mu$ L

---

合計 200 $\mu$ L

200 $\mu$ L の cDNA 溶液をビーズに加え、よく混ぜ、室温で 30 分インキュベートする。

400 $\mu$ L の 1x B&W で 3 回マグネットビーズを洗う。

400 $\mu$ L の LoTE で 3 回マグネットビーズを洗う。

#### 5) cDNA 断片とアダプター1 との結合

各処理区由来の cDNA 断片とライブラリー識別配列で区別されたアダプター1\_XX と対応を付け、別々のチューブ内で、cDNA 断片とアダプター1\_XX をライゲーションさせる。

1.5mL チューブ内の cDNA を結合したマグネットビーズに以下の試薬を加え反応液を調製する（他の処理区についても同様に反応液を調整する）。

LoTE	19 $\mu$ L
5xligase buffer	6 $\mu$ L
アダプター1_XX (200ng/ $\mu$ L)	3 $\mu$ L
<hr/>	
合計	28 $\mu$ L

よく混ぜた後、50°Cで2分間、その後室温で15分間インキュベートする。

T4 DNA ligase(5U/ $\mu$ L) (Invitrogen) を2 $\mu$ L加えて混ぜる。

16°C、2時間インキュベートする。

マグネットビーズをそれぞれ400 $\mu$ Lの1x B&Wで4回、LoTEで3回、滅菌水で1回洗う。

#### 6) cDNA 断片の *Eco*P15I による切断

1.5mL チューブ内の cDNA を結合したマグネットビーズに、以下の試薬を加え混ぜる。

10x NEBuffer 3	10 $\mu$ L
10x ATP	10 $\mu$ L
100x BSA	1 $\mu$ L
<i>Eco</i> P15I (10u/ $\mu$ L) (NEB)	10 $\mu$ L
滅菌水	69 $\mu$ L
<hr/>	
合計	100 $\mu$ L

37°C、2時間インキュベートする。

#### 7) アダプター・タグ断片の精製

*Eco*P15I 切断後、反応液の入った1.5mL チューブをマグネットスタンド上に1分間静置し、上清を回収する（上清にアダプター・タグ断片が含まれる）。

マグネットビーズの入ったチューブに100 $\mu$ LのLoTEを加え懸濁後、再度上清を

回収し先の上清と合せる (合計 200 $\mu$ L)。

#### 8) アダプター・タグ断片の脱リン酸化

以下の反応液を調整する。

アダプター・タグ溶液	200 $\mu$ L
添付の 10x 反応バッファー	25 $\mu$ L
滅菌水	24 $\mu$ L
アルカリフォスファターゼ (Biodynamics) (2.5U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
合計	250 $\mu$ L

60 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートする。

フェノール/クロロホルム抽出

エタノール沈殿

反応液	250 $\mu$ L
10M NH <sub>4</sub> OAc	125 $\mu$ L
glycogen	3 $\mu$ L
エタノール	875 $\mu$ L
合計	1253 $\mu$ L

-80 $^{\circ}$ C、1 時間

14,000rpm、40 分間遠心

70%エタノールで洗う。

乾燥後 6 $\mu$ L の LoTE に溶解する。

#### 9) アダプター2 との結合

以下の反応液を調整する。

アダプター・タグ溶液	6 $\mu$ L
アダプター2 (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L
Ligation High mixture (東洋紡)	10 $\mu$ L
合計	20 $\mu$ L

16 $^{\circ}$ C で 4 時間から一晩インキュベートする

## 10) アダプター・タグ断片の PCR 増幅

### ○PCR 反応

ライゲーション反応液の希釈系列 (x5, x10, x20, x100, x200) をつくり、それぞれについて下記の条件で PCR を行う。

10x KOD plus バッファー	5 $\mu$ L
25mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ L
2mM dNTP mix	5 $\mu$ L
35ng/ $\mu$ L GEX PCR プライマー1	2 $\mu$ L
35ng/ $\mu$ L GEX PCR プライマー2	2 $\mu$ L
アダプター・タグ希釈液	2.5 $\mu$ L
KOD plus	1 $\mu$ L
滅菌水	30.5 $\mu$ L
<hr/>	
合計	50 $\mu$ L

### 温度サイクル

98°C 0:30

↓

15 サイクル

98°C 0:10  
60°C 0:30  
68°C 0:15

↓

68°C 10:00

↓

4°C

### ○PAGE による PCR 反応産物の確認

PCR 反応液を 5 $\mu$ L とり、6%の TAE-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する (200V、30~35 分間)。

SIBR green で染色後、セーフイメージャー (Invitrogen) で可視化を行い、アダプター・タグ由来のバンド (~104bp) が良く増幅されており、かつ他のバンド (~47bp: アダプター1 のダイマー由来産物等) の増幅が少ない条件 (アダプター・

タグ溶液の希釈倍率) を選択する。

#### 1 1) PAGE によるアダプター・タグ増幅断片の精製

増幅効率の良かった希釈倍率の残りの PCR 反応液を 6% の TAE-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する (200V、30~35 分間)。

SIBR green で染色、セーフイメージャー (Invitrogen) で可視化を行い、~104bp のバンドを切り出す。

0.5mL チューブの底に注射針で穴を開け、ゲル片を入れる

ゲルの入った 0.5mL チューブを 2mL チューブに入れ 14,000rpm で 2 分間遠心する。ゲルはチューブの穴を通過する過程で細かく粉砕される。

粉砕されたゲルに 300 $\mu$ L の LoTE を加え 37 $^{\circ}$ C で 2 時間振とうする。

ゲルと LoTE を Spin-X カラム (Costar) に移し 14,000rpm で 2 分間遠心する。

濾液をフェノール/クロロホルム抽出する。

#### エタノール沈殿

反応液	300 $\mu$ L
10M NH <sub>4</sub> OAc	150 $\mu$ L
グリコーゲン	3 $\mu$ L
エタノール	1050 $\mu$ L
<hr/>	
合計	1503 $\mu$ L

-80 $^{\circ}$ C、1 時間

14,000rpm、40 分間遠心

70%エタノールで洗う。

乾燥後、10 $\mu$ L の LoTE に懸濁し発現タグライブラリー溶液とする。

#### 1 2) ライブラリーの評価

○TA クローニングによるアダプター・タグ構造の確認

以下の反応液を調整する。

pGEM-T Easy vector (50ng/ $\mu$ L) (Promega)	1 $\mu$ L
ライブラリー溶液	1 $\mu$ L

2x Rapid Ligation Buffer (Promega)	5 $\mu$ L
滅菌水	1 $\mu$ L
T4 DNA ligase (2u/ $\mu$ L) (Promega)	1 $\mu$ L
<hr/>	
	合計 10 $\mu$ L

16°Cで一晩インキュベートする。

大腸菌を形質転換後プラスミドを調製、インサート断片をシーケンスし、インサート断片が、

「アダプター1 - *Nla*III 認識配列- 25~27 塩基長のタグ - アダプター2」

となっていることを確認する。

○ライブラリーの濃度および純度の確認

Agilent 2100 bioanalyzer、DNA 1000 Assay (Agilent)、等を用いて、ライブラリーの DNA 濃度及び純度を確認する。



## 5. 塩基配列解読結果からの発現タグの抽出

### 1) GAII による発現タグライブラリーの解読配列からの低品質配列の除外

GAII による発現タグライブラリーの解析により、1 リード 36 塩基、合計 400 万以上の解読配列が得られるが、全解読配列には品質の低い配列が含まれている可能性がある。全解読配列から、N を含むもの、クオリティーが低い配列を含むものは除外する必要がある。解読配列の品質管理は、GAII の基本解析ソフトウェア Analysis Pipeline によって行うことができる。GAII による塩基配列解読解析を委託する場合は、納品データの品質管理について事前に打ち合わせておく必要がある。

### 2) 解読配列の構造とタグ配列の抽出

解読配列の例を図 5-1 に示す。解読配列は、「ライブラリー識別配列 - EcoP15I 認識配列 - NlaIII 認識配列 - タグ配列」の構造を持つ。この構造に合致する解読配列を選抜し、24 塩基のタグ配列をライブラリー識別配列とともに抽出する。

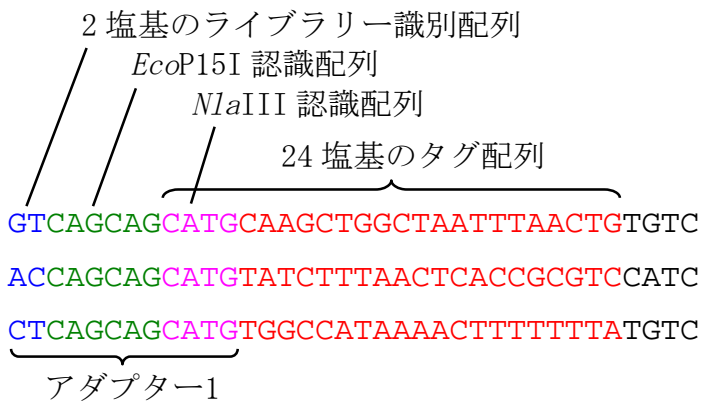


図 5-1 発現タグライブラリーの解読配列の構造

### 3) ライブラリー識別配列による分類と各タグ種の出現回数の計数

複数種のライブラリーを混合解読した場合は、タグ配列をライブラリー識別配列によりライブラリーごとに分類する。ライブラリー別に、各タグ種の出現回数をカウントする。

### 4) 収集したタグ配列には出現頻度の低いタグ種が多数含まれるため、総タグ

種数は予想される総遺伝子数よりも多くなる(表 5-1、図 5-2 の解析例を参照)。これらの低頻度のタグ配列には、塩基配列解読の誤りに由来するものが多く含まれていると考えられる。これらの信頼性の低いタグ種を除外するために、解析対象とする最小のカウント数を設定し、以後解析を行うタグ種を選抜する。最小のカウント数は、高等植物の総遺伝子数が 3~4 万であることから、総タグ種数が 3 万程度となるように設定することが目安となる(解析例では、4 つの処理区での出現回数の合計を 10 とした)。

表 5-1 発現タグ収集の解析例

処理	全抽出タグ		カウントが10以上	
	タグ種数	タグ数	タグ種数	タグ数
無処理	352,595	1,056,689	33,507	696,333
3時間	314,907	1,075,351	33,584	754,729
1日	457,140	1,127,050	33,207	660,252
3日	298,514	1,046,435	33,671	746,101
合計	1,156,669	4,305,525	34,269	2,859,150

無処理および 0.1 $\mu$ M の CdCl<sub>2</sub> で 3 時間、1 日、3 日処理したスズメナスビ (*Solanum torvum* Sw.) の根から mRNA を精製し、4 種の発現タグライブラリーを作製した。混合ライブラリーの GAI 解析により得られた 573 万の配列からタグ配列を抽出した。4 種のライブラリーで合計 10 回以上カウントされたタグ 34,269 種(合計 285 万タグ)を解析対象として選抜した。

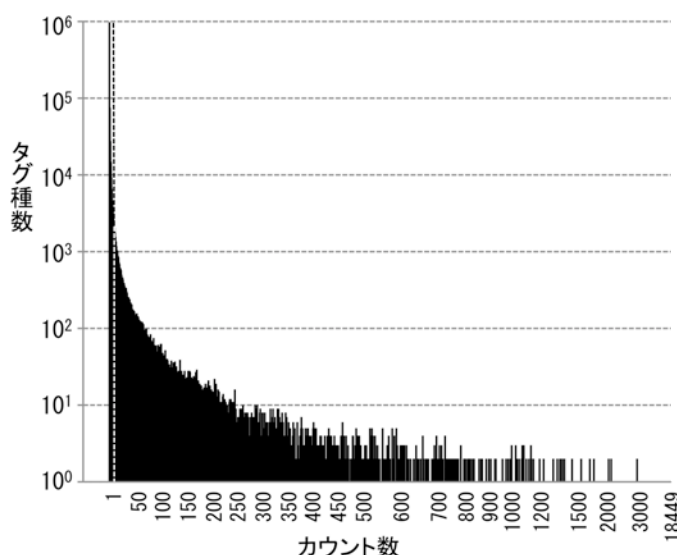


図 5-2 抽出したタグ種のカウント数の分布例

抽出したタグにはカウント数の少ないタグ種が多数含まれている。これらの信頼性の低いタグ種は解析対象から除外する。解析例では 10 回以上カウントされたタグ種を解析対象として選抜した。破線はカウント数 10 の閾値を示す。

## 6. カウント数差の比較による遺伝子発現の変動解析

### 1) ライブラリー間のカウント数差の比較

図 6-1 にライブラリー間の各タグ種のカウント数の比較例を示す。各タグ種のカウント数の大小は対応する遺伝子の発現量を反映していると考えられる。

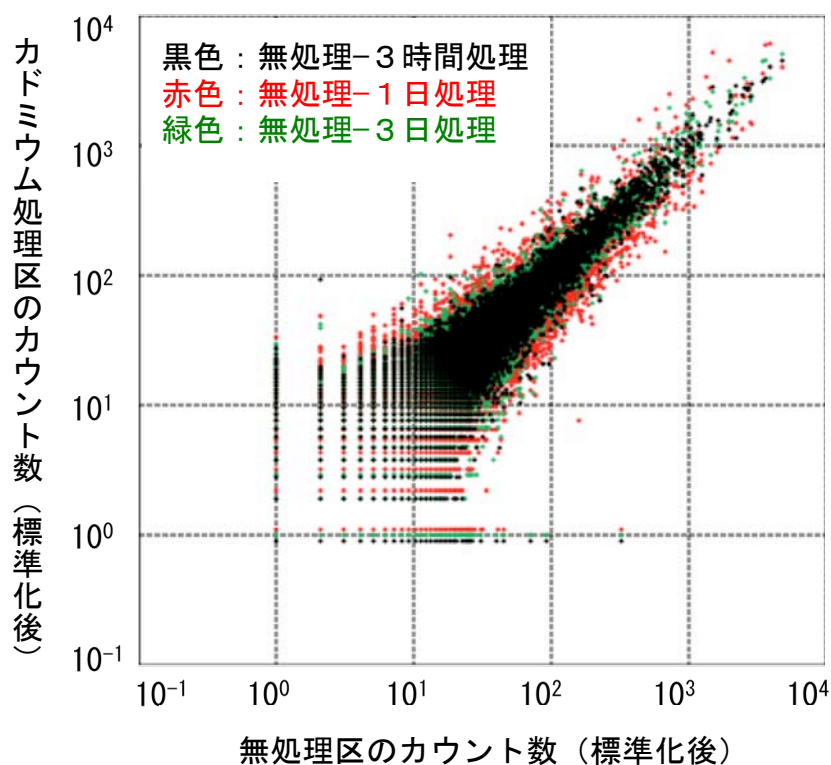


図 6-1 ライブラリー間のカウント数の比較例

スズメナスビ (*Solanum torvum* Sw.) の根における、無処理区とカドミウム処理区の間のカウント数を比較した。無処理区に対するカドミウム処理区（3時間：黒色、1日：赤色、3日：緑色）のカウント数の分布を示す。

### 2) カウント数のライブラリー間差の有意性検定

各タグ種のカウント数のライブラリー間差の有意性を統計学的に検定することにより、各処理区間の遺伝子発現変動を検出することができる。有意差の検定法には、SAGEbetaBin 法 (Bencio et al., 2004)、Audic と Claverie の方法 (Audic and Claverie, 1997)、Fisher の正確確立検定法、等がある。web 上でこれらの検定を行えるサイトがあるので以下に URL を紹介しておく。

• SAGEbetaBin 法

<http://bioinfo.lbhc.hccancer.org.br/sage/betabin//en/index.php>

• IDEG6 (Audic と Claverie の方法、Fisher の正確確立検定法、カイ 2 乗検定等、6 種の検定法)

[http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6\\_form/](http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6_form/)

表 6-1 に、SAGEbetaBin 法により網羅的に発現変動遺伝子を抽出した例を示した (Bayes error rate = 0.05)。

表 6-1 網羅的な発現変動遺伝子の抽出例

(34,269タグ種中)	カドミウム処理			計
	3時間	1日	3日	
増加タグ種数	580	1,423	655	2,049
減少タグ種数	652	1,464	721	2,022

無処理とカドミウム処理区 (3 時間、1 日、3 日処理) の間でカウント数が有意に変動していたタグ種を選抜した。有意差検定は SAGEbetaBin 法により行った (Bayes error rate = 0.05)。

## 7. タグ配列の発現遺伝子への対応付け

### 1) 参照配列への対応付け

本解析法で取得するタグ配列は 24 塩基長を有するため、EST 配列等参照となる発現遺伝子の情報があれば、発現遺伝子と厳格に対応付けすることができる。

### 2) RACE PCR による cDNA のクローニング

タグ配列から PCR プライマーを設計し、RACE PCR法により直接 cDNA をクローニングすることが可能である。

## 8. 参考文献

Audic S, Claverie JM 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research* 7: 986-995.

Matsumura H, Reich S, Ito A, Saitoh H, Kamoun S, Winter P, Kahl G, Reuter M, Krüger DH, Terauchi R 2003. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 100:15718-15723.

Romualdi C, Bortoluzzi S, D'Alessi F, Danieli GA 2003. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiological Genomics* 12: 159-162.

Vêncio RZN, Brentani H Patrão DFC, Pereira 2004. Bayesian model accounting for within-class biological variability in Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *BMC Bioinformatics* 5:119.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-487.

Yamaguchi H, Fukuoka H, Arao T, Ohyama A, Nunome T, Miyatake K, Negoro S 2010. Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of a low cadmium-accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*. *Journal of Experimental Botany* 61:423-437.

## 9. 問合せ先等

ご質問等あれば下記までご連絡ください。

〒514-2392 三重県津市安濃町大字草生 360

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム

主任研究員 山口博隆

E-mail: hyamagu@affrc.go.jp

TEL: 059-268-4651(直)

FAX: 059-268-1339

本マニュアルは、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業（PROBRAIN）「食の安全を目指した作物のカドミウム低減の分子機構解明」の研究成果として作成されたものです。

本マニュアルの内容を無断で複製・転載することを禁じます。