

## RT real-time PCR 法における内部標準遺伝子の選定

澤田 夕貴<sup>\*1</sup>, 菅谷 麻希<sup>\*2</sup>, 久富 寿<sup>\*3</sup>

The normalization strategy of RT real-time PCR using multiple internal control genes.

Yuki SAWADA<sup>\*1</sup>, Maki SUGAYA<sup>\*2</sup>, Hisashi HISATOMI<sup>\*3</sup>

(Received March 22, 2012)

### 1. 背景

RT real-time PCR 法は, RNA 定量における測定法として汎用されている。本法では, RNA を逆転写反応により cDNA に変換し, その cDNA に対して PCR 反応を行う。本法による各種 mRNA 量の測定ではサンプルの質や量の変動, cDNA 合成効率などを考慮する必要があり, 測定したデータをそのまま使用できない。一般には total RNA, ribosomal RNA あるいは内部標準遺伝子の mRNA 量によるデータの補正法が提唱されている。しかし, total RNA 量による補正法では, 正確な濃度測定の実施や total RNA に含まれる mRNA の不特定性が問題視される。Ribosomal RNA 量による補正法では, ribosomal RNA あるいは mRNA を転写する RNA ポリメラーゼが異なるため, 発現状態の差異が問題視される。そのため, 内部標準遺伝子を用いた補正法が提唱され,  $\beta$ -Actin mRNA,  $\beta$ 2-Microglobulin mRNA および Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA が広く用いられる。内部標準遺伝子に用いられるこれらハウスキーピング遺伝子は, 発現量の普遍性が補正における条件である。しかし, 組織間においてハウスキーピング遺伝子の発現量の変化が報告<sup>1)</sup>されており, 補正したデータにバイアスが生じ, 適切な解釈の妨げとなる。したがって, 遺伝子発現解析では内部標準遺伝子 mRNA の選定が重要である。そこで本研究では, 上記の他に  $\beta$ -Glucuronidase mRNA を内部標準遺伝子として追加し, mRNA 測定における内部標準遺伝子選定の条件検討を行なった。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 内部標準遺伝子の mRNA 量測定

胃がん患者の癌部, 非癌部 (各 10 例) から High Pure RNA Tissue Kit (Roche Applied Science) を用いて total RNA を抽出した。サンプルの採取に関しては採取した施設の倫理規定(患者に対するインフォームドコンセントを含む)に基づき適正に処理されたサンプルを用いた。PrimeScript<sup>®</sup> II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) により cDNA を合成した。内部標準遺伝子の mRNA として  $\beta$ -Actin mRNA,  $\beta$ 2-Microglobulin mRNA, GAPDH mRNA および  $\beta$ -Glucuronidase mRNA の primer を設定し, 合成した cDNA を Reaction Mixture (2× KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Master Mix (日本ジェネティックス株式会社) 8.5  $\mu$ L, Forward primer 0.27  $\mu$ M, Reverse primer 0.27  $\mu$ M) に添加し, 95°C/3 min 後, 95°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec を 1 サイクルとした RT-PCR 反応を 40 cycles 行なった (iCycler iQ<sup>TM</sup> Real-time Detection System/Bio-Rad)。

#### 2.2 内部標準遺伝子 mRNA の検出限界の測定

任意に選択したサンプルの total RNA を段階希釈し, cDNA を合成した。合成した cDNA を Reaction Mixture に添加し, 上記 2.1 と同様の反応を行なった。反応終了後, PCR 増幅産物を 2%アガロースゲルに供し, 電気泳動を行なった。エチジウムブロマイド染色した PCR 増幅産物を UV トランスイルミネーターによって確認した。

### 3. 結果

内部標準遺伝子 mRNA である  $\beta$ -Actin mRNA,  $\beta$ 2-Microglobulin mRNA, GAPDH mRNA および  $\beta$ -Glucuronidase mRNA それぞれの 1.0  $\mu$ g total RNA における平均発現量 $\pm$ 標準偏差値は, 癌部では  $10^{5.3\pm 0.30}$ ,

\*1: 理工学研究科理工学専攻博士前期課程

\*2: 物質生命理工学科 助教

\*3: 物質生命理工学科 教授 (hisatomi@st.seikei.ac.jp)

$10^{5.4\pm 0.40}$ ,  $10^{5.2\pm 0.25}$  および  $10^{4.1\pm 0.47}$  であった。非癌部では  $10^{4.8\pm 0.56}$ ,  $10^{4.9\pm 0.69}$ ,  $10^{3.8\pm 0.15}$  および  $10^{3.2\pm 0.15}$  と算出された (Figure 1)。

また, PCR 増幅産物を電気泳動後, UV トランスイルミネーターの可視化により, 内部標準遺伝子由来 mRNA のみの増幅を確認した。さらに, cDNA 合成に用いる total RNA の量の変化による PCR 増幅産物の増減も確認した。各内部標準遺伝子 mRNA の検出限界は 300~800 copies と確認された。

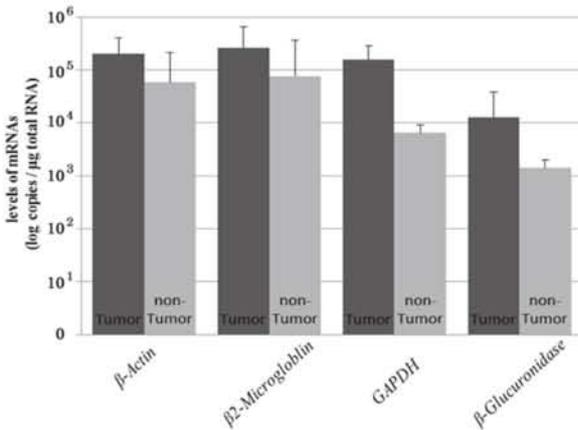


Figure 1. Expression of internal control genes in human gastric cancer tissues.

mRNA expression levels are presented as the mRNA copy number per  $\mu\text{g}$  total RNA.

#### 4. 考察

癌部では各サンプルによって Stage や分化度が異なり, 同じ癌部でも多種の細胞の存在が明らかになっている<sup>2)</sup>。従って, 非癌部よりも癌部の方が細胞の種類が多い, すなわち内部標準遺伝子の発現量が一定ではない可能性が高い。しかし, 本研究では標準偏差の値が癌部と非癌部において予想したほどの差異は確認されなかった。むしろ標準偏差の値が比較的小さい *GAPDH* mRNA および *β-Glucuronidase* mRNA において, 癌部, 非癌部での平均 mRNA 量が 10 倍以上も異なった。この状況で内部標準遺伝子 mRNA による補正を行うことは, 癌部の中でのデータの解析には役立つが, 癌部と非癌部の比較においては補正としての役割を担っていない。標準偏差の値を無視すれば *β-Actin* mRNA および *β2-Microglobulin* mRNA の方が, *GAPDH* mRNA および *β-Glucuronidase* mRNA よりも癌部, 非癌部における平均値の乖離が少なく, 内部標準に適した遺伝子と言える。ただ, これらのデータは指数表記のグラフでの場合であり, 平均値の乖離だけで判断すると, 全体的に数値が低い *β-Glucuronidase* mRNA が

最も乖離が少ない。本研究の結論としては, 癌部および非癌部での mRNA 量の平均値が揃い, かつ標準偏差の値もより小さい内部標準遺伝子を更に追求するしかない。

本研究では, total RNA の質を無視している。RNA は DNA と比較すると非常に不安定であり,  $-80^{\circ}\text{C}$  下における凍結保存時でも半減期が約半年と言われている。RNA の質は cDNA 合成に影響を与え, データの変動を引き起こす可能性がある。このため, やはり内部標準遺伝子を特定する必要がある。Vandesompele ら<sup>1)</sup>が指摘したように, 臓器ごとに様々な内部標準遺伝子の mRNA 量を比較する必要があるが, 本研究のように内部標準遺伝子の mRNA 量が同じ臓器内の細胞種の違いに起因して異なる場合は, 明確な指針はなく研究者の判断に任せられてしまう。同時にそれはデータの信憑性を論ずるうえで, 欠かせない判断でもある。また, 測定対象の mRNA 量と内部標準遺伝子 mRNA 量は 10 倍以内に収まっている方が解析し易いため, その点でも選定をさらに困難にする。癌部, 非癌部など臨床サンプルを用いた実験では, 各サンプルの保存や抽出の時期などを揃えるのは難しく, サンプルによって RNA の劣化の程度が若干異なってしまう。これも内部標準遺伝子の mRNA 量の正確な測定に影響を与えているかもしれない。臨床サンプルは倫理規定などで取扱いが厳しく制限されているが, 測定するうえでも, 内部標準遺伝子だけとつても, 簡単には取扱えない。これからも内部標準遺伝子の探索は続けることになるが, 理解が深まるにつれ難解さが増して来るテーマである。

#### 参考文献

- 1) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, 3, RESEARCH0034.
- 2) Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur. J. Cancer* 2006, 42, 1219-1224.