

Focussing Review

創薬のためのゲノム科学 ～ Quantitative ProteomeとMedicinal Geneticsを中心に～

小田吉哉、長洲毅志
エーザイ（株）シース研究所

Genomics for Drug Discovery. Focusing on Proteome and Medicinal Genetics

Yoshiya Oda and Takeshi Nagasu

Eisai Co., Ltd.

Lab. of Seeds Finding Technology

Received, April 4, 2000. Accepted, June 23, 2000.

Abstract

Genomics will lead us to a new era of drug discovery, in which the final goal will be an individualized medicine. However the goal is still far and will be difficult to realize. In short, we must learn to utilize well and develop new techniques in genomics. In this document, we introduce the way of utilizing this technology, especially focusing on the proteome, and our new concept of "medicinal genetics". The quantitative proteome technology that we have developed will be a powerful tool for drug discovery and evaluation of proteins, direct target for drugs. In addition, medicinal genetics will serve as a short for genes to become drug targets, including target finding and validation.

Key words : proteome, genomics, genetics, drug discovery, bioinformatics, chemical genetics, target validation

【はじめに】

ゲノムとはその生物の染色体の最小セットを示す言葉である。そしてゲノム科学(Genomics)はゲノムを個々の遺伝子ではなく総体として扱う学問である。生物の全ゲノム配列を明らかにできる技術があつて初めて可能になった学問といえよう。言い換えるなら全配列情報をもとに始まる分野とも言える。この分野の特徴は学問としては分子生物学を中心に据えながら、分析科学や情報科学などを取り込んだ総合科学的

なものであるという点である。ヒトの遺伝子は遅くとも2003年までには明らかにされ、その後の医学や創薬を根本的に変える可能性がある。例えば薬剤のターゲットとなるタンパクをコードする遺伝子情報が全て明らかになるのである。そのため製薬会社を中心に重要な遺伝子については特許化による囲い込み競争が激しくなっている。しかし特許成立のためには、塩基配列情報だけでは不十分であり、その遺伝子の機能解析と創薬を効率的に結びつけることが重要なのである。遺

伝子の特許化については、未だ不確定要素があるが、ヒトの全ゲノム配列が公知になった後も有用な遺伝子の権利を得ることは可能であろう。一方で、ヒトの全塩基配列決定後には個体レベルのバリエーションが解析される時代となる。いわゆる遺伝性疾患だけでなく、多くの一般的な疾患も遺伝的要因が関与していることは周知の事実である。今後はこれらの遺伝的要因、それも複数であり、個人によって異なる原因であって明らかにされていくであろう。それによって見出された遺伝子は、診断や薬剤のターゲット候補として非常に有用である。個人の遺伝子情報という領域であるため、プライバシー保護などの施策が必要であるが、この分野は今後確実に大きく発展する。実際、2000年から日本でもSNP解析を中心とした国家プロジェクトが開始される。

【ゲノム科学と創薬】

ヒトに先立って、大腸菌、酵母、線虫、ショウジョウバエなど幾つかのモデル生物の全ゲノムが明らかになった。よって配列情報があるためクローニングの手間が省けるなどゲノムプロジェクトが分子生物学に与えた意義は大きい。しかしこれらモデル生物の全ての遺伝子機能を明らかにするためには今後も多大な労力を必要としている。つまりその生物の全体のパターンを見ることはゲノム解析で始めて達成できるが、特定の遺伝子機能について調べるとなると従来と変わらぬ地道な作業が重要となる。これが端的に現れるのが創薬研究である。ゲノム科学は重要で大きな意義を持つが魔法ではない。創薬研究では、ゲノム科学の技術や情報を駆使しながら、薬剤のターゲットになる一つ一つの遺伝子の研究を行うことが要求される。一方で、これまでの創薬は分子標的を特定して、その阻害剤などをスクリーニングして見つけるという手法を取ってきた。従って新しい標的分子の発見が重要事項であった。しかしGPCRやKinaseなど薬剤ターゲットになりそうな遺伝子の一つ一つ調べて新規標的分子を見つける方法は非効率的である。ポスト・ゲノム時代と言われる現在では、例えば病態モデルと正常との比較により、どのような遺伝子発現の変動が起こるか調べることで、より効率的に標的分子を見出すことが可能になりつつある¹⁾。ここで威力を発揮するのがポストゲノム時代の中心であるDNA chip技術とProteome技術である。前者は遺伝子の発現レベルをmRNAの定量により網羅的に行うものであり、後者はそれをタンパクレベルで行うものである。タンパクは翻訳後修飾や分解などmRNAとは別のレギュレーションも受けるため、mRNAとタンパクの間に必ずしも相関関係は成立しない。また生体に対し様々な影響を直接与えるのは遺伝子自身であるよりも、むしろその遺伝子産物であるタンパクであり、医薬品の直接のターゲットも多くの場合タンパクである。よって創薬研究

においてProteomeに託す期待は大きい。ここではゲノム創薬の一翼を担う新しいProteome技術について紹介した後、それからゲノム科学の技術を有効に活用して創薬を行う"Medicinal Genetics"のコンセプトについて触れてみたい。

【Quantitative Proteome】

<タンパク存在量の変動解析について>

DNA chipにおけるDifferential Displayと同様にProteomeにおいてもタンパクレベルでのDifferential Displayを作製し、個々のタンパクレベルの変化を捉える種々の試みが行われている。しかしながら二次元電気泳動を中心とした従来のやり方では、比較すべき二つの試料に存在する個々のタンパクの存在量を正確に比較することは極めて難しい。

なぜなら

- 1、溶解性の悪いタンパクも含めた、細胞からのタンパク抽出の再現性
- 2、細胞分画やタンパクの粗精製・濃縮操作による再現性
- 3、二次元電気泳動の再現性
- 4、ゲル染色の再現性
- 5、一つのスポットに複数のタンパクが混在している場合
- 6、2次元電気泳動を用いない場合の定量（最近、カラムスイッチングHPLCなどLC/MS中心でプロテオームを行う方法も紹介されているが、通常定量的解析は困難²⁾）
- 7、質量分析（MS）でのピーク強度比較（MSでの強度比較は内部標準物質を用いない限り定量性に乏しい。さらにトリプシンなどの消化効率やペプチドの回収率などもバラツキの大きな原因になる。）
- 8、回収率・再現性などの補正（Proteomeのように不特定多数のタンパクを扱う場合、個々のタンパクについて回収率を補正することは困難である。）

このように従来のProteomeでは、個々のタンパクの発現変化を正確に捉える事は難しい。そこで、この問題を解決したのが、小田らが開発した安定同位体とMSを組み合わせた方法である³⁾。先に述べたようにMSでのピーク強度は再現性に乏しいにも関わらず、薬物など低分子物質を中心にGC/MSやLC/MSでは定量分析が日常的に行われている。それは、まず分析対象物質を構成する元素の一部を安定同位体に置き換えた（例えば水素Hを重水素Dにした）内部標準物質を合成して、それを最初にサンプルに加えることで標的分子の回収率を正確に補正しているのである。一方、Proteomeでは目的物質が不特定多数で、しかも対象が低分子ではなくタンパクである。そのため一見すると安定同位体を用いた内部標準法を適用するのは難しいように思われる。しかし小田らは比較すべきサンプル（細胞）に含まれるタンパク全てを安定同位体

(例えば窒素 ^{15}N)で標識することにより、MSを使った定量的プロテオームを可能にした。それについて以下に説明する。

まず比較するサンプル(細胞)のうち片方の培地中に安定同位体(例えばその細胞の窒素源を ^{15}N にしたり、必須アミノ酸を同位体標識しておく)を予め加えておいてから培養を行う。するとその細胞が作り出したタンパクは、全て安定同位体で標識されることになる。続いて両者を混合してから、タンパクの抽出や分画などの操作を行い、二次元電気泳動などでタンパクの分離を行う。そしてゲル上のタンパク・スポットを切り出し、トリプシンなどで消化し得られたペプチド断片を回収しMSで分析する。個々のタンパクの回収率は、タンパクが異なれば回収率も変わるかもしれない。しかしここまでの全行程において、同じタンパクであるならば安定同位体で標識されたタンパクとそうでない通常のタンパクとの間に回収率に違いはない。よってMSで観測されるペア(安定同位体標識のペプチドと通常のペプチド。図1のピーク強度比は回収率に関わらず一定であり、もしこのピーク強度比に変化が生じるのであれば、それはそのタンパクの存在量(発

現・分解・修飾等を加味した増減)に変化が生じたことになる。この方法ではタンパクの存在量が僅か20 - 30%変化しただけでも有意差を持って検知することができる。さらに小田らの方法はMSでのスペクトル・データでタンパクの定量と同定を行っているため、たとえ二次元電気泳動で分離した1スポットが複数のタンパクから成る混合物であっても、MSで各タンパク(実際にはペプチド断片)を改めて分離するため、それぞれのタンパクについて正確な定量が可能になる。このように混合スポットに対する定量性は従来の電気泳動スポットに基づく方法では不可能であった。この方法の登場によりこれまで定性的な情報にすぎなかったプロテオームに定量的データを加えることが可能になった。

小田らのアプローチは、そのすぐ後にR. D. Smithらによっても報告された。彼らは極めて分解能・精度の高いMSを用いることで、タンパクを消化することなく、直接定量することに成功している⁴⁾。両者の方法は培養細胞であるならば原理的に全ての細胞つまりタンパクに適用可能であるが、動物や人などの組織中のタンパクに対しては限界がある。そこで

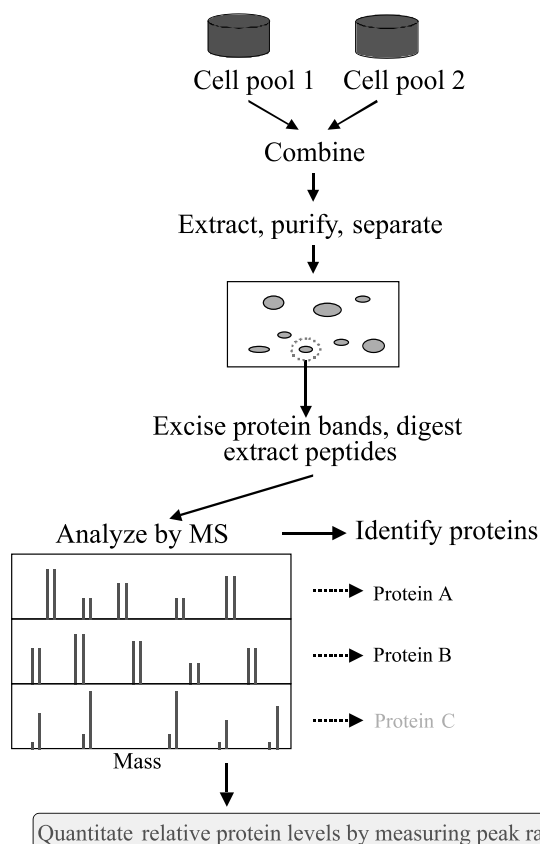


図1：安定同位体元素標識法を用いたタンパクの変動解析についての模式図

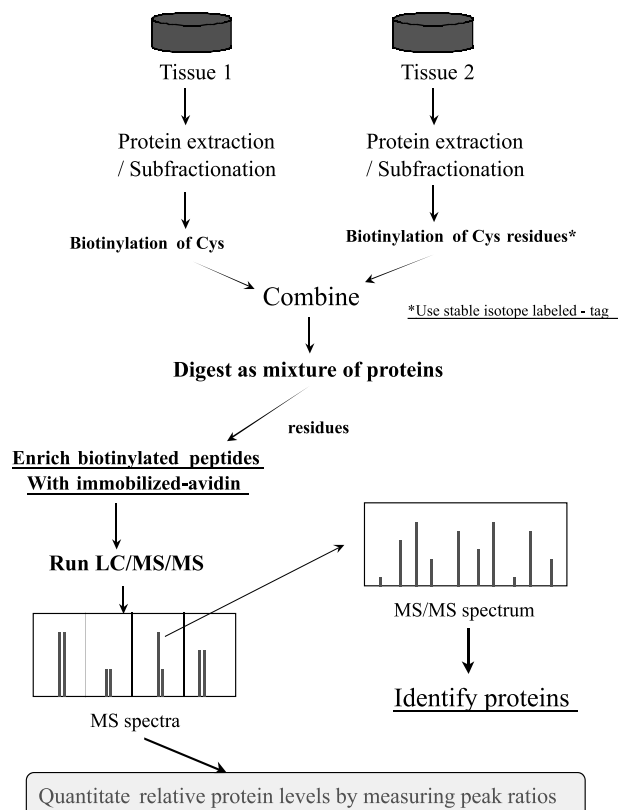


図2：組織由来のタンパクの変動解析についての模式図

R. Aebersoldらは、この点を克服するための方法を考案した⁵⁾。

まず使用するTagのうち、片方のTagに重水素など安定同位体元素標識をする。そして図2に示したようにタンパクのCys残基にBiotin-tagを共有結合させる。その後、二つのサンプルを混合する。ここで彼らがBiotinというAffinity-tagを用いた理由は以下の通りである。ゲル電気泳動後In-gelあるいはOn-membraneでタンパクを消化しMSで測定する場合、全てのペプチド断片をMSで検出できるとは限らない。言い換えると、比較するべきサンプル間で、タンパク量の増減を調べるためには、Tagが結合したペプチド（Cys残基を含むペプチド）だけを検出すればよいのである。Tagがなければサンプル間の区別ができないからである。そこでBiotin-tagを挿入し、AvidinでBiotin化ペプチドのみを精製しMSで分析している。MSでは同位体標識の有無（分子量の違い）によりペアのピークが観測され、そのピーク強度比の変化が、そのタンパクの存在量の変化を意味する。通常タンパク混合物をトリプシン消化すると膨大な数のペプチドが生じるが、Aebersoldらの方法では、Cys残基を含むペプチドのみに限定されるため、混合ペプチドとしての複雑さを軽減している。ただしタンパクの同定にはPeptide Mass Fingerprinting法は使えず、MS/MSを行うことが必須である。このAebersoldらの方法は、動物などの組織由来のタンパクに対してもQuantitative Proteomeを可能にただけでなく、Proteomeに二次元電気泳動は必須であるという考え方を打破した点でも画期的である。一方Aebersoldの方法の弱点は、まずBiotin化反応までは、比較する二つのサンプルを別個に処理することになる。よってBiotin化反応がサンプル間で反応効率に差がでないように定量的に進行することが重要である。さらにこの方法では、組織などからタンパクを抽出（場合によっては分画など粗精製）する過程で生じる回収率の補正が必要になる。しかし膜タンパクのように取り扱いの難しいタンパクの場合、一般に回収率のばらつきが大きくなる傾向がある。つまり前処理操作での再現性が悪くなると、定量性が大きく低下することになる。

一方、小田らの方法とAebersoldらの方法に共通した特徴は、いずれも変化の有無に関係なく全てのタンパクを調べ定量することである。つまり従来の二次元電気泳動で変化のあったスポットのみを分析するという概念とは異なり、全てのタンパクを調べるので作業量は大幅に増えることになる。しかしProteomeとは全てのタンパクを網羅的に調べることが目的であるから、全てのタンパクの変化量を把握することはProteome本来の姿であり、既にロボット化・高速化が進められていることから、全てのタンパクについて調べることは容易になりつつある。今後、小田らの方法とAebersoldらの方

法、いずれかを適宜使い分けることで多くの場合、Quantitative Proteomeが可能になると考えられる。

 部位特異的翻訳後修飾の変動解析

タンパクはリン酸化修飾、糖修飾などによりその機能が変化することがあり、このような翻訳後修飾はDNA配列やmRNAレベルではわからないため、タンパク自身を直接分析する必要がある。また翻訳後修飾でタンパクの活性が制御される例は多く、部位特異的に翻訳後修飾の変化について定量する事は、そのタンパクの生理機能を知る上で重要である。しかし一つのタンパクが複数箇所修飾を受ける場合、アミノ酸残基別に修飾の変化を定量分析できる手法はなかった。さらに細胞内のタンパクが修飾を受ける場合、修飾の程度が0%か100%かといった例は希であり、多くの場合、その修飾のされ方がヘテロであるため、さらに解析が難しくなる。しかし先に述べた小田らの方法は、このような課題を解決し部位特異的に翻訳後修飾の変化を定量可能にした。

まず目的のタンパクを条件の異なる培地から集め翻訳後修飾の違いを比較することになるが、その際に片方を安定同

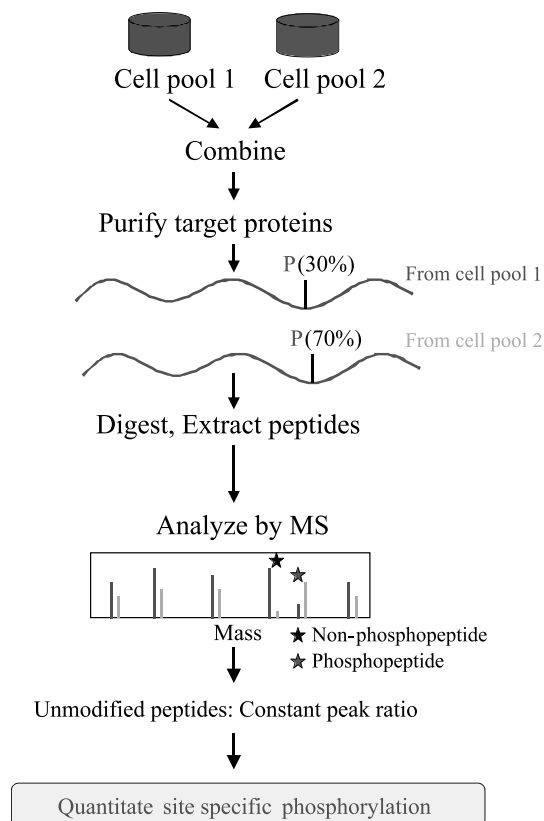


図3：部位特異的翻訳後修飾の変動解析についての模式図

位体を含む培地を使う。一定期間培養後、二つの細胞群を混合してから目的のタンパクを抽出・精製し、トリブシンなどで消化し、そのペプチド断片をMSで分析する。タンパク抽出からMS測定に至るここまでの過程において、目的のタンパクの回収率やプロテアーゼの消化効率、MSでのイオン化効率などは、標識タンパクと非標識タンパク間でいずれも全く同じである。しかし安定同位体元素で標識したタンパクは分子量が大きくなるためMSで検出する際に非標識体由来のピークとペアで観測される。この時、修飾を全く受けないペプチド鎖なら、そのタンパクのどのペプチド鎖であっても、MSでのピーク強度比は一定である。さらに修飾を受けても、その実験条件では修飾の程度に変化がない場合も、そのペプチド鎖のピーク強度比は、修飾を受けない部分と同様に一定の比となる。そして修飾の程度に変化があった領域はMSのピーク強度比に変化が生じる。この方法では僅か20-30%程度の微小な変化も有意さを持って検出できる。

ところでリン酸化ペプチドはMALDI-TOF/MSなどMSでイオン化抑制が起きやすいことが知られており、そのためリン酸化ペプチドをMSで見逃すことも多い。さらに糖鎖の付加でもMSの感度が落ち、その上MSだけでは糖鎖構造の解明は難しい。しかし小田らの方法では、翻訳後修飾されたペプチド鎖を直接MSで分析できなくても、反対の修飾されず残った方、非修飾ペプチド鎖をMSで検出さえすれば、例えば修飾の種類は不明であっても、その領域に翻訳後修飾反応がどのくらい起きたか知ることができるという特徴も併せ持つ(図4)。翻訳後修飾の解析はこのようなプロテオームの技術を駆使しない限り他に方法はないため、本法は非常に強力な武器に成るであろう。

【Medicinal Genetics】

我々の部署では上で述べたQuantitative Proteomeと、シリコン基盤上にフォトリソグラフ技術を用いてオリゴDNAを合成したAffymetrix社のDNA chip技術を有している⁶⁻⁹⁾。そして我々は、独自の病態モデルや化合物を用いることでmRNAやタンパクレベルでの発現変化を追跡して、新たな標的分子探しを展開している。そこで以下に我々が提案するMedicinal Geneticsについて説明する。ここで強調したいことはGenomicsそのものでなく、むしろ1つ1つの遺伝子を扱うGeneticsこそが創薬に直接つながる道であるというコンセプトである。

製薬会社では日夜多くの化合物が合成され、その活性が調べられている。独自の化合物・天然物の中には細胞レベルや動物レベルで、作用機序が不明ながらも明確な薬理活性を誘

導するものがある。Medicinal geneticsでは、この薬理活性をPhenotypeとして捉えているのである。それが仮にその研究目的に合致しないPhenotypeであっても(例えば副作用)視点を变えることで新たな創薬の糸口になりうる。そこで我々は新たな創薬テーマを創出するために図5に示したようなゲノム科学を支えている最先端技術を駆使して新たな創薬標的分子の発見を目指している。

図6に示したように、まず独自の化合物データベースの中から、面白いPhenotypeを示す化合物を選び出す。次に、この化合物による処理・未処理試料についてDNA chipにより網羅的にmRNAの発現解析を行う。そして変動している可能

あるタンパクがPartialに翻訳後修飾を受ける場合

＜ある同一ペプチド断片の比較＞

【安定同位体元素標識法】

TASAATSAASPGGPER
↓
MSで未修飾体の検出可能
↓
ピーク強度比が変化
(つまり翻訳後修飾の程度に変化)

【従来の方法】

TASAATSAASPGGPER
↓
翻訳後修飾の種類が不明
あるいはMSで検出できない
ことが多々ある
↓
解析不能の場合も多い

部位特異的に翻訳後修飾の
変動解析が可能

図4：安定同位体元素標識法による翻訳後修飾解析のもう一つの利点

Key Technology for Medicinal Genetics

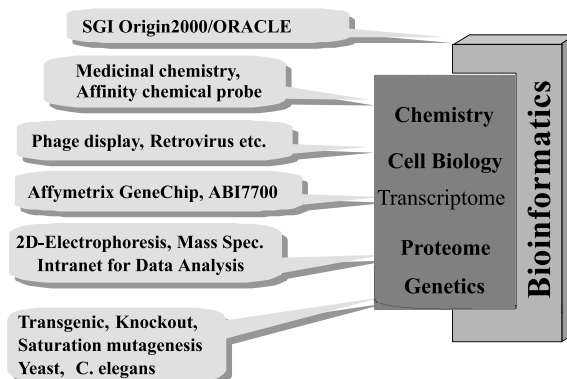


図5：Medicinal Geneticsの鍵となるテクノロジー

性が高い遺伝子については、ABI7700を用いて、より精度の高い分析を行うことで確度を高める。一方でタンパクレベルについても先に述べたQuantitative Proteomeによって変動するタンパクを追跡していく。このようにDNA chipやProteomeにより、膨大な情報を得ることができる。そこで必須となるのがバイオインフォマティクスである¹⁰⁻¹³⁾。これは塩基配列情報解析を中心にゲノム科学を補佐しながら発展した学問であり、既に独立した分野としてその地位を確保しつつある。我々は、発現解析より得られた膨大な情報をデータベース化し、文献など他の情報と融合した独自のシステムを構築しているところである。このように実験事実やIn-silicoでの解析を通して、創薬標的分子候補を選び出している。また化合物のPhenotypeとモデル生物の変異体のPhenotypeから目的遺伝子を得る "Chemical Genetics" 手法¹⁴⁻¹⁶⁾も大いに活用している。

一方、これと並行してMedicinal chemistryを駆使し、その化合物の活性・特異性を保ちながら、Affinity chemical probeを合成している。そして細胞や組織から、このProbeに親和性の高いタンパクを特異的に精製し、MSを中心としたProteome技術により、そのタンパクの同定を行っている。このAffinity chemical probeを用いた手法では、その化合物が直接作用するタンパクを同定できると同時にその周辺タンパクをも精製・同定可能である。さらにAffinity chemical probeに、Photo-affinity labeling法を組み合わせることで、その化合物の標的分子を直接同定することができる。さらに化合物の結合部位も推定することができ、それにより化合物を薬として最適化する際の有益な情報を得ることも可能になる。このようにAffinity chemical probe法によっても標的分子候補を得ることができる。

このようにして得られた標的分子候補（多くの場合複数あ

る）について機能を解析し、創薬ターゲットとしてValidateする作業が重要になってくる。ここで力を発揮するのがモデル生物の利用である。我々は目的に応じて酵母、線虫、マウスを使い分けている。それぞれ分子生物学研究を通して確立された系であり、酵母は細胞周期、線虫は神経などの分化、マウスはヒト関連の病態モデルなど得意領域がある。例えば新規遺伝子を発見したならば、その機能推測のために、マウスの相同遺伝子を分離し遺伝子破壊、ノックアウトマウスの作成を行うのが常套手段となっている。しかしマウスでは、遺伝子破壊・遺伝子導入操作には多大な労力と時間を要する。しかもいわゆる遺伝学的な手法を用いることができない。マウスは遺伝学的モデル系ではなく、むしろ病態モデルやスクリーニング系としての方が有用である。また酵母は、簡単に変異株の作成、遺伝子の導入・破壊、クローニングができる利点がある。さらに遺伝学的な手法、complementation, suppression, multicopy suppressionで遺伝子機能解析もできるため、我々もモデル生物として積極的に活用している¹⁷⁾。しかし神経関係や細胞間のコミュニケーションなどを調べるには適していない。一方、線虫は1998年に全ゲノム配列が明らかにされた、初めての多細胞生物である¹⁸⁾。全部で約1000の細胞から成り、約19000個の遺伝子がある。そこにはGPCRをはじめヒトで重要な遺伝子ファミリーのプロトタイプが全て存在すると考えられている。よって線虫に注目したベンチャー企業さえ設立されており、その一つdeVGenはホームページで「man is genetically a "fourthfold worm"」とその有用性をうたっている。そして線虫のライフサイクルは約3日間と短く、体が透明でありGFPなどと組み合わせることで視覚的に体内を観察するに適している。またRNA interference手法で、発現レベルでの遺伝子機能破壊ができ、UNCをはじめとする種々のマーカー遺伝子とその表現型が知られており、遺伝学的にも系統維持されている。このような背景から我々は、酵母やマウスの限界を補うために、標的候補分子のValidateに線虫 (*C. elegans*) を活用している。また標的分子が未知な場合であっても、線虫のデータベースを活用することで、線虫での表現型の解析から、既存の変異株（遺伝子）に結びつけることが期待できる。表現型が新規の場合でも、変異株（遺伝子）を取得し遺伝学的に標的にたどり着くことも可能である。また遺伝子的解析により候補遺伝子前後のパスウェイを明らかにすることができる。これによってさらに創薬に適した遺伝子標的の提示が可能になる。我々はこれをTarget Optimizationと呼んでいる。

このようにして薬剤の標的分子を決めた後には、そのアミノ酸一次構造から、タンパクの立体構造を類推したり、実際にNMRやX線解析などを駆使するStructural Biologyとドラッグデザインを組み合わせることで、実際に薬作りを行って

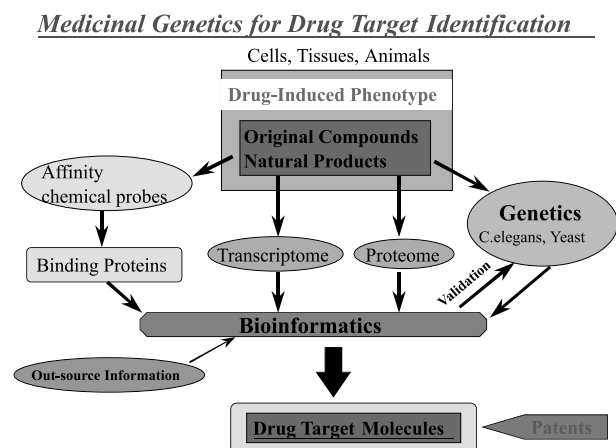


図6：テクノロジーを中心に考えたMedicinal Geneticsの概念図

いる。我々は化合物・天然物、薬理活性、遺伝子、機能、立体構造、表現型など全ての情報をバイオインフォマティクスにより有機的に結びつけて創薬研究を展開している。このように独自の化合物による作用をPhenotypeと捉えて、標的分子を探索するChemical Geneticsと遺伝子のOptimizationを行う一連の研究分野がMedicinal geneticsであり、ポストゲノム時代における創薬研究の一つの流れになると考えている。

【おわりに】

以上のように、ゲノム科学によって今まで出来なかったことが出来るようになり、そして非常に多くの情報を利用できるようになった。しかしゲノム科学は魔法の呪文ではない。我々はそれらの技術を駆使しつつ、個々の遺伝子について今まで以上に深い研究を行ってはいじめてゲノム創薬を語れるのである。個々人の遺伝子配列パターンによって、病気の予防や治療の方針が出来るようになるテーラーメイド医療は皆の目指すところである。全塩基配列決定はそのための前哨戦であるし、今後注力されるSNP解析を中心としたPharmacogenomicsはそこへの第一歩である。しかしながらゴールまでまだまだ長い道のりであり、サイエンスの上で幾つものBreak-throughを必要としているし、医療制度や法制制度上でも今後解決するべき課題は多い。個々の患者さんに最適の治療をということは我々製薬企業のみならず、全ての人の願いであろう。そのような方向で着実に科学の進歩がなされることは全く間違いのないことである。ここに紹介したアプローチはそのような夢を秘めつつ、今何をすべきか真剣に考えた最適なやり方であると確信している。

参考文献

- 1) 野口照久、石井威望 監修 「21世紀の創薬科学」(共立出版株式会社) 1998.
- 2) A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik and J. R. 3rd Yates, "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry", *Nature Biotechnol.*, 676-682, 17(1999).
- 3) Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn and B. T. Chait, "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 6591-6596, 96(1999).
- 4) L. P. Tollic, P. K. Jensen, G. A. Anderson, M. S. Lipton, K. K. Peden, S. Martinovic, N. Tollic, J. E. Bruce and R. D. Smith, "High throughput proteome-wide precision measurements of protein expression using mass spectrometry", *J. Am. Chem. Soc.*, 7949-7950, 121(1999).
- 5) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb and R. Aebersold, "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags", *Nature Biotechnol.*, 994-999, 17(1999).
- 6) D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton and E. L. Brown, "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays", *Nature Biotechnol.*, 1675-1680, 14(1996).
- 7) M. Chee, R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris and S. P. Fodor, "Accessing genetic information with high-density DNA arrays", *Science*, 610-614, 274(1996).
- 8) R. J. Lipshutz, S. P. Fodor, T. R. Gingeras and D. J. Lockhart, "High density synthetic oligonucleotide arrays", *Nature Genet.*, 20-24, 21(1 Suppl)(1999).
- 9) M. Mahadevappa and J. A. Warrington, "A high-density probe array sample preparation method using 10- to 100-fold fewer cells", *Nature Biotechnol.*, 1134-1136, 17(1999).
- 10) 八尾徹、「ゲノム情報解析とタンパク質構造ゲノミクス、- バイオインフォマティクスの進展 -」*蛋白・核酸・酵素*, 2005-2012, 44(1999).
- 11) S. J. Spengler, "Bioinformatics in the information age", *Science*, 1221-1223, 287(2000).
- 12) S. A. Teichmann and G. Mitchison, "Computing protein function", *Nature Biotechnol.*, 27, 18(2000).
- 13) J. Skolnick, J. S. Fetrow and A. Kolinski, "Structural genomics and its importance for gene functional analysis", *Nature Biotechnol.*, 283-287, 18(2000).
- 14) S. L. Schreiber, "Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry", *Bioorg. Med. Chem.*, 1127-1152, 6(1998).

- 15) R. B. Stockwell, J. S. Hardwick, J. K. Tong and S. L. Scheiber et al., "Chemical genetics and genomic approaches reveal a role for copper in specific gene activation", J. Am. Chem. Soc., 10662-10663, 121(1999).
- 16) D. S. Tan, M. A. Foley, B. R. Stockwell, M. D. Shair, and S. L. Schreiber, "Synthesis and Preliminary Evaluation of a Library of Polycyclic Small Molecules for Use in Chemical Genetic Assays", J. Am. Chem. Soc., 9073-9087, 121(1999).
- 17) 山本正幸 編「バイオマニュアルシリーズ10：酵母による遺伝子実験法」(株式会社羊土社) 1994.
- 18) The C. elegans Sequencing Consortium, "Genome sequence of the Nematode C. elegans: a platform for investigating biology", Science, 2012-2018, 282(1998). {Scienceのこの1998年12月11日号は線虫の特集号である}