

## Publications and References for Affymetrix® GeneChip® Exon Arrays

The GeneChip® Exon Array, the most powerful and comprehensive expression array on the market, is the first experimental tool available to profile both gene-level and exon-level expression on the whole-genome scale using a single array. Researchers worldwide have published data highlighting how GeneChip® Exon Arrays, featuring the most advanced design and highest sensitivity available, have enabled them to uncover novel gene expression and alternative splicing patterns

### ALTERNATIVE SPLICING ANALYSIS ON EXON ARRAYS

#### ■ Oberdoerffer S., et al Regulation of CD45 Alternative Splicing by Heterogeneous Ribonucleoprotein, hnRNPLL *Science* 321:686-691 (2008)

##### Key Findings:

・ T-細胞の活性化には、膜貫通フォスファターゼ CD45 をコードする mRNA の選択的スプライシングが伴う。リボヌクレオタンパク質 hnRNPLLが、この選択的スプライシングの重要な誘導因子であることを見出した。刺激を受けた T-細胞では、hnRNPLL がアップレギュレートされ、CD45の転写産物に結合することで選択的スプライシングを制御していた。エクソナレイによる解析で、hnRNPLLは活性化されたT-細胞におけるCD45,CD44,STAT5Aなどの選択的スプライシングのグローバルな調節因子として機能していることが示唆された。造血細胞でのhnRNPLLの誘導により、迅速にトランスクリプトームが変化し、望ましい細胞への増殖と誘導が可能になるかもしれない。

#### ■ Zhang Z., et al SMN Deficiency Causes Tissue-Specific Perturbations in the Repertoire of snRNAs and Widespread Defects in Splicing. *Cell* 133:585-600 (2008)

##### Key Findings:

・運動性ニューロン維持 (SMN) タンパク質は、mRNA 前駆体スプライシング装置の主要な構成要素である small nuclear RNA (snRNA) リボヌクレオタンパク質 (snRNPs) の生合成に必須である。SMNの欠損は、運動性ニューロン消耗性疾患であるSMA (脊髄筋萎縮症:spinal muscular atrophy) を引き起こす。本研究では、重篤な SMAで起きているのと同様に、SMN の欠損が及ぼす、細胞の種類に特異的な snRNA と mRNA のレパートリーに対する予期しない効果を示した。リアルタイムPCRとGeneChip Mouse Exon 1.0ST Array を用い、SMN を欠損したマウスの組織では、snRNA 間の量比が変化し、広範な遺伝子の転写産物で、mRNA 前駆体スプライシングの欠損が起きていることが見出された。

これらの発見は、RNA代謝とスプライシング調節における SMN複合体の重要な役割を明らかにし、SMAが一般的なスプライシング異常による疾患で、運動性ニューロンだけに限定されるものでないことを示している。

#### ■ Clark T. A., et al. Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome Biology* 8(4):R64 (2007).

##### Key Findings:

・ 本論文は、プロトタイプGeneChip Exon Arrayを用いて選択的スプライシングを検討した最初のAffymetrixの発表論文である。  
・ Clarkらは、組織特異的選択的スプライシング、ならびに既知のエクソンおよび十分にアノテーションが付された遺伝子以外の有意な発現に関する結果を示した。このデータは、GeneChip Exon Arrayの包括的なデザインによってのみ得ることができた。  
・ さらに、選択的スプライシングを同定するための、splicing index algorithmを提唱した。このアルゴリズムの妥当性は、脳に豊富に存在するエクソンに対するRT-PCRにより確認された。

■ **Das D., et al. A correlation with exon expression approach to identify cis-regulatory elements for tissue-specific alternative splicing.**

*Nucleic Acids Research* 35(14):4845-4857 (2007).

**Key Findings:**

- Dasらは、選択的スプライシングのcis制御モチーフを同定するため、発現との相関を検討した。
- 筋肉における、転写産物で正規化した発現が、他の組織よりも高いカセットエクソン56個について検討を行い、筋肉特異的スプライシングに対する制御モチーフの候補を複数発見した。
- 「組織特異的なエクソンに関する更なるデータセットが解析用に入手できれば、われわれはエクソン発現との相関を検討することで、選択的スプライシングのcis制御に対する重要な知見が得られると期待している。」

■ **French P. J., et al. Identification of differentially regulated splice variants and novel exons in glial brain tumors using exon expression arrays.**

*Cancer Research* 67:5635-5642 (2007).

**Key Findings:**

- Frenchらは、脳神経膠腫の組織学的サブグループ間で発現が異なるスプライスバリエーションの同定を行った。
- その結果、Human Exon 1.0 ST Arrayの利用が、組織学的な外観に基づく神経膠腫のサブグループの分子レベルでの分類に有用であることが明らかになった。
- エクソンレベルのプロファイリングでは、700個以上の新規エクソンおよび神経膠芽腫および乏突起膠腫でスプライシングの異なる多数のエクソンも同定できた。これらの多くはRT-PCRにより確認された。

■ **Gardina P. J., et al. Alternative Splicing and Differential Gene Expression in Colon Cancer Detected by a Whole-Genome Exon Array.**

*BMC Genomics* 7(1):325 (2006).

**Key Findings:**

- Gardinaらは、エクソンアレイを用いて、結腸癌10検体および正常組織サンプル10検体の発現プロファイルを解析した。
- 組織のタイプによって発現が大幅に異なる遺伝子に関して、GeneChip Exon ArrayとU133 Plus 2.0 Arrayの遺伝子レベルシグナルが相関していることが明らかになった。
- 癌と対照サンプルで発現の異なる遺伝子を検討し、発現が異なる遺伝子を160個同定して、癌でアップレギュレートされている遺伝子のほぼ3分の1が、有糸分裂、細胞周期制御、細胞増殖、浸潤、マトリックスリモデリングおよびWntシグナル伝達と密接に関与するネットワークの一部であることが明らかになった。
- 癌組織と正常組織でスプライシングの異なる多数の遺伝子も同定した。これらのうち11個は、RT-PCRで確認できた。興味深いことに、これらの遺伝子11個中10個は、細胞骨格の形成や他の細胞のマトリックスとの相互作用に関与しており、スプライシングにより制御されるネットワークを形成していた。これらの結果は、癌の病因への理解を深めることを可能にし、治療のターゲットおよび診断マーカーを提供できる可能性がある。

■ **Hung L. H., et al. Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: A combined microarray and RNAi analysis.**

*RNA* 14:284-296 (2008).

**Key Findings:**

- Hungらは、RNAiとGeneChip Exon Arrayを組み合わせて、既知のmRNA スプライシング制御因子のノックダウンに基づき、選択的スプライシングの変化を明らかにした。
- これまでに選択的スプライシングの証拠が得られていなかった複数の新規スプライスバリエーションを予測した。
- GeneChip Exon Arrayデータに基づき、異なるポリA部位の選択が、hnRNP Lが関与する新しい制御メカニズムとして機能していることを推測した。

■ Jhavar S., et al. Detection of TMPRSS2-ERG translocations in human prostate cancer by expression profiling using GeneChip Human Exon 1.0 ST Arrays.

*Journal of Molecular Diagnostics* 10:50-57 (2008).

**Key Findings:**

- Jhavarらは、前立腺癌サンプル27検体で個々のERGエクソンの発現をモニタリングし、GeneChip Exon Arrayが、転座により生成するハイブリッドTMPRSS2-ERG転写産物を検出できるかどうかを検討した。
- 癌サンプル27検体中15検体のERG遺伝子の発現の差が検出できた。これらの15検体全てで、エクソン2および3に比べてエクソン4-11の発現が増加していた。これは、ERG遺伝子のエクソン4の融合が関与する転座を示唆しているという仮説を立て、15検体全てについてRT-PCRで確認した。
- 「われわれの結果は、ERG転座を検出するためのExon 1.0 ST Arrayを用いた発現解析が有効であることを明らかにし、ヒト前立腺癌の発生について新たな知見を提供している。」

■ Kwan T., et al. Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans.

*Nature Genetics* 40(2)225:231 (2008).

**Key Findings:**

- Kwanらは、CEU HapMap集団を検討し、転写産物アイソフォームの特異的な発現を制御する頻度の高い遺伝的変異のゲノムワイドの解析を行った。
- 隣接するSNPと転写産物レベルが相関している遺伝子を検討し、39%が遺伝全体の発現の変化を反映し、55%が転写産物アイソフォームの変化(スプライスバリエーション、5'および3'UTRの差異)を反映していることを明らかにした。
- 3'バイアスアレイを用いてCEU集団の発現プロファイルを検討した過去の報告と、著しい違いがみられることが明らかになった。これらの結果、過去の研究では3'UTRが短い転写産物の同定が不正確で、選択的スプライシングを受けた転写産物が同時に見逃されていたことが明らかになった。
- 「われわれは、遺伝子の多くの領域をターゲットとしたエクソンアレイなどのツールが、これまで考えられていたよりも、遺伝子発現変化の本当の複雑さのより完全な全体像を提供できることを明らかにした。」

■ Kwan T., et al. Heritability of Alternative Splicing in the Human Genome. *Genome Research* 17:1210–1218 (2007).

**Key Findings:**

- Kwanらは、HapMap集団由来の細胞株の、選択的スプライシングパターンのヒトにおける差異を検討し、個人によって異なる、配列で確認されたエクソンスキッピング、イントロンリテンションおよび潜在的なスプライス部位の利用を含む複数の転写産物を同定した。
- 過去にアノテーションが付されていない複数のスプライシングを同定し、GeneChip Exon Arrayが既知および新規の選択的スプライシングを同定できることが明らかになった。

■ McKee A. E., et al. Exon expression profiling reveals stimulus-mediated exon use in neural cells.

*Genome Biology* 2007 8:R159 (2007).

**Key Findings:**

- McKeeらは、GeneChip Exon Arrayを用いて、カルシウム誘発性のエクソンレベルおよび転写産物レベルの発現を検討し、細胞外刺激と特定のエクソンの転写とを結びつけた。
- 「驚くべきことに、転写産物全体に変化が認められたものよりも、一部のエクソンの発現レベルのみに変化が認められた転写産物の方が多かった。このことは、KClおよびTPGに反応して、エクソン利用の著しい変化が起きていることを示唆している。」
- 選択的スプライシングにおける刺激誘発変化が、遺伝子制御の主要な因子として働いていることが明らかになった。

■ Moore M. J. and Silver P. A. Global analysis of mRNA splicing.

*RNA* 14:197-203 (2008).

**Key Findings:**

- MooreとSilverは選択的スプライシングの研究に使われている実験方法をレビューし、いくつかのGeneChip Exon Arrayの研究について簡単なレビューを行った。

■ Yeo G. W., et al. Alternative Splicing Events Identified in Human Embryonic Stem Cells and Neural Progenitors.

*PLoS Computational Biology* 3(10):e196 (2007).

**Key Findings:**

- Yeoらは、ヒト胚幹細胞に比べて、神経前駆細胞で選択的スプライシングを受けると予測される1,737個の内部エクソンを同定するための、異常値検出法を紹介した。
- セリン/スレオニンキナーゼおよびヘリカーゼ活性をコードする遺伝子に、異なるエクソンを用いる遺伝子候補が多いことを発見した。
- 多数の哺乳類のゲノム配列を比較することにより、保存された多数の結合部位候補を同定できた。これらは、選択的スプライシングを受けると考えられるエクソンの近傍に多数認められた。

## GENE EXPRESSION ANALYSIS ON EXON ARRAYS

■ Chahrour M., et al. MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription

*Science* 320: 1224-1229 (2008)

**Key Findings:**

- Rett症候群という、自閉症様の行動を特徴とする発達障害の研究に、Mouse Exon 1.0 ST Array を用いている。この疾患の原因遺伝子 MeCP2 のコピー数を操作したマウスで、視床下部におけるゲノムワイドの遺伝子発現を調べた。MeCP2 は、数千というこれまで考えられていたより多くの遺伝子発現を制御し、activatorとしても repressorとしても機能しているという新しい知見が得られた。

■ Duan S., et al. Genetic Architecture of Transcript-Level Variation in Humans

*The American Journal of Human Genetics* 82, 1101–1113, (2008)

**Key Findings:**

- HapMapのpopulation で、Human Exon 1.0 ST Array を用いて遺伝子発現の差異を調べ、SNP ジェノタイプとの関連を議論している。
- これまでも人種間の遺伝子発現の違いを研究した報告はあり、主にHuman Genom Focus Arrayや Human Genome U133 シリーズのアレイが用いられてきたが、Human Exon 1.0 ST Array を用いるメリットについては、論文の中で議論されている。

■ Hu Z., et al. Exon-Level Expression Profiling: A Comprehensive Transcriptome Analysis of Oral Fluids

*Clinical Chemistry* 54:5, 824–832 (2008)

**Key Findings:**

- 分解しやすい唾液サンプルでExonレベルでの発現プロファイリングを行い、定量PCRの結果との相関が高い結果が得た。
- 新しい転写産物を検出でき、それらの多くは、従来の3'末端のアプローチでは見過ごされていた、5'末端のフラグメントから検出されたものであった。

■ Ge X., et al. Genome-wide analysis of antisense transcription with Affymetrix exon array.

*BMC Genomics* 9:27 (2008).

**Key Findings:**

- Geらは、改良プロトコールとGeneChip Exon Arrayを用いて、エクソン部位のアンチセンス転写を検討した。
- UniGeneクラスタ1,516個にまたがるエクソン部位2,088カ所のアンチセンス転写が同定された。

■ Zhang W., et al. Evaluation of Genetic Variation Contributing to Differences in Gene Expression between Populations. *The American Journal of Human Genetics (In press, 2008).*

**Key Findings:**

- Zhangらは、2つのHapMap集団(アフリカ系1集団、ヨーロッパ系1集団)の発現プロファイルを検討し、発現に差のある遺伝子を同定して、どのような生物学的経路とプロセスがこれらの2つの集団に関係しているかを明らかにした。
- 2集団で発現の異なる転写産物クラスターを383個同定した。発現が異なる遺伝子は、リボソーム生合成および抗菌体液性反応経路に多かった。また発現の異なる遺伝子の上流および下流のSNPのリストも明らかにした。
- この研究は全体的に、集団レベルの遺伝子発現の差異が、疾患および薬剤毒性に対する遺伝的感受性に関連している可能性を示している。

■ Wang X., et al. The Expression of MicroRNA miR-107 Decreases Early in Alzheimer's Disease and May Accelerate Disease Progression through Regulation of  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1. *Journal of Neuroscience 28(5):1213-1223 (2008).*

**Key Findings:**

- Wangらは、さまざまな病期のアルツハイマー病患者の脳組織から抽出したRNAの発現プロファイルを検討した。
- BACE1 mRNAレベルが、miR-107レベルと負の相関を示し、アルツハイマー病の進行と正の相関を示すことが明らかになった。

■ Huang R.S., et al. A genome-wide approach to identify genetic variants that contribute to etoposide-induced cytotoxicity. *PNAS 104(23):9758- 9763 (2007).*

**Key Findings:**

- Huangらは、遺伝子型、遺伝子発現および細胞毒性データを用いて、化学療法剤誘発性の細胞毒性に関連した、機能的SNPやハプロタイプの同定を目指した。
- Exon 1.0 ST Arrayを用いて全ゲノム発現データを得て、直線回帰により、エトポシド細胞毒性に関与していると考えられるSNPとの相関を評価した。
- 解析により、遺伝子発現への影響に基づいて、エトポシド誘発性毒性に寄与する63の遺伝的変異が同定された。

■ Huang R. S., et al. Identification of Genetic Variants Contributing to Cisplatin-Induced Cytotoxicity by Use of a Genome-wide Approach. *American Journal of Human Genetics 81:427-437 (2007).*

**Key Findings:**

- Huangらは、シスプラチン誘発性細胞毒性の遺伝的基礎を理解するため、HapMap細胞株176株(CEU 87株およびYRI 89株)の発現プロファイルおよびSNPパターンを検討した。
- 26遺伝子の発現変化およびシスプラチン誘発性細胞毒性と有意な相関を示す17のSNPが同定された。

■ Kapur K., et al. Exon arrays provide accurate assessments of gene expression. *Genome Biology 8(5):R82 (2007).*

**Key Findings:**

- Kapurらは、GeneChip Exon Arrayの遺伝子発現を評価する方法を開発した。これは、個々のエクソンの発現を評価するベースライン作成に向けた第一歩である。
- この方法には、プローブ特異的バックグラウンド補正とプローブ選択方法が含まれる。これはGeneChip Tiling Array用に開発されたMATアルゴリズムに基づいている。
- 著者らはGeneChip Exon Arrayと彼らのモデル(GeneBASEと呼ばれる)を用いれば、従来の3発現アレイよりも正確に遺伝子発現を測定できると提唱している。

■ Okoniewski M. J., et al. High Correspondence Between Affymetrix Exon and Standard Expression Arrays. *Biotechniques* 42(2):181-185 (2007).

**Key Findings:**

- Okoniewskiらは、確立された2つの細胞株の遺伝子発現プロファイルの比較において、GeneChip Exon Arrayおよび従来のU133 Plus 2.0 Arrayで得られた結果を比較した。
- 3種類のマッピング方法を用いたところ、2種類のアレイは、発現変化率 (fold change) に関して高い一緻性を示した。
- 著者らは、「従来のマイクロアレイは既に繰り返し実験的に検証されているため、本研究は、エクソンアレイが、既存のアレイにうまくマッピングできるプローブセットだけでなく、トランスクリプトームをより広くカバーする何千もの他のプローブセットについても信頼性が高いという、強力な証拠を提供している」と結論づけた。

■ Xing Y., et al. Assessing the Conservation of Mammalian Gene Expression Using High-Density Exon Arrays. *Molecular Biology and Evolution* 24:1283-1285 (2007).

**Key Quotes from the Manuscript:**

- 「3'発現マイクロアレイは、各遺伝子の3'末端について少数のプローブを用いるため、ヒトとマウスの3'発現アレイ間で絶対発現量の測定値を直接比較すると、誤りを招く。ヒトとマウスの3'アレイではオルソログスな遺伝子について完全に独立したプローブデザインを用いているためである。」
- 「3'発現アレイとは異なり、GeneChip Exon Arrayでは、対応するヒト組織とマウス組織におけるオルソログス遺伝子の発現レベルがよく相関している。このことは、転写物存在量の安定化に対する強力な選択圧があることを示唆している。」
- 「われわれの解析は、特に遺伝子発現の進化的な研究に関する、高密度エクソンアレイ技術の有用性を示している。」

## ANALYSIS/METHODS DEVELOPMENT

■ Guryev V., et al. Distribution and functional impact of DNA copy number variation in the rat *Nature Genetics* .40 (5): 538-545 (2008)

**Key Findings:**

- Victor G., et al.らはRat Exon 1.0 ST Arrayを用いてラットゲノムのCNV解析を行い(その際ゲノムDNAからのターゲット調製はMapping Assay Stylプロトコルを流用)、ラットゲノムのCNVとヒトゲノムのCNVを比較している。同時に発現解析をRat Genome 230アレイを用いて、CNVと疾患との関連などについて議論している。

■ Bitton D. A., et al. Exon-level integration of proteomics and microarray data. *BMC Bioinformatics* 9:118 (2008).

**Key Findings:**

- Bittonらは、非腫瘍原性ヒト乳房上皮細胞株から得た定量的タンパク質質量分析データとエクソンレベルデータを比較し、両タイプのデータの一致性を検討した。
- これまでにプロテオミクスデータと3'発現アレイデータで観察された一致性と比較して、プロテオミクスデータとエクソンアレイデータには非常に高い一緻性が認められた。彼らは、この高い相関性が、より精密なペプチドエクソンレベルでデータを比較できるためであるとした。

■ Abdueva D., et al. Experimental Comparison and Evaluation of the Affymetrix Exon and U133 Plus 2.0 GeneChip Arrays. *PLoS ONE* 2(9):e913 (2007).

**Key Findings:**

- Abduevaらは、一連のスパイク添加 (spike-in) ハイブリダイゼーション実験で、GeneChip Exon ArrayとHuman Genome U133 Plus 2.0 Arrayの性能を比較し、2種類のアレイの性能が同等であることを示した。

「いくつか大きな技術的な違いがあるにもかかわらず、われわれは、両プラットフォームの間に高い一致性を認めた。すなわち、個々の Human Exon 1.0 ST Array のプローブは、濃度変化を高い信頼性で検出でき、エクソンレベルで偏りのない発現測定を行うことができる。」

■ **Mao X., et al. Rapid high-resolution karyotyping with precise identification of chromosome breakpoints. *Genes, Chromosomes and Cancer* 46(7):675-83 (2007).**

**Key Findings:**

- Maoらは、多色蛍光in situハイブリダイゼーション (M-FISH) と Affymetrix 500K Array を組み合わせて、前立腺癌細胞モデルの高解像度核型分析および染色体切断点の同定を行った。
- GeneChip Exon Array を用いて、融合遺伝子または遺伝子部分欠損の原因となる転座を確認した。
- 個々の腫瘍におけるほとんどの染色体再編成を迅速かつ正確に同定できる方法が示された。この方法により、腫瘍形成における重要な遺伝子および遺伝的バイオマーカーの同定が容易になる。

■ **Okoniewski M. J., et al. An annotation infrastructure for the analysis and interpretation of Affymetrix exon array data. *Genome Biology* 8(5):R79 (2007).**

**Key Findings:**

- Okoniewskiらは、「X:MAP」と呼ばれるゲノムレベルアノテーションデータベース、および「Exonmap」と呼ばれるエクソンアレイ解析用の BioConductor/R パッケージを用いて、GeneChip Exon Array データを解析するプロセスを提唱した。
- X:MAPにより、GeneChip Exon Array からゲノムまでの Affymetrix プローブセット配列のきめの細かいマッピングが効率的に処理され、Google API インターフェースを搭載したゲノムブラウザでデータが視覚化される。
- Exonmapは、エクソンアレイ解析用に最適化された Bioconductor/R パッケージであり、データベースの複数の表から抽出したデータの利用と統合を行う。これにより、クライアントとサーバー間のデータ転送の諸経費が抑えられる。

■ **Robinson M. D. and T. P. Speed. A comparison of Affymetrix gene expression arrays. *BMC Bioinformatics* 8:449 (2007).**

**Key Findings:**

- Robinson と Speed は、検討した3種類の Affymetrix 発現プラットフォーム間で、遺伝子レベルでのシグナル推定値の生成において高い一致性が示されることを明らかにした。
- 著者らのデータから、whole-transcript 発現アレイの感度が高く、3' 発現アレイでは見逃されていた真の生物学的差異をとらえられる可能性が示唆される。
- 「包括的なアレイである GeneChip Exon Array アレイは、既知または予測された全てのエクソンの内容の測定に有用性を有している。」

■ **Xing Y., et al. Probe Selection and Expression Index Computation of Affymetrix Exon Arrays. *PLoS ONE* 1(1):e88 (2006).**

**Key Findings:**

- Xing らは、経験的データセットを用いて構成的に発現されているエクソンを同定する新しいアルゴリズムを提唱し、これらの構成的なエクソンに対応する GeneChip Exon Array 上のプローブのリストを作成した。
- 彼らはこの経験的に得られたリストを用いて、定評ある Li-Wong プローブモデル (Bioconductor で実行) と組み合わせ、従来のマイクロアレイよりも各遺伝子の真の転写活性をより忠実に示すエクソンアレイに基づき、正確な遺伝子レベルの発現量測定を行った。

■ **Yates T., et al. X:Map: annotation and visualization of genome structure for Affymetrix exon array analysis. *Nucleic Acids Research* 36:D780-D786 (2008).**

**Key Findings:**

- Yates らは、GeneChip Exon Array およびそれに対応したゲノムデータをマッピングするマッピングプロジェクト X:Map を導入した。

▪ X:Mapにより、各遺伝子のイントロン エクソン構造の詳細なアノテーション、各遺伝子の既知の転写物に対するマッピング、およびエクソンアレイターゲット配列に対する各遺伝子の相対的な位置が得られる。

■ **Yoshida R., et al. A Statistical Framework for Genome-Wide Discovery of Biomarker Splice Variations with GeneChipR Human Exon 1.0 ST Arrays.**

*Genome Informatics* 17(1):88-89 (2006).

**Key Findings:**

▪ Yoshidaらは、エクソン発現プロファイルから、観察されるスプライシングの変化を同定するための、新しい統計学的手法を提唱した。この研究は、選択的スプライシング解析用のより高度な統計アルゴリズムの開発に向けた重要な第一歩である