

氏名(本籍)	三浦亜耶(千葉県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4304号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Study on the Function of Human Secretory Proteins by Gene Expression Profiles</b> (遺伝子発現プロファイルを用いたヒト分泌タンパク質機能の研究)		
主査	筑波大学教授(連携大学院)	農学博士	磯貝隆夫
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田博
副査	筑波大学教授	理学博士	漆原秀子
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田治

### 論文の内容の要旨

ヒトゲノムやcDNA配列解析につづくゲノム科学の課題の1つは、これらの情報や資源を基に、多様な生体反応系のそれぞれを成立させている分子間ネットワークのしくみを解き明かすことにある。サイトカインは細胞の遺伝子発現変動を引き起こすことで様々な細胞機能を制御し、生体反応と細胞間コミュニケーションに関与する因子である。細胞レベルで、サイトカインによって引き起こされる多様な生命現象を比較解析し、多種多様な応答性を生み出す機構について法則性や原理を見出すことは、生命現象を理解する上で重要である。また、サイトカインはこれまでにヒトで百種類以上存在することが知られているが、細胞機能の制御を包括的に理解するために、いまだ見つかっていないサイトカイン様生理活性因子を探し出すことも重要である。これらの目的にはサイトカインとしての生物学的活性を適切に評価できる指標を用いる必要がある。DNAマイクロアレイは、数万遺伝子の発現状態を一度に調べることを可能にした技術の1つである。それを用いた遺伝子発現プロファイルとして、サイトカインによって引き起こされる多様な生命現象を数値化することで、複数の現象について比較解析することが可能となる。本論文では、DNAマイクロアレイによって取得した遺伝子発現プロファイルを使用し、①遺伝子発現変動の類似性に基づいた、異なるサイトカイン刺激に対するヒト冠動脈血管内皮細胞応答の細分化、②遺伝子発現パターンの相違が細胞を刺激したサイトカインの活性変化と有意に相関することの検証、③新規サイトカイン様生理活性因子のスクリーニングシステムの構築を行った。

#### 1) 遺伝子発現変動の類似性に基づくサイトカイン刺激に対するヒト冠動脈血管内皮細胞応答の細分化

正常ヒト冠動脈血管内皮細胞(HCAEC)をモデルとして、複数の異なるサイトカイン刺激に対する細胞応答を遺伝子発現変動の類似性に基づいて細分化する研究を行った。様々な生理活性因子の刺激によって引き起こされる細胞応答の多様性を生み出している分子レベルの機構を理解するために、血管内皮細胞の様々な機能応答に関与する主要なサイトカインであるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ およびOncostatin M(OSM)で刺激したHCAECの遺伝子発現プロファイルを約2.2万のヒト遺伝子を搭載したDNAマイクロアレイを用いて取得し、比較解析した。その結果、異なるサイトカイン刺激に対して類似した発現変動をし

た遺伝子群や、個別のサイトカイン刺激に対して特異的に発現変動した遺伝子群のパターンを詳細に分け、それらに属する遺伝子を同定した。その結果、サイトカイン刺激に対する HCAEC の細胞応答が 15 パターンに分けられることを明らかにした。

### 2) 遺伝子発現プロファイルによるサイトカインの生物学的活性の評価

細胞の遺伝子発現パターンの変化と細胞を刺激したサイトカインの活性変化が有意に相関することを調べた。IL-1 $\beta$  をモデルタンパク質とし、作用強度の変化が予測される種々の融合タグ等の付加配列をもつもので刺激をおこなうことや、細胞を刺激する際の量を変化させることによって遺伝子発現プロファイルを取得し、比較解析した。その結果、サイトカインのタンパク質の構造の変化や刺激の量に応じて遺伝子の発現パターンが変動することを明らかにした。即ち、生物学的活性を評価できることを明らかにした。

### 3) 遺伝子発現プロファイルを用いた *in vitro* 合成分泌タンパク質の機能解析系の開発

新規サイトカイン様タンパク質の発見を目的とした探索システムの構築を行った。ゲノムや cDNA の配列解析により、分泌タンパク質をコードする可能性がある機能未知のタンパク質を予測できるようになった。①ヒト全長 cDNA をリソースとしてタンパク質を効率的に発現し取得することを目的とし、効率的クローニングシステムと小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を組み合わせた結果、マルチウェルプレートで 2 日間以内に cDNA から合成タンパク質を取得できること、②小麦無細胞タンパク質合成系においてジスルフィド結合を形成できるように調整した結果、ジスルフィド結合を形成するサイトカインでも活性を有するタンパク質を取得できること、③アッセイ系の高効率化をめざし、96 ウェルプレートで縦方向と横方向にそれぞれ混合した 20 種類のタンパク質溶液を調製し、それらで刺激した細胞から取得した遺伝子発現プロファイルを解析した結果、96 ウェルプレート上の生理活性因子の位置を一度の解析で特定できることを明らかにした。分泌タンパク質合成用に至適化した汎用タンパク質発現系と遺伝子発現プロファイルを指標としたサイトカインの活性評価系が、新規生理活性因子の迅速な探索や機能解析に有用であることを示すことができた。

多様な生体反応系を制御するサイトカイン機能の破綻は多くの疾患と関連することが知られている。したがって、サイトカインによって引き起こされる生命現象を遺伝子発現プロファイルによって記述し蓄積することは、サイトカインの生物学的活性の分類や細胞の各応答パターンに属する遺伝子を明らかにするなどの生物学の基礎研究に留まらず、診断マーカーや治療標的の発見にも貢献できる可能性がある。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

遺伝子発現プロファイルを指標とした細胞応答の解析という方法が、今までとは異なる遺伝子発現の変動の類似性という観点から分割していくことができることを明らかにしたことが評価される。また、細胞応答を詳細に切り分ける過程で各応答パターンを構成する遺伝子を明らかにした結果、サイトカイン刺激に対する細胞応答の多様性を生む機構の理解につながる 1 つの解析手法の開発がなされたことも評価される。更に、遺伝子発現プロファイルが、サイトカインによって引き起こされた細胞応答をモニターする指標になりうることが実証されたことも評価される。その上、本研究で構築した汎用タンパク質合成系と遺伝子発現プロファイルを指標としたサイトカインの活性評価系を、新探索システムとして新規生理活性因子の探索と未だ機能が明らかでない遺伝子を対象とした解析の技術基盤となることが期待される成果である。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。