

氏名(本籍)	わた 綿 ^{わた} 引 ^{ひき} あきら 玲 ^{あきら} (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3556号
学位授与年月日	平成16年7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	人間総合科学研究科
学位論文題目	Development of Alternative Splicing Libraries Reveals the Complexity of Alternative Splicing in Mouse Melanoma and Melanocyte Cells (選択的スプライシングライブラリの開発によるマウスメラノーマとメラノサイト細胞における選択的スプライシングの複雑さの解明)
主査	筑波大学教授 医学博士 野口雅之
副査	筑波大学客員助教授 医学博士 木山亮一 (産業技術総合研究所)
副査	筑波大学講師 博士(医学) 今川重彦
副査	筑波大学講師 博士(医学) 榎和子

論文の内容の要旨

(目的)

ヒト、マウスなどのゲノムプロジェクトが進むにつれて、ゲノム上に存在するタンパク質をコードする遺伝子は30000前後と推定されている。この数は実際に生命活動を行う上で必要なタンパク質の数に比べて少なく、その差を埋めるものとして選択的スプライシングの存在が重要となってきた。しかし、選択的スプライシングの機序は未だ不明な部分が多い。また各々の遺伝子における選択的スプライシングの存在についての研究は進んでいるが、包括的なスプライシングの選択についてのデータは未だほとんど得られていない。そこで本研究では、2つの異なる状況(2つの細胞株)における選択的スプライシングを同時にできるだけ多く得るために、選択的スプライシングライブラリ(Alternative Splicing Library; ASL)を開発し、状況特異的な選択的スプライシングとそれを含む完全長cDNAの獲得を目指した。

(対象と方法)

二つのマウス細胞株(メラノサイト、メラノーマ)由来の完全長cDNAライブラリを材料とし、各々が逆鎖の関係になるように一本鎖cDNAを合成し、ハイブリダイゼーションさせ二本鎖とした。選択的スプライシングがある部分はアニールしないため一本鎖のループを形成すると考えられ、その一本鎖部分と5'末端をビオチン化修飾した25塩基ランダムオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを行いストレプトアビジンを介して選択した。さらに得られたDNA断片にY字型リンカーを連結させ、各々の鎖をPCR増幅し一定の方向でサブクローニングを行いライブラリを作成した。このライブラリから得た配列情報をBLAT, MAP, BLASTのプログラムを用いて解析し、その遺伝子情報、および由来となる細胞株の推定を通じて選択的スプライシングを探索した。一部についてRNAおよび完全長のcDNAクローンを使い選択的スプライシングの発現解析を行った。

(結果)

構築された ASL は、サザンブロッティングで選択的スプライシングが約 40 倍濃縮されることを確認した。ASL から約 45000 クローン (Alternative Splicing Sequence TagS ; ASSETS) の配列を得て、それらの配列を ASSETS 同士、また完全長 cDNA、マウスゲノムと比較することで、ASL 内に存在する選択的スプライシングの候補として新規なものも含めて 662 個見出した。それらのスプライシングの形態を分類したところコード領域内で起こっているものが約 8 割を占めることが分かった。これらの遺伝子は癌化に関係しているものだけでなく種々のものを含んでいた。一部を RT-PCR を用いてスプライシング同位体の発現を確認した。さらに完全長 cDNA ライブラリから候補と相似なクローンを抽出し、選択的スプライシングおよびその組み合わせ、完全長の配列と ASSETS との関係を得た。

(考察)

ASSETS の配列はスプライシングの上流と下流の配列を含んでいるためにマウスゲノムと配列と比較することで選択的スプライシングのパターンを知ることが可能となっている。さらに一方向にクローニングすることで由来するライブラリを推定することができる。ASL はマイクロアレイと比較して新規の選択的スプライシングが得られやすいこと、完全長 cDNA をもとにしているのものでその選択的スプライシングの同位体である完全長の遺伝子を得ることが容易であることからプロテオーム解析に導きやすい点が挙げられる。また RT-PCR を組み合わせることで選択的スプライシングの発現の比を調べることも可能である。

(結論)

今回開発された ASL により、状況に特異的な選択的スプライシングとその完全長の遺伝子の獲得というシステムが作られ、これを用い正常と疾患を対比させることで疾患に特異的に発現しているスプライシング探索の道を開くものとなり、疾患に関係するもののみを抑えるような治療などへの応用が可能となる。このように疾患を遺伝子の発現の強弱で見ただけでなく別の側面で捉えることができる強力なツールとなることが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は 2 つの細胞あるいは組織間での選択的スプライシングの差異を網羅的に解析する方法を開発した極めてユニークで意欲的な研究である。現在まで既知の遺伝子のスプライシングの異常について個々の遺伝子の解析はなされているが、選択的スプライシングという事象そのものに注目してこの観点から色々な遺伝子のスプライシングの特徴に迫ろうとする研究はない。概要でも述べているようにこの方法を用いて正常と疾患を対比させることで疾患に特異的に発現しているスプライシング探索の道を開くものとなると考えられる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。