

氏名(国籍)	みきりか 三木理雅(韓国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2731号
学位授与年月日	平成13年12月31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	医学研究科
学位論文題目	Delineating Developmental and Metabolic Pathways <i>In Vivo</i> By Expression Profiling Using the 19 K Set of RIKEN Full-Length Enriched Mouse cDNA Arrays (理研マウス完全長cDNAマイクロアレイを用いた発現プロファイルによる代謝経路および脳の発育過程の解析)
主査	筑波大学教授 医学博士 三輪正直
副査	筑波大学教授 医学博士 中内啓光
副査	筑波大学教授 医学博士 山本雅之

論文の内容の要旨

(目的)

ゲノムプロジェクトの成果によって得られた膨大なシーケンスの発現情報を解明するのにDNA microarray技術は非常に有用なツールであり、ゲノム創薬や遺伝子診断などの応用への期待が高まっている。しかし、遺伝子数の多い哺乳動物では適切なarrayを作成することが困難であったため、哺乳動物における発育過程や組織の維持などの機能解析はこれまでに行われてこなかった。

そこで本研究では、マウス完全長cDNAプロジェクトにより得られた18816種類のnon-redundant, cDNAライブラリーをスライドガラス上にスポットしたcDNA microarray (RIKEN 19K array) を作製し、それらを用いて49種類のマウスの主要臓器、及び発生段階における遺伝子発現プロファイルを作成した。

(対象と方法)

DNA microarray上に載せるDNA (ターゲットDNA) は本研究室のプロジェクトによって得られた18816種類のマウス完全長cDNAライブラリーのinsert部分をPCRにより増幅した。これらをアレイヤーを用いてPoly-L-lysineコートしたスライドガラスに固定し19K arrayを作成した。また、19K arrayにハイブリダイズするDNA (プローブDNA) はC57BL/6Jマウスの主要組織および胎児期の組織のmRNAを抽出し、これらをcDNAに逆転写する際に蛍光標識Cy3-dUTPまたはCy5-dUTPで蛍光標識したものを用いた。本研究では1 μ gのmRNAを49組織よりそれぞれ抽出したものをCy3、胎生17.5日目の胎児のオスとメスより抽出したものを等量混ぜたものをCy5で標識しすべての組織のコントロールとした。

再現性の高いデータを抽出するプログラム (PRIM) を用いてフィルタリングを行った結果、14,610遺伝子を得ることができた。これらのデータを用いて、階層クラスタリングを組織間および遺伝子間で行い、胎児期および成体期における遺伝子の発現パターンの類似性や相違性の解析を試みた。さらに、代謝経路に関する遺伝子群のみを抽出し発現パターンの解析を行なった。

(結果・考察)

発生起源や機能が類似した組織は近距離にクラスターされた。これは発現パターンの類似性のみに基づいた場合でも、組織の特異性や組織の持つ機能がよく表されていることを示している。同時に、胎生175日目の胎児のRNAは非常によいコントロールであることが示唆された。

〈成体および発育過程における遺伝子発現パターン〉

脳組織の発育過程における遺伝子発現パターンの解析を行うために、脳組織のデータのみを採用し、階層クラスタを行った結果、出生後10日目の小脳および嗅脳の発現パターンは、発生段階初期（胎生11,12,13日）のそれと類似していた。また、その遺伝子群は細胞死や神経の再構築に関わる遺伝子群と細胞分裂に関与するものに大別された。

E1Aを刺激する遺伝子についても興味深い結果が得られた。Cyclin D1とCREG遺伝子の発現パターンの逆相関が初めて示された。Cyclin D1-CDK4,6複合体はpRBのリン酸化を介してE2Fを活性化し細胞増殖を促進するが、これはCyclin D1がpRB内に存在する結合部位に結合することによる。一方、CREGもまたpRBおよびp300/CBP結合部位を持っており、E1Aを介したE2F活性を阻害する。このように、Cyclin D1とCREG遺伝子の転写が逆相関し、その遺伝子産物が反対の機能を持っていることは理にかなっているように思われる。CREGと発現パターンの類似した遺伝子群の多くはCREGに関与あるいはCREGを制御する遺伝子群であることが予測される。

〈代謝経路関連遺伝子の発現解析〉

代謝経路に関連する遺伝子群の個々の発現解析は様々な組織で行われ、全ての組織において代謝制御が行われていることは推測されていた。しかし、個体全体の代謝経路を一度に解析することは不可能であった。

そこでRIKEN 19K array中に存在する遺伝子から、代謝経路に関連する遺伝子群を抽出し、それらを78種類の代謝経路関連遺伝子群に分け階層クラスタリングを行った。興味深いことに、ほとんどすべての代謝経路の遺伝子群は大きく二つのグループに分かれ、一つは全ての組織に発現している遺伝子群で、もう一つは組織特異的に発現している遺伝子群であった。

さらに、酵素遺伝子の発現パターンの詳細解析を代謝経路のなかでも解析の進んでいる解糖系について行った。それぞれの遺伝子を解糖系の代謝マップに記載し、階層クラスタリングによってグループ化した。これらの遺伝子は、筋肉特異的、精巣特異的、および肝臓と腎臓特異的に発現している遺伝子にグループ化された。筋肉特異的遺伝子において、発現パターンがより似ている遺伝子群は解糖系の中でもより近い経路に存在する遺伝子であることが示された。一方、発現パターンの相関が弱い遺伝子群は経路内でも遠いところに存在する遺伝子であった。

興味深いことに、同じ酵素番号がついているにも関わらず、異なるグループに存在し、組織特異的発現パターンを示しているものがあつた。例えば精巣特異的に発現がみられ、精巣特異的に働くアイソフォームの存在を裏付けるものと考えられた。これらの遺伝子は精子形成の際や精嚢内でエネルギー生産を行う代謝経路間のスイッチを調節していると考えられた。同様のことが筋肉、肝臓、腎臓特異的な遺伝子についても推定可能であり、クラスタリングによって、効率良く組織特異的に機能する遺伝子や、アイソフォームを識別できることがわかつた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者は、ゲノムプロジェクトによって得られた膨大な数のクローンの機能解析を行うのに有用なDNA microarrayの立ち上げを行い、それを用いてマウス49組織の発現プロファイルの作成を行いデータベースの構築を行ってきた。このデータベースは配列情報やモチーフ情報だけでは機能注釈を行うことのできない遺伝子に対しても、発現情報を付加でき、非常に有用なデータベースとなることが期待される。

また、プロフィールの作成だけでなく、大量データベースから生物学的に有用な情報を引き出す方法論を提唱しているという点も高く評価される。

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。