

論文審査の結果の要旨

氏名 三浦史仁

本論文は、2章から成り、第1章は Fluorescent Differential Display 法を用いた出芽酵母の転写活性化因子 Pdr1p の標的遺伝子のカタログ化について、第2章はアダプター付加競合 PCR 法を用いたより高精度な転写物定量システムの確立について述べられている。

近年、ヒトをはじめとする多くの生物において、その生命の設計図ともいえるゲノム構造が決定されている。しかし、ゲノム構造の決定により存在が明らかになった多くの遺伝子の機能は未だ明らかにされていない。つまり、設計図は手に入れても、その暗号を解くには至っていないのである。こういった状況下、より効率的にそれら未知の遺伝子機能を明らかにしようとする機能ゲノミクスと呼ばれる学問分野が確立されつつあり、この中で機能解析の糸口として注目されているものの一つが、ゲノム全体に渡って mRNA の発現動態を記載するトランスクリプトーム解析である。ゲノム的解析は解析そのものが大規模になるため、より有効にこれを行うためには、確固たる解析戦略と高度な解析技術を要する。本論文では、トランスクリプトーム解析におけるこれら二つの重要な点に関して議論を進めている。

機能的相関を持つ遺伝子群は、およそ同様の転写制御を受けているものと考えられ、その制御の実体の多くは転写制御因子によるものである。したがって、これら転写制御因子の標的遺伝子を探索し、カタログ化することは個々の転写制御そのものに対する解析基盤をもたらすだけでなく、さまざまな遺伝子の細胞内での機能を探るための重要な礎となる。出芽酵母ゲノム中にも多くの転写制御因子の存在が確認されているが、この生物を究極に理解するためには、それぞれの転写制御因子の標的遺伝子を同定する必要がある。そのための戦略を考える上でのモデルとして、本論文では出芽酵母の転写制御因子 Pdr1p の標的遺伝子のカタログ化を試みている。論文筆者は、Fluorescent Differential Display(FDD)法を用いることで *PDR1* の野生株、破壊株、過剰活性変異株の三者におけるそれぞれの遺伝子の転写量を比較し、その標的遺伝子を同定しようと試みた。この結果、Pdr1p の既知標的遺伝子を同定し得たことから、それぞ

れの転写制御因子で活性の異なる変異体を用意し、それらの間でトランスクリプトームの比較を行うことが、標的同定の戦略として有効であることを示している。さらには、今まで薬剤耐性の分野で記載されたことのない遺伝子、細胞内の蛋白分解を司るプロテオソーム、糖代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝等の様々な機能に及ぶ遺伝子等 20 遺伝子が Pdr1p による支配を受けている可能性を示している。また、データベース上で注釈もついていないようなゲノム領域からアミノ酸レベルで 100 残基にも満たないような転写物が存在し、それが実際に Pdr1p の制御を受けていることを示し得たことは、ゲノム全域に渡ってより包括的に遺伝子の存在を確認する必要性があることを示している。これらの成果は、トランスクリプトーム解析を行う上での重要な教訓を導いており、今後の同様な解析において参考とすべきものである。

論文筆者は、FDD 解析の中で、未だゲノム的規模のトランスクリプトーム解析技術が成熟していないことを痛感した。昨今の DNA チップ等による解析は十分に高速化がなされているが、その定量性が懸案の対象であった。そこで、より高精度なトランスクリプトーム解析システムの確立を目指して、高い定量性を持つアダプター付加競合(ATAC)-PCR 法に注目した。まず、mRNA の 3'末端にのみ応用可能だった ATAC-PCR 法の解析対象を、アダプター形状に工夫を加えることにより改良し、いかなる制限酵素断片も解析可能な一般化アダプター付加競合(GATC)-PCR 法として確立した。続いて、GATC-PCR を行う上で定量性、感度に非常に大きな影響を持つ非特異的増幅産物の抑制という課題に対し、独自に遺伝子特異的プライマーの特異性判定基準を考案し、プログラムとして実現したことは、同手法の導入を容易にし、より安定なシステムを構築する上で必要不可欠なものであった。さらには、このプライマー設計技術を用いて出芽酵母全ゲノムに対するより詳細な mRNA 発現解析システムを構築しつつあることは、論文筆者の研究者としての資質を顕著に表しているものと考えられる。

なお、本論文の第 1 章は、矢田哲士、中井謙太、榊佳之、伊藤隆司との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。