

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 西田奈央

本論文は 7 章から構成されている。第 1 章は「序論」で、本論文の研究の背景と目的について述べられている。第 2 章は「原理」で、DNA エンコード技術を用いた遺伝情報解析の原理、それを遺伝子多型解析 (SNP 解析) に適用した DigiTag 法の原理、遺伝子発現解析に適用した GepDen 法の原理について述べられている。第 3 章は「試料」で、DigiTag 法の開発で使用されたヒトゲノム DNA、SNP、プローブ及び DNA コード化数 (DCN) 配列、DNA キャピラリーアレイと、GepDen 法の開発で使用されたマウスの遺伝子、プローブ及び DCN 配列、汎用 DNA チップについて述べられている。第 4 章は「実験方法」で、DigiTag 法及び GepDen 法のプロトコールの詳細、反応条件及び特性を検討する実験の方法、DigiTag 法によるヒト第 5 番染色体上の 28 箇所マルチプレックス SNP タイピング解析の実験方法、GepDen 法によるマウスの移植断片対宿主病関連遺伝子の発現解析の実験方法について述べられている。第 5 章は「結果」で、DigiTag 法と GepDen 法の反応条件及び特性を詳細に検討・評価した結果、DigiTag 法によるヒトゲノムのマルチプレックス SNP タイピング解析の結果、GepDen 法によるマウスの遺伝子の発現解析の結果について述べられている。これらの実験結果に対する考察が第 6 章で行われ、最後の第 7 章では本論文の研究の結論について述べられている。

ヒトゲノムのドラフト配列が発表されて以来、ゲノムワイドな SNP 解析、遺伝子発現解析が盛んに行われるようになった。しかし、ゲノムワイドな SNP 解析によって検出された候補領域において、第一義的な疾患感受性遺伝子多型を特定するためには、数十から数百種類の SNP を正確かつ効率よくタイピングできる技術が必要とされる。また、遺伝子の機能解析においても、ゲノムワイドな発現解析によりスクリーニングされた数十から数百種類の機能的に重要な遺伝子について、その機能を明らかにするためには、正確な発現量を効率よく決定できる技術の確立が不可欠である。論文提出者は、このような背景を踏まえ、上記の要求に応えることのできる遺伝子多型解析法と遺伝子発現解析法の確立を目指した研究を行った。

本論文の第 2 章に述べられているように、DNA エンコード技術を用いた遺伝情

報解析法では、SNP の対立遺伝子型や発現遺伝子の種類や量といった遺伝情報を DNA コード化数 (DCN) と呼ばれるオリゴ DNA に変換して解析を行う。この変換のことを DNA エンコードと呼ぶ。DCN は DNA コンピューティングのために開発されたオリゴ DNA で、DNA 分子反応が正確に進むよう設計されている。

DNA エンコード技術を用いた遺伝子多型解析法である DigiTag 法では、SNP の対立遺伝子型が 3 つの部分配列 (名称: SD、D1、ED) で構成された DCN に変換される。D1 は SNP 部位の情報を、ED (ED1 あるいは ED2) は対立遺伝子型の情報を表現するために用いられる。*Taq* DNA リガーゼを用いたライゲーション反応により複数の SNP 部位から同時に SNP 情報が DCN へ変換されたのち、反応液は 2 つに分けられ、それぞれ、プライマーペア (SD、ED1) 及び (SD、ED2) を用いた非対称 PCR により増幅され、異なる蛍光分子で末端標識される。最後に、両方の PCR 産物を一緒にして DNA キャピラリーアレイにハイブリダイズし、二波長で検出することにより、対立遺伝子型が決定される。

DNA エンコード技術を用いた遺伝子発現解析法である GepDen 法では、発現遺伝子の cDNA の種類と量の情報を 4 つの部分配列 (名称: SD、D1、D2、ED) で構成された DCN に変換して解析が行われる。DCN は共通のプライマーペア (SD、ED) で一様に増幅されたのち、デコード反応と汎用 DNA チップを用いて D1 と D2 の組み合わせが読み出され、発現している遺伝子の種類と量が決定される。

第 5 章で述べられているように、論文提出者は第 4 章で述べた実験方法にしたがって DigiTag 法の反応条件と特性を詳細に調べたのち、ヒト染色体 5q31-33 の約 500 Kb 領域に存在する 28 箇所の SNP を対象としたマルチプレックス SNP タイピングを 40 検体に対して行うことにより、DigiTag 法の評価を行った。その結果、多型が見られなかった SNP#13 とクラスター分離の悪かった 3 箇所の SNP (#6、#9、#19) を除く全 24 箇所の SNP においてコール率 99.2% でタイピングができることがわかった。シーケンシング結果との一致率は 100% で、2 回の独立した実験から再現性は、2 箇所の SNP (SNP#2: 0.96、SNP#20: 0.96) を除いて、R 二乗値で 0.99 以上であった。多型の見られなかった SNP#13 を除く 27 箇所の SNP のうち、24 箇所でタイピングが成功したので、タイピング成功率は 88.8% である。この成功率をさらに向上させるために、論文提出者はエンコードステップに用いる 5' クエリープローブにミスマッチを導入してマルチプレックス SNP タイピングを行った。その結果、SNP#6 と SNP#9 においてクラスター分離が改善され、SNP タイピングに成功した。ミスマッチ導入プローブを用いた際のタイピング成功率は 96.3% となり、既存の方法と比較して DigiTag 法は成功率の高い方法であることが実証された。

同じく第 5 章に述べられているように、論文提出者は移植断片対宿主病に関連する 7 種類のマウス遺伝子 (*IGTP*、*TGTP/Mg21*、*Nedd5*、*PRCC*、*vitronectin*、

*Mn-SOD*、*activin beta C*) を標的遺伝子として、GepDen 法の有効性を検証する実験を行った。標的遺伝子に特異的な 30 塩基長の合成 DNA を使った実験により GepDen 法の特異性と定量性を確認したのち、移殖断片対宿主病を発症させたマウスの肝細胞から抽出した 2  $\mu$ g のトータル RNA を用いて発現解析を行った。その結果は半定量的 PCR 法の結果とよく一致することがわかった。さらに、濃度未知の逆転写産物 (*Mn-SOD*、*activin beta C*) に加えて、濃度既知の合成 DNA を 3 種類、3 pM ~ 30 fM の濃度範囲で混ぜて解析することにより、濃度未知の遺伝子産物の絶対量を明らかにできることを示した。

論文提出者が開発した DNA エンコード技術を用いた解析法の特徴のひとつとして汎用性の高さが挙げられる。解析対象に対して自由に DCN を割り当てられるので、エンコードステップ以降は共通の試薬、器具、実験条件で解析を行うことができる。また、エンコード反応を僅かに変更する程度で、SNP タイピングと遺伝子発現解析を同じように行うことができる。このような汎用性の高さは、本論文で開発された方法がより安価な遺伝情報解析のプラットフォームとなり得ることを示している。

以上のように、論文提出者は、DNA エンコード技術を用いた遺伝子多型解析法と遺伝子発現解析法を世界で初めて開発し、ゲノムの機能解析の研究に重要な足跡を残したといえる。

なお、本論文は田邊哲也、橋渡賢図、平安恒幸、高須美和、陶山明、徳永勝士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって方法の開発、実験、解析及び考察を行ったもので、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 (学術) の学位を授与できると認める。