

審査の結果の要旨

氏名 百合野 秀朗

本研究は薬物性肝障害における遺伝子の発現プロファイルを何万という単位で包括的に調べるために、ラットに四塩化炭素急性肝障害を誘導する系を代表的事例として用い、mRNA 転写開始点を含んだ遺伝子発現の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 正常ラットの肝臓から 56,668 tags、四塩化炭素投与したラットの肝臓から 55,909 tags、計 112,577 tags をシーケンスし、それぞれ 18,084 種類、21,868 種類の転写産物を得た。ゲノム中の 1ヶ所にマッチする正常肝臓 21,599 個、四塩化炭素投与肝臓 17,156 個の 5' SAGE tag 中、それぞれ 99.5%、99.2%は RefSeq データベース内の既存転写開始点の-500 から+200bp の内にマッチし、この結果から得られた 5' tag のほとんどが転写開始点であることが示された。
2. 個々の tag を BLAST 検索し、正常ラットの肝臓で発現する遺伝子、四塩化炭素投与ラットの肝臓で発現する遺伝子、正常ラットの肝臓と四塩化炭素投与ラットの肝臓の両者を比較し発現が上昇する遺伝子、発現が減少する遺伝子を各々同定した。続いてラットの正常な肝臓で発現している遺伝子上位 100、四塩化炭素投与で発現する遺伝子上位 100 を遺伝子機能により分類した。正常ラット肝臓の機能と比較して、四塩化炭素投与肝臓では主にトランスポーター、薬物代謝酵素群、RNA 合成の変動が明らかとなった。
3. 多くの遺伝子には複数の転写開始点が存在することが知られている。既知の転写産物にヒットする正常肝臓 5,096 tag、四塩化炭素投与肝臓 6,716 tag のうち共に 85% 以上の転写開始点がエクソンから始まっていることが分かった。しかし四塩化炭素投与により第 1 エクソン以降からの転写開始点が多数観察された。さらにイントロンから始まる転写開始点の割合も増加が認められた。一方、特異的な発現パターンを示す遺伝子も確認された。Spin2b では四塩化炭素投与により第 1 エクソンからの発現が減少したが、第 2 エクソン以降の発現増強が認められた。さらに、Serpina3c では四塩化炭素投与でも第 1 エクソンに発現量の変化は認められなかったが、以降

のエクソンから発現が増加していた。また、Cyp2c23 では発現頻度がほぼ同程度であるにも関わらず、四塩化炭素投与により転写開始点が大きく 3'側へ移動していることが観察された。

4. 今回得られた 5' SAGE データを従来の遺伝子発現解析法と比較するため、Long SAGE 法を用い正常ラット肝臓の解析を行った。シーケンスにより Tag 数は 30,916 tags を得た。解析結果から正常ラット肝臓について強く発現している遺伝子上位 50 個を 5' SAGE の結果と比較した。いくつかの遺伝子はかなり異なるレベルで発現していたが、多くの遺伝子は両方のライブラリーで同程度発現していることが明らかになった。

次に、今回得られた 5' SAGE データを cDNA microarray 解析結果と比較するため、Affymetrix GeneChip Rat Genome230 2.0 を用い本サンプルの解析を行った。解析結果から正常ラット肝臓、四塩化炭素投与肝臓、正常ラット肝臓に対して四塩化炭素投与で発現上昇、減少する各々について強く発現している遺伝子上位 50 個を 5' SAGE の結果と比較した。正常ラット肝臓、四塩化炭素投与ラット肝臓で発現している遺伝子上位 50 は、5' SAGE で解析したデータとほぼ結果が相関することが認められた。正常ラット肝臓に対して四塩化炭素投与で発現が上昇、減少するもの上位 50 では、5' SAGE で解析したデータと一致するものは多くは観察されなかった。しかしながら、GeneChip 解析では遺伝子の総量では変化しないものでも、5' SAGE 法では tag の変化によって遺伝子の発現変化を示すことができた。

5. 本研究で得られた 5' SAGE の転写開始点情報が、従来の転写開始点決定法とどの程度相関があるか確認するため、正常ラット肝臓および四塩化炭素投与したラットの肝臓における Cyp2c23、Gstm1、Vtn の 5'末端領域を 5' RACE 法にて解析した。Tag およびクローンが発現する位置、頻度ともに高い相関が確認された。同時にいくつかの遺伝子 (Cyp2c23、Gstm1、Vtn) の mRNA の長さとおよび発現量をノーザンブロットによって解析を行った。3 遺伝子共に四塩化炭素投与により 3'側に微弱ではあるがバンドが観察された。この結果により 5' SAGE のプロファイルはノーザンブロットによる可視化によっても確認することができた。

以上、本論文では四塩化炭素急性肝障害における mRNA 転写開始点を含んだ遺伝子発現プロファイルを解析し、他の遺伝子発現解析ツールとの比較から 5' SAGE tag の有用性を明らかにした。本研究により得られた結果は、急性肝障害におけるトランスクリプトームの中核的な情報を与えるだけでなく、トランスクリプトームの発現制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。