

## 審査の結果の要旨

氏名 日野 公洋

DNA、RNA、Protein という一連の遺伝情報の流れは分子生物学のセントラルドグマとして長い間信じられてきたが、2006年にノーベル賞を受賞した RNA interference の発見により、細胞内には機能性の小さな RNA 分子が多数存在し、遺伝情報の発現を制御しているということが明らかにされた。現在も数多くの細胞内機能性 small RNA が報告される一方で、その機能の解明は未だに研究の緒に就いたばかりであり、今後の解析が期待されている状態にある。

本論文では、そのような機能性 small RNA 分子の 1 つである microRNA の研究を行っており、腸管上皮分化に関わる microRNA の探索とその制御機構について研究を進めている。

第 1 章は序論であり、研究の背景と目的について述べている。

第 2 章では本研究で行った実験方法について述べている。本研究では多数の分子生物学的手法を用いて解析を行っているが、その個々の手法を詳細に説明している。

第 3 章では、実験結果とその結果を踏まえた考察を 9 節に渡って述べている。

1 節では、本研究を通して用いている腸管上皮細胞分化のモデル系、Caco-2 細胞分化誘導系の構築を行っている。

2、3 節では、分化誘導前後における 156 種類の microRNA の定量を行い、分化誘導により発現上昇を示す microRNA として miR-194 に注目した理由について述べている。また、異なる分化形質を持った腸管由来培養細胞株間での miR-194 の発現量比較を行い、miR-194 が Caco-2 細胞分化誘導系において特に高い発現と誘導性を示す事を明らかにしている。

4 節では、マウスの小腸切片を用いて in situ hybridization を行い、miR-194 が腸管上皮細胞特異的に発現していることを示している。以上の 2~4 節の結果から、in vitro、in vivo の 2 つの系で miR-194 が腸管上皮細胞特異的な発現を示すことを明らかにし、miR-194 が腸管上皮細胞の分化・成熟に関与する miRNA であることを示唆している。

5 節では、ヒトゲノム上に 2 ヶ所存在する miR-194 locus に焦点を当て、Caco-2 細胞分化誘導系において発現誘導を示す mature miR-194 の由来について検討を行い、Northern blotting と RT-PCR を用いた miR-194 locus の比較検討の結果から、miR-194-2 に注目した理由について述べている。

6 節では、RACE 法を用いて pri-miR-194-2 の 5'末端と 3'末端を同定し、その遺伝子構造を決定すると共に、miR-194-2 が intronic miRNA であることを明らかにしている。さらに、その exon 領域から ORF の探索を行い、pri-miR-194-2 はタンパクをコードしていない non-coding RNA である可能性を示唆している。

7 節では、転写開始点近傍領域の欠失変異体を用いて pri-miR-194-2 の転写制御領域を同

定し、その転写制御に腸管特異的遺伝子群を制御していることで知られる HNF-1 $\alpha$  が関与していることを luciferase reporter assay を用いて示している。さらに、内在性の HNF-1 $\alpha$  が pri-miR-194-2 転写制御領域に結合していることを ChIP assay を用いて明らかにした上で、HNF-1 $\alpha$  と miR-194 の発現の関連性について考察を加えている。

8 節では HNF-1 $\alpha$  とその family protein の協調的な miR-194-2 発現制御の可能性について検討を行い、HNF-4 がその候補となり得ることを示している。

9 節では miR-194 の標的遺伝子の予測と同定に関して研究を行っている。予測された 10 遺伝子に関して reporter assay による検討を行い、そのうちの 4 遺伝子が miR-194 の標的遺伝子となり得ることを明らかにしている。

4、5 章では本論分の総括と今後の展望について述べている。

以上、本論文は腸管上皮細胞分化によって高い発現誘導を示す microRNA の同定とその遺伝子構造の決定、ならびにその転写制御機構の解析を行った初めての報告であり、これらの成果は化学生命工学、特に腸管分化における microRNA の細胞生物学、分子生物学の進展に大きく貢献している。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。