

# 論文審査の結果の要旨

氏名 藤田修二

本論文は *miRNA* 遺伝子プロモータのコンピュータ予測の章と *miR-21* 遺伝子のフィードバック制御について述べられた章の2章立てで構成されており、各章はイントロダクション、材料と方法、結果、考察で構成されている。これらに先立ち、全体のイントロダクションも設けられており、*miRNA* 分子の構造的特徴や生合成、機能について現在の知見が説明され、その重要性については転写因子とのアナロジーによって概説されている。

*miRNA* のプロモータ予測の章において、まず *miRNA* プロモータ、遺伝子構造についての説明や配列情報解析に関する背景が「イントロダクション」で述べられている。「結果」では脊椎動物間での保存度に着目したコンピュータ解析法とその成果が解説され、最終的に予測された59のプロモータ (*miPPR*) に関して統計的解析や実験的解析による検証結果が述べられている。本研究では情報学的な解析に加え生化学的実験によっても予測が精査され実証されているため、他の研究者に有用たる情報を提供している点で評価される。59の *miPPR* はゲノム上の位置などの情報が一覧できる表として添付されている。

次章では、予測された *miPPR* の内の一つ *miR-21* 遺伝子に対するプロモータに関する詳細な解析が展開されている。「イントロダクション」において *miR-21* が多くの腫瘍にて発現が亢進していることから述べられ、*miR-21* 遺伝子自身の制御を解析することが重要な課題であると認識される。本文では *miR-21* の遺伝子構造を同定する詳細な生化学実験が述べられている。興味深いことに以前報告されていた遺伝子構造は誤りであることが明らかにされている。またこの *miR-21* 遺伝子は *TMEM49* 遺伝子と重複しているにも関わらず同定された独自のプロモータのみによって制御され、同時に *TMEM49* mRNA は *miR-21* のヘアピン領域に達すること無く polyA が付加されることが述べられている。*miRNA* には他の遺伝子のイントロン中に存在するものも多く、これらの発見は今後の *miRNA* 遺伝子の制御を考える上で非常に重要な知見である。次に同定したプロモータ中の保存された転写因子結合部位に着目することにより、がん遺伝子である AP-1 が *miR-21* を活性化することがプロモータ解析や DNA 結合

解析により明らかにされている。これは **miR-21** ががんで高い発現を示すことの原因となっていることを示唆するものであり、重要な発見である。本論文では、さらに **NFI** 結合部位がやはりこのプロモータ内でも保存されていることに着目している。これは転写因子 **NFI** ファミリーの一つである **NFIB** 自身が脊椎動物間で保存された転写因子であり、さらにその遺伝子 3'UTR 中に **miR-21** の結合部位が保存されているためであることが述べられている。プロモータ解析、DNA 結合解析により **NFIB** は **miR-21** のリプレッサーとして機能することが示され、一方で **miR-21** に対する阻害剤やレポーター解析により **NFIB** mRNA は **miR-21** の標的となりその翻訳が阻害されることが示されている。さらに **miR-21** の強制発現により内在性の **miR-21** の転写が活性化することから **miR-21** と **NFIB** との間でダブルネガティブフィードバックが形成されていることが明らかにされている。このフィードバック制御は **miR-21** の発現を安定化することが予想され、**miR-21** ががんなどで高い発現を示すことから重要な発見であると考えられる。最後に **HL-60** 細胞の **PMA** 刺激の経時変化サンプルにおいて **NFIB** が **miR-21** 依存的翻訳阻害と同時に **miR-21** 非依存的な転写抑制を受けることが示された。これから得たパラメータに基づくシミュレーションにより、このような転写と翻訳の二重の制御によって標的遺伝子の発現抑制時間が短縮されると示唆されることが述べられている。時間軸に着目することにより転写レベル（転写因子）と転写後レベル（**miRNA**）の多層制御によって標的遺伝子の刺激応答の短縮に効果があることを示唆したことは **miRNA** の機能を明らかにする上で意義深いものである。

最後に全体の結論と今後の展望の章において、マイクロアレイ等の解析を通して時間軸に着目した **miRNA** の制御系を明らかにする予定であることが述べられている。

なお、本論文における **miRNA** のプロモータ予測の章は伊庭英夫との共同研究であり、**miR-21** のフィードバック制御の章は伊庭英夫、伊藤太二、水谷壮利、箕口滋、山道信毅、櫻井浩平との共同研究であるが、全ての実験及びコンピュータ解析が論文提出者によって遂行されており、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。