

審査結果の要旨

氏名 菅生 厚太郎

本研究は、RNAi を応用した新しい順遺伝学的アプローチの確立を目的とした。そのため、以前に報告した RNAi ライブラリー構築技術 EPRIL (enzymatic production of RNAi library) 法の改良を行い、改良された EPRIL 法で構築した細胞由来の RNAi ライブラリーを用いた選択実験により、下記の結果を得ている。

1. 従来の EPRIL 法の各ステップを見直し、効率の良い酵素反応系とともに、回収率の高いビオチン-ストレプトアビジンビーズシステムを用いた精製方法を導入した。その結果、従来法で必要とされた中間産物の増幅なしに大規模な RNAi ライブラリーを構築する方法—改良型 EPRIL 法が確立した。
2. 改良型 EPRIL 法を用いて細胞の mRNA より合成した cDNA 混合物を原料に RNAi ライブラリーを構築した。その結果、数 100 万オーダーの独立したクローンを含む大規模な RNAi ライブラリーが構築された。
3. ライブラリーを構成するクローンの配列を解析した結果、構築された RNAi ライブラリーは、様々な遺伝子を標的とする shRNA コンストラクトから構成されていることが明らかとなった。
4. 2と3の結果より、改良型 EPRIL 法によって構築された細胞由来の RNAi ライブラリーは、細胞で発現している遺伝子を網羅するのに十分な複雑性を有していると示唆された。
5. GFP を構成的に発現している細胞の cDNA 混合物より構築した RNAi ライブラリーを、GFP の発現を指標として選択した。その結果、GFP の発現を強く抑制する shRNA コンストラクトが単離された。また、単離された shRNA コンストラクトは GFP の mRNA に相同な配列を有していることが確認された。
6. IL-3 依存性マウス前駆 B 細胞株 (FL5.12 細胞) の cDNA 混合物より構築した RNAi

ライブラリーを、IL-3の欠乏によって誘導されるアポトーシスの抑制を指標として選択した。その結果、アポトーシス抑制効果を有する shRNA コンストラクトが単離された。また、単離された shRNA コンストラクトには、アポトーシスへの関与が報告されている遺伝子と配列が一致するものが含まれていた。

7. ヒト T 細胞株 (Jurkat T 細胞) の cDNA 混合物より構築した RNAi ライブラリーを、ストア作動性カルシウム流入機構の抑制を指標として選択した。その結果、ストア作動性カルシウム流入機構を強く抑制する shRNA コンストラクトが単離された。また、単離された shRNA コンストラクトの配列から、STIM1 がこの機構を担う遺伝子として同定された。

8. 5、6、7の結果から、細胞由来の RNAi ライブラリーを特定の細胞機能を指標として選択することによって、その細胞機能に変化を与える shRNA コンストラクトを RNAi ライブラリーの中から単離することが可能であることが明らかとなった。また、単離された shRNA コンストラクトの配列より、その細胞機能に関わる遺伝子を同定することが可能であることが示された。

以上、本論文では、RNAi を用いた新しい順遺伝学的アプローチが示された。このアプローチでは、事前情報やアドホックな仮説に依存せずとも機能遺伝子の探索が可能となり、ゲノム情報と細胞機能を結ぶ架け橋として重要なブレイクスルーをもたらすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。