

審査の結果の要旨

氏名 櫻井 浩平

本研究は、がん等の疾患において発現異常を示すことが知られているmiR-199aに着目した。研究室で開発したmicroRNAのプロモーター予測アルゴリズムによって*miR-199a-2*遺伝子の上流にプロモーター領域(miPPR199a-2)を予測したため、*miR-199a-2*遺伝子の発現分子機構を明らかにすることを目指した。また、miR-199aの発現ベクターおよび抑制ベクターを構築し、miR-199a-5pとmiR-199a-3pの新規標的遺伝子の同定を試みた。そして、miR-199aが形成する遺伝子制御ネットワークをがん細胞株および組織切片を用いて解析し、miR-199aの発現異常の原因の一端を明らかにすることを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 内在性のmiR-199aの発現量が高いSW13(vim-)細胞においてmiPPR199a-2内に2つの転写開始点を同定した。また、miPPR199a-2にある3つのEgr1結合予測配列のうち、最も下流にある配列にEgr1が動員され、*miR-199a-2*の転写を正に制御することが示された。
2. miR-199a-5pとmiR-199a-3pの両成熟microRNAを効率よく発現させることができるmiR-199a発現ベクターを構築した。また研究室で開発したTuD (Tough decoy) RNA発現ベクターを利用し、miR-199a-5pあるいはmiR-199a-3pを特異的に阻害することに成功した。
3. *miR-199a*遺伝子から生成されるmiR-199a-5pと-3pがともに、クロマチン構造変換因子SWI/SNF複合体の触媒サブユニットの1つである*Brm*を標的とする可能性が示唆された。

miR-199a-5pと-3pは*Brm* mRNAの3' UTR内のそれぞれ異なる部位に結合し、*Brm*の翻訳後抑制に関与すると考えられる。

4. 複数種のがん細胞株において*Brm*と*Egr1*の発現が逆相関することを見出し、*Brm*が*Egr1*を負に制御するという作業仮説を立て解析したところ、*Brm*が*Egr1*遺伝子のプロモーター上に動員され、*Egr1* mRNAの転写を負に制御することが示唆された。
5. 食道扁平上皮の組織切片を用いて発現解析を行ったところ、がん浸潤部においてmiR-199a-5p, -3p, *Egr1*の発現は低下し、*Brm*の発現が上昇していることから、細胞株で認められた発現様式が食道扁平上皮がんにおいても認められた。

以上、本論文は*miR-199a-2*遺伝子の発現が転写因子*Egr1*によって正に制御されること、またmiR-199a-5pと-3pは*Brm* mRNAを標的とすることを示した。さらに*Brm*は*Egr1* mRNAの転写を負に制御することから、miR-199a、*Egr1*、*Brm*がfeedback loopを形成することを明らかにした。このfeedback loopは、miR-199a、*Egr1*、*Brm*の3因子のみで形成されるものではなく、他の複数の因子が関与することが示唆されるが、miR-199aが発現異常を示す原因の一つであると考えられ、microRNAが形成する遺伝子制御ネットワークの解明に重要な貢献をなし、学位の授与に値するものと考えられる。