

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 後藤 理

本論文は、新しい遺伝子発現分析法である GEP-DEAN 法とその有効性を報告した論文である。GEP-DEAN は Gene Expression Profiling by DCN-Encoding-based ANalysis の略である。論文全体は、Introduction、Materials and methods、Results、Discussion の 4 つの章、及び Conclusion と Appendix から構成されている。

第 1 章の Introduction では、本論文の研究の背景と目的が述べられている。遺伝子発現分析は、生命科学、医科学において重要な分析の一つである。遺伝子の機能解析、遺伝子ネットワークの構造と機能の同定、病気の機序の解明や診断など、基礎研究から病気の診断などの応用まで、生命医科学において様々な利用されている。とくに、DNA マイクロアレイを用いた分析法は、多数の遺伝子を同時に分析できる並列性の高さで利用のし易さから、ゲノムスケールの大規模分析から候補遺伝子の詳細な分析まで、幅広い利用が行われている。現在、このマイクロアレイを用いた遺伝子発現分析で課題となっているのが、データの標準化である。これは、米国の MAQC プロジェクトにより明確に示された課題である。マイクロアレイによる分析で測定できるのは、遺伝子の発現量の相対的変動量である。したがって、共通のレファレンス、応答性が規格化されたマイクロアレイを用いた分析によりデータを標準化しないと、相互に結果を比較して解析を進めることができない。そのため、共通レファレンスとして使用する RNA サンプルを提供するためのコンソーシアムなども設立されている。しかし、長年に渡って安定に共通レファレンス RNA を供給し続けることや、すべての研究対象に対してそれらを供給することは容易ではない。また、転写産物の濃度に依存する遺伝子ネットワークの動態に関する研究や遺伝子間の発現変動量の大小関係をもとにした機能解析などは、相対的変動量しか測定できない分析ではそもそも不可能である。論文提出者は、現在のマイクロアレイによる遺伝子発現分析法が抱える深刻なデータ標準化の問題を解決することを目的として、本論文の研究を行った。

第 2 章の Materials and methods では、GEP-DEAN 法のプロトコルの詳細、及び GEP-DEAN 法の有効性を調べるために行った実験で使用した試料と方法の詳細について述べられている。実験に使用した多数の DNA の配列は Appendix にまとめられている。

第 3 章の Results では、最初に GEP-DEAN 法の概要について述べられている。マイクロアレイによる遺伝子発現分析法が抱えるデータ標準化の問題を解決す

るために、論文提出者はマイクロアレイを用いて遺伝子発現の絶対量が測定できる分析法を新たに開発した。GEP-DEAN 法と名付けられたその分析法は、遺伝子発現による転写産物から逆転写によりつくられた多種類の cDNA の量をマイクロアレイにより同時に定量することができる。サンプル中の cDNA の量はまず対応する DCN (DNA-Coded Number) 配列をもつ DNA の量にライゲーション反応により変換 (エンコード) される。その後、共通のプライマー対で、多数の遺伝子の DCN 配列がまとめて PCR 増幅される。デコード反応により、分別、Cy5 ラベルされた後、分析対象の遺伝子群の種類に依らない共通のプローブをもつマイクロアレイにより検出・定量される。DCN 配列は、正規直交配列と呼ばれる人工的な配列を連結してつくられた、一種の数字を表現する配列である。多数の DCN 配列をもつ DNA の混合物が共通のプライマー対で一様に増幅できることが確認されている。GEP-DEAN 法では、さらに、濃度既知の合成オリゴ DNA を同様にエンコード、増幅してからデコード反応により分別、Cy3 ラベルした後、サンプルのデコード産物とマイクロアレイで競合ハイブリさせて Cy5 と Cy3 の蛍光強度比を測定する。その比の値からサンプルに含まれる DNA の絶対量を決定する。

論文提出者は、GEP-DEAN 法でサンプルに含まれる多種類の DNA が同時に定量できることを、濃度既知の約 300 種類の 30 塩基長の合成 DNA の混合物からなるサンプルの定量を行うことで確かめた。その結果、1 amol 以上の量であれば、マイクロアレイのスキヤナーの Cy5 と Cy3 のチャンネルの感度を補正することで、Cy5/Cy3 比から直接、サンプルに含まれる DNA の量が決定できることが示された。また、それより少量の場合は、濃度既知の合成 DNA を内部標準としてサンプル中に加えることにより、18 zmol の感度で定量が可能であることが示された。

また、論文提出者は、極微量の DNA を定量する標準的な方法である定量的 PCR (qPCR) 法と GEP-DEAN 法の比較を行った。合成された 99 塩基長の DNA を多数含むサンプルを用いた実験により、GEP-DEAN 法の方が qPCR よりも定量が正確であること、GEP-DEAN 法は qPCR 法と違って多数の DNA を同時に定量できるので、サンプルの無駄が少なく、分析も短時間でできることを示した。

さらに、論文提出者は、マウスの肝細胞から抽出したトータル RNA のサンプルを用いて、約 900 種類の遺伝子の cDNA の絶対量を 100 個の共通プローブをもつマイクロアレイを用いて、18 zmol の感度と 7 時間の分析時間で決定できることを示した。

遺伝子発現の絶対量が測定できると、共通のレファレンス RNA や応答性が規格化されたマイクロアレイを用いた分析結果でなくとも、相互に比較を行って、有意に発現量の変動した遺伝子を同定することが可能になる。論文提出者は、アミノアセトフェノン (APAP) を投与したマウスの肝細胞から抽出したトータル RNA を用いて GEP-DEAN 法による遺伝子発現分析を行い、このことを示した。

第 4 章の Discussion では、第 3 章で示された結果の重要な点がまとめられた後、MLPA 法、DASL 法、PLPs 法など、GEP-DEAN 法と同様にライゲーション反応

と PCR 増幅を利用する遺伝子発現分析法との比較、遺伝子発現の絶対量が測定できる qPCR 法や次世代シーケンシング法に基づく RNA-seq 法との比較を行っている。その結果、数十から数百の候補遺伝子について、様々な条件での遺伝子発現を正確に分析したいという用途には、GEP-DEAN 法が最も適していると結論している。

以上のように、論文提出者は、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の絶対量が測定できる分析法を世界ではじめて開発することにより、世界中で使用されているマイクロアレイを用いた遺伝子発現分析法が抱えるデータ標準化の問題を根本的に解決することに成功した。この成果は、世界中で得られた遺伝子発現データを相互に比較して解析することを可能にするだけでなく、遺伝子間の発現変動量の比較による遺伝子機能の解析や病気の正確な診断を可能にするものである。また、絶対量の測定が可能な GEP-DEAN 法は、細胞内における転写産物の濃度が直接関係してくる遺伝子ネットワークの動態など、定量性が要求される研究において、非常に有効な分析法になるといえる。

なお、本論文の研究は村上康文、陶山明との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析法の開発と有効性を確認する実験、及び考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、ゲノム科学、生物物理学の分野において博士（学術）の学位を授与できると認める。