

論文審査の結果の要旨

氏名 奥田 哲夫

本研究では、次世代シーケンス技術を応用して、小胞体ストレス応答性 mRNA の網羅的解析を行った。小胞体ストレスとは、真核細胞において、グルコース飢餓、環境ストレスへの曝露や遺伝子変異の存在により小胞体内に折りたたみ構造の異常なタンパク質が蓄積されることを指す。細胞内では小胞体ストレスに対する生体防御機構として IRE1 α -XBP1 経路と PERK-eIF 2 α 経路が存在する。最近、IRE1 α -XBP1 経路の不活性化後も PERK-eIF 2 α 経路が恒常的に活性化していることが、小胞体ストレス下の細胞運命の決定と関係していることが報告された。そこで我々は、IRE1 α -XBP1 経路の活性状況下と不活性状況下それぞれにおいて、タンパク質に翻訳されて機能していると考えられる、ポリソーム形成 mRNA の網羅的発現解析を行うことで、細胞運命の決定に関与する遺伝子を同定する計画を立てた。その方法としてマイクロアレイではなく、次世代シーケンサー solexa を用いた。ヒト大腸腺癌由来の細胞株 HT29 を、小胞体ストレス誘発剤として作用する Tunicamycin (Tm) で処理し、IRE1 α -XBP1 経路の活性化および不活性化の条件をそれぞれ 4 時間および 16 時間と決定した。各時点で HT29 の細胞質およびポリソーム画分より mRNA を抽出後、ライブラリーを作成し、Solexa でシーケンスした。Solexa により 1 レーンあたり約 500 万タグが読まれた。

次に 18,001 種類のタンパク質コード遺伝子に注目し、Refseq (タンパク質コード遺伝子の代表 mRNA/cDNA 配列) を用いた発現プロファイルを実行した。この結果、1 細胞あたり 1 コピー以上 mRNA が存在する遺伝子は 6966 種類、mRNA の総コピー数は約 10 万コピーであった。我々は Solexa 解析の出力が正当なものであるのかを評価するために発現の上昇した 71 遺伝子 (既知の小胞体ストレス応答性遺伝子を含む) について定量的リアルタイム PCR を実行した。Solexa の結果とリアルタイム PCR の結果との相関は $R=0.7$ で、完ぺきな相関とは言えなかったが、将来的な解析対象を選ぶことは可能と判断した。この 71 遺伝子の中から、低コピー数の遺伝子も含め、新たな小胞体ストレス応答性遺伝子の候補が 22 遺伝子同定された。今回、全 RNA シーケンスを応用することによって、マイクロアレイを用いた研究によって報告されてこなかった新規候補遺伝子の同定に成功した。これは、電子的なハイブリダイゼーションから獲得した高分解能により、低コピー数の遺伝子変化の検出が可能となったことが寄与している。

なお、本論文は、若栗浩幸・鈴木穰・菅野純夫との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験及び解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。

以上 1070 字