

審査の結果の要旨

太向 勇

本研究は RNAi スクリーンによる網羅的な遺伝子の探索において不十分な遺伝子のノックダウンによる偽陰性を減らすため、技術開発を行ったものである。高機能な RNAi ライブラリーを構築し得る技術である HT-EPRIL 法の開発に成功し、下記の結果を得ている。

1. 一つの遺伝子に対して数百種類の shRNA コンストラクトを作製する技術である EPRIL 法をハイスループット化した HT-EPRIL 法を開発した。HT-EPRIL 法で作製した数百種類の shRNA コンストラクトの混合物を細胞に導入し、定量的 RT-PCR や免疫染色により発現量を定量した結果、標的遺伝子の発現量の顕著な減少が確認され、HT-EPRIL 法で作製した shRNA コンストラクトの混合物が高いノックダウン効果を有していることが示された。
2. HT-EPRIL 法によって 2,273 遺伝子の RNAi ライブラリーを構築し、ストア作動性カルシウム流入 (SOCE) に関連する遺伝子の RNAi スクリーンを行い、44 遺伝子を候補として同定した。候補の中にはこれまでに SOCE への関与が知られていなかった遺伝子である PHB2 が含まれており、HT-EPRIL 法により構築した RNAi ライブラリーを用いた RNAi スクリーンによって細胞機能に関連する未知の遺伝子が同定できることを示した。
3. SOCE 関連候補遺伝子の中の一つである PHB2 をノックダウンした細胞で小胞体内のカルシウム量と、SOCE 活性及び、ミトコンドリアのカルシウム取り込み能をカルシウムイメージングにより定量したところ、いずれも有意に低下したことから、PHB2 がカルシウムシグナルに重要な役割を果たしていると考えられた。

以上、本研究は高機能な RNAi ライブラリー構築技術である HT-EPRIL 法を開発し、この技術を用いた RNAi ライブラリーの応用可能性を示した。

本研究により開発された HT-EPRIL 法はこれまで網羅的 RNAi スクリーンにおいて問題であった偽陰性を減らすことのできる有用な技術であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。