

学 位 論 文 要 旨

氏 名

峰野 純一

題 目

遺伝子構造および遺伝子機能の解析技術の開発とマウス胎児の発生・分化に関する転写物のハイスループット解析
(Development of the technologies for structural and functional analysis of gene, and high-throughput analysis of the transcripts relating to development and differentiation of Mouse embryo)

生命工学・分子生物学はこの約 15 年間で、ラージスケールの遺伝子構造解析から体系的な遺伝子機能解析、さらに近年の non-coding RNA 解析へと変遷し、統合されてきた。それに呼応して蛍光 non-RI システムをベースとした解析技術は目覚ましい進歩を遂げた。個々の現象だけではなく、細胞全体での生命現象を捕らえるためには、これら解析技術を素早く取り込み、解析手法を開発し、多くの遺伝子情報を取得する事は非常に重要である。本論分では、この大きな流れの中で現れてきた解析技術の開発・手法の開発及び、これら技術を用いた遺伝子発現解析、特に発生・分化に関連する転写物（遺伝子と non-coding RNA）の解析に関する成果を述べる。

遺伝子構造解析では、まず日本で始まった大腸菌ゲノムプロジェクトにて、当時登場した蛍光 DNA シーケンサーを用いて遺伝子配列解析を行い、その中で araD 遺伝子を決定し、構造比較を行った。次にゲノムプロジェクトの促進のために、新規蛍光プライマーの開発と蛍光イメージアナライザーの実用化に関する研究を行った。新規蛍光プライマーの開発では、dye-primer 方式の蛍光シーケンサーに有用な蛍光プライマーを開発し、蛍光イメージアナライザーの実用化では、アガロース電気泳動にて高感度に解析を行い、ゲノム解析に必須のマッピング技術に有用である事を見出し、さらにはシーケンスラダーによる長塩基解析方法を見出した。

遺伝子機能解析では、まず遺伝子機能解析の重要技術である DNA チップにおいて、DNA チップの作製方法に関する検討とスポットティング型 DNA チップの感度の同定を行い、5pg まで有意差データを取得できる DNA チップを開発した。DNA チップで多種類のサンプルを効率的に解析するための検討を行い、マウス各種臓器における発現解析にて各種臓器特異的発現遺伝子を同定した。また、Ki-ras 変異の解析を行い、スポットティング型オリゴ DNA チップで変異解析が可能である事を見出した。次に、DNA チップよりも網羅性に優れた DNA マイクロビーズによる遺伝子発現解析技術を用いて、ヒト脳組織間の遺伝子発現解析やヒト間葉系幹細胞分化時の発現解析を行い、さらに DNA マイクロビーズ技術と DNA チップ技術を統合して、ヒト脳の発生における発現解析を行い、発生・分化に関与すると予測される、機能未知を含む種々の遺伝子を同定した。さらに DNA マイクロビーズ技術を発展させ、マウス胎児の発生段階における non-coding small RNA (micro RNA) の網羅的解析を行い、195 種類の新規 micro RNA を発見し、発生段階での特異的 micro RNA 候補を同定した。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Junichi Mineno

題 目

Development of the technologies for structural and functional analysis of gene, and high-throughput analysis of the transcripts relating to development and differentiation of Mouse embryo
(遺伝子構造および遺伝子機能の解析技術の開発とマウス胎児の発生・分化に関する転写物のハイスループット解析)

In these 15 years, biotechnology and molecular biology have been changing such as gene structural analysis to gene functional analysis to recent non-coding RNAs analysis, and now they are integrated. Along with this change, analysis technology based on fluorescence non-RI system has been making striking progress. To get whole biological process in organisms, not only each biological event, it is very important to take a new technology, develop analysis method and obtain many genes' information. This dissertation describes about the development of these methods and analysis of the transcripts (genes and non-coding RNAs), especially relating to development and differentiation by using these technologies.

Regarding the gene structural analysis, the E. coli genome project started in Japan and we determined the DNA sequence of araD gene of E. coli by using the fluorescent DNA sequencer newly commercialized at that time and compared the structure. Next, we conducted the study about development of new fluorescent primer and practical applications of laser-excited fluorescent image analyzer to speed up the genome project. We identified the best primer for dye-primer sequencing method, showed high sensitive agarose gel electrophoresis useful for mapping method which was essential for genome analysis and showed long sequence by sequencing ladder.

Regarding the gene functional analysis, DNA chip is an important technology, we examined the DNA Chip making method and identified the sensitivity, and finally, we developed DNA Chip having the sensitivity of 5 pg with significance. And we examined the effective way for taking the multiple samples, took the data of several mouse tissues, and got the tissues specific genes. Furthermore, we analyzed Ki-ras mutant, and we showed we could do the mutation analysis by spotted oligo-DNA Chip. Next, we analyzed the differential expression among the human brain tissues, and gene expression at the differentiation of human mesenchymal stem cells by using DNA micro-beads technology which was more comprehensive analysis technology than DNA Chip. And by integration of the DNA micro-beads technology into DNA Chip technology, we analyzed the expression at the several stages in development of human brain and then we identified the several genes (including function unknown genes) which were predicted the development and differentiation related genes. Furthermore, we improved the DNA micro-beads technology and comprehensively analyzed the expression of non-coding small RNAs (microRNAs) existing in several stages of mouse embryos development, and then we found 195 kind of new microRNAs and they were predicted specific microRNAs in the special development stage.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	峰 野 純 一
審査委員	主査 鹿児島 大学 客員教授 加 藤 郁 之 進
	副査 鹿児島 大学 客員教授 浅 田 起 代 蔵
	副査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 宮崎 大学 教授 水 光 正 仁
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
審査協力者	
題 目	<p>遺伝子構造および遺伝子機能の解析技術の開発とマウス胎児の発生・分化に関する転写物のハイスループット解析</p> <p>Development of the technologies for structural and functional analysis of gene, and high-throughput analysis of the transcripts relating to development and differentiation of mouse embryo</p>
<p>遺伝子構造及び機能解析に欠かせない蛍光物質の開発と応用は、近年DNAチップやsiRNAの解析などにも用いられたことにより、さらに進んでいる。本研究は遺伝子構造と機能解析に蛍光物質を用いた高感度検出システムの開発と実用化、それを応用したDNAチップや遺伝子の発現をハイスループットの的に解析できる新しい手法の開発、さらにこれらの技術を駆使して発生・分化に関わる遺伝子の低分子転写物（マイクロRNA：miRNA）のハイスループット解析により新規のmiRNAを同定し、貴重なmiRNAのデータベースの構築に寄与した。</p> <p>本研究で得られた結果の骨子は以下のとおりである。</p> <p>分子生物学での遺伝子構造、機能および発現などの解析にはラジオアイソトープ（RI）が使われてきたが、安全性や利便性の面から非RIの開発が求められていた。本研究ではまず、蛍光を用いたDNAシーケンサーで配列決定を行い、さらに蛍光DNAシーケンサーによるラージスケール解析を可能にするため感度の高い新規の蛍光プライマーを開発した。その結果、蛍光で600ベースを解読できるようになった。蛍光を使って迅速にスキャニングできる蛍光イメージアナライザー（FMBIOシステム）の実用化に着手し、DNAシーケンスだけでなく、アガロー</p>	

スゲル電気泳動によるDNAの定量やサザンブロッティングが高い感度で行えるようになり、有効であることが示された。

次に蛍光によって遺伝子が定量的に解析できることから、モルホリン緩衝液および炭酸緩衝液にcDNAを溶解させてアミノ基をコートしたスライドガラスに固定することにより質の高い高感度DNAチップを作製することに成功し、細胞で発現しているほぼすべてのRNAの解析が可能となった。これをもとにマウスのDNAチップで組織特異的遺伝子の解析を行い、いくつかの組織別遺伝子発現マップを作成した。SBH (Sequencing By Hybridization) によるオリゴDNAのDNAチップではヒトのc-Ki-ras 61 遺伝子の1塩基変異型を検出し、本方法がSNP (Single Nucleotide Polymorphism) においてハイスループットの解析に適用できることを示した。

転写物 (mRNA) をハイスループットの解析するため、DNA マイクロビーズを用いたMegaclone、Megasort および MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) の実用化を目指した。Megasort 解析では発生過程でヒトの脳に差次的に変化する遺伝子 146 種類を同定し、これらの遺伝子が脳の各部位で発現している頻度を明らかにした。また、MPSS 解析においてヒト間葉系幹細胞を使って脂肪細胞への分化における遺伝子発現の変化を調べ、98 種類の発生特異的遺伝子および 20 種類の分化特異的遺伝子の変動を見出した。この結果はリアルタイムPCRの結果とも一致しており、本方法が網羅的遺伝子発現の解析に適していることを証明した。

近年、注目されている miRNA の発現をハイスループットの解析するため、マウス胎仔を使って miRNA の同定を行った。これにはDNAマイクロビーズライブラリーを作製して MPSS を行い、それによって 390 種類の miRNA を同定した。そのうち 195 種類は既知の miRNA であったが、残りの 195 種類は新規の miRNA であった。そのうちのいくつかは発生ステージで特異的に発現していた。また、種々の miRNA がポリシストロニックなクラスターを形成していることを明らかにした。

以上のように、本論文でまとめた研究は遺伝子の構造と機能解析技術に大きく貢献し、多くの研究者がこれらの技術を使って新しい結果を生み出し、分子生物学の発展に寄与した。この研究によりデータベースに登録されたデータは、今後の発現ネットワークの解析に世界中で利用されていくものと思われ、ライフサイエンスの領域にも大きく貢献するものである。したがって、博士の学位論文として十分な価値を持つと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏名	峰野純一
審査委員	主査 鹿児島大学 客員教授 加藤郁之進
	副査 鹿児島大学 客員教授 浅田起代蔵
	副査 鹿児島大学 教授 杉元康志
	副査 宮崎大学 教授 水光正仁
	副査 佐賀大学 教授 渡邊啓一
審査協力者	
実施年月日	平成18年12月27日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）	
<div style="text-align: right;"> <input type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答 </div> <p>主査および副査は、平成18年12月27日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>また、筆記により、外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者と同等以上の学力および識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を持つものと判定した。</p>	

学位申請者
氏 名

峰 野 純 一

[質問1] miRNAがポリシストロニックに転写された長い転写物からmiRNAの部分を選択的に切り出す機構はわかっているのか？

[回答1] miRNAのプロセッシングには、Drosha、Exportin、Dicer、Argonote、RISCと種々の酵素が関与することが報告されている。単一の機構のみでプロセスされるのであれば、一つの転写産物から同じようなmiRNAの発現プロファイルになると考えられるが、今回示したデータのように種々のプロファイルになっているので、別の機構、例えば各酵素のサブタイプがもっと存在する可能性やmiRNAが自分を制御する酵素自体を抑制する機構が考えられる。

[質問2] miRNAは安定性や細胞内でのターンオーバーに関しては確認されているか？

[回答2] 1本鎖のRNAは不安定と言われている。miRNAのデータは無いが、siRNAの有効期間でその安定性を考察すると、1週間で効果は消える。

[質問3] miRNAのターゲットであるmRNAと、miRNAの発現の相関はパラレルか、またmiRNAによる発現抑制作用はどのような機構で起こるのか？

[回答3] miRNAによる抑制機構には2種類あり、mRNAと配列が完全マッチしてmRNAを切断するケースと数塩基のミスマッチにて3' UTRに結合してタンパク翻訳抑制するケースがある。切断するケースはmiRNAの発現とターゲットのmRNAの発現はパラレルであるというDNAチップを用いた報告があるが、ミスマッチの場合はmRNA発現レベルとの相関性は見られない。

[質問4] miRNAにmutationが起こり、翻訳抑制効率が悪くなり疾病と関係する可能性はあるのか？

[回答4] そのような報告はこれまでされてないが、本研究ではゲノム配列に完全一致したもののみを解析対象としたが、対象外の取得配列の中にゲノムとの1塩基ミスマッチのものもあり、それらを解析すれば何か言えるかもしれない。

[質問5] AffymetrixのDNA ChipとDNA Micro-beadsの利点と欠点は何か？

[回答5] DNA Micro-beadsは一つのサンプルを深く解析することができるが、多サンプルを解析するのはやや困難である。DNA Chipは昨今価格も下がり、多サンプルの解析が可能になった。ただしDNA Chipは解析できる遺伝子がDNA Chip上に固定化されているものに限定される。かたやDNA Micro-beadsは解析する遺伝子に限定はなく、新規遺伝子や、発現量の低い遺伝子も解析できる。この両手法の欠点を補うためにFunctional DNA Chipを考えた。DNA Micro-beadsを用いて得られた、Functionで選択した遺伝子群のDNA Chipを作製することにより、効率よく多

サンプルの解析が可能となった。

[質問6] DNA Micro-beads技術において世界初の技術改良点は何か？

[回答6] DNA Micro-beadsは文献を読んだだけではできない複雑な技術であり、多くの改良を行っている。まず、従来のMegacclone技術では蛍光標識による各反応ステップの確認とセルソーターでの大量のビーズ処理を行う必要があり、かなりの日数と労力を要したが、ビオチンと蛍光を組み合わせたラベリング条件を検討し、各反応ステップの確認及びcell sorterを使用しないビーズの簡便な処理方法を確立した。従来のMegasort技術では、プローブ作製用にcDNAライブラリーを別途作製してPCRによる蛍光標識を行っており、プローブのpopulationに偏りが懸念された。そこでmRNAを直接in vitro transcription法により蛍光標識を行う方法を開発し、偏りの少ないプローブを作製することが可能となった。これらは技術的な改良であるが、技術的な改良以外に世界初であるのは、DNA Micro-beads とDNA chipを組み合わせた解析方法を行ったことである。

[質問7] 蛍光物質は従来のものを使用しているのか？

[回答7] 蛍光物質自身の開発は行ってなく、Cy3, Cy5, FAM, PEを使用している。

[質問8] DNA Chipでは発現差2倍以下の遺伝子の変動は隠れてしまうが、DNA Micro-beadsの感度はどうか、転写因子の解析などはできるのか？

[回答8] DNA Chipは蛍光強度という固まりでとらえるが、DNA Micro-beadsは数の情報なので統計処理することができ、P値を計算してCriteriaを引くことで2倍以下でも有意さを示す事が可能である。

[質問9] miRNAは2本鎖がmRNAに結合するのか？

[回答9] miRNAは1本鎖になってmRNAに結合する。

[質問10] miRNAはintergenicに多く存在するが、どのようなRNA部分がmiRNAになる宿命なのか？

[回答10] 今回の発現クラスター解析データからは、intergenicやintronicなどとの相関は見られなかった為、そのような解析は不可能であった。

[質問11] クラスターとなるmiRNAの発現レベルが異なるpre体をreal time PCRでチェックしているが、pre体の発現変動をDNA Micro-beads で網羅的に確認する事はできるか？

[回答11] pre体のサイズである60~80baseの長さの部分を取ってライブラリーを作製することで、データ解析スキームは検討しなければならないが、可能と考える。ただし、pre体がすぐにmature体にプロセスされるのであれば困難であると思われる。

[質問12] 新規miRNAのターゲットmRNAを網羅的に解析することはできるのか？

[回答12] ターゲットを網羅的に検索する手法や装置はまだ世の中に存在せず、次に開発すべき技術と考えている。細胞内にmiRNAを導入して、mRNAの発現レベルをDNA Chipにて解析した報告があるが、個々のmiRNAで行っており網羅的ではなく、またmiRNAによる抑制かmiRNAを導入した刺激による発現変動かわからない。今後網羅的なターゲット解析技術の開発はぜひ行ってみたい。

[質問13] マウスE10.5で新規miRNAが多いが、E10.5の発生レベルの特徴は？

[回答13] E10.5は神経・視神経に関連した発生段階で、神経管が閉じ、レンズの原基ができる段階である。発生に不必要なタンパク発現がmiRNAにより抑えられている、または、その逆かもしれない。

[質問14] 質問6の答えに関して、技術改良点以外にも、MPSS技術の特徴をいち早く理解してmiRNAの網羅的解析を行った事が新しい事ではないのか？

[回答14] 植物のmiRNAをMPSSで解析した論文が先に出た。本研究データは既に出ていたが、こちらのほうが早くpublishされたので、公式には新しいとは言えない。

[質問15] 次はどのように研究を発展していこうと考えているのか？

[回答15] 蛍光を用いたハイスループットなターゲット解析システムの開発を行っていく予定である。

[質問16] MPSSはすばらしい技術であるが、コスト削減をする必要がある。どのような方法が考えられるか？

[回答16] ビーズを用いる事で手間とコストがかかるので、担体を変えればコスト削減の可能性はある。

[質問17] サンプルの調製を行う操作中に分解されたゴミと本物を見分ける方法はあるのか？

[回答17] RNAは分解されやすく、すい臓のRNAなどは分取後すぐに分解される。分解されてゴミとなったRNAを見分ける方法はなく、従来から行われている迅速・慎重な方法で取り扱うしかない。