

論文内容の要旨

申請者氏名 重岡稔章

遺伝子トラップは、選択マーカー遺伝子を含む DNA 断片をゲノムに挿入させることにより、ランダムに遺伝子を破壊する手法である。これまでに遺伝子トラップとして実用化されている手法のほとんどがプロモータートラップと呼ばれる原理に基づいており、ES 細胞中で発現されていない組織特異的遺伝子をこの手法で破壊することは困難であった。一方、プロモータートラップとは異なり、標的細胞における転写活性の有無に関らず遺伝子をトラップする手法として polyA トラップ法が開発されている。

申請者は、polyA トラップによる大規模な変異体作製を試み、実際に複数の系統の変異体を用いてノックアウトマウスの作製に成功しているが、その過程において、polyA トラップ法には、ベクター DNA の遺伝子内挿入部位が最も 3' 側のイントロンに偏るという致命的な弱点が存在し、遺伝子機能の完全な破壊を困難にしていることに気づいた。この polyA トラップ法の欠点は、申請者により nonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれる現象に起因することが明らかにされた。NMD は、突然変異に由来する未成熟な停止コドンを持つ mRNA を選択的に分解する重要な過程であり、mRNA の品質管理機構として全真核細胞に保存されている。申請者は、ポリ A トラップの欠点を克服する手法を開発する過程において、PTC の下流に internal ribosome entry site (IRES) を挿入することにより NMD が回避されるという現象を見出した。この原理に基づく新しいトラップベクターを構築し、遺伝子トラップを行ったところ、ポリ A トラップで見られた遺伝子内挿入部位の偏りが消失し、多くの変異体において、遺伝子機能が完全に破壊されたアレルが形成されていることが明らかになった。この新しい遺伝子トラップ法の創出により、標的細胞における転写活性の有無に関らず、ベクターの挿入部位に関する「偏り」が皆無の状態、遺伝子を破壊することが初めて可能となった。

また、申請者は IRES による NMD の抑制機構に注目し、FACS による蛍光解析を応用して NMD を高感度で検出する実験系を確立することにより、そのメカニズムの解明を試みた。その結果、IRES からの翻訳およびリボソームの移動を阻害しても NMD に対する抑制効果が失われないことが示され、さらに IRES のかわりに RNA 上で強固な二次構造をとる人工的な配列を PTC の下流に挿入した場合においても、NMD が抑制されることを明らかにした。これらの結果から、NMD の抑制は、IRES からの翻訳に依存しておらず、IRES が mRNA 上で形成する複雑な二次構造に依存している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 重岡稔章

ポスト・ゲノムシーケンス時代の国際的な共同研究計画として、2004年に「The Knockout Mouse Project」が発表され、マウスES細胞中の全遺伝子を今後5年以内に破壊するべく、世界中の研究者に協力が呼びかけられた。この計画では、ノックアウトマウスを迅速かつ効率的に作製するために、網羅的な変異体作製技術である「遺伝子トラップ」の手法を用いて、マウスゲノムのできるだけ多くの遺伝子を破壊することが提唱されている。遺伝子トラップ法は、選択マーカー遺伝子を含むDNA断片をゲノムに挿入させることによりランダムに遺伝子を破壊する変異体作製の手法であるが、従来の遺伝子トラップ法には、標的細胞(ES細胞)で発現の無い/弱い遺伝子を破壊することができないという大きな欠点が存在するため、これらの遺伝子は遺伝子ターゲティングにより個別に破壊されなければならないと考えられていた。この個別な遺伝子破壊の過程が「The Knockout Mouse Project」の律速段階になると懸念されており、標的細胞での発現の有無に関わらずランダムに遺伝子を破壊することができる新しい遺伝子トラップの開発が望まれていた。

申請者は、mRNAの品質管理機構である nonsense-mediated mRNA decay (NMD) に注目することにより、従来の手法が持つ欠点を克服した新しい遺伝子トラップシステム「Unbiased Poly A Trap (UPATrap)」の構築に成功した。この新手法により、標的細胞における転写活性の有無に関らず、ランダムかつ確実に遺伝子を破壊することが初めて可能となり、「The Knockout Mouse Project」の遂行にとり大きな障害となっているステップを乗り越えるのに役立つと考えられる。実際にカナダの国家プロジェクトの一環として、マウスES細胞を用いた大規模な遺伝子トラップを推進しているグループであるCMHDは、今後このUPATrap法を採用することを表明している。また、申請者はIRESによるNMDの抑制機構に注目し、研究を行う過程で、**premature termination codon (PTC)** とエクソン・ジャンクション間に存在するRNA上の二次構造によりNMDが抑制されるという新しい現象を見出した。PTCの識別機構に関しては未解明の部分が多く、本研究で明らかにされた現象は、複雑なNMD経路の分子基盤を解明する上で重要な意味を持つと考えられる。

以上のように本論文は、NMDの分子機構を解明する上で重要な知見を提供しつつ、従来の手法が持つ欠点を克服した極めて有用な遺伝子トラップ法を提案しており、学術上、応用上貢献するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。