

論文の内容の要旨

申請者氏名 Edy Meiyanto

最近、組織あるいは細胞レベルで発現する遺伝子を網羅的に解析する方法として、マクロアレイあるいはマイクロアレイ (DNA チップ) が急速な普及をとげている。本研究では、まず、cDNA あるいは cRNA プローブを用いる従来の DNA チップ解析法に替わる新しい標識法を開発するとともに、次に、その方法を応用して、破骨細胞分化過程、特に、細胞増殖から分化にコミットする時期に発現が制御されている細胞周期関連遺伝子を探索し、それらの遺伝子の挙動を mRNA ならびに蛋白質レベルで解析した。

マクロ／マイクロアレイを用いた遺伝子解析法は、多量の遺伝子情報を比較的簡便に得られる技術として急速な展開を見せている。その技法では、解析しようとする細胞から調製した RNA を基にして蛍光色素で標識した cDNA あるいは cRNA を作成し、それをアレイ上の標的 DNA 分子と結合させることにより、発現している遺伝子を特定する操作が行われている。その方法では、解析しようとする試料毎にプローブを調製しなければならない、またプローブ作成時の逆転写反応においては鋳型 RNA の長さおよび高次構造による影響から各 mRNA 間で得られるシグナルの強さが異なり、従って各遺伝子の発現レベルを定量することが困難である、などの問題が生じている。本研究では、真核細胞の mRNA の 3'-末端にみられる poly(A)配列に着目し、その部分に結合する蛍光色素標識の poly(dU)を作成、利用する方法を開発した。この方法では、上に述べた問題点が解決され、発現レベルを反映した検出が可能であることを確認した。

次に、この方法を破骨細胞 *in vitro* 分化誘導系に応用して、細胞が増殖から分化に向かう初期過程に注目して、細胞周期関連遺伝子の発現プロファイルを行うとともに、蛋白質レベルでの解析をおこなった。その結果、分化誘導因子 ODF 刺激により、G1/S 移行因子 Rb の不活性化が引き起こされ、S 期への進行が抑制されること、しかし一定時間後、特定の Cdk、サイクリン分子の発現上昇、Rb の活性化、さらにそれらに伴って S 期への移行が誘導されること、またこの S 期進行を止めると分化が見られないこと、などを見出した。以上のことより、ODF による多面的な細胞周期制御の実体とその結果として生じる S 期進行抑制が明らかとなり、細胞が増殖から分化へと誘導される初期過程を分子レベルで理解する手がかりが得られた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Edy Meiyanto

多細胞系においては、個々の細胞は正しい時期に正しい方法で成長、増殖、分化あるいは生存を選択しなければならない。そしてこれらの挙動の原因あるいは結果として特定の遺伝子群の発現を伴っている。従って、それらの遺伝子群の同定／解析を行うことは、個々の細胞の挙動については個体レベルでの理解に必須である。申請者は、まず、DNA チップ解析法において従来の cDNA あるいは cRNA プローブに替わる新しい標識法を開発するとともに、次に、その方法を応用して、破骨細胞分化過程、特に、細胞増殖から分化にコミットする時期の細胞周期進行の様相とそれに伴って発現が制御されている細胞周期関連遺伝子を探査し、それらの挙動を mRNA／蛋白質レベルで解析した。

現在用いられているマクロあるいはマイクロアレイを用いた遺伝子解析法では、解析しようとする試料毎にプローブを調製しなければならない、またプローブ作成時の逆転写反応においては鋳型 RNA の長さおよび高次構造による影響から各 mRNA 間で得られるシグナルの強さが異なり、従って各遺伝子の発現レベルを定量することが困難である、などの問題が生じている。そこで申請者は、真核細胞の mRNA の 3'-末端にみられる poly(A)配列に着目し、その部分に結合する蛍光色素標識の poly(dU)を作成、利用する方法を開発した。この方法では、上に述べた問題点が改善され、発現レベルを反映した検出が可能であることを確認している。

次に、申請者は、この方法を破骨細胞 *in vitro* 分化誘導系に応用して、細胞が増殖から分化に向かう初期過程に注目して、細胞周期関連遺伝子の発現プロファイルを行うとともに、蛋白質レベルでの解析をおこなった。その結果、分化誘導因子 ODF 刺激により、G1/S 移行因子 Rb の不活性化が引き起こされ、S 期への進行が抑制されること、しかし一定時間後、特定の Cdk、サイクリン分子の発現上昇、Rb の活性化、さらにそれらに伴って S 期への移行が見られること、その移行が分化に必須であること、などを明らかにした。

以上のように、本論文は、アレイを用いた新しい標識法を開発するとともに、それを応用することにより細胞が増殖から分化へと誘導される初期過程を分子レベルで理解する手がかりを得たもので、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、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して認めた。