

論文審査の結果の要旨

氏名 榎原 雄太

本論文では、ヒト遺伝子のプロモーター配列が内在的にコードしている転写活性化能の解析を試みている。その基盤となる測定技術の確立、データ収集及びデータ解析の方法論について述べられている。

ヒトゲノム配列の解読以降も、遺伝子の転写制御機構の解明は依然として課題である。本論文ではその第一歩として、多段階に制御される転写の起点となる転写開始、その中でも最も基本的な因子となる一次元の DNA 配列であるプロモーター配列が内在的に有する転写活性化能に注目している。

論文の前半では、遺伝子のプロモーター領域の配列差が転写活性化能へ与える影響を解析するため、体系的なルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ系を構築している。構築した実験系にて、472 遺伝子のプロモーター領域について配列情報及び転写活性化能データを取得。配列の特徴と転写活性化能を解析している。対照として、251 種類のプロモーター領域以外の領域についても同様にデータを取得し、解析している。その結果、遺伝子のプロモーター領域の転写活性化能は、転写活性化能が高値となる P1 群 (87%) 及び低値となる P2 群 (13%) の二峰性の分布を示すことがわかった。また、既知のシスエレメントの存在割合など、P1 群と P2 群の間には配列上の相違点も存在することが示された。プロモーター領域以外の領域は、プロモーター領域とは配列上の特徴を大きく異ならせているが、その中にも十分な転写活性化能を有している配列が存在していることが明らかとなった。

これらの結果から数百の規模でのプロモーター配列と転写活性化能の相関データを取得、解析することが可能となった。しかし、より詳細にプロモーター配列を調べるためには、プロモーター配列内の 1 塩基レベルの配列差が転写活性化能へ与える影響を解析することが課題と考えられた。その手段として、塩基レベルでの塩基置換や欠損を入れた変異プロモーター配列を網羅的に作成し、その配列情報と転写活性化能データを解析することが考えられた。しかし、従来の変異プロモーター配列の取得、配列決定と転写活性化能の測定方法ではスループットに課題があり、より効率的な実験手法の確立が必要であった。

そこで後半では、プロモーター配列の 1 塩基レベルの配列差が転写活性化能に与える影響を解析するために、**Error Prone PCR** を用いた多様な変異プロモーター配列の取得、次世代シーケンス技術を駆使した効率的な配列決定及び転写活性化能測定の実験系を構築している。塩基置換が転写活性化能へ与える影響は、目的変数に転写活性化能、説明変数に変異情報とした、重回帰モデルの偏回帰係数として推定。転写活性化能へ影響を

与える塩基の特徴を解析可能とした。実験系の構築、データ取得及び解析には、8 遺伝子のプロモーター領域を供している。

構築された実験系では、1 度の実験で約 2 万の変異プロモーターの配列情報及び転写活性化能データが取得可能であった。得られた変異情報は、プロモーター配列中の 99%の塩基で 10 以上蓄積され、プロモーター領域全体で塩基置換が転写活性化能へ与える影響を推定可能であった。プロモーター配列の 1 塩基レベルの配列差が転写活性化能へ与える影響を解析するために、十分なデータを蓄積可能な実験系が構築できたと考えられる。得られた各塩基への変異パターン及び転写活性化能は、独立した実験間で再現性が示された。得られた転写活性化能データは、従来のルシフェラーゼアッセイ系の結果とも高い相関 ($r=0.816$) を示した。推定された配列置換が転写活性化能へ与える影響は、点変異クローンを用いた検証実験で確認された。以上のことから、構築された実験系及び解析手法が、プロモーター配列の 1 塩基レベルの配列差が転写活性化能へ与える影響を解析可能にするものと考えられる。

8 遺伝子のプロモーター領域の解析から、配列置換の影響が大きい塩基の特徴も示している。転写開始点近傍では、配列保存度が高く、変異が転写活性化能に負に寄与する塩基が、クラスターを形成していた。これは転写開始点近傍の転写因子結合配列を検出している可能性が考えられる。転写開始点上流 200bp 以遠では、周辺 5 塩基の GC 含量が高い塩基の配列置換が、転写活性化能へ正負の影響があると考えられた。1 塩基レベルの配列置換が転写活性化能へ与える影響を解析することで、新たなシスエレメントの生成を予測できる可能性も考えられた。

なお、本論文は、入江琢磨、劉瑩、門城拓、山下理宇、若栗浩幸、金井昭教、千葉丈、高木利久、水島・菅野純子、橋本真一、中井謙太、菅野純夫、鈴木穰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（科学）の学位を授与できると認める。

以上 1988 字