

氏名	拓 亚
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	工 学
学位授与番号	博甲第3152号
学位授与の日付	平成18年 3月24日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Development of novel cell surface marker DNA microarrays and characterization of cells and tissues (新規 DNA マイクロアレイの開発及び細胞表面マーカー探索への 応用)
論文審査委員	助教授 妹尾 昌治 教授 山田 秀徳 教授 穴戸 昌彦 教授 尾坂 明義

#### 学位論文内容の要旨

In order to screen cells or tissues by cell surface markers, I developed a series of DNA microarrays applicable for analyzing gene expression of cell surface protein on mouse, rat and human cells. Since these microarrays carried probes only for proteins localized on the cell surface, they were called cell surface marker DNA microarrays. Probes were designed to ensure the gene expression analysis is highly specific for cell surface protein. For transmembrane protein, the coding sequence of membrane-spanning portions was selected as the probe sequence. For GPI-anchored protein, the coding sequence of GPI-anchor attachment site was selected as the probe. These microarrays are prepared on DLC-coated slide glass, on which DNA can be bound covalently.

With the prototype of mouse cell surface DNA microarray, we performed gene expression profiling analysis on two mouse cell lines, i.e. BALB/c 3T3 and its SV40 virus-transformant. By comparing their expression pattern, CD62L and IL-6R $\alpha$  were picked up as the candidates of the significantly up-regulated genes in SV-T2 cells. I also analyzed gene expression profiles of five mouse neuroblastoma cell lines (i.e. NB2a, NB41A3, C1300N18, BC3H1, Neuro-2a) and normal mouse brain tissue. The data were clustered by spherical self-organizing map (sSOM) and six genes were picked up as the candidates of up-regulated genes in neuroblastoma cell lines. RT-qPCR, immunohistochemical analysis and biological function analysis supported the result of microarray analysis. These data highlight the potential of the DNA microarray as a novel platform for screening cell specific surface markers.

In conclusion, the high fidelity of these cell surface marker DNA microarrays was considered primarily due to two reasons. First, it is the successful design of the probes that can ensure the screening is highly specific for cell surface protein. Second, the usage of DLC-coating slide glass that covalently fixes DNA probes to give the high performance in microarray analyses. The cell surface marker DNA microarrays have a high potential to be widely applied in screening cell surface markers, which might serve as molecular targets for the diagnosis or treatment of diseases.

## 論文審査結果の要旨

細胞はその表面に特徴的な分子を持っていると考えられている。その特徴的な分子は多くの場合タンパク質や糖質で構成されているが、細胞外マトリックスを構成する糖質はその核となる部分にタンパク質を有する事を考慮すると一つの細胞の表面の性質は、膜表面上に存在するタンパク質をコードする遺伝子の発現状況を調べればその細胞の表面を特徴づける事が可能であると予想される。ゲノムプロジェクトが様々な生物について進められている今日ではそのような遺伝子は網羅的に解析され塩基配列がデータベース化されているので、タンパク質をコードする遺伝子配列の一部をプローブとして発現する遺伝子の網羅的スクリーニングを行う事が可能になっている。しかし、遺伝子自身はスプライシングの変化を起こすことが知られているので、遺伝子が発現している事だけを示しても一意的にそのタンパク質が細胞表面上に存在する事を示す事はできない。そこで、本論文ではタンパク質が細胞膜に結合している部分をコードする遺伝子の塩基配列をプローブとして遺伝子の発現パターンを解析するDNAマイクロアレイを設計している。ヒト、マウス、ラットの遺伝子を対象に合計約4,000遺伝子に対するプローブの設計を行って、これをダイヤモンド様カーボンにより表面処理されたスライドガラス基板に共有結合で固定化したものを作成している。これを用いてマウス正常繊維芽細胞とその細胞がウイルスにより癌化した細胞を対象に遺伝子の発現パターンを比較した結果、2種類の遺伝子が癌化した細胞で発現が上昇していた。この内の一つはIL-6受容体であったので、2つの細胞のIL-6に対する応答性を調べると、癌化後にのみ反応性が認められることが判明し、単純に遺伝子の発現が上昇しているだけではない事がわかった。この事により、マイクロアレイにより細胞表面の解析を行う事が有効である事が明らかにされた。さらに、5種の神経芽腫細胞の遺伝子発現を解析して、異なる細胞株でありながら酷似したパターンを示す事やこのパターンが正常脳とは異なることも明らかにした。本方法が、細胞表面のマーカーを解析する手法として今後有望であることを認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。