

氏名(本籍)	と まる やす ひろ 外 丸 靖 浩 (群 馬 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 3458 号		
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	<b>A Comprehensive search for HNF-3 <math>\alpha</math>-regulated genes in mouse hepatoma cells by 60K cDNA microarray and chromatin immunoprecipitation/PCR analysis</b> (マイクロアレイと染色体免疫沈降法を用いたマウスの肝細胞における HNF3 $\alpha$ の被制御遺伝子群の網羅的探索)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	榎 正 幸
副査	筑波大学助教授	医学博士	内 田 和 彦
副査	筑波大学講師	博士(医学)	島 野 仁
副査	筑波大学講師	博士(医学)	大根田 絹 子

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

遺伝子発現は、転写因子を中心とした遺伝子の階層的な制御により規定される。この遺伝子発現カスケードを解明することは、生体内現象を分子レベルで明らかにする上で重要である。近年マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析が盛んに行われ多くの成果を挙げているが、マイクロアレイ解析だけでは、分化や発生などの複雑な生体現象を制御している遺伝子発現カスケードの全容を明らかにすることは非常に難しい。そこで、本研究では、転写因子が直接作用する遺伝子群を網羅的に同定するシステムを構築することを目的とした。

### (対象と方法)

モデル系として肝分化や糖代謝など多くの生体現象に関わる転写因子 hepatocyte nuclear factor 3  $\alpha$  (HNF3  $\alpha$ ) とマウスの肝臓がん細胞株 Hepal-6 を用いた。まず HNF3  $\alpha$  の過剰発現により遺伝子の発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子群をマウス 60K cDNA マイクロアレイを用いてスクリーニングし、HNF3  $\alpha$  被制御遺伝子候補群とした。次に、HNF3  $\alpha$  が直接プロモーター領域に作用することで直接に遺伝子発現を制御する遺伝子群を同定するために、得られた HNF3  $\alpha$  被制御遺伝子候補群について、マウスゲノムデータベースから、遺伝子プロモーター領域の配列を抽出し、この領域に HNF3  $\alpha$  の認識コンセンサス配列 (TRTTTGTYWN) を含むものを選び出すことにより、HNF3  $\alpha$  直接被制御候補遺伝子群を決定した。更に、選び出した遺伝子群の一部を染色体免疫沈降法により解析し、HNF3  $\alpha$  被制御遺伝子を同定した。

### (結果)

HNF3  $\alpha$  を Hepal-6 に過剰発現させた後、24 時間後に既知の HNF3  $\alpha$  直接被制御遺伝子の発現量が上昇し始め、36 時間後、48 時間後にも安定して発現量が上昇していることをマイクロアレイ解析により明らかに

した。そこで、HNF3  $\alpha$  過剰発現から 36 時間後、48 時間後の両方で遺伝子の発現量が 2 倍以上に上昇した約 1500 遺伝子を選択し、HNF3  $\alpha$  被制御遺伝子候補群とした。次いで、それらの遺伝子をマウスゲノムデータベース上で検索し、約 800 遺伝子のプロモーター領域の配列を抽出することができた。さらに、これらの遺伝子のプロモーター内に HNF3  $\alpha$  の認識コンセンサス配列が有るかどうかを既存のプログラムを用いて検索した。その結果、約 300 遺伝子のプロモーター領域にコンセンサス配列が存在することが明らかになり、これらの遺伝子群を HNF3  $\alpha$  直接被制御候補遺伝子群とした。その中には、注釈がついているものが 135 遺伝子あり、それ以外は機能未知か有意な注釈がついていないクローンであった。さらに、135 遺伝子の中から、HNF3  $\alpha$  と機能的に関わりのある注釈をもつ 27 遺伝子（既知の HNF3  $\alpha$  直接被制御遺伝子 6 遺伝子を含む）を選び、染色体免疫沈降-比較 PCR 法を用いて細胞内での結合を認識した。その結果、26 遺伝子について Hepal-6 細胞内で HNF3  $\alpha$  とそれぞれのプロモーター領域が結合することを強く示唆する結果を得ることが出来た。

#### (考察)

これまで、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析が行われていたが、標的転写因子の被制御候補遺伝子群を網羅的に同定することは困難であった。本研究では、マイクロアレイ解析法、ゲノムシーケンス及び cDNA シーケンス情報解析、そして染色体免疫沈降-比較 PCR 法を組み合わせることにより、標的転写因子の直接被制御候補遺伝子群を同定する効率を飛躍的にあげることが出来た。この新しい転写調節因子標的遺伝子同定法をもちいて、幾つかの新規 HNF3  $\alpha$  標的遺伝子を見つけることができた。その中には、肝臓における脂質代謝経路において密接に関連した反応を触媒する酵素をコードする 3 遺伝子が含まれていた。また、肝や筋においてインスリンにより誘導されるグリコーゲンシンターゼとグリコーゲンホスホリラーゼの両方の遺伝子が HNF3  $\alpha$  により制御されていることも強く示唆された。さらに HNF3  $\alpha$ 、インターフェロン制御因子 -3, 7 の間に転写制御回路が存在することが推察された。以上の結果は、本研究で開発した遺伝子カスケード同定法が、遺伝子発現制御の骨組みを広範に解析するのに有用であることを強く示唆するものである。

#### (結論)

これまで、標的転写因子の直接被制御候補遺伝子群を網羅的に解析するシステムは、高等生物には無かった。それは遺伝子の数が多いことだけでなく、そのゲノム構造が複雑なことにも原因があった。しかし現在では、マウスのゲノムシーケンスと多くの cDNA シーケンス解読がほぼ完了したことにより、遺伝子のプロモーター領域の配列情報を網羅的に検索することが可能になった。また、マイクロアレイ解析法の確立により、網羅的な遺伝子発現解析を行うことが可能になった。本研究では、これらの情報と技術を融合させて、特定の転写因子が直接制御する遺伝子群を網羅的に同定するシステムを構築した。これにより、遺伝子発現カスケード解析システムの基盤を構築できたと考えられる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

マイクロアレイ解析法、ゲノムシーケンス情報解析、染色体免疫沈降-比較 PCR 法を組み合わせ、転写因子により制御される遺伝子群を網羅的に同定する方法を開発した意欲的研究である。HNF3  $\alpha$  の過剰発現により誘導される 26 遺伝子を同定し、実験系が計画通り働くことを明らかにしており、今後機能的なゲノム解析を行う上で重要な手段を提供したものとして高く評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。