

氏名(本籍)	もり た まり こ 森 田 眞理子 (岡山県)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 5961 号			
学位授与年月日	平成 24 年 1 月 31 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	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Combinatorial motif analysis of regulatory gene expression in <i>Mafb</i> deficient macrophages (<i>Mafb</i> 欠損マクロファージにおける遺伝子発現制御の組合せモチーフ解析法)			
主査	筑波大学教授	博士(医学)	土 屋 尚 之	
副査	筑波大学准教授	博士(保健学)	大 橋 順	
副査	筑波大学助教	博士(生命科学)	大 庭 良 介	
副査	筑波大学教授	博士(保健学)	市 川 政 雄	

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

転写因子 MafB は、マクロファージをはじめとする種々の細胞の分化や機能に重要な役割を有するが、その分子機構、特に単球・マクロファージ前駆細胞の分化におけるほかの転写因子との相互作用については、ほとんど解明されていない。

相互作用する可能性のある複数の転写因子を見出す上で、バイオインフォマティクスのアプローチにより、大量の DNA 配列から、有意に高頻度に共起し、直接的関係にある機能モチーフの組合せを発見することは、有用な情報を提供する。本研究において、著者は、バイオインフォマティクスの新規アプローチを用いて、MafB 認識配列と直接的に関係する制御モチーフを探索し、MafB と相互作用する転写因子の同定を試みた。

(対象と方法)

著者は、所属研究室の先行研究において作成された MafB 欠損マウスのマクロファージの mRNA 発現プロファイリングにより、発現レベルが低下した遺伝子群と発現レベルに変化がみられなかった遺伝子群を解析対象とした。Smith-Waterman-Gotoh アルゴリズムおよび PRRN アルゴリズムを用いて、両方の遺伝子群につき、ヒト、チンパンジー、ウシ、イヌ、ラット、マウスにおけるそれぞれのプロモータ領域のマルチプルアラインメントを行い、進化的に保存されている領域を取得した。次に、先行研究により明らかになっている MafB 結合配列群から MEME プログラムにより共通配列を抽出し、MafB モチーフとした。発現低下がみられた遺伝子群において、MAST プログラムにより MafB モチーフの検索を行い、MafB モチーフを複数の種に有する遺伝子群を、MafB 結合遺伝子セットとした。

次に、MEME を使い、MafB 結合遺伝子セットが有する、新規の MafB モチーフとそれ以外のモチーフを探索し、抽出されたモチーフから、TFSEARCH および TFBIND を用いて、既知の転写因子結合モチーフを検索した。検索されたモチーフのうち、MafB 欠損マウスにおいて発現低下が見られた遺伝子のプロモータ領域に過剰出現するモチーフを over-representation index (ORI) スコアを用いて計算し、候補機能的モチーフを選択した。これらのモチーフ間の相互作用を、対数線型グラフィカルモデル (LGM) を用いて解析した。

そして、得られたモチーフの組合せを有する遺伝子を選択し、発現の低下した遺伝子に共通する最適モチーフの組合せを発見した。

最後に著者は、最適モチーフの組合せを有する *C1qa* 遺伝子のプロモータ領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したプラスミドをマクロファージ細胞株である RAW264.7 に導入したりポーターアッセイを施行し、インフォマティクスにより得られたモデルの実験的検証を試みた。

(結果)

MafB 欠損マウスのマクロファージでは、野生型と比較し、mRNA レベルが 50% 以下に低下していた遺伝子が 51 個見出された。著者は、これに先行研究において発現低下が確認されていた 1 遺伝子を加えた 52 遺伝子から、上記のフィルタリングにより、18 遺伝子を MafB 結合遺伝子セットとして選択した。

これらの遺伝子から、計 74 モチーフが抽出されたが、著者は、これらのうち、ORI スコアの上位である 10 モチーフ ([GATA-1, MYOD], [MZF1], [Nkx-2.5], [AML-1a], [AP2/ZID], [AP2, AML-1a], [CdxA], [GATA-1], [AP4/AML], [GATA-2, AP2] モチーフ) を、候補機能的モチーフとして選択した。

著者は、次に、LGM を用いてこれら 10 モチーフを解析し、共起パターンを有するモチーフの 10 種の組合せを見出した。その中から、発現低下がみられた遺伝子群に共通した最適モチーフの組合せを発見した。なかでも GATA-1 モチーフは、MafB モチーフと強く共起し、これらの転写因子間の相互作用が示唆された。

最後に著者は、MafB モチーフと GATA-1 モチーフの両方を含む *C1qa* 遺伝子のプロモータ配列を用いたりポーターアッセイにより、このモデルの検証を試みた。MafB 単独の過剰発現により、プロモータ活性の上昇がみられ、GATA-1 単独の過剰発現では影響は認められなかったが、これらを同時導入すると、GATA-1 は用量依存的に MafB によるプロモータ活性の上昇を阻害することが確認された。

(考察)

本研究において著者は、SWG、LGM などの複数のバイオインフォマティクス解析法を用いて、進化的に保存されたモチーフの組合せを見出すことにより、MafB と GATA-1 の相互作用の可能性を見出し、実験的に検証した。著者は、本研究におけるように、バイオインフォマティクスと実験的研究を組み合わせることは、遺伝子制御上、機能的な意義を有する複数のモチーフの組合せを見出す上で、有力な手法であると考察している。

また、MafB と GATA-1 は、それぞれ、血球系細胞のマクロファージ系、赤血球系各系列への分化に重要な役割を有することがすでに確立していることから、本研究において示されたこれらの転写因子間の相互作用が、生体内における血球系細胞の分化のスイッチングに重要な役割を持つ可能性を考察している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ゲノム解析の進展により、大量の DNA 配列データが得られた現在、これらの配列データから、生物学的意義を有する情報をどのように効率的に取得するかはきわめて重要な問題である。なかでも、複数の転写因子間の相互作用の探索は、実験的手法のみでは困難を伴う。本研究において、著者は、マクロファージ分化において重要である転写因子 MafB と相互作用する転写因子を探索することを目的に、実験データを起点として、複数のバイオインフォマティクス解析法を組み合わせることにより、MafB モチーフと GATA-1 モチーフが強く共起することを見出した。著者はさらに、この知見をもとに、これらの転写因子が機能的に相互作用するとの仮説を提唱し、実験的手法により、その仮説を支持する知見を得た。

本研究の解析アプローチには著者の創意が認められる。また、本手法は、マクロファージ以外の系にも一般化しうる方法と考えられる。さらに、見出された結果である MafB と GATA-1 の相互作用は、マクロファージや赤血球系分化を考える上で、貴重な情報を提供する。以上の点から、本論文は、当該分野の発展に寄与

する内容を含み、博士学位論文にふさわしいと考えられる。

平成 23 年 11 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。