

【課程博士用】

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな) 氏 名	くぼ あつし 久保純
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目) カタユウレイボヤ初期胚における転写制御ネットワークに関する研究	
論 文 調 査 委 員	(主査) 佐藤ゆたか 准教授 曾田 貞滋 教授 沼田 英治 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士（理学）	氏名	久保 純
論文題目	カタユウレイボヤ初期胚における転写制御ネットワークに関する研究		
(論文内容の要旨) 胚発生をシステムとして理解するために、転写制御因子による遺伝子の発現制御を網羅的に解析し、遺伝子制御ネットワークとして統一的に理解しようとする試みが様々な動物で行われている。カタユウレイボヤでも、その胚発生における解析の容易さなどから、初期胚における遺伝子制御ネットワークが集中的に解析されている。本研究では遺伝子制御ネットワークのより詳細な構造を明らかにすることを目的として、転写制御因子の <i>in vivo</i> における結合プロファイルの網羅的な同定を行った。 クロマチン免疫沈降法をカタユウレイボヤ初期胚に適用し、中胚葉発生で重要な 11 個の転写制御因子の ChIP-on-chip プロファイルを決定した。このプロファイルでは既知の直接的制御関係を正しく同定できており、また結合モチーフの解析、GC 含量の比較、結合サイトの分布などの解析を通して、各転写制御因子の結合プロファイルの特徴を明らかにした。 このプロファイルによると、過去に同定されていた制御関係のうちの大部分が直接的な制御関係であることが明らかとなった。加えて、今回新たに転写制御因子とゲノム DNA との相互作用を数多く同定した。さらに解析を進めたところ、これらの相互作用のうちの少なくとも半分以上は標的遺伝子の発現において何らかの役割を持つと見積もられた。実際に、これまで知られていた調節領域とは質的に異なる新規調節領域を新たに同定することにも成功した。 本研究におけるプロファイルをもとに、中胚葉形成に関わる遺伝子制御ネットワークを明らかにした。一口に中胚葉といっても、脊索、筋肉、間充織とその組織ごとに遺伝子制御ネットワークの構造は異なっており、各組織に特徴的な遺伝子発現制御の仕組みが存在している。 今回得られた膨大な量の情報は発生生物学者のみならず、遺伝子調節領域の理解を目指す進化発生学者や数理生物学者にとっても有益な情報を提供するものである。			

(論文審査の結果の要旨)

カタユレイボヤ(*Ciona intestinalis*)は、脊椎動物の姉妹群である尾索類(被囊類)に属する動物である。カタユレイボヤは脊椎動物としての基本的体制をもっており、この体制をつくる発生プログラムは脊椎動物の誕生の時点で獲得されたものであると考えられる。しかしながら、脊椎動物の誕生の際に、どのようなゲノムの変化が具体的に起こってこのような体制が獲得されたのかは未解明である。発生プログラムは単純な遺伝子のカスケードとして存在するのではなく、調節遺伝子が複雑に結びついた遺伝子調節ネットワークとして存在するが、このネットワークを構成するノードである調節遺伝子のレパートリーはどの動物でも大きな違いはなく、進化上の発生プログラムの変化の多くはネットワークにおけるノード間の結合の変化、つまり、転写調節因子のゲノムへの結合の変化によってもたらされたと一般に考えられている。したがって、発生プログラムの理解には調節遺伝子相互の制御関係だけではなく、その関係が直接の転写調節因子の結合に由来するものかどうか、を知ることが必要となる。

申請者は、この問題に取り組むために、次の二点を考慮に入れて、実験系の構築から研究を始めた。一つ目は、転写調節因子のゲノムワイドな結合のプロファイルを知る必要があること、二つ目は、ネットワークの理解には多くの転写因子の解析が必要であるため、ハイスループットな解析を行う必要があることである。そのために申請者は、クロマチン免疫沈降法による実験を選択した。ハイスループット化を実現するため、申請者はタグをつけたタンパク質を利用した。つまり、申請者が立ち上げた実験系では、転写調節遺伝子のコード領域にインフレームでタグをコードする配列をつないだ融合遺伝子配列を準備し、さらにその融合遺伝子をその転写調節遺伝子自身のプロモーター・エンハンサー配列につなぎ、胚に導入する。導入された遺伝子は内在の遺伝子と同じ場所・同じ時間に発現し、内在の転写因子と同じゲノム領域に結合すると考えられる。次にタグに対する抗体でクロマチン免疫沈降・マイクロアレイ解析を行い、転写調節因子の結合プロファイルをゲノムワイドに同定する。クロマチン免疫沈降実験は通常、高品質の抗体を必要とするが、本方法では市販のひとつの抗体ですべての実験を行うことができるという利点があり、ハイスループット化が可能となった。一方で、本方法は外来遺伝子の導入による方法であり、その導入による人為的影響も考えられたが、申請者は実験結果を共同研究者の助けをかりながら情報学的に解析・検討し、実際に *in vivo* での結合を検出していることを様々な方法で慎重に確認している。

次に、この方法をホヤ初期胚で重要な機能を持つ 11 の転写調節因子に適用し、これまでに遺伝子ノックダウン等の方法によって決められていた暫定的な遺伝子調節ネットワークをシス調節領域のレベルで精密化することに成功した。動物胚発生の遺伝子調節ネットワークの研究はシス調節領域の解析まで行われていない場合が多く、また、シス調節領域の解析まで行われている研究でも、解析の行われている転写調節因子の種類が限定的であったり、その標的の探索がゲノムワイドではなく限定的である場合がほとんどである。申請者の明らかにしたホヤの遺伝子調節ネットワークの完成度は、網羅性という点で高いレベルにあり、ホヤの発生のグローバルな理解と脊椎動物の体制の起源の研究に大きな貢献を行った。

以上のように、新しい実験手法を粘り強く確立し、詳細な遺伝子調節ネットワークの姿を明らかにしたことは評価に値し、申請者の研究能力は本学の理学博士の基準を十分に満たすものと判断された。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 5 月 28 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、合格と認めた。