

## 【GNPとの関連・GNPへの貢献】

### a) 転写・制御の解明に関連する研究成果

横軸研究という立場上、単独で転写制御の機能解明に繋がる研究を遂行することは困難がある。しかしなら J. Mol. Biol. に掲載された論文はかずさ DNA 研究所単独で成された。この中で、SMARCA1 という分子が DNA-dependent ATPases としていくつかの遺伝子の転写レベルでの発現を正に制御していることを示した。また SMARCA1 は、少なくとも HCT116 という大腸癌細胞株においては TRIM28, MSH2 と複合体を形成して機能していることも示すことができた。以下に、SMARCA1 抗体で同定したゲノム上の結合配列の下流の遺伝子（遺伝子の機能ごとに分類し遺伝子シンボルで表示している）を示す。

| transcription | transport or signal | cell cycle or development | protein modification | metabolism  | immune          | unknown         |
|---------------|---------------------|---------------------------|----------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| ANKZF1        | ACTR1A              | ABHD2                     | PPM1B                | <b>AK2</b>  | <b>PSCD2</b>    | C19orf39        |
| <b>BCAS3</b>  | ENSA                | DNM2                      | GTPBP1               | BPGM        | USP5            | ANKHD1-EIF4EBP3 |
| <b>CENPA</b>  | G3BP1               | <b>EIF2AK3</b>            | <b>RPS11</b>         | <b>OPA3</b> | NLRP4           | C12orf60        |
| CNOT3         | <b>MF12</b>         | FLAD1                     | STT3A                |             | <b>KIR2DS4*</b> | EV15L           |
| <b>H2AFV</b>  | <b>OSBP</b>         | MAP3K11                   |                      |             |                 | FLJ13305        |
| <b>HBP1</b>   | RAB11B              | NUMB                      |                      |             |                 | KIAA1826        |
| HLTF          | RAB40C              |                           |                      |             |                 | LENG9           |
| HNRNPL        | STIP1               |                           |                      |             |                 | LOC90379        |
| JMJD2B        | GOLPH3L             |                           |                      |             |                 | LRRC48          |
| <b>KHSRP</b>  | EHP1                |                           |                      |             |                 | <b>NPAL3</b>    |
| MYST4         | <b>NUBP2</b>        |                           |                      |             |                 | PWWP2A          |
| <b>NFE2L1</b> | <b>DCTN4</b>        |                           |                      |             |                 | TBC1D10B        |
| NGDN          | STARD3NL            |                           |                      |             |                 | TNRC6B          |
| PRMT1         | <b>BRSK2*</b>       |                           |                      |             |                 | ZSWIM3          |
| RBM15         | DNAJB5              |                           |                      |             |                 | LOC653447       |
| RFX1          |                     |                           |                      |             |                 |                 |
| SP1           |                     |                           |                      |             |                 |                 |
| SP2           |                     |                           |                      |             |                 |                 |
| SUV420H2      |                     |                           |                      |             |                 |                 |
| <b>UBP1</b>   |                     |                           |                      |             |                 |                 |
| ZBTB20        |                     |                           |                      |             |                 |                 |
| ZNF687        |                     |                           |                      |             |                 |                 |

Myc target genes are in bolt.

p53 target genes are in gray box.

The asterisks denote the genes identified by the Human ENCODE01 Array.

### b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

#### 依頼抗体の作製・提供

- 1) 井上聡博士らによって、抗 FOXP1 抗体や抗 NCOR1 抗体、抗 NRIP1 抗体の特異性が確認され、現在大量サンプルの解析や ChIP on chip 解析が進行中である。
- 2) 眞貝洋一博士らによって、抗 ZNF644 抗体を用いて新規の蛋白質相互作用が確認された。
- 3) 福井 宣規博士らによって、抗 DOCK2 抗体の特異性が評価され、精製抗体をバルクで供給した。

## 【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

- 1) The GENSAT project (<http://www.gensat.org/index.html>)
- 2) The human protein atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)
- 3) The Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>)
- 4) miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)
- 5) The Mouse Genome Information (<http://www.informatics.jax.org/>)
- 6) Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)

### 【主な研究論文とその概要】

1. Okazaki N, Ikeda S, Ohara R, Shimada K, Yanagawa T, Nagase T, Ohara O, Koga H. The Novel Protein Complex with SMARCAD1/KIAA1122 Binds to the Vicinity of TSS. J Mol Biol. 2008 Jul 17. [Epub ahead of print]

SMARCAD1 は、そのコードする蛋白質の一次構造の類似性から、クロマチン再構成因子のコアーとなる DNA 依存性 ATPases と考えられていた。しかしながら、そのクロマチンに対する作用は全く明らかとなっていなかった。本論文では、作製した特異抗体を用いた免疫沈降によって、ゲノム上に結合配列を明らかにするとともに、蛋白質複合体の一部も明らかにした。

2. Tanaka Y, Zhang SJ, Terasaki H, Koga H, Endo S, Usui H, Washiyama K, Kumanishi T, Uematsu Y, Itakura T. Frequent and variable abnormalities in p14 tumor suppressor gene in glioma cell lines. Brain Tumor Pathol. 2008;25(1):9-17.

P14 と p16 癌抑制遺伝子は、同じ染色体上の遺伝子の exon の使い分けによって生じる、機能の異なる遺伝子である。本論文では、ヒト脳腫瘍から樹立した 10 種のグリオーマ細胞株における当該遺伝子の状態を詳細に解析し、これまで報告の極僅かな P14 遺伝子の異常を発見したことを報告している。

3. Nagase T, Yamakawa H, Tadokoro S, Nakajima D, Inoue S, Yamaguchi K, Itokawa Y, Kikuno RF, Koga H, Ohara O. Exploration of Human ORFeome: High-Throughput Preparation of ORF Clones and Efficient Characterization of Their Protein Products. DNA Res. 2008 Jun 30;15(3):137-49.

本論文では、高効率に cDNA の蛋白質コード領域のみを各種発現プラスミドに組み込む技術を開発し、それを用いて 1,929 遺伝子のハロタグ融合蛋白質を発現させたことを報告している。さらに、この融合蛋白質発現プラスミドを培養細胞に導入し、その細胞内局在を決定するに留まらず、転写活性の測定や蛋白質相互作用解析に用いることで、未だ機能の決定されていない分子に機能解明の糸口を提示した。

### 【特許出願数の実績】

本研究課題からの特許の出願は、現時点ではなし。

ゲノムネットワークプロジェクトの  
課題の報告

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      |                                                                                              |                                     |         |         |         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------|---------|---------|-----------|
| プログラム名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |      | (1) ゲノム機能情報の解析 (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) 次世代ゲノム解析技術の開発 (4) 個別生命機能の解析 (5) 動的ネットワーク解析技術開発 |                                     |         |         |         |           |
| 課題の分類                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |      | (1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) 公募課題                                                                   |                                     |         |         |         |           |
| 課題名<br>(和英併記)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |      | ヒトゲノムネットワーク情報システムの構築<br>(Establishment of Human Genome Network Information System)           |                                     |         |         |         |           |
| 代表研究者名<br>(所属機関・職名)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      | 五條堀 孝<br>(大学共同利用機関法人情報システム研究機構 国立遺伝学研究所・教授)                                                  |                                     |         |         |         |           |
| 年度別研究費<br>(千円)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |      | 16年度                                                                                         | 17年度                                | 18年度    | 19年度    | 20年度    | 合計        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      | 410,000                                                                                      | 440,800                             | 413,000 | 455,000 | 350,000 | 2,068,800 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      | 研究者名                                                                                         | 所属機関・部局・職                           |         |         |         | 専門分野      |
| 研究組織<br>図                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 代表機関 | ☆五條堀 孝                                                                                       | 大学共同利用機関法人情報システム研究機構<br>国立遺伝学研究所・教授 |         |         |         | 生命情報学     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 分担機関 | ☆宮尾 祐介                                                                                       | 東京大学 大学院情報理工学系研究科・助教                |         |         |         | 情報科学      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      | ☆郷 通子                                                                                        | 長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部・特別<br>客員教授       |         |         |         | 生命情報学     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      | ☆北野 宏明                                                                                       | システム・バイオロジー研究機構・会長                  |         |         |         | 情報科学      |
| 【研究目的】                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |      |                                                                                              |                                     |         |         |         |           |
| <p>共同研究環境としてのヒトゲノムネットワークプラットフォームを実現し、ヒト生体分子ネットワーク情報の収集、解析と利用者への公開を実施するため、パイプライン技法を中心とした、高速なデータの連携・解析・可視化手法の実現を目指し、基礎生物学から医・薬学等の応用分野に至るまで統合的な情報の提供を可能とするデータベースを構築・運用し、そのデータベースからの発見的情報利用技術の開発をすることを目的とする。このため、国立大学法人東京大学、長浜バイオ大学、特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構と共同で実施する。</p>                                                                                                                           |      |                                                                                              |                                     |         |         |         |           |
| 【課題の概要】                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |      |                                                                                              |                                     |         |         |         |           |
| <p>情報・システム研究機構国立遺伝学研究所を拠点として、ヒトゲノムネットワーク情報システムの構築を実施する。「ゲノム機能情報の解析」等の研究により得られたデータや既存のゲノム情報を蓄積し、それらを有機的に結合して「個別生命機能解析」の研究に提供可能な環境を構築する。「個別生命機能の解析」に従事する研究者と「ゲノム機能情報解析」を行う研究機関や研究者の間で情報をフィードバックすることにより、ダイナミックな情報の交流システムを実現する。本プロジェクトのみならず、我が国の生物科学研究の発展のための礎となるヒトを中心とした統合データベースの構築を行い、学术界、産業界に対し広く情報の提供を行う。</p> <p>研究開発事項としては、ゲノムネットワークパイプラインの開発、ゲノムネットワーク利用システムの研究、ゲノムネットワーク解析アルゴリズムの研究等を行う。</p> |      |                                                                                              |                                     |         |         |         |           |

## 【平成20年8月末までの研究成果】

以下の4つの柱に関して研究開発を進めてきた。

### ① ゲノムネットワークパイプラインの開発と運用

#### 1. ヒトゲノムプラットフォームの開発

タンパク質などの生体分子の相互作用に係る情報の大規模データを統合・データベース化するための高速システム「情報処理パイプライン」の運用を行うため、既存の生体分子間ネットワーク等に関する情報を標準化し、ゲノムネットワークプロジェクト参加機関において生成される様々な情報とともに、集約・公開するためのプロトコル等の開発を進めた。また、蓄積された情報を統合し、公開するためのゲノムネットワーク統合データベースを開発・構築した。

#### 2. プラットフォームの開発と公開登録

### ② ゲノムネットワーク利用システムの開発

情報処理パイプラインの生成するデータベースよりネットワーク情報を抽出・編集し、ゲノムネットワークプロジェクト内外に公開するためのゲノムネットワーク公開インターフェースの開発・公開を行った。また、本研究課題実施のために必要な技術等の開発も進めた。

### ③ ゲノムネットワークアルゴリズム等の研究

ゲノムネットワークプラットフォームに要求される要素技術を集中して研究を進めた。特に、ゲノムネットワークデータ検索アルゴリズムの研究、各種生体分子情報からのネットワーク情報の抽出アルゴリズムの研究とその表示に関する研究を行った。

### ④ プロジェクトの総合的推進

縦軸研究との連携を進めるために、利用システム講習会を開催し、利用手引書の作成と配布を行った。さらに、縦軸機関研究成果の取り込みを効率的に行うため、実施会議と協力して縦軸研究機関への聞き取り調査を行い、情報技術での縦軸サポートも進めた。

## 【GNPとの関連・GNPへの貢献】

### ① 転写・制御の解明に関連する研究成果

横軸研究機関である理化学研究所林崎先生から産出された CAGE データを中心に PPI, ChIP などを統合化し、プラットフォームを通じて、コンソーシアム公開版および一般公開版を作成し提供している。また、データ解析機能として、発現プロファイルの相関解析機能や PPI 経路探索機能の提供を行っている。

#### 1. ゲノムネットワークプラットフォーム利用システムの機能拡充

#### 2. プロジェクト独自情報の検索

TU (転写単位) の検索, siRNA の検索, Clone の検索に加えてかずさ DNA 研究所による抗体データベースとの連携を進め、コンソーシアムメンバーに公開した。また、成育センターの浅原グループのマウス遺伝子発現3次元データベース、慶応大学 IVV システムの詳細情報を、各機関との連携の元プラットフォームから利用可能にした。

### ② 縦軸研究 (又は横軸研究) への貢献に繋がる研究成果

横軸・縦軸の各研究機関からの研究成果に、公開されている既存関連データを統合しプラットフォーム (<http://genomenetwork.nig.ac.jp>) からコンソーシアムメンバー向け、一般向けの両方の形で公開した。公開に当たっては、ゲノムビューワー、PPI ビューワー、発現ビューワーを作成提供している。また、当該研究に関して活用した研究データ・リソースの提供を知財システムおよびプラットフォームを通して行っている。同時に、横軸と縦軸機関間のデータ共有と共同研究のサポートとして WEBDAV という方式を用いたデータ共有システムの構築と提供を行っている。また、以下のような独自アルゴリズムの開発と提供を進めた。

#### 1. CAGE マッピングアルゴリズムの研究・実装

#### 2. CAGE と H-Inv2.0 トランスクリプトームのマッピング

#### 3. PPI と発現プロファイルの解析アルゴリズム

#### 4. シスエレメント予測解析システムの開発

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

プロジェクト横軸・縦軸から産生された各種データ

【主な研究論文とその概要】

1. Genome Dyn. 2007;3:13-29.

Evolution of protein-protein interaction network.

Makino T, Gojobori T.

Protein-protein interactions (PPIs) are one of the most important components of biological networks. It is important to understand the evolutionary process of PPIs in order to elucidate how the evolution of biological networks has contributed to diversification of the existent organisms. We focused on the evolutionary rates of proteins involved with PPIs, because it had been shown that for a given protein-coding gene the number of its PPIs in a biological network was one of the important factors in determining the evolutionary rate of the gene. We studied the evolutionary rates of duplicated gene products that were involved with PPIs, reviewing the current situation of this subject. In addition, we focused on how the evolutionary rates of proteins were influenced by the characteristic features of PPIs. We, then, concluded that the evolutionary rates of the proteins in the PPI networks were strongly influenced by their PPI partners. Finally, we emphasized that evolutionary considerations of the PPI proteins were very important for understanding the building up of the current PPI networks.

2. Gene. 2007 Sep 1;399(1):1-10. Epub 2007 Apr 20.

Mapping of chimpanzee full-length cDNAs onto the human genome unveils large potential divergence of the transcriptome.

The genetic basis of the phenotypic difference between human and chimpanzee is one of the most actively pursued issues in current genomics. Although the genomic divergence between the two species has been described, the transcriptomic divergence has not been well documented. Thus, we newly sequenced and analyzed chimpanzee full-length cDNAs (FLcDNAs) representing 87 protein-coding genes. The number of nucleotide substitutions and sites of insertions/deletions (indels) was counted as a measure of sequence divergence between the chimpanzee FLcDNAs and the human genome onto which the FLcDNAs were mapped. Difference in transcription start/termination sites (TSSs/TTSs) and alternative splicing (AS) exons was also counted as a measure of structural divergence between the chimpanzee FLcDNAs and their orthologous human transcripts (NCBI RefSeq). As a result, we found that transposons (Alu) and repetitive segments caused large indels, which strikingly increased the average amount of sequence divergence up to more than 2% in the 3'-UTRs. Moreover, 20 out of the 87 transcripts contained more than 10% structural divergence in length. In particular, two-thirds of the structural divergence was found in the 3'-UTRs, and variable transcription start sites were conspicuous in the 5'-UTRs. As both transcriptional and translational efficiency were supposed to be related to 5'- and 3'-UTR sequences, these results lead to the idea that the difference in gene regulation can be a major cause of the difference in phenotype between human and chimpanzee.

3. Nucleic Acids Res. 2008 Feb;36(3):861-71. Epub 2007 Dec 17.

Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes.

Nakagawa S, Niimura Y, Gojobori T, Tanaka H, Miura K.

Understanding regulatory mechanisms of protein synthesis in eukaryotes is essential for the accurate annotation of genome sequences. Kozak reported that the nucleotide sequence GCCGCC(A/G)CCAUGG (AUG is the initiation codon) was frequently observed in vertebrate genes and that this 'consensus' sequence enhanced translation initiation. However, later studies using invertebrate, fungal and plant genes reported different 'consensus' sequences. In this study, we conducted extensive comparative analyses of nucleotide sequences around the initiation codon by using genomic data from 47 eukaryote species including initiation codon by using genomic data from 47 eukaryote species including animals, fungi, plants and protists. The analyses revealed that preferred nucleotide sequences are quite diverse among different species, but differences between patterns of nucleotide bias roughly reflect the evolutionary relationships of the species. We also found strong biases of A/G at position -3, A/C at position -2 and C at position +5 that were commonly observed in all species examined. Genes with higher expression levels showed stronger signals, suggesting that these nucleotides are responsible for the regulation of translation initiation. The diversity of preferred nucleotide sequences around the initiation codon might be explained by differences in relative contributions from two distinct patterns, GCCGCCAUG and AAAAAAUG, which implies the presence of multiple molecular mechanisms for controlling translation initiation.

4. BMC Genomics. 2008 Mar 1;9:112.

Two different classes of co-occurring motif pairs found by a novel visualization method in human promoter regions.

Murakami K, Imanishi T, Gojobori T, Nakai K.

It is essential in modern biology to understand how transcriptional regulatory regions are composed of cis-elements, yet we have limited knowledge of, for example, the combinational uses of these elements and their positional distribution. RESULTS: We predicted the positions of 228 known binding motifs for transcription factors in phylogenetically conserved regions within -2000 and +1000 bp of transcriptional start sites (TSSs) of human genes and visualized their correlated non-overlapping occurrences. In the 8,454 significantly correlated motif pairs, two major classes were observed: 248 pairs in Class 1 were mainly found around TSSs, whereas 4,020 Class 2 pairs appear at rather arbitrary distances from TSSs. These classes are distinct in a number of aspects. First, the positional distribution of the Class 1 constituent motifs shows a single peak near the TSSs, whereas Class 2 motifs show a relatively broad distribution. Second, genes that harbor the Class 1 pairs are more likely to be CpG-rich and to be expressed ubiquitously than those that harbor Class 2 pairs. Third, the 'hub' motifs, which are used in many different motif pairs, are different between the two classes. In addition, many of the transcription factors that correspond to the Class 2 hub motifs contain domains rich in specific amino acids; these domains may form disordered regions important for protein-protein interaction.

#### 【特許出願数の実績】

【発明の名称】 相同性検索システム、相同性検索装置および相同性検索方法

【発明者】 五條堀 孝, 池尾 一穂, 岡山 利次

【出願番号】 特願2007-052583; PCT/JP2008/053647

【特許出願日】 2007/03/02

ゲノムネットワークプロジェクトの  
課題の報告

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      |                                                                                                                                            |        |                                |      |              |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------|------|--------------|--------|
| プログラム名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      | (1) ゲノム機能情報の解析 (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) <span style="border: 1px solid black;">次世代ゲノム解析技術の開発</span> (4) 個別生命機能の解析 (5) 動的ネットワーク解析技術開発 |        |                                |      |              |        |
| 課題の分類                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |      | (1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) <span style="border: 1px solid black;">公募課題</span>                                                                   |        |                                |      |              |        |
| 課題名<br>(和英併記)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |      | メチル化ボディマップとタンパク質DNA相互作用情報の統合<br>Integration of Methylation Body Map and Protein-DNA Interaction Information                                |        |                                |      |              |        |
| 代表研究者名<br>(所属機関・職名)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |      | 伊藤 隆司<br>(国立大学法人東京大学・教授)                                                                                                                   |        |                                |      |              |        |
| 年度別研究費<br>(千円)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |      | 16年度                                                                                                                                       | 17年度   | 18年度                           | 19年度 | 20年度         | 合計     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      | 24,000                                                                                                                                     | 34,000 | 0                              | 0    | 0            | 58,000 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      | 研究者名                                                                                                                                       |        | 所属機関・部局・職                      |      | 専門分野         |        |
| 研究<br>組<br>織<br>図                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 代表機関 | ☆ 伊藤隆司                                                                                                                                     |        | 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授          |      | ゲノム科学        |        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      |                                                                                                                                            |        |                                |      |              |        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 分担機関 | ☆ 山田洋一                                                                                                                                     |        | 金沢大学・自然科学研究科・助教                |      | ゲノム科学        |        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      | ☆ 吉田美寸夫                                                                                                                                    |        | インテックシステム研究所・バイオ事業部・グループマネージャー |      | バイオインフォマティクス |        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      |                                                                                                                                            |        |                                |      |              |        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      |                                                                                                                                            |        |                                |      |              |        |
| ※ 研究者名欄は、適宜増減してください。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |      |                                                                                                                                            |        |                                |      |              |        |
| <b>【研究目的】</b><br>本事業では、ゲノムネットワークプロジェクトの「横軸研究」がもたらす標準的な蛋白質DNA相互作用ネットワーク情報を、個別的生命機能を対象とする「縦軸研究」へと効果的に移転するのに必要不可欠なエピジェネティック情報の系統的取得技術を開発・提供する。具体的には、「HM-PCRによるアレル別メチル化の網羅的解析法」と「メチル化依存的酵母1ハイブリッドシステム」の開発を推進する。                                                                                                                                                                                                                                                                  |      |                                                                                                                                            |        |                                |      |              |        |
| <b>【課題の概要】</b><br>1：メチル化依存的酵母1ハイブリッドシステムの開発研究<br>ライブラリ・スクリーニングが可能なメチル化依存的酵母1ハイブリッドシステムを構築して、新規メチル化DNA結合蛋白質の1ハイブリッド・スクリーニングを行う。<br><br>2：HM-PCRによるメチル化ボディマップ作成法の開発研究<br>HM-PCRの微量化を目的に、全ゲノム増幅との併用による使用DNA量の節減を検討する。また電気泳動チップの導入による高速化を図る。更に下記の統合解析支援システムを駆使して、転写因子遺伝子プロモータのHM-PCRアッセイ系を構築する。<br><br>3：メチル化ボディマップ統合解析支援システムの開発研究<br>i) HM-PCRプライマー設計機能、ii) HM-PCR最適反応条件判定機能、iii) 電気泳動多重化支援機能、iv) メチル化状態自動判定機能、v) メチル化ボディマップ表示機能、から構成されるHM-PCR法による網羅的なメチル化解析実験を支援する情報システムを構築する。 |      |                                                                                                                                            |        |                                |      |              |        |

**【課題終了時までの研究成果】**

**1：メチル化依存的酵母1ハイブリッドシステムの開発研究**

メチル化依存的酵母1ハイブリッドシステムによるライブラリ・スクリーニングを目的に、デュアルレポータ方式の第2世代システム、更にデュアルベイト方式の第3世代システムを開発した。これにより、メチル化非依存的DNA結合蛋白質のバックグラウンドを劇的に減少させることに成功した。更に接合を利用して、日立製作所ライブラリをスクリーニングできるシステムも構築した。その結果、新規のメチル化DNA結合蛋白質の同定にも成功し、本システムの有効性を実証することが出来た。

**2：HM-PCRによるメチル化ボディマップ作成法の開発研究**

大規模HM-PCR解析および希少サンプル解析の基盤として、制限酵素消化DNAを $\phi$ 29DNAポリメラーゼによって増幅する方法を確立し、2回増幅DNAでもメチル化パターン判定に影響がないことを確認した。これにより使用DNA量を原法の10,000分の1、つまり1解析あたりに2～3個細胞相当DNAにまで微量化することが可能になり、微量化を達成した。

**3：メチル化ボディマップ統合解析支援システムの開発研究**

HM-PCRによるメチル化ボディマップ作成の統合解析支援システムを構成する機能として、i) HM-PCRプライマー設計機能、ii) HM-PCR反応条件予測機能、iii) 多重化HM-PCR設計機能、iv) メチル化パターン自動判定機能、v) メチル化パターン表示機能を開発し、それらを実装したシステムを構築した。

上記の2と3を組み合わせ、理研開示の転写因子2,339遺伝子のプロモータのうち、1,668についてプライマーを合成し、1,418で増幅に成功した。末梢血細胞DNAの1回増幅産物を利用した多重化HM-PCR解析を進行し、955遺伝子についてメチル化パターンを決定した。

**【GNPとの関連・GNPへの貢献】**

**a) 転写・制御の解明に関連する研究成果**

新規メチル化DNA結合蛋白質の同定

**b) 縦軸研究（又は横軸研究）への貢献に繋がる研究成果**

理研開示のヒト転写因子プロモータに関するHM-PCRアッセイ系の確立

**【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】**

**1) 理研開示のヒト転写因子プロモータデータ**

**2) 日立製作所の2ハイブリッドライブラリ**

【主な研究論文とその概要】

Okamura, K., Yamada, Y., Sakaki, Y. & Ito T.: An evolutionary scenario for genomic imprinting of *Impact* lying between nonimprinted neighbors. *DNA Res.* 11, 381-390, 2004.

インプリント遺伝子Impactの周辺ゲノム領域のメチル化状態をHM-PCRで解析した。

Cheong, J., Yamada, Y., Yamashita, R., Irie, T., Kanai, A., Wakaguri, H., Nakai, K., Ito, T., Saito, I., Sugano, S. & Suzuki, Y.: Diverse DNA methylation status at alternative promoters of human genes in various normal tissues. *DNA Res.*, 13, 155-167, 2006.

ヒトオルタナティブプロモータの組織別のメチル化状態をHM-PCRで解析した。

Yamada, Y., Shirakawa, T., Taylor, T., Okamura, K., Soejima, H., Uchiyama, M., Iwasaka, T., Mukai, T., Muramoto, K., Sakaki, Y. & Ito, T.: A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 11q: comparison with chromosome 21q. *DNA Seq.*, 17, 300-306, 2006.

ヒト11番染色体長腕部のCpGアイランドに関して、HM-PCRによる網羅的アレル別メチル化解析を行い、先に解析した21番染色体長腕部の結果と比較検討した。

【特許出願数の実績】

なし

ゲノムネットワークプロジェクトの  
課題の報告

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      |                                                                                                                                            |        |                    |        |        |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------|--------|--------|--------|
| プログラム名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |      | (1) ゲノム機能情報の解析 (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) <span style="border: 1px solid black;">次世代ゲノム解析技術の開発</span> (4) 個別生命機能の解析 (5) 動的ネットワーク解析技術開発 |        |                    |        |        |        |
| 課題の分類                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      | (1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) <span style="border: 1px solid black;">公募課題</span>                                                                   |        |                    |        |        |        |
| 課 題 名<br>(和英併記)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      | 新技術を基盤とした革新的遺伝子解析システムの開発<br>(Development of Breakthrough Gene Analysis System based on a Newly Established Technology)                     |        |                    |        |        |        |
| 代表研究者名<br>(所属機関・職名)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |      | 関根 光雄<br>(国立大学法人東京工業大学・教授)                                                                                                                 |        |                    |        |        |        |
| 年度別研究費<br>(千円)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |      | 16年度                                                                                                                                       | 17年度   | 18年度               | 19年度   | 20年度   | 合 計    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      | 14,000                                                                                                                                     | 14,000 | 11,000             | 10,000 | 10,000 | 59,000 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      | 研究者名                                                                                                                                       |        | 所属機関・部局・職          |        |        | 専門分野   |
| 研究<br>組<br>織<br>図                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 代表機関 | ☆関根 光雄                                                                                                                                     |        | 東京工業大学・生命理工学研究科・教授 |        |        | 核酸有機化学 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      | 半田 宏                                                                                                                                       |        | 東京工業大学・生命理工学研究科・教授 |        |        | 分子生物学  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      | 岡田 典弘                                                                                                                                      |        | 東京工業大学・生命理工学研究科・教授 |        |        | 進化生化学  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 分担機関 | ☆ (代表研究者)                                                                                                                                  |        |                    |        |        |        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      | (分担研究者)                                                                                                                                    |        |                    |        |        |        |
| <p><b>【研究目的】</b></p> <p>本研究グループでは、新技術として塩基部無保護法や保護DNAプローブ法を活用して、精度の高い遺伝子検出法を開拓することが目的である。特に、天然塩基の塩基識別能を凌駕する“保護型”人工塩基を組込んだDNAプローブ分子の開発を行う。また、これまでのDNAチップの精度の悪さが、天然塩基の塩基識別能と塩基対形成能の低さにあるため、この問題を根本的に解決するために、より強力に塩基対形成できる人工塩基の開発とともに、検出プローブの骨格をDNAからより構造が固く標的遺伝子に対するハイブリダイゼーション能が強いRNAに変え、より短鎖なRNA検出プローブを用いてmRNAの発現解析に応用することを目指す。</p>                                                                                                                   |      |                                                                                                                                            |        |                    |        |        |        |
| <p><b>【課題の概要】</b></p> <p>塩基部無保護法でしか合成できなかった5'-末端に5'-ヨードチミジンを導入した短いDNAプローブをCPG上で合成したものを活用した感度の高い新しいSNP検出法を開発する。天然塩基よりも一段上の塩基識別能を向上させた人工塩基を分子設計し、オリゴデオキシヌクレオチドに組み込みその識別能と塩基対形成能をTm測定により調べる。さらに、人工塩基をCPGやガラスプレート上に結合させたDNAチップを構築し、その遺伝子検出能について調べる。一方、DNAからRNAに検出プローブの骨格を変えるために、2'-O-シアノエチル化されたRNA分子の合成を検討する。そのため、より効率のよいモノマー合成ユニットの合成法を開発する。最終的には、塩基識別能を向上させた人工塩基を組込んだRNAオリゴマーの基本的性質について詳細に検討する。この人工塩基を組込んだRNAオリゴマーをガラスプレート上に結合させ、実際に遺伝子解析システムを構築する。</p> |      |                                                                                                                                            |        |                    |        |        |        |

### 【平成20年8月末までの研究成果】

3'-末端にチオリン酸基を導入した蛍光標識した短鎖 DNA フラグメントと 5'-末端に 5'-ヨードチミジンを導入した短い DNA プローブを、CPG を用いたケミカルライゲーションを利用した新しい SNP 検出法を開発した。これは、標的遺伝子が結合したとき、はじめてケミカルライゲーションが起こることによって、CPG 上に標識された蛍光が残ることを利用した新しい検出法であり、SNP を連結部位の近傍に設定することによって、かなり正確に SNP を見分けることができる新技術である。また、塩基識別能力を向上させた人工塩基としては、まず、天然型のチミン塩基を 2-位のカルボニル基をチオカルバニル基に置換した 2-チオチミン塩基、アデニン塩基はその塩基の窒素原子の位置を移動し、アミノ基にアセチル基を導入した 2-N-アセチル-7-デアザ-8-アザアデニン塩基を創成した。さらに、シトシン塩基は 4-N-アセチルシトシン塩基、最後にグアニン塩基は 2-N-カルバモイルグアニン塩基に誘導した人工塩基が、それぞれ優れた性質を示すことを明らかにしてきた。これらの塩基を逐次 DNA プローブに導入した DNA プローブを構築して、その塩基識別能とハイブリダイゼーション能を評価し、実際に天然型よりも検出精度が向上することを明らかにした。さらに、実際にこの性能の高い保護 DNA プローブを使ってレトロトランスポゾン異常を示す HeLa-RC 細胞の遺伝子発現解析を行い、明らかに従来型の検出系を異なる結果を得た。

RNA を検出プローブとする RNA チップ開発のため、その基本技術となる 2'-O-シアノエチル化された RNA 分子の合成法を詳細に検討した結果、今までピリミジン系の合成モノマーユニットは多段階の工程を必要としたが、ウリジン合成ユニットでは、わずか4工程の合成反応で簡単に合成できることを見出した。また、シチジン合成ユニットは、ウリジン合成ユニットから直接2工程の合成反応によって合成できることを見出した。したがって、ピリミジン合成ユニットに関しては、共通の原料から合成できることから、RNA チップ開発について明るい展望が開けた。

### 【GNPとの関連・GNPへの貢献】

#### a) 転写・制御の解明に関連する研究成果

二色蛍光法を用いてHeRa-RC細胞とHeLa細胞の特定の遺伝子6個の発現量を比較した結果、その発現量に明らかな差異が見られ、従来法の解析データを再考すべき価値があることがわかった。

#### b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

この研究を通して、様々な研究グループと連携をもつ新たな研究もスタートすることができた。たとえば、短鎖miRNAの検出法の開発、SMAP法の改良研究などである。

### 【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

該当せず。

## 【主な研究論文とその概要】

1. K. Seio, T. Sasami, R. Tawarada, M. Sekine, Synthesis of 2'-O-methyl-RNAs incorporating a 3-deazaguanine, and UV melting and computational studies on its hybridization properties. **Nucleic Acids Res.**, 34, 4324-4334 (2006).

この論文は、天然型グアニン塩基の塩基識別能を向上させるため、2-アセチル-3-デアザグアニン塩基を設計し、実際にRNA中に導入し、その性能について調べた結果、天然型のグアニン塩基ではG-Aミスマッチ塩基形成してしまいが、この人工塩基に変えると、全くミスマッチ形成を防ぐことができることを見出した論文。

2. K. Seio, T. Sasami, A. Ohkubo, K. Ando, and M. Sekine, Highly Selective Recognition of Cytosine over Uracil and Adenine by a Guanine Analogue, 2'-N-Acetyl-3-deazaguanine, in 2'-O-Methyl-RNA/RNA and DNA Duplexes. **J. Am. Chem. Soc.** 129, 1026-1027 (2007).

この論文は、グアニン塩基のアミノ基に単純なカルバモイル基を導入するだけで、G-Uミスマッチ塩基対が形成しづらくなることを初めて明らかにしたことを見出した論文。

3. T. Sasami, Y. Odawara, A. Ohkubo, and M. Sekine, and K. Seio, Synthesis and hybridization properties of oligodeoxynucleotides incorporating 2'-N-carbamoylguanine derivatives as guanine analogs. **Tetrahedron Lett.**, 48, 5325-5329 (2007).

この論文は、2'-N-カルバモイルグアニン塩基が前後の塩基配列にいかんにかかわらず、一般的にシトシン塩基をチミン塩基より正確に塩基識別することができることを明らかにした論文。

4. H. Saneyoshi, I. Okamoto, Y. Masaki, A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, Facile Synthesis of 2'-O-Cyanoethyluridine by Use of Ring-Opening Reaction of 2,2'-Cyclonucleosides with Cyanoethyl Trimethylsilyl Ether in the Presence of BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O. **Tetrahedron Lett.**, 48, 8854-8857 (2007).

この論文はRNAチップの創成に必要な2'-O-シアノエチルRNA分子を合成するために、ウリジンとシチジンの3'-アミダイト合成ユニットを効率よく合成する新しい手法を開発したもので、これまで、多段階必要であった合成ルートを著しく改善したもので、ウリジン合成ユニットの場合、わずか4工程で合成できることを示した論文。この合成法の開発で、ピリミジン系の合成ユニットに関しては、初めて2'-O-シアノエチルRNA分子を大量に合成できる目処がついたものである。

5. A. Ohkubo, R. Kasuya, K. Sakamoto, K. Miyata, H. Taguchi, H. Nagasawa, T. Tsukahara, T. Watanobe, Y. Maki, K. Seio, and M. Sekine, "Protected DNA Probes (PDP) " Capable of Strong Hybridization without Removal of Base Protecting Groups. **Nucleic Acids Res.**, 36, 1952-1964 (2008).

この論文は、保護基でありながら、塩基識別能を著しく向上させる機能性官能基として機能する人工塩基を組込んだDNAオリゴマープローブの合成法についてまとめたものである。特にアデニン塩基を6-N-アセチル-8-アザ-7-デアザグアニン塩基に変えることによって、塩基識別能と塩基対形成能が著しく向上させることができた詳細な研究について報告したものである。

## 【特許出願数の実績】

1. 【発明の名称】オリゴヌクレオチド固定化固相担体 【出願番号】特願 2006-066396 【特許出願日】2006.3.10 【PCT 出願番号】PCT/JP2007/054645 【PCT 出願日】2007-0309 【国際公開番号】WO/2007/105623 (公開日: 20.09.2007) 【出願人】国立大学法人東京工業大学 【発明者】関根光雄、清尾康志、大窪章寛、田中邦彦
2. 【発明の名称】オリゴヌクレオチド誘導体、遺伝子検出用プローブ及び DNA チップ 【出願番号】特願 2007-506962 【特許出願日】2006/2/28 【PCT 出願番号】PCT/JP2006/303772 【PCT 出願日】2006.2.28 【国際公開番号】WO2006/093157 (公開日: 2006.9.8) 【出願人】国立大学法人東京工業大学 【発明者】関根光雄、清尾康志、大窪章寛、坂本一石、佐々見武志
3. 【発明の名称】固体支持体及び DNA チップ 【出願番号】特願 2005-263722 【特許出願日】2005.9.12 【公開番号】特開 2007-078399 (公開日 2007.3.29) 【出願人】国立大学法人東京工業大学 【発明者】関根光雄、大窪章寛、清尾康志