

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

CAGE解析によるmRNA発現データ

【主な研究論文とその概要】

なし。

【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) 次世代ゲノム解析技術の開発 (3) 個別生命機能の解析 (4) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (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 (和英併記)		糖尿病に関連した転写調節因子に対する遺伝子ネットワークの探索					
代表研究者名 (所属機関・職名)		加藤 規弘(国立国際医療センター 研究所・部長)					
年度別研究費 (千円)		16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	合計
		18,000	24,000	18,000	0	0	60,000
		研究者名		所属機関・部局・職		専門分野	
研究 組 織 図	代表機関	☆ (代表研究者)		加藤 規弘		ゲノム医科学	
		(分担研究者)		柳内 和幸		分子生物学	
	分担機関	☆ (代表研究者)					
		(分担研究者)					
		(分担研究者)					
	※ 研究者名欄は、適宜増減してください。						
【研究目的】 ヒトでは、酵母などと異なり、プロモーター領域以外にも転写因子の結合配列が存在するため、転写調節領域をゲノム規模で解析する有効な手法が現状では存在しない。我々は、結合配列の大規模かつ効率的な同定を可能とする酵母one-hybridシステム(Y1H法)の改良に成功し、今回、それを糖尿病に関連する3つの主要な転写因子の機能的解析に活用する。<i>in vitro</i>と<i>in vivo</i>の実験系を併用して、分子レベルの転写因子-標的遺伝子(結合配列)間の相互作用から、細胞レベル、個体レベルの二次的な発現変動までを含む、糖尿病関連の転写因子に関する統合的なゲノムネットワーク解析を目的とする。その知見に基づいて高精度な転写因子結合配列の予測アルゴリズムの作成を試みる。各転写因子に対しては300～500個の標的遺伝子が推定されるものの、90%以上は未同定であり、本研究成果は、糖尿病の「発症メカニズムの解明」や「創薬ターゲットの発見」に重要である。							
【課題の概要】 概要: 先ず改良 Y1H 法を用いて 3 つの転写因子(GR、HNF4α、PPARγ)の結合配列の同定を試みる。それらに関して測定した結合親和性のデータをもとに、各 DNA 配列を‘結合強度’で重み付けし、転写因子結合配列の規則性を探索することによって、結合配列をより正確に予測するプログラムの作成を試みる。 改良 Y1H 法によって同定された直接的な標的遺伝子の(ネットワークの)下流には、2 次および 3 次的な発現変動をする遺伝子が存在する。これらを同定するために、細胞レベルと個体レベルでのマイクロアレイによる発現解析を行い、全データを <i>in silico</i> で統合することにより、糖尿病を疾患モデルとした転写因子ネットワークを描き、各転写因子のクロストーク等を解析する。以下、項目別に説明を補足する。 上述したごとく、本研究は <i>in vitro</i>と <i>in vivo</i>の実験系を併用するとともに、分子レベルの相互作用から個体レベルの2次的影響までを含む、糖尿病に関連する転写因子の網羅的なネットワー							

ク解析を主たる目的とする。さらに、その結果に基づいて精度の高い転写因子結合配列の予測アルゴリズムの作成を試みるべく、下記の実験を行う。

I. 転写因子結合配列のゲノムワイドな探索(分子レベル)

- (1) *in vitro* の実験系は、「転写因子がゲノム全体にアクセス可能な状態」と考えられ、細胞種の違いを超えた転写因子の結合配列の探索に適している。よって、第一段階としては、改良 Y1H 法を用いて、ヒトとラットのゲノムから転写因子の結合配列を同定する。
- (2) 同定したすべての結合配列は、PCR 法で回収する。回収したゲノム DNA 断片を用いて、転写因子と各 DNA 配列との生化学的な結合親和性を測定する。
- (3) ヒトとラット間で共通して結合配列の見出される遺伝子群に関しては、両生物種間でのゲノム情報の保存性を検証していく。これによって、異種間での比較ゲノム学的情報の有効性を評価する。

II. 細胞特異的な転写因子ネットワークの解析(細胞レベル)

I のゲノムワイドな探索で収集した情報は、細胞のクロマチン構造や他の転写因子の存在を無視したものである。よって、複数の細胞株を用いて、生きた細胞内での転写因子の結合状態と、転写因子に依存して発現変化する標的遺伝子群を同定する必要がある。

- (1) 転写因子に応答する遺伝子群をマイクロアレイでタイムコースに沿って解析する。
- (2) 同定した転写調節領域をスライドガラス上にスポットし、Chromatin IP 等によって生細胞における転写因子の結合を確認する。

III. 個体内における解析(個体レベル):モデル動物としてはラットを活用

ヒトにおいては侵襲的な実験が不可能なため、本研究では個体レベルの評価系としてラットを用いる。デキサメサゾン(DEX、合成グルココルチコイド)、ピオグリタゾン(PPAR γ の誘導薬) 負荷によって主要臓器における発現変化をマイクロアレイで解析し、個体レベルでの直接的な標的遺伝子の動態とともに、2次的、3次的に発現の変化する遺伝子群を同定する。

IV. *in silico* での解析(統合的な解析)

実験データより得られた各転写因子と DNA 配列との結合強度による重み付けに従って、結合配列の規則性を解析し、従来のものより正確な DNA 結合配列の予測アルゴリズムを作成する。また、分子、細胞、個体の各レベルでの糖尿病関連の転写因子ネットワークにおけるクロストークポイントや、ヒトとラットの間で保存されている下流遺伝子群などについて、統合的な解析を行う。

【課題終了時までの研究成果】

概要:改良 Y1H 法を用いて、ヒトゲノムから GR 結合配列のクローニングを行い、563 箇所を同定した。一分子蛍光分析システム(FCS 法)を用いて affinity(親和性)を予備的に検討し、その結果に基づいて従来の結合配列予測プログラムの信頼性(cut-off 値)を評価した。予測アルゴリズムでのスコア ≥ 75 を示す 391clone について、GR との結合を FCS 法で評価したところ、334(85.4%)箇所での直接結合を確認し、その親和性を数値化した。さらに、これらのゲノム断片のうち、実際にグルココルチコイド応答領域として 150 箇所が機能することを、ヒト細胞株でのルシフェラーゼ・アッセイによって確認した。また比較ゲノム学的視点より、ラットゲノムからも GR 結合配列を 878 箇所クローニングし、これらについても直接結合の確認、親和性の数値化、生物種間の重複に関する解析等を進めた。以下、項目別に説明を補足する。

(1)ハイスループットな DNA-タンパク相互作用実験系の確立

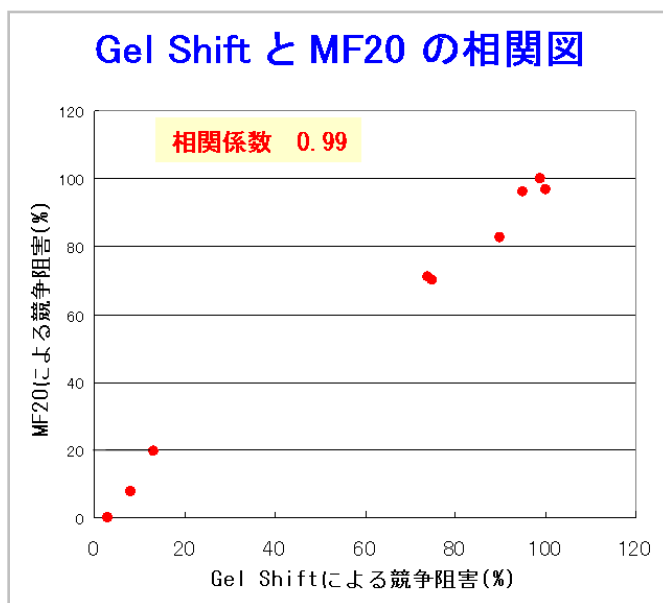
2つの、独立して作成したライブラリーにおいて、改良 Y1H 法により GR 結合配列をスクリーニングした結果、2020 クローンを同定し、そのうち重複を除いた独立クローン数は 563 であった。ヒト(お

よびラット)ゲノムから改良 Y1H 法によって転写因子結合配列が得られた後のステップとして、ハイスループットな生化学的 DNA-タンパク相互作用実験系の確立が不可欠である。そこで遺伝子を導入しやすいヒト細胞株である 293 細胞に、FLAG-tag を付けたヒト GR 遺伝子発現ベクターを安定的に導入し、その細胞溶解液から抗 FLAG 抗体を用いて GR タンパクを精製した。当初、実験に用いていた(昆虫細胞で発現された)市販のゲルシフト用 GR タンパクでは、予期する通りの結合特異性(GRE-consensus および hTA-GRE とは結合し、本来結合しないはずの Random Oligo、Random Oligo 2、AGCE1 とは全く結合しないこと)が認められなかったため、試行錯誤した末、独自に動物細胞から精製した GR タンパクを用いることにより解決できた。

生化学的な結合実験をハイスループットで行うために、順次、3つの実験系-①ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)の変法である ELDIA (enzyme-linked DNA-protein interaction assay)、②表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance)現象を応用した MultiSPRinter(TOYOBO 社)、そして③1 分子蛍光観察システム(MF20) (オリンパス社)-を検討し、最終的にはMF20を用いることでハイスループットな生化学的DNA-タンパク相互作用の実験系が確立できた。

MF20 は共焦点レーザー光学技術を応用したもので、1000 兆分の 1 リットルという超微小領域中をブラウン運動によって通過する 1 分子の通過所要時間を測定する。蛍光標識されたプローブ DNA は分子量が小さく、水分子の衝突によるブラウン運動のスピードは速い。これに対して、プローブ DNA にタンパク質が結合して複合体を形成した場合には、スピードがより遅くなって超微小領域中の通過所要時間が長くなる。プローブを固定することなく、分子が自由に水溶液中を動いている状態で観察できるため、他の実験系では得られない自然に近い条件での相互作用解析が可能となる。

結合実験の結果は、結合するべき GRE-consensus と hTA-GRE で結合が観察され、全く結合しないはずの Random Oligo、Random Olig2、AGCE1 では結合が観察されなかった。これはゲルシフトの実験結果とよく関連し(右図)、次項で述べる ルシフェラーゼ・アッセイによる生細胞内での GR 結合状態とも非常によく関連することが確認された。



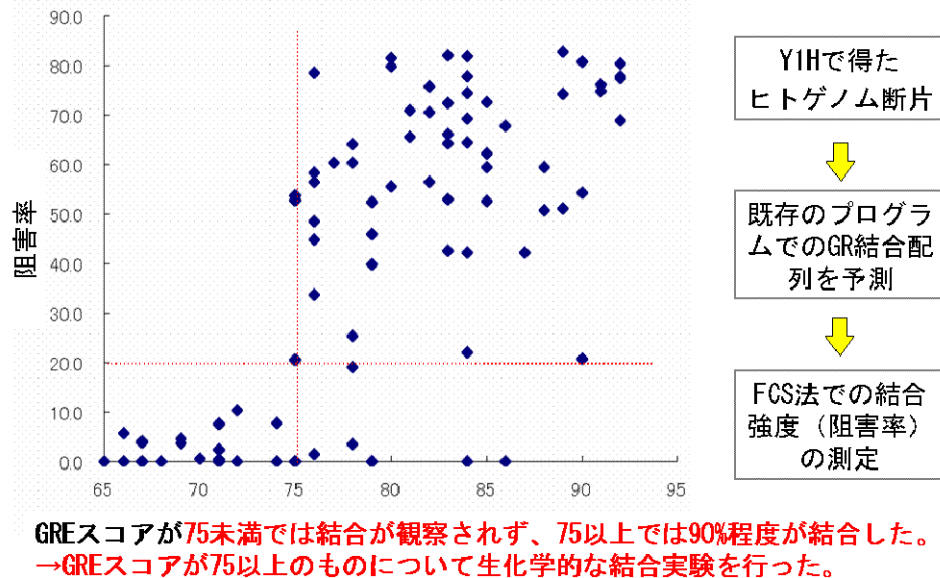
(2)同定された GR 結合配列の親和性測定とルシフェラーゼ・アッセイによる転写活性化の確認
前項での検証結果に基づき、改良 Y1H 法にてクローニングした転写因子結合配列の親和性を MF20 にて測定した。予備的検討として、先ず既存の予測プログラムの信頼性を評価するために 96 断片分を測定したところ、GRE スコア<75 では全く結合が観察されず、スコア $\geq$ 75 で 90%程度の結合が見られた(次ページ図参照)。引き続き、スコア $\geq$ 75 のクローン全てに関して MF20 で結合親和性を測定したところ、334 クローン(85.4%)で GR の直接結合することが確認された。これらのデータから、従来のコンセンサス配列 GGTACAAnnTGTYCTK との比較において、高親和性を示すクローンで保存されている可能性の高い配列 AGnACAnnnTGTnCnn が導かれた。

また直接結合の確認されたクローンのうち、ルシフェラーゼ・レポーター・ベクターへの組み込みが容易な 180 クローンをヒト 293 細胞でテストし、150 クローン(83%)でグルココルチコイド依存的な転写活性化能を確認した。なお、不応答性クローン 30 個の一部に関しては、別の細胞株で

の応答が確認されており、MF20 とルシフェラーゼ・アッセイとの結果が一致しない部分に関しては細胞特異的な転写因子 (ないしコファクター) の影響等が考えられた。

図2. Y1Hクローンの検証 (結合強度とGREスコアの比較)

標識しない配列を40倍加えたときの阻害率とGREスコア



(3)細胞レベルでのマイクロアレイ解析

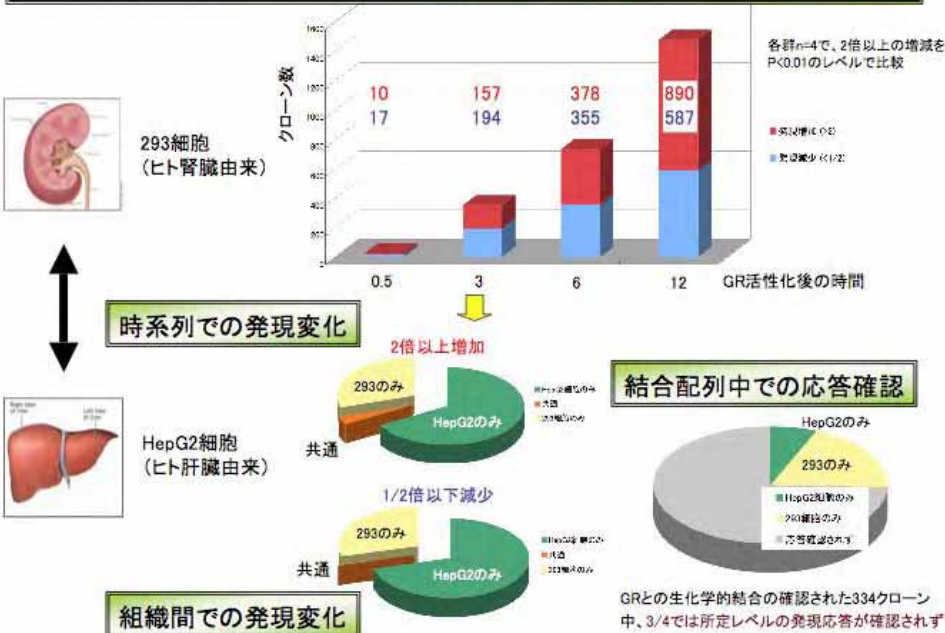
マイクロアレイによる発現解析を行うに際し、リガンド刺激による下流ネットワークが顕著となるように、FLAG-tag を付けた、ヒト GR を安定に発現するヒト細胞株2種(ヒト腎臓由来の細胞株 293 細胞とヒト肝癌由来の細胞株 HepG2 細胞)を樹立した。また、FLAG-tag を付けたラット GR を安定に発現するラット膵臓β細胞由来のインスリン産生細胞株 RIN5F も樹立した。これらの細胞については、先ず機能的な GR が安定して発現する細胞株であることを確認した。

293 細胞と HepG2 細胞に関して、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾン(DEX)を培養液中に添加した群と添加しない群とを準備し、0.5 時間後、3 時間後、6 時間後、12 時間後の 4 ポイントにおいて、各群から n=3 で RNA 抽出を行った。これらの RNA を用いて、Agilent 社製のマイクロアレイにて発現解析を行った。

この GR 下流遺伝子のヒト 293 細胞での時系列観察で、 $P < 0.01$ で2倍以上の発現変動をした遺伝子数は、0.5 時間後で 27 遺伝子、3 時間後で 351 遺伝子、6 時間後で 733 遺伝子、12 時間後で 1477 遺伝子であり、GR 活性化後の時間経過に従って GR 下流の遺伝子ネットワークが広がっていく様子が綺麗に観察された(次ページ図)。また、GR 下流遺伝子について 3 時間後の細胞株間で発現変化を比べた場合、293 細胞で発現変化した 351 遺伝子(発現上昇 157 遺伝子、発現低下 194 遺伝子)と HepG2 細胞で発現変化した 797 遺伝子(発現上昇 330 遺伝子、発現低下 467 遺伝子)で共通する遺伝子はわずかに 18 遺伝子(発現上昇 16 遺伝子、発現低下 2 遺伝子)しか存在せず、細胞種による初期応答遺伝子の違いが顕著に認められた。

他に注目すべき点は、MF20 での生化学的結合の確認された(前述した)334 クローンに関しては、その 4 分の 3 で所定レベル(2倍以上の変動かつ群間比較で $P < 0.01$)の発現応答が確認されなかったことである。こうした組織特異性や1次〜3次応答に関するアレイ結果の解釈に関しては、さらなる検討が必要である。

マイクロアレイでの発現変動に関する検討



(4) ラットにおける GR 結合配列の解析

ヒトを対象とした場合に、その研究試料の入手可能性という点で、大きな制約が存在する。すなわち手術等の特殊な事情がない限り、生体の組織(臓器)を採取して発現変動を調べることはできず、当然ながら薬物等の負荷に伴う組織レベルの発現変動を調べることもできない。こうした点を補完する意味でモデル動物を用いた実験の意義は大きいが、そこで認められた結果をヒトに外挿するためには、両生物種の異同に関する基盤的データを整備する必要がある。そこで我々は、侵襲を伴う生理的実験の容易さという点からラットを対象として、比較ゲノム学的アプローチを試みた。

改良 Y1H 法により、ラットゲノムからも GR 結合配列を 878 箇所クローニングし、これらについても(ヒトでの実験と同様)直接結合の確認、親和性の数値化、生物種間の重複に関する解析等を行なった。改良型 Y1H によって、ラットゲノムから同定した GR 結合配列の中で約 100 クローンを選び、ヒトと同様にラット GR タンパク質と GR との親和性を、MF20 での競争阻害実験で評価した結果、ラットでも、Score が 80 以上を示す配列が極めて高い結合親和性を示すことを見出した。ヒトで GR との結合が確認された 334 クローンのうち、ラットで同定されたものと重複したのは、15 個(〜5%)であり、また結合配列を同定するために(ヒト、ラットとも2回ずつ独立して)作成した Y1H 用ライブラリーどうしのクローンの重複も必ずしも多くなかった。従って、ライブラリー作成過程などの微妙な条件設定において、改良 Y1H 法のゲノム網羅性を不十分としている要因が存在するのではと推測された。細胞レベルの検討として、ヒトでの結果との比較という視点でラット脾臓および肝臓由来の GR 発現細胞株を樹立し、個体への DEX 投与に伴う *in vivo* 組織発現変動とともにマイクロアレイ解析を行なった。ステロイドの主要な生理的作用である抗炎症に関わる分子は、共通して発現変動するものの、組織ごとの特異性が高く、また paracrine としてのフィードバックを受ける生体内と *in vitro* での解析結果にも大きな違いが見られた。

(5) ヒト HNF4 α および PPAR γ に関する結合配列の解析

ヒト GR と同様に HNF4 α に関しても改良 Y1H 法での結合配列スクリーニングを行い、独立クローンとして 1,109 箇所を同定した。しかし、GR に対する DEX のような(発現を誘導する)リガンドが HNF4 α には存在しないため、正確かつ詳細に、結合配列や結合強度の確認等を実施することは困難であった。一方、PPAR γ に関しては色々と工夫を試みたものの、改良 Y1H 法がうまく機能しなかったために結合配列スクリーニングを行わず、代わりに、ラット個体にピオグリタゾンを与えて、それに伴う組織発現の変化をマイクロアレイで解析した。特に、PPAR γ の臨床的効果の大きい肝臓、脂肪、心臓に着目して、既報の培養細胞での実験結果と比較したところ、pleiotropic な作用が再現されるとともに、新たな糖代謝関連パスウェイと顕著な臓器特異性が見出された。

(6) 転写因子横断的なネットワーク解析・データの統合

本研究では、当初3つの転写因子に関する統合的なネットワーク解析を目指していたが、当初に予想しなかった種々の困難もあって、そのうちの一つである GR に焦点を絞ることとなった。開始当初にはゲノム規模で転写因子結合配列を同定する効率的手法がなかったために、独自に開発し基盤実験手法として試みた改良型 Y1H 法の意義は評価に値すると考える。その後、タイリングアレイが開発され、普及し始めているものの、横軸研究機関である東工大など、一部の施設を除いて正確性の高い DNA-タンパク相互作用の検証実験は必ずしも汎用化レベルにまで達していない状況である。改良型 Y1H 法の、ゲノム規模での網羅性に関して不十分な点はあるものの、両手法の結果を突き合わせることで validation などの点で有用な情報を提供できる。

【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

従来、転写研究では5'上流(プロモーター)領域ばかりが注目されてきたが、イントロンや下流領域にも多くの転写因子結合領域が存在することを、ゲノム全領域にまたがる GR 結合配列の同定作業の結果、明示することができた。異なる培養細胞でのアレイ解析結果では、組織間での発現応答の重なりが相当に低い可能性がある(細胞種ごとの特異性が大きい)ことが示唆された。

b) 縦軸研究(又は横軸研究)への貢献に繋がる研究成果

- ・同じステロイド・ホルモンの核内受容体であるエストロゲン受容体や、PPAR γ の脂肪細胞における発現ネットワークを手がける縦軸研究グループとも相補的な研究成果であり、疾病という観点から個体の複雑性を解明するうえで少なからず貢献できたものと思われる。
- ・同定した GR 結合配列に関するゲノム規模での網羅性については、横軸研究のタイリングアレイの実験結果と突き合わせることで、相補的な知見が提供できる(特にウェット実験で検証し数値化したされた転写因子-結合配列データとしての基礎資料的位置づけ)。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

ゲノムネットワークプラットフォーム <http://genomenetwork.nig.ac.jp/>

日立製作所 タンパク質相互作用データ(Y2H データ)

東京工業大学 TilingArray によるヒトの発現解析データ

理研 CAGE データ

【主な研究論文とその概要】

1. Konoshita T, Wakahara S, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, Kawai Y, Kato N, Koni I, Miyamori I, Mabuchi H. Tissue gene expression of renin-angiotensin system in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2006, 29: 848-52.
糖尿病の臓器合併症の病因・治療において重要な役割を果たすレニン-アンジオテンシン系に注目し、その主要因子の臓器レベルでの発現変動をヒト腎生検試料を解析対象と

して包括的に検討した報告。

2. Jesmin S, Maeda S, Mowa CN, Zaedi S, Togashi H, Prodhan SH, Yamaguchi T, Yoshioka M, Sakuma I, Miyauchi T, Kato N. Antagonism of endothelin action normalizes altered levels of VEGF and its signaling in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol*. 2007 Nov 28;574(2-3):158-71.
血管内皮増殖因子（VEGF）は様々な循環・代謝ネットワークの key molecule である。特に血管障害後のリモデリングにおいて、エンドセリン受容体の阻害により惹起される VEGF シグナル経路の諸因子の動態をラットの脳虚血という病態で解析した報告。
3. Kato N, Liang Y-Q, Ochiai Y, Jesmin S. Systemic evaluation of gene expression changes in major target organs induced by atorvastatin. *Eur J Pharmacol*. 2008 Apr 28;584(2-3):376-89.
脂質、インスリン抵抗性など生体の代謝調節ネットワークにおいて重要な役割を果たす HMG-CoA reductase 阻害薬（アトルバスタチン）をラットに投与した際の *in vivo* での遺伝子発現変化を、臓器特異性という視点からマイクロアレイにて解析した報告。
4. Ochiai Y, Liang YQ, Serizawa M, Kato N. Dynamic Changes of the Renin-Angiotensin and Associated Systems in the Rat After Pharmacological and Dietary Interventions *in vivo*. *Physiol Genomics*. 2008 Sep 16. [Epub ahead of print]
血圧、インスリン抵抗性など生体の代謝調節ネットワークにおいて重要な役割を果たす レニン-アンジオテンシン系に関して、薬物阻害および食餌負荷（高脂肪食、高食塩食）時の主要因子の発現変動を“Dynamic（動的）”に捉え、解析した報告。
5. Kato N, Liang YQ, Ochiai Y, Birukawa N, Serizawa M, Jesmin S. Candesartan-induced gene expression in five organs of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. in press.
血圧、インスリン抵抗性など生体の代謝調節ネットワークにおいて重要な役割を果たす レニン-アンジオテンシン系の阻害薬（カンデサルタン）をラットに投与した際の *in vivo* での遺伝子発現変化を、臓器特異性という視点からマイクロアレイにて解析した報告。

【特許出願数の実績】

特になし

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 (和英併記)		生命を形づくる遺伝子発現機構の網羅的解析 (Comprehensive analysis of gene expression pattern and mechanism which living organism forms)					
代表研究者名 (所属機関・職名)		浅原 弘嗣 (国立成育医療センター研究所・部長)					
年度別研究費 (千円)		16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	合 計
		22,000	22,000	22,000	67,000	27,000	160,000
		研究者名		所属機関・部局・職			専門分野
研究組織図	代表機関	☆浅原 弘嗣	国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部・部長			分子生物学 整形外科	
		橋本 徳	国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部・研究員			分子生物学 麻酔科学	
		味八木 茂	同上			分子生物学	
		横山 成俊	同上			発生生物学	
		渡邊 隆司	同上			分子生物学	
		工藤 寛枝	同上			発生工学	
		吉鷹 輝仁	同上			分子生物学 整形外科	
		山下 聡	同上			分子細胞生物学	
		光岡 和彦	同上			工学	
【研究目的】 ゲノムプロジェクト等で創出された情報を活用することによって生命現象の解明等への研究の発展を図り、同時に必要なゲノム解析に係る技術開発及びデータベースの開発を実施する。その一環として、 Whole mount <i>in situ</i> hybridization (WISH) 等のデータから絞り込まれる転写因子・転写コファクターの機能を網羅的に解析し、データベースの開発をするとともに、他の組織の発生にも通ずる公理の発見を目指す。							
【課題の概要】 四肢を中心として、全身の臓器で発生期における遺伝子発現をスクリーニングし、それら遺伝子の発生・発達における機能を解析する。マウス胚における WISH を行い、ヒトと共通する転写関連遺伝子の発現パターンの画像データから、転写因子・転写コファクターの共発現を網羅的にスクリーニングし、 <i>in vitro</i> では間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) の軟骨・骨分化モデル、 <i>in vivo</i> ではノックアウトマウスの作製・解析などによって、軟骨・骨形成による生物の形づくりのメカニズムを解明し、先天性骨系統疾患の病態メカニズムの理解や、 MSC などの組織幹細胞を用いた将来的な再生医療に向けての基盤的知見の蓄積を図る。							

【平成20年8月末までの研究成果】

(マウス胚 WISH による転写関連因子の発現期における発現様式の解析)

マウスのゲノム、遺伝子情報より、転写因子、転写コファクターのリストを作成し、さらに理研転写因子データベース (Riken TFdb; <http://genome.gsc.riken.jp/TFdb/>) (Kanamori *et al.*, 2004, *Biochem Biophys Res Commun*) およびPANTHERデータベース (PANTHER Classification System; <http://www.pantherdb.org/>) を参照して保管し、2,911 個の転写関連遺伝子のリストを作成した。このリストに基づき、理研Functional Annotation of Mouse (FANTOM) cloneより 1,549 個の転写関連遺伝子のcDNA cloneを得た。また、米国マウスMammalian Gene Collection (MGC) cloneライブラリより、111 種類のcDNA cloneを得て、クローンとして全部で 1,660 種類の転写関連因子を得た。これらのcDNA cloneに対して、T7 およびSP6 ポリメラーゼプロモーター配列を付加したプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物を精製して鋳型とし、DIG-RNAプローブを合成した (One-Step法)。これらのプローブを用い、胎生 9.5、10.5、11.5 日胚のICRマウスを使用し、反応温度/時間、ハイブリダイズの温度/時間等をそれぞれの実験で一様に設定し、WISHを行った。結果は、実体顕微鏡で観察し、Charge Coupled Device (CCD) カメラにて約 37MB/枚の高画質 Tagged Image File Format (TIFF) 画像を、すべての胚において前肢芽の拡大像 2 枚と全体像、四肢以外で興味深い組織発現を認めた場合はその組織の拡大像も含め、最低でもステージ毎に 3 通りの倍率で撮影し、それぞれの遺伝子に対して 3 ステージ、合計して最低 9 枚の画像をえた。このようにして行った結果、合計約 1,600 遺伝子の約 25,000 枚の画像取得を完了した。その上で複数の研究者が発現パターンを確認・評価した。

WISH 法の最大の利点は空間的な発現情報入手の容易さにある。我々の注目する四肢をはじめ、比較的容易に観察可能な尾部 (未分節中胚葉を含む)、脊髄神経、眼などを含め全身における転写因子発現の多様性を見る事が可能であり、今回の解析により、約 300 個の遺伝子が組織特異的な発現をすることを観察した。

これらの中で四肢のパターニング、軟骨形成の肢芽領域に注目すると、特異的な発現を示したものは約 150 個であった。これらの発現をさらに詳細に (1) 先端部肥厚組織である apical ectodermal ridge (AER) 領域、(2) AER の直下で細胞増殖が盛んであると言われている progress zone (PZ) 領域、(3) 後部で前後軸形成に重要な分泌因子 sonic hedgehog (Shh) が発現する zone of polarizing activity (ZPA) 領域、(4) ZPA と対称位置であり転写因子 Gli3 の発現する肢芽前部領域、(5) 肢芽中央部、(6) 軟骨細胞凝集領域、(7) その他、筋細胞領域、指間領域など、多数の領域に分類して発現の有無を評価した。

AER 領域には、全部で約 10 個の因子で見られた。また、PZ には約 50 個の因子で発現が確認された。これらの領域は増殖・成長が強い領域であるので、分化に対する抑制作用や、未分化性の維持などの機能を持つ可能性がある。ZPA 領域では、約 30 個の因子で同部位付近に発現が見られた。これらの因子は Shh の上流、下流因子もしくは、Shh の活性に関係する因子の候補である。すなわち、これらの因子は、前後軸形成のメカニズム解明に重要である可能性がある。また、ZPA とは対称的に、肢芽前方の Shh の発現領域と重ならないがその付近に発現している因子が複数確認されているが、これらは Shh によって抑制される下流因子の候補であり、これらも軸形成メカニズムに重要な因子である可能性がある。肢芽中央部のみに発現する転写因子はこれまであまり報告が無かったが、転写因子 Gsc をはじめとした複数の遺伝子において肢芽背側よりの観察によって中央部での発現が見られた。これらの因子については、発現領域の重なりや位置関係を精密に解析し、機能解析を行う必要があるが、肢芽の前後軸形成に関わる因子と予想される。四肢の骨・軟骨形成領域については、軟骨の分化に関わる転写因子 Sox9、Sox6 などの発現様式を指標に、軟骨領域付近で発現する新規の転写因子を 8 個同定した。遺伝子発現様式から、これらの遺伝子は軟骨細胞分化における Sox9 に対する転写コファクター候補、あるいは Sox9 の下流である標的遺伝子の候補として、非常に興味深い。その他、筋細胞領域、指間領域など、複数の遺伝子の発現を確認した。

このように、詳細な四肢領域、ならびに全身の各臓器・組織 (眼、鼻、顎、心臓、肝臓、体節、

尾、脊髄)におけるそれぞれの遺伝子の発現領域から遺伝子の共発現遺伝子クラスターの解析を行った。これらの結果は、データベース化し、EMBRYS (Embryonic gene expression Database as a Biomedical Research Source) として、GNP コンソーシアム内に公開した。

WISH のデータは画像として保存され、その点では 2 次元 (2D) でのデータ開示となり、腹部、背部など研究者ごとに興味を持つ領域を全てカバーできる情報開示の点で脆弱さが問題である。この問題を解決すべく、3 次元 (3D) でのデータ取得を検討し、新規 3D 画像データ取得システム (AERO 規格) を開発した。

既存の 3D 画像記録方式としては、①連続切片の再構築、②サンプルの透明化処理による OPT 方式、③ CT などによる断層画像の再構築等が報告されているが、いずれも特殊な機材あるいは膨大なコストを要し、汎用性の点で改善の余地があると考えられる。

本研究で開発した AERO システムでは、ロータリーヘッド付き CCD カメラを用いて、斜め上方 45 度より周囲 360 度を 2 度毎に 180 枚の画像を取得、その後アニメーションとして再構築し、使用者が操作して任意の角度から観察することができる。

従来の 3D 再構成法の confocal 撮影および OPT 方式では、フィルターによる単色撮影が行われ、連続切片の再構築方式ではカラー撮影後の画像を閾値による単色化を行ってから 3D 再構成が行われており、いずれも 3D ではオリジナルのカラー画像は見られない。AERO 方式ではサンプルオリジナルのカラー画像のまま立体的表現で観察することが可能である。

当方式で記録したデータは自己展開型ファイル形式で配布可能で、特別なソフトウェアを介さず閲覧可能である。また、EMBRYS に AERO データを収容することで、ウェブでも閲覧可能となる。これはデータの流通、研究者間での共有にとって有利であり、研究ネットワークを通じた研究速度アップが期待される。

これまで WISH を完了している転写関連因子のうち、特に興味深い発現パターンを示す約 200 因子について、E9.5、E10.5、E11.5 の 3 ステージにおいて AERO 規格での撮影を完了した。現在ウェブデータベースへの AERO 規格画像のアップロードに向けて AERO プログラムの整備がほぼ完了しており、間もなくウェブ上での AERO 規格画像が閲覧可能となる。

(遺伝子改変マウスを用いた機能解析)

前述した WISH スクリーニングより興味深い発現を示し、かつ、機能の明らかにされていない遺伝子を選択し、それぞれの遺伝子の組織形成への役割について明らかにすることを目的として遺伝子改変マウスの作製を行った。目的の遺伝子を Venus 遺伝子に置換することで、遺伝子破壊だけではなく遺伝子発現の分析が可能となる様に工夫した、‘ノックイン・ユニバーサルベクター’を構築した。このベクターに目的配列を組み込み、各遺伝子を破壊する為のノックインベクターを作製した。これまでに 16 遺伝子のノックインベクターを作製した。これらのうち 8 遺伝子のノックインベクターは ES 細胞 (TT2F21) に導入し、それぞれの遺伝子領域が Venus 遺伝子に置換した ES 細胞を取得した。さらに、これらのうち 7 遺伝子についてはマイクロインジェクション法により、遺伝子領域が Venus に組み換わった ES 細胞を用いてキメラマウスを取得した。その後、当該キメラマウスの germ line transmission を確認し、ノックイン・ホモマウスを取得した。その他、3 遺伝子に関して、遺伝子領域内にジーントラップベクターが導入された ES 細胞を購入し、マイクロインジェクション法によるキメラマウスの作製を行い、目的遺伝子をホモ欠損したマウス個体を取得した。

(ハイスループット遺伝子導入アッセイシステムの構築、解析)

発生期において細胞分化、組織形成は転写因子の絶妙な制御により実行されているが、個々の転写関連因子は単独ではなく、それぞれ複数因子の相互作用により働く。我々は WISH スクリーニングにより共発現する因子を探索することにより、この組織形成を制御する相互作用を探索しているが、発現の類似性を見ているのみであり、相互作用については更なる解析が必要であることは明らかである。我々はこの問題に対し、ヒト遺伝子の全長 cDNA 発現ベクターライブラリを用いた新たなスクリーニング系としてハイスループット遺伝子導入アッセイを構築し解析することにした。こ

れは、遺伝子のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターと、ヒト遺伝子の全長 cDNA 発現ベクターライブラリを共に培養細胞へ遺伝子導入し、ルシフェラーゼの活性を指標にして転写調節を制御する因子を網羅的に評価するハイスループットなシステムである。この目的として、我々は国立成育医療センター研究所にて、東京大学医科学研究所で作製された日本オリジナルの **FLJ** ライブラリおよび **ATCC** より購入した世界で最もよく使用されている **MGC** ライブラリを使用することにした。これらのライブラリは、合計すると約 **16,000** 種類のヒト遺伝子に相当する。これらを **384** プレートで自動分注ロボットを用いることにより短時間で一度に解析が可能である。

これまでに、このシステムを用いて、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化に重要な転写因子 **Runx2** と協調して働く因子を探索した。材料として **Runx2** の結合配列を **6** 個タンデムにつないだ **6xOSE2** (osteoblast specific element) レポーター・ベクターを用いてスクリーニングした。その結果、標準化変量 (STD) **4** 以上 ($n=3$) を指標として **Runx2** による転写を **up regulate** する **24** 遺伝子を見出した。見出された遺伝子には既に **Runx2** との結合が報告されているものが含まれていたもので、本スクリーニングシステムは期待通り機能したと考えられる。

(ChIP-chip アッセイによる網羅的標的遺伝子の探索)

転写関連因子の機能を解析するにあたり、その最も重要な能力が遺伝子発現の制御である以上、標的とする遺伝子ならびにその転写関連因子を中心とした分子ネットワークを探索することは、細胞分化、組織形成への役割を知る上で大きな意味を持つ。近年、転写因子の網羅的な標的遺伝子の探索法としてクロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation: ChIP) とゲノムタイリングアレイを組み合わせた **ChIP-chip** 法が構築され、その有用性について相次いで報告されている。我々はこの方法を用いて目的とする転写因子の標的遺伝子、すなわち機能を明らかにすることを計画した。

これまでに軟骨形成、精巣形成に重要な転写因子である **Sox9** について、それぞれ軟骨細胞、精細管の支持細胞であるセルトリ細胞をマウスより採取して初代培養を行い **Sox9** 抗体で **ChIP-chip** を行い **Sox9** のそれぞれの組織での標的遺伝子の解明を行った。

ゲノムタイリングアレイは **GeneChip Mouse Promoter array** (Affymetrix) を使用して約 **28,000** 遺伝子のシス領域 (転写開始点より **-6~+2.45kbp** の領域) への結合に注目して解析を行った。この結果については **GNP** コンソーシアム内にて公開した。また、並行して **shRNA** 発現レンチウイルス感染によりマウス軟骨細胞、セルトリ細胞で **Sox9** の発現抑制 (ノックダウン) を行い、**GeneChip Mouse Genome 2.0 array** (Affymetrix) を使用してマイクロアレイ解析を行い、発現が変動する遺伝子を検討した。これら、**ChIP-chip** 解析により **Sox9** がプロモーター領域に結合している遺伝子群と、**Sox9** 発現抑制により発現に変動の見られた遺伝子群とで重複する遺伝子を探索し、**Sox9** の標的遺伝子候補とした。この解析により軟骨細胞で **Sox9** 標的遺伝子候補として既知標的遺伝子である **Col2a1**、**Hapln1** を含め **60** の標的遺伝子候補を見出した。

この標的遺伝子候補群に共に **Sox9** が抑制的に働く後期軟骨分化を促進する転写因子 **Runx2** に対し抑制的に働く **Twist2**、**Bapx1** が含まれており、詳細な分子生物学的な解析により、これらが **Sox9** の直接の標的遺伝子であること、これらの発現制御を介した **Runx2** の機能、発現の抑制することにより、後期軟骨分化の抑制が行われていることを強く示唆する結果を得た。

【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

発生期における遺伝子の発現パターンの網羅的解析を、空間解像度の高い **WISH** 法により行ったことで、個体全体の各組織形成に関わる可能性のある転写因子クラスターを、特に四肢領域において詳細に同定できた。これらの遺伝子は、ダイナミックに進行する組織形成時に特異的に感度良く発現していることから、それぞれの組織形成に重要な遺伝子である可能性があり、先天性疾患の原因遺伝子解明、組織再生医療の基盤となり得る。また、**WISH** スクリーニングの結果をデータベース化し、一般公開に先駆けて **GNP** コンソーシアム内に開示した。今後、このリソースを閲覧、利用した **GNP** コンソーシアム内の各分野の研究者から、一步先んじた発展／展開研究がなされることが見込まれ、新たな研究促進リソースとして期待が持たれる。

また、遺伝子発現ベクターの保有数が限界点となるハイスループット遺伝子導入アッセイにおいて、**FLJ** ライブラリを活用することで非常に網羅性の高いシステムを構築することに成功した。これまでにこのシステムを使用して **Runx2** の協調因子を探索し、既知因子を含む複数の協調因子候補を見出すことができ、システムの有効性について確認できたとともに新たな骨形成に関わる因子を解明する基盤データを得ることができた。

さらに、**ChIP-chip** 法を用いることで、新たな標的遺伝子を見出し、軟骨分化における **Sox9** の新たな役割について明らかにすることができた。今後は骨格形成と性分化という異なる二つの生命基盤において、**Sox9** が標的遺伝子をどのように使い分けているかという点に注目して研究を行うことにより、組織特異的な転写因子の活性メカニズムに迫れる可能性がある。

b) 縦軸研究（又は横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

1. 理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 林崎良英先生

マウス胚 **WISH** を行うにあたり、各因子に対応した **RNA** プローブ作製を高速化するために、理化学研究所の整備した **Riken** 転写因子データベースに基づき、マウス **cDNA** クローンの提供を受けた。また、ヒト間葉系幹細胞、軟骨細胞ならびにマウス軟骨細胞、セルトリ細胞の **RNA** をサンプルとした **CAGE** 解析を依頼している。

2. 東京大学 大学院新領域 創成科学研究科 菅野純夫先生

ハイスループット遺伝子導入アッセイシステム構築のために、菅野研究室が整備したヒト全長遺伝子クローン（発現ベクター）ライブラリ（**FLJ** ライブラリ）の提供を受けた。

3. 日立製作所 ライフサイエンス推進事業部 岩柳隆夫先生

マウス胚 **WISH** 解析で、四肢などに特徴的な発現の認められた転写関連因子について、**Yeast two hybrid (Y2H)** システムによるタンパク質-タンパク質相互作用のスクリーニングを依頼している。

4. 東京工業大学 大学院生命理工研究科 白髭克彦先生

軟骨の分化ならびに精巣の形成において重要な転写因子 **Sox9** の標的遺伝子を探索するため、白髭研究室で構築、整備されている **ChIP-Chip** 解析を共同研究として行っている。

5. 筑波大学 大学院人間総合科学研究科 高橋智先生

マウス胚 **WISH** 解析で、四肢に特徴的な発現の認められた遺伝子のノックアウトマウスの作製、解析を共同研究として行っている。

6. 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 高柳広先生

骨リモデリングにおける転写因子 **CREB** の研究を介して、情報、ツールの交換を行っている。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

1. WISHスクリーニングのRNAプローブ合成のリソースとして、理研FANTOM cloneよりのべ2,034個（1,549種類の転写関連因子）のcDNA cloneの提供を受けた。
2. 東大菅野研究室が整備したヒト全長遺伝子クローン（発現ベクター）ライブラリ（FLJライブラリ）の提供を受けた。

【主な研究論文とその概要】

1. Transcriptional coactivator PGC-1 α regulates chondrogenesis via association with Sox9. Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, Furumatsu T, Lotz M, Belmonte JC, Asahara H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15; 102(7):2414-9.

概要：Sox9 と PGC-1 が共発現することから、両分子の相互作用を検討し、PGC-1 が Sox9 のコアクチベーターとして、ニワトリ胚およびヒト間葉系幹細胞で相乗的に軟骨分化誘導および特異的遺伝子発現の増強を促すことを示した。

2. Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. Furumatsu T, Tsuda M, Yoshida K, Taniguchi N, Ito T, Hashimoto M, Ito T, Asahara H. *J Biol Chem*. 2005 Oct 21; 280(42):35203-8.

概要：試験管内で再構成した、クロマチン転写系で、p300 のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性が Sox9 依存的転写調節に必須であることを示した。

3. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4; 280(9):8343-50.

概要：TGF- β の刺激は、Smad3 と Sox9 の直接的相互作用によって軟骨分化および特異的遺伝子発現の誘導を行うこと、また、Smad3 が Sox9 と p300 の結合を増強することを示した。

4. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H. *Mol Cell Biol*. 2007 Aug; 27(16):5650-63.

概要：ノックアウトマウスを使用した解析により、HMGB1が軟骨発生に遺伝子発現の制御と同時に、細胞外因子として関わっていることを示した。

5. Dynamic gene expression of Lin-28 during embryonic development in mouse and chicken. Yokoyama S, Hashimoto M, Shimizu H, Ueno-Kudoh H, Uchibe K, Kimura I, Asahara H. *Gene Expr Patterns*. 2008 Feb; 8(3):155-60.

概要：線虫の分化のタイミングを決めるヘテロクロニック遺伝子 *Lin-28* が、マウスとニワトリの四肢発生においても発現し、四肢形成に重要な役割を担っていることを初めて示した。

【特許出願数の実績】

該当なし。

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) <u>個別生命機能の解析</u> (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) <u>公募課題</u>					
課題名 (和英併記)		生体においてステロイドホルモンが担うゲノムネットワークの解明 (<i>In vivo Investigation of Steroid Hormone-Related Genome Networks</i>)					
代表研究者名 (所属機関・職名)		井上 聡 (国立学校法人東京大学・特任教授)					
年度別研究費 (千円)		16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	合計
		20,000	20,000	20,000	48,000	32,000	140,000
		研究者名		所属機関・部局・職			専門分野
研究組織図	代表機関	☆井上 聡		東京大学・医学系研究科・特任教授			老年・抗加齢医学 ゲノム医学
		浦野 友彦		東京大学・医学系研究科・特任助教			内分泌代謝学、生化学
	分担機関	☆ (代表研究者)					
【研究目的】 生命現象において情報伝達と生体恒常性の維持に、内分泌系が大きな役割を有している。中でもステロイドは代表的なホルモンであるとともに、その受容体はホルモン依存性の転写因子そのものである。これら受容体は転写調節によりゲノムネットワークを形成している。代表的なステロイドホルモンは、免疫系、代謝系に関わるグルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、女性ホルモンであるエストロゲン、プロゲステロン、男性ホルモンであるアンドロゲンの 5 種類である。これらのホルモンは、それぞれ独自の受容体として、核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR)、ミネラルコルチコイド受容体 (MR)、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、アンドロゲン受容体 (AR) を介して働く。ステロイドならびにステロイド受容体は、広範な生理作用を及ぼすとともに、特に、癌、骨粗鬆症、炎症などの疾患の診断と治療に関わっており、実際にステロイドとその受容体拮抗剤は、それら疾患の薬として用いられている。本研究では、生体と各種病態においてステロイドが担う転写のネットワークに着目し、生体恒常性の維持とその破綻におけるステロイドのゲノムネットワークの解明を目指す。すなわち、ステロイド作用の標的因子とそのネットワークを網羅的に同定し、それらの性状、機能を分子レベルで解明し、ステロイドホルモンが担う作用カスケードの生体ならびに病態における役割を明らかにすることを目的とする。							