

【課題の概要】

ステロイドは代表的な内分泌ホルモンとしてヒトの正常な働きの維持に深く関わっている。その失調は様々な臓器から、全身に及ぶ各種疾患に至り、実際にこの関連物質は治療薬として広く用いられている。本研究は、ステロイドホルモンが担うゲノムネットワークを網羅的に探索し、その機能解明から創薬を目指す。ステロイドホルモンの標的ネットワークを、ゲノムタイリングアレイ、マイクロアレイ、定量RT-PCR解析、CAGE解析、PPI法を用いて、DNAレベル、RNAレベル、タンパク質レベルでの標的を探索し、同定している。それら新たな標的分子の機能を、分子レベルと生体レベルで明らかにし、病気との関連を解析し、疾患治療への応用を目指す。

具体的には

- ① アンドロゲンの全ゲノムネットワークとその分子標的の解析
 - ② エストロゲンの全ゲノムネットワークとその分子標的の解析
 - ③ 各ステロイドホルモンに共通する、もしくは特異的なゲノムネットワークの解析
- の3項目について、ゲノムネットワークプロジェクトで整備されるゲノム機能の基盤情報と依頼によりスクリーニングされた情報、新規に行う転写因子の結合部位の情報を利用してステロイドホルモンの標的ネットワークを探る。各項目では、エストロゲン、アンドロゲン、グルココルチコイドを中心に5つのステロイドホルモンと関連受容体の特徴と共通性を比較しながら、ヒト材料を用いた解析を行う。横軸機関と連携を深め、分子間相互作用、発現制御機構、ネットワークをより詳細に解析し、そこで得られたデータを総括し新しい分子メカニズムを探るとともに、病気との関連解析を進め、臨床材料と疾患モデル系を用いて診断、治療への応用を目指す。

【平成20年8月末までの研究成果】

アンドロゲンは前立腺の発生・機能維持に必須であり、老化に従い激増する前立腺癌と前立腺肥大の増殖を促す。一方エストロゲンは、乳癌の発症と診断・治療に深く関わる。これらステロイドホルモンは転写因子である受容体を介したゲノムネットワークを構成する。そこで、当ネットワーク、標的遺伝子を探索することにより、前立腺癌や乳癌の発症・進展メカニズムが明らかにされ、それらを分子標的とした新規診断・治療・予防法へ応用できることが期待される。アンドロゲン受容体 (AR) のゲノムネットワークを明らかにするため、横軸研究 (東大先端研・油谷教授研究室、東京工業大学・白髭教授研究室) との共同研究により、前立腺癌細胞を用いて AR 結合部位の ChIP-chip 解析を行った。ヒトゲノム全体の約 1% にあたる領域のマイクロアレイを用いて解析し、AR 結合部位を 10 箇所同定し、その近傍にステロイド代謝や薬物解毒に関わる UGT1A や細胞接着分子 CDH2 を含む 8 個の応答遺伝子を見出した (*Oncogene*, 2007)。一方、染色体レベル、全ゲノム上でのアンドロゲン結合部位に関しては、増殖や転写、シグナル伝達などに関わる有望な新規応答遺伝子近傍に結合部位を見出し、複数の新しいホルモン標的遺伝子を得ており、その制御と機能が注目される (学会発表ならびに論文投稿中)。バイオインフォマティクスや ChIP-cloning 法での結果との比較も進んでいる (*Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 2006; 2008)。エストロゲン応答遺伝子について、独自の方法で同定した TRIM 遺伝子である Efp に関し、Efp とその基質の発現が乳癌あるいは子宮癌の予後を予測できることを示し (*Clin Cancer Res*, 2005a; *Clin Cancer Res*, 2005b)、蛋白相互作用解析から Efp の新基質 RIG-I を得て、この修飾機構が感染防御機構に不可欠な自己免疫に関わる新規メカニズムであることを明らかにした (*Nature*, 2007)。同様にエストロゲン応答遺伝子 EBAG9 や新規経路、エストロゲン関連受容体 ERR と癌あるいは生活習慣病の病態における役割についても新しい知見を得た (*Cancer Res*, 2005; *J Biol Chem*, 2006a; *J Biol Chem*, 2007; *Int J Cancer*, 2007; *in press*)。

骨とステロイドの関係については、ステロイド受容体 X あるいはリン酸化を介する新しいビタミン K の作用機構を世界に先駆け解明し (*J Biol Chem*, 2006b and Cover; *J Mol Endocrinol*, 2007)、さらにはステロイドホルモンの新規標的ネットワークを明らかにしている (学会発表ならびに論文投稿中)。

エストロゲン受容体のゲノム上の結合部位から近傍に標的遺伝子を同定し、そのネットワーク上での機能を明らかにする手法は研究者らの独自性の高いものである。当研究者らの報告は以前から一貫してエストロゲン受容体のヒトゲノム上の結合部位に注目して研究を行ってきた点で先見性があったと考えられる。この研究をゲノムネットワークプロジェクト (GNP) でさらに展開し、これら標的遺伝子の疾患、治療の診断としての新しい役割を明らかにした。また、本GNP研究によるアンドロゲン受容体についてのChIP-chip解析は世界に先駆けるものであり、そのネットワーク全貌の理解と臨床への応用を目指すものとして順調な成果を得ている。さらに各種ステロイド受容体ネットワークとの相互関係を視野にいたした統合的解析も進んでいる。

次項とも関連し、GNPに対する実績として以下の4点は評価し得ると考えている。

1) 横軸-縦軸との共同研究

ChIP-chip解析ならびに定量RT-PCR解析にて横軸研究機関との共同研究を行い、すでに成果の一端を論文として公表してきた。さらには、クローン、siRNA/shRNA、抗体、CAGE、M2HならびにY2H解析で横軸機関との、密接な協力をすすめ、学会発表を行い、論文発表の準備中である。これらの共同研究により産出されたデータは、横軸研究機関より、GNPデータベースに登録され、一般公開される。

2) 個別研究

独自に見出したエストロゲン、アンドロゲン、ステロイド応答遺伝子の新しい機能、疾患、診断・治療への応用における役割を明らかにした。エストロゲン、アンドロゲン、グルココルチコイド、ビタミンKの新しい標的因子ネットワークを明らかにした。

3) 動的ネットワーク解析技術開発研究への展開

本研究によるエストロゲンの転写レベルでの標的ネットワーク解析を基盤として、北野宏明博士を代表研究者とする研究課題「乳がん細胞の薬剤抵抗性に関するネットワークの動態解析」が採択され、数理解析とプロテオミクスを強化して研究が発展している。

4) 外部への成果の公表

論文発表ならびに学会発表を複数行った。*J Biol Chem*の内容は同誌のPaper of the Weekに選ばれ表紙を飾るとともに、朝日、毎日、読売各紙の記事となった。本研究に関して、縦軸機関の成果として、一般、マスコミ、研究者、産業界向けに2005年3月の第1回GNP公開シンポジウムならびに、2007年2月の第3回GNP公開シンポジウムにおいて発表した。また、新聞、専門誌でも記事として一般向けに取り上げられている。

【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

ChIP-chip 法で同定された AR 結合部位にアンドロゲン依存性の転写活性があり、ヒストン H3/H4 のアセチル化、RNA ポリメラーゼ II、SRC1/p160 ファミリーのコアアクチベータの結合性がホルモン刺激により亢進することを見出した。アンドロゲン受容体についての ChIP-chip 解析として世界初であり、ホルモン依存性癌におけるゲノムネットワークレベルでの転写制御の解明の第一歩となった研究として、GNP に貢献できた。また、ゲノム情報で得られる完全コンセンサスホルモン応答配列の機能は長らく不明であったが、本研究によりこれらの部位のなかに各種ステロイドホルモン受容体が実際に結合し、近傍に応答遺伝子がある実例を示した。さらにステロイドによるゲノムネットワークが多彩な機能を持つ分子群を制御しそれらがさらに別のネットワークに接続しうる好例を示した。特に、AR の全ゲノムレベルでのネットワーク解析が ChIP-chip 法、CAGE 法、マイクロアレイ法を三本柱として順調に進んでおり、ER における成果とあわせ、遺伝子の乏しい領域における転写制御や、アンチセンス RNA、ncRNA、miRNA などの新しい機能の解析が進んでいる。

b) 縦軸研究（又は横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

中核機関である理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター（研究代表者：林崎良英博士、課題名：ゲノム機能情報の集中的解析）には、アンドロゲンならびにエストロゲン応答に関わる定量 RT-PCR ならびに CAGE 解析を、ホルモン刺激前後の時系列 RNA サンプルを調整して依頼し、現時点ではアンドロゲンに関して結果を得て、機能解析が進んでいる。その一端を論文発表し、また学会発表を行っている。また、M2H のために本研究に関わる転写関連因子のリストを提供し、その結果を得て活用している。

東京大学・大学院新領域創成科学研究科（研究代表者：菅野純夫博士、課題名：ゲノムネットワーク解析に向けた cDNA クローンの整備）からは cDNA、同大学・分子細胞生物学研究所（研究代表者：秋山徹博士、研究課題名：ヒト全遺伝子レトロウイルス型 siRNA ライブラリの構築）からは siRNA/shRNA を理化学研究所を通じて供与され、GNP 実験に活用している。かずさ DNA 研究所（研究代表者：古閑比佐志博士、課題名：抗体を用いた転写因子複合体解析によるゲノムネットワークの解明）に、抗体作成を依頼し、既に得られた抗体を使って、ChIP 解析、蛋白質複合体解析あるいは臨床材料を用いた免疫組織化学解析を行っている。

一方、株式会社日立製作所・中央研究所（代表者：大友純博士、課題名：酵母ツーハイブリッド法による転写因子間の相互作用の解明と補助因子の検索・同定）に、転写に関わる因子約数十個の Y2H を依頼し、必要な全長 cDNA クローンを提供し、それらの結果ならびに既にゲノムネットワークのデータベースに公開された Y2H の情報から、本研究と関連して着目した相互作用をヒト培養細胞において確認し、研究を進めて、今年の学会でその成果を発表し、論文投稿予定である。

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター（研究代表者：白髭克彦博士、課題名：ゲノムタイリングアレイを用いたヒト転写レギュロームの解明）の分担研究者：油谷浩幸博士（東京大学・先端科学技術研究センター）と、アンドロゲン受容体の結合部位の全ゲノム上での網羅的探索について研究を進め、既に複数のサンプルを作製し、ChIP-chip 全ヒトゲノム分の結果を得、機能解析を行っている。そのうちゲノム 1%分の ENCODE の解析についてはすでに横軸-縦軸の共同論文として *Oncogene* 誌に発表となり、続報を投稿中である。

さらに、埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター（研究代表者：岡崎康司博士、脂肪・骨芽細胞分化ネットワークのクロストークと冗長性の解明）と縦軸機関同士の連携を行い、ゲノムインフォマティクスにおける共同研究から、本研究による共著の論文を複数公表した。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

前述のように、横軸研究機関より、以下のデータ、リソースを得ている。

1. ChIP-chip
2. 定量RT-PCR
3. CAGE
4. PPIデータ(Y2H,M2H)
5. cDNAクローンとsiRNA/shRNA
6. 抗体

【主な研究論文とその概要】

1. Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer Res* 65, 3700-3706, 2005.

エストロゲン受容体応答遺伝子の1つであるエストロゲン受容体結合フラグメント関連抗原9 (EBAG9)について、マウス腎癌モデルとヒト腎癌症例を用いた解析により、腎癌の腫瘍促進効果として作用し、予後予測因子となり得ることを明らかにした。EBAG9を安定発現させたマウス腎癌細胞 Renca においては、培養レベルで細胞増殖促進は起こらないものの、同種マウスである BALB/c マウスの皮下に移植すると EBAG9 安定発現 Renca 細胞はコントロール Renca 細胞に比較して大きな腫瘍を形成する。BALB/c マウスの腎臓被膜下へ移植した場合は、EBAG9 安定発現 Renca 細胞は同様にコントロールに比して大きな腫瘍を形成するが、BALB/c ノードマウスでは有意差がなかった。EBAG9 過剰発現の有無による Renca 細胞に対する細胞障害性 T 細胞の反応には差は生じないものの、腎臓被膜下移植において、EBAG9 過剰発現の腫瘍には CD8+ T 細胞の浸潤性が低下していた。78 例のヒト腎癌症例において、EBAG9 免疫染色性は予後増悪と有意な相関を示し、疾患特異的生存率に対して多因子相関解析において EBAG9 は P 値 0.0485 を示した。エストロゲン受容体経路から同定された標的因子が、細胞性免疫への働きかけにより、悪性腫瘍の進行をもたらす機構を明らかにした個別解析の1例として、GNP に貢献できた。

2. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S: Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 281, 16927-16934, 2006.

核内受容体ステロイドX受容体(SXR)の骨芽細胞系における新しい機能を明らかにした研究内容である。ヒト骨芽細胞様細胞MG63を用いたマイクロアレイ解析において、ビタミンK2とSXRリガンドのリファンピシンにより発現上昇する遺伝子として、small leucine rich repeatプロテオグリカンの1つであるツクシ(TSK)、コラーゲン結合分子のマトリリン-2、リンパ球系表面抗原として知られるCD14などが同定された。このうち、TSKについてはSXRを介するコラーゲン蓄積増加作用に関与することを、安定発現細胞やsiRNA を用いた実験により明らかにし、この作用がビタミンK2による骨質改善効果の一因である可能性が示された。従来知られてきたビタミンKの補酵素作用以外に骨への新しい作用が示された研究として、*J Biol Chem*誌の6月23日のPaper of the Weekとして表紙を飾り、新聞各紙でも取り上げられる社会的反響を呼び、研究成果を国民健康の関心事とした点で、大きな貢献ができた。

3. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU: TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916-921, 2007.

エストロゲン応答遺伝子Efp/TRIM25の新規基質として、蛋白質複合体解析から自然免疫においてRNAウイルス感染防御にかかわる因子RIG-Iを見出した。Efp、RIG-Iともインターフェロンに応答する。遺伝子改変動物における解析から、EfpはRNAウイルス感染防御に不可欠な役割を担い、その分子機構として、EfpがK63依存性のRIG-Iユビキチン化に関わるE3リガーゼとして働くことが解明された。すなわち、このホルモン・サイトカイン応答性の修飾機構が感染防御機構に不可欠な自己免疫に関わる新規メカニズムであることを明らかにした。

4. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S: Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* 26, 4453-4463, 2007.

横軸研究機関（東大先端研・油谷研究室、東京工業大学・白髭研究室）との共同研究により、前立腺癌LNCaP細胞を用いたアンドロゲン受容体(AR)結合部位についてのChIP-chip解析を行った。LNCaP細胞を合成アンドロゲンR1881(10 nM)にて24時間刺激し、AR抗体によるクロマチン免疫沈降したDNAとコントロールのinput DNAについて、ヒトゲノム全体の約1%にあたるENCODE領域のマイクロアレイを用いて解析した。P値 $1e^{-5}$ 以下のAR結合部位は10箇所同定され、その近傍にアンドロゲンにより発現誘導される遺伝子が8個同定された。その中には、ステロイド代謝や薬物解毒で作用する酵素UGT1Aや神経系や間葉系で発現する細胞接着分子のCDH2が含まれており、この2遺伝子については、今回ChIP-chipで同定されたAR結合部位にアンドロゲン依存性の転写活性があり、ヒストンH3/H4のアセチル化やRNAポリメラーゼIIやSRC1/p160ファミリーのコアクチベータの結合性がホルモン刺激により亢進することを見出した。アンドロゲン受容体についてのChIP-chip解析としては世界初であり、ホルモン依存性癌における転写・制御の解明の第一歩となった研究として、GNPに貢献できた。

5. Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, Inoue S: FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 388-393, 2008.

アンドロゲン受容体(AR)は、ホルモン依存性の転写因子として前立腺癌の進行に深く関わっており、AR標的遺伝子ネットワークの探究は、前立腺癌の病態解明の上で重要なテーマである。本論文では、クロマチン免疫沈降法を用いて、ARが結合するゲノム領域(ARBS)をクローニングすることにより、ARBS近傍に特にARの転写制御に作用する新規アンドロゲン標的遺伝子が存在するかの検討を行った。その結果、forkhead box (FOX)ファミリー転写因子の1つであるFOXP1遺伝子のイントロン領域に、機能的ARBSが同定され、FOXP1が前立腺癌細胞LNCaPにおいて、アンドロゲン依存性にmRNAおよび蛋白質発現が誘導されることを明らかにした。興味深いことに、FOXP1はARと直接結合しており、FOXP1がARの転写活性に抑制的に作用することを転写アッセイにより明らかにした。その一例として、前立腺癌の主要な腫瘍マーカーであり、アンドロゲン依存性発現を示すPSA遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域において、FOXP1が結合し、ARを介するアンドロゲン依存性のPSAの転写がFOXP1により抑制されることを明らかにした。さらに、横軸研究機関である理研林崎博士との共同研究によって、転写因子を中心とする2,000以上の遺伝子の発現を定量RT-PCR法にて解析したところ、LNCaP細胞において、複数のFOXファミリー遺伝子がアンドロゲンによって発現調節されていることを見出した。以上の結果より、前立腺癌細胞において、FOX遺伝子群がホルモン依存性にARの転写制御を受け、ARの転写活性の調節に関与することにより、腫瘍の病態にかかわる可能性が示唆された。理研林崎博士との共同研究である中規模定量RT-PCR法を用いた解析は、乳癌研究にも活かされ、学会発表を行い、論文投稿準備中である。

【特許出願数の実績】

協力機関との研究により、以下3件の関連した特許を出願中である。

1. 「子宮癌及び乳癌の予防乃至治療に好適な二本鎖核酸分子、癌細胞増殖抑制剤、並びに医薬」、特願 2007-162641、出願日：2007年6月20日、
2. 「前立腺癌及び膀胱癌の予防乃至治療に好適な二本鎖核酸分子、癌細胞増殖抑制剤、並びに医薬」、特願 2008-060757、出願日 2008年3月11日、井上聡・池田和博
3. 「子宮癌、乳癌、及び膀胱癌の予防乃至治療に好適な二本鎖核酸分子、癌細胞増殖抑制剤、並びに医薬」、PCT/JP2008/61346、出願日：2008年6月20日、井上聡・池田和博

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)	脳の時間的・空間的発現制御機構のシステム生物学 (Systems biology for temporary and spatial regulatory mechanism of expression in brain)					
代表研究者名 (所属機関・職名)	上田 泰己 (独立行政法人理化学研究所・チームリーダー)					
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
	37,000	44,000	44,000	44,000	31,000	200,000
	研究者名	所属機関・部局・職			専門分野	
研究組織	代表機関	☆上田 泰己	独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター チームリーダー		システムバイオロジー、機能ゲノミクス	
	分担機関	☆ (代表研究者)				
		(分担研究者)				
<p>【研究目的】</p> <p>本研究の目的は、多様な細胞が形成され高次の脳機能が発揮されるための基盤となる脳における時間的・空間的発現制御機構を、システムとして理解・制御・再構築することである。本研究の特徴は①定量的・包括的な遺伝子発現解析、②ゲノムワイドなプロモータデータベースを用いた脳における時間的・空間的発現調節機構の推定、③ハイスループットな発現制御機構の検証、からなる実験および計算の融合的アプローチである。複雑で動的な生命現象であるマウス脳の概日リズムをモデル系として解析し、脳における時間的・空間的・定量的な遺伝子発現データを取得し脳の一日の状態を理解する。さらに取得された発現データをゲノムインフォマティクスを用いて解析することで発現制御機構を推定し、推定された制御機構をハイスループット測定技術を用いて体系的に検証することで脳の一日の生成機構を解明することを目指す。</p>						

【課題の概要】

本研究では以下の課題を実施する。

(1) 脳50部位についてのゲノムワイドな遺伝子発現解析

脳の空間的発現制御機構を理解するためのプラットフォームデータとして、マイクロアレイを用いて、マウス脳50部位の発現プロファイルを獲得する。さらに、このデータを用いて脳の空間的発現制御機構の予測を試みる。さらに、発現プロファイルを用いて、脳部位特異的遺伝子の同定なども行う。

(2) 様々な時間スケールについてのゲノムワイドな遺伝子発現解析

時間特異的発現制御機構について、焦点を絞った解析を行う。脳内における発現制御は、数十分から数時間で遂行されるものから数ヶ月かけて完遂されるものまで多様である。本研究では、発現制御機構を時間軸の長さにより①数十分から数時間スケールの発現制御機構、②概日スケールの発現制御機構、③数ヶ月スケールの発現制御機構、の3つに分類し、各時間スケールに対応する生命現象をモデルにして、時間特異的発現制御機構の解析を行う。

(3) ハイスループットスクリーニング系を用いた、時間特異的発現制御機構の解析、および、時間特異的発現制御機構のダイナミクス解析

数万に及ぶゲノムスケールのライブラリーを一日でトランスフェクションできるハイスループットスクリーニング系を構築し、概日時計において朝 (E-box/E'-box)・昼 (D-box)・夜 (RRE) に遺伝子発現するために重要とされる配列を制御する遺伝子群を同定する。同定された遺伝子群の中で特に強く制御していると思われるものについてはあわせて分子生物学的、細胞生物学的な手法を用いて機能解析を行う。

【平成20年8月末までの研究成果】

(1) 脳50部位についてのゲノムワイドな遺伝子発現解析

これまでに確立した組織レベルでのゲノムワイドな発現解析手法を脳のゲノムワイドな発現解析へと拡張し、脳51部位について遺伝子発現データの取得が終了した（図1）。各部位は独立したn=2のサンプリングを行い、また、日周期による影響を取り除くため、4時間おきに6点で取得した部位を混合した。なお、これら51部位はゲノムワイドな発現解析へ進行するに先立ち、既知の研究で特異的発現が見出されている遺伝子を使ってQ-PCRによるサンプルの品質確認を行い、既知情報との一致が確認できたものである。その後、Affymetrix社のGeneChip（Mouse Genome MOE430 2.0）を用いたDNAマイクロアレイ解析により、51部位について包括的な転写産物の発現量を測定した。測定は各部位に対して独立にサンプリングした2サンプル（n=2）に対して行った。測定結果はAffymetrix社のGCOSソフトウェアで画像処理などのデータ処理を行った後、RMA（Robust Multichip Array）法を用いて約45,000プローブセットについての包括的な発現量（n=2）のデータを求めた。

さらに、取得した脳部位の発現データを用いて、脳部位特異的に発現が増加ないし減少している遺伝子の探索を行った。方法は、まず明らかに発現傾向の異なる3部位（Retina, Pituitary gland, Pineal）を除く48部位について、測定した発現量と、各部位が特異的に増加していることを示すパターン（特異性を調べたい部位は1、それ以外は0としたデータ列：プレート）との相関をプローブセットごとに求める方法（プレートマッチング法）で相関係数を求めた。次に、統計的手法を用いて相関係数のP-valueを計算し、そのFDR（False Discovery Rate）が0.05以下となったものを、脳部位特異的に発現の変動が見られたものとして抽出した。その結果、いずれかの脳部位で特異的に発現量が増加した（3,729種類）もしくは減少した（252種類）計3,981種類の転写配列を同定した（図1B）。

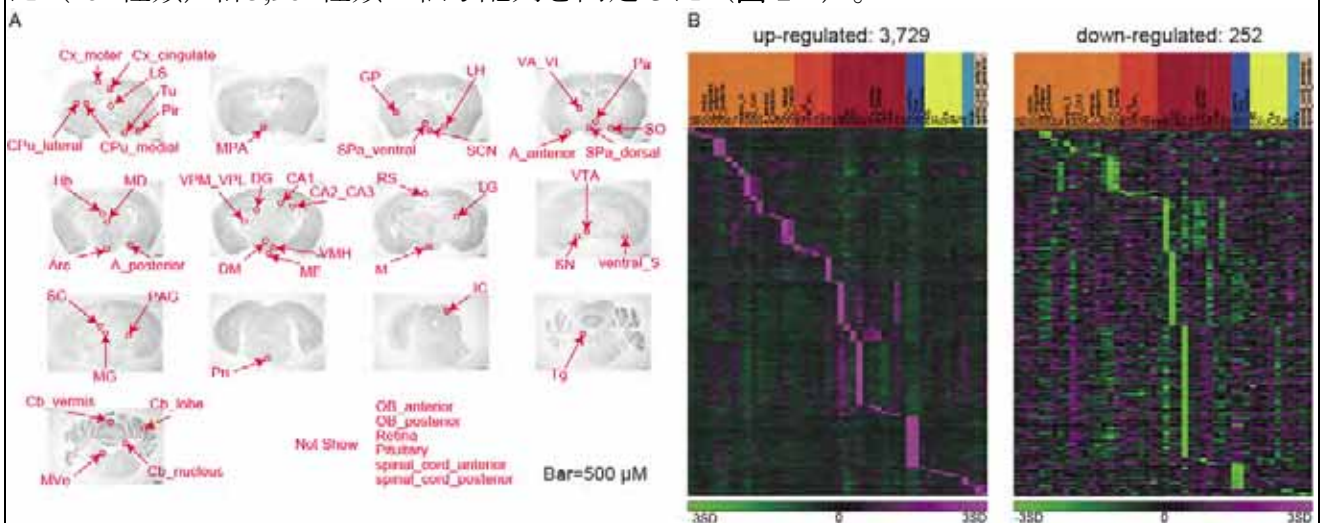


図1 脳51部位の発現解析（A: 取得した脳部位、B: 脳部位特異的遺伝子の発現量ヒートマップ）

(2) 様々な時間スケールについてのゲノムワイドな遺伝子発現解析

・数十分から数時間スケールの発現制御機構

数十分から数時間スケールの発現制御機構を明らかにするために、視交叉上核の光応答をモデル系とした解析を行った。主観的夜の前半（CT16）と主観的夜の後半（CT22）においてマウスに光照射（30分、400lux）を行い、光照射後30分、60分、120分、180分、240分後のマウスから摘出した視交叉上核（各点50匹）を精製しRNAの抽出を行った（n=2）。その後、Affymetrix社のGeneChipを用いたDNAマイクロアレイ解析により、光照射後の視交叉上核における包括的な転写産物の発現量を測定した。まず我々が取得したデータにおいて、既知の光応答遺伝子が既知情報通りの発現変動を示すことを確認した。サンプルの品質

を確認した上で、統計的手法を用いて解析したところ、285 個の光応答遺伝子を特定することができた。そのうち 240 遺伝子が光によって視交叉上核で発現上昇しており、また残り 45 遺伝子は光によって視交叉上核での発現が抑制されることがわかった。これらの発現パターンは Q-PCR 及び *in situ hybridization* 法によっても確認することができた。主観的夜の前半と後半で光に反応する遺伝子は基本的に同じであった。また視交叉上核で振動する遺伝子との関わりを調べたところ、50 遺伝子が視交叉上核で振動し、かつ光応答を示すものであった。そのうちの 45 遺伝子は光により発現が上昇するもので、5 遺伝子は発現が抑制されるものであった。

光によって視交叉上核において発現が上昇するものの中には、光に対して早く反応するものとゆっくりと反応するものがあるように思われた。そこで、我々が得た光応答遺伝子の発現データに対して PCA (principal components analysis) を行った結果、光に対して早く反応する遺伝子群 (early type) とゆっくりと反応する遺伝子群 (late type) の component を抽出することができた。early type を示すものは 56 遺伝子、late type を示すものは 47 遺伝子であった。我々は early type 遺伝子と late type 遺伝子は、それぞれ光の速さと強さを検出しているのではないかと考え、これを確かめるために長時間光照射実験を行った。その結果、early type 遺伝子は光が絶えず照射されているのにも関わらず一過性の発現上昇しか示さなかったのに対して、late type 遺伝子は高い発現を維持し続けた。これらの結果は、我々の仮説を支持するものである。現在、これらの知見についての論文を作成中である。

・数ヶ月スケールの発現制御機構

数ヶ月スケールの発現制御機構を明らかにするために、正中隆起・正中隆起部の光周性をモデル系とした解析を行った。光周性の研究はウズラをモデルとした研究が進んでいる。最近我々は、名古屋大学の吉村崇准教授らと共にウズラにおいて甲状腺刺激ホルモン (TSH) が長日条件下において発現してくる季節物質であることを見出した (Nakao et al., 2008, Nature)。まず、ウズラと同様のメカニズムが哺乳類においても保存されていることを確認するために短日条件下、長日条件下において CBA/N マウスを飼育し、正中隆起・正中隆起部における TSH β mRNA の発現を *in situ hybridization* 法によって確認した。その結果、マウスにおいても長日条件下では正中隆起・正中隆起部の TSH β mRNA の発現量が上昇していた。このことは遺伝子レベルにおいて、マウスにおいても光周性は保存されていることを示している。

定量的・包括的な遺伝子発現解析を行うために短日条件下、長日条件下で CBA/N マウスを飼育し、それぞれ 4 時間おきに 6 点、正中隆起・正中隆起部 (各点 25 匹, n=2) のサンプルを取得後、RNA を抽出した。サンプルの品質確認を行うために、短日と長日における TSH β mRNA の発現を Q-PCR を用いて確認した。その結果、長日条件下において TSH β mRNA の発現量が上昇していることが確認できた。また、時計遺伝子である *Per2*, *Bmal1* の mRNA の発現変動を Q-PCR で確認したところ、短日・長日条件においてきれいに正中隆起・正中隆起部で日周変動していることが確認できた。これらのサンプルを用いて、Affymetrix 社の GeneChip を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、短日条件下と長日条件下で発現が変動する遺伝子の包括的なデータを得ることができた。さらに短日条件下から長日条件に移した 1 日目 (light on の時刻を 8 時間前進) のサンプリングを行い、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、光に反応して正中隆起・正中隆起部ですぐに発現が上昇する遺伝子の包括的なデータを得ることができた。今後、これらのデータを *in situ hybridization* 法を用いて確認する予定である。