

(3) ハイスループットな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

本研究では、数万クローンを一日でトランスフェクションし、ゲノムスケールでのスクリーニングがハイスループットに可能なシステムを構築した。さらに、このシステムを利用し、概日時計における朝（E-box/E'-box）・昼（D-box）・夜（RRE）に発現するのに必要な配列、それぞれを三回繰り返した配列を持つルシフェラーゼ発現ベクターをレポーターとし、完全長cDNAライブラリーとしてヒト4,144クローン、マウス8,897クローンからなるMGC（Mammalian Gene Collection）ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。また、スクリーニング結果には擬陽性クローンが含まれると予想されるので過去に当研究チームで行ったSV40プロモーター制御下にあるルシフェラーゼをレポーターとしたスクリーニング結果との比較で擬陽性クローンを取り除いた。いずれのスクリーニングについても二度の試行結果の相関を計算したところ、十分信頼できる結果と判断した。さらに、本システムは完全長cDNAのみならず、siRNAのトランスフェクションにも適用可能である。我々は384ウェルプレートを用いたシステムでE-boxを標的とし、ヒトsiRNAライブラリーを用いたスクリーニングも試験的に行った。二度の試行結果の相関は、cDNAを用いた場合と同様の結果だったことから、系が確立できたと思われる。

一方で、384ウェルプレートを用いたシステムでのアッセイ方法は、トランスフェクション効率を考慮したものではない。そこで二次スクリーニングとして擬陽性クローンを除いたクローンのうち、ルシフェラーゼ活性を強く制御したクローンに対しレニーラルシフェラーゼを用いて内部補正し、さらに96ウェルプレートを用いることでより精度の高い結果を得た。この結果からE-box, D-box, RREによる発現を強く制御した遺伝子を選別した。また当研究チームでは、光電子増倍管（PMT）を用いることで転写ダイナミクスを測定する系を確立しており、時計遺伝子プロモーター制御下のレポーターを用いることで、概日時計のリズムをモニターすることが可能である。我々はこのシステムを用いることで、哺乳類概日時計においては朝配列を介した転写の抑制が必須であることを明らかにした（*Nature Genetics*, Sato et al, 2006）。

そこで、今回のハイスループットスクリーニングで得られてきた制御因子候補について強い抑制効果を示した遺伝子の過剰発現による影響を、PMTを用いて検証した。E-box, RREでは概日時計のリズムが消失するものや、本来の周期よりも長い周期で振動するという表現型が認められた。一方でD-boxについてはリズムの周期に大きく影響を及ぼすものではなく、振幅が低下するという弱い影響しか示さなかった。この結果は概日時計の制御因子はE-boxすなわち朝配列に多く存在していることを示唆している。

【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

転写・制御機構の解明という観点に対して、本研究は、非常に複雑な脳という部位の空間的および時間的な発現制御機構の解明を目指したものである。平成20年度末までに、空間的な発現制御機構の解析として、脳50部位の発現プロファイルの獲得、部位特異的遺伝子の同定、脳の空間特異的な制御配列の予測結果が、時間的な発現制御機構の解析として、光応答や光周性といった生命現象についての時系列発現プロファイルの獲得、刺激に反応する遺伝子の同定、これらの時間特異的な制御配列の予測結果が得られる予定である。また、cDNAおよびRNAiを用いたハイスループットなスクリーニング及びダイナミクス解析によって一日を制御する転写回路が明らかになる予定である。

b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果 本研究では50脳部位の遺伝子発現プロファイル、光応答や光周性に関する時系列の遺伝子発現プロファイルを取得する。これらのデータや発現プロファイルデータからの解析により得られた脳部位特異的発現遺伝子リスト、時間特異的遺伝子といったデータはゲノムネットワークプラットフォームへの提供が可能である。また、本研究で構築したハイスループットスクリーニング技術は現在世界的に見てもトップレベルであり（384ウェルプレート、CV～10%）、さらなる低コスト化、ハイスループット化が可能な1536ウェルプレートを用いた細胞スクリーニングシステムにむけてこの系への発展も目指している。このようなハイスループットスクリーニングシステムは、転写のネットワークだけでなく、さまざまな素過程（翻訳・分解・修飾）のスクリーニングへも応用できるため、ゲノムネットワークプロジェクトのコア技術の一つとしてゲノムネットワークに貢献できると期待される。
【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】 なし。
【主な研究論文とその概要】 1. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function, Trey K. Sato, Rikuhiko G. Yamada, Hideki Ukai, Julie E. Baggs, Loren J. Miraglia, Tetsuya J. Kobayashi, David K. Welsh, Steve A. Kay, <u>Hiroki R. Ueda</u>* and John B. Hogenesch*, Nature Genetics, 38, 312-319, 2006. *corresponding authors Direct evidence for the requirement of transcriptional feedback repression in circadian clock function has been elusive. Here, we developed a molecular genetic screen in mammalian cells to identify mutants of the circadian transcriptional activators CLOCK and BMAL1, which were uncoupled from CRYPTOCHROME (CRY)-mediated transcriptional repression. Notably, mutations in the PER-ARNT-SIM domain of CLOCK and the C terminus of BMAL1 resulted in synergistic insensitivity through reduced physical interactions with CRY. Coexpression of these mutant proteins in cultured fibroblasts caused arrhythmic phenotypes in population and single-cell assays. These data demonstrate that CRY-mediated repression of the CLOCK/BMAL1 complex activity is required for maintenance of circadian rhythmicity and provide formal proof that transcriptional feedback is required for mammalian clock function. 2. Detection of a circadian enhancer in the mDbp promoter using prokaryotic transposon vector based strategy, Yota B Kiyohara, Keigo Nishii, Maki Ukai-Tadenuma, <u>Hiroki R Ueda</u>, Yasuo Uchiyama, Kazuhiro Yagita, Nucleic Acids Res., 36, e23, 2008. In mammals, the expression of 5-10% of genes occurs with circadian fluctuation in various organs and tissues. This cyclic transcription is thought to be directly or indirectly regulated through circadian transcriptional/translational feedback loops consisting of a set of clock genes. Among the clock genes in mammals, expression of the Dbp mRNA robustly oscillates both in vivo and in culture cells. Here, we present circadian enhancer detection strategy using prokaryotic transposon system. The mDbp promoter drives reporter gene expression in robust circadian cycles in rat-1 fibroblasts. To identify the circadian enhancer generating this robust rhythm, we developed a prokaryotic transposon-based enhancer detecting vector for in vitro transposition. Using this system, we identified a strong circadian enhancer region containing the CATGTG sequence in the 5' flanking region of the mDbp gene; this enhancer region is critical for the ability of the mDbp promoter to drive robust oscillation in living cells. This enhancer is classified as a CANNTG type non-canonical E-box. These

findings strongly suggest that CANNTG-type non-canonical E-boxes may contribute, at least in part, to the regulation of robust circadian gene expression. Furthermore, these data may help explain the wider effects of the CLOCK/BMAL1 complex in control of clock output genes.

3. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response, Nobuhiro Nakao, Hiroko Ono, Takashi Yamamura, Tsubasa Anraku, Tsuyoshi Takagi, Kumiko Higashi, Shinobu Yasuo, Yasuhiro Katou, Saburo Kageyama, Yumiko Uno, Takeya Kasukawa, Masayuki Iigo, Peter J. Sharp, Atsushi Iwasawa, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Teruyuki Niimi, Makoto Mizutani, Takao Namikawa, Shizufumi Ebihara, Hiroki R. Ueda, Takeshi Yoshimura, **Nature**, 452, 317-322, 2008.

Molecular mechanisms regulating animal seasonal breeding in response to changing photoperiod are not well understood. Rapid induction of gene expression of thyroid-hormone-activating enzyme (type 2 deiodinase, DIO2) in the mediobasal hypothalamus (MBH) of the Japanese quail (*Coturnix japonica*) is the earliest event yet recorded in the photoperiodic signal transduction pathway. Here we show cascades of gene expression in the quail MBH associated with the initiation of photoinduced secretion of luteinizing hormone. We identified two waves of gene expression. The first was initiated about 14 h after dawn of the first long day and included increased thyrotrophin (TSH) beta-subunit expression in the pars tuberalis; the second occurred approximately 4 h later and included increased expression of DIO2. Intracerebroventricular (ICV) administration of TSH to short-day quail stimulated gonadal growth and expression of DIO2 which was shown to be mediated through a TSH receptor-cyclic AMP (cAMP) signalling pathway. Increased TSH in the pars tuberalis therefore seems to trigger long-day photoinduced seasonal breeding.

4. Analysis and Synthesis of High-amplitude Cis-elements in the Mammalian Circadian Clock, Yuichi Kumaki, Maki Ukai-Tadenuma, Ken-ichiro D. Uno, Junko Nishio, Koh-hei Masumoto, Mamoru Nagano, Takashi Komori Yasufumi Shigeyoshi, John B. Hogenesch, Hiroki R. Ueda, **PNAS**, 2008. (in press)

Mammalian circadian clocks utilize regulatory loops mediated by Clock/Bmal1-binding elements (E-boxes), DBP/E4BP4 binding elements (D-boxes) and RevErbA/ROR binding elements (RREs). As a step towards system-level understanding of the dynamic transcriptional regulation of the oscillator, we constructed and utilized a mammalian promoter/enhancer database with computational models of the E-box, D-box, and RRE to predict new targets of the clock, and subsequently validated these targets at the level of the cell and organism. We further demonstrated the predictive nature of these models by generating and testing synthetic regulatory elements that do not occur in nature and showed that these elements produced high-amplitude circadian gene regulation. Biochemical experiments to characterize these synthetic elements revealed the importance of the affinity balance between trans-activators and trans-repressors in generating high-amplitude circadian transcriptional output. These results highlight the power of comparative genomics approaches for system-level identification and knowledge-based design of dynamic regulatory circuits.

【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) 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)	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 (Investigation of Cross Talk and Redundancy in the Differentiation Network of Fat Cell and Osteoblasts)					
代表研究者名 (所属機関・職名)	岡崎 康司 (学校法人埼玉医科大学・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
	37,000	35,000	28,000	33,000	29,000	162,000

	研究者名	所属機関・部局・職	専門分野
研究 組 織 図	代表機関		
	☆ 岡崎 康司	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター 所長・教授	ゲノム科学
	(分担研究者)		
	分担機関		
	☆ (代表研究者)		
	(分担研究者)		

【研究目的】

骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を有する間葉系幹細胞を用い、脂肪細胞分化と骨芽細胞分化に関する転写制御系ネットワークを明らかにして両者のクロストークを見出す。特に各方向への分化時の遺伝子制御ネットワークのハブとなる因子とそのネットワーク周辺を詳細かつ正確に解析し、脂質代謝及び骨代謝を制御する創薬ターゲットを発見することによって、骨粗鬆症やメタボリックシンドロームの治療に結びつける事を目的とする（図1）。

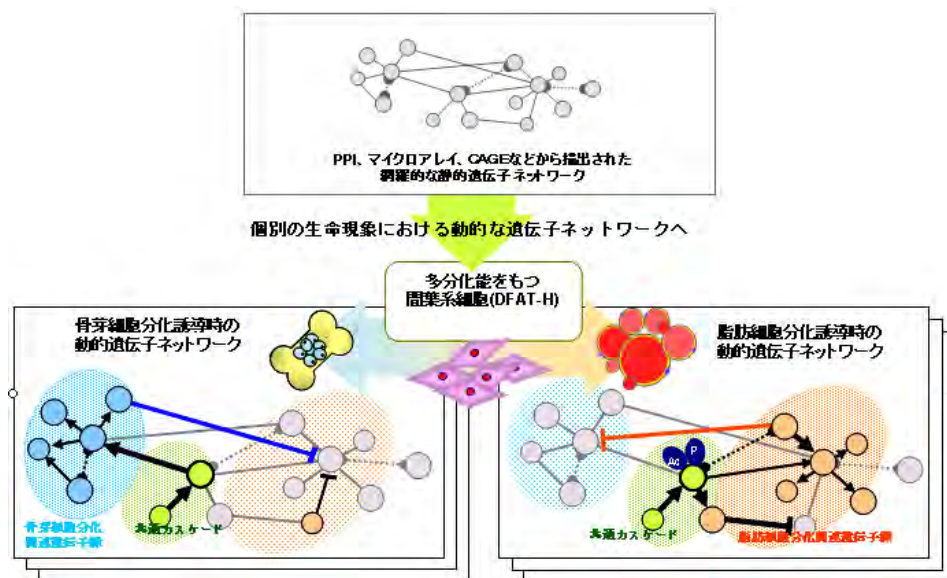


図1 網羅的遺伝子ネットワークから個別の生命現象における動的ネットワークへ