

【課題の概要】

1. 脂肪、骨芽細胞分化サンプルより得られる遺伝子発現データを解析して、両方向への分化に関する重要な転写制御関係を見出しながら、個々の因子について個体レベルでの生化学的試験も含めた詳細な解析を行った。両方向の分化に関与する遺伝子を、分化誘導初期応答遺伝子とバイオインフォマティクスの統合解析、比較ゲノムによる解析、CAGE解析、発現パターン解析などを駆使して、多角的な観点から解析した。横軸機関より得られたデータと遺伝子発現データの解析により系統的に検索された、両方向への分化に重要な関わりが示された転写因子について、分子生物学的、生化学的な解析を詳細に行った。特に転写因子の一つであるId4については、ノックアウト解析により脂肪、骨芽細胞分化に対して重要な働きを持つことを明らかにした。
2. PPAR γ が結合して転写調節を行う可能性のある領域を、バイオインフォマティクス解析で予測すると共に、PPAR γ 抗体によるプロモーターアレイ、タイリングアレイ解析を行って検索した。これらの解析から得られた候補遺伝子上流のプロモーター活性をハイスループットな実験系を用いて効率よく検定し、その一部については詳細な分子生物学的検証実験により確認した。特に、Tysnd1 遺伝子がペルオキシソーム内において重要な機能を持つことを明らかにした。また ERR α が PPAR γ の制御を受けながら脂肪細胞分化を調節する役割があることを見出した。
3. 脂肪、骨芽細胞分化時に重要な働きを持つマイクロ RNA を探索し、その脂肪分化、骨芽細胞分化に及ぼす役割を解析した。

【平成20年8月末までの研究成果】

下記1)、2)について研究活動を推進し、成果を得た。

1) 脂肪・骨芽細胞のクロストークに関わるグローバルネットワークの解明

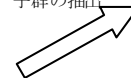
i) ST2細胞において脂肪及び骨芽細胞分化時に発現する遺伝子の網羅的解析

マウス ST2 細胞を脂肪、骨芽細胞に分化させたサンプルの GeneChip 解析データを元に、両方向への分化に伴って発現が変動する遺伝子群を抽出した。また、脂肪・骨芽細胞分化ネットワークのクロストークおよび冗長性に関わる遺伝子群を探索するために、脂肪細胞、骨芽細胞分化によって特徴的な発現変動を示す遺伝子群を抽出した(図2)。脂肪及び骨芽細胞分化に関わる因子の一つである Dlx5 の発現パターンと正相関する因子(112 遺伝子)あるいは逆相関する因子(147 遺伝子)を発現パターンマッチングにより抽出した(図2)。



脂肪及び骨芽細胞分化に関わる代表例として Dlx5 を指標とした。

正相関する遺伝子群の抽出



逆相関する遺伝子群の抽出

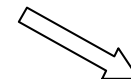


図2 脂肪細胞、骨芽細胞分化によって特徴的な発現変動を示す遺伝子の例

ii) Id4遺伝子の機能解析

脂肪及び骨芽細胞分化時における GeneChip データと、理研、日立製作所、慶應大学による PPI データを統合することによって、両方向の分化のクロストークを制御している候補因子 Id4 を発見することができた(国内特許出願済み 特願 2007-022359)。Id4 は、

【平成20年8月末までの研究成果（続き）】

脂肪、骨芽細胞分化によって特徴的な発現変動を示す遺伝子群に含まれる転写因子の一つであり、両方向への分化において重要な役割を持っていることを、ノックアウトマウスの解析やRNAiの実験系などを利用して実際に証明した（図3）。

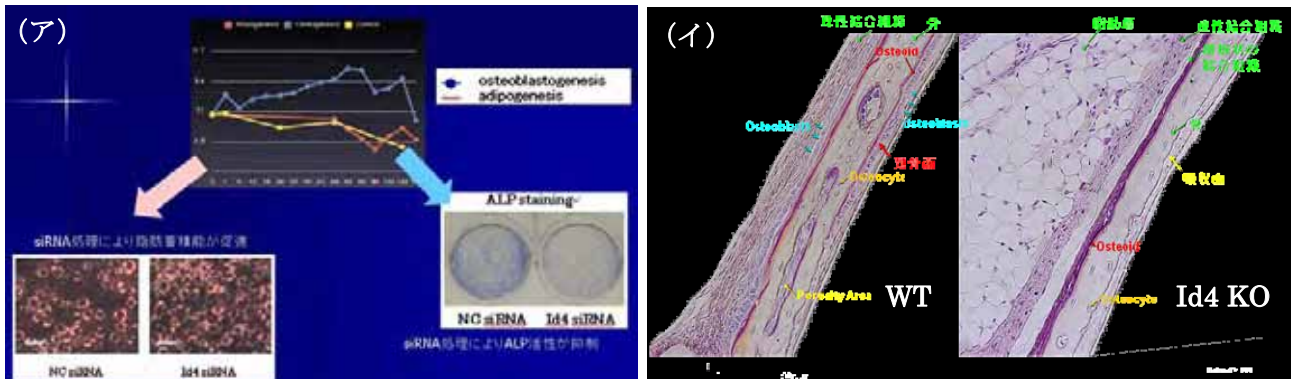


図3 (ア) ST2にId4のsiRNAを導入すると脂肪分化が亢進し、骨芽細胞分化が抑制された。(イ) Id4 ノックアウトマウス頭頂骨の断面図。Id4 ノックアウトマウスでは脂肪細胞が著しく増加し、骨芽細胞が著しく減少していた。(ウ) Id4 KOマウスの腰椎。Id4 ノックアウトマウス(Id4 KO)では骨量が著しく減少していた。

iii) 比較ゲノムを用いた脂肪、骨芽細胞ネットワーク解析

他の生物種で脂肪蓄積に影響を及ぼす事が報告されている遺伝子群を比較ゲノム解析し、それらの遺伝子が哺乳動物(マウス)でも脂肪、骨芽細胞分化に大きな関連性を持つ事を見出した。(図4)。

図4 (ア) 線虫との比較ゲノム解析により明らかになった脂肪分化関連遺伝子探索とその機能解析結果の例。(イ) 本解析により明らかになった脂肪、骨芽細胞分化ネットワークの描出例



iv) BMP初期応答遺伝子の探索

GeneChipによる網羅的発現データから、脂肪、骨芽細胞分化を制御している転写因子の役割を新たに発見した。特に本研究では、GeneChip解析データとBMP応答配列予測データを新たに統合して、BMP刺激による骨芽細胞分化時のごく初期段階のシグナリングにかかわる遺伝子を網羅的にスクリーニングした(図5)。

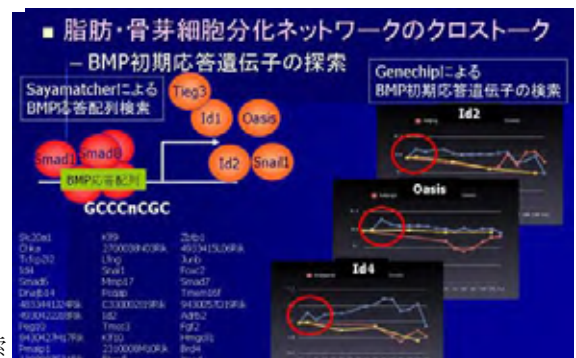


図5 BMP初期応答遺伝子の探索

【平成20年8月末までの研究成果（続き）】

v) 脂肪、骨芽細胞分化に関与するマイクロRNAの探索

脂肪、骨芽細胞分化に伴うマイクロRNA発現変動を網羅的に解析し、このデータを元に、両方向への分化に影響を及ぼすマイクロRNAとして、miR-125bの重要性を新たに発見した（図6）（国内特許出願済み 特願2007-020893）。

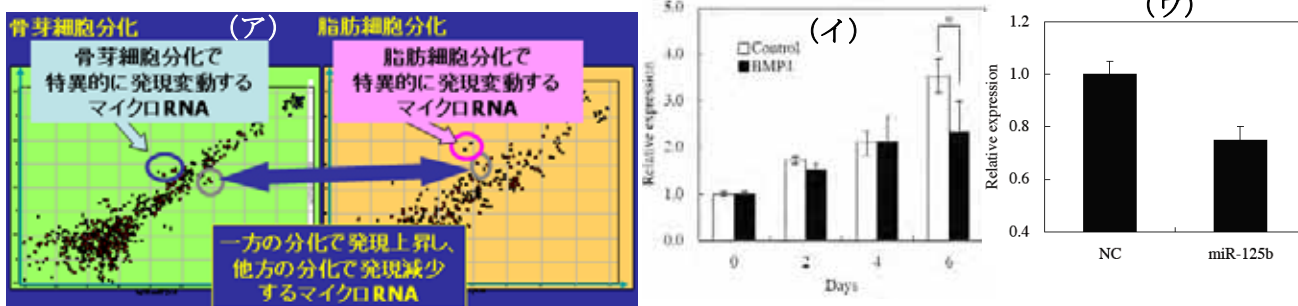


図6 (ア) マイクロRNA発現アレイを用いた脂肪、骨芽細胞分化で発現変動するマイクロRNAの探索。(イ) マウスST2細胞における骨芽細胞分化時の内在性miR-125b発現量の経時変化(Days)。分化誘導(BMP4)、未分化培養(control)共にmiR-125bの発現量が増加していくが、分化誘導時には発現量増加の度合いが小さいことが確認された。(ウ) miR-125b導入による骨芽細胞分化能への影響。Osteocalcin発現量の定量により、骨芽細胞分化能が抑制されることが分かった。

2) 脂肪及び骨芽細胞分化におけるコアネットワーク解析

i) 横軸データの統合によるPPAR γ ネットワークの描出

PPAR γ と関連性の高い遺伝子群を、各横軸機関より産生されたPPIデータ、リアルタイムRT-PCRデータ、CAGEデータ、我々が産出した比較ゲノムデータ、転写因子結合配列予測データを統合することにより抽出した（図7）。

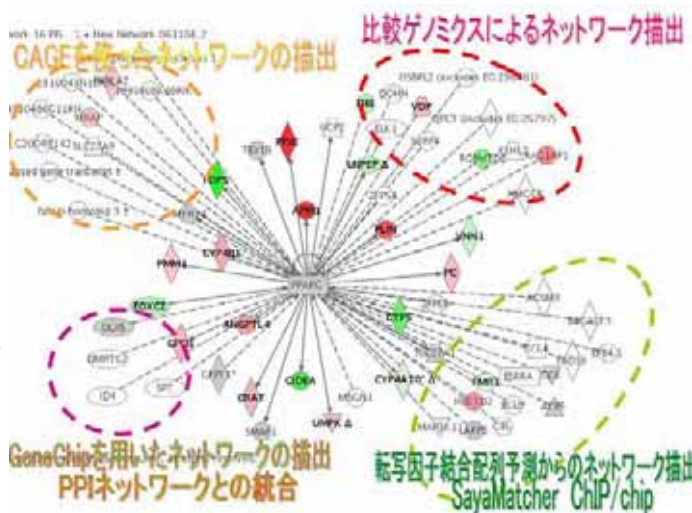


図7 本研究によって新たに描出されたPPAR γ ネットワークの例

ii) Tysnd1遺伝子の機能解析

PPAR γ ネットワークに含まれる遺伝子の中で、特にTysnd1がペルオキシソームにおいて脂肪酸 β 酸化酵素のプロセッシングに重要な機能を持つことを新たに解明した（図8）。

iii) ERR α 遺伝子の機能解析

転写因子結合配列予測データより、ERR α 遺伝子がPPAR γ の標的遺伝子として挙がってきた。そこで本遺伝子について、ゲルシフトアッセイやsiRNA実験などの詳細な解析を行い、脂肪細胞分化時にPPAR γ 標的遺伝子として重要な機能を持つことを明らかにした（図9）（国内・国際特許出願済み PCT/JP2006/312085）。

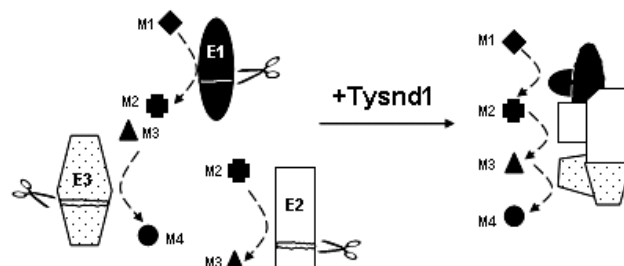


図8 Tysnd1の機能