

【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）。

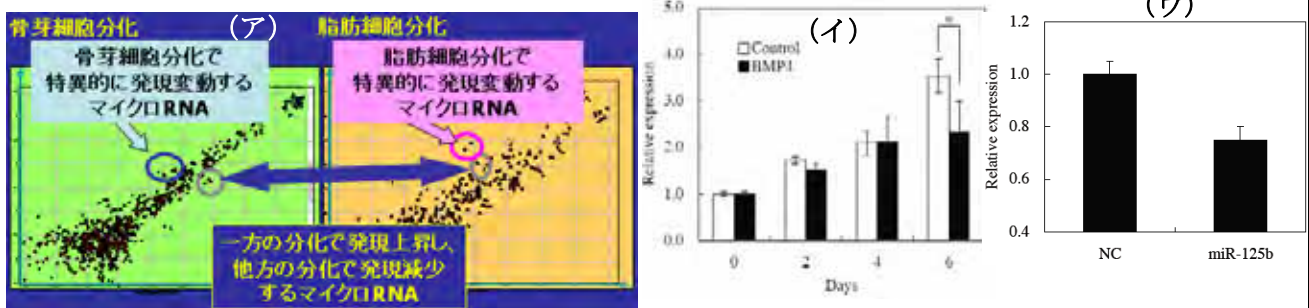


図6 (ア) マイクロRNA発現アレイを用いた脂肪、骨芽細胞分化で発現変動するマイクロRNAの探索。(イ) マウスST2細胞における骨芽細胞分化時の内在性miR-125b発現量の経時変化(Days)。分化誘導(BMP4)、未分化培養(control)共にmiR-125bの発現量が増加していくが、分化誘導時には発現量増加の度合いが小さいことが確認された。(ウ) miR-125b導入による骨芽細胞分化能への影響。Osteocalcin発現量の定量により、骨芽細胞分化能が抑制されることが分かった。

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）。

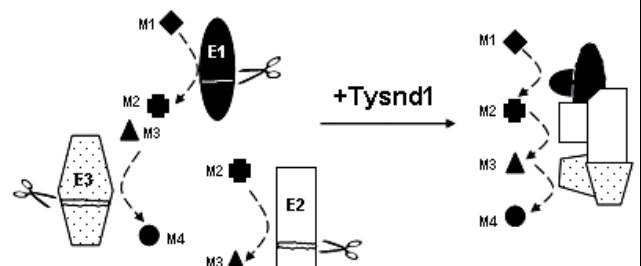


図8 Tysnd1の機能

【平成20年8月末までの研究成果（続き）】

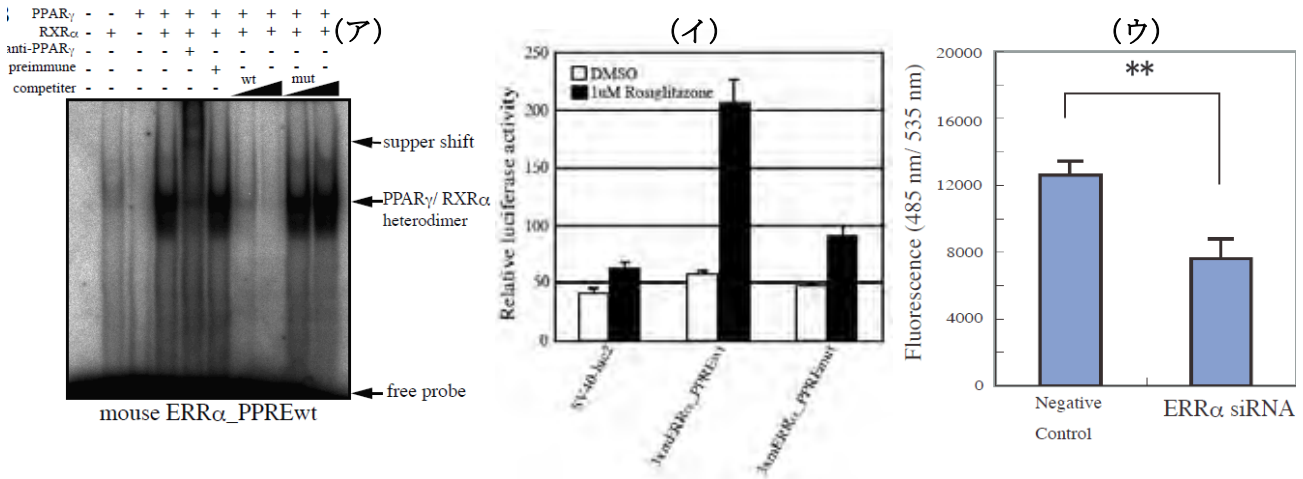


図9 (ア) ERR α 第1イントロン内に存在するPPAR γ 応答配列へのPPAR γ の結合、(イ) レポーターアッセイを用いたERR α PPREの転写活性能の検討 (ウ) ERR α をsiRNAで抑制した時の細胞内中性脂肪蓄積量の減少

iv) PPAR γ 結合配列の網羅的解析実験

PPAR γ が実際に結合しているDNA領域をChIP法により取得し、その結合領域をChIP on Chip法により網羅的に解析した (図10)。

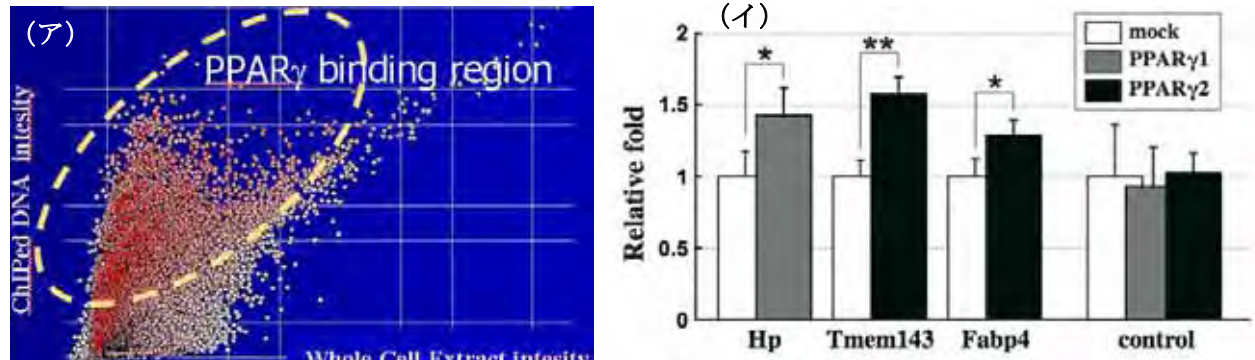


図10 (ア) PPAR γ による ChIP on Chip の解析例。(イ) 本解析より探索された PPAR γ により制御される遺伝子のレポーター検証実験。

【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

脂肪、骨芽細胞分化に関連の深い転写因子について、結合する可能性の高いDNA領域を網羅的に検索した (図11-ア)。得られたデータを、横軸データであるCAGEデータや、

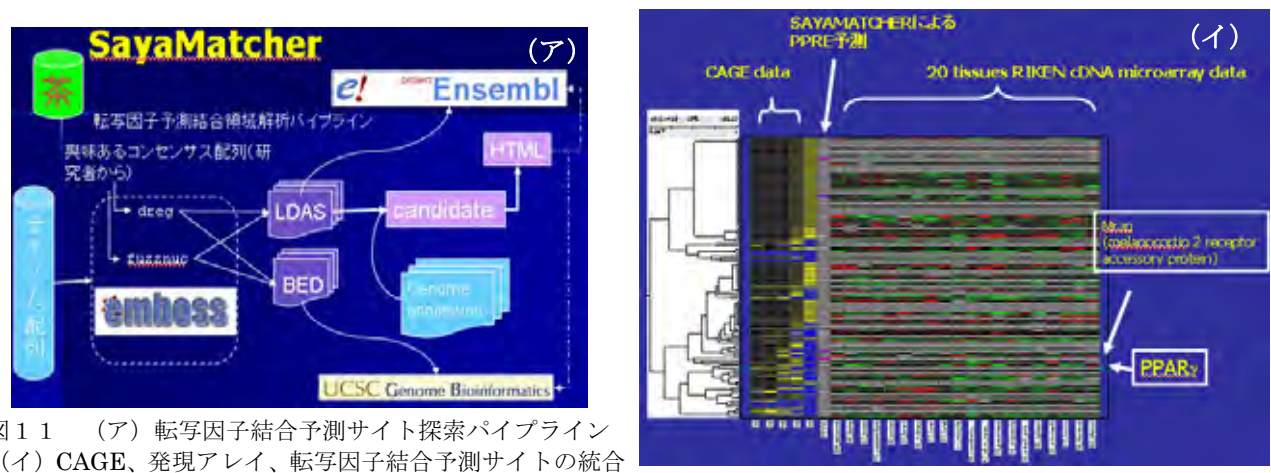


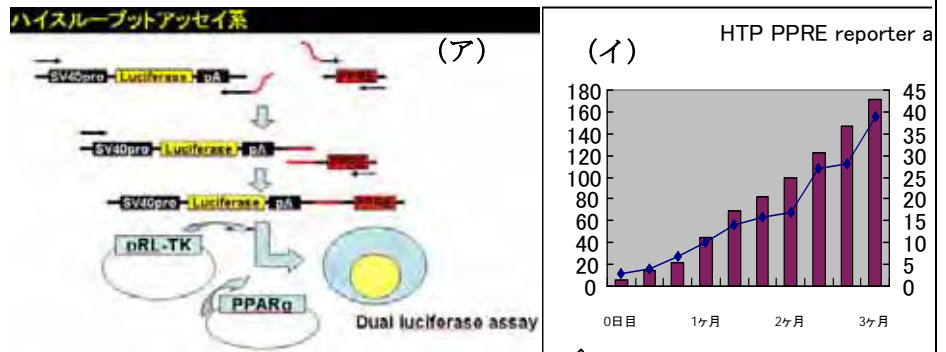
図11 (ア) 転写因子結合予測サイト探索パイプライン (イ) CAGE、発現アレイ、転写因子結合予測サイトの統合

【GNPとの関連・GNPへの貢献（続き）】

発現アレイのデータと重ね合わせて、統合的ゲノムネットワーク解析の基盤を構築した(図11-イ)。

脂肪、骨芽細胞分化に関連の深い転写因子結合DNA領域が統合的ネットワーク解析により大量に予測された。実際にこれらの配列が遺伝子の発現を調節しているかどうかを調べるためには、ハイスループットな解析手法が必要であった。そこで、脂肪細胞分化に必須の核内受容体転写因子PPAR γ の応答配列(PPAR γ response element: PPRE)をモデルに2段階PCR法を利用したハイスループットレポーターアッセイの実験系を確立し、検証した。この結果、PPAR γ に実際に調節を受けて発現変動する遺伝子を多数見いだした(図12)。

図12 PPAR γ によって発現調節される遺伝子のハイスループットな探索。(ア)ハイスループットアッセイ系の手順。(イ)アッセイ数のグラフ。棒グラフは累積解析数(Y軸左を参照)、折れ線グラフはポジティブであった解析数(Y軸右を参照)。



b) 縦軸研究 (又は横軸研究) への貢献に繋がる研究成果
網羅的発現データの取得とその解析

PPAR γ 抗体を用いたタイリングアレイ解析の準備を行った。まず、脂肪細胞分化では2日目と6日目、骨芽細胞分化で3日目でPPAR γ の発現が上昇し、サンプリングポイントとして適切であることを確認した(図13-ア)。また、ChIP実験によりPPAR γ 結合部位を持つFabp4の上流域が濃縮されていることが確認された(図13-イ)。これらのサンプルをプロモーターアレイ解析したところ、ポジティブコントロールであるFabp4とAdipoqの両遺伝子において、PPAR γ が結合していると判断できる結果を得ることができた(図13-ウ)。このサンプルをタイリングアレイ解析に用いることで、より高精細なデータを取得することが可能になることが分かった。現在、PPAR γ 抗体と同様に、骨芽細胞分化時のキー転写因子の一つであるRunx2の抗体を用いたタイリングアレイについても検討を行っているところである。

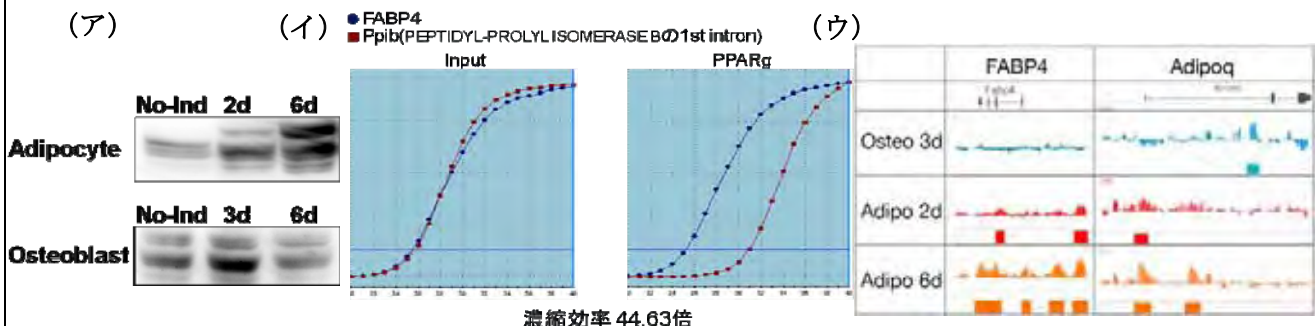


図13 (ア) PPAR γ タイリングアレイの条件検討。各タイムポイントにおけるPPAR γ のタンパクレベルでの発現量。脂肪細胞分化では2日目、6日目、骨芽細胞分化では3日目における発現量が多いことが確認された。(イ) PPAR γ を用いたChIPにより、PPAR γ が上流域に結合することが既に報告されている遺伝子Fabp4上流域が濃縮されていることが確認された。(ウ) プロモーターアレイ解析の結果。タイリングアレイ解析の前段階として、ゲノム中のプローブ密度が低いプロモーターアレイを用いて、テスト解析を行った。その結果、既知のPPAR γ 標的遺伝子であるFabp4とAdipoqのゲノム領域にPPAR γ が実際に結合していることが確認された。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

横軸機関による研究データ・リソース

1. CAGEデータ (理化学研究所) : 脂肪、骨芽細胞分化時の合計6ポイントをサンプルとしてCAGE解析を行ったデータを活用した。
2. PPIデータ (理化学研究所、日立製作所、慶應義塾大学) : 脂肪、骨芽細胞分化に関与する遺伝子と関連性が指摘されるPPIデータを活用した。
3. qPCRデータ (理化学研究所) : 脂肪、骨芽細胞分化時に発現が変動する主要転写因子についての発現変動解析データを活用した。
4. 抗体 (かずさDNA研究所) : 脂肪、骨芽細胞分化時にキーとなる既知転写因子についての抗体を活用した。
5. 新規PPI情報発掘データ (国立遺伝学研究所) : 骨芽細胞分化時のシグナル伝達パスウェイとPPIデータとの比較整理を行ったデータを活用した。
6. タイリングアレイデータ (東京大学先端科学技術研究センター) : 脂肪、骨芽細胞分化時のサンプルを用いてPPAR γ 抗体を用いたタイリングアレイデータを活用した。また、Runx2抗体を用いたデータを今後さらに活用する予定である。

本縦軸プロジェクトにより産出した研究データ・リソース

1. mRNA発現アレイデータ (Affymetrix, Agilent) : 脂肪、骨芽細胞分化時の詳細な経時サンプルを用いて、遺伝子発現パターン情報を網羅的に取得し、ネットワーク解析に活用した。
2. マイクロRNA発現アレイデータ (Ambion, Agilent) : 脂肪、骨芽細胞分化時の経時サンプルを用いて、マイクロRNAの発現パターン情報を網羅的に取得し、遺伝子制御の解析に活用した。
3. ChIP-on-Chipデータ : 脂肪細胞分化時のサンプルを用いてPPAR γ 抗体を用いたプロモーターアレイデータを活用した。
4. 転写因子結合サイト予測データ : 既知の脂肪、骨芽細胞関連転写因子のDNA結合配列を全ゲノムにわたって網羅的に探索したデータを活用した。
5. ハイスループットレポーターアッセイデータ : 転写因子による転写活性調節の検証を効率よく行うための実験系を確立し、そこから得られた大規模なデータを活用した。

【主な研究論文とその概要】

1. Mizuno Y, Kurochkin IV, Herberth M, Okazaki Y and Schönbach C. Predicted Mouse Peroxisome-targeted Proteins and their Actual Subcellular Locations. APBioNet InCoB2008 BMC Bioinformatics supplement. in press (2008).
2. Nakachi Y, Yagi K, Nikaido I, Bono H, Tonouchi M, Schönbach C, Okazaki Y. Identification of novel PPAR γ target genes by integrated analysis of ChIP-on-chip and microarray expression data during adipocyte differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 372, 362-366 (2008).
3. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 368, 267-272 (2008).

4. Yamamoto K, Ninomiya Y, Iseki M, Nakachi Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Yamanoue Y, Itoh T, Nishii Y, Petrovsky N, Okazaki Y. 4-Hydroxydocosahexaenoic acid, a potent peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist alleviates the symptoms of DSS-induced colitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 367, 566-572 (2008).
5. Yagi K, Nikaido I, Mizuno Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Schönbach C, Okazaki Y. Identification of evolutionally conserved fat regulatory genes using comparative genomic approach. in revision (2008).
6. Tokuzawa Y, Yagi K, Bono H, Arai S, Mizuno Y, Ninomiya Y, Suda T, Okazaki Y and Kurokawa R. ERR α is regulated by PPAR γ through conserved PPRE in ERR α intron 1 during adipogenesis, in revision (2007).
7. Yagi K, Mizuno Y, Nikaido I, Fukuda T, Katagiri T, Tokuzawa Y, Arai S, Ninomiya Y, Yabe-Anan T, Kano K, Kurokawa R, Suda T and Okazaki Y. Id4 is a key factor that controls cross-talk between adipogenesis and osteoblastogenesis. in revision (2007).
8. Arai S, Matsushita A, Du K, Yagi K, Okazaki Y, Kurokawa R. Novel homeodomain-interacting protein kinase family member, HIPK4, phosphorylates human p53 at serine 9. *FEBS Letters.* 581, 5649-5657 (2007).
9. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, Inoue S. Estrogen-related receptor modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res. Commun.* 358, 813-8 (2007).
10. Kurochkin IV, Mizuno Y, Konagaya A, Sakaki Y, Schönbach C, Okazaki Y. Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in β -oxidation of fatty acids. *The EMBO J.* 26, 835-845 (2007).
11. Horie-Inoue K, Takayama K, Bono H, Ouchi Y, Okazaki Y, Inoue S. Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 339, 99-106. (2006).
12. Bono H. SayaMatcher : Genome scale organization and systematic analysis of nuclear receptor response elements. *Gene*, 364, 74-78 (2005).
13. Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K.A. Novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 967-974 (2004).

【特許出願数の実績】

1. Kurochkin IV, Schönbach C, Okazaki Y. A pharmaceutical composition for treating and disorder associated with peroxisomal biogenesis. PCT/JP2006/312085 (2006/06/09) .
2. 岡崎康司、八木研、水野洋介. 骨粗鬆症の予測分析方法、並びに骨粗鬆症の治療剤及びそのスクリーニング方法. 特願2007-022359 (2007/01/31) .
3. 岡崎康司、水野洋介、八木研. 間葉系細胞の分化抑制剤及び分化促進剤、並びに医薬及びスクリーニング方法. 特願2007-020893 (2007/01/31) .

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)	2時間を刻む生物時計に関わる遺伝子群の網羅的解析 (Comprehensive Analysis of the Gene Groups Associated with a Two-Hour Cycle Biological Clock)					
代表研究者名 (所属機関・職名)	影山 龍一郎 (国立大学法人京都大学・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
	48,000	20,000	20,000	20,000	20,000	128,000
	研究者名	所属機関・部局・職			専門分野	
研究 組 織 図	代表機関	☆ 影山龍一郎	京都大学・ウイルス研究所・教授			分子生物学
		大塚 俊之	京都大学・ウイルス研究所・准教授			神経科学
		小林 妙子	京都大学・ウイルス研究所・助教			分子生物学
分担機関	☆ (代表研究者)					
		(分担研究者)				
【研究目的】						
<p>発生過程の進行を制御する生物時計の実体は、長らく不明であった。研究課題代表者は、bHLH型転写因子Hes1はいろいろな細胞において、さらにHes7は体節形成過程の未分節中胚葉において2時間を刻む生物時計として働くことを明らかにしてきたが、その役割や分子機構については不明の点が多い。この2時間時計の生物学的な意義を明らかにする目的で、Hes1やHes7の下流遺伝子群を網羅的に探索し、それらの発現動態および機能を調べる。本研究により、2時間時計に関わる遺伝子ネットワークの全体像を明らかにする。</p>						
【課題の概要】						
<p>2時間周期で発現変動（オシレーション）する遺伝子群をマイクロアレイによって網羅的に探索するとともに、同定されたオシレーション分子の発現動態をリアルタイムで観察し、さらにその機能を明らかにする。</p>						

【平成20年8月末までの研究成果】

体節形成過程において、Hes の発現をリアルタイムで可視化することに成功し、安定な発現オシレーションには細胞間相互作用が重要なことを明らかにした (PNAS, 2006)。また、Fgf シグナルと Notch シグナルが協調して Hes7 の発現オシレーションを制御し、逆に Hes7 オシレーションは Fgf シグナルと Notch シグナルの発現オシレーションを同期させて、安定なリズムを刻むことがわかった (Developmental Cell, 2007)。一方、神経前駆細胞では、Hes1 オシレーションがプロニューラル遺伝子 Neurogenin2 や Notch リガンド Deltalike1 の発現オシレーションを誘導し、この発現オシレーションは神経前駆細胞の増殖と分化に重要な役割を担うことを明らかにした (Neuron, 2008)。さらに、リン酸化 Stat3 および Socs3 の発現量もオシレーションし、このオシレーションが Hes1 の発現オシレーションに必須であることを示した (PNAS, 2007)。

【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

体節形成過程および神経幹/前駆細胞におけるオシレーターネットワークを解明し、それぞれの成果はプラットフォームに登録済みである。また、白髭先生 (東工大) との共同研究で、胎生幹細胞におけるオシレーターネットワークの解析が進行中である。

b) 縦軸研究 (または横軸研究) への貢献に繋がる研究成果

今回明らかになってきたオシレーターネットワークは多くの細胞や局面で重要な役割を担うことが明らかになりつつあり、他の縦軸研究にも貢献し得ると考えられる。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

胎生幹細胞におけるオシレーターネットワークの研究に関しては、白髭先生 (東工大) の ChIP on Chip データを活用している。

【主な研究論文とその概要】

1. Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H., and Kageyama, R. (2006) Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **103**, 1313-1318.

Hes1 プロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものをレポーターとして用いることによって、Hes1 の発現をリアルタイムで可視化することに成功した。その結果、Hes1 は未分節中胚葉では安定なオシレーションを示すが、分散培養した未分節中胚葉の個々の細胞では不安定なオシレーションしか示さないことがわかった。この不安定なオシレーションは、線維芽細胞のそれとよく似ていた。このことから、未分節中胚葉の個々の細胞は他の細胞と同じような不安定な Hes1 オシレーターしか持っていないことが明らかとなり、安定なオシレーションには細胞間相互作用が重要なことが示唆された。また、数理モデルを用いることによって、不安定なオシレーター同士を相互作用させて安定なオシレーターをつくることがシミュレーションできた。

2. Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Takenaka, Y., Nagahara, H., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. (2007) Ultradian oscillations in Stat, Smad and Hes1 expression in response to serum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **104**, 11292-11297.

線維芽細胞を血清刺激した後、経時的に RNA を抽出し、発現オシレーションを示す遺伝子を網羅的に探索した。その結果、Hes1 以外に Stat および Smad シグナル系分子の発現が約 2 時間周期でオシレーションすることがわかった。この発現オシレーションは、Stat3 と Smad1 の周期的活性化とそれぞれの下流因子 Socs3 と Smad6 によるネガティブフィードバックより構成されていた。興味あることに、Stat シグナル系の発現オシレーションを抑制すると、Hes1 の発現オシレーションも抑制された。Hes1 は Stat シグナル系の活性化に必要であると報告されていることから、Stat-Hes1 の発現オシレーションはお互いに依存しあうことが示唆された。さらに、Hes1 の発現オシレーションが抑制されると、細胞周期が G1 で遅延した。これらの結果から、いくつかのシグナル分子は血清刺激により短周期の発現オシレーションを示すこと、中でも Stat-Hes1 の発現オシレーションは効率的な細胞増殖に重要であることが明らかになった。

3. Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.-X., and Kageyama, R. (2007) The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and Notch signaling in the somite segmentation clock. **Dev. Cell** **13**, 298-304.

分節過程では、bHLH 因子 Hes7 の発現オシレーションによって Notch シグナルのモジュレーター分子である Lunatic fringe (Lfng) の発現オシレーションが制御される。Hes7 の標的遺伝子を網羅的に探索した結果、Lfng 以外に Fgf シグナルの下流で抑制的に働く Dusp4 を同定した。Dusp4 の発現はオシレーションしており、Fgf シグナルの活性化も周期的であった。Hes7 を欠損すると、Lfng だけでなく、Dusp4 の発現オシレーションも消失した。したがって、Hes7 は Lfng や Dusp4 の発現オシレーションを制御することによって Notch シグナルと Fgf シグナルの周期的な活性化を同期させることが示された。一方、Notch シグナルを抑制すると、Hes7 の発現は低下して未分節中胚葉の前側では消失したが、後側では低レベルに残り、オシレーションしていた。次に、Fgf シグナルを抑制すると、まず未分節中胚葉の後側で Hes7 の発現が消失し、やがて前側でも消失した。以上の結果から、Hes7 の発現オシレーションは Fgf シグナルと Notch シグナルによって協調的に制御され、逆に Hes7 は両シグナル系を周期的に活性化して分節過程を制御することが明らかになった。

4. Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. **Neuron** **58**, 52-64.

bHLH型転写抑制因子Hes1は、プロニューラル因子群の発現を抑制することによって神経幹／前駆細胞を維持する。神経幹細胞におけるHes1の発現は、Notchシグナルによって誘導されるが、ネガティブフィードバックによって2～3時間周期でオシレーションすることがわかった。その結果、下流因子であるプロニューラル遺伝子Neurogenin2 (Ngn2)やNotchリガンドDeltalike1 (D111)の発現もオシレーションしており、このD111の発現によって神経幹細胞は相互にNotchシグナルを活性化し合い未分化状態を維持することが示された。したがって、D111の発現が持続するとニューロンに分化するが、オシレーションすると未分化状態の維持に働くことが明らかになった。

【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) 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)	ノンコーディング RNA によるゲノム情報発現制御機構の解析 (Analysis of Noncoding RNAs that Act as Regulators of the Expression of Genome Information)					
代表研究者名 (所属機関・職名)	塩見 春彦 (学校法人慶應義塾・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
	15,000	15,000	15,000	13,000	13,000	71,000
	研究者名	所属機関・部局・職			専門分野	
研究 組 織 図	代表機関	☆塩見 春彦	慶應義塾大学・医学部・教授			RNA生物学
	分担機関	☆ (代表研究者) (分担研究者)				
【研究目的】						
<p>最近の研究から多種多様な機能性non-coding RNAが存在し、それらが仲介するさまざまなゲノム情報発現制御機構が明らかになってきた。本研究では、non-coding RNAのゲノム情報発現制御における役割を理解し科学技術の振興に寄与する為、特にsiRNAおよびmiRNAの生合成経路とその機能の解明を目指す。また、疾患におけるnon-coding RNAの役割を理解するため、疾患関連蛋白質と相互作用するnon-coding RNAや疾患関連遺伝子領域から発現するnon-coding RNAの同定を行い、その機能の解明を目指す。</p>						
【課題の概要】						
<p>(1) 脆弱X遺伝子産物と相互作用する小分子RNAの同定とその機能解析 脆弱X遺伝子産物FMR1が形成する複合体に特異的に存在する小分子RNAを抗FMR1抗体を用いて同定・単離し、その機能解析を行う。</p> <p>(2) Argonaute蛋白質と相互作用する小分子RNAの同定とその機能解析 RNAサイレンシングにおける中核因子であるArgonaute蛋白質と相互作用する内在性小分子RNAを抗Argonaute抗体を用いて同定・単離し、その機能解析を行う。</p> <p>(3) miRNAによるin vitro翻訳抑制系の構築 ショウジョウバエ培養細胞および胚抽出液を用いてmiRNAによる翻訳抑制機構を解析する実験系を構築し、この機構に関与する因子の同定を進める。</p>						