

【課題の概要】

自然睡眠状態と覚醒状態のマウス大脳皮質から RNA を抽出し、DNA チップ解析を行い、睡眠・覚醒状態での遺伝子の発現変動を解析する。次に、候補遺伝子の遺伝子発現調節機構を解明する。更に、動物において候補遺伝子の発現を RNAi あるいは阻害剤を用いて機能を抑制し、睡眠調節との関連を検討する。

【平成20年8月末までの研究成果】

1) 睡眠測定システム

マウスの脳に脳波測定用の電極を手術により装着した。2 週間の回復期間をおいた後、睡眠誘発物質であるプロスタグランジン D₂ あるいはアデノシン A_{2A} 受容体アゴニストである CGS21680 を投与し、睡眠状態にあることを脳波および筋電図により確認した。このようにマウスの脳に睡眠誘発物質を投与して自然睡眠に極めて近い睡眠を誘導することが可能である。また、より効率よく実験を進めるため、リアルタイムでモニターした行動量と脳波解析より求めた覚醒量との比較を行うことにした。その結果、行動量と覚醒量は同じプロファイルを示し、行動量をモニターすることで睡眠・覚醒状態を判定できる方法を確認した。

2) 自然睡眠下のマウス脳において発現レベルが変動する遺伝子の網羅的解析

自然睡眠状態と自然覚醒状態にあるマウスや、覚醒物質であるカフェインを腹腔内投与し覚醒状態にしたマウス、睡眠誘発物質であるプロスタグランジン D₂ あるいはアデノシン A_{2A} 受容体アゴニストである CGS21680 (コントロールは人工脳脊髄液) を 50 pmol/min あるいは 5 pmol/min 脳室内に投与して睡眠を誘発したマウスを用いて、大脳皮質から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。各実験には、各 2~4 匹のマウスを使用し、個々のマウスから調製した RNA を等量ずつ混ぜ、逆転写反応を行った。さらに、Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array により発現レベルが変動する遺伝子の網羅的解析を行い、得られたデータを GeneSpring GX7.3 (Agilent) により解析した。その結果、睡眠状態と覚醒状態の大脳皮質における遺伝子の発現レベルの変動が小さく、またマウス個体差による結果の違いが大きかった。そこで、マウスの数を増やし、マイクロアレイ解析を繰り返し行うことにより、解析結果の精度を上げた。また、自然睡眠と自然覚醒においてはサンプルを採取する時間に 12 時間の差が生じるため、概日リズムに関わる遺伝子が多く含まれることも分かった。そこで、自然睡眠時に覚醒物質であるカフェインを投与することにより強制的に覚醒させたマウスのサンプルを対照とすることで、概日リズムに関連する遺伝子を除外した。

自然睡眠時 (明期開始 2 時間後)、自然覚醒時 (暗期開始 2 時間後) および、カフェインによる強制覚醒時に発現が変動する遺伝子を Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430_2.0 array により解析した結果、自然覚醒と比較して、カフェインによる強制覚醒で発現が低下し、かつ自然睡眠で発現が上昇した遺伝子は 217 個であった。このうち、176 遺伝子について定量 PCR 法により発現レベルを測定した結果、55 個の遺伝子が自然睡眠時に、大脳皮質において発現上昇することを確認した。更に、睡眠時間依存的に発現上昇する遺伝子を単離するため、マイクロアレイ解析および定量 PCR 法により、覚醒状態から睡眠状態への移行期の

マウス大脳皮質（明期開始 1、2、および 4 時間後）を用いて、経時的な発現レベルの変動を解析した。その結果、55 個の遺伝子のうち、38 個の遺伝子が経時的に発現レベルが上昇し、行動量と逆相関を示した。

一方、同じマイクロアレイデータについて、理研 発生・再生科学総合研究センター（CDB）の Clock element DB を用いて概日リズムに関わる遺伝子を除外した結果では、自然睡眠と自然覚醒の比較において、自然睡眠で発現レベルが 1.5 倍以上上昇した遺伝子は 104 個、自然覚醒で 1.5 倍以上発現が上昇した遺伝子は 97 個であった。これらの遺伝子群は、上述のカフェインにより概日リズムに関連する遺伝子を除外した遺伝子群とは一致しなかった。

3) 薬剤により睡眠を誘発したマウスの脳において、発現レベルが変動する遺伝子の網羅的解析

ヒスタミンは H_1 受容体を介して覚醒を調節し、風邪薬や抗アレルギー薬として処方される抗ヒスタミン薬（ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬）は催眠効果を示す。我々は、ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬による催眠効果が、断眠による強制覚醒により増強することを見出した。そこで、カフェインによる強制覚醒後にヒスタミン H_1 受容体拮抗薬を投与することにより睡眠を誘発したマウスを用いて、薬剤誘発睡眠時のマウスの脳内で発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。

明期終了 2 時間前の自然睡眠時にカフェイン（15 mg/kg）を腹腔内投与して強制的に覚醒させたマウスに対し、暗期開始直前にヒスタミン H_1 受容体拮抗薬であるピリラミン（5 mg/kg）を投与して睡眠を誘発した。ピリラミン投与 2 時間後に大脳皮質から RNA を抽出し、Affimetrix GeneChip Mouse Genome 430_2.0 array により、発現レベルが変動する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、自然覚醒群、カフェイン投与群あるいはピリラミン投与群と比較して、薬剤誘発睡眠群で発現レベルが 1.2 倍以上変動した遺伝子は、上昇が 43 個、低下が 102 個であった。これらの遺伝子について定量 PCR 法により発現レベルを測定した結果、自然覚醒群、カフェイン投与群あるいはピリラミン投与群と比較して、薬剤誘発睡眠状態のマウスにおいて発現レベルが 1.2 倍以上上昇した遺伝子は 15 個であった。一方、発現レベルが 0.8 倍以下に減少した遺伝子は 4 個であった。これらの遺伝子について自然睡眠時に変動する遺伝子と比較したところ、睡眠時に発現が低下する c-FOS や ARC (activity regulated cytoskeletal-associated protein) 以外に、共通して変動する遺伝子はなかった。以上の結果は、ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬による催眠は、自然睡眠とは異なる状態にあるということを遺伝子発現レベルで示している。つまり、薬剤誘発による睡眠は、自然睡眠とは異なる遺伝子発現制御ネットワークにより制御されていることを示している。

4) In Vitro Virus (IVV) 法による相互作用タンパク質の同定（慶応大学・柳川弘志教授との共同研究）

2) の自然睡眠下のマウス脳において発現レベルが変動する遺伝子の網羅的解析において、自然睡眠下のマウス大脳皮質で発現レベルが上昇した遺伝子のうち、特に発現レベルの変動の大きい 4 個の遺伝子として、

CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput)

ARNTL (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like)

MORF4L1 (mortality factor 4 like 1)

FABP7 (fatty acid binding protein 7, brain)

を抽出し、慶応大学柳川弘志教授との共同研究により、それら 4 個のタンパク質と相互作用するタンパク質の同定を行った。ベイト作製に必要な候補遺伝子の cDNA クローンは、理研ゲノム科学総合研究センター（GSC）より分与を受けた。IVV 法に用いるライブラリー作製のための poly(A)⁺RNA は、自然睡眠下にあるマウスの大脳皮質から精製した。IVV 法により、

前述の 4 個のタンパク質と相互作用するタンパク質の解析を行った結果、59 個の相互作用タンパク質を得た。これらの遺伝子発現を、自然睡眠および自然覚醒下にあるマウスの大脳皮質の RNA を用いて定量 PCR 法により確認した。その結果、FABP7 と相互作用する候補タンパク質のうち、発現レベルの変動が大きい 5 個の遺伝子として、

PRKRIR (protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor))

MTDH (Metadherin)

FUBP1 (far upstream element binding protein 1)

PHYHIPL (phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein-like)

GPM6A (glycoprotein m6a)

を抽出した。現在、FABP7 とこれら 5 個の候補タンパク質とのタンパク質相互作用を *in vitro* pull down 法により検証している。

5) 候補遺伝子の転写因子の探索

2) の自然睡眠下のマウス脳において発現レベルが変動する遺伝子の網羅的解析において、睡眠時に大脳皮質で発現が変動する遺伝子の網羅的解析の結果から、カフェインによる強制覚醒を対照にして得られた遺伝子群あるいは理研 CDB 上田泰己チームリーダーが作製した Clock element DB を用いて得られた遺伝子群を抽出することにより、概日リズム関連遺伝子を候補遺伝子から除外した。候補遺伝子のプロモーター領域を同定するために、FANTOM の CAGE データおよび Ensembl database を用いて転写開始点の同定を行い、転写開始点から上流 5kb までのプロモーター配列を取得した。カフェインによる強制覚醒を対照にして得られた 217 個の遺伝子のうち、121 個の遺伝子についてプロモーター配列が取得できた。理研 CDB の Clock element DB を用いて得られ、自然睡眠で 1.5 倍以上発現が上昇した 104 個の遺伝子のうち 59 個の遺伝子、自然覚醒で 1.5 倍以上発現が上昇した 97 個の遺伝子のうち 71 個の遺伝子についてプロモーター配列が取得できた。

これら候補遺伝子のプロモーター配列のうち、転写開始点から上流 1 kb のプロモーター配列を用い、ゲノムネットワークプロジェクトの CisFinder および BIOBASE の MATCH を用いて転写因子の結合部位の予測を行い、睡眠関連の候補遺伝子のプロモーター領域に存在するシス配列を抽出した。次に、睡眠関連の候補遺伝子のプロモーター領域に高頻度で存在するシス配列の頻度が、覚醒関連遺伝子において出現する頻度と比較して 1.4 倍以上高く、かつ、睡眠関連遺伝子のプロモーター領域内のシス配列の出現頻度が上述の 2 種類の概日リズム関連遺伝子の除外方法の違いによる差が 1.4 倍以下であるシス配列を抽出した。その結果、睡眠状態で発現上昇する遺伝子のプロモーター配列に高頻度で存在するシス配列として、

GATA3 (GATA binding protein 3)

HLF (hepatic leukemia factor)

SOX5 (SRY-box containing gene 5)

CDP CR3+HD (cut-like homeodomain protein)

の 4 つのシス配列を見出した。これらの 4 つのシス配列について、睡眠時間依存的に発現が上昇した 38 個の遺伝子のプロモーター領域に存在する頻度を調べたところ、38 個の遺伝子中においても、GATA3、HLF、SOX5 および CDP CR3+HD の 4 つのシス配列が、プロモーター領域内に高頻度で存在した。また、IVV 法によるタンパク質相互作用のベイトタンパク質として単離した CLOCK、ARNTL、MORF4L1 および FABP7 の 4 個の遺伝子と FABP7 と相互作用するとして単離された PRKRIR、MTDH、FUBP1、PHYHIPL および GPM6A の 5 個の遺伝子のプロモーター領域においても、これら 4 つのシス配列は高頻度で存在した。つまり、今回同定された GATA3、HLF、SOX5 および CDP CR3+HD の 4 つのシス配列は睡眠時に重要な役割をするシス配列であることが推測される。

また、4つのシス配列のうち、SOX5 結合配列に結合する SOX5 は、睡眠時間依存的に発現が上昇したとして単離された 38 個の遺伝子の 1 個であり、睡眠時に機能する遺伝子の発現調節に関与している可能性が高いことを意味している。つまり、SOX5 と SOX5 結合配列をプロモーター領域にもつ遺伝子群は、SOX5 により睡眠時間依存的に発現制御される遺伝子発現調節ネットワークを形成している可能性を示唆している。そこで、38 個の遺伝子のうち、神経の分化や増殖との関連が報告されている 18 個の遺伝子のプロモーターに存在する SOX5 結合部位を同定し、ゲルシフトアッセイ法により、これらシス配列への SOX5 の結合について調べている。

6) CAGE 解析 (理研 GSC との共同研究)

5) の候補遺伝子の転写因子の探索において、データベースに公開されている情報を利用して、候補遺伝子のシス配列の解析を行った。しかし、睡眠状態にあるマウスの大脳皮質では、公開データとは転写開始点が異なる可能性もある。そこで、実際に睡眠状態あるいは覚醒状態にあるマウスの大脳皮質から調製した RNA を用いて、候補遺伝子のプロモーター領域の同定と遺伝子発現情報を同時に取得するため、横軸(中核)研究機関である理研 GSC に CAGE 解析の実施を依頼した。解析に必要な mRNA は、2) の自然睡眠・自然覚醒・カフェイン覚醒、3) のカフェイン投与群・ピリラミン投与群・薬剤誘発睡眠群の大脳皮質から調製した。現在、理研 GSC において解析を実施中である。

7) in vivo での検証

動物において候補遺伝子と睡眠調節との関連を検討するため、現在、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを介した shRNA の導入により候補遺伝子をノックダウンするシステムの構築を進めている。AAV ベクターシステムを用いて、同定された転写調節因子に対する siRNA をマウス脳内にインジェクションし、ノックダウンしたマウスの睡眠を解析することで、同定された候補遺伝子の睡眠への関与を検証する。また、ノックダウンしたマウスの大脳皮質の遺伝子発現レベルの変動を調べることで、同定した転写調節因子が関わる遺伝子発現調節ネットワークを解析する。

【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

睡眠という個別の生命現象を制御する、あるいは睡眠・覚醒により発現が調節される遺伝子発現制御ネットワークを明らかにするために、自然睡眠時に、大脳皮質において発現が上昇する遺伝子を同定した。人為的な睡眠・覚醒状態ではなく、自然睡眠下において発現レベルが変動する遺伝子の同定はこれまでに例がない。断眠解除後のリバウンド睡眠ではなく、自然睡眠下において発現レベルが変動する遺伝子の同定は世界で初めてである。さらに、これらの遺伝子の発現制御における共通性を調べ、4個の転写調節因子結合配列が高頻度で、これらの遺伝子のプロモーター領域内に存在することが分かった。睡眠特異的な遺伝子が同定され、睡眠時に共通して見られる転写制御機構の一端が明らかとなった。

b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

睡眠・覚醒に関連した遺伝子発現制御ネットワークを明らかにするために、睡眠時に発現変動するタンパク質と相互作用するタンパク質を横軸研究機関である慶応大学（柳川教授）と共同で同定した。睡眠時においてマウス大脳皮質で見られるタンパク質相互作用の解析結果は、慶応大学とともにプラットフォームにて公開予定である。

我々は、マウスの睡眠状態をいつでも定量的に測定することができる。よって、睡眠あるいは覚醒状態の動物からサンプル（組織）を抽出することが可能である。そこで、睡眠あるいは覚醒状態にあるマウスの大脳皮質における遺伝子発現情報の取得と転写開始点の決定を行うため、横軸（中核）研究機関である理研 GSC と共同で CAGE 解析を行っている。睡眠・覚醒状態にあるマウスの大脳皮質における CAGE データはこれまでになく、このデータについても、プラットフォームにて公開予定である。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

概日リズム関連遺伝子の情報は、理研CDBの上田泰巳チームリーダーのClock element DBを活用した。プロモーター配列および転写開始点情報の取得には、NCBI、FANTOMのCAGEデータおよびEnsembl databaseを用いた。シス配列の解析には、ゲノムネットワークプロジェクトのCisFinderおよびBIOBASEのMATCHを用いた。

また、理研GSCから、マウスcDNAクローン434個の分与を受けた。

【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) 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)		ヒトゲノムのクロマチン転写ユニットの網羅的解析とその応用 (Comprehensive Analyses for Human Genome Chromatin Transcription Unit and its Application)			
代表研究者名 (所属機関・職名)		太田 力 (国立がんセンター研究所・室長)			
年度別研究費 (千円)		18年度	19年度	20年度	合 計
		28,000	28,000	28,000	84,000
		研究者名	所属機関・部局・職		専門分野
研究 組 織 図	代表機関	☆ 太田 力	国立がんセンター研究所・		生化学
			腫瘍ゲノム解析情報研究部・		
			室長		
	分担機関	☆ (代表研究者)			
(分担研究者)					
【研究目的】 ゲノムDNAの付着している“足場”は、細胞を問わず固定した領域が存在する一方、組織特異的あるいは分化特異的に変化する領域があることが示唆されており、全ての細胞で同じ転写ユニットが存在するのではないらしい。つまり、“足場”は遺伝情報を保存する極めて静的な役割のほかに、選択的な情報利用の過程にも重要な役割を果たしていることが考えられる。「いかに核の中に“場所”と“秩序”を与え、かつ、転写や複製などの反応を制御するのか」という問題は、遺伝子調節機構を明らかにする上で最も基本的・魅力的問題の1つとして考えられる。以上の観点から、申請者は、ゲノムネットワークを考える上で、遺伝子発現調節におけるゲノムの高次構造の要となっている“足場”の網羅的な検索を行い、遺伝子の転写ユニットと発現制御機構について分子レベルでの情報を得ることを目的として研究を行った。					

【課題の概要】

ゲノムDNAは核内では浮遊して存在しているのではなく、核内構造体に一部のDNA領域を結合させた状態で存在することが知られている。最近、この構造体付着DNA部分はクロマチンの“足場”として機能していることに加えて、足場と足場の間に存在する複数の遺伝子は一つの独立した転写調節単位（転写ユニット）として高次構造的な発現調節（DNAのねじれやDNA／ヒストンの修飾を介した調節）が行われていることが示唆され始めている。本研究課題においてはポストゲノムシーケンス研究として、この“足場DNA”の網羅的な検索をHeLa細胞を用いて行い、ゲノム上における複数の遺伝子を含む転写ユニットの情報を得ることを目指した。さらに、この情報を用いて癌におけるゲノム構造異常によって引き起こされる転写ユニットの破壊／結合およびクロマチン修飾異常の探索を行い、癌の分子機構を転写ユニット異常（それに伴うクロマチン修飾異常）という新しい視点から解析を試みた。

【平成20年8月末までの研究成果】

(1) ヒトゲノムからの足場DNAの同定:

ループ構造をなすDNAの付け根の配列は、DNaseIやSDS等の界面活性剤に対して強い抵抗性を示す領域である。そこで、細胞核を抽出した後、DNaseIや界面活性剤等の処理を行い、不溶性となった分画からDNAを抽出した。これら抽出されたDNA断片をプラスミドに連結させ、大腸菌に形質転換し、ゲノムDNAの付着している“足場”領域のDNAライブラリーを作成した。この“足場”領域のDNAライブラリー31,111個のコロニーからDNAを抽出し、塩基配列を解読した。足場DNA配列の特徴としてatに富む配列に加え、aggの繰り返し配列等興味深い配列が存在していた。

さらに、ヒストンH3K4のdi-およびtri-メチル化抗体を利用したChIP法を用いて、ヒストンH3K4のdi-およびtri-メチル化が存在する領域のDNAライブラリーを作成し、解析を行っている。

(2) ヒトゲノムからの転写ユニットの同定:

これら解読した約30,000個の“足場”領域DNAの塩基配列をゲノム上にマッピングを試みたところ、繰り返し配列等でゲノム上にマッピングできないものが多数存在したが、11,592個の足場配列がゲノム上にマッピングすることに成功した。マップされた位置から遺伝子外部に存在するものが6,366個〔その内、遺伝子近傍（10kb以内）に1,533個、遺伝子とかなり離れた領域（10kb以上）に4,833個存在していた〕あり、また、遺伝子内部に存在するものは5,226個〔その内、エクソン領域に805個、イントロン領域に4,421個存在していた〕であった。

また、染色体ごとの“足場”領域の個数を比較してみたが、染色体の長さに相関しており、偏りは見出すことができなかった。

マッピングされた“足場”領域の一例を下記に示す。染色体19p13.2のPPAN遺伝子からYIPF2遺伝子までの約1Mbpの間に31遺伝子が存在し、7か所の足場が見出された（図-1）。

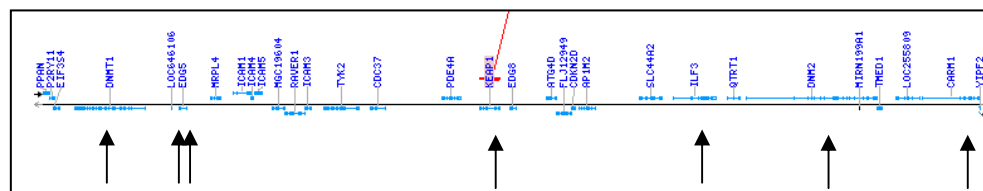


図-1. 染色体19p13.2領域の遺伝子配列と足場領域（縦矢印）

現在、HeLa細胞の遺伝子発現データと足場”領域”のデータとの相関解析を試みており、転写ユニット単位での遺伝子発現制御機構について検討している。

(3) 他の癌由来の培養細胞の足場領域DNAの変化の探索:

ゲノム上にマッピングされた足場”領域”DNAの中に、解毒制御に関与することが知られている転写抑制因子KEAP1のエクソン部分に相当する配列が見出された。最近、このエクソン中の領域における足場DNA量が異なる肺癌由来の培養細胞株を見出した。この足場DNA量が異なる細胞株においてKEAP1遺伝子の発現が低下していた。この知見から、この転写抑制遺伝子が肺癌に関与している可能性が示唆されたので、肺癌においてこの転写抑制遺伝子の変異解析および発現異常解析を行ったところ、高頻度で遺伝子変異および発現異常を見出した。現在、この転写抑制遺伝子の発現異常と足場DNA量との相関を正確に調べるため、この転写抑制遺伝子の発現低下を示す複数の培養細胞株を探索中である。

【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

転写抑制遺伝子の発現異常と足場DNA量との相関を示す肺癌由来の培養細胞株を見出し、足場における転写制御機構の役割を分子レベルで解明する糸口を見出すことに成功した。

b) 縦軸研究（又は横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

HeLa細胞をモデルとして作成した“足場”領域のDNAライブラリーの塩基配列解析が完了したので、現在HeLa細胞の遺伝子発現データと足場“領域”DNAのデータとの相関解析を試みており、転写ユニット単位での遺伝子発現制御機構について検討している。これら転写ユニット単位での転写制御機構の存在が示唆できれば、GNPにおける縦軸研究および横軸研究で行われている遺伝子発現研究において、クロマチンレベルでの高次の転写制御機構との関連解析に利用できるものと思っている。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

- 1：ヒストンH3のChip-ChIPデータ
- 2：THP-1細胞

【主な研究論文とその概要】

1. Ohta T., Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T, Shibata T, Yamamoto M and Hirohashi S.
Loss of Keap1 Function Activates Nrf2 and Provides Advantages for Lung Cancer Cell Growth.
Cancer Res. 68, 1303-1309 (2008).

概要：酸化ストレス応答および第二相解毒酵素の多くが転写活性化因子Nrf2とその抑制因子Keap1で制御されていることが知られている。我々は肺癌由来の培養細胞においてKEAP1の体細胞変異および遺伝子発現低下（発現低下した細胞株の一つが足場DNA量の異常をもっていた）を見出した。次に、肺癌の手術検体を用いて遺伝子変異を探索したところ、約15%でKEAP1遺伝子の変異を見出した。これらKEAP1遺伝子の変異は全てNrf2の異常活性化を引き起こしていた。変異の見つかった細胞株では酸化ストレス応答因子群や第二相解毒酵素因子群が過剰発現しており、酸化ストレスや抗癌剤に対して高い抵抗性を示していた。

【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)		エピジェネティックネットワークを介した幹細胞維持の分子機序 (Molecular Mechanisms Underlying Epigenetic Regulation to Maintain Various Stem Cells)			
代表研究者名 (所属機関・職名)		古関 明彦 (独立行政法人理化学研究所・グループディレクター)			
年度別研究費 (千円)		18年度	19年度	20年度	合 計
		22,000	21,000	19,000	62,000
		研究者名	所属機関・部局・職		専門分野
研究組織図	代表機関	☆古関 明彦	理研・免疫アレルギーセンター・グループディレクター		遺伝学
		山田 大輔	理研・免疫アレルギーセンター・研究員		分子生物学
	分担機関	☆ (代表研究者)			
		(分担研究者)			
【研究目的】 幹細胞維持には、ポリコム群をはじめとする内因性のエピジェネティック制御だけではなく、外因性シグナル群も重要な役割を果たすことはすでに明らかにされているが、これらがどのように相互作用するのかについては、おそらくヒストン修飾を介した相互作用が存在すること以外に多くのことは知られていない。本研究は、幹細胞システムに焦点を絞り、エピジェネティックシステムと外因性シグナル群のそれぞれが構成するネットワークの機能的相関を明らかにすることを目的とする。そのために、この申請期間内に、 (1) 胚性幹細胞 (ES 細胞) をモデルとして用いた多能性維持に必要なエピジェネティックネットワークの解明、及び (2) 生体内の組織幹細胞におけるクロマチン状態を解析するための実験システムの構築 の2点に焦点を絞った研究を行う。					

【課題の概要】

(1) 胚性幹細胞(ES細胞)をモデルとして用いた多能性維持に必要なエピジェネティックネットワークの解明

昨年までに、コアネットワークを構成する他の因子及びES細胞の分化誘導(Cdx2, Gata6など)を引き起こすネットワークが、どのようにポリコム群を改変あるいは再構築するのか、また、どのようにクロマチン構造の変換を引き起こすのかを、それぞれのコンディショナルノックアウトあるいは過剰発現ES細胞を用いた解析を行った。その結果、ポリコム群をノックアウトしてもOct3/4のクロマチンは明らかな影響を受けないものの、Oct3/4をノックアウトするとポリコム群のクロマチン結合は抑制され、その結果標的遺伝子群の脱抑制が起こってくることを明らかにした。また、この制御は、ポリコム群とOct3/4の直接的な結合を介していることが示された。すなわち、Oct3/4は、その転写制御メカニズムとしてポリコム群を用いていることが示された。本年度は、ポリコム群がどのように局所的に構築されていくのかを、様々なポリコム群ノックアウト細胞を用いて解析した。すなわち、発現プロファイリングとChIP-Chip解析を行い、そこから得られたデータを用いて、同様にバイオインフォーマティクスを用いた解析を行い、エピジェネティック因子間の相互作用を明らかにする。

(2) 生体内の組織幹細胞におけるクロマチン状態を解析するための実験システムの構築

昨年度、ビオチン結合ドメインをノックインしたRing1Bアリルとビオチンリガーゼの両方を有するマウス系統を樹立した。その上で、タモキシフェン依存的に活性化するCREリコンビナーゼ、あるいは、様々な組織特異的にCREを発現するマウスと交配し、組織特異的なクロマチン免疫沈降を行うシステムの樹立を目指す。

【平成20年8月末までの研究成果】

(1) 胚性幹細胞(ES細胞)をモデルとして用いた多能性維持に必要なエピジェネティックネットワークの解明

ポリコム群複合体によって制御される二つのヒストン修飾であるがヒストンH3K27のトリメチル化とヒストンH2Aのユビキチン化がどのようにES細胞の未分化性の維持に寄与し得るのかを解析した。そのために、ヒストンH3K27のトリメチル化(H3K27me3)、ヒストンH2Aユビキチン化(H2Aub1)、ポリコム群タンパクであるRing1B、Cbx2の結合をゲノムワイドに明らかにし、どのタグが結合している遺伝子が、分化誘導因子の発現により制御されているのかを解析した。各遺伝子座にどのように構築され、その構築と分化誘導因子との機能的な相関についてゲノムワイドな解析を行った。ChIP-ChipデータとそれぞれのノックアウトES細胞の発現変化データを比較することにより、各遺伝子について、それぞれのタグが結合しているか、否かを判定した。その結果、H3K27me3が結合している遺伝子座(K27+群)は4,000、Ring1BあるいはCbx2が結合する遺伝子座(RB+群)は1,000、H2Aub1が結合している遺伝子座(uH2A+群)は400存在することが明らかになった。uH2A+群のうち300は、RB+群に包含され、RB+群のうちの800は、K27+群に包含されることが明らかになった。すなわち、この3群の間には有意な包含関係が成立し得ることが示された。K27+RB+uH2A+群だけを抽出すると、その80%は発生過程に寄与するタンパクであり、さらにその大半は転写制御因子であることが示された。

次にこのような包含関係がどのように形成されるのか、それぞれの結合の間にどのような関係を明らかにするために、相関についての定量的な解析を行った。その結果、この3つのタグの間にはいずれもポジティブな相関があり、それらはいずれも二相性の相関であることが示された。K27+の強い結合の見られる部分にRing1Bの強い結合があり、その中の強い結合がある分画に優先的にH2Aub1が結合することが示された。

レンチノイン酸あるいはGATA6の強制発現によりES細胞を分化誘導した時に、K27+RB+uH2A+群、K27+RB+uH2A-群とK27+RB-uH2A-群とで、遺伝子発現変化を比較すると、いずれの分画でも有意に脱抑制が観察されたものの、K27+RB+uH2A+群における脱抑制が最も強く見られた。これらのことから、コア因子がK27+RB+uH2A+ドメインの形成に寄与することが考えられた。

(2) 生体内の組織幹細胞におけるクロマチン状態を解析するための実験システムの構築

昨年度までに、ビオチン結合ドメインをノックインしたRing1Bアリルとビオチンリガーゼの両方を有するマウス系統を樹立した。現在までにこれらを各種のディリーター系統と交配し、ERT2-CREについては終了、Lck-CRE(T細胞)、Mx-CRE(B細胞)などとは現在も交配を続けている。ERT2-CREと交配したマウスを用いて、ChIPと複合体の精製を試みた。11.5日胚を用いた実験から、ChIPには十分に適していることが示された。複合体精製については、何らかの前処理が必要であることが明らかになった。

【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

- ・ES細胞のエピゲノム状況についてゲノムワイドなデータ群を提供した。
- ・コア因子ネットワークとエピゲノムの間に機能的な相関があることを示した。

b) 縦軸研究(又は横軸研究)への貢献に繋がる研究成果

- ・野生型あるいは様々な変異ES細胞における発現プロファイルおよびChIP-Chipデータを産生した。
- ・ChIP-Chipデータとマイクロアレイデータをリンクさせるデータ処理方法を開発した。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

・ChIP-Chipデータの解析に用いた各遺伝子座のTSSは、遺伝研データベースよりダウンロードした。

【主な研究論文とその概要】

1. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Fujimura Y, Ohara O, Toyoda T, Otte AP, Okano M, Brockdorff N, Vidal M, Koseki H. Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. **Development**. 2008 Apr;135(8):1513-24. Epub 2008 Mar 13.

ES細胞におけるポリコム群複合体の標的遺伝子座への結合がOct3/4を含むコアネットワークに依存していることを証明し、そのメカニズムの一部を示した。

2. Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, Mao X, Isono KI, Brykczynska U, Kolb C, Otte AP, Koseki H, Orkin SH, van Lohuizen M, Peters AH. (2008) PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos.

Nat Genet. 40:411-20..

初期胚において精子由来ゲノムと卵由来ゲノムが、それぞれ異なるエピジェネティックメカニズムによって修飾を受けていることを明らかにした。

3. Calés C, Román-Trufero M, Pavón L, Serrano I, Melgar T, Endoh M, Pérez C, Koseki H, Vidal M. (2008) Inactivation of the polycomb group protein Ring1B unveils an antiproliferative role in hematopoietic cell expansion and cooperation with tumorigenesis associated with Ink4a deletion. **Mol Cell Biol.** 28:1018-1028.

ポリコム群は造血細胞の増殖を抑制し、その過程はがん抑制遺伝子であるInk4aの制御とは独立していることを示した。

4. Stock J, Giadrossi S., Casanova M., Brookes E., Vidal M., Koseki H., Brockdorff N., Fisher A.G, Pombo A. (2007) Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in ES cells. **Nat Cell Biol.** 9:1428-1435

ポリコム群はたらずヒストン H2A のユビキチン化により、休止型の RNA ポリメラーゼ2が標的遺伝子座に集積することを示した。

5. Sharif J., Muto M., Takebayashi S., Suetake I., Iwamatsu A., Endo T.A., Shinga J., Mizutani-Koseki Y., Toyoda T., Okamura K., Tajima S., Mitsuya K., Okano M., Koseki H. (*Senior authors) (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. **Nature** 450:908-912.

ポリコム群と相互作用する因子であるNp95は、複製後に生じるヘミメチル化されたDNAを認識し、そこにDnmt1をリクルートする活性があることを明らかにした。

【特許出願数の実績】

出願番号 : 特願2008-081826 (平成20年3月26日出願)

発明の名称 : 変異体FGF 古関明彦他4名

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)		哺乳類生殖細胞の性分化に関わるゲノムネットワークの解析 (Analyses of the Genome Network Related to Sexual Differentiation of Mammalian Germ Cells)			
代表研究者名 (所属機関・職名)		相賀 裕美子 (大学共同利用機関法人情報システム研究機構国立遺伝学研究所・教授)			
年度別研究費 (千円)		18年度	19年度	20年度	合 計
		31,000	33,000	31,000	95,000
		研究者名	所属機関・部局・職		専門分野
研究組織図	代表機関	☆ 相賀 裕美子	国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授		発生遺伝学
		小久保 博樹	国立遺伝学研究所・助教		発生遺伝学
		佐波 理恵	国立遺伝学研究所・ポスドク		発生遺伝学
		佐田 亜衣子	国立遺伝学研究所・大学院生		
		鈴木 仁美	国立遺伝学研究所・大学院生		
		鈴木 敦	横浜国立大学・特任助教		生化学
【研究目的】					
哺乳類生殖細胞の性分化に関わる遺伝子カスケード、すなわち体細胞からの情報を受けて生殖細胞が性分化する過程に関与する遺伝子カスケードを解析する。特に、我々が単離した雄の生殖細胞に特異的に発現するNanos2による遺伝子支配を標的として、エピジェネティックな制御を含めた生殖細胞の性分化に関わるゲノムネットワークの解明を目指す。					
【課題の概要】					
哺乳類の性は遺伝的に決定されるが、これまでは主に、そのプライマリーな性決定に関与する体細胞側の遺伝子カスケードの解明に焦点が絞られており、体細胞からの情報を受けて性分化する胎生期の初期生殖細胞の遺伝子ネットワークはほとんど解析されてこなかった。しかし、生殖細胞は精子と卵子という非常に重要な細胞に分化するために、体細胞とは異なった戦略をとることが明らかになりつつある。我々が独自に単離したNanos2遺伝子は雄の生殖細胞に特異的に発現しており、雄の生殖細胞の分化維持に必須である。Nanos2はRNA結合蛋白質であるが、この蛋白質の欠損は生殖細胞の遺伝子発現に多大なる影響を与え、生殖細胞の性質を変化させることを明らかにしている。このプロジェクトでは、Nanos2の上流及び下流の遺伝子を標的として生殖細胞の性分化に関わるゲノムネットワークの解明を目指すとともに、Nanos2蛋白質の作用機構を解析する。					

【平成20年8月末までの研究成果】

(1) 生殖細胞の性分化を誘導するシグナル系の解析 (Nanos2 上流シグナルの探索)

生殖細胞の性は染色体によって決定されるのではなく、生殖巣に入ってから体細胞からの誘導によって決まる。その結果雄の生殖細胞では Nanos2 が誘導され、雌のカスケードを抑制し雄のカスケードを促進すると考えている。したがって生殖細胞の性分化を理解するには最初のシグナルとして Nanos2 の上流シグナルの同定が重要である。我々は、トランスジェニックマウスを用いて Nanos2 遺伝子のエンハンサー解析を行った。その結果、Nanos2 遺伝子上流に約 300 塩基からなるエンハンサーを同定した。その中には多くの転写因子の結合配列が存在していたため、実際にどのような転写因子が発現しているかを絞り込む目的で、野生型マウスのオス、メスの初期生殖巣から RNA を調整しアレイ解析により、雄の生殖細胞で最も初期に発現上昇する転写因子を探索した。この際、生殖細胞を完全に欠損する Nanos3 ノックアウトマウスからも RNA を調整してアレイ解析を行い、生殖細胞特異的な遺伝子の同定を試みた。その結果、雄の生殖細胞で初期に発現上昇する転写調節因子として遺伝子 (約 50 個) を同定した。さらにこれらの遺伝子の cDNA を理研から分与して頂き、発現ベクターに組み込み培養細胞を用いて Nanos2 エンハンサーを持つルシフェラーゼに対して転写誘導能を持つ転写因子を探索した。しかし、これまで単独の発現によりルシフェラーゼ活性を誘導できる因子は同定できていない。

(2) Nanos2 ノックアウトマウスの解析 (Nanos2 下流シグナルの探索)

Nanos2 ノックアウトマウスにおいて、生殖細胞は減数分裂を開始するなど、メスの性質を示すようになる一方、雄としての分化が抑制される。その基盤となる遺伝子カスケードを明らかにするために、野生型及び Nanos2 ノックアウトマウスの雄性生殖巣から RNA を調整し、アレイ解析を行った。この際も、Nanos3 ノックアウトマウスのアレイデータと比較して生殖細胞の遺伝子プロファイルを解析対象とした。その結果、非常に多くの遺伝子の発現が上昇あるいは減少していることが明らかになった。特に特徴的な遺伝子カスケードとして 1) 減数分裂関連遺伝子の上昇、2) 細胞死関連遺伝子の上昇、3) 未分化生殖細胞に特徴的な遺伝子の再上昇、4) 雌の分化マーカーの上昇、5) 雄のゲノムインプリンティング関係の遺伝子の低下、6) 他の雄特異的遺伝子の低下、が観察された。しかし、未同定な多くの遺伝子がどのようなカスケードにより上昇・低下しているかはまだ不明である。今後、これらの遺伝子変動の意味を解析する方法として、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた解析が中心になるが、まず最初に、着目する遺伝子として Stra8 の解析を行った。Stra8 はレチノイン酸によって誘導される遺伝子で、減数分裂の誘導に必要と考えられている。胎生期においては雌の生殖細胞に特異的に発現する。一方、Nanos2 ノックアウトマウスでは雄であるにも関わらず誘導され、それが減数分裂を誘導すると考えている。そこで、Nanos2 のエンハンサーを用いて Stra8 を雄に強制発現するトランスジェニックマウスを作製し解析した。その結果、雄で発現誘導した Stra8 は、一過的に内在性の Nanos2 の発現を抑制したことから、Stra8 による Nanos2 のエンハンサーに対する負の制御機構が存在することが明らかになった。またその際、減数分裂関連の遺伝子 Scp3 の発現上昇がみられたことから、雄の生殖細胞は減数分裂に一時的にコミットしたと