

考えられる。しかし、その後、Stra8 の発現が抑制され、雄の生殖細胞は正常に分化し、このトランスジェニックマウスは妊娠可能となった。先に述べたように、Stra8 は Nanos2 のエンハンサーを抑制する能力があると考えられ、その結果、Nanos2 エンハンサーによる Stra8 の発現を抑制したのではないかと思われる。その後、Stra8 がないと Nanos2 が強く誘導され、結果として、今度は正常発生過程と同様に Nanos2 の機能により Stra8 の発現が転写後に抑制されたと考えられる。

3) Nanos2/Bax ダブルノックアウトマウスの解析

Nanos2 ノックアウトマウスにおいてはメスのカスケードへの移行が見られるが、最終的には細胞死がおこり、生殖細胞が失われ、解析が困難になる。そこで細胞死を抑制するために、Nanos2/Bax ダブルノックアウトマウスを用いて、そのサンプルを用いた解析を試みている。これらの遺伝子が同じ染色体に乗っていたため、ダブルノックアウトのサンプルを得るのに時間を要したが、ようやくサンプルが集まり、解析を開始している。まだ解析途中であるが、BAX の単独のノックアウトの影響もかなり多いため、解析は難航している。タイムコースを追ったプロファイルの比較や、ダブルホモに加えてダブルヘテロやシングルヘテロの情報も必要であるため、それらの情報も収集している。これまでの解析で、BAX のノックアウトが単純に細胞死の抑制のみに働くわけではないということが判明し、予想より解析を困難にしている。

4) Nanos2 の機能解析

Nanos2 は RNA 結合蛋白質であり、細胞質内で P-body という構造に存在することがわかった。すなわち、RNP コンプレックスを作って機能すると考えられる。そこで Nanos2 と相互作用するタンパク質および標的分子の同定に向けて、免疫沈降実験を行った。今回は Flag-tag をつけたトランスジェニックマウスを用いて Nanos2 と結合する蛋白質を 7 種類同定した。その結果、mRNA の分解に関与する polyA 分解蛋白質複合体の構成成分を 5 種類また機能未同定な蛋白質を 2 種類同定した。その他の蛋白質に関してもある程度の解析は完了したが、まだ特異性が低いため、免疫沈降物をさらに精製するために、新たなトランスジェニックマウス (2 回の切断による分離が可能な tag を付ける) を作製中である。今後、より免疫沈降の特異性を上げてマイナーな結合蛋白質の同定を試みる。一方、RNA に関しては、胎児期の沈降物を用いて、単離した RNA をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、Nanos2 結合 RNA として同定できた遺伝子は正常マウスにおいては発現レベルが常に低く、Nanos2 ノックアウトマウスで発現上昇する RNA が多くこれらは直接の標的である可能性が強く示唆された。一方、Nanos2 ノックアウトマウスで発現減少する遺伝子も結合していることを明らかになり、Nanos2 が RNA の分解以外に機能する可能性も示唆された。我々は、これまで胎児期の Nanos2 の機能に主に着目した解析を行ってきたが、生後の精子形成過程で Nanos2 が精子幹細胞に発現しており、Nanos2 を強制発現すると、未分化な精原細胞が増加し、細胞の分化が抑制されることも明らかにしている。すなわち、Nanos2 は精子幹細胞の維持に関与することが示唆された。我々は生後においても Nanos2 は機能しており、その分子機構に関しては共通である可

能性が高いと考え、細胞をより大量に得られる生後の強制発現系を用いて、同様に免疫沈降実験を行った。その結果、結合蛋白質としてはほぼ共通の蛋白質が同定された。まだ結合 RNA に関しては、まだ検討していないが、今後、解析の予定である。すなわち、胎生期と生後では同じメカニズムで機能するが、標的 RNA が異なると考えている。

【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

- ・ 生殖細胞の性分化課程における雄性・雌性遺伝子プロファイルを明らかにした。
- ・ 生殖細胞の初期性分化に関与する可能性のある遺伝子候補をリストアップできた。
- ・ 野生型と *Nanos2* ノックアウトマウスの遺伝子発現プロファイルの比較により、雄性生殖細胞のプロファイルのなかで、*Nanos2* によって制御されている遺伝子カスケードを明らかにする（予定）。

b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

基本的に、このプロジェクトはヒトの遺伝子ネットワークを対象にしているが、発生過程の遺伝子プロファイルを明らかにするためには、遺伝子の機能解析も可能なマウスを用いるのは有効な手段であると考えている。また、ヒトとマウスで生殖細胞の形成機構はほぼ同じであると考えられるため。今回我々が得た情報は、充分ヒトのカウンターパートとして考えてよいと思われる。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

理研から多くの転写因子の cDNA を分与頂いた。

【主な研究論文とその概要】

1. Suzuki A, Tsuda M, and Saga Y. Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of *Nanos2* during male germ cell development. *Development* 134, 77-83, 2007

生殖細胞の分化過程において、2種類の *Nanos* 遺伝子、*Nanos2* と *Nanos3* が発現している。雄の生殖細胞で両方の遺伝子の発現があるが、*Nanos3* はもっと初期の始原生殖細胞に発現しているため、生殖細胞が初期に失われ性分化における機能は不明だった。今回トランスジェニックマウスを用いて、それぞれの遺伝子機能の関係を調べた。その結果、*Nanos2* は *Nanos3* の初期の機能を補うことができるが、*Nanos3* は *Nanos2* の性分化における機能を補えないことがわかり、性分化における *Nanos2* の特異的な機能が示唆された。

2. Suzuki A, Saga Y. (2008) *Nanos2* suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes & Develop.* 22, 430-435.

生殖細胞の性分化は、始原生殖細胞が生殖巣に入ってから体細胞による誘導によって引き起こされる。雌はすぐに減数分裂を開始するが、雄は細胞分裂を停止して生後に減数分裂を行う。しかし、*Nanos2* を欠損した雄の生殖細胞は減数分裂を開始するのみならず、雌化する傾向を持つことが遺伝子発現解析から明らかになった。また逆に、雌の生殖細胞に *Nanos2* を強制発現すると雌の生殖細胞の減数分裂が抑制されるだけでなく、雄

化プログラムが開始されることもわかった。このように、Nanos2 は生殖細胞の減数分裂を抑制するとともに、雄の分化プログラムを進行させるという生殖細胞の性分化に重要な機能をもつことを明らかにした。

3. Suzuki H, Tsuda M, Kiso M, Saga Y. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Dev Biol.* 2008 Jun 1;318(1):133-42.

Nanos3 はマウスの始原生殖細胞の形成直後に発現する蛋白質で生殖細胞の維持に重要な機能を果たす。Nanos3 が欠損すると、始原生殖細胞は速やかに細胞死を起こして消失する。今回 Nanos3 遺伝子座に Cre recombinase を導入したノックインマウスを作製し細胞系譜を追跡することを可能にした。また細胞死誘導因子である BAX とのダブルノックアウトマウスを作製し解析した結果、ある一部の細胞が細胞死から免れ生殖細胞に分化することが判明し、BAX の欠損のみでは完全に細胞死を抑制することは不可能であり、Nanos3 は BAX 以外の経路で機能する細胞死の抑制に機能することも明らかになった。

【特許出願数の実績】

なし。

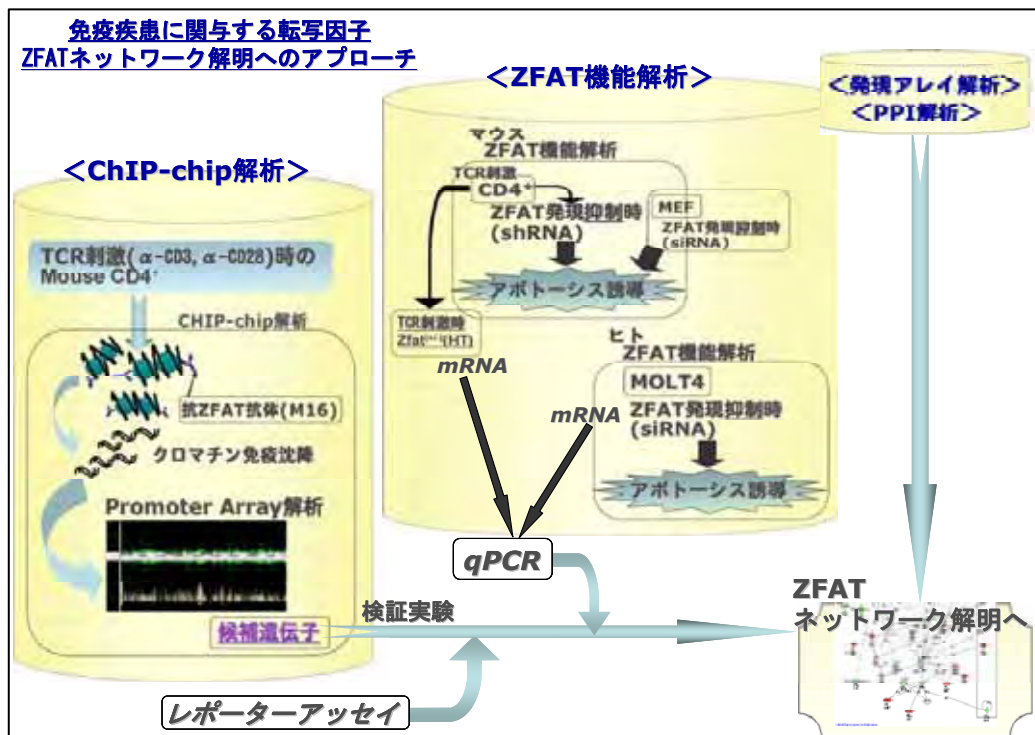
ゲノムネットワークプロジェクトの
課題の報告

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)	免疫疾患に關与する転写因子群ネットワークの解明 (Investigation and Elucidation of the Transcription Factor Network Related to Immunological Diseases)				
代表研究者名 (所属機関・職名)	白澤 専二 (学校法人福岡大学・教授)				
年度別研究費 (千円)	18年度	19年度	20年度	合計	
	40,000	40,000	35,000	115,000	
	研究者名	所属機関・部局・職		専門分野	
研究組織図	代表機関	☆ 白澤 専二	福岡大学・医学部・教授		分子細胞生物学
		藤本 崇宏	福岡大学・医学部・講師		分子細胞生物学
		小柳 緑	福岡大学・医学部・助教		分子細胞生物学
		田中 陽子	福岡大学・医学部・助教		分子細胞生物学
		馬場 賀	福岡大学・医学部・助教		分子細胞生物学
		土井 佳子	福岡大学・医学部・助教		分子細胞生物学
		高島 康郎	福岡大学・医学部・ポストドクター		分子細胞生物学
		角田 俊之	福岡大学・医学部・ポストドクター		分子細胞生物学
		中林 一彦	福岡大学・医学部・非常勤講師		分子細胞生物学
		房野 たかみ	福岡大学・医学部・教務職員		分子細胞生物学
【研究目的】					
<p>自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) 感受性遺伝子として同定したZFAT(zinc-finger gene in AITD susceptibility region)は転写制御因子をコードすると考えられる。免疫担当細胞におけるZFATを軸とした転写ネットワークの全体像を明らかにするために、(1)発現アレイ解析、(2)タンパク-タンパク相互作用解析、(3)ZFAT-DNA相互作用解析、を柱とするネットワーク解析を実施する。免疫関連疾患の病因・病態の解明、創薬ターゲットの探索を行い、先駆的な治療法の開発に資することを目的とする。</p>					
【課題の概要】					
<p>これまでに、マウスZFAT遺伝子は18個のC2H2型zinc-finger motifと1個のAT-hook motifを含む転写関連因子様タンパク質をコードし、魚類からヒトに至るまで高度に保存された遺伝子であり、ZFAT遺伝子欠損マウスは発生早期に致死となることが判明した。更に、ZFATは免疫組織（胸腺、脾臓、リンパ節、末梢血）に特異的に発現し、主にT,B細胞に発現することを確認した。また平成19年度内部評価委員会では、免疫沈降能などの優れた抗ZFAT抗体の樹立および本課題の方向性の焦点を絞るという点について指摘を受け、改善を図った。その結果、これまでChIP-chip</p>					

解析に用いていたC16抗体よりも免疫沈降能が高いM16抗体を新規に樹立し、解析に利用した。更に、マウス脾臓由来CD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激により、T細胞の芽球化に一致してZFAT発現量が一過性に亢進することを見出したことから、この単純化されたT細胞の系に焦点を絞り、ZFAT-DNA相互作用解析、ZFAT-タンパク質相互作用、ZFAT機能解析を進めることができた。マウスCD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激時のChIP-chip解析より得られた候補遺伝子のレポーターアッセイおよびqPCR等の検証実験によりZFAT制御候補遺伝子の同定を試み、ZFATを軸とした転写ネットワークの全体像を解明するための成果を産出した。またマウスCD4⁺T細胞およびヒトT細胞株MOLT4におけるZFATの機能解析からZFATの抑制によりアポトーシスが誘導されることが明らかとなり、創薬ターゲットとして期待される成果も産出し、特許出願を行った。

【平成20年8月末までの研究成果】

以下の図に示すように、①ZFAT発現および機能解析、②ZFAT-DNA相互作用解析、③PPI解析を柱とするネットワーク解析を平成18年度より開始し、以下のような研究成果を得た。



＜①ZFATの発現および機能解析＞

a. ZFATの組織別発現解析

ZFAT-C末端部位（164アミノ酸残基）を抗原とするポリクローナル抗体を樹立し、マウス免疫組織における内在性ZFATタンパクの発現量をwestern法で解析した。ZFATタンパクは調べた9種類の組織の中では脾臓および胸腺で顕著に多く、骨髄、腎臓を含む他の7組織では殆ど検出されなかった。また表面抗原で分離した細胞集団（CD19⁺B細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD11b⁺細胞など）を対象にwestern解析を行った結果、マウス脾臓およびリンパ節ではZFATはB細胞およびT細胞にほぼ特異的に発現していること、マウス胸腺ではCD4⁺CD8⁺T細胞以後の分化段階で発現が

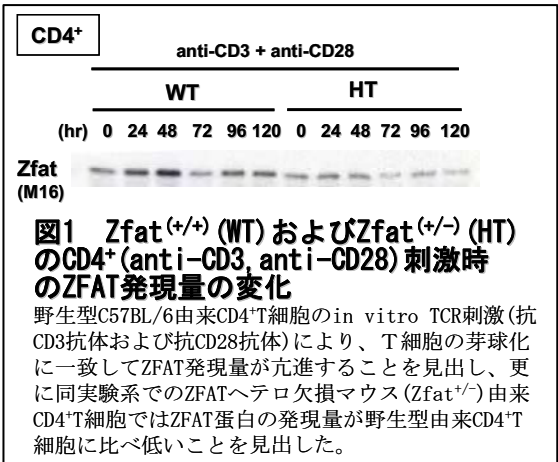
強くなることが明らかとなった (Koyanagi M, et.al. Genomics (2008), 91(5):451-7)。またヒト末梢血においてもT, B細胞に特異的に発現していた。

b. Ba/F3 cellにおけるZFAT強制発現系での遺伝子発現アレイ解析

Ontology解析ではZFATの強制発現により、発現が制御される遺伝子群には免疫に関与する遺伝子カテゴリーが、多数含まれていることが明らかとなり、ZFATが免疫応答において重要な役割を担うことが示唆された (Koyanagi M, et.al. Genomics (2008), 91(5):451-7)。

c. マウスにおけるTCR刺激時のZFAT発現解析

我々は野生型C57BL/6由来CD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激(抗CD3抗体および抗CD28抗体)により、T細胞の芽球化に一致してZFAT発現量が一過性に亢進することを見出し、更に同実験系でのZFATヘテロ欠損マウス(Zfat^{+/-})由来CD4⁺T細胞ではZFAT蛋白の発現量が野生型由来CD4⁺T細胞に比べ低いことを見出した(図1)。さらにZFATの発現を抑制するために非分裂細胞においても、遺伝子導入可能なレンチウィルスの系を導入・樹立した。CD4⁺T細胞にshRNA発現ベクターを形質導入72時間後、抗CD3抗体および抗CD28



抗体にてTCR刺激した結果、ZFAT shRNAではcaspaseの活性の誘導が示唆された。詳細に関しては現在解析中であるが、ZFATの発現・機能の抑制が活性誘導T細胞アポトーシスに対する感受性を増大させている可能性が示唆されている。

d. ヒトT細胞におけるZFAT機能解析

ZFATはヒト末梢血においてもマウスと同様にT細胞に発現が確認されていることから、ZFATが発現しているヒトT細胞由来白血病細胞株MOLT4の系においてZFATの機能解析を行った。ZFAT標的配列に対して異なる2種のsiRNA(コントロールsiRNAはそれぞれのsiRNAのスクランブル配列)をMOLT4に導入し、ZFATの発現を抑制した。その結果、ZFAT発現抑制時では細胞増殖率の低下、Sub-G1期の増加およびアポトーシス陽性細胞数の増加(アネキシンV染色)が認められた。(図2)

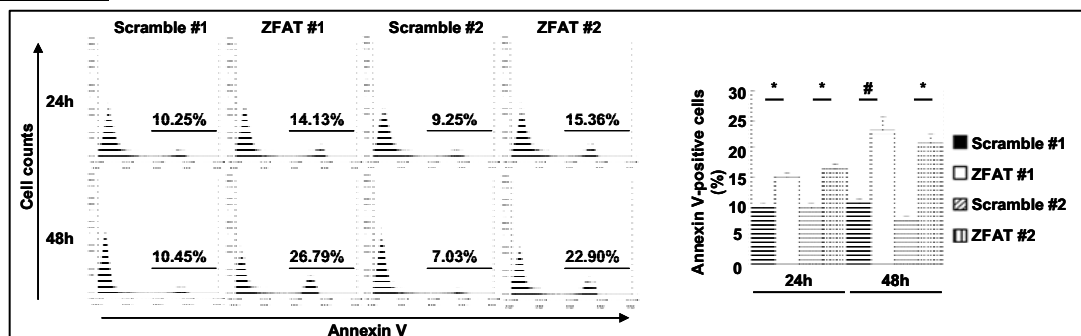


図2 siRNAによるZFAT発現抑制時のアポトーシス誘導(MOLT4)

ヒトT細胞由来白血病細胞株MOLT4においてsiRNAを用いたZFAT発現抑制時のAnnexin V染色の結果を示す。ZFAT siRNA#1および#2、コントロールとして#1および#2のスクランブル配列を用いた。いずれのsiRNAにおいてもZFATの発現を抑制することにより、アポトーシスが誘導されることが示された。

さらに詳細にアポトーシス経路について検討した結果、ZFAT発現抑制細胞群ではcaspase8およびcaspase9の活性が亢進しており、活性型caspase3においても亢進が認められ、caspase

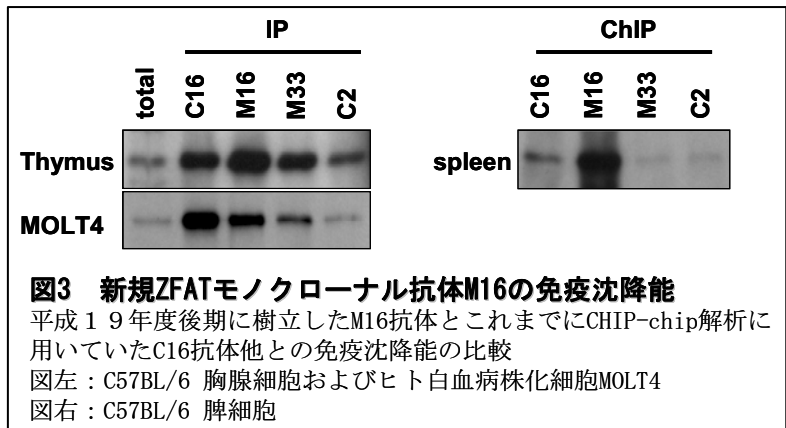
阻害剤 Z-VAD により細胞増加率の低下は完全に解消された（論文投稿中）。

以上(a~d)の結果より、ZFATの蛋白-DNA結合、蛋白-蛋白結合などの詳細な機能解析に関してはマウス脾臓由来CD4⁺T細胞のTCR刺激下の条件に焦点を絞り、免疫系転写ネットワークの解析をおこない、最終的にはヒトの系へと応用していくこととした。ZFATの抑制により誘導されるアポトーシスに関しても得られた情報と照合し、この系にて検証することとした。

<②ZFAT-DNA相互作用解析>

a. ZFAT ChIP-chip 解析

平成19年度内部評価委員会でコメントを頂いたように、変性ZFAT蛋白をよりよく免疫沈降させる抗ZFAT抗体の樹立を試みた結果、M16抗体(ZFAT 中心領域を認識)を樹立することに成功した(図3)。



この免疫沈降能の優れたM16抗体を用いてクロマチン免疫沈降(Chromatin Immunoprecipitation: ChIP)とマイクロアレイを組み合わせた網羅的な解析法であるChIP-chip法によりZFAT-DNA相互作用部位の同定を試みた。ChIP-chip解析の対象はマウスCD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激後のZFAT発現量亢進時に絞り、ChIP-chip解析とその検証実験を実施した。ZFAT ChIP DNAは白髭教授(東京工業大学)により構築されたin vitro transcription (IVT)法により増幅し、コントロールとしてRat IgGで同様の操作を行ったものを用いて、Affymetri社製GeneChip[®]Mouse Promoter 1.0R Array (25,500以上のマウスプロモーター領域の5'転写開始部位の約6kb上流から約2.5kb下流までカバー)にハイブリダイズし、TAS/IGBにて解析した。3回のChIP-chip解析を行い、重複して同定された**39の領域を候補領域**(図4)として解析を進めた。得られた**候補領域近傍遺伝子(41 genes)**に関してはさらなる検証を進めた。

b. レポーターアッセイ

まず、ChIP-chip法で得られた39個のZFAT制御候補領域について、HEK293 cellを用いてレポーターアッセイにてDNA結合能に関する検証を行った。ZFATを強制発現させたとき、39候補の内、21候補がプロモーター領域に結合することが示唆された。この21領域には、非常に興味深いアポトーシス、転写関連遺伝子が複数含まれていた。またレポーターアッセイで現在使用している約500bpの領域を縮小した領域を使用し、ZFATのDNA結合コンセンサス配列を同定していく予定である。

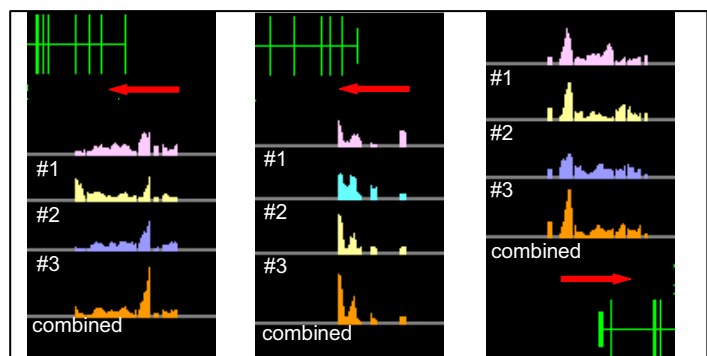


図4 M16抗体を用いたChIP-chip解析における候補領域近傍遺伝子のpositive領域

マウスCD4⁺T細胞のin vitro TCR刺激後のZFAT発現量亢進時において、M16によるChIP-chip解析を3回(#1~#3)実施した。図中の波形はプロモーターアレイ解析(TAS/IGB)による候補領域近傍遺伝子(3遺伝子)のpositive領域を示す。3回(#1~#3)を単独で解析した波形(ピンク色、黄色、青色)およびcombinedした解析の波形(オレンジ色)を示す。

c. qPCR解析

現在ZFATの発現変化により、これらの遺伝子のmRNAがどのように変化するかを2つの系にてqPCRでの検証を行っている。1つめの系では、ZFAT蛋白の発現が低下しているTCR刺激時のZFATヘテロ欠損マウス脾臓由来 CD4⁺T 細胞(図1参照)を用いた。このうち19候補遺伝子のmRNA発現量が野生型の発現量に比べて有意に低下しており、ZFATにより制御される遺伝子であることが示唆された。レポーターアッセイとの照合では**9候補遺伝子**が得られており、これらの遺伝子の蛋白発現を解析中である。ただし、このヘテロマウスを用いた系においてはZFATの発現が完全に抑制されていないために現在ではレンチウイルスshRNAを用いて完全に抑制し再検証中である。2つめの系ではMOLT4細胞を用いており、こちらも現在解析中である。最終的にそれぞれの系で発現が変動する遺伝子群をレポーターアッセイで得られた候補遺伝子と照合することで各実験系における、または総合的な転写ネットワークを解明していく予定である。

<③PPI解析 (ZFAT相互作用タンパク候補因子の解析)>

横軸グループとの連携により、M2H解析およびIVV解析でSSSCA1, LZTR1, CEBPE, NEMO, mTORが相互作用因子として同定された。そこで、これらの候補PPIを対象にIP-westernによる検証実験を施行したが、これまで試行した条件ではいずれのPPIも確認されるには至っていない。

<④ その他>

a. ZFAT ノックアウトマウスの解析

我々はZFAT欠損マウス樹立を試みたが、**胎生致死(胎生8.5日)**となることが明らかとなった。野生型マウスのembryoを用いた免疫染色では胚外中胚葉および胚外中胚葉由来血管にZFATの発現が認められ、胎生8.5日のH.E染色では胎盤形成不全が認められた。この胚外中胚葉の発生異常が胎生致死の原因であると示唆された。

b. マウス間葉系細胞でのZFAT機能解析

マウス線維芽細胞(MEF)にZFAT標的配列に対して異なる2種のsiRNA(コントロールsiRNAはそれぞれのsiRNAのスクランブル配列)を導入し、ZFATの発現を抑制した。その結果、ZFATの発現抑制により、細胞増殖率が低下し、caspase3が活性化され、アポトーシスが誘導されることが示された(図5)。

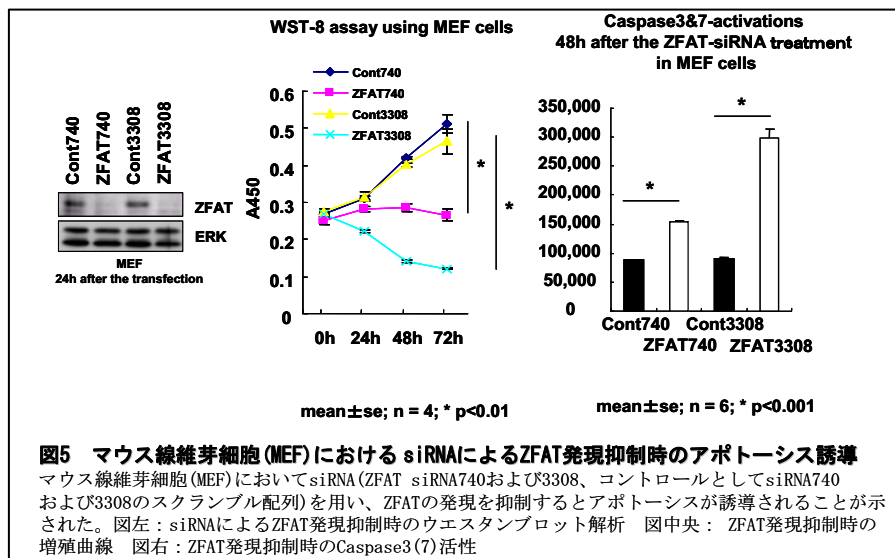


図5 マウス線維芽細胞(MEF)における siRNAによるZFAT発現抑制時のアポトーシス誘導
マウス線維芽細胞(MEF)においてsiRNA(ZFAT siRNA740および3308、コントロールとしてsiRNA740および3308のスクランブル配列)を用い、ZFATの発現を抑制するとアポトーシスが誘導されることが示された。図左: siRNAによるZFAT発現抑制時のウェスタンブロット解析 図中央: ZFAT発現抑制時の増殖曲線 図右: ZFAT発現抑制時のCaspase3(7)活性

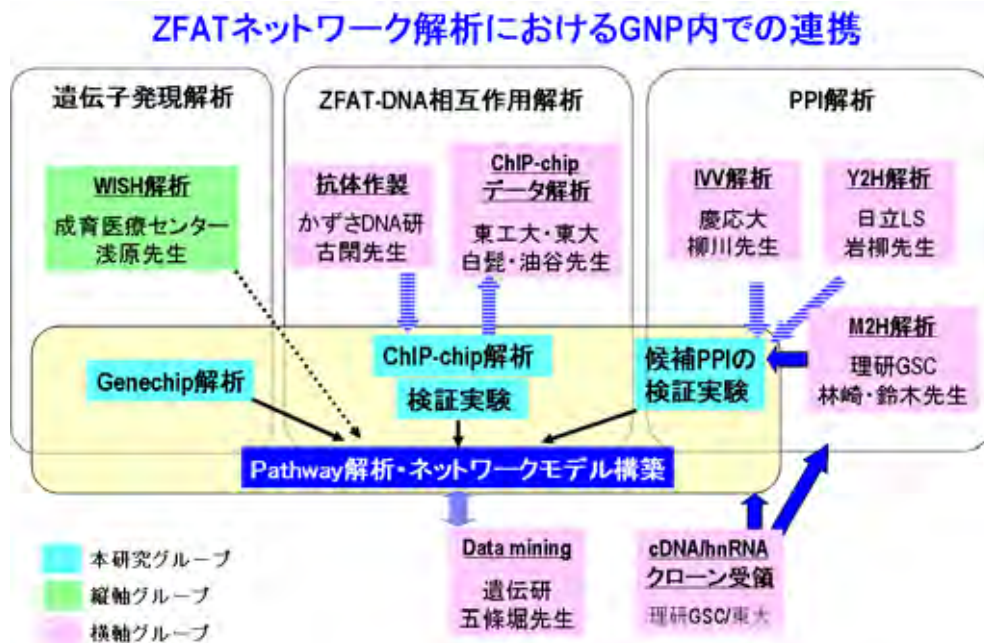
【GNPとの関連・GNPへの貢献】

a) 転写・制御の解明に関連する研究成果

本研究では免疫担当細胞におけるZFATの生物学的機能解析と転写ネットワーク解析を実施し、ZFATが免疫担当細胞でのアポトーシスにおける重要な役割を担うことを明らかにし、この系においてZFATが標的とする候補遺伝子群の同定を行うことに成功しつつあり、転写・制御の解明に直接的に貢献している。

b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

横軸グループと縦軸グループとの連携によりネットワーク解析を実施している(下図)。本研究でのZFATを軸とした転写ネットワーク解析の柱となるタンパク-タンパク相互作用解析およびZFAT-DNA相互作用解析では横軸グループによる連携から、候補相互作用因子を同定等の情報提供を受けることができた。



【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

1. 日立ライフサイエンス/岩柳グループとの連携によりY2H解析を実施した。
2. 理研GSC/林崎・鈴木グループとの連携によりM2H解析を実施し、ZFAT相互作用候補因子を複数個同定した。
3. かずさDNA研究所/古閑グループに抗ZFAT抗体の作製を依頼した。
4. 東京工業大学/白髭グループからの情報・アドバイスに基づいて、ChIP-chip解析ための条件検討などを進めた。
5. 国立成育医療センター/浅原グループとの連携によりWISH解析を実施した。
6. 慶応大学/柳川グループとの連携によりIVV解析を実施し、ZFAT相互作用候補因子を複数個同定した。

【主な研究論文とその概要】

1. ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes. Koyanagi M, et.al. Genomics (2008), May;91(5):451-7

マウスZFAT遺伝子は18個のC₂H₂型zinc-finger motifと1個のAT-hook motifを含む1237アミノ酸残基の転写関連因子様タンパクをコードし、硬骨魚類からヒトに至るまで高度に保存された遺伝子である。ZFATはマウス脾臓およびリンパ節ではB細胞およびT細胞にほぼ特異的に発現しており、マウス胸腺ではCD4⁺CD8⁺T細胞以後の分化段階で発現が強くなることが明らかとなった。さらに、マウスProB細胞株(Ba/F3)のZFAT強制発現系での発現アレイ解析では発現変動遺伝子群に免疫関連遺伝子が多数含まれることが示された。

【特許出願数の実績】

1. (出願番号) PCT/JP2008/66155
(発明の名称) ZFAT遺伝子発現抑制RNA
(出願日) 2008年9月8日
(出願人) 学校法人福岡大学
(発明者) 白澤専二、藤本崇宏、角田俊之、土井佳子、小柳緑

ゲノムネットワークプロジェクトの
課題の報告

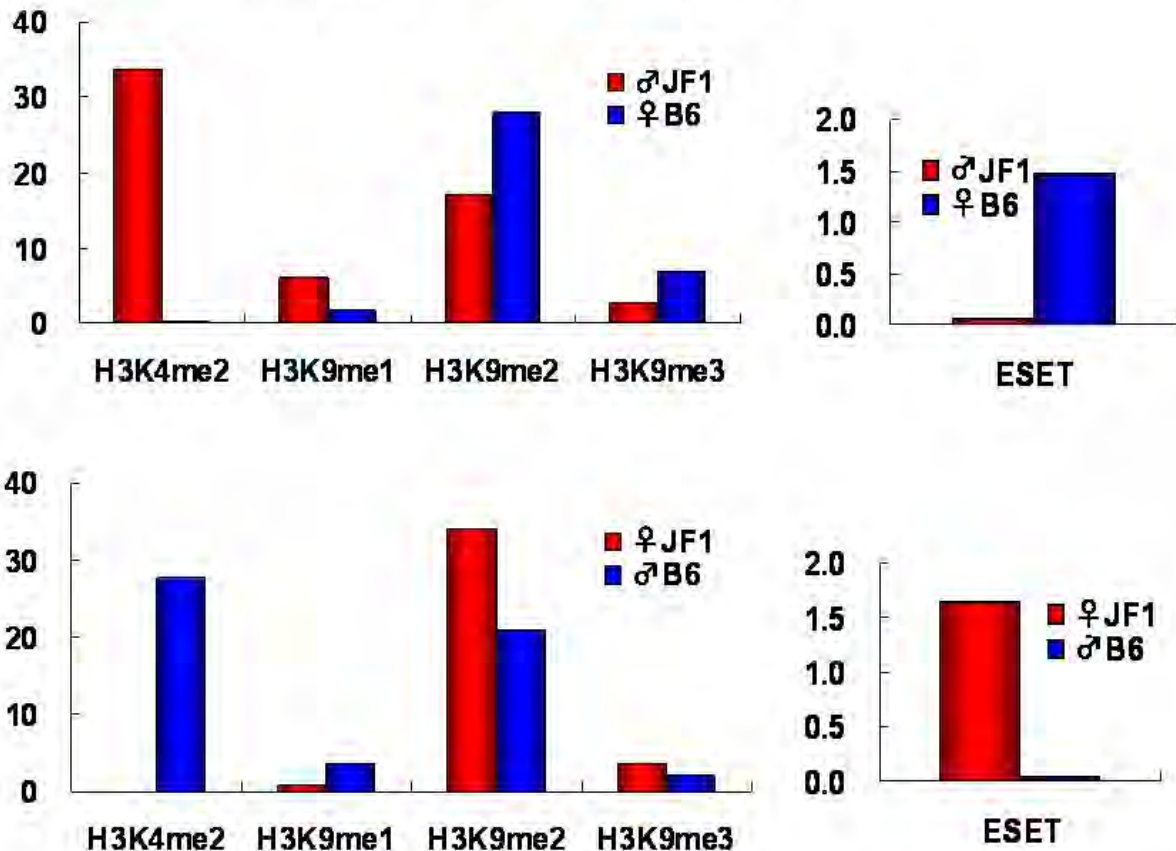
プログラム名		(1) ゲノム機能情報の解析 (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) 次世代ゲノム解析技術の開発 (4) <u>個別生命機能の解析</u> (5) 動的ネットワーク解析技術開発			
課題の分類		(1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) <u>公募課題</u>			
課題名 (和英併記)		SETドメイン分子によるゲノムネットワーク構築と生命機能制御 (Construction of Genome Network by SET-Domain Molecules and Regulation of Biological Functions)			
代表研究者名 (所属機関・職名)		眞貝 洋一 (国立大学法人京都大学・教授)			
年度別研究費 (千円)		18年度	19年度	20年度	合計
		31,000	24,000	21,000	76,000
		研究者名	所属機関・部局・職		専門分野
研究組織 図	代表機関	☆眞貝 洋一	京都大学・ウイルス研究所・教授		分子生物学
		立花 誠	京都大学・ウイルス研究所・准教授		分子生物学
	分担機関	☆ (代表研究者)			
		(分担研究者)			
【研究目的】					
<p>我々の生態機能をネットワークという観点から理解することにおいて、各細胞にヒストン化学修飾情報(ヒストンコード)をゲノムワイドレベルでモニタリングすることが強く求められている。そこで、まだ、機能が明らかにされていない、ヒストンメチル化酵素・SETドメイン分子に焦点を絞り、この分子がどのようなヒストンメチル化コードをどのようなクロマチン領域に封印するのかをゲノムワイドで解明し、どのようなクロマチン生命現象を制御するのか、さらに生体内のどのような生命機能を制御するのかをモデルマウスを作成・解析することで明らかにする。</p>					
【課題の概要】					
<p>機能の明らかにされていないヒストンメチル化酵素・SETドメイン分子の中から、SETDB1/ESET (ヒストンリジンメチル化酵素)とSETドメインサブファミリーのPRドメイン分子Prdm5, Prdm8に焦点を絞り、その分子機能と標的遺伝子の同定、生命機能における役割を明らかにする。具体的には、1) それぞれの分子に対する特異抗体を樹立 (或いは入手) し、ゲノムワイドなChIP-chip解析を行うことでその標的遺伝子或いは標的クロマチン領域を同定する、2) ノックアウト細胞及びノックアウトマウスを作成して、その表現型の解析からESET, Prdm5, Prdm8の分子機能ならびに生命機能を明らかにする。別に、SETドメイン分子の標的遺伝子・クロマチンの特異性の分子機構を明らかにする目的で、すでに解析の進んでいるヒストンメチル化酵素G9aの複合体解析から明らかにされた相互作用因子の解析を行う。具体的には、G9aと相互作用する2つのマルチ亜鉛フィンガー蛋白質の1) G9aの標的特異性における役割と、2) G9aによる転写制御における役割を明らかにする。</p>					

【平成20年8月末までの研究成果】

1. SETDB1/ESETの機能解析に関して

SETDB1/ESETに対する特異抗体を用いて、ChIP-chip解析を行った。その結果、ESETの標的候補遺伝子が同定された。大変興味あることに、それらの遺伝子の多くは、インプリント遺伝子が代表するような片方のアレルでのみ発現する遺伝子であった。遺伝子多型の存在するマウス種間のF1を用いて、ESETの標的候補インプリント遺伝子で、ESETが片親由来のアレル特異的に局在しているかどうかを検討した結果、*U2af1-rs1* (図1) および *Peg5/Neuronatin* 遺伝子上では母親由来のアレルにESETがより集積していることが明らかとなった。

図1. ESET は母親由来のU2af1-rs1遺伝子に蓄積している



現在、*ESET*をノックダウン或いはノックアウトするとこれらの標的遺伝子の片親性発現が不全になるかどうかを検討中である。また、*ESET*コンディショナルノックアウトES細胞の解析の結果、*ESET*欠損に伴って複数の種類のレトロエレメントの転写が活性化されることを見出した。興味あることに、マウスES細胞における*ESET*の欠損では、レトロエレメントを含むグローバルなDNAメチル化の低下は観察されなかった。現在、*ESET*によるDNAメチル化非依存的なレトロエレメントの転写抑制機構の実体の解明を行っている。

2. Prdm8の機能解析に関して

*Prdm8*の標的遺伝子或いはクロマチン領域を検索する目的で、ゲノムワイドなChIP-chip解析を行ったが、*Prdm8*においては*ESET*のように有意に局在している遺伝子或いはクロマチン領域を見出せなかった。別に、*Prdm8*の生命機能を明らかにする目的で、*Prdm8*ノックアウトマウスを樹立した。現在、そのマウスの表現型を解析中である。

3. Prdm5の機能解析に関して

*Prdm5*の機能を明らかにする目的で、慶応大学の柳川弘志研究室との共同研究により、*Prdm5*のPPI解析を行い、いくつかの*Prdm5*相互作用候補因子を同定した。現在、その候補因子と*Prdm5*との相互作用を*in vivo*で検証中である。

【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

現在その分子メカニズムの詳細は明らかに出来ていないが、ESETによるマウスES細胞におけるレトロエレメントの転写抑制は大変興味深い。DNAのメチル化が存在する生物では、レトロトランスポゾンの転写抑制には通常DNAのメチル化が重要であるが、ESET欠損ES細胞ではレトロエレメントを含むグローバルなDNAメチル化の低下は観察されていない。近年、植物においてはRNAi機構とヒストンメチル化修飾がDNAメチル化によるレトロトランスポゾンの転写抑制の制御に重要な役割を持つことが示されている。しかし、哺乳類では、そのような関係は明確になっていない。本研究は、哺乳類におけるレトロトランスポゾンの転写抑制メカニズムの新たな分子機構を明らかに出来るかもしれない。

b) 縦軸研究（又は横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

先に述べたように、慶応大学の柳川弘志研究室との共同研究により、Prdm分子（Prdm4, Prdm5, Prdm8, Prdm15）のPPI解析が行われ、それぞれ複数の相互作用候補因子が同定された。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

ヒト及びマウスのcDNAクローンとヒトのshRNAノックダウンクローン

【主な研究論文とその概要】

今のところまだなし。

【特許出願数の実績】

今のところなし。

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)		免疫系細胞高次機能を司るDOCK2シグナルネットワークの解明 (Elucidation of DOCK2 Signal Network in Controlling Various Cellular Functions in the Immune System)			
代表研究者名 (所属機関・職名)		福井 宣規 (国立大学法人九州大学・教授)			
年度別研究費 (千円)		18年度	19年度	20年度	合計
		40,000	40,000	35,000	115,000
		研究者名	所属機関・部局・職		専門分野
研究 組 織 図	代表機関	☆ 福井 宣規	九州大学・生体防御医学研究所・教授		分子免疫学
		田中 芳彦	九州大学・生体防御医学研究所・准教授		免疫細胞生物学
		錦見 昭彦	九州大学・生体防御医学研究所・助教		生化学
分担機関	☆ (代表研究者)				
	(分担研究者)				
【研究目的】					
<p>本研究では、受容体刺激から機能発現に至るDOCK2シグナルネットワークの全貌を解明することを目的とする。このため具体的には、① DOCK2の機能ドメイン及びそれに刺激依存のあるいは恒常的に会合する分子の同定、② DOCK2の新しい機能やその制御機構の解明、③DOCK2の細胞内動態を制御するシグナル伝達系の解明、④ DOCK2-Racシグナルによる遺伝子発現制御機構の解明を行う。</p>					
【課題の概要】					
<p>免疫系は生体にとって感染に対する必須の防御機構であるが、一方免疫応答したための病態、例えば自己免疫疾患、移植片拒絶は、現代医学が解決すべき問題としてクローズアップされている。DOCK2は線虫のCED-5、ショウジョウバエのMyoblast Cityの哺乳類ホモログであり、免疫系特異的に発現する分子である。研究代表者はこれまでに、DOCK2がケモカイン受容体や抗原受容体の下流で機能するRac活性化のマスター分子であり、その欠損により移植片拒絶や自己免疫発症が阻止できることを実証してきた。このため本研究では、受容体刺激から機能発現に至るDOCK2シグナルネットワークの全貌を解明することで、DOCK2シグナルを標的とした新規免疫抑制剤開発の分子基盤を提供することを目標とする。</p>					

【平成20年8月末までの研究成果】

1. DOCK2が好中球ケモアトラクタント受容体の下流で機能する主要なRac活性化分子であり、遊走や活性酸素産生に重要な役割を演じることを明らかにした。また、生理的な条件下でDOCK2の細胞内動態を可視化できるノックインマウスを作製して、DOCK2がPIP3と会合し、PI3K依存性に細胞膜に移行することを示した。さらに、好中球を対象に、完全長DOCK2およびその欠失変異体を発現できる実験系を確立し、これを用いて好中球遊走応答に重要な機能ドメインを新たに同定すると共に、その会合分子を明らかにした。
2. DOCK2欠損ナイーブCD4⁺ T細胞が抗原刺激に伴い大量のIL-4を分泌し、ある系統のマウスにおいてアレルギー疾患を自然発症することを見いだした。このメカニズムの詳細な解析を行い、DOCK2-RacシグナルがIL-4受容体の細胞内輸送を介してその発現をコントロールしており、過剰なIL-4シグナルがT細胞に伝わるのを未然に防ぐという、全く新しいヘルパーT細胞分化の制御機構を明らかにした。
3. DOCK2は形質細胞様樹状細胞(pDC)の遊走に不可欠なRac活性化分子であるが、骨髄系樹状細胞(mDC)の遊走には必要ではないことを見いだし、pDCとmDCではその遊走の制御機構が異なることを示した。
4. DOCK2-GFPマウスより単離した免疫細胞を用いて、刺激依存的にDOCK2と会合する分子を数種類同定し、その相互作用の生化学的解析を行った。また横軸研究と連携して、IVV法およびM2H法によりDOCK2と会合する候補分子の単離を行った。
5. DOCK2欠損T細胞と血管内皮細胞との相互作用を解析することで、DOCK2がtransendothelial migrationには必要ではないが、血管内皮細胞上での移動(lateral motility)に重要な役割を演じることを示した。また、DOCK2がT細胞のリンパ節への移入のみならず、リンパ節内での運動やリンパ節からの移出をも制御することを、多光子共焦点レーザー顕微鏡を用いて明らかにした。
6. shear stress下でT細胞のVCAM1への接着性を解析し、DOCK2よりもVavがこのプロセスに重要であることを示した。

【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

外界からの刺激に応じて一連の遺伝子群が転写されるプロセスは、転写因子やターゲットDNAとの相互作用に加えて、様々なシグナル分子やアダプター分子が関与している。それ故、「個別生命機能の解析」においては、生命高次機能を司る‘Key’となる分子を中心に、遺伝子発現に至る精緻なネットワークを解明することが求められていると理解できる。

例えば、Racはこれまでに多くの遺伝子の発現を制御することが報告されているが、その詳細なメカニズムはわかっていない。我々は、DOCK2がT細胞受容体(TCR)の下流でRacを活性化し、サイトカイン受容体の小胞輸送を制御することで、サイトカインの遺伝子発現に影響を与えることを明らかにした。この知見は、TCRのシグナルとサイトカイン受容体のシグナルとが、Rac活性化による微小管動態の制御を介して統合されており、その結果サイトカイン遺伝子発現に影響を与えることを示したもので、ヘルパーT細胞分化の制御に関する新しい概念を提唱するものである。