

b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

理化学研究所 林崎先生および慶応大学 柳川先生との共同研究として、DOCK2会合分子の網羅的解析を行い、その成果は順次GNPプラットフォームへと公開される予定である。このように本研究は、機能発現に至るDOCK2シグナルネットワークの解明に向け着実に成果をあげており、その成果は新規免疫抑制剤開発のための分子基盤を提供するものと期待される。

ゲノムネットワークプロジェクトの最終目標は、細胞の高次機能制御における精緻なネットワークマップの作成とその医学・生物学への応用と位置づけられることから、本研究はある意味これを先取りした形で実施されたものと言える。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

RNAiレトロベクターおよびcDNAの供与を受けたが、これを活用した論文データはまだない。

【主な研究論文とその概要】

1. Tanaka Y, Hamano S, Gotoh K, Murata Y, Kunisaki Y, Nishikimi A, Takii R, Kawaguchi M, Inayoshi A, Masuko S, Himeno K, Sasazuki T, Fukui Y. T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor- α subunit controlled by the Rac activator DOCK2. **Nature Immunol.** 8: 1067-1075, 2007.

抗原刺激に伴い、T細胞はTh1、Th2という異なるサイトカイン遺伝子を発現するT細胞サブセットに分化する。これまでに、T細胞受容体（TCR）を介したシグナルとIL-4受容体のシグナルとの間に何らかのクロストークが存在すると考えられてきたが、その分子実体は不明であった。我々は、DOCK2欠損CD4⁺ T細胞が抗原刺激に伴い大量のIL-4を分泌し、Th2 proneのBALB/c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。DOCK2欠損CD4⁺ T細胞においては、抗原刺激に伴うIL-4受容体のダウンレギュレーションが障害されており、その結果IL-4受容体を介したシグナルが亢進、遷延化していた。このメカニズムを解明すべく詳細な解析を行い、TCRの下流で誘導されるDOCK2-Racシグナル伝達系が、微小管動態を介してIL-4受容体の細胞内輸送とタンパク質分解をコントロールし、最終的にサイトカインの遺伝子発現を制御するという極めて精緻なメカニズムが存在することを明らかにした。この成果は、朝日新聞、日本経済新聞、毎日新聞等多くの新聞で取り上げられると共に、NHK全国版等でテレビ報道もなされた。

2. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Inayoshi A, Enjoji M, Takayanagi R, Sasazuki T, Fukui Y. Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells. **Blood** 111: 2973-2976, 2008.

樹状細胞は感染に伴い速やかに移動し、原微生物を貪食し、T細胞に抗原を提示する一方、Toll-like受容体を介して病原微生物を認識し、サイトカインを分泌することで獲得免疫応答を制御している。樹状細胞はその形態や機能、細胞表面マーカーの違いから骨髓系樹状細胞（mDC）と形質細胞様樹状細胞（pDC）に大別される。pDCはウイルス感染に伴い大量のI型インターフェロンを産生することから注目を集めている細胞であるが、その遊走制御機構は不明であった。私達はDOCK2欠損マウスにおいてpDCの分化・成熟は正常であるにも関わらず、2次リンパ組織においてpDCが著減することを見い出した。DOCK2欠損pDCではRac活性化が著しく障害されており、その結果いずれのケモカインに対してもほとんど遊走応答を示さなかった。これに対して、DOCK2欠損はmDCにおけるRac活性化や遊走応答にはほとんど影響を与えなかった。以上より、mDCとpDCの遊走において異なる分子がRac活性化を担っていることを明らかにした。

3. Kunisaki Y, Nishikimi A, Tanaka Y, Takii R, Noda M, Inayoshi A, Watanabe K, Sanematsu F, Sasazuki T, Sasaki T, Fukui Y. DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. **J. Cell Biol.**, 174: 647-652, 2006.

好中球は極めて運動性の高い、生体防御システムの最前線で機能する白血球である。これまでノックアウトマウスを用いた解析より、好中球の遊走や活性酸素産生において、Racが重要な役割を演じることが明らかにされているが、Rac活性化に関わる分子は不明であった。我々は、DOCK2 ノックアウトマウスにおいて好中球の遊走や活性酸素産生が著しく障害されていることを見いだした。DOCK2 欠損好中球では、fMLP刺激によるRac活性化が障害されており、その結果 leading edgeにおけるFアクチン及びPIP₃の集積が消失していた。さらに、DOCK2 の細胞内動態を生理的な条件下で可視化するため、DOCK2 遺伝子の最終エキソン直下にGFPを挿入したノックインマウスを作製し、このマウスを用いてDOCK2 がPIP₃と会合し、PI3K依存的に細胞膜に移行することを明らかにした。興味深いことに、DOCK2 によるRac活性化は持続したPIP₃の集積やAktのリン酸化には重要であったが、PIP₃の産生そのものには全く影響しなかった。以上より、DOCK2 は好中球の遊走において、RacとPIP₃間の正のフィードバックループで機能するRac活性化分子であるが、そのフィードバック機構はPI3Kの触媒活性を介したものではないことを明らかにした。この論文は、JCBのIn This Issue(ハイライト欄)でもとりあげられた。

【特許出願数の実績】

本研究の成果としての出願はないが、DOCK2に関しては「リンパ球遊走制御機能欠失モデル非ヒト動物」「リンパ球遊走に不可欠なDOCK2の機能ドメイン及び会合分子」として国内／国外の特許申請を行っており、うち一部はアメリカおよび日本で既に認可済みである。

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)	蛋白の可視化と機能的複合体解析で解くゲノム安定性ネットワーク (Visual and Functional Proteome Analysis of Genome Integrity Network in Human Cell)			
代表研究者名 (所属機関・職名)	安井 明 (国立大学法人東北大学・教授)			
年度別研究費 (千円)	18年度 31,000	19年度 23,000	20年度 18,000	合 計 72,000
	研究者名	所属機関・部局・職		専門分野
研究 組 織 図	代表機関	☆ 安井 明	東北大学・加齢医学研究所・教授	分子生物学
		高尾 雅	東北大学・加齢医学研究所・講師	分子生物学
		中嶋 敏	東北大学・加齢医学研究所・助教	細胞生物学
	分担機関	☆ (代表研究者)		
		(分担研究者)		
【研究目的】 ゲノムの安定性を保証する機構は生物学と医学の分野で共通する最も重要な課題の一つである。ゲノム疾患と称される癌と遺伝病のそもそもの原因はゲノムの不安定性であり、老化や神経疾患の原因にもなることが示されている。このようなゲノム疾患を防ぐヒトゲノムの安定性を保証する機構は、これまで高発癌遺伝病の原因遺伝子を中心に解析されてきたが、実際の細胞内での機構を理解するまでに至っておらず、多くの発癌原因遺伝子や早老症、老化、神経疾患の原因遺伝子がまだ見つかっていないと考えられる。この研究は、我々の独自の技術である細胞内でのゲノム損傷応答の可視化解析と、損傷の現場で働く蛋白の複合体の決定とその機能解析を融合して、既知・未知蛋白が構成する複合体の同定と機能の解明を行い、ヒト細胞内でのゲノム安定性に関わる複合体の網羅的同定と機能情報のネットワークを解明するのが目的である。				
【課題の概要】 ゲノム損傷の修復やシグナル伝達などのゲノム安定性を決定する蛋白の機能欠損は癌や老化あるいは遺伝病をもたらすが、これらの蛋白が実際の細胞内でどのように働いているかについてはまだ多くのことが分っていない。我々は最近、顕微鏡のレンズを通して細胞核に局所的にレーザー光を照射して種々の損傷を作成し、損傷に応答して集積し解離する蛋白を可視化して解析する研究方法を開発した。この方法で、細胞内でどの蛋白が何に依存してどのような損傷に集積するかを明らかに出来る。また、蛋白質が損傷に応答して形成する複合体を質量分析機で同定し、同時にその複合体の活性を解析する技術を確立した。この申請課題は、これらの方法を組み合わせて、ゲノム安定性に関わる重要なヒト蛋白複合体の構成と機能を明らかにする。さらに、こうして得られる新規蛋白質や複合体の機能的なネットワーク情報を癌、老化、遺伝病などのゲノム疾患の診断と治療に役立てる。				

【平成20年8月末までの研究成果】

この研究は、我々が開発した、レーザーによるヒト細胞核の局所照射で集積する蛋白を可視化して解析する実験方法と、損傷の現場で形成される蛋白複合体を質量分析で同定する方法を組み合わせ、細胞内で実際にゲノム安定性に機能する蛋白ネットワークを明らかにするもので、ゲノム安定性ネットワークと転写との関連にも注目して研究を展開している。これまでに、複数の重要な新規の蛋白質とその複合体の同定を含む研究成果があり、GNPのacknowledgeを持つ論文を5報（*EMBO J*, *Mol Cell*, *PNAS*がそれぞれ1報、*Nucleic Acids Res.*が2報）を既に発表し、現在、in pressの論文が2報（*J Cell Sci*, *EMBO J*）、投稿中の論文が2報、投稿準備中の論文が2報ある。今後さらに、より多くの良い論文を発表していく。

【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

GNPは転写制御のネットワークプロジェクトであるが、この研究は本来、癌や老化制御に関わるゲノム安定性に働く蛋白質間のネットワークの解明を目指している。しかし同時に、転写制御とゲノム安定性の機構に共通して働く蛋白質やそれらの転写の機構について解析を進めている。

b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

ゲノム安定性に関わる酵素活性を持ったヒト新規蛋白質（PALFやAPENX）とその複合体を決定し、それらの機能を明らかにした（APENXは新規APエンドヌクレアーゼで論文準備中）。これらは最も頻繁に生じるDNA単鎖切断の新規の修復系を示すもので、癌や神経系の疾患制御に重要であると考えられる。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

cDNAリソース。siRNAリソース。抗体作成。

【主な研究論文とその概要】

1. Hong Z, Jiang J, Lan L, Nakajima S, Kanno S, Koseki H, Yasui A. A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2939-47, 2008.

レーザー照射に集積するヒトポリコーム蛋白 PHF1 を発見し、KU 依存的に二重鎖切断修復 (NHEJ) に関わり、X 線抵抗性に貢献している事を発見。PHF1 はさらに p53 や RAD50 などと結合して、ゲノム安定性ネットワークに関わっている (古関先生との共同研究)。IP と質量分析で決定した PHF1 の PPI をデータベースに登録。

2. Kanno, S, Kuzuoka, H, Sasao, S, Hong, Z, Lan, L, Nakajima, S, and Yasui A. A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses, *EMBO J.* **26**, 2094-2103, 2007.

リン酸化ペプチドに結合する FHA ドメインを持つ新規の蛋白 PALF を発見。塩基の無い部位を切る AP エンドヌクレアーゼと 3' -5' エキシヌクレアーゼの活性があり、単鎖切断部位にギャップを作り結合している PARP1 のポリ ADP リボシル活性を活性化する。IP と質量分析で決定した PALF の PPI は重要な DNA 二重鎖および単鎖切断の修復蛋白と相互作用を発見し、データベースに登録。

3. Hashiguchi, K. Matsumoto, Y, and Yasui, A. Recruitment of DNA repair synthesis machinery to sites of DNA damage/repair in living human cells. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2913-2923, 2007.

PCNA と RFC はクランプ及びクランプロードと呼ばれる DNA 複製の進行役であるが、DNA 修復でどのように損傷部位にやって来るかを明らかにした。機能的ドメインを同定した。結論は、PCNA と RFC が相互に依存して損傷部位に集積する。

4. Kamath-Loeb AS, Lan L, Nakajima S, Yasui A, Loeb LA. Werner syndrome protein interacts functionally with translesion DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10394-10399, 2007.

良く知られているウエルナー早老症の原因蛋白である WRN が損傷の乗り越え DNA 複製に関わるポリメラーゼ h と相互作用をして、紫外線損傷などの効果的な乗り越え (translesion synthesis) に関わり合っていることを証明。

5. Prasad R, Liu Y, Deterding LJ, Poltoratsky VP, Kedar PS, Horton JK, Kanno S, Asagoshi K, Hou EW, Khodyreva SN, Lavrik OI, Tomer KB, Yasui A, Wilson SH. HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol Cell*, **27**, 829-841, 2007.

活性酸素による塩基損傷を作る新しい方法を開発して非ヒストンクロマチン蛋白の HMGB1 が損傷に集積することを可視化して証明した。

【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) 個別生命機能の解析 (5) <u>動的ネットワーク解析技術開発</u>		
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)		乳がん細胞の薬剤抵抗性に関するネットワークの動態解析 (Dynamic Analysis of Drug Resistance-related Networks in Breast Cancer Cells)		
代表研究者名 (所属機関・職名)		北野 宏明 (特定非営利活動法人 システム・バイオロジー研究機構・会長)		
年度別研究費 (千円)		19年度	20年度	合 計
		49,000	45,000	94,000
		研究者名	所属機関・部局・職	専門分野
研究組織図	代表機関	☆北野 宏明	特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構・会長	システム生物学
		松岡 由希子	同機構・研究員	コンピュータサイエンス
		松原 和子	同機構・技術員	分子生物学
		Natalia Polouliakh	同機構・客員研究員	Bioinformatics
		Samik Ghosh	同機構・研究員	コンピュータサイエンス
		藤本 尚未	同機構・技術員	分子生物学
		鈴木 顕	同機構・学生研究補佐員	分子生物学
	分担機関	☆尾山 大明	国立大学法人東京大学医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー・特任助教	プロテオミクス バイオインフォマティクス
		後藤 典子	同医科学研究所 システム生命医科学技術開発共同研究ユニット・特任准教授	癌生物学 細胞生物学
		秦 裕子	同医科学研究所 疾患プロテオミクスラボラトリー・技術専門職員	プロテオミクス
		室橋 道子	同医科学研究所 システム生命医科学技術開発共同研究ユニット・産学官連携研究員	癌生物学 細胞生物学
		☆井上 聡	学校法人埼玉医科大学 医学部・部門長	ゲノム医学・内分泌学
		池田 和博	同学部・助教	分子生物学
		☆畠山 眞里子	独立行政法人理化学研究所 基幹研究所 先端計算科学研究領域 システム計算生物学研究グループ 細胞システムモデル化研究チーム・チームリーダー	生化学 システムバイオロジー
		長嶋 剛史	同チーム・研究員	バイオインフォマティクス
		黒木 陽子	同チーム・研究員	ゲノム科学

【研究目的】

タモキシフェン感受性・非感受性乳がん細胞を用いて、リン酸化プロテオーム・遺伝子発現解析を行い、エストロゲン受容体の脱制御とEGFRシグナル伝達系に関するネットワーク要素の同定とその動態の解析を行う。乳がんシグナル伝達ネットワークのMAP化や数理モデル構築、ネットワークの摂動解析を通じて薬剤抵抗性メカニズムの解明と候補となる薬剤標的経路の同定を目指すとともに、特にマルチターゲット創薬の可能性を検討する。

【課題の概要】

具体的に、2年間で以下の事柄を到達可能にする。① 乳がんに関するシグナル伝達系ネットワークMAPの作成。② TAM感受性・非感受性MCF-7細胞についてのエストロゲン投与時、EGF添加時の状態での時系列・定量的リン酸化プロテオームの精密時系列測定によるシグナル伝達系のダイナミクス測定。③ 同様の条件下での遺伝子発現解析によるシグナル標的遺伝子と転写因子ネットワークの同定とそのダイナミクス測定。④ ②と③のデータをもとにした動的ネットワーク推定および上記MAPを利用した制御ネットワークの予測と数理モデルの構築。⑤ 摂動解析によるネットワーク解析とコンビナトリアル・セラピーの標的経路の同定。⑥ がん細胞と正常細胞のダイナミクスとロバストネスの差分の数理解析。⑦ さらに、これらの解析プロセスを明確に定義し、可能な限りシステム化することで、ゲノムネットワークの解析パイプラインの構築を目指す。

【平成20年8月末までの研究成果】

a) 動的数理モデルの構築に関して

EGFR の分子相互作用 MAP を拡張し、ER などを含めた相互作用ネットワークを構築した。現在は、その Version0.5 を作成、今後さらに強化する予定である。

ヒアリングにおいては、この MAP の構築が可能であるかが一つのポイントになっていた。実際に、EGFR と ER などをつなぐ相互作用を文献情報などから同定し、網羅性の高い MAP が完成しつつある。この MAP の作成過程で、EGFR と ER が複合体を作っているという報告をする論文が、数通発見された。これは、一般的な理解とは異なるが、複数の研究室からの報告であり、この中身に関してプロジェクトメンバー全体で吟味することとなった。また、当初は、EGFR と ER のみを含める予定であったが、いくつかの GPCR シグナル系をも含める必要があることが判明し、それらを含めた MAP となった。MAP の規模は、分子種数 449、相互作用数 282 となり、最大規模の MAP である。

b) バイオインフォマティクス、数理科学的解析について

MAP の作成過程において、プロモータ解析や発現解析を行い、相互作用の確かさの一つの傍証とした。

一方、ゲノムネットワークプロジェクトの情報基盤サイド（遺伝研管轄）の東京大学の辻井研と密に連携し、文献情報マイニングツール PathTEXT を連動させ、MAP 開発に利用するプラットフォームを構築しつつある。この連動で、MAP の部位を視覚的に確認・指定しながら、関連部位の文献情報を迅速にかつ的確に知的探索することが可能となり、MAP 開発の作業効率の向上が見込まれる。

また、実験データの解析は、各々の実験チームが第一段階の解析を行った。データ統合後にさらに全体の解析を行う予定である。

c) モデルを構築するための細胞内分子動態解析、データ生産

実験・データ産出に関しては、理研畠山チーム、東大尾山チーム、埼玉医大井上チームが担当している。基本的に順調である。特に、注記される事項としては、タモキシフェン非感受性MCF-7細胞株の樹立に成功したことがある。これは、ヒアリングの際に懸念された事項であったので、大きな前進である。樹立したタモキシフェン非感受性株6系統を解析したところ、タモキシフェン存在下においても、エストロゲン存在下においても、細胞増殖速度が亢進していることが明らかになった。また、これらのタモキシフェン非感受性株においてはESR1/ER α タンパク質の発現が亢進している傾向が観察された。また、樹立したタモキシフェン非感受性株は一つを除いて極めて似通った遺伝子発現のパターンを有しており、非常に安定している。この株を利用して、タモキシフェン抵抗性に関する研究が可能となった。また、エストロゲン枯渇耐性MCF-7細胞株も樹立できており、エストロゲン非依存性の乳癌増殖モデルを構築している。

現時点においては、MCF-7細胞を使って、遺伝子発現データ、たんぱく質リン酸化の時系列データが取得され、データ統合を開始する目処が立った。

[細胞サンプルの調整]

タモキシフェン感受性MCF-7(野生株)について、リン酸化プロテオーム解析用およびマイクロアレイ解析用のサンプル調整を行った。特に、リン酸化プロテオーム用のサンプルについては、タンパク質検出能を上げるよう培養細胞の条件やサンプル調整の段階での条件検討を行った。チロシンリン酸化解析用サンプルについては各時間点あたり10cmシャーレ約40枚、セリン・スレオニンリン酸化解析用サンプルについては10cmシャーレ約10枚を東大と共にサンプル処理条件を検討した。マイクロアレイ解析用については各時間点あたり2枚程度の細胞で良好なサンプルを得ることができた。また、タモキシフェン非感受性細胞6クローンについて、タモキシフェン投与時の細胞応答が低いものを選ぶためマイクロアレイを用いて検討し、1クローンに絞った。非感受性細胞についても野生株と同様の細胞用およびサンプル調整を行っている。

[リン酸化プロテオーム解析]

本プロジェクトにおいては、時系列データの作成に向けて、プロテオームデータを基にした相対定量データの生成及び統合を行う情報処理プラットフォームを新たに構築した。超低流速の液体クロマトグラフィーと高分解能の質量分析計がon-lineで接続されたnanoLC-MS/MSシステムはショットガン式にデータを産生し、その結果比較的容量の大きい生データが作成される。今回構築したデータ処理プラットフォームにおいては、測定によって得られる生データを基に自動で定量し、各タンパク質に関する時系列活性変動データを高速で統合・一覧化することが可能となった。さらにサンプルごとのプロテオームデータの物性情報を視覚的に比較可能にするデータ処理システムを併せて構築することにより、サンプルごとの産生データを包括的に評価し、実験条件の検討に効率的にフィードバックすることも可能になった。

プロジェクト開始当初から方法論が確立していたチロシンリン酸化の変動解析に関しては、タモキシフェン感受性MCF-7細胞におけるエストロゲン及びHRG投与後60分までの時系列データの取得が完了し、タンパク質同定検索の閾値 ($p < 0.05$) を満たす160種類のタンパク質に関して全時系列データの情報処理・統合を行った。EGFRファミリーリガンドの一つであるHRGを用いた刺激によってErbBファミリーパスウェイの主要因子の多くがチロシンリン酸化の亢進を示していた他、当該シグナルネットワーク内の主要パスウェイ上に定義できない要素も同定された。

一方、セリン・スレオニンリン酸化を含めた全リン酸化シグナル因子の解析に向けた方法論に関しては、平成19年度に10cm dish一枚分以下の初期細胞試料を用いた実験条件の検討を行い、Phos-tagアガロースによる細胞内リン酸化ペプチドの効率的な濃縮法を確立した。本方法論を用いた質量分析測定において200種類以上のリン酸化ペプチドが同定され、全ペプチドに占めるリン酸化ペプチドの割合は75%以上と効率的に測定対象を濃縮することが可能になった。現在タモキシフェン感受性MCF-7細胞に関して、上記と同一の刺激条件における全リン酸化シグナル因子に関する時系列データの取得を進めている段階である。なお、先日樹立されたタモキシフェン非感受性MCF-7細胞に関しては、現在プロテオーム解析用に安定同位体標識を導入しているところであり、こちらに必要な細胞試料が揃い次第、順次サンプル調製を行い、データを取得する予定である。

[定量ウエスタンブロッティングによるリン酸化蛋白質の時系列解析]

タモキシフェン感受性 **MCF-7** 細胞において、**HRG** 刺激によって活性化されるシグナルネットワーク上既知の鍵分子について、そのリン酸化を検出する抗体を用いた定量ウエスタンブロッティングを行い、リン酸化プロテオームで取得した時系列と同様の時系列(60分まで)で、分子のリン酸化の時系列データを取得した。**Ras/ERK** パスウェイの鍵分子として **MEK**、エストロゲンパスウェイのクロストーク鍵分子として、エストロゲン受容体のリン酸化についてデータを得た。いずれも5分以内にリン酸化レベルはピークに達し、**MEK** は一過性のピークの後早期にリン酸化レベルが低下する一方、エストロゲン受容体リン酸化は、持続的であった。現在他の複数の鍵分子も含めて、エストロゲン刺激についてもリン酸化データを取得している。今後タモキシフェン耐性 **MCF-7** 細胞において、同様の時系列データを取得し、パスウェイ上の鍵分子の動態変化を解析する。

[定量的PCR解析によるMCF7細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の動的ネットワーク解析]

エストロゲン投与後のmRNA発現レベルの制御を時間軸に沿って体系的に解明するため、MCF-7標準細胞を用いて100 nMエストロゲンで刺激し、エストロゲン投与後8点(0、1、2、3、6、12、24、48時間後)の時間経過に従ってRNAを抽出した。そのRNAを用いて横軸機関(理化学研究所：林崎研究室)との共同研究で定量的PCR法を行い、2,000個超の転写因子を中心とする遺伝子の時間軸に沿ったエストロゲンによる発現変化のデータを取得した。それら遺伝子のエストロゲンによる発現量の変化をコンピューターによりクラスター解析を行ったところ、数多くのエストロゲンによって発現上昇を示す遺伝子群が同定された。エストロゲンにより発現上昇を示す遺伝子のうち、いずれかの解析ポイントにおいて5倍以上の発現上昇を示すものは345個存在しており、それらの遺伝子に着目してデータベースによる遺伝子機能との関連付けを行った。その結果、細胞周期、RNAスプライシング、クロマチン修飾、基本転写因子、核内受容体、DNA修復、ユビキチン修飾、アポトーシス、細胞骨格などと関連する遺伝子のクラスターに分類することができた。この中で、エストロゲン受容体をはじめとする核内受容体として、**ESR2/ERβ**、**PGR**などがエストロゲンによって発現上昇することが同定された。**ESR2**遺伝子の発現が見られる乳癌では予後が良好で、ホルモン療法による治療効果が良い傾向が観察されている。また、**ESR2**遺伝子の変異は性ステロイドホルモンの生成や代謝およびシグナル伝達経路に影響を及ぼす可能性が考えられており、乳癌リスクに影響を及ぼす可能性が示唆されている。**PGR**はエストロゲン応答遺伝子として知られ、乳癌では**PGR**陽性のものは予後が良く、ホルモン療法に対する反応が良いことが知られている。これらの核内受容体の発現変化はホルモン作用および治療薬抵抗性を解析する上で基本的な情報を与えると考えられた。さらに新規の核内受容体の制御を見出し、機能解析を進めている。また、核内受容体と結合してその活性を制御するフォークヘッド転写因子ファミリーがエストロゲンによって制御されていることを見出した。

【マイクロアレイ解析】

MCF-7野生株にエストロゲンまたは成長因子を投与した時の遺伝子発現の時間変化を、Affymetrix GeneChipを用いて解析した。エストロゲンおよび成長因子投与で発現レベルやパターンの異なる遺伝子を抽出し、クラスター解析によって類似した発現パターンを示す遺伝子群に分類した。その結果、エストロゲンと成長因子によって誘導される遺伝子およびその発現パターンに大きな違いがあることが明らかとなった。また、リン酸化プロテオームと遺伝子発現（qRT-PCRとGeneChip）の統合解析の結果、両者で変動のあった18遺伝子を同定した。文献情報のデータマイニングからこれらのほとんどがエストロゲン受容体－シグナル伝達系－BRCA1パスウェイに関連することが明らかとなった。さらに、野生株とタモキシフェン非感受性株における遺伝子発現の比較を行い、これらの細胞間で発現パターンが逆相関を示す遺伝子群を同定し、そのパスウェイ解析を行った。野生株ではBRCA1、細胞周期、lyase活性を持つものが、非感受性株ではNotchシグナルやG-proteinシグナルなどシグナル伝達に参与する遺伝子が高発現していることがわかった。ウェスタン・ブロットの解析などによって、非感受性株ではエストロゲン受容体の機能変化が起っている可能性が示唆された。

d) バイオインフォマティクス、数理科学的解析と細胞内分子動態解析、データ生産の連携
7月から、データ統合作業を開始した。これは、大規模MAP上に、遺伝子発現、リン酸化プロテオーム、ウェスタン・ブロットなどのデータを統合して、その動態を描く作業である。このデータ統合を得て、シグナル伝達の実態が可視化されると共に、動的モデル構築の基盤が構築される。

【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

本研究では、転写制御ネットワークとタンパク質相互作用ネットワークの両方を包括的にモデル化しその動態を理解する方法論の確立に貢献すると考えている。

b) 縦軸研究（又は横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

情報基盤サイド（遺伝研管轄）の東京大学のチームと連携し、文献情報マイニングツールPathTEXTを連動させたMAP開発に利用するプラットフォームの構築

【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. Satre, Kemper, Oda, Okazaki, Matsuoka, Kikuchi, Kitano, Tsuruoka, Ananiadou, Tsujii. Connecting Text Mining and Pathways using the PathText Resource. LREC2008 Proceedings.
2. Ken Suzuki, Samik Ghosh, Yukiko Matsuoka, Hiroaki Kitano. A comprehensive molecular map of crosstalk between the EGFR and the ER pathways in cancer cell lines. ICSB2008, Gothenburg Convention Centre, Sweden, Aug. 24-26, 2008. (poster presentation)
3. Mariko Hatakeyama, Takeshi Nagashima, Kazuhiro Ikeda, Yoko Kuroki, Noriko Gotoh, Masaaki Oyama, Satoshi Inoue, Hiroaki Kitano. Difference and Commonality of Gene Regulatory Networks in Ligand-Stimulated Wild Type and Drug-Resistant MCF-7 Breast Cancer Cells. ICSB2008, Gothenburg Convention Centre, Sweden, Aug. 24-26, 2008. (poster presentation)
4. Masaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Noriko Yumoto, Takeshi Nagashima, Yoko Kuroki, Satoshi Inoue, Mariko Hatakeyama and Hiroaki Kitano. Time-resolved description of global phosphoproteome dynamics for network-wide exploration of novel drug targets against breast cancer. ICSB2008, Gothenburg Convention Centre, Sweden, Aug. 24-26, 2008. (poster presentation)
5. Satre, R.; Kemper, B.; Oda, K.; Okazaki, N.; Matsuoka, Y.; Kikuchi, N.; Kitano, H.; Tsuruoka, Y.; Ananiadou, S.; and Tsujii, J. PathText: Text Mining Integrated with Biological Pathway. Genomes to Systems 2008, Manchester, UK, March 17-19, 2008. (poster presentation)

【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) 個別生命機能の解析 (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) 公募課題		
課 題 名 (和英併記)		脂肪細胞・骨芽細胞分化ネットワークの再構成と特性解析 (Reconstruction and Characterization of Adipocyte/Osteoblast Differentiation Networks)		
代表研究者名 (所属機関・職名)		松田 秀雄 (国立大学法人大阪大学・教授)		
年度別研究費 (千円)		19年度	20年度	合 計
		78,000	58,000	136,000
		研究者名	所属機関・部局・職	専門分野
研究 組 織 図	代表機関	☆松田 秀雄	大阪大学・情報科学研究科・教授	バイオインフォマティクス
		竹中 要一	大阪大学・情報科学研究科・准教授	バイオインフォマティクス
		瀬尾 茂人	大阪大学・情報科学研究科・助教	バイオインフォマティクス
	分担機関	☆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
		徳澤 佳美	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・研究員	ゲノム科学
		水野 洋介	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・研究員	ゲノム科学
		仲地 豊	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・研究員	ゲノム科学
		坊農 秀雅	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・客員 准教授	生物情報科学
		山下 泉	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・大学院生	ゲノム科学
		八木 研	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・非常勤 講師	ゲノム科学
【研究目的】 脂肪細胞と骨芽細胞への分化過程における転写制御を中心とした統合的な分子ネットワークの解明を目指し、それに特化した解析アルゴリズムの開発を行う。情報解析グループと実験グループが非常に緊密に連携した体制を組んでおり、単に発現情報等から転写制御ネットワークを推定するだけでなく、ベイズ推定のスコア計算の中で実験的に確認された制御関係を重み付けすることにより、実験側からの知見を反映した高精度のネットワークの再構成を行う。さらに、得られたネットワークの構造を解析することで、ハブやクロストークに關与する重要な遺伝子を探索するとともに、それぞれの遺伝子の発現変動が与える影響を解析する。また、これらの重要な遺伝子については、それが発現している時期の周囲でタイムポイントを増やした発現測定を行うことで、その遺伝子周辺の転写制御ネットワークのさらなる詳細化・高精度化を行ってネットワークの詳細な特性を明らかにしていくことを目的とする。				

【課題の概要】

以下の分担で研究課題を実施している。

平成19年度

1. 解析用データの産生（埼玉医大）
2. 分子生物学的実験による解析結果の検証準備（埼玉医大）
3. 遺伝子ネットワーク比較解析パイプラインの構築（埼玉医大）
4. 探索対象とする転写因子の選定（阪大）
5. 逐次拡大による転写制御ネットワークの推定（阪大）

平成20年度

6. 時間遅延を考慮した転写制御関係の拡大（阪大）
7. クロストーク遺伝子の探索による両細胞分化ネットワークの統合と特性解析（阪大）
8. 分子生物学的実験による解析結果の検証（埼玉医大）

【平成20年8月末までの研究成果】

1. 解析用データの産生（埼玉医大）

発現アレイのデータについて、大阪大学との協議の結果、サンプル数を2の n 乗単位で確保する事により計算上の効率化が図れる事から、脂肪、骨芽細胞分化時の経時サンプリングのタイムポイントを再検討した。その結果、図1、表1に示すタイムポイントでサンプリングを行う事を決め、実際のサンプリングを実施した。得られたサンプルから全RNAを抽出し、Affymetrix発現アレイを用いて発現データを取得した。

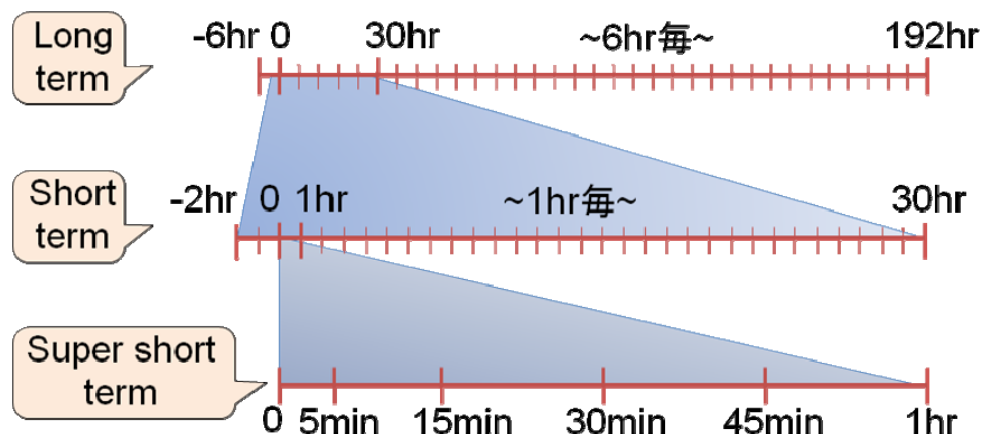


図1 発現アレイのサンプリングにおけるタイムポイント

表1 発現アレイに用いたサンプルの処理内容

処理区名	処理の内容	分化誘導の内容
Long term	分化誘導の6時間前から、分化誘導を経て、分化誘導後192時間後までの6時間刻みでサンプリング	脂肪細胞分化 骨芽細胞分化
Short term	分化誘導の2時間前から、分化誘導を経て、分化誘導後30時間後までの1時間刻みでサンプリング	脂肪細胞分化 骨芽細胞分化
Super Short term	分化誘導から5分後、15分後、30分後、45分後、1時間後のサンプリング	脂肪細胞分化 骨芽細胞分化
Control	上記タイムポイントのうちのいくつかについてサンプリング	分化誘導なし

全てのタイムポイントについて、脂肪分化誘導、骨芽細胞分化誘導の細胞サンプルを3回繰り返してそれぞれ用意した。上記の中の特定のタイムポイントについては、誘導をかけない細胞サンプルもコントロールとして3回繰り返して用意した。合計で137ポイントのサンプルを処理した。

2. 分子生物学的実験による解析結果の検証準備（埼玉医大）

解析結果を検証するためのルシフェラーゼアッセイ実験やRNA干渉実験などの分子生物学的な実験系の準備を行った。まず、マウスPPAR γ 遺伝子上流プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだものを細胞に導入し、脂肪細胞分化誘導処理することによりシフェラーゼ活性が上昇する事を確認した。また、マウス Osteocalcin遺伝子上流のRunx2応答配列を含む領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだものをRunx2遺伝子と共に細胞に導入し、Runx2応答配列がRunx2の影響を受けてルシフェラーゼ活性を上昇させることを確認した。

また、siRNAをマウスST2細胞に導入し、特定の遺伝子をノックダウンして発現量を効率よく低下させ、その結果として脂肪、骨芽細胞分化の表現型に影響を与える事が可能な事を確認した。まず、マウス Osterix遺伝子に対するsiRNAを細胞に導入することにより、内在性のOsterix遺伝子発現量が著しく抑制され、この結果骨芽細胞分化が著しく抑制される事を確認した。

次にマウスPPAR γ 遺伝子に対するsiRNAを細胞に導入することにより、内在性のPPAR γ 遺伝子発現量が著しく抑制され、この結果脂肪細胞分化が著しく抑制されることを確認した。

これらのコントロール実験を対照とすることにより、今後ベイズ推定によりネットワークに加えられる遺伝子の脂肪、骨芽細胞分化への影響をsiRNA導入実験により検証できることが明らかになった。

3. 遺伝子ネットワーク比較解析パイプラインの構築（埼玉医大）

これまでに、埼玉医大にて産出した解析用データについて、大阪大学にてデータのフィルタリングと、脂肪、骨芽細胞分化に関する既知のコアネットワーク遺伝子と発現パターンに相関のある遺伝子の抽出を行った。また、各タイムポイントにおいて顕著に発現する遺伝子を抽出し、誘導時間に応じて転写が順次起こっていく遺伝子を大阪大学にて解析した。現時点においても引き続き、大阪大学と下記のような連携を行っている。

- (1) 脂肪・骨芽細胞関連主要転写因子の発現 **perturbation** による他の遺伝子発現への影響を観察する実験を行っている。具体的には、Osterix, PPAR γ , Runx2, Dlx5, Msx2, C/EBP β / δ / α , Id4 等について、siRNA によるノックダウンや発現ベクターによる強制発現を行い、その影響を受けて発現変動する遺伝子を発現アレイを用いて探索し、得られたデータを大阪大学で解析に使用している。
- (2) 大阪大学から提示された時間遅延許容相関遺伝子ネットワークを検証する実験を行っている。
- (3) 大阪大学から提示された、一時的に顕著な発現を示す遺伝子群のデータについて、発現の関連性を検証すべき遺伝子を選定中である。
- (4) 大阪大学から逐次提示される、ベイズ推定により新たに描出されるネットワークを検証する実験を行っている。
- (5) 発現アレイデータを視覚化するツール(Maror3)を整備した。これにより、各遺伝子の発現量の経時変化プロフィールを簡単に視覚化できるようになった。また、任意の遺伝子の発現パターンと相関の高い遺伝子を表示させたり、当該遺伝子に関する情報をさらに取得するために、GEO, ENSEMBL, NetAffx 等の外部データベースへリンクを介して容易にアクセスできる環境を構築した。このシステムを大阪大学にも移植し、大阪大学でも同様の視覚化が行えるようになった。

4. 探索対象とする転写因子の選定（阪大）

転写制御ネットワークの推定のための前処理である制御遺伝子候補の選定を実施するためのシステムを開発した。本システムの選定手順は次の通りである。

Step 1. 全遺伝子中から転写因子のみを抽出

Step 2. 発現アレイデータから発現変動が大きい遺伝子を抽出

Step 3. Step 1 と Step 2 で選ばれた遺伝子の積集合を候補遺伝子として選定

Step 1 の転写因子の選定では、Gene Ontology をベースにした転写因子機能情報や発現組織情報を一部考慮している。Step 2 では研究分担機関である埼玉医科大学により計測した発現データを使用した。この発現データに対して本システムを適用することにより、339 個の制御遺伝子の候補を選定した。

5. 逐次拡大による転写制御ネットワークの推定（阪大）

遺伝子間の制御関係の推定には、ベイズ推定法を用いた。遺伝子に関する異種複数の情報を確率的表現に変換した後、確率的な意味で独立性の弱い遺伝子間に制御／被制御関係を表わす辺を引く手法である。本手法は最も尤度の高い制御ネットワークの構造を求めることが可能だが、膨大な計算時間を要すること及び、ノイズに弱いという欠点を有していた。特にノイズにより制御／被制御関係の方向が容易に反転してしまう。そこで計算時間に対しては、近似的解法を利用する事及び、推定するネットワークの規模を小さくする事で対処した。具体的には、従来の方でベイズネットワーク推定を効率的に行うためには、一度に与える遺伝子数を5個から10個程度に制限する必要があった。しかし、例えばPPAR γ に制御される遺伝子は数十個知られているため一度にネットワークを推定することは困難である。そこで本研究では、PPAR γ に対して直接的な制御／被制御関係が判明している小規模な既知制御ネットワークに対して逐次的に遺伝子を追加していく手法を開発した。追加していく遺伝子は、4. で選定したものを利用する。具体的には次の手順でネットワークを拡大していく。

- (1) マイクロアレイの時系列発現データを基に、ベイズ法でのネットワーク推定を行うことで、既知ネットワークにつながる新規の転写因子を探索
- (2) siRNAによるノックダウン、ルシフェラーゼアッセイ等で実験的に検証されれば、新たな既知ネットワークとして追加
- (3) (1), (2)を繰り返すことでネットワークを拡大

6. 時間遅延を考慮した転写制御関係の拡大（阪大）

5. の方法では、転写制御の制御・被制御の遺伝子発現に時間ずれ、すなわち制御遺伝子の発現から遅れて被制御遺伝子の発現が始まる場合には、制御関係が推定できない可能性がある。そこで、マイクロアレイ実験で使うRNAの取得を等時間間隔で詳細に行うことにより、推定時に測定タイムポイントをシフト操作によりずらししていくことで時間ずれのある制御関係の推定を可能とした。ただし、このタイムポイントのシフト操作を加えた制御ネットワーク推定をすべての遺伝子の組合せで行うことは、計算量的に困難であるため、シフト操作は5. の逐次拡大で加える遺伝子と既知ネットワークの遺伝子の間に限定し、かつあらかじめシフト操作により、既知ネットワークの遺伝子との間で発現パターン間の相関係数が向上する遺伝子をスクリーニングして絞り込むことで、選択した遺伝子のみを対象に、シフト操作を含めた制御ネットワークの推定を行った。本手法により、推定された転写制御ネットワークを図2に示す。