

平成19年度ゲノムネットワークプロジェクト実施計画案 (研究課題別)

ゲノム機能情報の解析

ゲノム機能情報の集中的解析	林崎 良英	1
ヒト全遺伝子レトロウイルス型 siRNA ライブラリの構築	秋山 徹	3
酵母ツーハイブリッド法 (Y2H) による転写因子間の相互作用の解明と 補助因子の検索・同定	岩柳 隆夫	5
<i>In vitro virus</i> 法による転写因子複合体の大規模解析	柳川 弘志	7
ゲノムタイリングアレイを用いたヒト転写レギュロームの解明	白髭 克彦	9
抗体を用いた転写因子複合体解析によるゲノムネットワークの理解	古閑比佐志	11

ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築

ヒトゲノムネットワーク情報システムの構築	五條堀 孝	13
タンパク質相互作用の変化を推定するアルゴリズムの開発	郷 通子	15
生命科学文献からの情報抽出とテキストマイニング技術の開発	宮尾 祐介	17
垂直統合型細胞内分子相互作用ネットワーク分析情報基盤の開発	北野 宏明	19

次世代ゲノム解析技術の開発

新技術を基盤とした革新的遺伝子解析システムの開発	関根 光雄	21
ショットガン戦略による高分解能メチル化ボディマッピング	伊藤 隆司	23
精子幹細胞の遺伝子改変によるがん疾患モデルラットの作成	篠原 隆司	25
転写因子に対する抗体の遺伝子免疫による迅速作製システムの開発	千葉 丈	27

個別生命機能の解析

生命を形づくる遺伝子発現機構の網羅的解析	浅原 弘嗣	29
生体においてステロイドホルモンが担うゲノムネットワークの解明	井上 聡	31
脳の時間的・空間的発現制御機構のシステム生物学	上田 泰己	33
脂肪・骨芽細胞分化ネットワークのクロストークと冗長性の解明	岡崎 康司	35
2時間を刻む生物時計に関わる遺伝子群の網羅的解析	影山龍一郎	37
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	塩見 春彦	39
個別生命機能における転写因子の機能ネットワークと疾患	高橋 智	41
運動器の形成・維持・老化に関わる遺伝子制御ネットワークの解明	高柳 広	43
細胞死シグナル分子と増殖・分化シグナル間ネットワーク機構解明	米原 伸	45
自己—非自己識別に関わる免疫系遺伝子制御ネットワークの解明	井上純一郎	47
睡眠覚醒調節に関する遺伝子発現調節ネットワークの解明	裏出 良博	49
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	太田 力	51
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	古関 明彦	53
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	相賀裕美子	55
免疫疾患に関与する転写因子群ネットワークの解明	白澤 専二	57
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	眞貝 洋一	59
免疫系細胞高次機能を司る DOCK 2 シグナルネットワークの解明	福井 宣規	61
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	安井 明	63

研究課題：ゲノム機能情報の集中的解析

研究代表者：理化学研究所ゲノム科学総合研究センター 林崎 良英

1. 当初計画・目標

転写制御ネットワークの解析パイプラインを構築する。そのために基盤リソース（完全長cDNAクローンなどの研究ツール、遺伝子発現情報qRT-PCR2,000遺伝子や転写開始点情報CAGE1,100万タグなどのプロモーターに関する情報、転写因子相互作用などの機能情報）の整備を行う。基盤リソースはコンソーシアムメンバーに提供し、プロジェクトの推進を図る。

2. 現状・進捗状況

転写制御ネットワークの解析パイプラインの構築を進め、基盤データの構築（遺伝子発現情報（2,313遺伝子のqRT-PCR）や転写開始点情報（4,300万のCAGEタグ）など）を通し、静的ネットワークのさまざまなデータ（ノードの抽出とエッジの探索）を産出し、網羅的な転写産物の同定とRNAによる新規の転写制御パスウェイを発見した。基盤（クローンリソース、基盤データ、解析技術）の整備を進め、成果はコンソーシアムに広く提供した。動的ネットワークの解析パイプラインの開発に着手しクラスターワークショップを進めている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

(1)縦横連携1『転写制御ネットワーク解析パイプラインの開発』

発現クラスターワークショップの活動を進め、転写制御ネットワーク解析パイプラインを構築する。題材として選定したヒトモノサイト様細胞株（THP-1）の分化・活性化（タイムポイント；21点）から産出した総合的なデータ（遺伝子発現、転写開始点、クロマチン情報など）の解析（インフォマティクスによる解析、ネットワーク予測、検証実験）を行う。

発現クラスターワークショップに設定した4つのワーキンググループ、①ネットワークWG、②機能性RNA WG、③クロマチンWGと④データベースWGが設定した方針に沿って研究を進める。

論文として、1)核タンパク質を中心としたダイナミック転写ネットワーク（Activity1）、2)全遺伝子に拡張したダイナミック転写ネットワーク（Activity2）、および3)サテライト論文の作成を計画している。

(2)縦横連携2『依頼解析・リソース頒布等』

H18年度に引き続き、理研が有する各種基盤（リソースと解析手法）を参加機関、とくに縦軸研究機関に提供し、縦軸研究の推進に貢献する。

連携として①CAGE等、依頼解析の実施、②cDNAクローンや理研データの提供、③縦軸主導ワークショップへの積極的な協力を進める。

特にコンソメンバーの連携の効果を生かすことができる『縦軸主導ワークショップ』はぜひ実施すべきと考える。理研が確立した最新の基盤を活用し、積極的に連携を図りたい。一方、ネットワーク研究で扱うデータは膨大であるため、インフォマティクスの分担は大きな負担となる。プロジェクト全体で、数理解析など新たなインフォマティクスグループの充実を図っていただければ、理研の経験、知識などを積極的に移転したい。

(3) 転写制御ネットワーク解析技術の高度化

ネットワーク解析の定量化に向けて、超deep CAGE法を開発する。新型高速シーケンサー (Solexa) の立ち上げと、CAGE法の最適化を行う。Solexaシーケンサーは、ランニングコストが安価な長所もっているため、定量解析に必要な量のデータの取得が可能になる。Solexaシーケンサーの読み取り長は約30ベースであるので、CAGEタグ (20ベース) を取得するためにプロトコルを改良する。

ネットワーク解析の未知のノードとなっているshort RNA (miRNA画分を除く) の解析手法と、核内タンパクの探索法の開発に着手する。

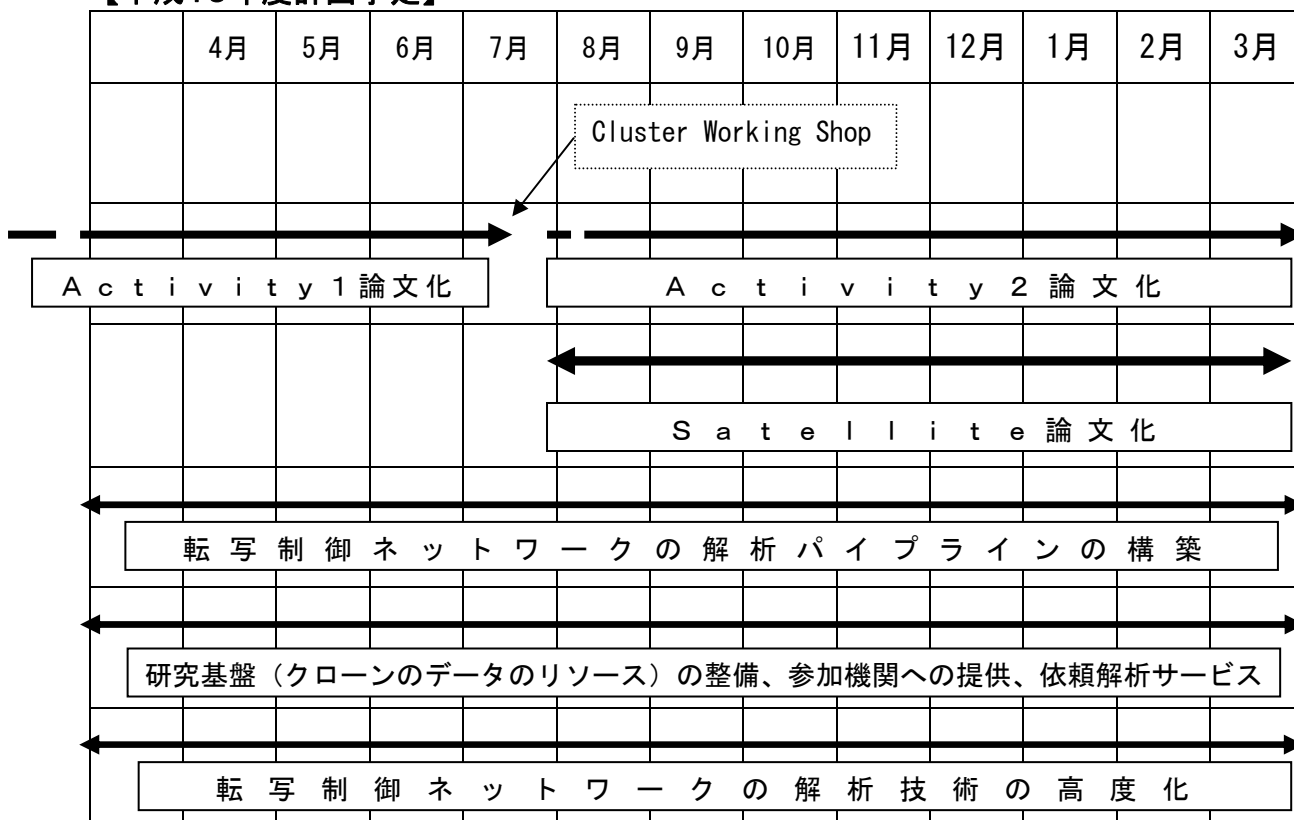
4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

われわれのGNPに対する考えは、プロジェクト開始当初から変わらず、参加機関の連携を促進し、先導的な研究成果を世に出すことである。

そのために理研は連携においても先導的な役割を果たすべく、(1) 発現クラスターワークショップ (ネットワーク解析技術の開発)、(2) 研究基盤 (クローンとデータのリソース) の整備と参加機関への提供、(3) 理研オリジナルの技術を活用した依頼解析サービスを進める

そして、これらの研究活動を通し、(1) 転写制御ネットワーク研究の先導的な研究例を達成し、モデルとすること。(2) 縦軸研究による学術的成果および知財取得の促進に貢献すること、(3) 遺伝研ゲノムネットワークプラットフォームの構築に協力し、成果の一般への普及を図ることをめざす。

【平成19年度計画予定】



研究課題： ヒト全遺伝子レトロウイルス型 siRNA ライブラリの構築

研究代表者： 東京大学分子細胞生物学研究所 秋山 徹

1. 当初計画・目標、途中計画変更等

当初計画では、(1)ヒト遺伝子レトロウイルス型 siRNA 発現ライブラリの構築、(2)ヒト遺伝子に対する KI 系を用いた siRNA 発現クローンの作製と確認、(3)siRNA を生産するレトロウイルスの調製とライブラリの評価、を予定していた。(1)と(3)については、予定を上回る成果が出ている(2. 現状、進捗状況、成果の項、参照。)。 (2)については、500 種のヒト転写因子遺伝子を標的とした siRNA 発現クローンを構築し、十分高いノックダウン活性が認められたクローンを用いて、発現が影響される転写制御因子遺伝子の発現解析を行った。計 27 種類の転写因子を標的として、ヒトの代表的な培養細胞である肝癌由来 HepG2 細胞と子宮頸がん由来 HeLa 細胞での転写制御ネットワークの解析を行ない、これらの細胞種における転写制御ネットワークの違いや共通点が見えることになり、これにより各々の転写制御ネットワークの特徴が把握できた。

2. 現状、進捗状況、成果

平成 17 年度までに、約 15,000 のヒト遺伝子に対する siRNA 発現ライブラリを構築し、これまでに約 95,000 クローンをコンソーシアムメンバーへ配布している。転写関連遺伝子を標的とするコンストラクト、約 400 を選択し、プラスミドとして HeLa 細胞および RKO 細胞にトランスフェクションして RNAi 効果を検討した結果、約 75%の遺伝子について RNAi 効果を確認することができた。従って、作製されたレトロウイルス型コンストラクトは、実際の研究に使用可能なレベルの高い品質を保持していると考えられた。また、レトロウイルスとして使用した場合にも同様に標的遺伝子の発現を抑制できることが明らかになった。平成 17 年度までに構築したライブラリには、配列設計の時点で、転写 variants が複数あり、それらすべてを同時につぶすことが困難である遺伝子に対する siRNA 発現コンストラクト、および使用していた発現ベクターの性質から、有効と考えられる siRNA を発現できるコンストラクトを作製することが不可能であったものは含まれていない。平成 18 年度 10 月から開始した計画では、残りのヒト遺伝子を中心として、siRNA 発現コンストラクトを約 5,000 の遺伝子に対して作製する予定となっている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

平成 18 年度 10 月から、残りのヒト遺伝子を中心として、計 5,000 程度の siRNA 発現ライブラリの構築を行う予定となっているが、出来る限り多くの variants をカバーできる pSUPER. retro. ベクター用の siRNA の配列設計は、すでにほぼ終了している。これまでに 4,000 以上の遺伝子を標的とする siRNA ライブラリ用のオリゴ合成が終了しており、約 2,000 程度のコンストラクトについては作成済みである。これらについては、現在シーケンス確認中であり、コンソーシアムメンバーへの配布は、平成 19 年度前半中を目処に順次開始する予定である。

**研究課題： 酵母ツーハイブリッド法(Y2H)による転写因子間の相互作用の解明と
補助因子の検索・同定**

研究代表者： 株式会社日立製作所 研究開発本部 岩柳 隆夫

1. 当初計画・目標 (〇内は、担当機関)

①縦軸研究機関からのリクエストに応じた酵母ツーハイブリッド(Y2H)解析

縦軸研究機関からのリクエストに応じたY2H解析を実施する。Y2H解析(日立製作所)、配列解析(理化学研究所)。

②GNP Y2Hデータの評価とドメイン間相互作用解析

- ・ Y2H法以外の実験手法による相互作用データのバリデーション(日立製作所)
- ・ バイオインフォマティクスによる評価(日立製作所)
- ・ 相互作用ドメインの詳細な解析(日立製作所)(九州大学)

③Y2H法による一本鎖抗体スクリーニング

GNP Y2Hにより検出された相互作用を阻害する一本鎖抗体を同法によりスクリーニング(日立製作所)。得られた抗体を用いて、H20年度には転写関連因子の機能解析を進める予定である。

④疾患関連ネットワークの抽出と創薬・診断ターゲットの選定

大規模Y2Hデータから新規シグナル伝達パスウェイの抽出を実施し、疾患との関連や、創薬・診断への応用を目標に、詳細な解析を実施する(日立製作所)。

⑤プロジェクトの総合的推進

プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、運営委員会や技術検討会の開催等、参画各機関の連携・調整にあたる(日立製作所)。

2. 現状・進捗状況・成果

計画・目標①に関しては、H16-18年度にすでに、1248 ベイトの Y2H 解析を実施し、2162 件の相互作用データをプラットフォーム公開済み。H19 年度は、特に H18 年度開始縦軸研究機関からのリクエストを優先的に進める。計画・目標②④に関しては、H16-18 年度に得られた全データが解析対象となり、すでに一部データに関しては、解析結果を報告している。計画・目標③に関しては、日立がすでに開発済みの Y2H 法による一本鎖抗体スクリーニング系を適用する。計画・目標⑤に関しては、H16-18 年度に引き続き、日立が取り纏めを行う。

3. 本年度計画(別紙添付)、当初計画・目標に対して達成の見込み

スケジュールに関しては、別紙の通り。当初計画・目標①, ②, ④, ⑤に関しては PJ 初期 3 年間にも取り組んでおり、本年度に関しても同様に実施する見込み。当初計画・目標③に関しては、スクリーニング系をすでに日立にて確立済みであるので、この系を用いて GNP Y2H 相互作用を阻害するような一本鎖抗体のスクリーニングに本年度は取り組める見込み。

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

横軸研究機関として転写因子に関連する Y2H タンパク質間相互作用 (PPI) データをコンソーシアムメンバーに提供するとともに、縦軸研究機関と連携した解析を引き続き推進する。さらに、独自にデータ解析を実施するとともに、Y2H データを取り掛かりとする新規転写調節機構解明への発展的研究を目指す。

【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
①縦軸研究機関からのリクエストに応じたY2H解析			←									→
② GNP Y2Hデータの評価とドメイン間相互作用解析	←											→
③Y2H法による一本鎖抗体スクリーニング		←										→
④疾患関連ネットワークの抽出と創薬・診断ターゲットの選定			←									→
⑤プロジェクトの総合的推進	←											→

研究課題： *In vitro* virus 法による転写因子複合体の大規模解析

研究代表者： 慶應義塾大学 理工学部 柳川 弘志

1. 当初計画・目標、途中計画変更等あればその旨記載

ゲノムネットワークプロジェクトにおける「ゲノム機能情報の解析」プログラムの一環として、プロジェクトに必要な基盤的なゲノム機能データを産出し、中核機関の産出するデータを質・量ともに強化・補完する。そのための技術開発を慶應大学理工学部と環境情報学部が連携して実施する。

2. 現状、進捗状況、成果

16-18年度では、ロボットによるPPI解析の基盤を確立し、ヒト50転写因子のタンパク質相互作用を解析し（縦軸研究機関からのリクエスト転写因子15個を含む）、約1000相互作用をコンソーシアムへ公開した。また、プルダウン検証も自動化し、信頼性は約7割であることを確認した。これは、Y2Hの大規模解析結果とほぼ変わらないレベルであった。その結果、中核機関などのM2HやY2Hを十分補完出来ることが証明できた。現在、上記成果について論文をまとめ投稿準備中である。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

（1）IVV法による大規模解析システムの構築（慶大理工 柳川弘志）

IVV法によって検出されたPPIデータに対して、選択的スプライシング情報、SNPs情報、モチーフ/ドメイン情報、疾患情報などの統合を行う。それら統合されたデータから任意の条件を満たすPPIを抽出するためのフィルタリング機能を備えたシステムを構築し、アノテーション付きの詳細なPPIデータを産出する。

（2）IVV法によるヒト転写因子のPPI解析（慶大理工 宮本悦子）

IVV法の利点である *in vitro* 解析系であることを利用して、*in vivo* 解析系では構築困難なヒト転写因子ライブラリーを作製する。また、縦軸研究機関リクエストタンパク質を中心としたPPI解析を行なうためのベイト作製を進め、リクエストタンパク質のPPI解析のための準備を行う。

（3）IVV法より得られたPPIデータの検証および複合体解析（慶大環情 斎藤輪太郎）

IVVの実験を用いて大規模スクリーニングを行って得られたPPIデータについて、他の大規模解析データの結果と比較しながら、利点や欠点を具体的にし、評価・検証してゆく。また、IVV法による結合ドメインやモチーフ解析により、複合体の結合様式を推定する。

（4）IVV法より得られるデータのスプライス・バリエーション解析（慶大理工 宮本悦子）

ヒトのPPIネットワーク（IVV、Y2H他）について、相互作用が選択的スプライシングによ

って変化すると考えられるノード（タンパク質）を網羅的に抽出する。ここで確立された解析過程は（1）で構築するシステムに組み込む予定である。

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

プロジェクトで必要な基盤的なゲノム機能データを産出し、横軸研究班が集中的に解析する転写因子関連タンパク質および縦軸研究班のリクエストタンパク質の相互作用に関するデータを質・量ともに強化・補完する。

【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
① IVV法による大規模解析システムの構築 (慶應大理工 柳川弘志)												▶
② IVV法によるヒト転写因子のPPI解析 (慶應大理工 宮本悦子)												▶
③ IVV法より得られたPPIデータの検証および複合体解析 (慶應大環境情報 斎藤輪太郎)												▶
④ IVV法より得られるPPIデータのspray・バリエーション解析 (慶應大理工 宮本悦子)												▶

研究課題： ゲノムタイリングアレイを用いたヒト転写レギュロームの解明
研究代表者： 東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター 白髭 克彦

1. 当初計画・目標、途中計画変更等あればその旨記載

以下の3点を目標として設定している。

1)ゲノムタイリングアレイ、プロモーターアレイを用いた ChIP-chip 法によるタンパク-DNA 相互作用の網羅的解析

縦軸研究者から ChIP-chip 解析依頼を受け、実施会議にて抗体の力価、幾つかの ChIP のパイロット実験の結果の提出を受け、選定された解析対象タンパクについて、ChIP-chip 解析を行う。

これらの研究と同時に効率の良い転写活性化、抑制に関わる染色体高次構造変換因子、コヒーシンおよびコンデンシン複合体、トポイソメラーゼ、Orc、インシュレータ結合因子（CTCF 等）、DNA メチル化タンパク、RNA ポリメラーゼ等の局在解析、動態解析を行う。RNAi 等の手法を用い個々の因子の転写に於ける役割、相互依存性を明らかにし、染色体構築という観点から、ヒト転写制御の全体像を解明する。

2)データ解析と転写ネットワークの体系化

株式会社三菱総合研究所とともに個々のタンパク質結合プロファイル間の相関を明らかにし、それに基づき、ゲノム上の各領域におけるタンパク群およびその変遷と動態を可視化し、転写ネットワークを体系的に理解するための情報処理システムを構築する。

3) 転写ネットワーク解析システムにより予測された制御機構の検証

2)で予測された転写制御領域の構成と連携について、縦軸研究者とともに RNAi 等の手法によりタンパクを枯渇させ、その条件下で ChIP-chip 解析を行い検証する。また、タンパク質のより詳細な動態解析を行うためにタンパク修飾、複合体情報等を解析可能な re-ChIP (-chip) 解析法を構築する。

2. 現状、進捗状況、成果

1)については、浅原等とのSox9についての論文が現在まとめられており、5月中に投稿予定である。また、CTCF、コヒーシンについても、転写、プロファイル解析を含めデータがまとめられており、6月の第1週に投稿する予定である。DNAのメチル化酵素の抗体、メチル化自身についても（幾つか良いものを得たので）1)の解析対象に加え、さらに、ゲノムワイドな局在解析を行っていく予定である。

2)については、プロトタイプ版については公開を開始できる状態にある。また、実際にプロファイル間の相関解析から、幾つかの制御機構の予測を行い、3)で述べたとおり、RNAi等の手法によ

り検証している段階にある。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

本年度計画予定（別紙としてスケジュール表で）

独自に解析を進めている15程度の因子に加え、5つの因子についてのプロファイル解析を共同研究を通して行っている。これらについてはプロモーターあるいは全ゲノムアレイを用いてゲノムワイドな局在とレギュロームの中での位置づけを行うつもりである。十分、今年度の目標は達成可能であり、既にre-chip等の新規技術開発でも成果を上げている。併せて、シーケンサーを用いた新規技術開発も行う予定である。

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

言うまでもなく、タンパク局在データは転写因子の直接のターゲットを検索する上で欠かせないものであり、当該プロジェクトにおいては、非常に重要な位置を占めていると言える。

【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
1)ChIP-chip 法によるタンパク-DNA 相互作用の網羅的解析												
2)データ解析と転写ネットワークの体系化												
3)転写ネットワーク解析システムにより予測された制御機構の検証												

研究課題： 抗体を用いた転写因子複合体解析によるゲノムネットワークの理解

代表研究者： かずさディー・エヌ・エー研究所 古閑 比佐志

1. 当初計画・目標、途中計画変更等あればその旨記載

抗体の評価方に whole mount のマウス胎児免疫染色を加え、個体発生におけるより詳細な蛋白質レベルでの発現情報をコンソーシアム内に提供できるよう努力する。

2. 現状、進捗状況、成果

平成 18 年度は実質的予算執行開始が下半期に入ってからなので、年間 200 抗体の作製には月平均 29 個の作製が必要であったが、当初は人員の配備やシステム構築にも多くの時間をとられた。担当責任者の島田研究員のもと 5 名の技術員・技術補助員が全力を傾けたおかげで、3 月末には 200 種全ての抗血清が得られる目処が立った。Western blot や免疫染色などの抗体の特異性評価という点では 19 年度に多少ずれ込むこととなったが、プロジェクト開始時期を考慮すれば、許容範囲と考える。縦軸研究との連携には特に配慮し、51 種の縦軸研究からの依頼抗体も作製中で、affinity 精製用の融合蛋白質を作製後、配布を行っていく。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み本年度計画予定

次年度もほぼ昨年度同様大きく分けて以下の 5 つの研究細目を実施する計画である。本年度と大きく異なる点は、抗体の作製数以外目標数値を本年度の 2 倍として取り組む点である。予算的にはかなりきびしいが、研究体制としては十分対応可能との判断から、このような挑戦的研究実施内容となった。加えて抗体の評価方に whole mount のマウス胎児免疫染色を加えることで、個体発生におけるより詳細な蛋白質レベルでの発現情報をコンソーシアム内に提供できるよう努力する。

- 1) 転写関連蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体の作製・評価（目標数；200種）
- 2) 抗体評価のための各種発現系の作製（目標数；60株）
- 3) 免疫沈降産物の質量分析解析による蛋白質複合体解析（目標数；20複合体）
- 4) クロマチン免疫沈降法によるDNA-蛋白質複合体解析（目標数；10沈降産物）
- 5) 上記データのデータベースへの反映

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

ゲノムネットワークプロジェクトは、現在までに様々な情報を提供してきた。その結果、非タンパクコード RNA の理解が深まる一方で、やはり転写制御という現象だけをとらえても、タンパクコ

ード RNA の理解は完全とは言えない。転写制御蛋白質に的を絞った本課題は、その蛋白質の機能解明という本来の目的に留まらず、現在進行中の研究を様々な面でサポートする位置づけにある。具体的には、Y2H や IVV 法による転写因子間の相互作用や ChIP on Chip を用いた転写制御ネットワーク解析を、内在性蛋白質で検証していく。さらに CAGE や qPCR 法, in situ hybridization 法で得られた遺伝子発現情報と、抗体による蛋白質発現情報を比較検討することで、転写後制御の理解が深まるよう研究を推し進める。加えて、個別生命機能の解析グループに対しても、抗体の供与や、依頼サンプルの解析を行なうという使命を有している。

【平成19年度計画予定】

業 務 項 目	実施期間（19年6月20日 ～20年3月31日）											
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
転写因子関連抗体の作製												→
抗体評価のための各種発現系の作製												→
蛋白質-蛋白質相互作用解析												→
DNA-蛋白質相互作用解析												→
データベース整備(所内・外)												→