

**【平成19年度計画予定】**

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
(1) 転写因子に対する抗体の 迅速作製システムの開発・改良												
(2) 転写因子に対する抗体の 作製												

**研究課題： 生命を形づくる遺伝子発現機構の網羅的解析**  
**研究代表者： 国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部 浅原 弘嗣**

**1. 当初計画、目標、途中計画変更あればその旨記載**

軟骨細胞の分化過程において四肢形成に関わる転写因子・転写コファクターを網羅的に解析するために、軟骨・骨初代培養細胞や軟骨・骨・筋肉などへの分化系培養細胞を用いた DNA マイクロアレイを行い、分化過程に置く様々な遺伝子の発現変化をプロファイリングする。また、ヒトとマウスで保存されている約 1,600 個の転写関連因子について、軟骨分化の主要な時期の開始前後におけるマウス胚を用いてホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、得られた発現パターンをデータベース化する。この中から特にユニークな発現パターンを示す新規遺伝子を選択し、それらの特異的な siRNA を用いてヒト間葉系幹細胞の分化転換系において解析する。この解析により四肢における分子機構を予測すると同時に、ノックアウトマウスを作成する候補遺伝子の選定を行う。その中で主立ったマーカー遺伝子の発現に異常を来す遺伝子、培養細胞において特に興味深い形態変化を伴う遺伝子から順にノックアウトマウスの作成および解析を行う。

**2. 現状、進捗状況、成果**

マウス胚ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションは、ヒトとマウスで保存されている約 1,600 個の転写関連因子についてほぼ全て終了し、約 2 万 5 千枚の画像データの解析および発現データベースの構築中である。さらにここから迅速に個々の遺伝子の発現パターンと共発現する遺伝子群を抽出するために、ロータリー画像取得顕微鏡システムを用い、得られた画像を自動的に立体計測するシステムの開発を行っている。現在はこれらのスクリーニングにより得られたデータの中から、特に四肢において特異的な発現パターンを示す新規の 22 個の遺伝子に着目し、間葉系幹細胞での解析に平行してノックアウトマウスの作成を進めている。前年度より引き続き進めている ChIP-on-chip アッセイによる Sox9 の制御遺伝子の検索およびヒト間葉系細胞を用いた転写制御因子スクリーニングのハイスループットアッセイの結果をもとに、現在双方から得られる情報と前述の WISH からの情報をあわせ、軟骨分化に特異的に働く遺伝子の (1) 発現パターン (2) 遺伝子カスケード (3) エピジェネティック制御機構といった複数の観点からの探索が可能となるシステムを構築している。先天性裂手症患者ゲノムの変異解析については、これらの情報をもとに現在進行中である。

**3. 本年度計画、当初計画、目標に対して達成の見込み**

間葉系細胞の分化モデルを用いた DNA マイクロアレイは既に予定通りに終了している。また、マウス胚ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションの解析結果をデータベース化し、GNP コンソーシアムおよび一般への開示を予定している。ノックアウトマウスの作成については既に 22 遺伝子中 14 遺伝子のターゲティングベクターが完成しており、本年度中に ES 細胞への導入、薬剤耐

性による選択およびマウス受精卵へのインジェクションが可能であると考えている。

#### 4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

本研究は縦軸機関として、四肢の発生において複数の網羅的な解析によって分子ネットワークを得、これまでの知見と融合させ、四肢のみならず形態形成における法則性を明らかにし、先天性疾患メカニズムの解明や再生医療に向けての基盤を確立することを目的としている。そのために、理研 FANTOM clone および東大 FLJ clone の利用、ChIP-on-chip 研究における東工大白髭研究室との連携など、他の GNP 参加機関との連携を十分に進めている。また、網羅的な発現データ等はコンソーシアムに公開し、横軸的にも貢献していきたい。

#### 【平成19年度計画予定】

業 務 項 目	実施期間 (19年4月1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	
ヒト幹細胞、骨軟骨細胞をもちいた分化誘導研究による分子生物学的解析	→												
遺伝子改変マウスの作成とそれを用いた遺伝子解析	→												
クロマチンレベルでの遺伝子発現調節機構の解析	→												
先天性骨軟骨系統疾患遺伝子解析への候補遺伝子抽出と解析	→												
ハイスループット遺伝子導入アッセイと解析	→												
WISH データベースの構築	→												

## 研究課題： 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

研究代表者：東京大学 大学院医学系研究科 井上 聡

### 1. 当初計画、目標、途中計画変更あればその旨記載

ステロイドは、代表的な内分泌ホルモンとしてヒトの生体恒常性維持に深くかかわり、その失調は乳癌、前立腺癌をはじめ各種疾患に至る。本研究ではステロイドホルモンが転写調節を介してかわるネットワークを網羅的に同定することを目標とする。計画は、(1) 転写因子のゲノム結合部位を標的としたステロイド受容体によるゲノムネットワークの同定と機能解析、(2) 生体と病態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析、(3) タンパク質ネットワークを介する新しいステロイド作用標的の網羅的探索、により進めていく。

### 2. 現状、進捗状況、成果

エストロゲン受容体のゲノム上の結合部位から近傍に標的遺伝子を同定し、その機能をネットワーク上での機能を明らかにする手法は研究者らの独自性の高いものである。当研究者は十数年以上前から一貫してエストロゲン受容体のヒトゲノム上の結合部位に注目して研究を行ってきた。この研究をゲノムネットワークプロジェクト(GNP)でさらに展開し、これら標的遺伝子の疾患、治療の診断としての新しい役割を明らかにした。本GNP研究によるアンドロゲン受容体についてのChIP-chip解析は世界に先駆けるものであり、そのネットワーク全貌の理解と臨床への応用をめざすものとして順調な成果を得ている。さらに各種ステロイド受容体ネットワークとの相互関係を視野にいれた統合的解析も進んでいる。

GNPにおける成果、貢献として以下の3点をあげる。

#### 1) 横軸-縦軸との共同研究

ChIP-chipにて横軸との共同研究を、バイオインフォマティクスに関して縦軸同士の共同研究を行い成果をすでにその一端を論文として公表してきた。さらには、クローン、siRNA、CAGE、M2HならびにY2Hで横軸機関との、密接な協力を推進している。

#### 2) 個別研究

独自に見出したエストロゲン応答遺伝子の新しい機能、疾患、診断・治療への応用の可能性における役割を明らかにした。エストロゲン、アンドロゲン、グルココルチコイド、ビタミンKの新しいネットワークを明らかにした。

#### 3) 外部への成果の公表

論文発表ならびに学会発表を複数行った。特に*J Biol Chem*の内容は同誌のPaper of the Weekに選ばれ表紙を飾るとともに新聞各紙でも取り上げられた。本研究に関しては、縦軸機関の成果として、一般、マスコミ、研究者、産業界向けにGNP公開シンポジウムにおいて発表した。

### 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

平成16年度から18年度までの成果を活かし、横軸との協力を進めつつ、ステロイドネットワークの解明にさらに研究を発展させる。アンドロゲンに関する全ゲノム解析の前立腺癌細胞におけるデータより、ネットワーク調節と個別分子標的の解析を進め、特に診断、治療標的への展開を促す。エストロゲンに関しては実際の薬剤として用いられているリガンドと受容体サブタイプとの関連でゲノムネットワーク解析を進め、遺伝子改変疾患モデル動物解析を並行して行う。アンドロゲンと共通の受容体結合配列を持つグルコルチコイド、ミネラルコルチコイド、プロゲステロンについては、アンドロゲンの成果と比較しつつ、横軸機関との密接な連携のもとにアレイやPPI解析によりその共通もしくは特異的なネットワーク機能解析を進める。これらにより各種臓器、生体ならびに癌を中心とした幅広い疾患の病態におけるステロイドの新たなネットワークの解明とその臨床への応用をめざす。

### 4. 本プロジェクトの中での研究の位置づけ

ステロイド受容体はリガンド依存性の転写因子であり、ゲノムネットワークプロジェクトによる産生データを活用し、その構築から動的ネットワークへの展開を行いうる系といえる。しかも、これらは疾患の成因、治療や診断に密接に結びついており、当プロジェクトで産生されるデータの応用としても好適と考えられる。

#### 【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
アンドロゲンの全ゲノムネットワークとその分子標的の解析	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">                     アンドロゲン受容体に関わる ChiP-on-Chip、CAGEデータの解析、標的ネットワークの機能解析                 </div>											
エストロゲンの全ゲノムネットワークとその分子標的の解析	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">                     エストロゲン受容体標的遺伝子の同定、機能解析とゲノムレベルでの標的ネットワーク解析                 </div>											
各ステロイドホルモンに共通する、もしくは特異的なゲノムネットワークの解析	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;">                     グルコルチコイド／ミネラルコルチコイド／プロゲステロン受容体結合エレメントと標的ネットワークの同定・比較と機能解析                 </div>											

## 研究課題： 脳の時間的・空間的発現制御機構のシステム生物学

研究代表者： 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 上田 泰己

### 1. 当初計画、目標

本研究の平成 19 年度以降の計画や目標は以下のとおりである。

#### (1) 様々な時間スケールについてのゲノムワイドな遺伝子発現解析

これまでのゲノムワイドな空間特異的発現制御機構の解析を発展させ、①数十分から数時間スケール、②概日スケール、③数ヶ月スケールの 3 つの時間スケールに対応する生命現象をモデルにして時間特異的発現制御機構の解析を行い、脳の制御機構の解明を目指す。

#### (2) 脳発現制御機構解明のためのインフォマティクス解析手法の開発

遺伝子発現データから未知の転写制御関係の予測を試みる。一般にこのような予測は難しいことが知られているが、本研究ではこの難問題に独立成分分析という手法を用いて取り組むこととし、新たな解析手法の開発を目指す。

#### (3) ハイスループットなスクリーニング系を用いた時間特異的発現制御機構の解析

時間特異的発現制御機構に関わる転写制御因子のスクリーニングを行い、遺伝子発現動態の理解を目指す。さらに、これまでに構築してきたスクリーニングシステムを発展させ、①転写以外の素過程のスクリーニング、②siRNA を用いた遺伝子ノックダウンによるスクリーニング、を本格的に遂行し、③1536 ウェルプレートを用いたトランスフェクションシステムの構築を目指す。

### 2. 現状、進捗状況、成果

脳のゲノムワイドな発現解析として、計 51 脳部位のサンプリングを行い、DNA マイクロアレイによる包括的な発現データの取得が完了した。さらに、いずれかの脳部位で特異的に発現量が増加もしくは減少した転写配列を計算機上で同定し、特定の部位ならびに遺伝子について *in situ* により特異的であることを検証した。

また、一度に数万サンプルのトランスフェクションアッセイ（発現制御機構のアッセイ）が可能なハイスループットスクリーニング系（384well ベース）を確立した。このスクリーニング系を用いて、朝（E-box/E'-box）・昼（D-box）・夜（RRE）の発現に必要な配列の制御に関与する遺伝子をスクリーニングし、さらに、PMT を用いた転写ダイナミクスの測定系を用いて遺伝子の過剰発現による影響を検証した。その結果、E-box の制御因子候補の中には概日時計のリズムが消失するものや、本来の周期よりも長い周期で振動するという表現型を示すものが認められ、概日時計に関与していると思われるものを得られた。

現在これらの成果の論文化や、関連特許出願の検討を行っている。

### 3. 本年度計画、当初計画、目標に対して達成の見込み

本年度は以下の項目を実施する予定である。

#### (1) 様々な時間スケールについてのゲノムワイドな遺伝子発現解析

①(数十分から数時間スケール)光応答をモデル系として、視交叉上核における光照射後の遺伝子発

現変化の包括的解析、統計的手法を用いた光応答遺伝子の抽出、新規光応答遺伝子を用いた視交叉上核における光応答の体系的な解析、②(概日スケール)日内変動を示す生理機能をモデル系として、生理機能中枢のうちの1部位についてサンプルの取得及びGeneChipによる解析、③(数ヶ月スケール)光周性をモデル系として、正中隆起・正中隆起部のサンプルの取得及びGeneChipによる解析、を行う。

**(2) 脳発現制御機構解明のためのインフォマティクス解析手法の開発**

独立成分分析を用いた発現制御関係の予測手法を開発するために、解析に用いる遺伝子セットをフィルタリングする方法の開発、遺伝子発現制御解析の予測に適した独立成分分析の適用方法の開発、解析結果の評価・解釈の方法の開発を行う。

**(3) ハイスループットなスクリーニング系を用いた時間特異的発現制御機構の解析**

cDNA ライブラリーを用いたタンパク安定性に関与する制御因子の探索、siRNA ライブラリーを用いた転写制御に関与する因子の探索、1536 ウェルプレートを用いたハイスループットスクリーニング系の検討、を行う。

**4. プロジェクトの中での研究の位置づけ**

本研究はゲノムネットワークプロジェクトの研究プログラムである「ゲノム機能情報の解析」から産出されるデータを有機的に活用し、対象となる個別生命機能を集中的にかつ独自性を持って解析し、新たな生命研究のパイロットプロジェクトとなるようなシステムの構築を視野にいれ、当該研究分野の一層の発展を目指す。

さらに、ハイスループットスクリーニングのための完全長 cDNA の精製を、理化学研究所 GSC 林崎グループに依頼しており、ゲノムネットワークプロジェクト内連携を活用する予定である。

**【平成19年度計画予定】**

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
(1) 様々な時間スケールについてのゲノムワイドな遺伝子発現解析	←											→
(2) 脳発現制御機構解明のためのインフォマティクス解析手法の開発	←											→
(3) ハイスループットなスクリーニング系を用いた時間特異的発現制御機構の解析	←											→

**研究課題： 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**  
**研究代表者： 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 岡崎 康司**

### 1. 当初計画、目標、途中計画変更

当初の計画通り、理化学研究所を中心とする横軸研究から出る大量のゲノム情報を駆使して、横軸機関や他の縦軸機関と相互に連携を行いながら、題目にある個別の生命機能についてゲノムネットワークを描出することで解明することを目的として、下記（１）～（７）のように行う。

- （１）横軸データを用いたグローバルネットワーク解析  
横軸機関による解析に必要なサンプルを調整する。横軸機関により産生されるグローバルなデータを解析し、脂肪及び骨芽細胞分化に関わるネットワークを描出する。
- （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-1  
脂肪細胞分化主要転写因子のネットワーク描出を中心として、脂肪及び骨芽細胞分化ネットワークのクロストークに関わる転写因子を探索し、その解析を行う。
- （３）脂肪及び骨芽細胞分化におけるコアネットワーク解析-2  
骨芽細胞分化主要転写因子のネットワーク描出を中心に、BMP 初期応答遺伝子等にも着目しながら、脂肪及び骨芽細胞分化ネットワークのクロストークに関わる転写因子を探索し、その解析を行う。
- （４）脂肪及び骨芽細胞分化に関与するマイクロ RNA の解析  
脂肪及び骨芽細胞分化時に発現量が変動したり、両方向への分化に影響を与えるマイクロ RNA を検索し、その解析を行う。
- （５）データ解析基盤の整備  
データ解析を行うのに必要な基盤の整備を行う。  
また、転写因子結合予測などを含めた種々の解析データを統合的に解析することにより、脂肪及び骨芽細胞分化に関わる重要な因子群を抽出する。
- （６）描出されたデータの検証  
ネットワーク解析により予測された脂肪及び骨芽細胞分化に関連のある遺伝子間の制御関係を検証する。
- （７）プロジェクトの総合的推進  
プロジェクト全体を常に見渡し、各業務間の連携を密にしながら効率的な管理運営に努める。各業務の進捗状況を頻繁に確認しながら、その効率化をさらに検討する。得られた成果は積極的に公表してゲノムネットワークプロジェクト全体の推進を図り、今後のさらなる展開に資する。

### 2. 現状、進捗状況、成果

- 上記 1 - （１） PPI, qPCR, CAGE データ等を活用して脂肪及び骨芽細胞分化に関するノードとエッジを描出した。現在は理研 CAGE 解析の新たなデータを取得しつつあり、今後得られるデータを含めて、より詳細な解析を行う。
- 上記 1 - （２） PPAR・との相互作用が示唆される転写因子が脂肪細胞分化に影響を与える事を確認した。今後は具体的な作用点の解明と生体中における役割の解明を行う。
- 上記 1 - （３） 転写因子結合領域予測方法である SAYAMATCHER とマイクロアレイ発現データの統合により、BMP 初期応答遺伝子群を探索した。今後は BMP のシグナリングカスケードにおけるそれらの遺伝子の発現調節機構を解明する。
- 上記 1 - （４） マイクロアレイを用いて各方向分化時に発現変動のあるマイクロ RNA を検出し、分化に影響を与えるマイクロ RNA を見出す事に成功した。今後はそれらのマイクロ RNA と分化の関連性を解明する。
- 上記 1 - （５） 横軸機関のデータ及び既知情報を含めてネットワークのノードとエッジを統



- 合的に描出し、さらに発現情報を反映させるプラットフォームを整えた。今後さらに他の大量データを統合的に解析できる体制を整える。
- 上記1-(6) 新たに予測された遺伝子間相互作用や調節機構をレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、RNAi 等により解明した。今後はこれらの検証過程をさらに効率よく進める系を整え、大量データより予測される新たなネットワークのノードとエッジの関連性を検証する。
- 上記1-(7) これまでに得られた結果の一部について既に特許出願や論文投稿を行った。今後はデータをさらに活用したり新たなデータを加えて一層重要な成果をまとめる。

### 3. 本年度計画、当初計画、目標に対して達成の見込み

これまで、当初の計画に基づいて研究活動を推進していくことができた。横軸データや我々が算出したデータに基づいてネットワークを描出し、脂肪細胞や骨芽細胞分化に重要な関連性を持つ遺伝子やマイクロRNAを見いだした。今後はさらに上記の計画や目標に沿って着実に研究を展開し、より重要な成果を取得していく事十分に可能であると考えられる。

### 4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

本計画では、間葉系の幹細胞が脂肪細胞と骨芽細胞という二つの方向に分化していく過程において重要な働きを持つ核酸やタンパク質の制御関係に着目している。関連性が高い二つの分化の過程において、これらの分子の制御メカニズムを大規模ゲノム情報を活用することによって明らかにし、ネットワークを描出していくという考え方はゲノムネットワークプロジェクトの中でも独創的であり、個別生命機能の解明のために大規模ゲノム情報をシステムティックに有効活用する研究のモデルケースになっていると考えている。今後は横軸機関から得られるさらに詳細なCAGEデータやChIP、PPIデータ等を活用して、より重要な成果の報告を行っていきたい。

#### 【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
①横軸データを用いたグローバルネットワーク解析	←											→
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-1	←											→
③脂肪及び骨芽細胞分化におけるコアネットワーク解析-2	←											→
④脂肪及び骨芽細胞分化に關与するマイクロ RNA の解析	←											→
⑤データ解析基盤の整備	←											→
⑥描出されたデータの検証	←											→
⑦プロジェクトの総合的推進	←											→

## 研究課題：2時間を刻む生物時計に関わる遺伝子群の網羅的解析

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 影山 龍一郎

### 1. 当初計画・目標

bHLH型転写因子Hes1はいろいろな細胞において、一方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、以下のことを行う。

#### (1)Hes1およびHes7の標的遺伝子群の網羅的探索

Hes1を強制発現した神経幹細胞、Hes1をノックアウトした神経幹細胞、および野生型の神経幹細胞からRNAを抽出し、マイクロアレー解析を行う。同様に、Hes1を強制発現したりノックアウトした胎性幹細胞、およびコントロールの胎性幹細胞からRNAを抽出し、マイクロアレー解析を行う。一方、Hes7を強制発現したりノックアウトした未分節中胚葉細胞からRNAを抽出し、マイクロアレー解析を行う。これらの解析から、Hes1およびHes7の標的遺伝子群を網羅的に同定する。

#### (2)Hes1およびHes7の標的遺伝子群の発現動態の解析

Hes1やHes7は遺伝子発現を抑制することがすでに明らかになっている。従って、発現が、Hes1を強制発現した神経幹細胞<野生型の神経幹細胞<Hes1をノックアウトした神経幹細胞、Hes1を強制発現した胎性幹細胞<コントロールの胎性幹細胞<ノックアウトした胎性幹細胞、およびHes7を強制発現した未分節中胚葉細胞<野生型の未分節中胚葉細胞<Hes7をノックアウトした未分節中胚葉細胞となる遺伝子群を同定する。これらの遺伝子について、それぞれの細胞で発現動態を明らかにする。

#### (3)Hes1およびHes7の標的遺伝子群の機能解析

上記で得られた遺伝子群について、強制発現およびノックダウン解析を行う。Hes1に関しては神経幹細胞と胎性幹細胞を、Hes7に関しては未分節中胚葉の機能にどのような変化が起こるのかを検討する。特に、神経幹細胞と胎性幹細胞については増殖能と細胞分化能を、未分節中胚葉については分節過程における影響を明らかにする。

#### (4)プロジェクトの総合的推進

上記の結果を統合して計画を推進する。

### 2. 現状、進捗状況、成果

上記の(1)についてすでにマイクロアレー解析を行っており、結果が出つつある。

### 3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

上記の研究計画は、本年度中に達成される見込みである。

### 4. プロジェクトの中での研究の位置付け

本プロジェクトで解析している短周期生物時計は、細胞分化や増殖と深く関わっていることが明らかになってきている。上記の研究成果は、細胞分化・増殖を制御する転写因子ネットワークの理解につながる。