

【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
①Hes1およびHes7の標的遺伝子群の網羅的探索												
②Hes1およびHes7の標的遺伝子群の発現動態の解析												
③Hes1およびHes7の標的遺伝子群の機能解析												
④プロジェクトの総合的推進												

研究課題： 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

研究代表者： 徳島大学 ゲノム機能研究センター 塩見 春彦

1. 当初計画・目標 途中計画変更等あればその旨記載

途中計画変更なし

2. 現状、進捗状況、成果

RNAi 関連の研究を発展させ、特に、RNAi において標的遺伝子を特異的に認識するガイド分子である siRNA や miRNA といった小分子 ncRNA の生合成経路、新規小分子 RNA の同定およびこれらの生合成経路の解明においてはこの数年大きく貢献してきた。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

(1) 脆弱X遺伝子産物と相互作用する小分子RNAの同定。

脆弱X遺伝子産物FMR1が形成する複合体に特異的に存在する小分子RNAのクローニングとその配列解析が達成できる見込みである。

(2) Argonaute蛋白質と相互作用する小分子RNAの同定。

ヒトArgonaute蛋白質 (AGO1, AGO2, AGO3, AGO4) の内、少なくともAGO1とAGO2に相互作用する内在性小分子RNAの同定・単離が達成できる見込みである。

(3) miRNAによるin vitro翻訳抑制系の構築。

培養細胞を用いてmiRNAによる翻訳抑制機構を解析する実験系の確立が達成できる見込みである。

(4) p16遺伝子領域由来non-coding RNAの機能解析。

p16遺伝子領域から発現する約600塩基長のnon-coding RNAの機能の理解が達成できる見込みである。

(5) siRNAレトロウイルスライブラリーの活用。

中核機関（東京大学）が提供するsiRNAレトロウイルスライブラリーを用いて、細胞ガン化／老化に関与する転写因子の同定を行い、幾つかの候補を同定することが達成できる見込みである。

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

小分子 RNA が関与する遺伝子発現抑制機構を総称して RNA サイレンシング (RNA silencing) と呼ぶ。ここ数年、RNA サイレンシングに関する新しい生物学の発見が続いているが、小分子 RNA が転写後のみならず、DNA のメチル化やヘテロクロマチン化に関与し、つまり、転写レベルの遺伝子発現制御機構にも直接関与していることが明らかとなって来た。また、RNA サイレンシングはエピジェネティクスにも関連しており、今後、ゲノムネットワークプロジェクトにおいても重要な分野になっていくことが予想される。

【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
① 脆弱X遺伝子産物と相互作用する小分子RNAの同定												
② Argonaute蛋白質と相互作用する小分子RNAの同定												
③ miRNAによるin vitro翻訳抑制系の構築												
④ p16遺伝子領域由来 non-coding RNAの機能解析												
⑤ siRNAレトロウイルスライブラリーの活用												

研究課題： 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

研究代表者： 筑波大学 大学院人間総合科学研究科 高橋 智

1. 当初計画・目標

本研究では、相互に機能を分担および相補するファミリーを形成する転写因子間ネットワーク（1次ネットワーク）と、タンパク質の相互作用（物理的会合やリン酸化）や標的結合配列の共有・競合によって形成される転写因子群間ネットワーク（2次ネットワーク）の個体発生や疾患形成における機能を明らかにするために、相互にネットワークを形成するTGFBR-Smadファミリー、Shnファミリーおよびb-Zip型転写因子であるATF-2とLarge Mafファミリーについて、個体レベルで解析を行うことを目標とした。

2. 現状、進捗状況、成果

これまでの3年間の研究で、実施責任者の高橋と、分担研究者の石井、加藤との緊密な共同研究体制により、TGF- β -Smadシグナルが、以前の研究で明らかとなっていたShn転写因子群に加え、b-Zip転写因子群であるATF-2や大Maf群転写因子ともネットワークを形成することを分子レベルで解明した。またいくつかの転写因子欠損マウスが、ヒト疾患のモデルマウスとなることを明らかにし、転写因子と表現型の間に存在するゲノムネットワークを同定した。これらの成果はMol. Cell. Biol. 2005、Dev. Cell 2006、Cell Metabolism. 2006、Mol. Cell. Biol. 2006に掲載された。研究計画は順調に進行しており、マウスの表現型やヒト疾患発症に至る新たなネットワークを同定している。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

19年度は、これまで作製した遺伝子改変マウスや、改変マウス由来の細胞を用いて、表現型に至るゲノムネットワークを詳細に解析する。さらに、今後2年間の重点課題として、ヒト疾患発症ネットワークの解明への展開を行う。解析に必要な遺伝子改変マウスを既に樹立されており、また遺伝子改変マウスで表現型発症に至る新たなネットワークを同定しており、当初計画・目標は十分達成できる予定である。

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

本研究プロジェクトでは、相互に作用する Smad、Shn、ATF-2、大 Maf 等の転写因子の機能的ネットワークを個体レベルで解析しており、GNP の横軸研究機関で同定された生化学的なタンパク質間相互作用や、プロモーター情報等の生体での機能的意義を検証することで、プロジェクトへの貢献を目指している。その手段として、転写因子欠損マウスで表現型の得られている臓器において、野生型マウスとの DNA マイクロアレイ比較のデータを、ゲノムネットワークの統合データベースに順次登録する計画を、国立遺伝学研究所と進めている。既に作製または導入した遺伝子改変マウス

の一部は、縦軸研究の高柳代表および浅原代表の研究グループに供与しており、縦軸研究間での相互協力を推進している。また浅原グループとは、転写因子の発現解析より重要と予想される転写因子について、遺伝子改変マウスの作製を共同で行う予定である。本研究で新たに同定した蛋白質間相互作用のデータをデータベースに登録する予定である。

【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
① Smad4を介した転写ネットワークの解析				←								→
② ALK-5D266Aノックインマウスの表現型解析	←											→
③ E2-2とそのファミリー分子群の解析	←											→
④ Schnurri (Shn) ファミリー変異マウスの表現型解析	←											→
⑤ ATF-2 ファミリー変異マウスの解析	←											→
⑥ MafA の転写制御ネットワークの解明	←											→
⑦ マクロファージ分化・機能発現における大 Maf 群転写因子の特異性、冗長性の同定	←											→

研究課題：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
研究代表者：東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 高柳 広

1. 当初計画・目標、途中計画変更等

高齢化社会が進展する中、生活の質に直結する運動器疾患の克服は医療上の大きな課題である。本業務課題では、骨・関節を構成する破骨細胞や骨芽細胞などを主な研究の対象とし、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析によって得られる遺伝子発現情報をもとにして、横軸研究で得られる情報を運動器分野において活用し、当該生体系において発現する遺伝子発現制御機構をネットワークとして理解することを目的とする。

2. 現状、進捗状況、成果

これまで破骨細胞および骨芽細胞における転写因子 NFATc1 の重要性を示してきた。これらの成果をもとに、現在、細胞分化に伴う NFATc1 の標的遺伝子および DNA 結合の動態を検討するため、横軸機関との連携の上で以下の研究を展開している。①骨格系細胞のトランスクリプトーム及びプロテオーム解析-網羅的な遺伝子発現情報（トランスクリプトーム、プロテオーム）の解析の結果、破骨細胞および骨芽細胞の分化に伴い発現上昇する遺伝子を NFATc1 をはじめ、いくつか抽出することに成功している。得られた網羅的な遺伝子発現情報と PPI 解析結果の大規模な統合を試みており、これまでに c-Fos や NFκB を中心とした破骨細胞分化段階における動的転写因子ネットワークを観察している（中核機関及び、慶応義塾大学・柳川弘志博士との連携）。②破骨細胞及び骨芽細胞の CAGE 解析-破骨細胞分化誘導系より経時的に調整した RNA サンプルを用いて中核機関と連携で解析中。③ChIP on chip 解析-破骨細胞分化に重要な転写因子 NFATc1 を対象にした ChIP on chip 解析を中核機関と連携で実施中である。④転写因子欠損細胞を用いたトランスクリプトーム解析-NFATc1 をはじめ骨格系細胞の分化に重要な転写因子のノックアウトマウスから細胞分化誘導系により経時的に調整した RNA サンプルを用いて、該当転写因子の特異的標的遺伝子を探索中である。⑤骨格系細胞における新規遺伝子の同定と機能解析-トランスクリプトーム解析により抽出した候補遺伝子の *in vitro* における過剰発現または発現抑制に伴う効果を検討中。これら *in vitro* の結果をもとに *in vivo* での機能解析を行うため、ノックアウトマウス作成業務を既に開始している。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み、本年度計画予定

①これまで得られたトランスクリプトームデータの精度を経時的測定ポイントを増やすことで上げるとともに、さらに、タンパク質レベルでの発現量変化についてプロテオーム解析を基盤にした解析を継続するとともに、特定の転写因子の複合体解析等のフォーカスドプロテオーム解析も予定している。さらにPPI解析と重要な転写因子のPDI解析も進行しており（慶応義塾大学・柳川弘志博士との連携）、これらの情報も併せて解析することで動的かつ機能的なネットワークの解明が可能となる。②破骨細胞及び骨芽細胞の分化誘導時におけるCAGE解析を実施（すでに破骨細胞サンプルについては中核機関に送付済み）し、細胞分化に伴い発現が変動する遺伝子のプロモーター構造の解析を行う。得られた骨格系細胞のCAGEデータを、これまでに中核機関から報告されている他の細胞株のCAGE解析データと比較し、骨格系細胞特異的に用いられているプロモーター構造の同定及び骨格系細胞特異的なncRNAの解析を予定している。さらに①で作製される統合データベースをCAGE解析結果も含んだリソースに拡充する。③骨格系細胞分化に重要な転写因子の作用機序を明らかにするために、プロモーター領域のカタログアレイを用いてChIP on chip解析を行う（東京工業大学・白髭克彦博士との連携）。同時に、骨格系細胞のCAGE解析によって明らかとなるプロモーター情報とトランスクリプトーム解析結果を参考にして、骨格系細胞特異的なオーダーメイドアレイ

研究課題：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

研究代表者：京都大学生命科学研究科 米原 伸

1. 当初計画、目標、途中計画変更あればその旨記載

本研究では、染色体の凝集異常が新たな転写誘導を介して新規細胞死を誘導する分子機構を解明し、細胞死（アポトーシス）シグナル分子である caspase や FLIP という分子が生体分子ネットワークに依存する転写の誘導と調節を介して細胞増殖・分化・死を制御する未知の分子機構を解明することを目的とする。

A) 染色体の凝縮異常によって生じる二核細胞に誘導される新規細胞死の分子機構を、CNBPの作用によるeEF1A1の発現抑制という現象から解明する。

B) デスレセプターFas下流でアポトーシスの阻害に関わる分子caspase-8, caspase-10, viral FLIP E8が転写を介して細胞の増殖に関与する分子機構を解明する。

C) TGF- β が細胞増殖抑制・分化を誘導するか、細胞死を誘導するかについて、SlugとBimの転写調節や活性化調節を介して振り分ける分子機構を解明する。

2. 現状、進捗状況、成果

A) 染色体の凝縮異常によって生じる二核細胞が新たな転写誘導を介して新規細胞死（caspaseに依存しない）を誘導する分子機構として、ハウスキーピング遺伝子eEF1A1 (EF-1 α)の翻訳抑制が必須の分子機構として機能しており、この翻訳抑制がmRNAに結合するCNBPタンパク質の活性化によって誘導されることを示してきた。

B) Fasを代表とするdeath receptorからのアポトーシス誘導に必須の分子caspase-8とその相同分子caspase-10について、ヒトT細胞の増殖にcaspase-10が、マウスT細胞の増殖にはcaspase-8が必須であることを明らかにしつつある。また、Fasを介するアポトーシスの誘導をcaspase-8活性化の上流で阻害する分子viral FLIP E8が β -catenin安定化の下流でTCF依存性転写を上昇させることにより、Wntシグナルを強く増強することを示してきた。

C) TGF- β がB細胞に対して、Bimを介してアポトーシスを誘導するシグナルと、Slugを介してそれを阻害するシグナルの両方を導入することを明らかにしてきた。

3. 本年度計画、当初計画、目標に対して達成の見込み

A) 我々が見いだしてきた新規細胞死がより一般的な現象であることを示すために、新しい方法で染色体凝縮を誘導するヒト細胞系を構築する。また、CNBPが活性化する分子機構を解析するとともに、活性化したCNBPが結合するmRNAを網羅的に同定することにより、転写開始点直下のmRNAの構造を介する翻訳抑制による動的ネットワークをCNBPが実行している実態を明らかにする。

B) ヒトcaspase-10やマウスcaspase-8発現抑制時に転写量の変わる遺伝子をDNAアレイ法によって網羅的に同定し、細胞増殖に関与する転写産物を解明していく。そして、ヒトcaspase-10やマウスcaspase-8がどのように細胞増殖に関わる転写調節に関与しているかという、未知のネットワークの実態を提示する。また、E8と会合する可能性を示している候補分子の強発現や発現抑制（shRNA発現）を行い、Wntシグナル下流のTCF依存性転写へどのような影響を示すか、可溶性Wnt3aの処理とルシフェラーゼアッセイを用いて明らかにする。

研究課題： 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

研究代表者： 東京大学医科学研究所 井上 純一郎

1. 当初計画・目標

T細胞の自己-非自己識別の確立に必須な胸腺上皮細胞の分化において、二種類の転写因子NFκB複合体、p50/RelAとp52/RelB、が形成する遺伝子制御ネットワークを提唱することを目標とする。計画1) p50/RelA及びp52/RelBの発現と活性化状態の時空間的解析、計画2) p50/RelA及びp52/RelBの標的遺伝子の同定、計画3) p50/RelA及びp52/RelBと相互作用する転写因子等の同定。

2. 現状、進捗状況、成果(上記各々の計画別に記載)

計画1) 蛍光タンパク質RelA-mRFP、RelB-Venus融合タンパク質を発現するノックインマウス作製のための相同組替えヘテロES細胞株の単離に成功した。

計画2) Affymetrix マイクロアレイの結果、胎生 15.5 日および 17.5 日において、インターフェロン誘導性の遺伝子群が TRAF6 と NIK の両方に依存して発現することを見出した。インターフェロン誘導性遺伝子群の胸腺形成における機能やTRAF6とNIKが関与するシグナル経路間のクロストークの存在を示唆している。また、発現がNIK依存性RelB非依存性の遺伝子が多数得られたことから、NIKが関与するもののNon-classicalなNFκB活性化を誘導しない新規シグナル経路の存在が示唆された。

計画3) 標的遺伝子産物及び相互作用タンパク質の機能評価を目的とした胸腺上皮細胞におけるRNAi実験に用いるレンチウイルスを調製し胸腺上皮細胞株への遺伝子導入に成功した。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

計画1) 2種類のノックインマウスの作成を完了する。作成したマウスを用いて、胸腺上皮細胞分化過程におけるRelAとRelBの時空間的な発現と活性化を把握する。また、作成したマウスとTRAF6ノックアウト、RelBノックアウト及びNIK不活化型変異(aly変異)マウスを交配する。FACS等を用いてRelAまたはRelBを発現する上皮細胞を分取する。ノックインマウスの作成において、時間の予測が多少困難なステップがあるが、そこを通過すれば、その後は計画が実行されると考えている。

計画2) マイクロアレイで抽出した約1000遺伝子のうち、ある程度機能が推定できる遺伝子群についてRT-PCRでその発現を確認する。横軸研究の柳川グループと連携して、抽出された遺伝子群を基に機能的なネットワークを推定するとともにプロモーターの構造を解析する。マイクロアレイの結果は、NIKとRelBが独立した異なるシグナルに関与することを強く示唆している。この発見を確かめるため、aly/alyかつRelBノックアウトのマウスを作成し、胸腺の構造と機能を解析する。当初の計画をほぼ達成する予定である。

計画3) RelAまたはRelBを発現する細胞から抗Myc抗体または抗FLAG抗体を用いた免疫沈降