

研究課題： 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

研究代表者： 財団法人大阪バイオサイエンス研究所 裏出 良博

1. 当初計画・目標

高等動物にとって睡眠は、生存していく上で必須の生命現象である。それにも関わらず、睡眠がどのようなメカニズムにより調節されているかはほとんど分かっていない。本研究では、睡眠時に発現が変動する遺伝子を網羅的に解析し、睡眠覚醒を制御する遺伝子発現調節ネットワークを解析する。さらに、睡眠中に脳内で起きる脳機能の回復や記憶の選別と定着のメカニズムに関与する遺伝子発現変化を転写制御の観点から明らかにし、睡眠を調節する薬剤開発のための新たな標的分子を提供する。

2. 現状、進捗状況、成果

睡眠誘発物質であるプロスタグランジン D₂ およびアデノシン A_{2A} 受容体アゴニストである CGS21680（コントロールは人工脳脊髄液）をマウスの脳室内に投与し、自然な睡眠状態になったことを脳波および筋電図で確認した。これらのマウスの脳から、大脳皮質、視床下部および海馬を単離し、RNA を抽出後、DNA チップ解析を開始し、現在、解析を進めている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

DNA チップ解析によって得られた候補遺伝子の発現を定量 PCR により確認するとともに、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、脳内の発現部位を特定する。さらに、候補遺伝子タンパク質の相互作用関係を明らかにし、また、候補遺伝子のプロモーター領域を同定して、シス配列を明らかにし、結合する転写調節因子を同定する。

既に DNA チップ解析は実施しており、候補遺伝子の絞込みを行っている。また、並行して、本年度実施計画に基づき、定量 PCR と *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現部位特定も行っている。これは、当初計画・目標どおりである。

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

我々は小型実験動物用の睡眠測定システムや脳波解析システムを開発し、客観性のある定量的な睡眠解析が可能である。従って、これらの睡眠解析システムを用いることにより、自然な睡眠時における脳内の遺伝子発現変化の解析を行い、睡眠覚醒調節に関する遺伝子発現調節ネットワークを解明することが可能である。さらに得られた結果と転写調節関連因子のタンパク質間相互作用情報やプロモーター情報などのゲノムネットワークプロジェクトの横軸研究機関がもつ情報・解析手法と密接な連携を持つことにより、睡眠という個別現象における遺伝子発現制御ネットワークを解明する。

研究課題： 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

研究代表者： 国立がんセンター研究所 太田 力

1. 当初の計画・目標

ゲノム DNA は核内では浮遊して存在しているのではなく、核内構造体に一部の DNA 領域を結合させた状態で存在することが知られている。最近、この構造体付着 DNA 部分はクロマチンの“足場”として機能していることに加えて、足場と足場の間に存在する複数の遺伝子は一つの独立した転写調節単位（転写ユニット）として高次構造的な発現調節が行われていることが示唆されはじめている。そこで、この“足場 DNA”の網羅的な検索を行いゲノム上における複数の遺伝子を含む転写ユニットの情報を得ることを目指す。さらに、この情報を用いてゲノム構造異常によって引き起こされる転写ユニット異常という新しい視点から癌関連遺伝子を探索することを目的とする。

2. 現状、進捗状況、成果

これまでに、モデル研究として癌由来の培養細胞 HeLa から“足場”領域の DNA を抽出し、プラスミドに連結させ、“足場”領域の DNA ライブラリーを作製した。現在、このライブラリーの約 6 割の塩基配列の解読が完了し、解読できた“足場”領域の DNA をゲノム上にマッピングを行っている。

3. 本年度の計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

本年度としては (1) 作製した“足場”領域の DNA ライブラリーの残り 4 割の塩基配列の解読を行う。(2) 解読した“足場”領域の DNA をゲノム上にマッピングし転写ユニットを推定する。(3) 他の癌由来の培養細胞の“足場”領域の DNA の変化を探索する(なお本年度計画予定は別紙参照)当初計画していたライブラリーの塩基配列解読の結果からゲノム上にマップできない配列が予想以上に見つかりライブラリーの解析数を増加させたため、解読完了に時間が掛かっている。

4. プロジェクトの中での研究の位置付け

私の研究はプロジェクトの中では縦軸研究として行っているが、今後、“足場”領域の DNA から推定される転写ユニットのデータは、他の横軸および縦軸の研究に利用されることが期待される。足場”領域の網羅的探索が完了した後、これらの配列データの開示を行いたいと考えている。

【平成19年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
①ヒトゲノムからの足場DNAの同定												
②ヒトゲノムから転写ユニットの同定												
③他の癌由来の培養細胞の“足場”領域のDNA の変化を探索												

研究課題: 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

研究代表者: 理化学研究所 免疫・アレルギー総合科学研究センター 古関 明彦

1. 当初計画の変更等

変更なし。

2. 3. 現状、進捗、成果、本年度計画

(1) 胚性幹細胞(ES細胞)をモデルとして用いた多能性維持に必要なエピジェネティックネットワークの解明

本研究では、Stat3の下流で機能すると考えられるES細胞維持に必要な転写制御因子に焦点を絞って解析を行った。この転写制御因子をES細胞においてコンディショナルにノックアウトすると、ES細胞は多能性と自己複製能を喪失し、ある方向へと分化していく。この転写制御因子のクロマチン結合部位を検索すると有意にポリコム群の結合部位と相関があったため、ポリコム群であるRing1A/Bをコンディショナルに二重欠損するES細胞とこの転写制御因子のコンディショナルノックアウト細胞における遺伝子発現変化を系統的に解析した。その結果、全体でみても遺伝子発現パターンの変化は統計学的に有意に相関することが明らかになった。さらにGO解析を行うと、発生、転写因子、転写制御、パターン形成などのキーワードを有する遺伝子群や、LIF経路、Notch経路において特に高い相関が見出された。これらのことから、この転写因子とポリコム群とは、ES細胞の形質を維持する上で、相互作用していることが考えられた。それが、エピスタティックな相互作用であるかを明らかにするために、クロマチン免疫沈降を行った。その結果、ポリコム群をノックアウトしても転写制御因子のクロマチンは明らかな影響を受けないものの、この転写制御因子をノックアウトするとポリコム群のクロマチン結合は抑制され、その結果標的遺伝子群の脱抑制がおこってくることを明らかにした。また、この制御は、ポリコム群とこの転写制御因子の直接的な結合を介していることが示された。すなわち、この転写制御因子は、その転写制御メカニズムとしてポリコム群を用いていることが示された。

(2) 生体内の組織幹細胞におけるクロマチン状態を解析するための実験システムの構築

ビオチン結合ドメインをポリコム群のひとつであるRing1Bに導入したES細胞を作成し、現在までにキメラマウスを作成している。また、標的遺伝子座にノックインし、ビオチンリガーゼをCREリコンビナーゼによって幹細胞特異的に発現させるための、ノックインES細胞を樹立しキメラマウスを作成した。ES細胞レベルでは、ポリコム群タンパクは十分にビオチン化されストレプトアビディンカラムを用いて、精製可能である事を示した。

4. プロジェクトの中での位置づけ

様々な変異 ES 細胞を用いた発現プロファイリングデータおよび ChIP-on-Chip データを GNP の他グループに対し供給することにより、バイオインフォマティクス研究と実験生物学研究の相互作用を触媒する。

【平成19年度計画予定】

①計画工程表												
計画項目 (所要経費)	実施期間 (19年4月～20年3月)											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
各種ES細胞を用いた発現プロファイリングとChIP-on-Chip解析	←											→
データマイニング			←									→
各種ノックインマウスの交配	←											→
新規ノックインマウスの作成	←											→

研究課題： 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

代表研究者： 国立遺伝学研究所 相賀 裕美子

1. 当初計画・目標、途中計画変更等あればその旨記載

哺乳類生殖細胞の性分化に関わるゲノムネットワークを解析する。特に雄性生殖細胞に特異的に発現し、その後の分化に重要な機能をもつ Nanos2 タンパク質は RNA 結合タンパク質であり、RNA の制御をとおした遺伝子発現制御ネットワークの解明を目指す。

2. 現状、進捗状況、成果

Nanos2 ノックアウトマウスにおける GeneChip を用いた発現解析により、減数分裂に特異的な遺伝子の発現上昇が確認され、細胞レベルでの発現変化もいくつかの遺伝子で確認した。しかし Nanos2 欠損細胞はアポトーシスにより失われるため詳細な解析が困難である。そこでアポトーシス促進因子である BAX 遺伝子欠損マウスとのダブルノックアウトマウスを用いた解析を目指して現在マウスを増産中である。一方、雌の生殖細胞は胎生期に減数分裂を進行させることが知られているが、Nanos2 を胎生期の雌生殖細胞に強制発現させたところ、正常な減数分裂が抑制された。さらに、それら Nanos2 を発現した雌の生殖細胞の核の性状や遺伝子発現のパターンを解析した結果、雄性生殖細胞に特異的な性質を示すことから、Nanos2 は、生殖細胞の雄への性分化に重要な役割を果たすことが明らかになった。Nanos2 の標的遺伝子を解析するため、現在抗体を用いた免疫沈降により RNA を回収し GeneChip を用いた解析を行なっている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

概ね予定どおり進行すると期待しているが、Nanos2 上流解析を介した生殖細胞の性分化を誘導するシグナル系の解析は難航しそうである。

4. プロジェクトの中での研究の位置づけ

Nanos2 は転写因子ではないが、RNA の翻訳抑制を介して、非常に重要な遺伝子制御を行なっていることが想定されており、マイクロアレイ、抗体沈降実験による Nanos2 を核にした RNA ワールドの解析により、生殖細胞に特異的な RNA サイレンス機構が明らかになると考えている。プロジェクトの中では、多少異質なものになると思うが次世代のゲノムネットワーク研究を先取りした解析になると考えている。

【平成19年度計画予定】

d) 平成19年度の所要経費												
①計画工程表												
計画項目 (所要経費)	実施期間 (19年4月～20年3月)											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
生殖細胞の性分化を誘導するシグナル系の解析	←											→
nanos2ノックアウトマウスの解析	←						→					
nanos2/Baxダブルノックアウトマウスの解析					←							→
nanos2の機能解析	←											→

研究課題：免疫疾患に關与する転写因子群ネットワークの解明

研究代表者：福岡大学 医学部 白澤 專二

1. 当初計画・目標：

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、創薬ターゲット発見、治療法開発の基盤となる成果を目指す。

2. 進捗状況、成果：

H18年度よりZFATネットワーク解析系の構築を開始し、主に以下の成果を得た。

- **発現アレイ解析系の確立：** ZFAT(またはTRZFAT)を過剰発現させたマウスpro-B細胞株(BaF3)をAffymetrix GeneChip mouse 430_2 arrayで解析し、発現変動遺伝子群の同定とGene ontology解析を行った。ZFATにより発現が抑制される遺伝子群に免疫関連遺伝子が特に高頻出することを見出した。
- **ZFAT相互作用因子：** 横軸との連携によるY2H/M2H解析で、少なくとも5つの候補を同定した。
- **ChIP解析：** これまでに作製した抗ZFAT-monoclonal抗体から、クロマチン変性条件化でも抗原認識能を保持するクローンを選別し、BaF3を材料に沈降DNAを得た。ChIP-chip解析（Affymetrixマウスプロモーターアレイを使用）を行い同定されたポジティブ領域の検証実験を開始した。

3-1. 本年度計画

- **ZFAT発現様式の解析：** ZFATの免疫系での発現様式（組織・細胞タイプおよび免疫刺激条件）を調べる。正常マウス個体（無刺激および免疫刺激後）および必要に応じてZFATトランスジェニックマウス、ZFATヘテロマウス(*Zfat*^{+/-})などを解析対象とする。
- **発現アレイ解析：** 細胞株を用いて同定したZFAT制御遺伝子群 に対するパスウェイ解析を実施し、発現変動遺伝子群の既知情報からのZFAT機能モデル構築を試みる。また、マウス由来免疫担当細胞を対象とする発現アレイ解析を行う。
- **ZFAT相互作用因子の同定：** H18年度にM2Hなどで同定したZFAT相互作用候補因子の検証実験（IP-western法など）を実施する。また、共精製によるZFAT相互作用因子の検索を開始する。
- **ZFAT-DNA相互作用解析：** 細胞株を材料とするChIP-chip解析を実施し、ZFAT候補相互作用ゲノム部位の検証実験（ChIPアッセイ、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイなど）を経て、ZFATのゲノム標的部位を同定することを目指す。実験系が確立できたらマウス由来免疫担当細胞を解