

ゲノム機能情報の解析**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 オミックス基盤研究領域 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 (cDNA クローンなど研究ツール、プロモーター領域、転写因子相互作用などのヒトゲノム機能情報) 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、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。

また、動的ネットワークの解析パイプラインの開発を行い、クラスターワークショップを進めた。具体的には、ヒトモノサイト様細胞株 (THP-1) を題材に、ヒト免疫細胞の分化における、CAGE による遺伝子発現プロファイル、マイクロアレイによる遺伝子発現情報、クロマチン構造情報、リアルタイム PCR による遺伝子発現情報、タンパク間相互作用などの多種のデータを経時的かつ系統的に収集し、プロモーター活性をゲノムワイドにプロファイリングした。それらのプロモーター情報をベースに転写因子結合モチーフの活性解析を行い、モチーフ間の制御関係から遺伝子制御ネットワークを描くことができた。また、モチーフとその制御関係を蓄積したエッジデータベースを作成した。THP-1 に関する一連の実験から得られた short RNA データ、クロマチン情報、Po12、SP1、SPI1 のマイクロアレイデータ、リアルタイム PCR、PPI データは、プラットフォームからコンソーシアムメンバーに開示した。新技術開発の一環として、次世代新型高速シーケンサーを、高温多湿な気候でも稼働できるように機構に工夫を加え、また、ライブラリ作成方法を新規に開発するなど、初期的な調整から立ち上げ、超deep CAGE、short RNA等のデータを得られるようになった。

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』**

今後検証実験や追加実験を行い、モチーフ間の制御ネットワークモデルの改良を行い、論文化とその投稿、さらに基本データベースのデータをもとに、サテライト論文作成と投稿を行う。

(2) 縦横連携 2 『依頼解析・リソース頒布等』

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 CAGE 等、依頼解析の実施、cDNA クローンや理研データの提供を行う。

(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、新型の次世代高速シーケンサーの立ち上げと、CAGE 法の最適化を行う。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

検証実験や追加実験の結果をもとに改良を行ったモチーフ間の制御ネットワークの論文や、実験結果を取り込んだ基本データベースのデータをもとにしたサテライト論文を作成し、順次投稿を開始している。また THP-1 解析から得られた複数件の特許の出願を予定している。

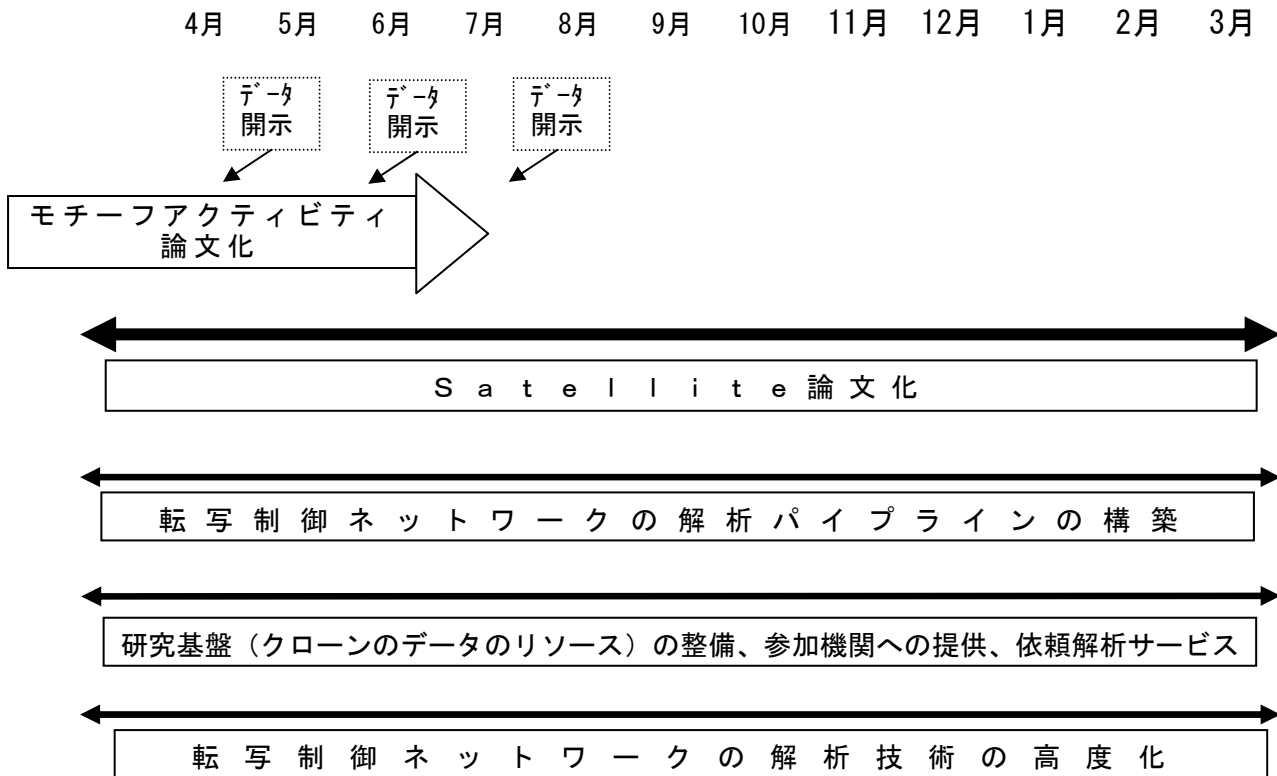
コンソへは、THP-1 解析から得られた microarray データや CAGE データを早期に開示する。追加、検証実験の結果も順次開示する予定である。

5. プロジェクトの中での研究の位置づけ

本年度も、(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などを行う。

そして、これらの研究活動を通し、(1) モチーフアクティビティのネットワークの構築と高度化を進めること。(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目指す。

【平成20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

約14,000種のヒト遺伝子に対するsiRNAをコードするレトロウイルス型 (pSUPERretro) コンストラクトを構築し、コンソーシアムメンバーに配布することを目的として研究を開始した。平成17年度末までに、予定を上回る約15,000遺伝子に対するコンストラクトを完成することができたので、さらに約5,000遺伝子に対するコンストラクトも作製することとした。また、転写因子を中心に複数のコンストラクトを作製し、さらにES細胞や神経細胞にも適用可能なレンチウイルス型 (pENTER) コンストラクトも作製することとした。

2. 現状、進捗状況、成果

既に約20,000遺伝子に対するレトロウイルス型コンストラクトの作製が終了し、15,000遺伝子については平成18年から、残りの5,000遺伝子については平成19年度からコンソーシアムメンバーへの配布を開始した。これまでに、リクエストのあった11研究機関に約100,000クローンの配布を行った。また、レンチウイルス型および我々が開発したRNA polymerase II promoterを使用したレンチウイルス型ベクターを用いたライブラリの配布も開始している。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

①siRNAライブラリの整備と情報公開、およびコンソーシアムメンバーへの配布を継続する。②siRNAライブラリ有効性の評価、有効性の低いコンストラクトの再構築と生体内での有効性の検討：これまで構築したコンストラクトのうち25%程度は抑制効率が低いため、異なる配列を用いたコンストラクトを構築する(数100)。さらに、癌化などの情報伝達経路における解析のツールとしての有効性を検討する。また、ゲノムワイドな解析における有効性を調べるために、標的遺伝子に対する抑制効果の特異性を解析し、off-target効果を回避した方法や配列選択などの検討を行う。これらの知見をとりこみ2,000-3,000程度のレンチウイルス型コンストラクトを作製する。③現在使用しているpSUPER.retro.PuroおよびpENTRを、プロジェクトメンバー(理想的には広く国内の研究者)に配布可能とする方策等を検討する。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

これまでの有効性評価の結果より、有効性が低いと判定されたコンストラクトについては選択中である。また、off-target効果を回避し、標的遺伝子特異的にノックダウンできるsiRNA配列選択法はほぼ確立しつつあり、pENTRベクターを中心とし、合わせて3,000程度のライブラリを構築する準備を開始している。

5. プロジェクトの中での研究の位置づけ

本研究により作製された siRNA ライブラリは、転写制御因子を中心としたヒト遺伝子解析を行うコンソーシアムメンバーの研究に大きな貢献をすると予測される。さらにコンストラクションを追加作製してライブラリの質を高めることにより、共有リソースとしての価値が格段に高まると考えられる。転写調節因子を中心として、生命活動を成立させているネットワークを明らかにし、疾患の発症機構の解明や新しい治療法の開発につながる成果を挙げることを目的とするゲノムネットワークプロジェクトの遂行に必須の重要プロジェクトであると考えられる。

【平成20年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
① siRNAライブラリの整備と情報公開、およびコンソーシアムメンバーへの配布	←											→
② siRNAライブラリ有効性の評価と有効性の低いコンストラクトの再構築-生体内での遺伝子カスケードにおける有効性、ゲノムワイドな有効性の検討-	←											→
③ レトロウイルス型 siRNA ライブラリに付随する知的財産権への対応	←											→

研究課題：酵母ツーハイブリッド法による転写因子ネットワーク解析

研究代表者：株式会社日立製作所 中央研究所 大友 純

分担研究機関1 独立行政法人理化学研究所 森田 良治

分担研究機関2 国立大学法人九州大学大学院 久原 哲

1. 当初計画・目標 (〇内は、担当機関)

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。更に、Y2H相互作用データの評価実験として β -galアッセイも実施する。Y2H解析・ β -galアッセイ(日立製作所)、配列解析(理化学研究所)

②データ公開

Y2H相互作用データと β -galアッセイによる評価実験データのプラットフォーム公開に加えて、Y2Hスクリーニングにより得られた全クローンの配列情報のプラットフォーム公開とDDBJへの登録を実施する。更に、相互作用領域情報の一般公開等、GNPプラットフォーム担当機関との連携の下、最終年度の総括として、本プロジェクトにより得たデータの詳細を積極的に公開する。(日立製作所)

③他手法実験によるY2Hデータのバリデーション

Y2H法とは原理の異なる実験手法であるプルダウンアッセイにより、Y2H相互作用データのバリデーションを実施する。(日立製作所)

④バイオインフォマティクスによるY2Hデータ解析

ネットワーク解析ツールを用いて、特に疾患関連の新規ネットワーク・パスウェイの解析を実施する。また、バイオインフォマティクスによるY2Hデータの精度・信頼性評価等の解析を実施する。(日立製作所) 更に、Y2H相互作用に関わる領域の配列情報を基にした相互作用ドメインの詳細な解析を実施する。(九州大学)

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、H16-19年度の間、合計1,344ベイトのY2H解析を実施した。さらに、 β -galアッセイによるY2H相互作用データの評価も実施した。現在までに、コンソーシアム公開した全Y2H相互作用の半数を超えるデータに対して評価実験が完了した。H20年度も、引き続き、縦軸研究機関からのリクエストに応じたY2H解析と β -galアッセイによる評価実験を進める。計画・目標②に関しては、H19年度までに、合計9回のコンソーシアム公開と、5回の一般公開を実施しており、GNPプラットフォーム担当機関と連携してきた。計画・目標③に関しては、すでに哺乳類細胞系における発現ベクターへのベイトとプレイのサブクローニングが完了し、現在プルダウンアッセイの条件検討を進めているところである。計画・目標④のデータ解析に関しては、本ネットワーク中に、前立線癌、乳癌に関わる性ホルモンリガンドの核内受容体パスウェイ情報が豊富に得られていることが判明しており、今後詳細に解析する予定である。計画・目標⑤に関しては、研究計画会議、研究報告会などを日立が取り纏めの上実施しており、H20年度も引き続き実施する。

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・目標の全てに関して、これまでスケジュール通りに進めており、目標は達成できる見込みである。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

H20年度に、論文1件、学会発表1件以上、特許出願1件、を目標としている。データ産出に関しては、引き続き、Y2H相互作用データ並びにβ-gal アッセイによる相互作用確認データの公開、各種ライブラリーより得られたクローンの塩基配列のDDBJ登録を予定している。

5. 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し、Y2Hデータを取り掛かりとする新規転写調節機構解明を目指す。

【平成20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酵母ツーハイブリッド(Y2H)解析		←————→											
②データ公開	←————→												
③他手法実験によるY2Hデータのバリデーション		←————→											
④バイオインフォマティクスによるY2Hデータ解析		←————→											
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、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義塾大学理工学部と環境情報学部が連携して実施する。また、縦軸班との連携強化として、縦軸依頼解析を実施する。

2. 現状、進捗状況、成果

19年度は、ロボットによる蛋白質間相互作用解析 (PPI解析) 技術を用いて、6機関の縦軸班 (井上純一郎教授・東大医科研、高柳広教授・東京医科歯科大学、裏出良博部長・大阪バイオサイエンス研究所、福井宣規教授・九州大学、白澤専二教授・福岡大学、眞貝洋一教授・京都大学) から依頼を受け、PPI解析を行った。43バイトで約600相互作用得られた。本年度は、これらの相互作用から生物学的に重要な相互作用ペアを選択し、*in vitro*プルダウン実験などで検証して行く予定である。

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)

構築したデータ統合システムを用いて、IVV法によって産出されたPPIデータの解析、および縦軸研究班へ、カスタマイズデータを提供する予定。

(2) IVV法によるヒト転写因子のPPI解析 (慶大理工 宮本悦子)

縦軸連携強化のため、IVV法によるPPI解析結果のプルダウンなどによる検証を行なう。(1)マウスPPI検証、(2)ヒトPPI検証を実施する予定。

(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)

既知ドメインとの重なりをブラウザできるグラフィカル・ユーザ・インターフェースを構築し、複合体を推定し、その精度を検証する予定。

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

ドメイン間や領域間相互作用情報を考慮に入れた解析により、選択的スプラインシングで相互作用が変化するタンパク質探索を網羅的に行う予定。

上記の各研究項目について、当初計画・目標に対して十分達成出来る見込みである。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

プロジェクト前半、ヒト50転写因子の約1000相互作用を遺伝研プラットフォームへ提供した。現在、これらのデータについてまとめた論文を投稿し、レビュー中である。本年度は、縦軸から依頼されたPPI解析データについて、遺伝研プラットフォームへ提供し、生物学的に重要なデータについては論文にまとめ投稿する予定である。

5. プロジェクトの中での研究の位置づけ

横軸連携では、プロジェクトで必要な基盤的なゲノム機能データとして、ヒト転写因子PPIデータを遺伝研プラットフォームへ提供する。縦軸連携では、個別生物機能解析に必要なデータとして、マウスの転写因子やシグナル伝達因子のPPIデータを解析し、縦軸班へカスタマイズデータを提供するとともに、遺伝研プラットフォームへ提供し、プロジェクトのデータを質・量ともに強化・補完する。

【平成20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データのサプライズ・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 大学院生命理工学研究科 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5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 解析依頼をうけ、ChIP-chip 解析を行う。縦軸研究者より補完的なデータの提示を受け妥当性について十分検証した後に ENCODE 領域、全ゲノムレベル（あるいは全プロモーターレベル）の解析を行う。特に縦軸研究者の研究対象となっている転写因子 Hes1（影山ら）および、Sox9（浅原ら）についてはマウス全プロモーターアレイによる解析、全ゲノムアレイレベルでの解析を行う。

これらの研究と平行して各種細胞におけるコヒーシン、CTCF、コンデンシン複合体、トポイソメラーゼ、コヒーシンのアセチル化修飾、転写伸長の抑制因子（NELF）の動態解析を行う。コヒーシンについてはコヒーシン遺伝子変異が原因の疾患を持つ患者由来の B 細胞について、また、その他の因子については RNAi 等の手法を用い個々の因子をノックダウンした状況で転写に与える影響を解析する。因子間の相互依存性を明らかにし、染色体構築という観点から、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。得られた相関情報に加え、既存のタンパク局在、転写情報を取り入れ、1) 複数種類のタンパク質（タンパク質複合体）が協調的に結合している制御領域の構成と動態、2) 共通のタンパク質もしくは領域を介した制御機構、を予測する。

- 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。

- 4) 転写ネットワーク解析システムの公開

以上の解析から得られた解析システムを公開する。

- 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するため、分担各機関の連携・調整にあたる。

2. 現状、進捗状況、成果

ヒトおよびマウス染色体上のタンパク結合プロファイルを解析可能な ChIP-chip 法を構築した (Methods in Enzymology, 2006, Mol. Cell, 2006)。この方法を用い現在までに、HeLa 細胞、HCT116 細胞等における、p53 タンパクの配置、RNAPolIII、各種ヒストン修飾のプロファイルマップを得た (Genomics 2007)。また、縦軸研究者の井上等と共同で AR (アンドロゲンレセプター) の結合位置の網羅的解析も行った (Oncogene, 2007)。さらに、各プロファイルの相関解析の結果、転写のインシュレーターを形成する因子として知られていた CTCF がコヒーシンと染色体上に共局在し、協調的に転写のインシュレーションに機能することを見いだした (Nature, 2008)。現在、コヒーシン、CTCF による転写インシュレーションのメカニズム（特にコヒーシン関連の疾患である CdLs や Roberts 症候群との関連で）をさらに解析を進める一方で、複数の新規転写因子、転写伸長反応制御因子、縦軸研究者による解析因子（Hes1、Sox9）についてプロファイルマップを作成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

本年度計画についてはスクリーニングのレベルでは掲げた全ての因子について ENCODE、Promoter、

