

研究課題： 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

研究代表者： 東京理科大学 基礎工学部 千葉 文

1. 当初計画・目標

本申請研究では、申請者の開発してきた遺伝子免疫法の転写因子抗体作製への最適化を行い、ChIPアッセイなどの転写因子の機能解析に有用な転写因子に対する抗体を迅速に作製するシステムの開発を目指す。さらにその過程で、重要な転写因子を3年間で20～30種類選んで、ChIPアッセイなどに利用できる抗体を作製することを目的とする。計画変更はない。

2. 現状、進捗状況、成果

平成18年度および平成19年度の目標をほぼ達成することができた。

- (1) 迅速な抗体作製法に最適化した遺伝子免疫法が、転写因子に対する抗体作製にも応用できることを、RXRG および RORB 遺伝子を用いて証明した。
- (2) 抗体のない新たな転写因子（10種）、転写制御因子（1種）およびRNA結合タンパク質（3種）に対する抗体作製を上記1)の免疫スケジュールで行い、全てに対する抗体を調製できた。また、この中の抗DRAP1転写因子モノクローナル抗体はChIPに利用できる特異性の高い抗体であることを理研林崎先生のグループとの共同で証明した。さらに、当初の目標を上回る以下の成果を得ることができた。
- (3) 調製された抗ヒト転写因子のいくつかは、マウスの転写因子とも強く結合したので、本研究で作製された抗体を用いて、ヒトとマウスの同じ転写因子の機能解析を併行して行うことが可能になった。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

- (1) 転写因子に対する抗体の迅速作製システムの開発

我々が確立してきた遺伝子免疫法を転写因子の機能解析に利用できる抗体の作製法を以下の内容でさらに最適化し、転写因子に対するモノクローナル抗体の迅速作製システムを完成させる。

- 1) 新たな免疫用ベクターの開発
- 2) 抗体の産生を促進するサイトカイン遺伝子のアジュバント作用の検討
- 3) 皮膚免疫を中心とする遺伝子免疫ルートの検討
- 4) 遺伝子導入した樹状細胞を利用した細胞免疫法の導入
- 5) 転写因子の抗原提示細胞への提示の促進のための転写遺伝子改変

これらの計画は既に着手されており、本年度内に達成できると思われる。

(2) 転写因子や RNA 結合タンパク質に対する抗体の作製

転写因子の研究グループとの密接な共同研究のもとで、重要な転写因子や転写調節因子を新たに14種類選択し、これまでに確立されている抗体作成システムを用いて、それらに対する抗体を作製する。特に、RNA 結合タンパク質に特異的なモノクローナル抗体の作製を目指す。免疫用ベクターに組み込んだ RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子を用いて、マウスに遺伝子免疫を行い、抗体価が1万倍程度以上に上昇したマウスの脾細胞を用いてハイブリドーマを作製する。ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の中で ChIP 法に有用な抗体を産生するものを選択し、必要量の抗体（10mg 程度）を調製する。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ算出状況など

ChIP に有用であった抗 DRAP1 抗体のデータは理研で解析中であり、サテライトペーパーとして論文発表される。今年度内に、新しい免疫用遺伝子ベクターで1報、抗転写因子抗体の迅速作製で1報、抗 RNA 結合タンパク質抗体で1報の投稿を予定している。新しい免疫用遺伝子ベクターに関する特許申請を準備している。

5. プロジェクトの中での研究の位置づけ

THP-1 細胞で発現する重要な転写因子に対する有用な抗体を作製できるので、GNP の発現クラスターワークショップに貢献できる。また、横浜市大・鈴木正則先生、理化学研究所・鈴木治和先生との連携を深める。要請があれば、プロジェクトの研究者の希望する転写因子に対する抗体を作製する。

【平成20年度計画予定】

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
(1) 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	←											→

個別生命機能の解析

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

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、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を、GNP コンソーシアムへの開示した。さらに、立体顕微鏡によるデータ取得を加えて適宜アップデートし、共発現クラスターの解析を進めている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

骨軟骨発生に関わると考えられる遺伝子、肢芽の軸形成に関わると考えられる遺伝子、somite の未分化性維持に関わると考えられる遺伝子等について、ノックアウトマウスを作成して機能解析を行い、上流・下流・相互作用因子の同定によって新規ネットワークを描く。また、これまでに軟骨細胞における Sox9 の標的遺伝子を探索するため、抗 Sox9 抗体による ChIP-chip アッセイならびに、発現マイクロレイ解析によるスクリーニングを行い、軟骨細胞における Sox9 を中心とした転写ネットワークを解明する。

本年度計画予定（別表としてスケジュール表で）

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

GNP での成果を、数本の論文として、発表するため論文作成準備にとりかかっている。データについては、GNP に公開している。

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。

【平成20年度計画予定】

業 務 項 目	実施期間 (20年4月1日 ~ 21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
CHIP-CHIP を用いた転写ネットワークの解析												→
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 データベースの改良												→

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

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、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、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、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、エストロゲン、アンドロゲン、各ステロイドホルモンの標的ネットワークの解析を進めていく。

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。特に、独自に見出した標的遺伝子Efp/TRIM25,EBAG9,COX7RPについてその疾患における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ChIP-chip解析が全ゲノムレベルで進み、そのネットワーク全貌の理解と臨床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たれた統合的解析が展開している。

ChIP-chip、CAGE、qRT-PCRにて横軸との共同研究の成果が出ており、学会ならびに論文として公表予定である。さらには、クローン、siRNA、M2HならびにY2Hで横軸機関との、密接な協力を推進し、各種ステロイドホルモンの新しいネットワークと標的ネットワークの意義を明らかにしつつある。

3. 本年度計画、当初計画、目標に対して達成の見込み

平成16年度から19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探る。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い、動的ネットワーク研究へもつなげていく。アンドロゲンと共通の受容体結合配列を持つグルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、プロゲステロンについて、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し、最終年度の成果をまとめていく。

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キメラマウスを作成した。

計画2) 胸腺上皮細胞の *in vitro* 分化系を用いて、RANKL 依存性の胸腺上皮細胞の分化に伴い IFN 及び IFN 応答遺伝子が発現誘導する事を示し、胸腺上皮細胞の分化を誘導するシグナルネットワークにおける RANK の位置が明らかにした。

計画3) タンパク質複合体を細胞から精製し、その構成因子を質量分析系で同定する実験系を改良し、より微量での同定を可能にした。胸腺上皮細胞の培養条件を検討した結果、RANKL刺激により胸腺髄質上皮細胞の分化が進行することが明らかとなった。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

計画1) A-Red マウスと B-Yellow マウスの作成を進め、RelA と RelB の胸腺上皮細胞分化過程における時空間的な発現と活性化を把握し、上皮細胞分化の分子機構を推定するとともに、目的とする遺伝子制御ネットワークを解析するための対象となる細胞の同定を目指す。FACS 等を用いて RelA-Red-M または RelB-Yellow-F を発現する細胞の分取及び濃縮を図る。計画をほぼ達成する予定である。

計画2) RelB, Aire, NIK, TRAF6, Sp100 を bait とした IVV 法によりこれらの転写因子及びシグナル伝達因子の結合タンパク質の網羅的なスクリーニングを開始しているが、それを継続する。TRAF6 シグナル、NIK シグナル及び RelB シグナルで制御される遺伝子のプロモーターの構造解析を行う。aly/aly かつ RelB ノックアウトのマウスを用いた、胸腺の構造と機能の解析を図る。計画をほぼ達成する予定である。

計画3) RelA-Red-M または RelB-Yellow-F 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を行い、RelA 及び RelB と複合体を形成するタンパク質を質量分析計を用いて同定し、ここで得られた結果から、RelA と RelB が形成するタンパク質複合体の

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～平成 20 年度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

(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) 視交叉上核の光応答について、DNA マイクロアレイを用いた包括的な時系列発現データの取得ならびに解析により光応答遺伝子を同定した。②(概日スケール) サンプルングの検討を行った。③(数ヶ月スケール) 正中隆起・正中隆起部の光周性について、サンプル取得が完了した。

(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の開発を目指し、手法の検討を行った。

(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化に関与する制御因子のスクリーニングを行い、候補遺伝子の同定を行った。

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) 光応答遺伝子について統計的手法を用いた転写制御機構の解析、細胞培養系及び視交叉上核組織培養系を用いた機能解析、②(概日スケール) 日内変動を示す生