

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・目標、途中計画変更等あればその旨記載

幹細胞システムに焦点を絞り、エピジェネティックシステムと外因性シグナル群のそれぞれが構成するネットワークの機能的相関を明らかにすることを目的とする。そのために、①胎児性幹細胞（ES細胞）をモデルとして用いた多機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、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、の2点に焦点を絞った研究を行う。

2. 現状、進捗、成果

(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細胞維持に必須な転写制御因子であるOct3/4に焦点を絞って解析を行った。Oct3/4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、Trophoblastへと分化していく。Oct3/4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Oct3/4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、Oct3/4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Oct3/4のクロマチンは明らかな影響を受けないものの、Oct3/4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Oct3/4の直接的な結合を介していることが示された。すなわち、Oct3/4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に導入したマウス系統を樹立し、ビオチンリガーゼトランスジェニックとの交配により、生体内でのビオチン化に成功した。

現在、このマウスに由来する胎児を用いたタンパク複合体の解析とクロマチン免疫沈降を行っている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

十分に達成しうる。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ算出状況等

研究項目（１）については、現在３報目を準備している最中である。また、今年度は、モデル細胞として新たに iPS 細胞を加える予定であり、それについても期間中にまとめたい。研究項目（２）については、年内にデータ取得を終了し、論文発表と特許出願を 2009 年 3 月までに終了する予定である。

5. 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20計画予定】

項目	4月・5月	6月・7月	8月・9月	10月・11月	12月・1月	2月・3月
(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 ・ KO ES 細胞におけるエピゲノム解析 ・ IPS 細胞におけるエピゲノム解析	←					→
(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 ・ ストレプトアビディンを用いたタンパク複合体精製とクロマチン免疫沈降	←					→

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 系統生物研究センター 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

これまで Nanos2 単独ノックアウトマウス及び、生殖細胞欠損の Nanos3 ノックアウトマウスからの結果と照らし合わせて、Nanos2 の機能によって変化する遺伝子発現ネットワークを明らかにしてきた。また Flag-Nanos2 を発現するトランスジェニックマウスを用いて Nanos2 と相互作用する蛋白質・RNA を同定してきた。その結果 Nanos2 は P-body を構成するポリアデニレーションコンプレックスの構成タンパク質と相互作用することが明らかになった。また Nanos2 と結合する RNA は多くのものが Nanos2 ノックアウトマウスで発現上昇を示すものであり Nanos2 の機能はこれらの RNA の分解を促進していることが強く示唆された。しかし、Flag-tag のみでは非特異的な結合が多いため、2 段階精製が可能な tag をもったトランスジェニックマウスを新たに作製中した。現在をこの系を用いてさらに Nanos2 結合蛋白質を同定しようと試みている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

Nanos/BAX ダブルノックアウトマウスのサンプリングが大幅に遅れたがようやく完了しつつある。一方、雌の生殖細胞に Nanos2 を強制発現すると生殖細胞が雄化することは現象的には見出しつつあるが、その遺伝子発現を解析するには強制発現の効率が低すぎて不可能であった。現在もっと効率よく雌に強制発現するために、Oct3-Cre-ER2 マウスを作製中である。このマウスを用いて、GeneChip 解析可能な系を構築できる予定である。これらの解析結果を加えて Nanos2 の下流遺伝子ネットワークの詳細を明らかにできると考えている。さらに現在 GS 細胞を用いた Nanos2 の機能解析、また生後に Nanos2 を過剰発現させた系を用いて下流遺伝子カスケードの検討も行う予定である。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

これまでに Nanos2-K0, Nanos3-K0 のデータ取得はほぼ終了した。加えて、今年度、Nanos/BAX ダブルノックアウトマウス、Nanos2 強制発現系における解析をおこなう。これらのデータを解析してその成果をすくなくとも 2 報ぐらいの論文にまとめる。また Nanos2 の機能解析に関する論文、Nanos2 の精子形成過程における発現と機能解析の論文をあわせて 3 報執筆する予定である。このプロジェクトで得られたアレイデータは解析後速やかに遺伝研のバンクに登録する。

5. 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20年度計画予定】

計画項目	実施期間（20年4月～21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/Baxダブルノックアウトマウスの解析												
Nanos2の機能解析												
GS細胞及びNanos2過剰発現細胞を用いた解析												

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： 慶應義塾大学 医学部分子生物学教室 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

最近の研究から多種多様な機能性 non-coding RNA が存在し、それらが仲介するさまざまなゲノム情報発現制御機構が明らかになってきた。本研究では、non-coding RNA のゲノム情報発現制御における役割を理解し科学技術の振興に寄与する為、特に siRNA および miRNA の生合成経路とその機能の解明を目指す。また、疾患における non-coding RNA の役割を理解するため、疾患関連蛋白質と相互作用する non-coding RNA や疾患関連遺伝子領域から発現する non-coding RNA の同定を行い、その機能の解明を目指す。このため、モデル動物として主にショウジョウバエを用いる。

徳島大学から慶應義塾大学への転出に伴い、分担研究者原英二博士にそのまま当業務に参加していただくことが極めて難しいため（しかも、原博士自身もこの4月1日より徳島大学から財団法人癌研究会癌研究所に転出）、平成20年度からは原博士が分担していた業務は継続しない。

2. 現状、進捗状況、成果

脆弱X遺伝子産物と相互作用する小分子RNAの同定とArgonaute蛋白質と相互作用する小分子RNAの同定に関する研究を進め、ハエAGO2は各種トランスポゾンに由来する内在性siRNAと相互作用しており、しかもこれら内在性siRNAは体細胞において幾つかのレトロトランスポゾンの発現を抑制していることが明らかとなった。また、ヒトAGOサブファミリータンパク質に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、ヒトAGO2とAGO3いずれにおいても、結合している小分子RNAの大部分がmiRNAであることを明らかにした。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

計画は順調に進んでおり、当初の目標を達成できると予想される。

本年度計画予定（既に提出済み）

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

現在、ショウジョウバエAGO2に結合する内在性siRNAに関する論文がNatureに、また、ヒトAGO2とAGO3に結合する小分子RNAに関する論文がPNASに印刷中である。

5. プロジェクトの中での研究の位置づけ

本プロジェクトの中核である転写研究からははずれているが、他の研究領域との橋渡しとなる重要な研究分野。

【平成20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の同定とその機能解析												
② Argonaute蛋白質と相互作用する小分子RNAの同定とその機能解析												
③ miRNAによるin vitro翻訳抑制系の構築												