

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。→ 本計画はほぼ終了したので、本年度の計画からは除いた。

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に新規細胞死が誘導される分子機構として、CNBPを介するeEF1A1 (EF-1 α)の翻訳抑制が必須であることを、これまでに示してきた。そして、この機構が培養細胞で二核細胞が増加する現象を阻害すること、ある種のヒトがん細胞ではこの機構が阻害されていることを示した。当初計画をほぼ達成できたので、論文を投稿している。また、染色体の凝縮異常をコンデンシンサブユニット分子のノックダウン誘導で実行すると、caspaseに依存しない細胞死が誘導されeEF1A1の発現も抑制されるが、この細胞死は外来性eEF1A1の発現では阻害されず、異なった機構の関与していることが示された。

B) アポトーシス関連分子の中で、ヒトT細胞の増殖と生存の維持にcaspase-10が、マウスT細胞の増殖と生存の維持にはcaspase-8が必須であることを示した。caspase-10はRNAが機能していることが示唆され、マウスcaspase-8は前駆体の弱いプロテアーゼ活性が機能することを示した。また、viral FLIP E8が β -catenin安定化の下流でWntシグナルを強く増強することをこれまでに見出してきた。横軸機関との連携によるY2H法と共免疫沈降物の質量分析解析により、PI3キナーゼ調節サブユニットp85が会合することを示し、p85がWntシグナルにE8と同じように関与することを示唆した。

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たので、本年度に論文としてまとめる。

3. 本年度計画、当初計画、目標に対して達成の見込み

本年度計画予定の詳細は、別紙スケジュール表に示した。簡単には、

A) 当初計画の目標はほぼ達成しているので、あらたな展開を目指す。染色体の凝縮異常を X 線照射等の方法でヒト細胞株に誘導し、eEF1A1 の発現抑制だけでなく、転写因子 EGR-1 の発現抑制によっても新しい細胞死が誘導されることを示す。そして、この機構と eEF1A1 の発現抑制という異なった機構が合わさって多核細胞の除去が実施されている実態の解明を目指す。

B) DNA アレイ解析によって見いだしている増殖抑制因子が caspase の細胞増殖・生存に関わる活性に直接関与するか否かを明らかにしする。ヒト caspase-10 やマウス caspase-8 がどのように細胞増殖に関わるかを提示していく。一方、viral FLIP E8 と会合する PI3 キナーゼ制御サブユニットが PI3 キナーゼ活性とは独立して TCF の転写活性を増強することを示し、E8 と関連して Wnt シグナルに関わる未知の分子機構の提示を試みる。caspase の系は期間内に当初計画の目標を達成する予定である。viral FLIP の系は、期間内での達成は困難であると予想されるが、できるだけ達成できるように努力する。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

成果予定: 各計画に応じた成果をあげることができる予定である。

論文発表: 新規細胞死の論文は revise の論文を投稿中。TGF- β の論文は投稿準備中、caspase の多様な活性についても今年度中に論文発表を行いたい。

特許出願: 具体的な計画はないが、取得にむけての取り組みも実施していきたい。

データ産出状況: DNA アレイのデータを各研究項目で取得しており、論文発表とともに公開したい。横軸研究との共同で行った Y2H 解析のデータは公開されている。

5. プロジェクトの中での研究の位置づけ

染色体の凝集異常が誘導する新規細胞死の研究では、新規細胞死と関わる新たな mRNA の安定性と翻訳制御のネットワークの存在を示すことができると期待している。caspase-8, caspase-10, viral FLIP E8, TGF- β の解析の系では、転写を介する新たな遺伝子発現ネットワークを細胞死と細胞増殖の両方の観点から提示できると期待している。これらは、我々が明らかにした網羅的転写産物解析の基礎データを、横軸研究の膨大なデータを交えて解析することにより可能になると考えている。

⇒本年度計画予定（別紙スケジュール表）

課題名 「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

【平成20年度計画予定】

実施計画		実施期間 (H20年 4月1日 ~ H21年 3月31日)											
項目	具体的計画	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
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解析	◎ コンデンシンのノックダウンで染色体凝縮を誘導したヒト細胞系を用いて、EGR-1の発現抑制によってcaspaseに依存しない新しい細胞死が誘導されることを示す。	←————→											
	◎ 各種ヒト細胞においてX線照射で引き起こされる細胞死について、eEF1A1あるいはEGR-1の発現抑制による新規細胞死やp53を介するアポトーシスが、どのように役割分担がなされているかを明らかにする。	←————→											
B) 細胞死シグナル分子が細胞増殖・分化を制御する未知の分子機構の解析	◎ ヒトcaspase-10やマウスcaspase-8のノックダウン誘導時に変動し、細胞増殖・生存の調節に関わる可能性のある転写産物について、その分子が機能しているか否かを明らかにする。	←————→											
	◎ 細胞増殖・生存に機能するcaspase-8の前駆体分子が会合するプロテアーゼ基質を明らかにし、その分子がcaspase-8の生存機能に関わることを示す。	←————→											
	◎ caspase-10が細胞増殖・生存に機能するのは、caspase-10タンパク質ではなく、既知の転写開始点より上流から転写されるmRNAである可能性が示唆されているので、これを証明し、そのRNAの標的分子を明らかにする。	←————→											
	◎ viral FLIP E8と会合するPi3キナーゼ制御サブユニットp85が、PI3キナーゼ活性とは関わらない新しい分子機構でWntシグナルを制御することを示す。	←————→											
	◎ p85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解析する。	←————→											

研究課題： 蛋白の可視化と機能的複合体解析で解くゲノム安定性ネットワーク

研究代表者： 東北大学 加齢医学研究所 安井 明

1. 当初計画・目標、途中計画変更等あればその旨記載

この研究は、我々が開発した、レーザーによるヒト細胞核の局所照射で集積する蛋白を可視化して解析する実験方法と、損傷の現場で形成される蛋白複合体を質量分析で同定する方法を組み合わせ、細胞内で実際にゲノム安定性に機能する蛋白ネットワークを明らかにし、癌などのゲノム疾患の診断、治療、予防に貢献するもので、基本的に途中計画変更はないが、ゲノム安定性ネットワークと転写との関連にも注目して研究を展開している。

2. 現状、進捗状況、成果

ゲノム安定性ネットワークに関わる多くの新規蛋白質やその複合体を同定し、現在、それらの医学的意義を解析しているところで、同時に論文を作成している。最近の主な成果としては、（1）転写因子として知られているポリコーム蛋白（mPcl1, hPHF1）がKUやp53蛋白と直接に相互作用して二重鎖切断のnon-homologous-end joiningに関わる事（*Nucleic Acids Res.*に発表）（2）転写制御にも関わるポリADPリボースポリメラーゼに結合し、塩基喪失部位を認識してニックを入れさらに3'→5'エキソヌクレアーゼの活性を持つ二種類のヒト新規蛋白質を発見した。これらの蛋白質がDNA切断に対するゲノム安定性ネットワークに重要な役割を持っている事を確認している（*EMBO J.*, に発表及び論文投稿中）。今年度中に発表予定の多くの研究成果がある。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

当初計画を達成し、さらにゲノム安定性ネットワークと転写との関連を明らかにする計画も達成出来ると考えている。

本年度計画予定（別紙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

平成19年度は、GNPのacknowledgeを持つ論文を5報（*EMBO J*, *Mol Cell*, *PNAS*がそれぞれ1報、*Nucleic Acids Res.* が2報）を既に発表し、投稿中の論文が2報ある。今後、さらに、より多くの良い論文を発表していく。

動的ネットワーク解析技術開発

課題: 乳がん細胞の薬剤抵抗性に関するネットワークの動態解析

代表研究者: 特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構 北野 宏明

1. 当初計画・目標

タモキシフェン感受性・非感受性乳がん細胞を用いて、リン酸化プロテオーム・遺伝子発現解析を行い、エストロゲン受容体の脱制御と EGFR シグナル伝達系に關与するネットワーク要素の同定とその動態の解析を行う。乳がんシグナル伝達ネットワークの MAP 化や数理モデル構築、ネットワークの摂動解析を通じて薬剤抵抗性メカニズムの解明と候補となる薬剤標的経路の同定を目指すとともに、特にマルチターゲット創薬の可能性を検討する。

システム・バイオロジー研究機構では、シグナル伝達系ネットワーク MAP の構築とその MAP に基づいて創薬ターゲットを推定する解析技術の開発を実施するとともに、プロジェクトの全体を統括する。

2. 現状、進捗状況、成果

① EGFR 拡張 MAP の構築

初期バージョンとして、既存の EGFR シグナル伝達系 MAP を、標準ファイル形式 SBML、さらに標準的なグラフィカル記法である SBGN 記法に準拠した CellDesigner4.0 ベータで再構築した。一方、エストロゲン受容体などのシグナル伝達系を含めた MAP を構築。今後、2つの MAP をマージし、さらに最近の知見を追加・拡張する予定である。

② 情報共有メカニズムの構築

②-1 モデルタグ付サーバーシステムの開発・構築

EGFR などのシグナル伝達系 MAP をウェブ上に配し、プロジェクトメンバーが自由に情報の追加、コメントができるモデルタグ付サーバーシステム（システム仮称“PAYAO”）のテストサイトを構築した。

本システムは、さらに東大辻井研・マンチェスター大学で研究・開発されている文献情報抽出システム PathTEXT と組み合わせて利用できるように、統合・開発が進んでいる。

②-2 プロジェクト進捗情報管理 WIKI の構築

当プロジェクトで利用することで研究データの共有促進を図り、また、プロジェクト内での進捗管理、経過報告などを促進するための WIKI を構築した。

<http://www.systems-biology.org/~myukiko/EG/doku.php>

今後、さらに実験データの共有、解析結果にもとづくディスカッションを推進するための情報共有メカニズムを構築予定である。

③ 数理的な創薬ターゲット同定技術の検討

シグナル伝達系 MAP から創薬ターゲット同定をするためのアルゴリズムなどを検討した。この第一段階として、現段階では、実際に臨床で利用されている多剤併用の調査、ロバストネスの理論から予測される Colateral sensitivity の調査などを行った。

④ 動的モデル構築

乳がんの薬剤感受性・非感受性のメカニズムのシグナル伝達との関連を調べ、そのダイナミック

スを再現するモデルの構築を開始した。今年度は、現状のモデルの理解を中心に調査し、拡張が必要な部分の特定を行った。

⑤ 副作用モデル構築の基本検討

乳がん細胞以外の細胞（心筋細胞等）をモデルとして、副作用モデルの構築を行うための、基礎調査を行った。副作用として、心筋細胞への影響、卵巣などへの副作用の現状と分子的機構を調査した。

⑥ 発現データ解析

現在実験中のデータ解析に入る前に、過去の類似データを用いて、発現データ解析ツールの検証を行った。今後、検証結果をもとに、解析手法の改良を行うとともに、理化学研究所グループで測定された発現データ解析を行う。また、ネットワークの構造との関連も解析する。

⑦ たんぱく質ネットワークと遺伝子制御ネットワーク融合

①の EGFR 拡張マップを基に、ネットワーク構造推定アルゴリズムや文献情報抽出などのデータを使って、たんぱく質ネットワークと遺伝子制御ネットワークとの融合を図る。現在、拡張マップの精度と網羅度を向上するプロセスに集中してこの部分もカバーしている。

⑧ 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、随時ミーティングを開催するなど、参画各機関の連携・調整にあたった。3月末の時点で、進捗のマイルストーンを確認するプロジェクトミーティングを行い、今後の戦略の再確認を行った。通常の議論は、個別ミーティングとメール、情報共有サイトで行っている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

本年度は、(1) EGFR 拡張 MAP の構築、(2) 情報共有メカニズムの構築、(3) 数理的な創薬ターゲット同定技術の検討、(4) 動的モデル構築、(5) 副作用モデル構築の基本検討、(6) 発現データ解析、(7) たんぱく質ネットワークと遺伝子制御ネットワーク融合、(8) プロジェクトの総合的推進が、主な項目として研究を進める。

本年度計画予定を、別紙スケジュール表に示す。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

(1) タモキシフェン非感受性 MCF-7 細胞株の樹立に成功した。これは、ヒアリングの際に懸念された事項であったので、大きな前進である。(2) MCF-7 細胞を使って、遺伝子発現データ、たんぱく質リン酸化の時系列データが取得された。プロジェクト内での検討の結果、さらにデータ取得を続けるとともに、対象となるたんぱく質を拡大する検討も行うことになった。

(3) EGFR シグナル伝達系にエストロゲン受容体シグナル伝達系を加えた MAP の開発が進捗しており、0.5 版ができ、今後これをさらに拡張する。(4) 実験データを可視化ソフトウェアに機能付加する開発は、試作が完成した。今後、改良と検証を行う。(5) 8 月にスウェーデンで行われるシステムバイオロジー国際会議 (ICSB-2008) において、一連の中間成果をポスター発表する。

5. プロジェクトの中での研究の位置づけ

これまでの知識・データに基づいた動的ネットワークの理論的な構築を通して、薬剤抵抗性メカニズムに関する知見を得ることがゲノムネットワークプロジェクトへの貢献となると考える。

課題：脂肪細胞・骨芽細胞分化ネットワークの再構築と特性解析

代表研究者：大阪大学 大学院情報科学研究科 松田 秀雄

1. 当初計画・目標

脂肪細胞と骨芽細胞への分化過程における転写制御を中心とした統合的な分子ネットワークの解明を目指し、それに特化した解析アルゴリズムの開発を埼玉医科大学と共同で実施する。

大阪大学では、昨年度実施した、候補遺伝子選定システムの開発、転写制御ネットワーク解析システムの開発に引き続き、今年度は、転写制御ネットワーク解析システムの開発を継続し、ベイズ推定スコアでのスクリーニングなどの拡張を行う。さらに、クロストーク遺伝子探索手法の開発を実施する。埼玉医科大学では、昨年度実施した、脂肪細胞・骨芽細胞分化時における遺伝子発現プロファイルの取得による解析用データの産生、分子生物学的実験による解析結果の検証準備、遺伝子ネットワーク比較解析パイプラインの構築に引き続き、今年度は、推定されたネットワークの検証のためのルシフェラーゼアッセイ実験や RNA 干渉実験などの実施、検証後の新たな推定のための補完的な解析用データの産生、CAGE データや既知の転写制御関係等との比較解析による脂肪細胞・骨芽細胞分化ネットワークの統合解析を実施する。

2. 現状、進捗状況、成果

埼玉医科大学で取得された遺伝子発現プロファイルは、マウス間葉系幹細胞を各方向に分化させた細胞サンプルを 1 時間ごとと 6 時間ごとに RNA を取得したほか、特に分化初期については 5, 15, 30, 45 分後に RNA を取りマイクロアレイ実験を行った非常に高精細度の時間分解能のものである。このデータをもとに、大阪大学で転写制御ネットワーク推定の対象とする候補遺伝子として、脂肪細胞・骨芽細胞分化系列の双方で有意な発現変動のあった 339 個の遺伝子を選定した。現在、この候補遺伝子を中心に、脂肪細胞・骨芽細胞分化のそれぞれの過程での転写制御ネットワークの推定を行っている。

3. 本年度計画、当初計画・目標に対して達成の見込み

計画表を別紙に示す。計画通り順調に進行しており、当初予定通り完了する見込みである。

4. 成果予定、論文発表、特許出願、データ産出状況等

昨年 10 月にプロジェクトが始まったばかりであり、研究成果発表はこれからとなっている。具体的には、脂肪細胞・骨芽細胞のそれぞれの分化過程での転写制御ネットワークを推定するとともに、それらを統合することで、両者のネットワークで共通に存在するクロストーク遺伝子を探索していく。データ産出状況については、マイクロアレイの遺伝子発現データが既に有り、推定された転写制御ネットワーク、転写制御の検証実験データが予定されている。論文発表については、今年度中に論文を投稿予定である。また、新規のクロストーク遺伝子が見つかった場合は特許として出願することを検討する。