

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870017

研究課題名（和文） 遺伝子発現ネットワークの網羅的解析と新規作製

研究課題名（英文） Analysis and synthesis of gene expression networks

研究代表者

戎家 美紀 (EBISUYA MIKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00544933

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子発現ネットワークの網羅的解析と新規作製を並行して行った。新規作製プロジェクトでは、「人工細胞間コミュニケーション」を目標として、改変型 Notch 経路や転写因子を組み合わせることで培養細胞に導入し遺伝子ネットワークの作製を行った。現在までに、隣り合う細胞間で任意遺伝子の発現量を制御し合えるようになった。一方網羅的解析プロジェクトでは、我々が最近見出した「転写の波及効果」という現象のメカニズムと普遍性の探求を中心に行った。結果、波及効果が特定のゲノム位置や細胞の状況に依存した現象である可能性を得た。

研究成果の概要（英文）：In this work, we analyzed and synthesized gene expression networks. The aim of the synthesis project is to create "artificial cell-cell communications". We designed small gene networks using the modified Notch pathway, transcription factors and cultured cells. So far, we have successfully made a system by which the neighboring cells mutually regulate each other's gene expression. In the analysis project, on the other hand, we studied the mechanism and generality of the "transcriptional ripple effect". The obtained results have suggested that the ripple effect occurs only at specific genomic locations and/or under specific cellular conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物学・機能生物化学

キーワード：遺伝子発現、網羅的解析、人工遺伝子回路

1. 研究開始当初の背景

私はこれまで、マイクロアレイやタイリングアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行ってきた。とりわけ最近、一つの遺伝子座において転写が強く活性化する際には、ゲノム上で近傍に存在する遺伝子や遺伝子間領域

でも転写が起こりやすい、という相関を見出し (Fisher 検定 $P=1.7\times 10^{-4}$)、これを「転写の波及効果 (Ripple effect)」と名付けた (Ebisuya et al., Nature Cell Biol. 10, 1106-1113, 2008)。実験モデル系としては、培養繊維芽細胞を増殖因子 (FGF) で刺激し

て、早期応答遺伝子 (Immediate early genes, IEGs) と呼ばれる一群の遺伝子の転写を誘導し、IEGs の近傍領域の発現量変化を、タイリングアレイを用いて定量した。次に、波及効果が起こる遺伝子のプロモーター配列を統計的に解析することによって、SRF という転写因子の関与を予測し、SRF の ChIP-chip とノックダウンによってその予測を実証した。その他、波及効果の起こる範囲は半径約 100 kb であること、ヒストンアセチル化状態の変化も関与していること、などを明らかにしていた。そこで、この波及効果という現象のより詳しいメカニズムや意義、普遍性などを調べたいと考えた。一方で、遺伝子発現ネットワークには、小規模でも興味深い特質を示すものがあり、例えば、mRNA やタンパク質量が周期的に変動する振動系などが挙げられる。こういった特殊な遺伝子発現ネットワークを、人工的に再構成・改変してみることで、新たな理解を得ることができると考えた。そして、通常の遺伝子発現ネットワークは 1 細胞内での相互作用を対象とするが、本研究では、細胞-細胞間で遺伝子発現を制御するネットワークを作製解析することにした。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子発現ネットワークの新たな性質解明を目的として、俯瞰的視点とフォーカスした視点の両方からアプローチした。具体的には以下の 2 つの課題に取り組んだ。(1) 遺伝子発現パターンを網羅的に解析することにより、新たな相関関係の解明を目指す。特に、転写の波及効果のような、ゲノム上の空間軸における相関に注目してそのメカニズムや普遍性なども解析する (以後、網羅的解析プロジェクトと呼ぶ)。(2) 興味深い特質を持つ小規模な遺伝子発現ネットワークを、人工的に作製することにより、発展的・定量的理解を目指す。最初の具体例としては、「人工細胞間コミュニケーション」の機能を持つ遺伝子発現ネットワークを作製し、普遍的な性質を探る (以後、新規作製プロジェクトと呼ぶ)。

3. 研究の方法

(1) 網羅的解析プロジェクト。転写の波及効果とインスレータータンパク質との関連を調べるため、文献的によく使用されている抗体を用いて ChIP-chip 実験を行う。波及効果が観察される領域の SRF 結合配列を含む DNA 配列をゲノム上の他の領域に移植し、人工的に波及効果を起こすことで、そのメカニズムや生理的意義を探求する。他の網羅的遺伝子発現データにも同様の現象が見られるか調べる。

(2) 新規作製プロジェクト。有名なシグナル伝達経路である Notch 経路は、Delta (リガンド) が隣の細胞上の Notch (レセプター) に結合すると、Notch の細胞内ドメインが切断され、核に移行して転写調節因子として働き、隣接する細胞の遺伝子発現を制御する。そこで、Notch の細胞内ドメインを、別の転写因子や転写抑制因子に置き換えることで、任意のプロモーター制御が可能になる。こういった部品をまず作製し、組み合わせて培養細胞に導入し、様々な細胞間コミュニケーションを作製する。細胞間コミュニケーションの例としては、以下のようなものが考えられる。

① 隣接する細胞へ、遺伝子発現状態 (シグナル) を伝播させる。シグナルは蛍光タンパク質で可視化し、伝播速度や、1 つの細胞から開始したシグナルが到達し得る最大細胞数を測定・検討する。

側方抑制 (隣接する細胞が互いに牽制することで、分化する細胞の数を制限するしくみ) による、遺伝子発現の空間パターン形成を再現する。分化細胞の割合やパターンの制御は、再生医療における組織構築の基盤となる重要な課題である。

② 細胞間双安定スイッチを作製する。2 つの隣接細胞が、互いに遺伝子発現を抑制し合うことで、常に逆の発現パターンを示す。また、この抑制を一時的に解除することによって、パターンを反転できる。簡単な数理モデルのコンピュータシミュレーションも行い、実際の実験結果と比較する。特に、複数の細胞に接している時には何が起こるか、に注目する。

③ 細胞間振動子を作製する。3 つの隣接細胞が、順番に次の細胞の遺伝子発現を抑制することで、周期的に振動する。これも数理モデルとの比較を行い、周期の長さや持続時間を予測する。

4. 研究成果

(1) 網羅的解析プロジェクト。転写の波及効果とインスレータータンパク質との関連を調べるため、文献的によく使用されている抗体を用いて ChIP-chip 実験を行ったが、一貫性のあるデータを取得することはできなかった。そこで、波及効果が観察される領域の DNA 配列を、ゲノム上の他の領域に移植し、人工的に波及効果を起こす試みを開始した。移植した DNA 配列が機能していることは確認できたが、移植先で新たな波及効果は観察できなかった。今回はウイルスを用いて DNA 配列の移植を行ったが、今後は相同組み換えなど別の移植方法も検討したい。また、別の実験系で転写の波及効果が見られるかを試すため、公共データベースからマイクロアレイデータを取得し、転写の波及効果に似た現

象が見られるか解析した。その結果、出芽酵母の G1 期開始時における遺伝子発現データにおいて、同様の波及効果が観察された。その他のマイクロアレイデータにおいてもそれらしい現象が見受けられたが、データ量が十分でなかったりより詳しい検証実験が困難であったため、自分達で新規の実験系立ち上げを開始した。新たな実験系としては、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) へのリプログラミング過程における網羅的遺伝子発現解析を行ったが、現在までのデータ解析では明らかな波及効果は見つかっていない。以上の結果は、波及効果が特定の DNA 配列や細胞の状況に依存した現象である可能性を示唆している。

(2) 新規作製プロジェクト。シグナル伝達タンパク質である Notch や Delta などのクローニングと改変を行い、改変タンパク質が細胞内で働くことを確認した。次いで遺伝子部品を組み合わせて、様々な「人工細胞間コミュニケーション」の作製を開始した。その結果現在までに、細胞間の接触依存的に任意遺伝子の発現量を制御できるようになった。また最近、最初のリガンドとなる細胞から隣の細胞へと、遺伝子発現シグナルが伝播する様子のライブセルイメージングに成功した。これらの結果は、さらに隣の細胞への伝播やパターン形成など、より高度な細胞間コミュニケーションの実現を目指す基盤となるものである。並行して、各部品とそれを組み合わせたシステムの挙動を予測・理解するため、反応速度論に基づいた簡単なコンピュータシミュレーションとパラメーター測定を行い、遺伝子ネットワークの振る舞いの予測と改良に活用した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① ERK5 Regulates Muscle Cell Fusion through Klf Transcription Factors. Dev Cell. 20, 192-205 (2011). 査読有 Sunadome K, Yamamoto T, Ebisuya M, Kondoh K, Sehara-Fujisawa A & Nishida E.
- ② Revolving movement of a dynamic cluster of actin filaments during mitosis. J Cell Biol. 191, 453-462 (2010). 査読有 Mitsushima M, Aoki K, Ebisuya M, Matsumura S, Yamamoto T, Matsuda M, Toyoshima F & Nishida E.

- ③ The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression.

Mol Biol Cell. 21, 2953-2965 (2010). 査読有

Yamazaki T, Fujiwara N, Yukinaga H, Ebisuya M, Shiki T, Kurihara T, Kioka N, Kambe T, Nagao M, Nishida E & Masuda S.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 戎家美紀、遺伝子ネットワークの作製と解析、第二回光塾、2010年12月12日、大阪大学吹田キャンパス
- ② 戎家美紀、西田栄介、遺伝子発現パターンの網羅的解析と新規作製、BMB2010、2010年12月09日、神戸ポートアイランド
- ③ 戎家美紀、Analysis and synthesis of transcriptional networks, Symposium 「SYNTHETIC BIOLOGY: FROM THE PRESENT INTO THE FUTURE」、2010年03月25日、京都大学
- ④ 戎家美紀、山本拓也、西田栄介、細胞周期における MAP キナーゼ経路依存的な転写調節機構の解析、がん研究に係わる特定領域研究合同シンポジウム、2010年01月14日、学術総合センター 一橋記念講堂
- ⑤ 戎家美紀、遺伝子発現パターンを網羅的に調べたり小規模に作ったり、定量生物学の会第二回年会、2010年01月11日、大阪大学吹田キャンパス
- ⑥ 戎家美紀、遺伝子ネットワークの解析と作製、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

戎家美紀 (EBISUYA MIKI)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユ
ニット・特定助教

研究者番号：00544933