

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19681021  
 研究課題名 (和文) 発生・分化・癌化に関わるゲノムネットワークの解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of retinoid-responsive gene networks  
 研究代表者  
 柳内 和幸 (YANAI KAZUYUKI)  
 東邦大学・理学部・准教授  
 研究者番号：30360704

研究成果の概要 (和文)：【目的】レチノイドX受容体 (RXR) は、発生や分化さらには糖尿病への関与など、多彩な生理作用をもつことが知られている。そこで、本研究では、新しい実験法を利用して、ヒトゲノム内に存在するRXR作用部位を解析し、約250か所を同定することに成功した。これらの情報は「TOHO rSNPdb」としてWeb上で公開しており、RXRネットワークの解明につながる有用なデータベースになると期待している。

研究成果の概要 (英文)：Retinoids play an important role in development, differentiation, and homeostasis. To identify RXR homodimer-binding sites in the human genome, we performed a modified yeast one-hybrid system and identified 250 potential RXR-binding sites. In addition, TOHO rSNP database will be important for the elucidation of the physiological functions of RXRs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
総計	18,400,000	5,520,000	23,920,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：機能ゲノミクス、発生・分化、ゲノム、発現制御、遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

酵母のような単細胞生物は転写開始点上流の 500 bp 程度で全ての転写調節が行われているが、ヒトのような高等生物ではプロモーター領域以外にも転写因子の結合配列が存在するため、転写調節領域をゲノム規模で解析することは非常に困難である。このため、

様々な実験手法が模索され、マイクロアレイ上に全ヒトゲノムを並べた「タイリングアレイ」と「クロマチン免疫沈降法」を組み合わせた「ChIP on Chip」が開発された。ChIP on Chipは「全ゲノム」を網羅している点は優れているが、人体に存在する約 300 種の細胞について、発生段階や様々な環境下をカバーす

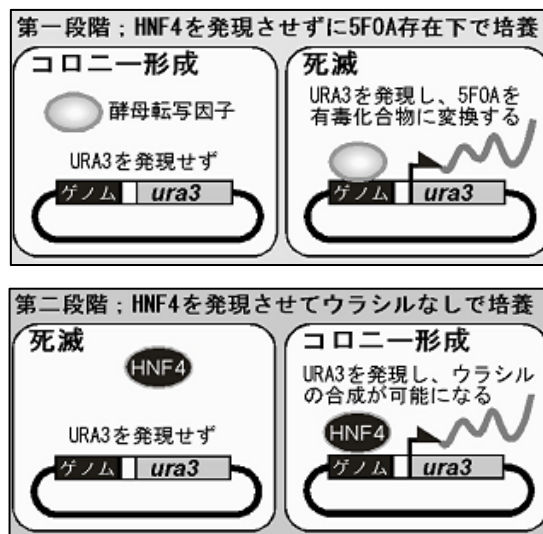
ることは不可能である。そこで申請者は、細胞種や環境に影響されず、しかも比較的低コストで実験できる新しい実験法の開発に取り組み、改良型 Y1H 法の確立に成功した。これまでに、申請者が開発した改良型 Y1H 法（詳細は次ページを参照）を用いて、糖尿病と深く関連する核内受容体型転写因子であるグルココルチコイド受容体 (GR) を解析し、ヒトゲノムから約 350 ヶ所の GR 結合配列の同定に成功した。改良型 Y1H 法を様々な転写因子について検討したところ、核内受容体ファミリーに属する転写因子に有効であることがわかってきた。その中でも、レチノイン酸受容体 (RAR および RXR) には特に有効であった。

## 2. 研究の目的

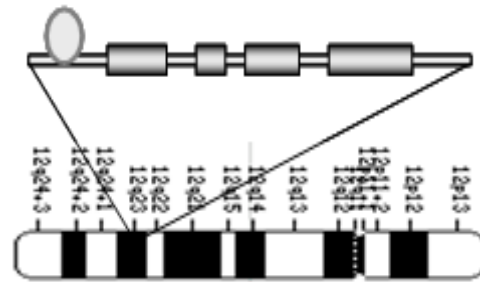
- (1) 申請者が独自に開発した改良型 Y1H 法を用いて、ヒトゲノムからレチノイン酸受容体標的配列を系統的に同定してリストアップする。
- (2) ヒト細胞株を用いたレポーターアッセイなどによって、クローニングした結合配列が、生細胞内においてレチノイン酸応答配列として機能するかを検証する。
- (3) データベースを作成し、全データを Web 上で公開する

## 3. 研究の方法

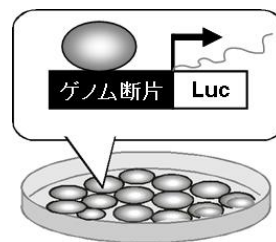
(1) 酵母を使った実験系は、生細胞の核内という意味では動物細胞と同じであるものの、動物細胞種ごとに特徴的なクロマチン修飾を受けておらず、「転写因子が全ヒトゲノム断片にアクセス可能な状態」と考えられ、細胞種の違いを超えた転写因子の結合配列の探索に適している。よって、申請者が開発した改良型 Y1H 法 (下図) を用いて、全ヒトゲノムからレチノイン酸受容体結合配列を系統的にクローニングする。



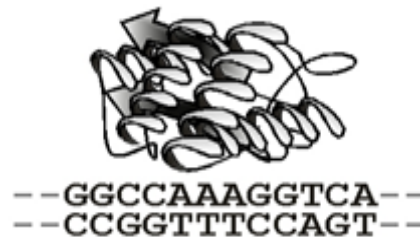
- (2) 得られた配列をシーケンスし、染色体上での位置をマッピングする。



- (3) 同定したレチノイン酸受容体結合配列を Luciferase 遺伝子の上流に連結し、ヒト細胞株を用いたレポーターアッセイを行う。これによって、生細胞内で実際にレチノイン酸応答配列として機能するかを検証する。



- (4) 分子レベルと細胞レベルから得られた全データをデータベース上に統合し、Web 上に公開する。

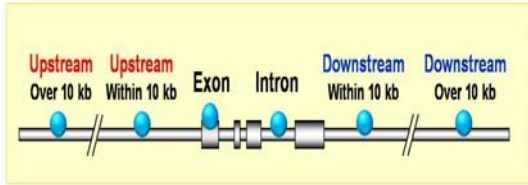


## 4. 研究成果

- (1) RXR 結合配列同定のために、まず、改良型 Y1H 法の条件を検討し、2.5 μM のレチノイン酸を用いることで、既存の RXR 結合配列依存的なコロニーの成長が確認された。

ligand	-	0μM	0.5μM	2.5μM	10μM
plate	U(+)	U(-),9-cis Retinoic acid(+)			
Effector	RXR	RXR	Empty	RXR	Empty
	Empty	RXR	Empty	RXR	Empty
Reporter	RXR	RXR	Empty	RXR	Empty
	Empty	RXR	Empty	RXR	Empty
Empty					
RXRE I					
RXRE I x2					
RXRE II					
RXRE II x2					

(2) ヒトゲノムの2倍をカバーするスケールで改良型 Y1H 法による RXR の結合配列の同定を行ったところ、約 250 の結合配列を同定した。さらに、これらを解析したところ、約 200 カ所の RXR 結合部位をヒトゲノム内に同定することに成功した。このうち 28% がイントロン内に結合しており、レチノイン酸応答領域としてプロモーター領域以外の重要性が示唆された。なお、イントロンの重要性については、グルココルチコイド受容体や、エストロゲン受容体など、他の核内受容体でも同様の結果が報告されていることと一致する。



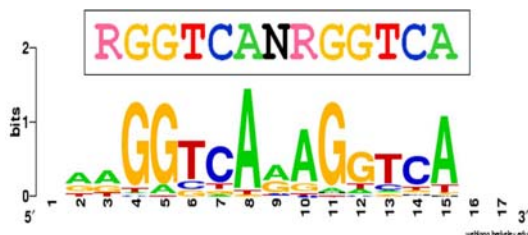
	Upstream Over 10 kb	Upstream Within 10 kb	Exon	Intron	Downstream Within 10 kb	Downstream Over 10 kb
Percentage	24%	8%	13%	28%	9%	17%

(3) RXR 結合部位として同定されたゲノム配列内に存在する RXR 結合配列を予測した例を以下に示す。ほとんどの配列が DR-1 を含んでいたが、中には DR-2 を含むものもあった。

DR-1: RGGTCANRGGTCA  
 DR-2: RGGTCANNRGGTCA  
 DR-3: RGGTCANNRGGTCA

#	Type	Sequence
1	DR-1	AGGTCA AGGGCA
2	DR-1	AGTGGTTA AGGGCA
3	DR-1	TCAGGTCA AGTTCAC
4	DR-1	GGGTTA GGGATA
5	DR-1	GGGTAA GGGCNA
6	DR-1	AGGGCA AGGTCATA
7	DR-1	AGGTGA AGGTCATA
8	DR-1	GGGGCA AGGGAATA
9	DR-1	TAAGCCA AGGTCA
10	DR-1	TCAGGTCA AGGTCA
11	DR-1	TCAGGTCA AGCACATA
12	DR-1	AGGTCA ANTTCA
13	DR-1	GTGACTG CAACCTCA
14	DR-1	GGGGCA AGGTTA
15	DR-1	CGGTCA AGGTCA
16	DR-1	AGGTCA AGGTCA
17	DR-1	AGGTCA GGGTNA
18	DR-1	AGGTGA AGGTCA
19	DR-1	AGGTTA AGGTCA
20	DR-1	NGGTCA AGTTCATA
21	DR-1	TGGTCA ATGTCT
22	DR-1	AGGGCA AGGTCA
23	DR-1	AGGTCA AGGTGA
24	DR-1	AGGTCA AGGTGA
25	DR-1	GGATCA AGGTGA
26	DR-1	AGGTCA AGGACG
27	DR-1	GGGTGA AGCCCA
28	DR-1	GGGTCA AGGTCT
29	DR-1	GGGTCA AGGTGA
30	DR-1	TCACCT TGAACCT
31	DR-2	AGGTCA GGTTCATA
32	DR-2	TGAACCT TGAACCT
33	DR-2	AGGTCA AGTTCATA
34	DR-2	AGGTCA AGGTCA
35	DR-2	GGATCA AGGTCA
36	DR-3	TGAACC TGAATCT
37	DR-3	GGGTCA GTGGCATA

これらの配列のコンセンサスを取ったところ以下のようになり、既存のコンセンサスと比較すると、1 番目と 8 番目の R が A である傾向が認められた。



(4) RXR 結合配列にもっとも近傍の遺伝子をリストアップしたところ（一部を以下に示す）、レチノイン酸による心筋への分化に重要な遺伝子や、糖尿病の発症に重要な遺伝子が含まれており、さらなる解析を進めている。

#	Gene (position)	Chr.	Position
1	TRIM16 (Exon 6)	17	15142824- 15143108
2	EMX2 (-60 kb)	10	70045885- 70046090
3	EIF5B (Intron 1)	2	4645502- 4645240
4	FBXO10 (Intron 10)	9	37559031- 37558693
5	OSTN (+50 kb)	3	97473908- 97474193
6	KCNT2 (+900 kb)	1	47173363- 47173101
7	RPL15P21 (-70 kb)	17	10438410- 10438665
8	RPH3AL (intron 5)	17	164921-165160
9	MATN1 (+260 kb)	1	897017-897152
10	RGS8 (-50 kb)	1	34179391-34179644
11	LOC100287377 (-10 kb)	4	78458152-78457912
12	LOC644357 (-500 bp)	1	240812-240978
13	PHACTR1 (Intron 2)	6	12660592-12660854
14	RPS27P10 (-30 kb)	2	62401045-62400830
15	LOC100130891 (+5 kb)	8	15960369-15960575
16	ST6GAL1 (Intron 2)	3	93211643-93211553
17	MATN1 (+260 kb)	1	12240779-12240717
18	MATN1 (+260 kb)	1	12240779-12240717
19	LOC338756 (-60 kb)	12	42023102-42023208
20	FAM110B (-150 kp)	8	10621797-10621699
21	MIRHG2 (-45 kb)	21	12553825-12553939
22	LOC646936 (+35 kb)	2	27999958-27999707
23	COQ9 (Intron 3)	16	11103104-11102933
24	CYCSP6 (-15 kb)	2	57476656-57476466
25	DCBLD2 (-180 kb)	3	5292975-5293139

(5) 得られた全データをデータベース上に統合し、TOHOrSNPdbとしてWeb上に公開した。TOHOrSNPdbでは、①クローニングされたゲノム断片の断片の染色体上での位置、②その配列内に存在するRXR結合配列とその結合スコア、③クローニングされたゲノム断片近傍に存在する遺伝子、④RXR結合配列近傍に存在する遺伝子の機能、⑤RXR結合配列近傍に存在する遺伝子と疾患との関連情報、⑥RXR結合配列上に存在するregulatory SNP、などの情報がまとめられている。TOHOrSNPdbは、RXRネットワークの解明につながる有用なデータベースになると期待している。

## 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5件)

- ① Taniguchi-Yanai K, Koike Y, Hasegawa T, Furuta Y, Serizawa M, Ohshima N, Kato N, Yanai K. "Identification and characterization of glucocorticoid receptor-binding sites in the human genome." J Recept Signal Transduct Res. 2010 Apr;30(2):88-105. 査読有
- ② Tsuchihashi-Makaya M, Serizawa M, Yanai K, Katsuya T, Takeuchi T, Fujioka A, Yamori Y, Ogihara T and Kato N "Gene-environmental interaction regarding alcohol-metabolizing enzymes in the Japanese general population." Hypertens Res. 2009;32(3):207-13. 査読有
- ③ Takeuchi F, Ochiai Y, Serizawa M, Yanai K, Kuzuya N, Kajio H, Honjo S, Takeda N, Kaburagi Y, Yasuda K, Shirasawa S, Sasazuki T, Kato N. "Search for type 2 diabetes susceptibility genes on chromosomes 1q, 3q and 12q." J Hum Genet. 2008;53(4):314-24. 査読有
- ④ Tanimoto K, Sugiura A, Kanafusa S, Saito T, Masui N, Yanai K, Fukamizu A. "A single nucleotide mutation in the mouse renin promoter disrupts blood pressure regulation." J Clin Invest. 2008 Mar;118(3):1006-16. 査読有
- ⑤ Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T, Tomoike H. "High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project." Hum Mol Genet. 2008 Feb 15;17(4):617-27. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 山内翔偉・山岸英明・豊島拓也・柳内圭子・長谷川貴士・柳内和幸・渡邊総一郎、「DNA-タンパク相互作用検出を目指した新しい架橋剤の合成と性質」、日本化学会第90春季年会(近畿大学、本部キャンパス)2010年3月27日
- ② 柳内圭子、高橋磨理子、古田裕一、長谷川貴士、大島範子、柳内和幸、「エストロゲン応答性の違いを生むヒトゲノム上のSNPの同定」、第32回日本分子生物学会年会

(神奈川、パシフィコ横浜) 2009年12月11日

- ③ 古田裕一、柳内圭子、池嶋真奈、渡邊未知也、今井友理香、中山美佳、伊藤真弓、高橋磨理子、大島範子、柳内和幸、「ヒトゲノムからのレチノイドX受容体結合配列の系統的な同定とその解析」、第32回日本分子生物学会年会(神奈川、パシフィコ横浜)2009年12月11日
- ④ 長谷川貴士、柳内圭子、渡邊未知也、今井友理香、中山美佳、伊藤真弓、大島範子、柳内和幸、「ヒトゲノムからのHepatocyte Nuclear Factor 4 結合配列の系統的な同定」、第32回日本分子生物学会(神奈川、パシフィコ横浜)2009年12月11日
- ⑤ 豊島拓也、青木淳一、平本隆祐、谷口圭子、柳内和幸、渡邊総一郎、「DNA-タンパク相互作用検出のための新しいクロスリンカーの合成」、日本化学会第89春季年会(千葉、日本大学理工学部船橋キャンパス)2009年3月28日
- ⑥ 豊島拓也、谷口圭子、柳内和幸、渡邊総一郎、「DNA-タンパク相互作用検出のための新しいクロスリンカーの合成」、第2回東邦大学複合物性研究センターシンポジウム(千葉、東邦大学)2008年10月11日
- ⑦ 柳内圭子、高橋磨理子、古田裕一、長谷川貴志、大島範子、柳内和幸、「改良型Yeast One-Hybrid法を用いたヒトゲノムからのエストロゲン受容体結合配列の系統的な同定と解析」、日本人類遺伝学会第53回大会(神奈川、パシフィコ横浜)2008年9月29日

[その他]

ホームページ等

<http://www.drkazu.com/TOHOorSNPdb.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳内 和幸 (YANAI KAZUYUKI)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：30360704

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし