

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「器官形成に関するゲノム情報の解読」
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）  
研究代表者 松原 謙一 （国際高等研究所 学術参与）  
主たる研究参加者  
加藤 菊也 （奈良先端科学技術大学院大学 教授）  
豊田 均 （大正製薬株式会社 主任）

### 3. 研究内容及び成果：

本プロジェクトの代表者、松原教授は既に1989年に遺伝子発現情報の包括的収集というコンセプトを生み出し、BodyMap法を完成させ、遺伝子発現のデータベース作成が実現出来ることを世界最初に示した。それ以来、本グループはヒトを中心とする個体の各種組織に於ける遺伝子発現情報の収集に努めて来た。本プロジェクト開始時点では松原グループは各種組織という空間軸よりも発生分化時の形態形成・器官形成という時間軸にそった遺伝子発現プロファイルの収集を行い、それより細胞の分化に伴う遺伝子発現調節のネットワークを解明することを中心課題とした。この為、松原グループは研究の対象としてマウスC57BL/6Jの小脳形成を選び、出生時の細胞塊が発生分化するプロセスで経時的に発現する遺伝子のプロファイルを収集し、そこに働く制御機構の解明を目指した。

より具体的には、生後4、8、9、10、12、16日、及び3、6週の時間軸に沿って発現してくる全遺伝子の動態を発現プロファイルとして収集した。発現プロファイルの定量化は組織形成の途上にある超微量試料のメッセンジャーRNAをcDNAに変換し、それをPCRで増幅し、そのパターンの解析を行うことによった。当初は、定量化はATAC-PCR法によったが、これには解析数に限界があることから、よりハイスループットなcDNAチップ技術を完成させて、これによって約6000の遺伝子の発現プロファイルの解析が可能になった。更に、最近のマウスゲノム配列決定の完成に伴い、それに基づいて設計した合成オリゴ核酸チップを用いて、マウスゲノムの全DNAに担われている30,000遺伝子の発現プロファイルを得る事が可能になった。この中、約16,000種の遺伝子について発現情報を収集してデータベースの構築を行った。

データの解析には一つずつの遺伝子の活性変動パターンを全ての他の遺伝子に対して比較するクラスター分析あるいは主成分分析法を主に用いたが、これによって遺伝子を発生分化時の挙動によって分類し、類似挙動パターンを示すcDNAごとに分類した。出来上がったデータは縦軸に遺伝子を、横軸に各発達段階にある小脳を示した、いわゆるタイルグラフで表現出来る。これによって、似た制御系や異なる制御系のもとに置かれているもの同士を容易に分類、認識できるようになった。この結果、本プロジェクト終了時において松原グループは、対象とした3万の遺伝子のうち、17,000について経時的な発現プロファイル情報を得ている。松原グループは、これらの包括的プロファイルの解析から小脳という細胞システムでは出生から8日を境として急速に機能の切り替えが遺伝子レベルで起こることを明らかにし、小脳形成の形態的観察と照らし合わせると、これは外顆粒細胞層

にある増殖状態の顆粒細胞が、移動を起こして内奥に移り、線維形成から成熟へと進むという形態上の観察結果と一致するものであり、この時点で神経細胞への切り替えが起こることを示している。前者を増殖顆粒細胞、後者を神経細胞と呼ぶことにすると、外顆粒層から増殖顆粒細胞が移動を始めて内奥に移る間に神経細胞に切り替わると言える。

また、松原グループは、形成途上の小脳の各部位からレーザーマイクロキャプチャー法により経時的に試料を取り出して解析を行った結果、初期の細胞活性の殆どが小脳の外側に最も近い外顆粒層で起きており、後期の細胞活性の殆どは小脳の最も内側にある細胞層で起きていることを明らかにしている。また、発現プロファイルの中に出現した遺伝子の機能を調べる為に、それらを発現ベクターにクローニングして PC12 細胞にトランスフェクションし、強制発現させた。700 種の遺伝子のクローニングを行ったところ、380 種の互いに異なる、発現可能な遺伝子クローンを得ることが出来た。それぞれのクローンをアテロコラーゲン法により PC12 細胞にトランスフェクションしたところ、細胞増殖促進効果を示したものが 9 個、顕著な神経突起誘導効果を示したものが 6 個、管形成を示したものが 4 個あった。トランスフェクションで過剰発現を起こし、PC12 細胞に分化誘導をもたらすこれらの遺伝子は今後の制御系ネットワークの解析に有効な手掛かりを提供するものと考えられる。

#### 4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で 19 件掲載された。松原グループは、小脳の器官形成に関する包括的な遺伝子発現の解析を行った。松原グループの成果に対してアドバイザーによる評価会議においては、中間報告時よりもその成果に一段の進歩が認められたとは言え、総合的に見てかなり厳しい評価となった。まず、肯定的な意見としてはマウスの小脳発生各ステージにおける 1 万数千遺伝子の発現プロファイルは一応データ収集を完了したことであり、この点に関してある程度の評価が与えられる。本研究は当初 cDNA をプローブとする方法でプロジェクトをスタートさせた為に包括的なプロファイリングの解析については対象解析数が少ないという決定的な問題をはらんでいたが、幸いマウスゲノムの全塩基配列が決定されたのに伴い、DNA アレイを用いた合成ヌクレオチドをプローブとする方法が可能になり、本プロジェクトが必要なプローブの大量作製に成功し、このような多くの遺伝子をカバーするプローブの作製はマウス小脳形成の際の発現プロファイルの包括的解析を可能にしたと言える。更に、その中からマウス小脳形成過程における特異な発現挙動をする遺伝子の解析から小脳発生分化に関わると思われる遺伝子を探し出したことについては一定の評価が与えられる。このような比較的肯定的な評価に反して、やや否定的な評価をするアドバイザーも見られた。まず、公開されたデータベースの内容が不十分だという指摘があった。また、当初の計画にあった小脳のみならず肝臓における同様な研究が全く行われなかったということについても厳しい評価が下された。さらに、本研究の成果が様々な不利な条件があったにせよ、世界的に見て、この分野において強いインパクトを与えられなかったという事実に対しては厳しい意見がみられた。また、本研究からの論文、特許についても不十分という指摘もあった。松原グループの評価については、今後はこのような成果

が公表後どれだけ活用されるかによって最終的評価が決まるという意見が大半を占めた。以上のように、松原グループの成果に関しては、その成果はある程度評価する意見と全体のレベルとして不十分とする評価が相反し、総合的な評価としてはやや不満足というのがアドバイザーの結論である。

#### 4－2．成果の戦略目標・科学技術への貢献

松原グループの小脳をモデルとした発生分化時の形態形成、器官形成における遺伝子発現情報の包括的な収集という戦略目標は、様々な技術的問題を乗り越え、最終的には当初の研究課題「器官形成に関するゲノム情報の解読」の戦略目標に合致する成果を得て終了した。松原グループの研究成果が今後の広義のゲノム科学技術、より具体的にはポストゲノムシーケンス時における研究の進歩にどれほど貢献するかは松原グループの収集した包括的な遺伝情報を世界の研究グループが今後どのようにそれを利用するかにかかっている。しかし、小脳発生時という限られた研究対象とは言え、一万数千に及ぶ遺伝子の発現情報を一見のもとにそれを閲覧できることは価値の高い成果である。松原グループの成果は、今後における研究において、器官の発生分化時の遺伝子発現の包括的なデータの収集が有効性を示すものとして期待されるので、当該基礎的又は応用分野科学における貢献もまた大きいと言えよう。

#### 4－3．その他の特記事項（受賞歴など）

なし