

国際高等研究所 学術参与

松原 謙一

「器官形成に関わるゲノム情報の解読」

研究期間：平成 1 0 年 1 2 月 1 日～平成 1 5 年 1 1 月 3 0 日

1. 研究実施の概要

ゲノムの構造解析が進展してヒトをはじめマウス、ハエ、線虫、コウボ、各種の微生物などたくさんの生物について DNA の塩基配列情報が大量に蓄積すると共に、ゲノム機能解析の必要性が広く認識されるようになった。

しかし、一般に言う「ゲノム機能解析」には二種類の全く異なったカテゴリーの仕事が含まれている。その 1 は、ゲノム構造解析から予測された新規遺伝子の産物同定を目指す実験的アプローチで、その典型は完全長 cDNA 配列の収集努力である。その 2 は、ゲノムの担う遺伝子群の発現調節情報を幅広く集め、全遺伝子を視野に入れた発現調節ネットワークの全容解明を目指す努力である。

網羅的発現情報収集をもとにして発現調節ネットワークの全容を解明しようとするいわゆるデータ駆動型サイエンスは、個別に遺伝子の発現調節を調べる従来の研究、いわゆる仮説駆動型サイエンスとは手法においても目的においても全く異なるものである。この仕事はデータベース構築から開始し、その成果が一旦出来上がれば以降の研究は他者もこれを繰り返すことなくそれを活用して進めることが出来るという特色を持つ。

本研究が発足した前後には大量の発現情報を収集する手法が出現しつつあり、BodyMap法、それを改良したSAGE法、ATAC-PCR法、DNAチップ法などが実用に供され始めており、一部は改良中という状況であった。

我々は 1989 年に発現情報の収集というコンセプトを生み出し、BodyMap法を完成させてデータベース作成が実現出来ることを示した世界最初のグループである。[Okubo, K. et al., Nature Genetics, 2, (1992) 173-9 : 遺伝子発現プロファイリングという語がそれ以来使われている] それ以来我々はヒトを中心とする個体成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が、研究費の圧倒的差によりフォロワーに水をあけられ、忸怩たる思いをしていた。しかし、1998年に自らの研究費申請が可能となり、改めて各種組織という空間軸よりも形態形成・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、細胞の分化を伴う増殖過程での調節のネットワークを解明することを指向した。

受精卵から始まる発生・器官の形成を含む形態形成過程はゲノムの担うプログラムが順を追って発現することに依って進行するものであり、その厳密な再現性の故に、このプログラムは安定なものであると考えられている、その解読は当然、きわめて重要である。

我々は研究の対象としてマウスC57BL/6Jの小脳形成を選んだ。マウスの小脳は発生の過程で遅く始まり、出生時には約1mmの細胞塊に過ぎないが、出生以降は全体として揃った増殖と分化を遂げて、約三週で完成器官になる。つまり、大部分の細胞は出生の後に起きた分裂と分化の産物である。この間には、外部と細胞のやり取りをしない、閉じたシステムとなっている。我々はこの集塊の中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。マウスの小脳の形態的な変化の様子を[図1]に示す。

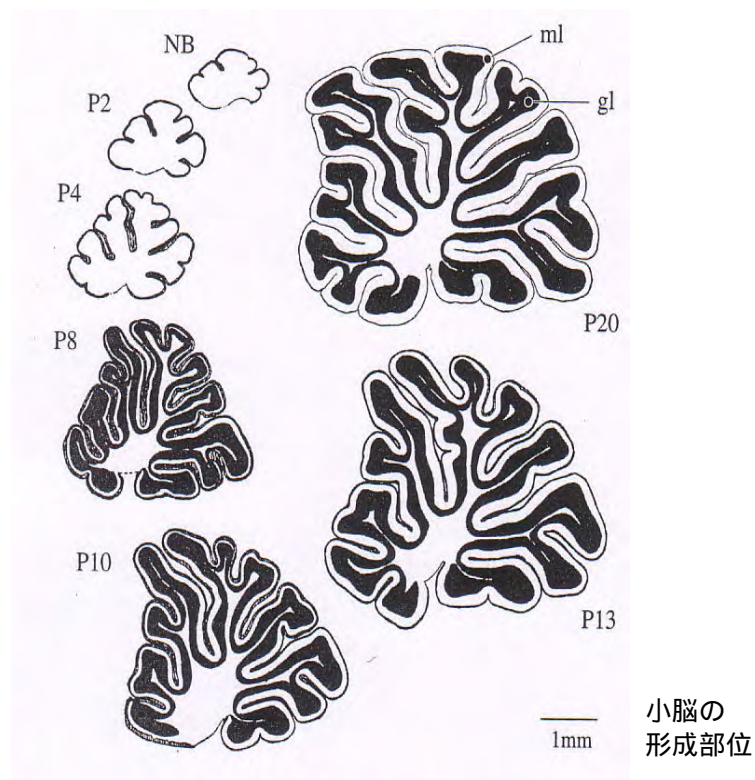
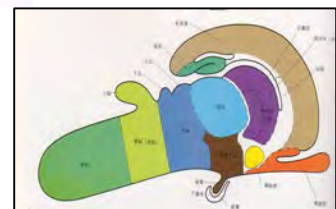


図1 出生後のマウス小脳の発達



先ず生後8日ほどの間に外顆粒層でグリア細胞の大規模な増殖が起こり、8日頃から細胞は内部へ移動して内顆粒層の形成を始める。12日頃になると内顆粒層と外顆粒層の間に広汎な神経線維のネットワーク形成を始め、いわゆる分子層を形作る。3週までに細胞は成熟し、小脳として完成する[図2]。夫々の過程はほぼ同期的に揃って起こるので、比較的単純に自己組織化の道を辿る細胞集団と見ることが出来る。

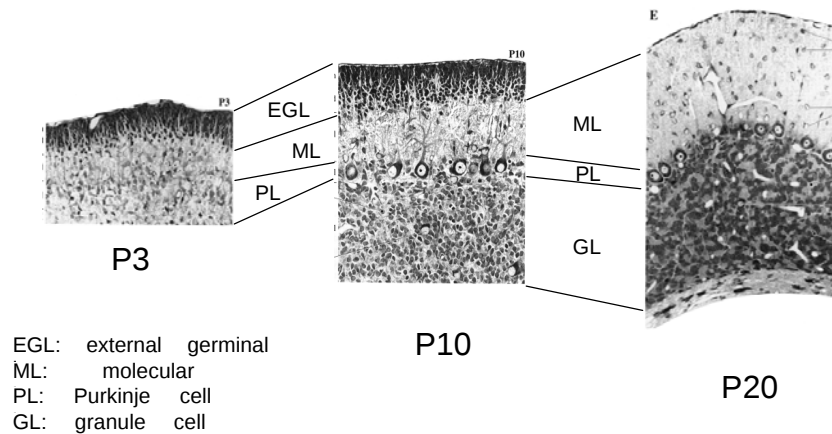


図2 出生後の小脳形成過程と細胞

本研究ではこの複雑系をそのままに「丸ごと」取り扱い、時間軸に沿って発現してくる全遺伝子の動態を生後4,8,9,10,12,16日,及び3,6週に発現プロファイルとして収集した。発現プロファイル収集は夫々の時点で得られた試料からRNAをとり、どの遺伝子を代表するメッセンジャーRNAが何分子存在するかを計測する作業である。組織形成の途上にある超微量試料のメッセンジャーRNAの集団を分析する為の情報に従って、RNAをcDNAの集団にまず変換して増幅した。

研究を始めた当初にはこのcDNAに変換した試料から、cDNAを一つずつクローニングし、シーケンスして、それを元にプライマーを設計し、ATAC-PCR法〔Kato,K(1997)Nucleic Acids Res. 25, 4694-6〕による計測を行った。この為それぞれの試料につき約2000の遺伝子発現の情報を得るに留まった。やがてcDNAチップの自製技術を完成させて、約6000の遺伝子の発現プロファイルをいつも得られるようになった。しかし、最近に到ってマウスゲノム配列決定が完成し、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出来るようになった。この内約16,000種の遺伝子についてデータベース構築に適する発現情報を収集することが出来た。

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[総当り]で対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。これによって現れては消え、或いは新たに現れ、或いは働きつづける遺伝子をその振る舞いによって分類し、互いに似た振る舞いをするもの同士、特殊な振る舞いをするもの同士などをまとめることが出来る。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した。遺伝子発現の強度は、6週の成熟マウス大脳で働いている遺伝子を標準とし、小脳に於けるそれぞれの遺伝子発現がそれよりも強いかわかりをlog2を底として表した。このタイルグラフでは小脳試料に於ける発現が6週の成体大脳よりも強いものほど赤色が強く、逆の場合には緑色が強くなるように表現してある。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認識できる。調査した3万の遺伝子のうち、17,000について経時的に発現プロファイル情報を得ることが出来た。〔図3〕

Postnatal Cerebellar Development

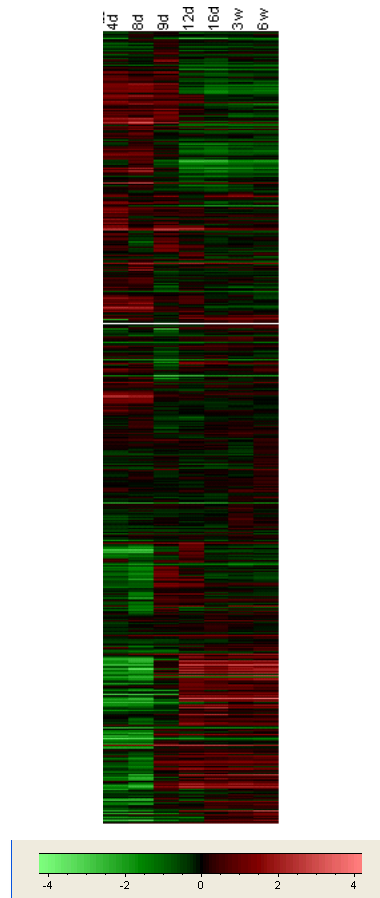


図3 生後4,8,9,12日3,6週の小脳で働く遺伝子群の様子

強く働くものを赤、中間の強さのものを青緑、弱く働くものを緑で表す。

8日と12日の間には発現遺伝子群の大幅な入れ替えが起きていることが分かる。

遺伝子の活性は同じ遺伝子が成体の大脳で働いている量を基準としている。

その結果、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切り替えが起こることが明らかになった。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観察と対応するものであり、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。便宜上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のだろう。この図で中間状態にあると思われる

9,10日から12日の試料の中には、増殖顆粒細胞型でも神経細胞型でもないパターンの遺伝子発現が種類は少ないながら起きていることも観察できる。

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調べた結果は、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示した。

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〔Honma et al, BBRC(2001)289, 1075-81〕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鍵を提供するものと考ええる。なお、これらの遺伝子は、すべて小脳形成の初期から12日頃までの間に発現するものであった。

本研究では深く追求することは出来なかったが、ここで構築したデータベースは病気や投薬等による機能変化を迅速に解析する上で有用なものである。

既に述べたようにゲノム機能の理解を目的としたこのタイプの研究は「面白い遺伝子」の発見を目指すものではない。しかし、器官形成の過程で働く制御のネットワーク理解は本データベース作成の最終目的の一つでありながら、「ドライ」の研究のみではこの最終目標に迫るのは難しい。理屈としては経時的に起こる諸反応において起動する遺伝子夫々の発現調節機構に関する情報を集め、他種物質との相互作用情報を集め、共発現する遺伝子群をまとめ、それらを総合的に考察するデータベース活用型解析がありうる。然し、現在のところ、その解析に不可欠な核酸と核酸、核酸とタンパク、タンパクとタンパクの相互作用に関する情報があまりにも貧弱である。この為、制御のネットワークを垣間見る為には、当面は[ドライ]だけでなく、対象とする生きた試料に何らかの介入実験を行う必要がある。遺伝子ノックアウト、薬剤投与、iRNA等いくつかの迫り方が工夫されているが、本報告の後半に触れた遺伝子の過剰発現で制御系を変化させる研究手法は其中でも最初に適用できるものの一つである。

2．研究構想

研究開始時には器官形成という時間軸に沿ってゲノム情報が読み出されてくる様子を記載する発現情報の収集と解析を複数の器官について行うつもりであった。このためにマウスの小脳と肝臓を使う実験を計画した。

然し、取り掛かってみると、当時の技術レベルではメッセンジャーの収集はともかく、cDNAライブラリーの構築と、その構成員をシーケンシングする大きな努力、BodyMapの作成、それに基づいたプライマーの設計、そしてATAC-PCRの実行という過程で要求される作業量は、予定していたのよりもはるかに大であった。このために、肝臓のデータ収集は断念し、小脳のデータ収集一本に絞った。

その後、重複を排したcDNAライブラリーを作りcDNAチップの活用へと進み、データ収集がやや楽になったが、2002年にマウスゲノムの解読完成のおかげで、全遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドを設計・合成し、搭載したオリゴチップの入手が可能になり、データ収集のスピードを速めることが出来た。

一方、オリゴチップの出現により、「全ての遺伝子」について網羅的に情報収集を可能にするという状況が出現したので、一部の遺伝子についての情報しか得られなかったそれ以前の研究とは質的な違いが現れた。小脳形成の初期と後期の間に、殆ど全ての発現遺伝子が入れ変わってしまうという明瞭な遺伝子発現調節系の変化が見出されたのはこのおかげである。それと共に、cDNAのコレクションではチップに載せる作業からもれてしまうような低発現の遺伝子の活性を調べたり、シグナル伝達系や細胞増殖のサイクルに関与する、現在知られている限りの遺伝子群、或いは神経細胞の突起形成や細胞内物質輸送に関与するフィラメント関連遺伝子の全てについてグローバルな情報を得るなど、「全遺伝子」が対象になってから画期的に多くの解析が可能になった。

本研究の成果として得られた発現プロファイルデータベースは、ゲノム配列からは機能未知としか言えない遺伝子に対して機能を推定するのに役立ち、また、疾病や薬物による器官の機能変化等を吟味・研究する上で、今後重要な役割を果たすものと考えている。このため、成果は公開データベースとすることに勤めており、既に各方面からアクセスされている。

しかし、今日、発現プロファイル情報を駆使して小脳との形成に働く遺伝子調節のネットワークを解明すると言うテーマについて言うと、所期の目的に近づいたとはいえ、成果は未だ誇れる状況にはない。理屈としては経時的に起こる諸反応に沿って起動する遺伝子の発現調節機構を理解する為に、別のデータベースから核酸・核酸、核酸・タンパク、タンパク・

タンパクの相互作用情報を入手して考察することが筋であろう。別の生物の発現調節ネットワーク情報の援用も考えられる。しかし、現在はそれらの情報があまりにも貧弱である。従って、早急に遺伝子発現調節のネットワーク解明に進もうとするならば、当面は生材料に何かの介入実験を行わねばならないだろう。本報告の後半に触れた遺伝子の過剰発現で制御系を変化させるという研究手法は、すぐに適用可能、且つ比較的操作の容易な手法の一つであろう。IRNA 法や各種の欠損株を駆使する遺伝子機能抑制実験、トランスジェニック株、あるいは適切な ES 細胞株や薬剤との組み合わせ環境などによるウェットからの介入実験が当面の活路であろうと考えている。

本研究では小脳における遺伝子発現のプロファイルを道具として疾病や薬剤の効果などを研究することも理論的にかのうであったが、小脳は器官形成のモデルシステムとしては優れている反面、機能破綻や攪乱を調べる為には比較的使い勝手が悪い。予備的なデータは、むしろ他の脳領域で出始めた。これらの成果は大正製薬と一部共同で進めたが、その成果は下記のデータ公表の中に盛り込まれている。

マウス 3 万の遺伝子を搭載したオリゴヌクレオチドチップを用いた研究は、本研究開始後に活動を始めた(株)DNA チップ研究所で行った。

3 . 研究成果

(1) 研究内容及び成果

小脳形成過程において経時的に収集した遺伝子発現プロファイル

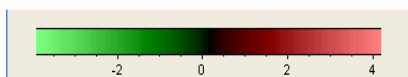
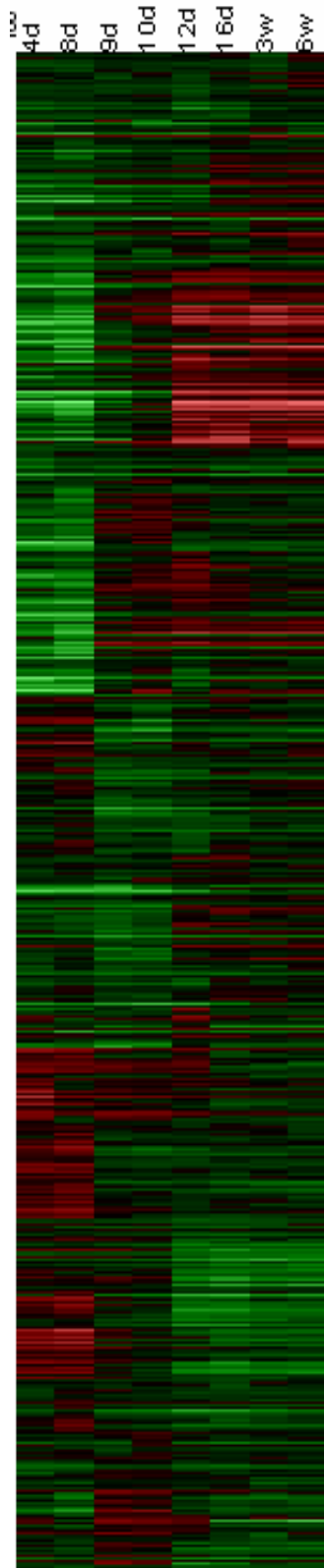
マウス(BALB/C6-b)の小脳を出生後4,8,9,10,12,16日、及び3,6週に採取し、[丸ごと] RNA調整に供し、c DNAに変換後にBodyMap法、ATAC-PCR法、cDNAチップ法、オリゴヌクレオチドチップ法により遺伝子の発現プロファイルを測定した。技術の進歩と共に測定対象の遺伝子数は増加し、最終的に、オリゴチップを使い、マウスゲノム解析で検出された既知、未知を問わず全ての遺伝子について発現量を測定した。この結果、約17,000の遺伝子についてその経時的発現の動態を記載したデータベースが出来上がり、一般に公開した。

発現プロファイルをいわゆるタイルグラフで表現したものは [図3] に示してある。この発現プロファイルは形態的観察と見事に一致する。即ち、生後8日までの間は約8000の遺伝子が夫々自己に固有の強さで発現し、その状態を比較的安定に保つ。これを仮に増殖型細胞のプロファイルと呼ぶ。ところが小脳の形成が8日を過ぎると増殖型細胞で発現していた殆ど全ての遺伝子は急激に消失し、全く新しいセットの遺伝子が働き始め、その強さは12日から6週に到るまでほぼ安定に続く。これを仮に神経型細胞の示すプロファイルと呼ぶ。8日から12日の間に起こる増殖型細胞→神経型細胞のプロファイルに変わるこの急激な変換は細胞がその間に全く違うものになってしまうことを表している。代謝、イオン輸送、膜成分、ミトコンドリアに到るまですっかり作り替えてしまい、同じ機能を持つ遺伝子も増殖型と神経型の間で異なるものを選んで働かせる仕組みになっている。〔図4〕に例として膜遺伝子群とトランスポート関連の遺伝子群の発現プロファイルを示すが、8日を境に細胞はほとんどの遺伝子を切り替えてしまうことがみて取れる。

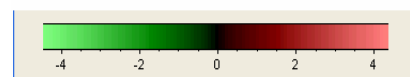
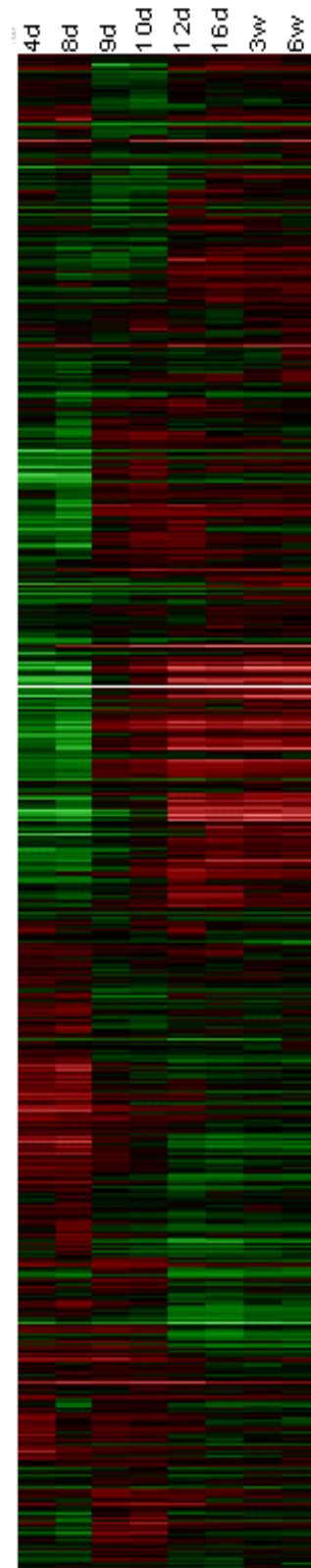
図4 膜関連遺伝子群及びトランスポート関連遺伝子群の小脳形成過程における発現プロファイル (次ページ)

どちらも8日以前と12日以降に起きたシャープな発現プロファイルの切り替を示している。その中間である9,10日に、顆粒細胞型の引継ぎか、神経型細胞の前倒しのような形で例外的な弱い発現が見える。

membrane



transport



例外としてリボソーム遺伝子群、ヒストン、サイトカイン関連遺伝子群等がこれらと異なる振る舞いをする事が認められた。

リボソーム関連遺伝子群のプロファイルを図5に示す。

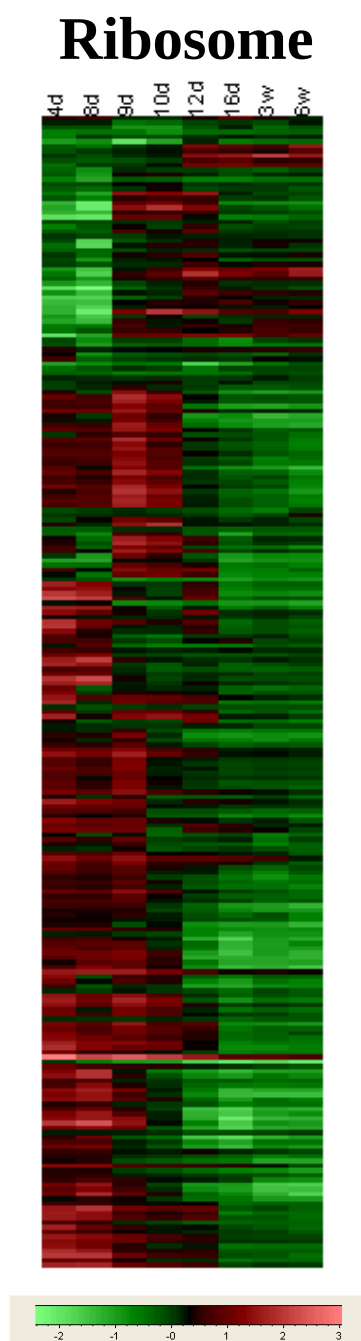
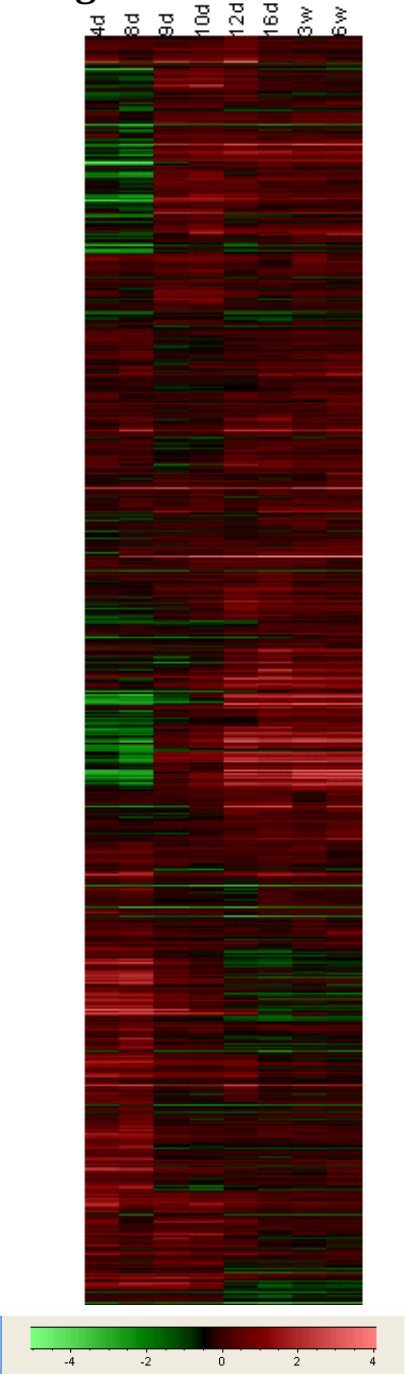


図5 リボソーム関連遺伝子群の発現プロファイル

若干の例外を除き、殆どの遺伝子は小脳形成の初期から移行期までの間に強い発現を示し、神経型細胞に変わる際の切り替えは認められない。

興味ある振る舞いを示すのはタンパクキナーゼ群、カルシウム関連遺伝子群、Znフィンガータンパク群である。[図 6、 7]。

**Protein kinase, G-protein, signal
transduction, signaling pathway,
signaling cascade**



Calcium

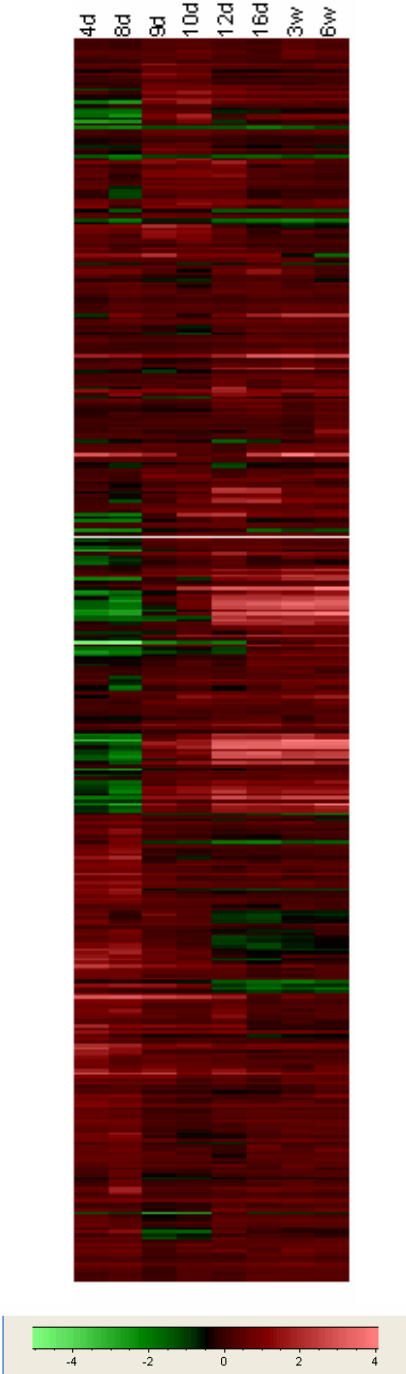


図 6 プロテインキナーゼ、カルシウム関連遺伝子群

Zinc Finger

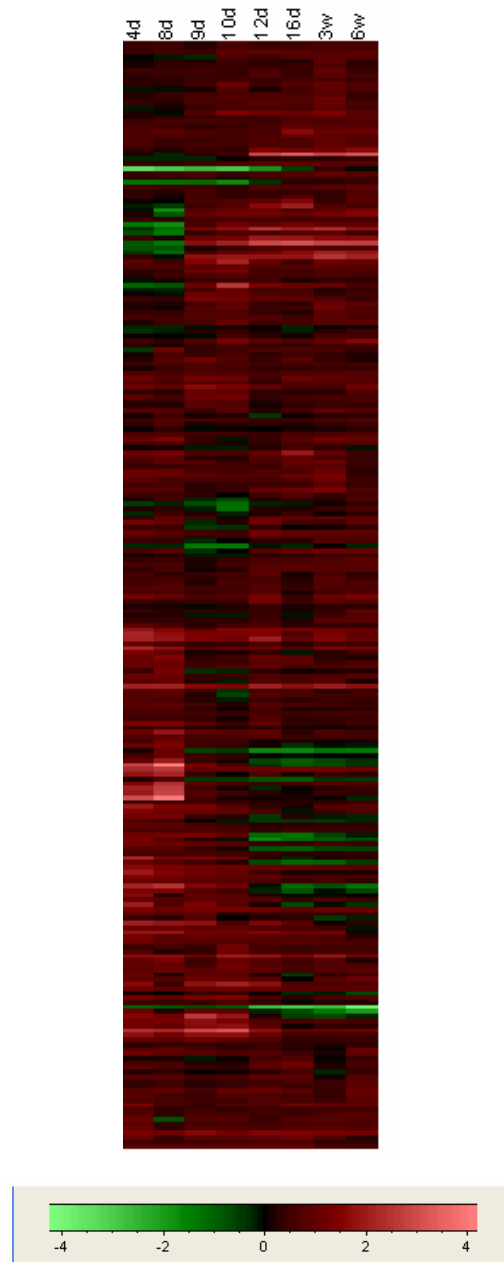


図7 Znフィンガー遺伝子群

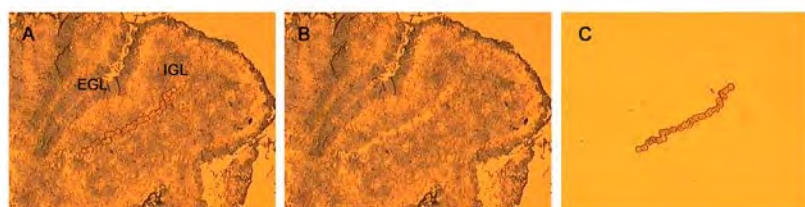
発現プロファイルは、ゲノム配列からもたらされた多数の機能未知遺伝子の少なくとも一部についてその振る舞いから機能を推測し、アノテーション付けの助けにすることができる。

遺伝子発現プロファイルが短期間に鋭い変換を引き起こす仕組みの解明はこれからの課題である。尚、比較的数量少ないが、この転換のおきている時期、つまり9,10日前後に特有のピークを示す遺伝子も若干あり、課題解決の鍵、或いはそこで有用なマーカーとして使えるのではないかと考えている。

発生途上の部位との対応

レーザーマイクロキャプチャー装置を用いて増殖顆粒細胞層と神経細胞層から細胞を採取し、夫々に於ける遺伝子の発現プロファイルを調査した。 [図 8]。

Laser Capture Microdissection



LCM of the granule layer from sections of postnatal day 12 mouse cerebellum
The tissue was fixed in ethanol and stained with hematoxylin and eosin (HE). (A) The IGL is targeted with individual laser shots. Each 35 μ m-diameter shot is seen as a circle. (B) The tissue section after LCM. The targeted tissue has been removed from the section. (C) Transfer film surface following LCM.

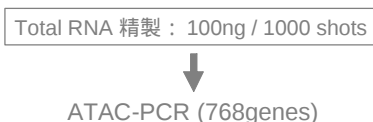


図 8 レーザーマイクロキャプチャー

その際、外顆粒層を最も外側に近い EGLm 層とその内側の EGLd 層に更に分け、内顆粒層を最も深奥の IGLb 層とそれより浅い部位にある IGLa 層に分けた。 [図 9]。

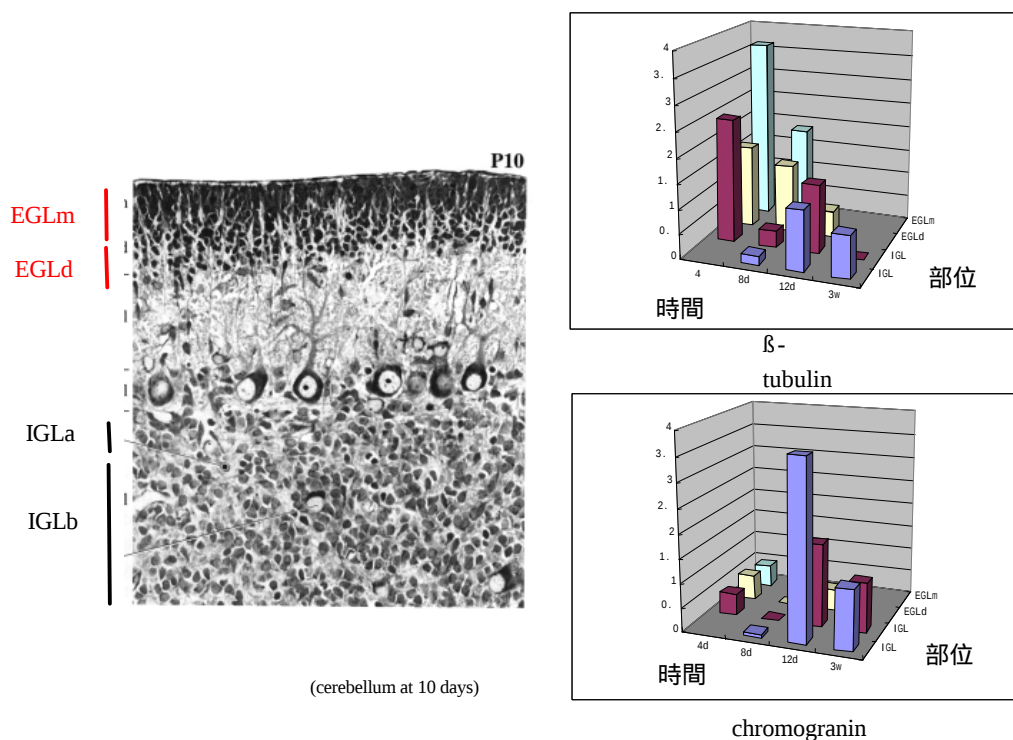


図9 小脳の小部位に於ける遺伝子発現の時間的区間的検討

小脳形成の早い時期に働く遺伝子は予想どおり、四試料の中で増殖顆粒層の最外側にある EGLm 層で最も強く、内側に向かって EGLa → IGLa → IGLb と弱くなっていた。このことは 8 日までの小脳では顆粒層最外部、つまり EGLm 層が主要な細胞の活性部位となっていることを示している。此の活性は時間と共に低下しながら、一部内顆粒層（前項では神経型細胞層）に移って行く。此れに反して小脳形成の遅い時期に働く遺伝子は四試料の中で神経細胞層の最内側である IGLb で最も強く、IGLa がそれに続き、外顆粒層では殆ど活性がなかった。これらの観察は小脳形成の後期には最内側の神経細胞が主要な活性部位の担い手であることを示している。更に多数の遺伝子を対象に、微量試料の解析に適した ATAC-PCR 法 300 の遺伝子について調べ、主成分分析法で局在と経時的変化を調べた結果を [図 10] に示す。

Principal Component Analysis

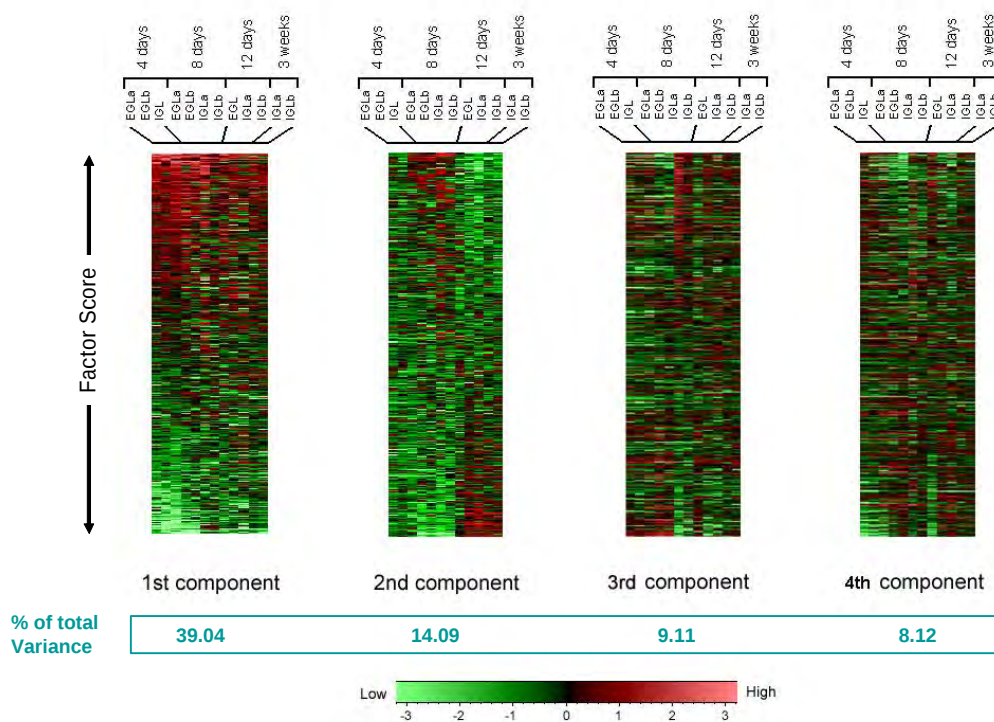


図10 小脳内部での遺伝子300種の発現とその時間的変動

内部部位の名前は図9による。横軸に部位と時間を、縦軸に各種の遺伝子を示す。

当然のことながら、初期、つまり外顆粒層で働く遺伝子には大部分のリボソーム、ヒストン、サイトカイン関連遺伝子等が含まれ、後期、つまり神経細胞層で働くものとしては神経細胞特異的な遺伝子が多く認められる。

トランスフェクションによる遺伝子機能の直接的観察

発現プロファイルのリストに出現した遺伝子700について発現ベクターへのクローニングを試み、380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〔Honma et al, BBRC(2001)289, 1075-81〕によりPC12細胞を受容体としてトランスフェクションアッセイを行った〔図11〕。

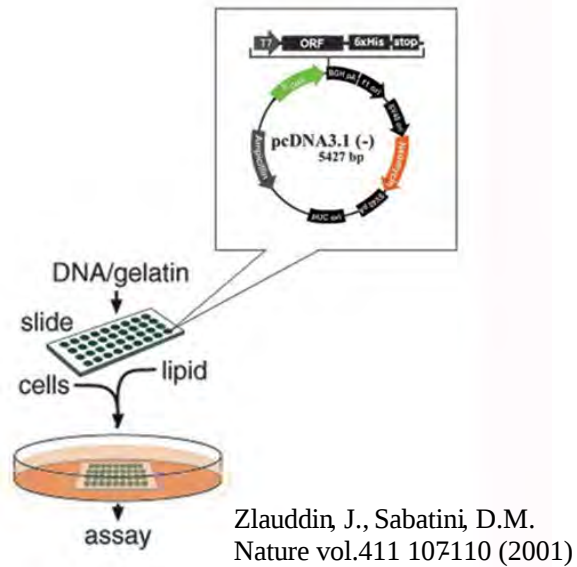


図11 アテロコラーゲン法により多数遺伝子のPC12細胞に対するトランスフェクション能を調べるスキーム

その結果、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個認められた[図12]。

過剰発現で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鍵を提供するものである。なお、これらの遺伝子は、すべて小脳形成の初期から12日頃までの間に発現するものであった。

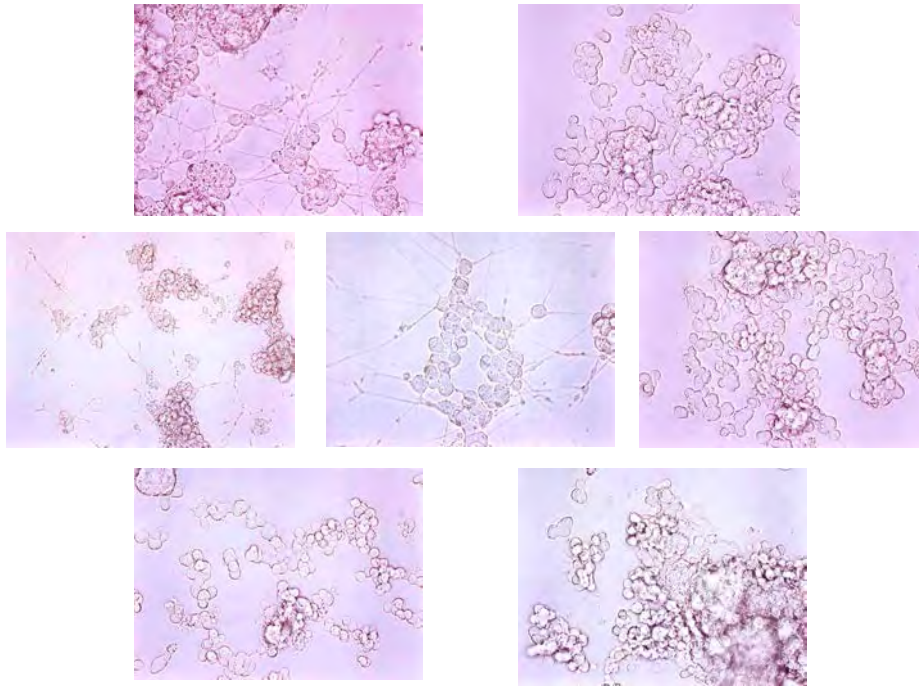


図12 アテロコラーゲン法により線維形成を示したP C 12細胞とコントロール

老化、個体差について

「丸ごと」で器官を解析する場合に、個体差は重大な障害となる。しかし、本研究を通じて小脳の初期形成の過程は完全な再現性を示した。これに対して加齢（63～75 週）後のマウス小脳を7 個体について調べたが、個体差が大きく、一般的傾向を論ずるには不足であった。

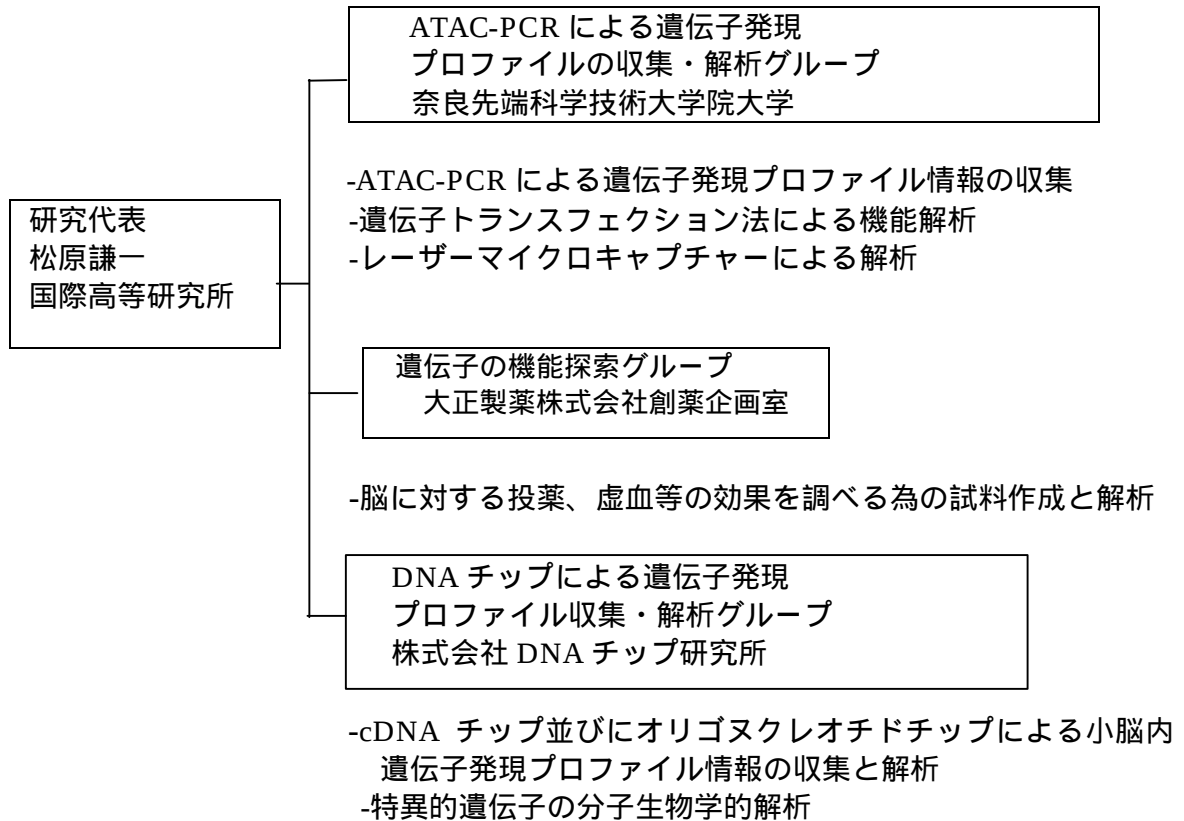
(2) 研究成果の今後期待される効果

ゲノム機能解析には国際的に大きなエネルギーが投入されており、プロテオーム解析や完全長 cDNA 収集、SNP 解析などに盛んな研究投資が行われている。こうした中、遺伝子発現プロファイル収集もかなりポピュラーになり、本年12月現在関連報文

は約9800報に達している。然しマウスと小脳というキーワードで検索できるものは11報文にすぎず、そのうち本報に近い内容を持つのは3で、その1は我々の論文であり、あとの2はアメリカで、そのうちの1つは緊密な情報交換の出来るグループである。他方、脳研究は活発に行われているが、脳を器官の構築という視点からアプローチする研究の姿勢は未だに殆ど無い。今回基本的なデータベースがほぼ出来上がったので、次の研究ターゲットを小脳の形成と上で起こるラジカルな細胞機能の切り替えに置きたいと考えている。この発現調節の切り替えの解析には、その切り替え時の前後に発現している（或いは発現を急加速または急停止する）遺伝子に注目した研究が一つであろう。また、すでに述べた如く、現状では制御系への介入実験を進める必要がある。繰り返しになるが、本研究で構築したような遺伝子発現情報のデータベースは一旦作れば同じ実験を繰り返す必要がない。また、それを元にして、小脳から他の脳領域にデータベースを広げ進む基礎ともなる。他の脳領域で研究されている疾病や薬剤の効果研究等に波及効果をもつものと期待される。

4 . 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

統括グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
松原謙一 田中美奈子	国際高等研究所	学術参与 研究補助員	全体の統括 事務補佐	H10.9~H15.11 H11.1~ H 15.11

遺伝子発現プロフィール収集・解析グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
松原謙一	奈良先端科学技術大学院大学 ゲノム機能解析講座 (以下同上)	教授	試料の調製	H10.9~H15.11
加藤菊也		教授	システム向上	H10.9~H15.11
榊原祥公		(助教授)	同上	H10.4~13.4
的場亮		(助手)	データ処理と知識化	H10~12.4
斉藤さかえ		助手	同 上	H10.9~H15.11
春日孝彦		共同研究員	データ解析とソフト開発	H10~H11.4
光原健太		共同研究員	データ解析とソフト開発	H12~H13.4
多田基紀		大学院生	解析実施、システム向上	H10~H11.4
山下理宇		大学院生	解析実施、システム向上	H10~H11.4
丸山千由利		CREST 技術員	解析実施	H11.2~ H15.11
東尾友美子		研究補助員	実験補助	H11.2~ H15.11
北 浩子		CREST 研究員	細胞培養と解析実施	H13.12~H14.4
植野 憲子		CREST 技術員	解析実施	H14.4~ H15.11

遺伝子の機能探索グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
北村一泰	大正製薬株式会社 創薬企画室	室長	試料作成と遺伝子機能探索	H12.4~ H15.11
大塚昇		課長	研究の統括	H12.4~ H15.11
豊田均		主任	試料作成 新規遺伝子の機能探索	H12.4~ H15.11

DNAチップによる遺伝子発現プロファイル収集・解析グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
松原謙一	(株)DNA チップ 研究所	社長	統括	H12.4～H15.11
Lim Chun Ren 村田成範	(株)DNA チップ 研究所	研究員 研究員	DNAチップによる 発現情報の収集と 解析	H14.4～H15.11 H14.4～H15.11
渡部祥二 西部圭悟	同上	同上	情報処理と解析	H15.4～H15.11 H14.4～H.15.1 1

５．研究期間中の主な活動

該当なし

6 . 主な研究成果物、発表等

(1)論文発表 (国内0件、海外19件)

1. Matoba, R., Kato, K., Sakakibara, Y., Maruyama, C., and Matsubara, K. Expression profiling of active genes. in *Conpromisos con el futuro del Proyecto Genoma Humano/Current Options for the Human Genome Project*, edited by Fundacion BBV. Documenta, FundaciBBV, Bilbao, Spain. pp.113-124, (2000).
2. Matoba, R., Kato, K., Kurooka, C., Maruyama, C., Sakakibara, Y. and Matsubara, K. Correlation between gene functions and developmental expression patterns in the mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 1357-1371.
3. Sawada, Ki, Doyu, M., Tanaka, F., Sobue, G. and Kato, K. Detection of triplet repeat expansion in the human genome by use of hybridization intensity. *Anal Biochem.* 286 (2000) 59-66.
4. Sakai, K., Higuchi, H., Matsubara, K. and Kato, K. Microarray hybridization with fractionated cDNA: enhanced identification of differentially expressed genes. *Anal Biochem.* 287 (2000) 32-37.
5. Matoba, R., Saito, S., Ueno, N., Maruyama, C., Matsubara, K. and Kato, K. Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development. *Physiological Genomics* 4 (2000) 155-164.
6. Doyu, M., Sawada, Ki, Mitsuma, N., Niwa, Ji., Fujii, Y., Yoshimoto, M., Sobue, G. and Kato, K. Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. *Mol. Brain Res.* 87 (2001) 1-11.
7. Yamashita, R., Matsubara, K. and Kato, K. A comprehensive collection of C2H2 -type zinc finger motifs compiled by molecular indexing. *Gene*, 274 (2001) 101-110.
8. Wyttenbach, A., Swartz, J., Kita, H., Thykjaer, T., Carmichael, J., Bradley, J., Brown, R., Maxwell, M., Schapira, A., Orntoft, T.F., Kato, K. and Rubinsztein, D.C. Polyglutamine expansions cause decreased CRE mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10 (2001) 1829-1845.
9. Saito, S., Matoba, R., Kato, K. and Matsubara, K. Expression of a novel member of the ATP1G1/PLM/MAT8 family, phospholemman-like protein (PLM) gene, in the developmental process of mouse cerebellum. *Gene*, 279 (2001) 149-155.
10. Saito, S., Matoba, R., Ueno, N., Matsubara, K. and Kato, K. Comparison of gene expression profiling during postnatal development of mouse dentate gyrus and cerebellum. *Physiological Genomics*, 8, (2002) 131-137.
11. Kita, H., Carmichael, J., Swartz, J., Muro, S., Wyttenbach, A., Matsubara, K., Rubinsztein, D.C. and Kato, K. Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Hum Mol Genet*, 11 (2002) 2279-2287.
12. Ravikumar, B., Stewart, A., Kita, H., Kato, K., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum Mol Genet*, 12 (2003) 985-994.
13. Saito, S., Matoba, R. and Kato, K. Adapter-tagged competitive PCR (ATAC-PCR) - a high-throughput quantitative PCR method for microarray validation. *Methods*, 31 (2003) 326-331.
14. Ohdate, H., Lim, C.R., Kokubo, T., Matsubara, K., Kimata, Y. and Kohno, K.: *J Biol Chem* 278 (2003) 14647-56 Transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth..
15. Kato, K., Matoba, R., Saito, S. and Matsubara, K. Brain Gene Expression Database (BGED). The 2004 Molecular Biology Database Collection. *Nucleic Acids Res.*, in press.
16. Kato, K. Adaptor-tagged competitive PCR: study of the mammalian nervous system. *Comptes rendus Biologies*, in press.

17. Lim, C.R., Fukakusa, A. and Matsubara, K. Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development using cDNA microarrays. *Gene* (2003) in press (著書)
18. Kato, K. ATAC Adaptor-tagged competitive PCR. In *Analysing Gene Expression* (ed. Lorkowski, S. and Cullen, P.), Willey-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 278-285 (2002).
19. Kato, K. Molecular indexing of 3'-cDNA ends. In *Analysing Gene Expression* (ed. Lorkowski, S. and Cullen, P.), Willey-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 312-321 (2002).

(2)口頭発表

招待、口頭講演 (国内2件、海外3件)

1. Kato, K. Adaptor-tagged competitive PCR and its application to the mammalian nervous system. Transcriptome 2000, Paris, Nov 6-9, 2000.
2. Kato, K. PCR-based gene expression profiling techniques. In "Genomics and Single molecule detection" a symposium by Norwegian Research Council, Oslo, 23rd September, 2003.
3. Sakae SAITO, Kikuya KATO Expression profiling and systematic functional analysis of genes expressed in granule cell development "Creating Coordination in the Cerebellum", Symposium in honour of Constantino Sotelo's lifetime work, Catania, Italy 2-4 October 2003.
4. マウス脳 cDNA チップを用いた抗うつ薬応答遺伝子群の発現解析 (日本分子生物学会第三回春季シンポジウム 招待講演)
5. Lim Chun Ren バイオビジネス国際フォーラム 2003 マイクロアレイを用いたマウス小脳の遺伝子発現プロファイル解析

ポスター発表 (国内20件、海外0件)

1. 斎藤さかえ、的場亮、加藤菊也、松原謙一 (奈良先端大) 第22回日本分子生物学会年会 マウス小脳の発達過程において特異的発現を示す新規遺伝子の解析
2. 坂井幸二、樋口浩文、松原謙一、加藤菊也 (奈良先端大) 第22回日本分子生物学会年会 DNAチップのための分画cDNAを用いた高感度ハイブリダイゼーション法
3. 的場亮、植野憲子、松原謙一、加藤菊也 (奈良先端大) 第22回日本分子生物学会年会 マウス小脳発生関連遺伝子の発現パターンによる分類
4. 溝口明子、的場亮、加藤菊也、松原謙一 (奈良先端大) 第22回日本分子生物学会年会 ヒト大腸癌肝転移巣における遺伝子発現様式の解析
第23回日本分子生物学会年会
5. 加藤菊也、的場亮、斎藤さかえ、松原謙一 (奈良先端大) 第23回日本分子生物学会年会 マウス小脳皮質および海馬歯状回路形成過程の発現プロファイルの比較
6. 斎藤さかえ、的場亮、松原謙一、加藤菊也 (奈良先端大) 第23回日本分子生物学会年会 Laser Capture Microdissection(LCM)を用いた小脳顆粒細胞分化における遺伝子発現パターンの解析
7. 的場亮、植野憲子、松原謙一、加藤菊也 (奈良先端大) 第23回日本分子生物学会年会 加齢に伴うマウス小脳における遺伝子発現プロファイル

- 8 . 山下理宇、松原謙一、加藤菊也、(奈良先端大) 第 2 3 回日本分子生物学会年会
マウス zinc-finger 遺伝子群の収集と解析
- 9 . 北浩子、室志津子、的場亮 (奈良先端大) Rubinsztein.D.C (ケンブリッジ大学) 加藤菊也、松原謙一 (奈良先端大) 第 2 4 回日本分子生物学会年会
伸長したポリグルタミン酸による神経細胞死過程における遺伝子発現プロファイルの解析と培養細胞系を用いたトリプレットリピート病の発症機序の解析
- 1 0 . 坂井幸二、三輪佳子、光原健太、的場亮、加藤菊也、松原謙一 (奈良先端大) 第 2 4 回日本分子生物学会年会マウス脳各部位の 3 ' EST 解析
- 1 1 . 北松尾浩子 (奈良先端大) Rubinsztein.D.C (ケンブリッジ大学) 松原謙一、加藤菊也 (奈良先端大) 第 2 5 回日本分子生物学会年会
トリプレットリピート病モデル培養細胞系の細胞死を抑制する遺伝子の探索
- 1 2 . 齋藤さかえ、加藤菊也 (奈良先端大) 第 2 5 回日本分子生物学会年会
Reverse Transfection を用いた小脳顆粒細胞の分化に關与する遺伝子の機能解析
- 1 3 . 望月秀明、加藤菊也 (奈良先端大) 第 2 5 回日本分子生物学会年会
合成オリゴヌクレオチドを用いた cDNA 合成法の開発
- 1 4 . 齋藤さかえ、加藤菊也 (奈良先端大) 第 2 6 回日本分子生物学会年会
ハイスループット遺伝子導入法を用いた小脳顆粒細胞の分化に關与する遺伝子の機能解析
- 1 5 . 坂井幸二、加藤菊也 (奈良先端大) 第 2 6 回日本分子生物学会年会
細断片化された cDNA 断片による転写産物の同定法
- 1 6 . 北松尾浩子、石縄直人、大羽成征、石井信、加藤菊也 (奈良先端大) 第 2 6 回日本分子生物学会年会
アダプター付加競合 PCR 法による遺伝子発現絶対量定量
- 1 7 . 村田茂範 第 25 回日本分子生物学会 マウス脳における抗うつ薬応答遺伝子群の発現解析
- 1 8 . 大舘秀純、津田亜紀子、Lim Chun Ren、木俣行雄、古久保哲朗、松原謙一、河野憲二 第 56 回日本細胞生物学会大会
出芽酵母 AAA+ファミリーATPase、Tih1p と Tih2p の機能解析
- 1 9 . 都留秋雄、Lim Chun Ren、松原謙一、河野憲二 第 56 回日本細胞生物学会大会
新規ストレス誘導性蛋白質 NPD003 の解析。
- 2 0 . Lim Chun Ren, 村田 成範, 木暮 みとり, 杉野 麻衣子, 松原 謙一 第 25 回日本分子生物学会年会
マウス脳組織 cDNA マイクロアレイを用いた脳の空間的及び時系列の発生機構解析

(3、4) 特許出願、新聞報道

なし

(5) その他特記事項

データの公表

本研究成果として得られたデータベースは下記にて公開している。いずれも 2003 年 8 月に更新。

<http://love2.aist-nara.ac.jp/BGED/index.html>

(ATAC-PCR による 3658 遺伝子の発現プロファイル情報;BGED は Nucleic Acids Research 2004 データベース特集号 Molecular Biology Database Collection に掲載予定。)

<http://love2.aist-nara.ac.jp/BED>

(BodyMap 法による発現プロファイル情報と cDNA(16332 種)の部分配列情報)

(オリゴヌクレオチドチップを用いた発現プロファイル情報)

http://www.dna-chip.co.jp/MDR_search/index.html

(cDNA チップによる発現プロファイル情報：クラスター解析の結果も搭載)