

「ゲノムの構造と機能」

平成10年度採択研究代表者

松原 謙一

(国際高等研究所 学術参与)

「器官形成に関するゲノム情報の解読」

1. 研究実施の概要

研究代表者はBodyMapという各組織で発現している遺伝子のデータベースの作成に携わってきた。これは、形成の終わった器官の発現の比較であり、遺伝子発現の静的な状態といえる。次の段階として、これらの器官の形成過程でダイナミックに変化する遺伝子発現の解析を行いたいと考えた。そこで対象をマウス脳とし、BodyMapと同様先ず脳の各部位で発現している遺伝子の詳細なリストを作り、次にマウス小脳皮質を主な対象として、遺伝子発現の動態の解析を行ってきた。このために必要な遺伝子発現プロファイル解析システムの確立を行い、小脳皮質をはじめとしていくつかの実験系について定量PCRを用いて解析を行った。その結果のデータベース化を行った。さらに、小脳発生過程の遺伝子発現プロファイルデータを取得した遺伝子の分化過程での機能を明らかにするため、PC12へ遺伝子導入実験を行い、神経細胞分化過程への影響を調べた。また、これらの研究とは全く別個に、組織で発現している遺伝子を迅速に同定する技術の開発を行った。

2. 研究実施内容

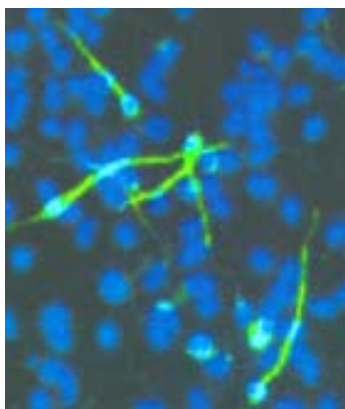
1) 遺伝子発現データベース (Brain Gene Expression Database, BGED) の構築

アダプター付加競合PCR法を用いて測定した遺伝子発現プロファイルデータをデータベースにまとめた。データベースとしてデータを利用する場合の利点を考えて、2つの特別な検索機能を付加した。1つは、Gene ontology termとSwissProt Functional Annotationを使った検索で、同一ないし類似の機能を持った遺伝子の発現パターンを同時に表示することができる。今ひとつは、類似発現パターンを持った遺伝子の検索機能である。両方とも、個々の遺伝子や特定の機能に興味のある一般の研究者の便宜をはかっている。なお、データベースに収録した実験サンプルは、以下の通り。すべてマウス脳。

生後小脳皮質発生過程、生後海馬歯状回発生過程、マウス各脳部位の比較、脳虚血過程(常温及び低体温)、向精神薬投与(クロザピンおよびハロペリドール)、老化による変化

2) 高速の遺伝子機能解析技術の開発と、その小脳発生過程への応用

細胞内へのDNA導入法としてreverse transfection法及びatelocollagenを用いたtransfection法について検討し、実験法を確立した。reverse transfection法は、1枚のスライドガラス上で数千の遺伝子を発現する細胞を観察することができる。また、atelocollagen法はplasmid DNAのみでなくアデノウイルスベクターやsiRNAを安定して細胞内に導入できるバイオマテリアルとして注目されており、遺伝子導入後にそれぞれの細胞の形態変化をArrayScan II (Cellomics社)により自動的に検出・解析するシステムが確立されている。これらの方法により、一回の実験で数百の遺伝子を発現する細胞を観察し、薬剤処理など培養条件を変化させて多数の遺伝子の機能を調べることが可能になった。13年度に、laser capture microdissection をもちいて小脳の各層（外顆粒層外側、外顆粒層内側、内顆粒層外側、内顆粒層内側）を分別採取し、小脳皮質発生過程の遺伝子発現プロファイル解析を行った。このときに測定した遺伝子のうち308個について、atelocollagen法によりPC12に遺伝子導入をおこない、ArrayScan IIにより形質観察を行った。予備的な結果だが、細胞増殖促進及び抑制作用、軸索進展作用を持つ遺伝子の数は、それぞれ8個、4個、9個であった。とくに、Rbは、強力な軸索進展作用を持つことがわかった。下図にArrayScan IIで得られた軸索伸張のイメージをしめす。



3) 新しい発現遺伝子同定方法の開発

EST配列決定やserial analysis of gene expression (SAGE)による発現遺伝子の同定は、組織で発現している遺伝子を迅速に調べるためには、有効な方法である。しかしながら、特にSAGEの場合、制限酵素認識部位のない遺伝子は系統的に見落とすという欠陥がある。この欠点を克服するべく、cDNAをDNase Iで消化した後、20-30塩基の断片を回収、これらの断片をconcatemalizationする技術を開発した。現在、ヒト白血球から約5000個のタグを同定した。これらの配列のデータ解析を現在行っている。

3. 研究実施体制

(1) 統括グループ

- ①松原謙一（国際高等研究所、学術参与）

②全体の統括

(2) 遺伝子発現プロファイル収集グループ

①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 客員教授）

②試料の調製，解析実施，システム向上，データ処理解析，ソフト開発，知識化

(3) 新規遺伝子の機能探索グループ

①北村一泰（大正製薬株式会社創薬企画室 室長）

②本年度は業務なし

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Kita, H., Carmichael, J., Swartz, J., Muro, S., Wyttenbach, A., Matsubara, K., Rubinsztein, DC. and Kato, K. Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Humam Mol ecular Genetics* ,11 (2002) 2279-2287.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）