

[0028]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2013年

<https://doi.org/10.15017/1485125>

---

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 28, 2014. 九州大学生体防御医学研究所  
バージョン :  
権利関係 :

トランスオミクス医学研究センター  
Research Center for Transomics Medicine

## ゲノミクス分野

### Division of Genomics

#### I. 准教授：山本 健 Associate Professor : Ken Yamamoto, M.D., Ph.D.

当教室では、基礎ゲノム科学分野としての日本人のゲノム多様性情報取得、および遺伝子多型とエピゲノムの個体差の連関に関する研究、ならびに応用ゲノム科学分野としての疾患の遺伝学研究を軸として研究活動を行っている。平成 25 年 4 月より大学院生として、システム生命科学府 1 年生賈楊が、生物学科卒研究生として、池田尚、山田浩平が研究室に加わった。平成 26 年 1 月、岩下雄二が国立長寿医療研究センター研究所流動研究員として異動した。同年 3 月、谷口愛樹、岩谷千寿が修士課程を、堤孝信が博士課程を修了した。また、北島秀俊がオックスフォード大学医学部にポスドクとして留学した。テクニカルスタッフとして研究支援を行ってきた秋永朋美、福山可八子が、それぞれエピゲノム分野、レドックスナビ研究拠点に移った。田平知子講師が、レドックスナビ研究拠点に異動した。

#### A. 基礎ゲノム科学分野における研究

##### a. 日本人のゲノム構造多型の解析

ゲノム構造多型は疾患感受性や薬剤応答などの個人差に影響を与える。しかし、複雑な構造多型を通常の 2 倍体細胞由来のゲノム解析によって決定することは困難である。そこで我々は単一精子由来のゲノムをもつ全胎状奇胎検体 (CHM) に着目した。CHM ゲノムは全領域ホモ接合であるため CNV を感度よく検出することができ、またその境界を決定するのが容易である。全胎状奇胎 84 検体についてゲノムワイドマイクロアレイでタイピングを行い、170 万個の SNP 配列および 2339 個のコピー数多型を検出した (D-HaploDB Phase 4 として公開 : <http://orca.gen.kyushu-u.ac.jp/>)。最も頻度の高い CNV として UGT2B17 遺伝子の欠失が検出された。この他にも薬物代謝に関連する遺伝子 (GSTT1, GSTM1, CYP2A6 など) における欠失が検出された (見かけ上、一部は増幅として検出)。これらの頻度が高い既知の欠失に加えて、頻度が低く切断点がこれまで解析されていない欠失も検出された。そのうちの GSTA2-GSTA1 領域の欠失についてシーケンス解析により切断点を決定し、2 つの遺伝子が non-allelic homologous recombination により融合しているアレルが日本人に低頻度に存在することを見出した。

##### b. 遺伝多型とエピゲノム個体差の連関

エピゲノムの個体差が疾患発症の個体差を規定している可能性がある。これまでの一塩基多型を用いた疾患感受性遺伝子の同定に引き続き、エピゲノムの個体差とヒト表現型との相関を明らかにすべく、ヒト集団を用い、まず、一塩基多型の DNA メチル化に与える影響についてチップをベースにしたゲノムワイドな解析を進めている。さらに家系を用い、DNA メチル化の遺伝について、一塩基多型との関連を中心に解析を進めている。また、一般住民集団を対象として、環境因子が DNA メチル化に与える影響をゲノムワイドに解析し、各種環境の標的となる遺伝子を同定した上で、一塩基多型を含めた統合的な解析を行っている。

### c. DNA を用いたナノ構造体の構築

我々は DNA ナノ構造体の自己組織化能を利用し、至適化された配列の選択により階層的でアドレス可能なナノ構造体を構築する新しいデザインシステムの確立を目指している。このために、Generation of sequences optimized for unique self-assembly of DNA-nanostructure (GENESUS)を開発した。このプログラムは望まない塩基対形成が最も起こりにくい単鎖のセットを構造体作製の最適セットとして選択する。一方、実際にナノ構造体を作成する際のウェットな実験法として、PCR・in vitro 転写・逆転写を利用した、単鎖 DNA の安価な大量調製法を確立した。そしてこれらドライ及びウェットの方法を駆使して、一辺 7 nm の正八面体及びその集合体を設計、構築した。次にゲル電気泳動像の定量解析から、設計された構造が安定な生成物として、効率よく構築できていることを確認した。

## B. 応用ゲノム科学分野における研究

### a. 単一遺伝病の原因遺伝子解明に関する研究

単一遺伝病における原因遺伝子変異同定は、ヒト表現型を形成する遺伝子機能の直接的な理解に有意義である。平成 25 年度は、優性遺伝様式をとる甲状腺腫瘍家系、家族性小瞳孔について研究を進め、変異遺伝子を同定し論文発表した。

### b. 多因子疾患の遺伝背景解明に関する研究

多因子疾患の原因遺伝子多型を基盤として、疾患の発症機序を、分子・細胞・個体レベルで解明し、さらに、コホート集団解析を通じて、個々人のゲノム情報に基づいた新しい予防法や診断法・治療法を開発するためには、集団を対象としたゲノム多型解析が必須である。本研究室では、多施設共同研究活動を主体として、多因子疾患発症に関わる遺伝背景の解明を進めている。

平成 25 年度進めたゲノム共同研究の対象疾患は以下の通りである。①自己免疫性甲状腺炎、②心筋梗塞、③糖尿病・肥満・高脂血症・高血圧、④痛風、⑤アルツハイマー。⑥大腸がん、⑦統合失調症、⑧多発性硬化症、⑨肝臓癌。

## 業績目録

### 原著論文

1. T. Tsutsumi, T. Asakawa, A. Kanegami, T. Okada, . Tahira, K. Hayashi. 2014.  
GENESUS: A two-step sequence design program for DNA nanostructure self-assembly.  
BioTechniques in press.
2. P. Chen, F. Takeuchi, J.Y. Lee, H.Li, J.Y. Wu, J. Liang, J. Long, Y. Tabara, M. O. Goodarzi, M.A. Pereira, Y.J. Kim, M.J. Go, D.O. Stram, E. Vithana, C.C. Khor, J. Liu, J. Liao, X. Ye, Y. Wang, L. Lu, T.L. Young, J. Lee, A. C. Thai, C. Y. Cheng, R.M. van Dam, Y. Friedlander, C. K. Heng, W.P. Koh, C.H. Chen, L.C. Chang, W.H. Pan, Q.Qi, M. Isono, W. Zheng, Q. Cai, Y. Gao, K. Yamamoto, K. Ohnaka, R. Takayanagi, Y. Kita, H. Ueshima, C.A. Hsiung, J. Cui, W. H.H. Sheu, J.I. Rotter, Y.D.I. Chen, C. Hsu, Y. Okada, M. Kubo, A. Takahashi, T.Tanaka, F. JA. van Rooij, S.K. Ganesh, J. Huang, T. Huang, CHARGE Hematology Working Group, M.D. Gross, T.L. Assimes, T. Miki, X.O. Shu, L. Qi, Y.T. Chen, X. Lin, T. Aung, T.Y. Wong, Y.Y. Teo, B.J. Kim, N. Kato, E.S. Tai, 2014.  
Multiple non-glycemic genomic loci are newly associated with blood level of glycated hemoglobin in East Asians.  
Diabetes, in press.
3. T. Yamaguchi, H. Nakaoka, K. Yamamoto, T. Fujikawa, K. Yong-II, K. Yano, S. Haga, K. Katayama, T. Shibusawa, B.P. Soo, K. Maki, R. Kimura, I. Inoue. 2014.  
Genome-wide association study of degenerative bony changes of temporomandibular joint in East Asian populations.  
Oral Dis. in press
4. H. Matsuo, A. Nakayama, M. Sakiyama, T. Chiba, S. Shimizu, Y. Kawamura, H. Nakashima, T. Nakamura, Y. Takada, Y. Oikawa, T. Takada, H. Nakaoka, J. Abe, H. Inoue, K. Wakai, S. Kawai, Y. Guang, H. Nakagawa, T. Ito, K. Niwa, K. Yamamoto, Y. Sakurai, H. Suzuki, T. Hosoya, K. Ichida, T. Shimizu, N. Shinomiya. 2014.  
ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload.  
Sci Rep 4:3755.
5. S. Ueda, D. Oryoji, K. Yamamoto, J.N. Yoshimura, K. Okamura, M. Noda, K. Kashiwase, Y. Kosuga, K. Sekiya, K. Inoue, H. Yamada, A. Oyamada, Y. Nishimura, Y. Yoshikai, K. Ito, T. Sasazuki. 2014.  
Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis.

- J Clin Endocrinol Metab. 99: E379-383.
6. Y. Wu, H. Gao, H. Li, Y. Tabara, M. Nakatochi, Y.F. Chiu, E.J. Park, W. Wen, L.S. Adair, J.B. Borja, Q. Cai, Y.C. Chang, D.C. Croteau-Chonka, M.P. Fogarty, W. Gan, C.T. He, C.A. Hsiung, C.M. Hwu, S. Ichihara, M. Igase, J. Jo, N. Kato, R. Kawamoto, C.W. Kuzawa, J.J.M. Lee, J. Liu, L. Lu, T.W. McDade, H. Osawa, W.H.H. Sheu, Y. Teo, S. Vadlamudi, R.M. van Dam, Y. Wang, Y.B. Xiang, K. Yamamoto, X. Ye, T.L. Young, Y. Zheng, J. Zhu, X.O. Shu, C. Shin, S.H. Jee, L.M. Chuang, T. Miki, M. Yokota, X. Lin, K.L. Mohlke, E.S. Tai. 2014.  
A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2.  
Hum Mol Genet 23:1108-1119.
  7. R. Teshiba, T. Tajiri, K. Sumitomo, K. Masumoto, T. Taguchi, K. Yamamoto. 2013.  
Identification of a KEAP1 germline mutation in a family with multinodular goitre.  
PLoS One. 8: e65141.
  8. S. Ichihara, K. Yamamoto, H. Asano, M. Nakatochi, M. Sukegawa, G. Ichihara, H. Izawa, A. Hirashiki, F. Takatsu, H. Umeda, M. Iwase, H. Inagaki, H. Hirayama, T. Sone, K. Nishigaki, S. Minatoguchi, M. Cho, Y. Jang, H. Kim, J.E. Park, S. Tada-Oikawa, H. Kitajima, T. Matsubara, K. Sunagawa, H. Shimokawa, A. Kimura, J.Y. Lee, T. Murohara, I. Inoue, M. Yokota. 2013.  
Identification of a glutamic acid repeat polymorphism of ALMS1 as a novel genetic risk marker for early-onset myocardial infarction by genome-wide linkage analysis.  
Circ Cardiovasc Genet. 6: 569-578.
  9. S. Haga, H. Nakaoka, T. Yamaguchi, K. Yamamoto, Y. Kim, H. Samoto, T. Ohno, K. Katayama, H. Ishida, S.B. Park, R. Kimura, K. Maki, I. Inoue. 2013.  
A genome-wide association study of third molar agenesis in Japanese and Korean populations.  
J Hum Genet. 58: 799-803.
  10. H. Ling, R. Spizzo, Y. Atlasi, M. Nicoloso, M. Shimizu, R.S. Redis, N. Nishida, R. Gafà, J. Song, Z. Guo, C. Ivan, E. Barbarotto, I. De Vries, X. Zhang, M. Ferracin, M. Churchman, J.F. van Galen, B.H. Beverloo, M. Shariati, F. Haderk, M.R. Estecio, G. Garcia-Manero, G.A. Patijn, D.C. Gotley, V. Bhardwaj, I. Shureiqi, S. Sen, A.S. Multani, J. Welsh, K. Yamamoto, I. Taniguchi, M.A. Song, S. Gallinger, G. Casey, Thibodeau SN, Le Marchand L, Tiirikainen M, Mani SA, Zhang W, Davuluri RV, Mimori K, Mori M, Sieuwerts AM, Martens JW, Tomlinson I, Negrini M, Berindan-Neagoe I, Foekens JA, Hamilton SR, Lanza G, Kopetz S, Fodde R, Calin GA. 2013.  
CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer.  
Genome Res. 23: 1446-1461.
  11. H. Kondo, T. Tahira, K. Yamamoto, A. Tawara. 2013 .  
Familial acrorea, microphthalmia and cataract syndrome.  
Br J Ophthalmol. 97: 1155-1160.

12. H. Matsuo, K. Ichida, T. Takada, A. Nakayama, H. Nakashima, T. Nakamura, Y. Kawamura, Y. Takada, K. Yamamoto, H. Inoue, Y. Oikawa, M. Naito, A. Hishida, K. Wakai, C. Okada, S. Shimizu, M. Sakiyama, T. Chiba, H. Ogata, K. Niwa, M. Hosoyamada, A. Mori, N. Hamajima, H. Suzuki, Y. Kanai, Y. Sakurai, T. Hosoya, T. Shimizu, N. Shinomiya. 2013.  
Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout.  
*Sci Rep.* 3:2014.
13. A. Miyashita, A. Koike, G. Jun, L.S. Wang, S. Takahashi, E. Matsubara, T. Kawarabayashi, M. Shoji, N. Tomita, H. Arai, T. Asada, Y. Harigaya, M. Ikeda, M. Amari, H. Hanyu, S. Higuchi, T. Ikeuchi, M. Nishizawa, M. Suga, Y. Kawase, H. Akatsu, K. Kosaka, T. Yamamoto, M. Imagawa, T. Hamaguchi, M. Yamada, T. Moriaha, M. Takeda, T. Takao, K. Nakata, Y. Fujisawa, K. Sasaki, K. Watanabe, K. Nakashima, K. Urakami, T. Ooya, M. Takahashi, T. Yuzuriha, K. Serikawa, S. Yoshimoto, R. Nakagawa, J.W. Kim, C.S. Ki, H.H. Won, D.L. Na, S.W. Seo, I. Mook-Jung; Alzheimer Disease Genetics Consortium, P. St George-Hyslop, R. Mayeux, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, M. Yoshida, N. Nishida, K. Tokunaga, K. Yamamoto, S. Tsuji, I. Kanazawa, Y. Ihara, G.D. Schellenberg, L.A. Farrer, R. Kuwano. 2013.  
SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians.  
*PLoS One.* 8: e58618.
14. J.Y. Lee, Y.A. Shin, K.J. Kim, H. Lyong, J.Y. Lee, Y.K. Kim, Y.J. Kim, C.B. Hong, D.J. Shin, S.H. Lee, K.W. Park, B.S. Lee, D. Yoon, H.J. Ku, I.Y. Oh, S.J. Park, J. Kim, H.K. Kawk, J.E. Lee, H.K. Park, J.E. Lee, H.Y. Nam, H.Y. Park, C. Shin, M. Yokota, H. Asano, M. Nakatochi, T. Matsubara, H. Kitajima, K. Yamamoto, H.L. Kim, B.G. Han, Y. Jang, H.S. Kim, J.E. Park, J.Y. Lee. 2013  
A genome-wide association study of a coronary artery disease risk variant.  
*J Hum Genet.* 58: 120-126.
15. H. Shibata, K. Yamamoto, Z. Sun, A. Oka, H. Inoko, T. Arinami, T. Inada, H. Ujike, M. Itokawa, M. Tochigi, Y. Watanabe, T. Someya, H. Kunugi, T. Suzuki, N. Iwata, N. Ozaki, Y. Fukumaki. 2013.  
Genome-wide association study of schizophrenia using microsatellite markers in the Japanese population.  
*Psychiatr Genet.* 23: 117-123.
16. F. Takeuchi, K. Yamamoto, M. Isono, T. Katsuya, K. Akiyama, K. Ohnaka, H. Rakugi, Y. Yamori, T. Ogihara, R. Takayanagi, N. Kato. 2013.  
Genetic impact on uric Acid concentration and hyperuricemia in the Japanese population.  
*J Atheroscler Thromb.* 20: 351-367.
17. Y. Takatsuno, K. Mimori, K. Yamamoto, T. Sato, A. Niida, H. Inoue, S. Imoto, S. Kawano, R. Yamaguchi, H. Toh, H. Inuma, S. Ishimaru, H. Ishii, S. Suzuki, S. Tokudome, M. Watanabe, J.I. Tanaka, S.E. Kudo, H. Mochizuki, M. Kusunoki, K. Yamada, Y. Shimada, Y. Moriya, S. Miyano, K. Sugihara, M. Mori. 2013.

The rs6983267 SNP Is Associated with MYC Transcription Efficiency, Which Promotes Progression and Worsens Prognosis of Colorectal Cancer.

Ann Surg Oncol. 20: 1395-1402.

18. R.W. Collin, K. Nikopoulos, M. Dona, C. Gilissen, A. Hoischen, F.N. Boonstra, J.A. Poulter, H. Kondo, W. Berger, C. Toomes, T. Tahira, L.R. Mohn, E.A. Blokland, L. Hatterschijt, M. Ali, J.M. Groothuismink, L. Duijkers, C.F. Inglehearn, L. Sollfrank, T.M Strom, E. Uchio, C.E. van Nouhuys, H. Kremer, J.A. Veltman, E. van Wijk, F.P. Cremers. 2013.

ZNF408 is mutated in familial exudative vitreoretinopathy and is crucial for the development of zebrafish retinal vasculature.

Proc Natl Acad Sci U S A. 110: 9856-9861.

## 学会発表

1. 岩谷千寿, 北島秀俊, 山本健 (2013, 5/30-5/31).  
ヒトにおける加齢のエピジェネティックバイオマーカー同定とマウスにおける再現性の検討.  
第7回エピジェネティクス研究年会, 福岡.
2. 田平知子, 久木田洋児, 加藤聖子, 和氣徳夫, 林健志 (2013, 10/05).  
Structural variations of pharmacogenetic genes detected in haploid genomes of Japanese population.  
第72回日本癌学会学術総会, 横浜.
3. Akiko Isomoto, Hidetoshi Kitajima, Sahoko Ichihara, Masahiro Nakatochi, Tatsuaki Matsubara, Mitsuhiro Yokota, Ryoichi Takayanagi, Ken Yamamoto (2013, 10/29- 10/31).  
Population based discovery of tobacco-smoking-related differential DNA methylation  
日本バイオインフォマティクス学会 2013 年年会(第2回生命医薬情報学連合大会), 東京.
4. Akiko Isomoto, Hidetoshi Kitajima, Sahoko Ichihara, Masahiro Nakatochi, Tatsuaki Matsubara, Mitsuhiro Yokota, Ryoichi Takayanagi, Ken Yamamoto (2013, 10/30- 11/2).  
Population Based Discovery of Tobacco-Smoking-Related Differential DNA Methylation  
CSHL Meeting: Genome Informatics 2013, NY, USA.
5. Akiko Isomoto, Ken Yamamoto (2013, 11/5).  
The impact of smoking on DNA methylation in humans.  
Recent Advances in Stem Cell Biology 2013, Fukuoka, Japan.
6. 北島秀俊, 大中佳三, 高柳涼一, 山本健 (2013, 11/20- 11/23).  
Epigenome-wide association scan を用いた、葉酸摂取量が DNA メチル化レベルに与える影響の検討.  
日本人類遺伝学会第58回大会, 仙台.
7. 岩谷千寿, 北島秀俊, 山本健 (2013, 11/21-11/23).  
加齢のエピジェネティックバイオマーカーELOVL2 の解析.



- 第 58 回日本人類遺伝学会年会, 宮城.
8. 岩谷千寿, 北島秀俊, 山本健 (2013,12/3-12/6).  
マウスにおける加齢に伴う組織特異的な DNA メチル化変化の研究.  
第 36 回日本分子生物学会年会, 兵庫.
  9. 堤孝信, 浅川剛, 兼上明美, 岡田孝夫, 田平知子, 林健志 (2013, 12/05).  
自己組織化 DNA ナノ構造体のための配列設計プログラム「GENESUS」: 正八面体とその多量体の設計と構築.  
第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸.
  10. 田平知子, 久木田洋児, 矢原耕史, 山本健, 加藤聖子, 和氣徳夫, 林健志 (2013, 12/05).  
日本人ハプロイド試料のゲノムワイド解析により同定された構造多型の機能予測.  
第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸.
  11. 磯本明子, 北島秀俊, 市原佐保子, 中朽昌弘, 松原達昭, 横田充弘, 高柳涼一, 山本健 (2013, 12/3- 12/6).  
Tobacco-Smoking-Related Differential DNA Methylation: 450K Discovery and Replication in the Japanese Population.  
第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸.
  12. 藤岡竜太, 山田浩平, 山本健 (2013, 12/3-12/6).  
転写因子 TEAD1 はエピジェネティック変化の標的遺伝子である.  
日本分子生物学会第 36 回年会, 神戸.
  13. 岩谷千寿, 池田裕宜, 佐藤ひかり, 杉本志穂, 古川雄亮, 胡旻 (2014, 3/6).  
Review of healthcare module field study- How can we improve the quality of Healthcare systems?  
The first international symposium on Decision Science Program, 福岡.
  14. 岩谷千寿, 池田裕宜, 佐藤ひかり, 杉本志穂, 古川雄亮, 胡旻 (2014,3/26).  
International Decision Science report: Social Business for healthcare in Bangladesh.  
The symposium on Yunus and Shiiki Social Business Research Centre, 福岡.

## II. 准教授：柴田 弘紀 Associate Professor : Hiroki Shibata, Ph.D.

当研究室では、遺伝子異常による疾病や適応進化と深い関わりを持つ遺伝的多様性の解析を行うことにより、遺伝情報制御機構や分子進化の観点から生命現象を理解することを目指している。近年は非モデル生物のゲノム解析や、古人骨 DNA のゲノム解析にも着手している。平成 26 年 3 月に大学院生（システム生命科学府）の熊銘侑が、修士号取得後、退学した。

### A. 神経疾患の分子基盤の解明

#### a. 本態性高 CK 血症の解析

久留米大学で見出された本態性高 CK（クレアチンキナーゼ）血症一家系に対して、次世代シーケンサを用いたエクソームリシーケンシングと連鎖解析を併用することにより、責任変異の同定を試みた。常染色体優性の本態性高 CK 血症家系の発症者 5 名を含む 4 世代家系の計 9 名を用いて Human OmniExpress BeadChip による連鎖解析を行った。その結果、1, 7, 10, 19 番染色体に LOD 値 1.4 から 1.5 の連鎖領域を見出した。次に発症者 1 名と家系内非発症者 1 名を SureSelect Ver4 でエクソンをキャプチャした後、GA IIx によるシーケンシングを行った。その結果、発症者でのみ見られた新規の SNV (Single Nucleotide Variant) を 65,180 個見出した。この中から連鎖解析のデータおよび高 CK 血症を来す可能性のある 40 個の候補遺伝子領域で絞り込んだところ、発症者の *RYR1* (Ryanodine receptor 1 遺伝子) において、新規の非同義 SNV を見出した。Polyphen-2 により、本アミノ酸置換の RYR 遺伝子産物への機能的影響を予測したところ possibly damaging と予測された。また、個別のキャピラリーシーケンスにより、家系内において、本変異が疾患と共分離することを確認した。さらに、筋生検サンプルを用いた細胞免疫染色とウェスタンブロッティングで遺伝子産物 RYR1 の著名な発現低下が見られた。RYR1 は 4 量体で機能するため、本変異により優性阻害が起きたと考えると、本疾患が優性遺伝形式であることと矛盾しない。以上から、上記非同義 SNV が本疾患の責任変異であると結論した(論文準備中)。

#### b. 先天性大脳白質形成不全症の解析

先天性大脳白質形成不全症とは中枢神経系のミエリン形成不全を主徴とする稀な小児神経疾患の一群である。その代表的原因遺伝子が *PLP1* であり、我々はこれまで 100 例

以上の *PLP1* 遺伝子解析を行い、完全重複 26 例、点変異 24 例、完全欠失 1 例を見出している。PLP1 は中枢神経系でミエリン形成を担うオリゴデンドロサイト特異的に発現している 4 回膜貫通型蛋白質であり、その変異の種類により先天型の PMD から家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) まで幅広いスペクトラムを示す。一方、PMD が疑われたものの *PLP1* に変異が認められない症例も数多く、遺伝的異質性が高いことが明らかになった。近年次世代シーケンサーなどにより先天性大脳白質形成不全症の新たな原因遺伝子が発見されているが、全容解明には至っていない。今年度は、発達の遅れとミエリン形成遅延が認められた 3 家系の男児で *SLC16A2* のミスセンス変異、一塩基欠失、および 4.5 kb の欠失をそれぞれ同定した。*SLC16A2* は Xq13.2 に位置し、モノカルボン酸トランスポーター 8 (MCT8) をコードしている。MCT8 は中枢神経系に限らず、肝臓・腎臓などでも発現しており、活性型甲状腺ホルモン (T3) の輸送に関わっているものと考えられている。新生児マススクリーニングで早期発見可能になったクレチン症では甲状腺ホルモン製剤 (T4) の投与で中枢神経の発達改善が見られる。しかしながら、神経細胞の甲状腺ホルモントランスポーターが欠損している本疾患ではその効果は期待できず、新たな治療戦略が必要と考えられた (論文準備中)。また、厚生労働省難治性疾患克服研究事業による研究班に参画し大脳白質生成不全症の全国疫学調査を実施しその結果をまとめた。本邦における本疾患の推定患者数は現在およそ 220 人であり、有病率は 10 万人当たり 0.8 人であることが明らかになった (Numata, et al., in press)。

## B. 毒生物のオミクス解析

生物毒は、生理活性物質の新たな創薬シーズとして、近年大変注目を浴びている。特に日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は、毒成分タンパク質が加速進化していることがわかっており、進化学的にも大変興味深い。ハブにおける加速進化機構の解明と創薬シーズ開拓を目指して、次世代シーケンサーを用いたハブのオミクス解析及び遺伝的多様性の解析を行っている。

### a. ハブの全ゲノム配列決定

#### (1) 全ゲノムショットガン (WGS) シーケンス

奄美大島産のメスの血液から抽出したゲノム DNA を用いてロシュ 454 用 WGS ライブラリを作製し、26 回のランで合計 12.7 Gb のデータを取得した (平均の読み取り長 369 塩基)。また同じメス個体由来のゲノム DNA を用いてイルミナ GA/MiSeq 用 WGS ライブラリを作製し、MiSeq による 250 塩基両側読みを 2 ラン行い、合計で約 2600 万リード、13

Gb のデータを取得した。400-500 塩基の断片長のライブラリを両端から 250 塩基読んだのでペアエンドリードの多くは中央部分で重なりと期待される。コンピュータ上で繋ぎ合わせを行った結果、平均長 316 塩基の約 1800 万本、合計 5.7 Gb に変換できた。これらのショットガンデータを新規アセンブルして、約 47 万コンティグにアセンブルできた。N50 長は 7.2 kb、合計の読み取り深度は 10.2 倍。

## (2) メイトペアによるスキップフォールディング

同じメス由来のゲノム DNA を用いて 4 段階の異なった長さ (2 kb、4 kb、8 kb、12 kb) のメイトペアライブラリを作製し、イルミナ GA で 75 塩基両側読みを行った。さらに 500 塩基のインサート長の WGS ライブラリの通常のペアエンドデータも追加した。合計で 7 億本ほどのメイトペア/ペアエンドデータを用いて、上のコンティグに対してスキップフォールディングを行った結果、スキップフォールド数 13.4 万、平均長 10.7 kb、N50 長 271 kb を達成した。

### b. ハブのトランスクリプトーム解析

adult と infant のハブの毒腺から RNA を単離し、ロシユ 454 シークエンサを用いて、RNA-Seq を行った。その結果、両者に共通して発現しているトランスクリプトがほとんどであったが、infant ハブ毒腺のみに発現しているトランスクリプトを見出した。配列を確認したところ、これまで adult ハブ毒腺での解析では発現が確認されなかったため偽遺伝子とみなされてきた遺伝子 A の産物であることがわかった。さらに adult と infant ハブ毒タンパク質の 2 次元電気泳動比較で、infant ハブ毒のみに発現するスポットを見出し、切り出して質量分析 (MS/MS) したところ、遺伝子 A に由来する遺伝子産物であることを確認した。

### c. ハブの遺伝的多様性の解析

南西諸島に分布するハブ属は、主に琉球諸島と奄美諸島に分布するハブ (*Protothrops flavoviridis*)、トカラ列島に生息するトカラハブ (*P. tokarensis*)、及び八重山諸島に分布するサキシマハブ (*P. elegans*) の 3 種からなるとされている。ハブ属の島集団間の遺伝的分化の度合いを、検討するために、奄美大島、徳之島、沖縄島、伊平屋島、久米島から採取したハブ、及びトカラ列島の小宝島から採取したトカラハブについて、ミトコンドリアの 12SrRNA 及び 16SrRNA 領域、約 2.6 kb の塩基配列を決定した。最尤系統樹を作製したところ、ハブの島集団は、北部個体群 (奄美大島、徳之島) からなる奄美クラスターと、南部個体群 (沖縄島、伊平屋島、久米島) からなる琉球ク

ラスターの2群に遺伝的に分化していることが分かった。また、トカラハブは奄美クラスターに完全に含まれた。以上のことから、現在ハブとされる種の島集団間の遺伝的多様性は大きく、現在別種とされるトカラハブはその多様性の中に完全に収まるため、トカラハブのみを独立種とすることの妥当性は低いと考えられた。

## 業績目録

### 原著論文

1. Y. Numata, L. Gotoh, A. Iwaki, K. Kurosawa, J. Takanashi, K. Deguchi, T. Yamamoto, H. Osaka, K. Inoue. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol*. In press.
2. H. Shibata, K. Yamamoto, Z. Sun, A. Oka, H. Inoko, T. Arinami, T. Inada, H. Ujike, M. Itokawa, M. Tochigi, Y. Watanabe, T. Someya, H. Kunugi, T. Suzuki, N. Iwata, N. Ozaki, Y. Fukumaki. 2013. Genome-wide association study of schizophrenia using microsatellite markers in the Japanese population. *Psychiatr Genet*. 23, 117-123.
3. S. Kusuda, Y. Yasukawa, H. Shibata, O. Doi, Y. Ohya, N. Yoshizaki. 2013. Diversity in the matrix structure of eggshells in the Testudines (Reptilia). *Zoolog Sci*. 30, 366-74.
4. M. Hamamura, J. Okouchi, H. Ozawa, Y. Kimuro, A. Iwaki, Y. Fukumaki. 2013. Amphiphysin I but not dynamin I nor synaptojanin mRNA expression increased after repeated methamphetamine administration in the rat cerebrum and cerebellum. *J Neural Transm*. 120, 1039-52.

### 総説

1. 井上 健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁. 2013. 先天性大脳白質形成不全症: ゲノム解析から診断, 治療への取り組み. *脳と発達* 45, 122-126.
2. 服巻 保幸. 2013. ゲノム多様性と精神疾患. *細胞* 45, 124-127.
3. 服巻 保幸. 2013. 統合失調症のゲノム解析. *福岡医学雑誌* 104, 275-281.

## 著書

- 1 柴田 弘紀. 2013.  
第七章: ヒトらしさの起源.  
ヒトは病気とともに進化した (長谷川真理子、太田博樹編), 185-200. 勁草書房.

## 学会発表

1. 柴田弘紀, 山本真由美, タケット奈々, 小川智久, 森一樹, 千々岩崇仁, 服部正策, 上田直子, 久原哲, 大野素徳, 服巻保幸 (2013, 8/28-31).  
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析  
第 15 回日本進化学会大会, つくば
2. H. Shibata, M. Yamamoto, N. Tuckett, T. Ogawa, K. Mori, T. Chijiwa, S. Hattori, N. Oda-Ueda, S. Kuhara, M. Ohno, Y. Fukumaki. (2013, 09/10).  
Whole genome sequencing of Asian pit viper, Habu, *Protobothrops flavoviridis* and its repetitive landscape.  
The Fukuoka International Symposium on Genomics & Epigenomics 2013 –Expanding Frontiers of Genomic Science–, Fukuoka, Japan
3. 柴田弘紀, 山本真由美, タケット奈々, 小川智久, 森一樹, 千々岩崇仁, 服部正策, 上田直子, 久原哲, 大野素徳, 服巻保幸 (2013, 9/19-21).  
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析  
第 85 回日本遺伝学会大会, 横浜.
4. 柴田弘紀, 山本真由美, タケット奈々, 小川智久, 森一樹, 千々岩崇仁, 服部正策, 上田直子, 久原哲, 大野素徳, 服巻保幸 (2013, 11/02-03).  
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析  
日本爬虫両棲類学会 第 52 回大会, 札幌.
5. N. Oda-Ueda N, H. Nakamura, H. Shibata, K. Mori, K Tashiro, S. Kuhara, T. Chijiwa, Y. Fukumaki, M. Ohno M (2013, 11/03-07).  
The transcript catalogue for the venom gland of *Protobothrops flavoviridis* snake in Amami-Oshima, Japan.

XI Congress of the Pan-American section of the International Society on Toxinology, São Paulo, Brazil.

6. 山口和晃, 千々岩崇仁, 柴田弘紀, 上田直子, 服部正策, 大野素徳 (2013, 12/03-06).  
クサリヘビ科グループ IIE ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の発見と, ホンハブのグループ IIA 毒性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> との進化的関与  
第 36 回日本分子生物学会年会、神戸.
7. 久保直樹, 藤英博, 白根健次郎, 白川峰征, 神里亮人, 曾根秀利, 佐藤康人, 鶴崎美徳, 富澤信一, 柴田弘紀, 才津浩智, 松本直通, 大保和之, 佐々木裕之 (2013, 12/03-06).  
マウス新生仔期の精原幹細胞の分化におけるメチローム変動  
第 36 回日本分子生物学会年会、神戸.
8. 柴田弘紀, 山本真由美, タケット奈々, 小川智久, 森一樹, 千々岩崇仁, 服部正策, 上田直子, 久原哲, 大野素徳, 服巻保幸 (2013, 12/03-06).  
日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析  
第 36 回日本分子生物学会年会、神戸.

## エピゲノミクス分野

### Division of Epigenomics

教授：佐々木 裕之

Professor : Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

当分野はトランスオミクス医学研究センターの設置に伴い、平成 25 年 4 月に開設された。担当教員としてエピゲノム制御学分野の主幹教授・佐々木裕之および助教・一柳健司が兼任で着任し、研究・教育に臨んだ。

エピゲノミクス分野では疾患における細胞の質的变化をエピゲノムの観点から理解することを目指し、高速シーケンサーを用いたエピゲノム解析を行っている。平成 25 年には高速シーケンサーが 1 台追加されて解析能力が一層充実したほか、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) の一員としてエピゲノム解読を進め、進化医学の観点からも研究を展開した。また、学内外の研究室との共同研究を積極的に行い、エピゲノム解析を支援した。最終的に、他のオミクス情報と合わせた横断的・統合的な研究を展開し、様々な病気を克服することを目指している。

具体的な研究成果は、エピゲノム制御学分野の A～E, G, H, K を参照。

### 業績目録

#### 原著論文

1. Fukuda, K., Ichiyangi, K., Yamada, Y., Go, Y., Udono, T., Wada, S., Maeda, T., Soejima, H., Saitou, N., Ito, T. & Sasaki, H. 2013  
Regional DNA methylation differences between humans and chimpanzees are associated with genetic changes, transcriptional divergence and disease genes.  
**J. Hum. Genet.** 58, 446-454
2. Nitta, H., Unoki, M., Ichiyangi, K., Kosho, T., Shigemura, T., Takahashi, H., Velasco, G., Francastel, C., Picard, C., Kubota, T. & Sasaki, H. 2013  
Three novel ZBTB24 mutations identified in Japanese and Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients.  
**J. Hum. Genet.** 58, 455-460
3. Umemori, J., Mori, A., Ichiyangi, K., Uno, T. & Koide, T. 2013  
Identification of both copy number variation-type and constant-type core elements in a large segmental duplication region of the mouse genome.  
**BMC Genomics** 14, 455



4. Li, Y., Miyanari, Y., Shirane, K., Nitta, H., Kubota, T., Ohashi, H., Okamoto, A. & Sasaki, H. 2013  
Sequence-specific microscopic visualization of DNA methylation status at satellite repeats in individual cell nuclei and chromosomes.  
**Nucl. Acids Res.** 41, e186
5. Okae, H., Matoba, S. Nagashima, T., Mizutani, E., Inoue, K., Ogonuki, N., Chiba, H., Funayama, R., Tanaka, S., Yaegashi, N., Nakayama, K., Sasaki, H., Ogura, A. & Arima, T. 2014  
RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice.  
**Hum. Mol. Genet.** 23, 992-1001

## 総説

1. Ichiyanagi, K. 2013  
Transposable elements in eukaryotic genomes: epigenetic regulation by the host and functionalization for the host.  
**Genes Genet. Syst.** 88, 1
2. Ichiyanagi, K. 2013  
Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs.  
**Genes Genet. Syst.** 88, 19-29
3. 鵜木元香, 新田洋久, 佐々木裕之. 2013  
DNA メチル化酵素異常症  
遺伝子医学 **MOOK 25** エピジェネティクスと病気 (佐々木裕之監修, 中尾光善・中島欽一編集), 210-216
4. 佐々木裕之(監修). 2013  
エピジェネティクスと病気  
遺伝子医学 **MOOK 25** エピジェネティクスと病気
5. 白根健次郎, 佐々木裕之. 2013  
第2章: 哺乳類の生殖細胞と初期胚におけるエピゲノム制御  
実験医学 31(増刊)ゲノム 医学・生命科学研究 総集編 (榊佳之・菅野純夫・辻省次・服部正平編集), 100-104

## 著書

1. 鵜木元香, 佐々木裕之. 2013

第2部-4: 生殖・発生 エピジェネティクスキーワード事典 (牛島俊和, 真貝洋一編),  
123-129 羊土社

2. 佐々木裕之. 2013

2章:エピジェネティクス-DNAメチル化酵素の重要性 英語論文セミナー: 21世紀の分子生物学 (渡辺公綱, 桂勲編), 22-36 講談社

## 学会発表 (口演のみ)

1. 佐々木裕之 (2013.4.19)

エピジェネティクスの過去・現在・未来

エピゲノム/エピジェネティクス JST・NEDO 公開シンポジウム～生命の適応戦略としての  
エピジェネティクスとその破綻による疾患, 東京

2. 佐々木裕之 (2013.5.25)

卵子のエピゲノムと遺伝子発現制御ネットワーク

第54回日本卵子学会, 東京

3. Sasaki, H. (2013.07.14-19)

Epigenetic events in mammalian germ-cell development

Gordon Research Conference on Germinal Stem Cell Biology, Hong Kong

4. 佐々木裕之 (2013.8.11)

エピジェネティクスと生命の多様性と恒常性維持

第2回エビデンスに基づく統合医療研究会 (eBIM 研究会), 大阪

5. 一柳健司 (2013.08.17)

霊長類進化におけるゲノムとエピゲノムの相互作用

国立遺伝学研究所研究集会「新機能獲得の分子進化」, 静岡

6. 佐々木裕之 (2013.8.29)

哺乳類生殖細胞のエピゲノム制御と小分子 RNA

第25回高遠・分子細胞生物学シンポジウム in 比叡山—生物学の新天地—, 京都

7. 佐々木裕之 (2013.9.21)

メチローム解析から見た哺乳類の非 CG メチル化

日本遺伝学会第85回大会, 神奈川

8. 福田溪, 一柳健司, 井口志洋, 佐々木裕之 (2013.9.21)

トランスポゾンによる霊長類エピゲノムの進化

日本遺伝学会第85回大会ワークショップ「転移因子と宿主の相互作用」, 神奈川

9. 一柳健司, 一柳朋子, 平福啓一伍, 井上晃太, 福田溪, 佐々木裕之 (2013.9.21)

マウス B2 SINE の DNA メチル化制御機構とクロマチンバウンダリー機能

- 日本遺伝学会第 85 回大会, 神奈川
10. 井上晃太, 福田溪, 一柳健司, 佐々木裕之 (2013.9.21)  
マウス雄性生殖細胞でのレトロトランスポゾン制御における DNA メチル化と piRNA の役割  
日本遺伝学会第 85 回大会, 神奈川
  11. 佐々木裕之 (2013.10.5)  
エピジェネティクスと生体恒常性維持  
日本体質医学会, 久留米
  12. 一柳健司 (2013.10.10-11)  
マウス SINE 配列による近傍遺伝子制御  
国立遺伝学研究所研究集会「転写因子と宿主の相互作用による生命機能」, 静岡
  13. Sasaki, H. (2013.11.6-8)  
Genomic imprinting and the epigenome of mammalian germ cells  
8th Annual Conference of Asia Epigenome Alliance, 2nd Taipei Epigenetics and Chromatin Meeting, Taipei, Taiwan
  14. Sasaki, H. (2013.11.10-12)  
DNA methylation profiles in mammalian germ cell development  
Annual Meeting & Science Days IHEC 2013, Berlin, Germany
  15. 佐々木裕之 (2013.11.14-15)  
マウス新生仔精原細胞における奇妙な DNA メチル化のふるまいの解明  
新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第 1 回公開シンポジウム, 大阪
  16. 佐々木裕之 (2013.11.21-22)  
エピゲノムとヒトの発生・生殖  
日本人類遺伝学会第 58 回大会, 仙台
  17. 佐々木裕之 (2013.12.7)  
ゲノムインプリンティングの基礎と生殖医療  
第 18 回日本生殖内分泌学会, 東京

## プロテオミクス分野

### Division of Proteomics

教授：中山 敬一

Professor : Keiichi Nakayama, M.D., Ph.D.

プロテオミクス分野では、タンパク質の総体であるプロテオームを解析するための技術開発とその応用を目指すと共に、多くの研究者に対して最先端技術の提供を行っている。基本技術としては精密質量分析によるショットガン・プロテオミクス、ターゲット・プロテオミクス、ペプチドマスマフィンガープリンティング等を用い、さらに ICAT, iTRAQ, SILAC, mTRAQ 等の安定同位体標識を用いた定量情報付加による高度のプロテオミクス技術を擁している。さらに従来個別解析であった MRM 技術を改変して大規模データ取得を目指す次世代プロテオミクス技術の開発を行っている。現在、15 台の質量分析計を有し、幅広いプロテオミクス技術への要請に対応が可能となっている。

プロテオミクス分野は、中山敬一が兼任として教授を務めている。さらに分野専任として松本雅記准教授とテクニカルスタッフ 1 名（崎山明恵）に加え、技術室所属の技官 1 名（木庭絵美子）とテクニカルスタッフ 1 名（小田瑞穂）、および研究所所属のテクニカルスタッフ 1 名（高見知代）で実際の研究開発及びサービス業務を進めている（2014 年 3 月 31 日現在）。

#### A. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用

近年、ゲノム情報の解明を背景に、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結びつくタンパク質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白であり、ゲノム情報の整備と質量分析計の高感度化を追い風に、プロテオーム解析への期待が過熱している。プロテオーム解析によってタンパク質の時空間的発現情報のみならず、タンパク質の相互作用や翻訳後修飾情報などの多次元情報を取得することが可能である。ところがこの中でもっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、他に比べて極端に発展途上であり、これを可能にする画期的な技術の開発が渴望されている。

LC-MS/MS 解析によるショットガン定量プロテオミクスは基本的にデータ依存的な自動 MS/MS 解析によっているため、何か意味のあるものが偶然“見つかる”ことを期待しつつ兎に角たくさんのタンパク質を同定し比較する方法である。確かにこの方法である程度の網羅性を得ることが可能であるが、ショットガン法の技術的な問題点は、網羅性を上げるためには試料の分画を必要とするため、網羅性とスループットが完全にトレードオフの関係にあることである。また、偶然に任せている以上、検出されなかったものが、本当は発現しているのにたまたま同定できなかったのか、検出感度以下しか発現していないのかわからないという問題点を内包する。つまりショットガン解析では定量情報はあくまで同定結果に付随して得られるものであり、同定できなければ変動していたのかを知ることはできない。

そこでわれわれは、従来のディスカバリーアプローチから、ターゲットアプローチとして最近注目を集めている MRM (Multiple reaction monitoring) [あるいは SRM (Selected reaction monitoring) とも呼ばれる] への転換を考えた。MRM は三連四重極型質量分析計の定量用測定モードであり、少数の検体のバリデーションには適するが、多くのタンパク質を網羅的に同定・定量することは本質的に難しいとされてきた。われわれの研究はこの障壁を乗り越えて、抜本的に MRM を改良し、将来的に大深度プロテオミクス (ディープ・プロテオミクス) を達成することによって、新たなバイオマーカー探索の時代を築くことを目的とする。

バイオマーカーの探索の成功のためには、多数の検体に対して迅速かつ網羅的にタンパク質の定量・同定を行う必要がある。従来型の探索ベースの質量分析を基盤としたプロテオミクスアプローチは現実的には網羅性が低く、定量性に関しても精度が低いという問題を内包していた。われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を発展させることで網羅的かつ高精度でタンパク質絶対定量を行うための基盤技術の開発を行ってきた。本年度はこれまで構築してきたプロテオームワイドな MRM 解析プラットフォームを利用して多検体の精密な絶対量計測が可能であることを実証するとともに、よりスループットが高い解析法として SWATH 法による絶対定量法の構築を試みた。MRM および SWATH 法は互いに相補的であり、これらを組み合わせることで極めてパワフルなタンパク質発現絶対定量計測が実現できると考えられる。これはバイオマーカー探索のための新たな技術基盤と成り得ることが期待される。

昨年度までに作成した PTP データベースに格納されているデータを元にさらに最適化された MRM method ライブラリーを構築し、より高感度に MRM 測定を実施できる体制を整えた。得られた実証済み MRM method を用いて、多数のヒト培養細胞において代謝酵素を中心とした精密なタンパク質絶対定量を実施した。その結果、中心炭素代謝をはじめとする代謝酵素の発現量は概ね細胞種間で保存されているものの、一部の酵素が特定細胞にのみ発現していることで代謝経路の特性を大きく左右している可能性が示された。また、一部の細胞株に対して実施したより網羅性と感度の高い分析によって代謝酵素の発現量は5桁以上の極めて広範なダイナミックレンジを有することが判明した。

また、MRM 法の欠点を補う手法として SWATH 法の導入を検討した。SWATH 法においては SWATH 法で得た極めて複雑な MS/MS スペクトルをペプチドにアサインするために、同一クロマトグラフィー条件で取得した IDA モードによる MS/MS ライブラリーが必要であり、これが本方法を実際に使用する上で大きな障壁となっている。また、現在の SWATH の仕様では絶対量計測のための内部標準の添加が困難である (詳細は述べないが装置への導入イオン量の制限のため)。そこで、われわれは組み替えタンパク質リソースを用いて IDA およびリファレンス SWATH データを取得することを試みた。その結果、組換えタンパク質を利用して取得した IDA データや SWATH データを有効に利用することで、SWATH を用いた大規模なタンパク質絶対定量が可能であることが示された。また、リン酸化の解析においても SWATH 法は有効であり、細胞刺激後の詳細なリン酸化の経時変化の定量的追跡が可能であることが判明した。

これまでに PTP 情報の取得、より高感度な解析のための前処理技術の開発、情報処理インフラの構築などを行い大規模な MRM 解析のためプラットフォームが完成した。本年度は主要なタンパク質に関しては全て測定可能であることが実証済みである MRM method のライブラリーを構築し、

これを用いて多検体における絶対定量を実施することが可能となり、代謝経路のパスウェイ構造比較などを実施することができた。また、MRM法の原理的欠点を相補する手法としてSWATH法を導入したが、SWATH法の原法が抱える、事前情報不足によるピークアサインの問題や絶対定量の問題を、組換えタンパク質を利用することで解決することができた。今後は、SWATH法を用いてより正確な絶対定量のため、組み換えタンパク質を用いて得たSWATHデータを合成ペプチドによる複数の内部標準添加によってノーマライズし、これをライブラリーとして保持することで、同様にノーマライズした実サンプルSWATHデータとのシグナル強度の比からタンパク質絶対量を見積もることを試みる。これまでに、予備的なデータ取得は完了しており、一部のタンパク質に関しては本方法による絶対定量が可能であることが判明しており、大規模なタンパク質絶対定量の実現が期待できる。

## B. DiPIUS法による新たなユビキチン化酵素の基質同定

SCF型ユビキチンリガーゼにおいてはF-boxタンパク質が基質特異性を担っており、分解される基質分子に特異的に結合する。現在、約70種類のF-boxタンパク質が知られているが、その大部分は対応する基質分子が同定されていない。昨年度われわれはF-boxタンパク質の基質分子を、酵素—基質の結合を指標としてプロテオミクス技術を用いて網羅的に同定する方法、DiPIUS法(Differential Proteomics-based Identification of Ubiquitylation Substrates)を開発した。結合を指標としたスクリーニングでは、F-boxタンパク質と基質が結合すると基質は速やかに分解されてしまうという問題があったが、われわれはF-boxドメインへ変異を導入することにより、基質とは結合するが基質は分解されない状況を作り上げた。野生型とF-box変異型の免疫沈降産物を定量的プロテオーム解析法であるSILAC(Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture)法を用いて比較することにより、容易に基質候補分子の同定が可能となった。

本年度はDiPIUSを用いて、実際にSCF複合体の基質を同定し、その検証作業をすることを試みた。対象として用いたのは、F-boxタンパク質であるFbxw7を含むSCF複合体(SCF<sup>Fbxw7</sup>)である。われわれはDiPIUS法を用いてFbxw7の基質候補として二つの関連する転写因子OASISとBBF2H7を発見した。OASISとBBF2H7は共にERに局在するタンパク質であるが、ERストレスによって切断され、そのN末端が核に移行して、それぞれ骨分化と軟骨分化に関与するタイプの転写因子である。どちらもFbxw7に認識される配列であるCPD(Cdc4 phospho degron)配列を有する。共免疫沈降実験により、OASISとBBF2H7はFbxw7と細胞内で結合することが示された。Fbxw7を過剰発現するとOASISとBBF2H7のタンパク質発現量は減少し、逆にRNA干渉法によってFbxw7をノックダウンしてやると、これらのタンパク質の発現量は上昇する。OASISとBBF2H7のCPD配列に変異を導入するとFbxw7との結合は見られなくなり、タンパク質は安定化することがわかった。われわれはin vitroユビキチン化アッセイを用いて、実際にOASISやBBF2H7がSCF<sup>Fbxw7</sup>によってユビキチン化されることを証明した。このFbxw7-OASIS/BBF2H7の関係を生理的に証明するため、細胞株でFbxw7のノックダウンを行い、骨分化および軟骨分化に対する影響を検討した。C2C12細胞においてFbxw7をノックダウンするとOASISが上昇し、それに伴って骨分化マーカーであるCol1A1の発現が上昇し、逆にFbxw7を過剰発現するとCol1A1の発現は減少することがわかった。同様にFbxw7の条件的ノックアウト細胞を用いて軟骨分化を観察すると、BBF2H7の蓄積と共に軟骨基質が増加していることが明らかとなった。逆にFbxw7を過剰発現すると、軟骨基質

の蓄積は減少する。Fbxw7 は今までに C/EBP  $\alpha$ , KLF5, SREBP 等の転写因子群を分解誘導することによって脂肪細胞への分化を抑制していることが知られているが、今回の研究から骨分化および軟骨分化のマスター転写因子である OASIS および BBF2H7 も制御していることから、間葉系幹細胞からの分化全体に Fbxw7 依存的な制御が寄与している可能性が示唆された。

## 業績目録

### 原著論文

1. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Onoyama, I., Imaizumi, K., Nakayama, K. I. 2013.  
F-box and WD repeat domain-containing-7 (Fbxw7) protein targets endoplasmic reticulum-anchored osteogenic and chondrogenic transcriptional factors for degradation.  
J. Biol. Chem., 288, 28488-28502.
2. Yumimoto, K., Muneoka, T., Tsuboi, T., Nakayama, K. I. 2013.  
Substrate binding promotes formation of the Skp1-Cul1-Fbx13 (SCF<sup>Fbx13</sup>) protein complex.  
J. Biol. Chem., 288, 32766-32776.
3. Zhao, H., Bauzon, F., Fu, H., Lu, Z., Cui, J., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Locker, J., Zhu, L. 2013.  
Skp2 deletion unmasks a p27 safeguard that blocks tumorigenesis in the absence of pRb and p53 tumor suppressors.  
Cancer Cell, 24, 645-659.
4. Kotoshiba, S., Gopinathan, L., Pfeifferberger, E., Rahim, A., Vardy, L. A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Kaldis, P. 2014.  
p27 is regulated independently of Skp2 in the absence of Cdk2.  
Biochim. Biophys. Acta, 1843, 436-445.
5. Lu, Z., Bauzon, F., Fu, H., Cui, J., Zhao, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Zhu, L. 2014.  
Skp2 suppresses apoptosis in Rb1-deficient tumours by limiting E2F1 activity.  
Nat. Commun., 5, 3463.

### 総説

1. 松本雅記, 中山敬一. 2013.  
タンパク質ネットワーク構造解析とその医学応用.  
実験医学 (増刊) 「ゲノム医学・生命科学研究総集編: ポストゲノムの 10 年は何をもちたか」, 2398-2404.
2. 松本雅記, 中山敬一. 2013.  
発現変動タンパク質を見つける: 新規プロテオミクスによる絶対定量を例に.  
実験医学別冊「見つける、量る、可視化する! 質量分析実験ガイド」(杉浦悠毅・末松誠 編, 羊土社, 東京) 81-90.

## 学会発表

1. 中山敬一. (2013, 4/17).  
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：90 年来のがんの秘密に迫る. (招聘講演)  
第 5 回お茶の水 Hematology セミナー, 東京.
2. 中山敬一. (2013, 6/13).  
次世代プロテオミクスによる癌代謝と細胞周期の統合的理解：90 年来の謎に挑む. (シンポジウム)  
第 17 回日本がん分子標的治療学会, 京都.
3. 中山敬一. (2013, 6/14).  
次世代プロテオミクスが解き明かすがんの秘密. (特別講演)  
第 40 回佐島シンポジウム, 仙台.
4. 中山敬一. (2013, 7/8).  
次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新天地：90 年来のがんの秘密に挑む. (特別講演)  
第 40 回 BMS コンファレンス, 宮崎.
5. 中山敬一. (2013, 7/12).  
Fbw7 is essential for maintenance of quiescence and function of cancer stem cells. (招待講演)  
第 35 回内藤コンファレンス, 札幌.
6. Nakayama, K. I. (2013, 8/23).  
Cell cycle and cancer stem cells: Abrogation of quiescence by Fbw7 ablation eliminates leukemia stem cells. (招待講演)  
ISEH 42nd Annual Scientific Meeting, Vienna.
7. 中山敬一. (2013, 9/12).  
がん治療における Fbxw7 抑制の二面性：光と影. (シンポジウム)  
第 86 回日本生化学会大会, 横浜.
8. Hatano, A., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2013, 9/16).  
Quantitative phosphoproteomic analysis of calmodulin-dependent calcium signaling.  
HUPO 2013 12th Annual World Congress, Yokohama.
9. Yokoyama, R., Shibara, T., Aoshima, M., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Okamoto, N., Tsubata, T., Ando, S. (2013, 9/16).  
Comprehensive quantitative phosphoproteomic approach by MS/MSALL with SWATH acquisition.  
HUPO 2013 12th Annual World Congress, Yokohama.
10. Nakayama, K. I. (2013, 9/17).  
Absolute quantification of human proteome by large-scale targeted proteomics. (Invited speaker)  
HUPO 2013 12th Annual World Congress, Yokohama.
11. 中山敬一. (2013, 10/4).  
ワールブルグ効果とは何か? : 全てを計ることによって明らかとなったがん代謝の真実. (モーニングレクチャー)  
第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜.
12. 中山敬一. (2013, 10/25).  
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：90 年来の謎を解く. (特別講演)



- 第40回日本神経内分泌学会学術集会・第38回日本比較内分泌学会大会・合同大会, 宮崎.
13. Nakayama, K. I. (2013, 11/5).  
Fbw7 is essential for maintenance of quiescence and function of cancer stem cells. (Invited Speaker)  
The 23rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Stem Cell Biology 2013, Fukuoka.
  14. 中山敬一. (2013, 11/19).  
次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新天地: 90年来のがんの謎に挑む. (招待講演)  
金沢大学がん進展制御研究所・共同利用共同研究拠点シンポジウム 2013, 金沢.
  15. Nakayama, K. I. (2013, 11/21).  
What is the Warburg effect? Next-generation proteomics uncovers the secret of cancer. (Invited Speaker)  
3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting, Toulouse.
  16. 幡野敦, 松本雅記, 中山敬一. (2013, 12/3).  
定量的リン酸化プロテオミクスによる胸腺細胞の抗原刺激シグナル伝達機構の解明.  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  17. 中山敬一. (2013, 12/3).  
次世代プロテオミクスを用いたがん代謝の統合的理解. (ワークショップ)  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  18. 西山正章, 中山敬一. (2013, 12/3).  
ユビキチンリガーゼ SCFFBXL12 複合体による幹細胞維持分子の分解と幹細胞分化に与える影響の解析.  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  19. 柴田猛, 横山亮, 青島理人, 松本雅記, 中山敬一, 岡本尚一, 津幡卓一, 安東純江. (2013, 12/3).  
MS/MSALL with SWATH-TMM acquisitionによるEGFシグナルネットワークの網羅的リン酸化プロテオミクス.  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  20. 黒田真也, 柚木克之, 久保田浩行, 曾我朋義, 松本雅記, 中山敬一. (2013, 12/3).  
トランスオミクスデータによるインスリン作用の多階層ネットワークのアンバイアス同定. (ワークショップ)  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  21. 都地崇弘, 渡邊心也, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 杉本のぞみ, 藤田雅俊. (2013, 12/4).  
新規結合タンパク質の解析によるGRWD1の転写における機能解明.  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  22. 井上一平, 弓本佳苗, 中山敬一. (2013, 12/4).  
ユビキチンリガーゼFbxw7の新規基質KLF7の同定と解析.  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  23. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2013, 12/5).  
mTORC1と炎症性ケモカインをつなぐ新規分子の発見とがん促進作用.  
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
  24. 弓本佳苗, 宗岡哲也, 坪井智広, 中山敬一. (2013, 12/5).  
基質の結合がFbx13のSCF複合体形成を促進する.

第36回日本分子生物学会年会, 神戸.

25. 中山敬一. (2014, 1/16).

次世代プロテオミクスが拓く新たな創薬アプローチ: 「ネットワーク標的創薬」の実現に向けて (招待講演)

次世代医薬分子解析学講座3周年記念シンポジウム: 日本版NIH元年に次世代創薬を考える, 東京.

26. Nakayama, K. I. (2014, 1/21).

Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. (Invited Speaker)

Kyushu University/Academia Sinica Bilateral Mini-Symposium on Cancer and Stem Cell, Taipei.

27. Nakayama, K. I. (2014, 2/7).

Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. (Invited Speaker)

International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, Monash University: Cell-fate Decision: Function and Dysfunction in Homeostasis, Melbourne.