

時系列データ統合解析プログラムの開発とこれによる生物時計ネットワークの網羅的解析

●石浦 正寛

名古屋大学・遺伝子実験施設

＜研究の目的と進め方＞

地球上に生息する生物のほとんどが生物時計を持っており、約24時間周期で活動している。我々は、時計を持つことが知られている最も単純な生物である藍色細菌において、生物時計の中核遺伝子である時計遺伝子クラスター *kaiABC* と、時計機能を修飾する時計関連遺伝子 *sasA*、*pex* のクローニングに成功し、分子遺伝学的に解析してきた。さらにこれらのタンパク質を生化学的・生物物理学的、構造生物学的に解析している。これらの時計タンパク質と時計関連タンパク質とから構成される「生物時計分子装置」は時計振動を自律的に発振することができ、未知の遺伝子発現制御ネットワークやタンパク質間相互作用ネットワークと連携して概日リズムを生み出していると考えられる。このような生物時計の全体像を分子レベルで理解するためには、生物時計分子装置を中心に置いて転写・翻訳・分子間相互作用（核酸-タンパク質間、タンパク質間など）・代謝などの種々のネットワークを網羅的に解析できる手法が必要である。また、生物時計分子装置（様々な分子複合体）の動態や機能を解析するには、一アミノ酸置換変異体タンパク質を作製し、その物性（動的構造、熱力学的物性）や生化学機能などを解析し、それらとリズム表現型との間の相関関係を抽出する手法が有効である。

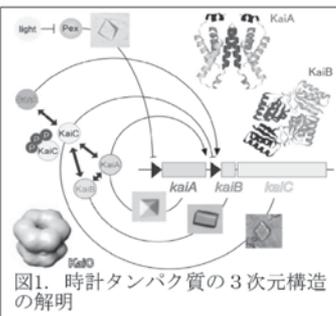


図1. 時計タンパク質の3次元構造の解明

本研究では以下のことを達成する：(1) 生命現象に関する膨大な量の多次元の時系列データを収集・蓄積し、クラスタリング、生物情報と時系列データの相関分析、ネットワークの推定により新規知識を抽出するプログラム(図2)の開発、(2) 藍色細菌の生物時計装置を中心とした遺伝子発現制御ネットワークの解明、(3) 藍色細菌の網羅的なタンパク質間相互作用ネットワーク解析のために、リアルタイムかつ *in vivo* でタンパク質間相互作用を解析できる実験系の開発。

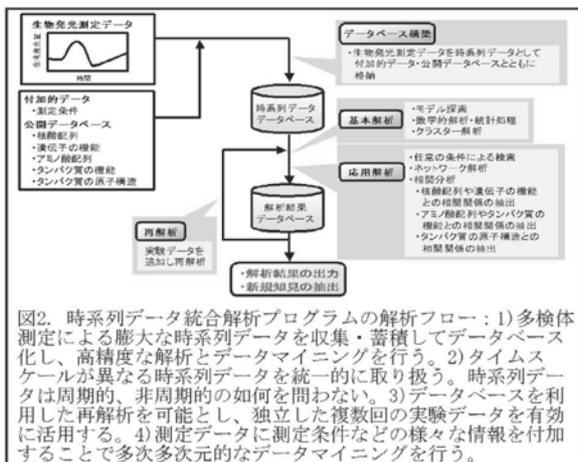


図2. 時系列データ統合解析プログラムの解析フロー：1) 多検体測定による膨大な時系列データを収集・蓄積してデータベース化し、高精度な解析とデータマイニングを行う。2) タイムスケールが異なる時系列データを統一的に取り扱う。時系列データは周期的、非周期的の如何を問わない。3) データベースを利用した再解析を可能とし、独立した複数回の実験データを有効に活用する。4) 測定データに測定条件などの様々な情報を付加することで多次元的なデータマイニングを行う。

＜2007年度の研究の当初計画＞

本年度は以下の(1)と(2)を進め、また(3)の研究のための基盤を構築する。

1. 時系列データ統合解析プログラムの開発：

試作プログラムに改良を加えて最終版を作成する。最終版では、プログラムとデータベースを合わせたシステム全体の統合テストを行い、その後実際のデータベースの構築を進める。これまでに別途開発を進めている新規のハイスループットな発光測定装置(図3)の測定結果を自動的にデータベースに蓄積させることを可能にし、実際の解析に用いてプログラムの有用性を検証する。

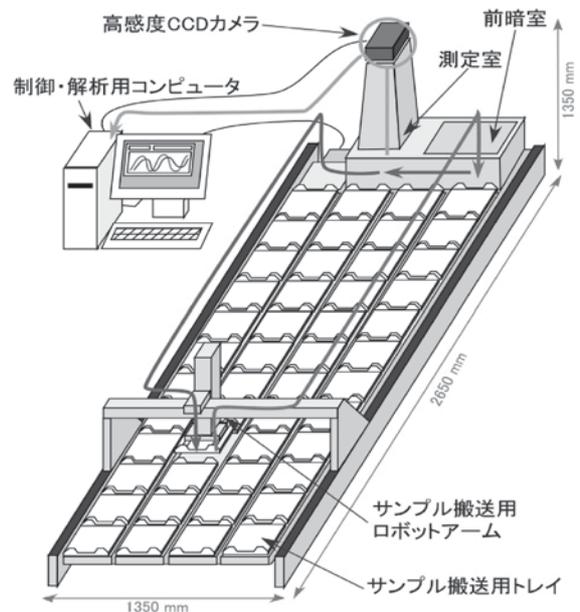


図3.ハイスループットの生物発光測定装置

2. 生物時計装置の遺伝子発現ネットワークの解析

上記プログラムを用いて、藍色細菌において、時計遺伝子クラスター *kaiABC* や時計関連遺伝子 *pex*、*sasA*、あるいは特定のパスウェイに関連する遺伝子の発現を網羅的に測定し、遺伝子発現制御ネットワークを解析する。

3. 網羅的 *in vivo* リアルタイムタンパク質間相互作用ネットワークの解析系の構築

藍色細菌で網羅的 *in vivo* リアルタイム相互作用解析系を確立し、生物時計装置を起点としたタンパク質間相互作用ネットワークの解明を目指す。そのために、*in vivo* でタンパク質間相互作用を解析する手法の一つである生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)を用い、藍色細菌の実験系における条件(ドナー{生物発光遺伝子}とアクセプター{蛍光遺伝子}のコードンの最適化、ドナーとアクセプターの組み合わせの最適化、増殖速度および蛍光強度の経時的測定)を検討する。

< 2007 年度の成果 >

[時系列データ統合解析プログラムの開発]

昨年度までに決定した仕様と、試作したルーチンを元にプログラムを試作した。大量の時系列データを解析してデータベースに記録することが可能な状態である(図4)。現在、プログラムのテストと解析後データのクラスタリング・発現制御ネットワークの解析機能の開発を進めており、今年度中には連動して動作する予定である。

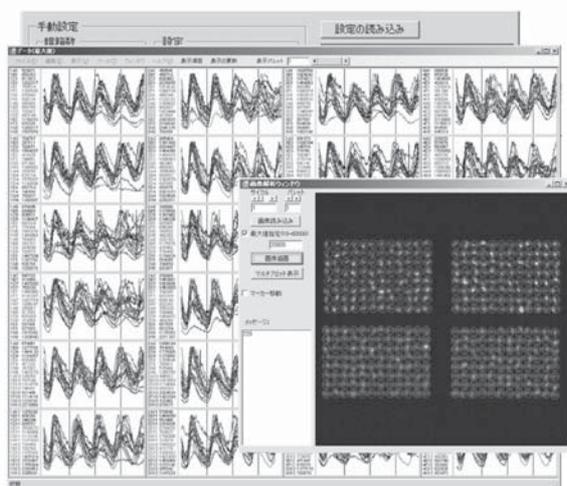


図4. 装置と連動した状態でのプログラム画像

[リアルタイムかつ *in vivo* でタンパク質間相互作用を解析できる実験系の開発]

BRETを行うためにドナーとなる複数種の発光タンパク質を整備している。また、時計タンパク質の生物物理学的解析(一分子測定)に取り組んでおり、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)のノウハウを蓄積している。藍色細菌においてBRETを行うため株を作製した。現在はBRET測定のための実験条件を検討中である。

簡便な小型生物発光測定装置を開発した(Okamoto *et al.*, 2007)。この装置は小型インキュベーターに入れることができるので、恒温培養室なしに簡便に生物発光測定ができる

時計関連タンパク質 Pex は時計遺伝子 *kaiA* のプロモーターに作用するリプレッサーであることを明らかにした(Kutsuna *et al.*, 2007)。

時計タンパク質 KaiC の N 末端及び C 末端ドメインはそれぞれ微弱な ATPase 活性を持つこと。その活性が温度に影響されないことを明らかにした(Murakami *et al.*, 2008)。

クラミドモナスにおいて、リズム変異体 105 個を分離し、それらの原因遺伝子 30 個を同定、クローニングすることに成功した(Matsuo *et al.*, 2008)。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究で開発する統合解析プログラムは、これまでに我々が率先して開発してきた発光測定を初めとする様々な大量の時系列データを遺伝子と関連づけて蓄積するものであり、既存の様々な測定方法で得られたデータを有効に活用することが可能になるので、多くの研究者にとって有用なものとなる。

藍色細菌において時計遺伝子クラスター *kaiABC*、時計関連遺伝子 *pex*、*sasA* を世界に先駆けてクローニングして以来、我々はいち早く時計タンパク質の生化学、生物物理学、構造生物学解析を行い、この分野の研究で常に世界をリードしている。藍色細菌の生物時計装置を中心としたネットワーク(遺伝子発現制御ネットワーク・タンパク質間相互作用ネットワーク)の網羅的に解析の研究はまだ誰も手がけておらず、極めて先駆的である。

進化上、藍色細菌と高等植物との中間に位置する緑藻クラミド

モナスにおいて、生物時計遺伝子を網羅的にクローニングすることに成功した。植物時計の分子機構と進化を解明する上で大きな貢献である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

藍色細菌においてBRET用の株を作製したが、BRETによる時計タンパク相互作用自体はまだ測定できていない。これは藍色細菌が持つ光合成色素の遅延蛍光が原因と考えられるので、光合成色素の欠損株をバックグラウンドに使用することなどを検討している。

<今後の課題>

近日中に時系列データ統合解析プログラムのクラスタリング・発現制御ネットワーク解析部分を仕上げてこれまでの開発部分と連動可能にし、時系列データ統合解析プログラムの開発を完了する。

様々な分野の研究者と共同研究を推進し、開発した時系列データ統合解析プログラムと新規開発した発光測定システムとを利用した大規模な解析プロジェクトを実施する。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0702132031

Okamoto, K., Ishiura, M., Torii, T., Aoki S. (2007) A compact multi-channel apparatus for automated real-time monitoring of bioluminescence. *J Biochem Biophys Method*, 70(4):535-538.

2. 0801281758

Kutsuna S., Kondo T., Ikegami H, Uzumaki T., Katayama M., and Ishiura M. (2007) The circadian clock-related gene *pex* regulates a negative cis element in the *kaiA* promoter region. *J Bacteriol*, 189:7690-7696.

3. 0801281303

Murakami, R., Miyake, A., Iwase, R., Hayashi, F., Uzumaki, T., and Ishiura, M. (2008) ATPase activity and its temperature compensation of the cyanobacterial clock protein KaiC. *Genes to Cells*, in press.

4. 0801291017

Matsuo, T., Okamoto, K., Onai K., Niwa, Y., Shimogawara, K., Ishiura, M. (2008) A systematic forward genetic analysis reveals components of the *Chlamidomonas* circadian system. *Genes and Development*, in press.

2) データベース/ソフトウェア

なし