

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700324
 研究課題名（和文） 遺伝子型、発現型の網羅的解析に基づく遺伝子制御機構の進化的シミュレーション
 研究課題名（英文） Evolutionary simulation of gene regulatory networks based on comprehensive transcriptome and mutation analysis.
 研究代表者
 小野 直亮（ONO NAOAKI）
 大阪大学 大学院情報科学研究科 特任准教授
 研究者番号 60395118

研究成果の概要（和文）：大腸菌をエタノール環境下で人工的に進化させた株をもとに、全ゲノムの塩基配列解読と遺伝子発現量の定量を行い、適応進化の過程での変化を解析した。複数の適応株の間で共通する特定の変異は見つからなかったが、発現量の変化には共通の傾向が見いだされた。その結果をもとに、細胞内の遺伝子制御ネットワークの振る舞いがどのように変化するか、そのダイナミクスをシミュレーションするモデルを構築し、グローバル発現制御因子の影響を評価した。

研究成果の概要（英文）：Based on expression profiles of *Escherichia coli* strains which were evolved under an ethanol stress condition in laboratory, we sequenced the whole genomes and expression profiles. Though there were no common mutations, we observed a bias of expression changes shared by the adapted strains. We modeled the dynamics of gene regulatory networks to simulate their adaptation, and we evaluated the effect of changes in global regulatory genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：1011

キーワード：マイクロアレイ、遺伝子、発現制御、モデル化

1. 研究開始当初の背景

近年のDNAマイクロアレイ技術の発達により、細胞内の全遺伝子の発現プロファイルを測定することができるようになっただけでなく、ゲノム全体における突然変異を比較的簡単な実験で検出することが可能になってきた。しかし、遺伝子の変異、とくに細胞内の遺伝子発現の制御機構における変異が遺

伝子発現のネットワークにどれだけ影響をあたえるかについては、まだまだ予測困難なことが多い。そのため、より進化のダイナミクスをより定量的に理解するためには、進化の過程で遺伝子発現の制御機構が環境に適応していく際にどのように変化していくか、またその変異がどのように表現型に影響していくかを解析するモデルを構築する必要

がある。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の進化過程における遺伝子型の変化とその表現型への影響を定量的に理解することを目的に、遺伝子制御ネットワークの進化ダイナミクスのモデルを構築する。

モデル生物として大腸菌を用い、大腸菌が環境に適応して行く過程での遺伝子型の変化と、その過程での発現プロファイルの変化を測定し、対比させることで大腸菌の環境適応過程において遺伝子制御機構がどのように変化したかの進化的シミュレーションによって探索し解析することを目的とする。また、進化実験で得られたデータをより詳細に解析するため、発現解析の精度の向上と遺伝子型の変異検出のためのアルゴリズムの開発を行う。

3. 研究の方法

環境ストレス要因としてエタノールを選び、大腸菌が培養液中のエタノール適応する過程を、人工進化実験により調べる。得られた進化株を元に、遺伝子発現プロファイルの変化を解析する。DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の定量性の向上のため、測定データからバックグラウンドノイズを除き、測定精度を向上させる解析アルゴリズムを開発する。解析された遺伝子発現データを元に、大腸菌の遺伝子発現ネットワークのモデルを構築する。

モデルとしては、初期状態としてまず、既知の遺伝子発現制御データベースをもとにした発現制御ネットワークを構築し、単純なダイナミクスによって定常状態での発現プロファイルをシミュレーションする。人工進化実験で得られたサンプルのトランスクリプトーム解析の結果を元に、進化の前後、及び、エタノールストレスの有無による発現量プロファイルの変化に近づくよう、進化モデルによってネットワークを最適化し、エタノール環境に対する適応の過程で発現制御ネットワークがどのように変化したのかを解析する事を目指す。

また、大腸菌の進化過程での遺伝子型の変化を解析するため、次世代シーケンサを用いたシーケンス結果を元に変異解析を行う。既存の配列解析アルゴリズムでは、塩基の置換による点変異は比較的高精度に検出することができるが、トランスポゾンの転移などのようにゲノムの構造が変わる変異の検出精度が低いため、そのような転移を検出するための解析アルゴリズムを構築する。解析された変異のデータを遺伝子発現ネットワークの変化ダイナミクスのモデルの振る舞いと比較し、どのような進化が起こったのかを解

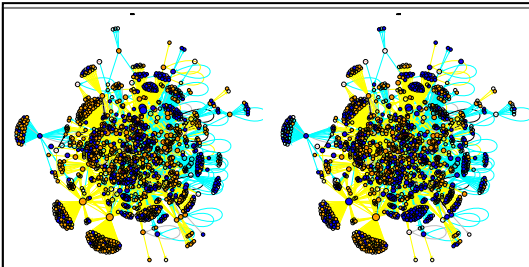


Figure 1. 遺伝子制御ネットワーク上での発現量の変化。左) 祖先株。右) 進化後のエタノール耐性株。いくつかのクラスターにおいて、エタノールストレスに対する応答の発現パターンが変化している。

析する。

4. 研究成果

進化株と祖先株の全遺伝子の発現量分布を主成分分析を用いて解析した所、エタノールストレスに対する応答、及び、進化前後での発現量の変化にそれぞれ特徴的なバイアスがあることが確認された。それぞれの株は独立に進化したにもかかわらずエタノール耐性の獲得の結果で発現量の変化に共通の傾向があることは、適応進化の過程で発現量の変化を導くダイナミクスの存在を示唆している。

発現量の変化をもたらした機構を詳細に調べるため、既知の転写制御因子のデータベース (RegulonDB) を元に、遺伝子発現制御ネットワーク上での相互作用を解析した。祖先株と進化株の間でエタノールストレス有り/無し環境における発現パターンの変化がどのような制御因子の影響下にあるかを比較したところ、複数の株でエタノールストレスに対して進化によって振る舞いの変化したクラスターを抽出することができた (Fig. 1)。

また一方で、得られた大腸菌の進化株の全ゲノム変異解析を行ったところ、エタノール代謝に直接関係する遺伝子には変異は見つからなかったが、6 系列中 4 系列で、グローバル制御因子の一つ、*hns* の上流に挿入配列が転移しているものが見つかった。この遺伝子の発現量の変化は他のさまざまな制御因子の発現の変化に間接的に変動を与えることが知られている。これらの結果は、エタノール耐性の獲得が単に特定の遺伝子の変異からトップダウン的にコントロールされたのではなく、環境変化や変異によって摂動を受け、ゆらぎが大きくなった遺伝子制御ネットワークのダイナミクスが環境との相互作用を通してより適応的な状態へと収束した

結果である可能性を示唆している。

また、遺伝子発現制御ネットワークが全体としてどのように発現パターンを変化させたのかをモデル化するため、ネットワークでの相互作用をとりいれたダイナミクスを構築し、計算機モデルでシミュレーションした。各遺伝子の遺伝子発現制御ネットワークの重みを行列として与え、遺伝子発現量とタンパク質の量を変化を確率モデルで記述した。実験で得られた進化株の発現パターンとの距離を適応度とし、遺伝的アルゴリズムを用いて発現制御ネットワークのパラメータを求めることで、実際の遺伝子発現量の分布をある程度再現することができた。今後このようなモデルをどうして細胞内のダイナミクスを再現することで、実験室進化のような過程での生物の適応過程をより詳細に解析することが可能となるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

[1] "Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress." Takaaki Horinouchi, Kuniyasu Tamaoka, Chikara Furusawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Takashi Hirasawa, Tetsuya Yomo and Hiroshi Shimizu. BMC Genomics, Vol. 11, pp. 579, (2010). 査読有

[2] "Transition from positive to neutral in mutation fixation along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution." Toshihiko Kishimoto, Leo Iijima, Makoto Tatsumi, Naoaki Ono, Ayana Oyake, Tomomi Hashimoto, Moe Matsuo, Masato Okubo, Shingo Suzuki, Kotaro Mori, Akiko Kashiwagi, Chikara Furusawa, Bei-Wen Ying, Tetsuya Yomo, PLoS Genetics, Vol. 6, No. 10, pp. e1001164 (2010). 査読有

[3] "Model-based analysis of non-specific binding for background correction of high-density oligonucleotide microarrays." Chikara Furusawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Tomoharu Agata, Hiroshi Shimizu and Tetsuya Yomo, Bioinformatics, Vol. 25, No. 1, pp. 36-41 (2009). 査読有

[4] "Genome-wide mutational and expression analysis of evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress." Horinouchi, T., Tamaoka, K., Furusawa, C., Hirasawa, T., Ono, N., Suzuki, S., Yomo, T., and Shimizu, H., Proc. of the 20th

International Conference on Genome Informatics (GIW 2009), (2009). 査読有

[5] "A model-based analysis method for detection of single-base substitution using resequencing microarrays." Ono, N., Suzuki, S., Furusawa, C., Shimizu, H., and Yomo, T., Proc. of Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC' 09), (2009). 査読有

[6] "Genome-wide mutational and expression analysis of ethanol-tolerant *Escherichia coli*." Horinouchi, T., Tamaoka, K., Furusawa, C., Hirasawa, T., Ono, N., Suzuki, S., Yomo, T., and Shimizu, H., Proc. of the International Symposium on Complex Systems Biology, (2009). 査読無

[7] "Development of a thermodynamic model to predict hybridization on high-density oligonucleotide microarray." Ono, N., Suzuki, S., Furusawa, C., Shimizu, H., and Yomo, T., Proc. of the International Symposium on Complex Systems Biology, (2009). 査読無

[学会発表] (計 14 件)

[1] "エタノール環境下での長期植え継ぎ培養によって得られた耐性大腸菌株の遺伝子発現・ゲノム変異解析" 堀之内貴明、玉岡邦康、古澤力、小野直亮、鈴木真吾、平沢敬、四方哲也、清水浩、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010)、2010/12/4、神戸ポートアイランド

[2] "人工進化実験における発現制御ダイナミクスの進化的シミュレーション" 小野直亮、堀之内貴明、古澤力、清水浩、四方哲也、定量生物学の会 第三回年会、2010/11/26-28、東京大学生産技術研究所

[3] "大腸菌エタノールストレス人工進化株の網羅的解析によるエタノール耐性付与" 堀之内貴明、玉岡邦康、古澤力、平沢敬、小野直亮、鈴木真吾、四方哲也、清水浩、定量生物学の会 第三回年会 東京大学生産技術研究所、2010/11/26-28

[4] "人工進化実験によって得られたエタノール耐性大腸菌株の網羅的遺伝子発現解析とゲノム変異解析" 堀之内貴明、玉岡邦康、古澤力、小野直亮、鈴木真吾、平沢敬、四方哲也、清水浩、第 62 回日本生物工学会大会、2010/10/27-29、宮崎シーガイア ワールドコンベンションセンターサミット

[5] "次世代シーケンサを用いた大腸菌DH1

株の全ゲノム解析" 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 清水浩, 四方哲也、第 62 回日本生物工学会大会、2010/10/27-29、宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット

[6] "複数時間スケールを持つ環境適応ダイナミクス：エタノールストレス環境下での大腸菌人工進化実験における網羅的表現型/遺伝子型解析" 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩、2010/9/20-22、第 48 回生物物理学学会年会

[7] "人工進化工学と網羅的遺伝子発現情報解析によるストレス耐性細胞の創製" 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 小野直亮, 鈴木真吾, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩、化学工学会 第 76 年会、2010/3/22、東京農工大学

[8] "大腸菌エタノールストレス人工進化株の全ゲノム変異解析・遺伝子発現解析" 堀之内貴明, 玉岡邦康, 古澤力, 平沢敬, 小野直亮, 鈴木真吾, 四方哲也, 清水浩、2010/1/10、定量生物学の会 第二回年会

[9] "高密度オリゴヌクレオチドアレイにおけるハイブリダイゼーションの熱力学モデルを用いた発現解析および変異解析アルゴリズムの開発" 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 清水浩, 四方哲也、2010/1/10、定量生物学の会 第二回年会

[10] "A model-based analysis method for detection of single-base substitution using resequencing microarrays." Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, and Tetsuya Yomo, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC'09), 2009/11/25, Kobe International Conference Center Port Island, Kobe, Japan.

[11] "次世代シーケンサにおけるメイトペアの距離情報を利用した配列解析アルゴリズムの開発" 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 清水浩, 四方哲也、2009/11/1、第 47 回日本生物物理学学会年会

[12] "メイトペア情報に基づいた次世代シーケンサによる resequencing 解析アルゴリズムの開発" 小野直亮, 鈴木真吾, 古澤力, 清水浩, 四方哲也、2009/9/23-25、第 61 回日本生物工学会大会

[13] "タイリングアレイを用いたエタノール耐性大腸菌株のゲノム変異解析" 玉岡邦康, 堀之内貴明, 古澤力, 平沢敬, 小野直亮, 鈴木真吾, 四方哲也, 清水浩、2009/9/23-25、第 61 回日本生物工学会大会

[14] "エタノール耐性大腸菌株のタイリングアレイを用いたゲノムワイド変異解析" 玉岡邦康, 堀之内貴明, 古澤力, 平沢敬, 小野直亮, 鈴木真吾, 四方哲也, 清水浩、生物学若手研究者の集い 夏のセミナー2009、2009/7/4-5、コミュニティ嵯峨野

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野 直亮 (ONO NAOAKI)

大阪大学 大学院情報科学研究科 特任准教授

研究者番号：60395118