

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850024

研究課題名(和文) ディファレンシャルネットワークによる作物有用形質に關与する遺伝子機能予測法の開発

研究課題名(英文) in silico prediction of gene function associated with agronomically useful traits in crops using differential network analysis

研究代表者

福島 敦史 (Fukushima, Atsushi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：80415281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ディファレンシャルネットワークによる作物有用形質に關与する遺伝子機能予測法の開発を目的とする。実用作物のトマト3種に焦点をあて、共発現ネットワークの接続形態の違いに基づいた遺伝子の重要性づけによって、葉の形の多様性の背後にある遺伝子制御ネットワークの推定手法の開発に取り組んだ。我々のディファレンシャルネットワーク手法は、種間で互いに異なった遺伝子共発現クラスターを構成する、種間での劇的な共発現パターンの変化をとらえた。同時に、遺伝子発現制御ネットワーク予測手法をRパッケージとして実装している。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop computational prediction methods of gene function associated with agronomically useful traits in crops using differential network analysis. To this end we analyzed comparative transcriptome dataset from leaf development samples using three Solanum species exhibiting different leaf development characteristics. Our differential network approach has detected coexpression alterations for genes making up the most significantly divergent cluster, and has identified thousands of potential key gene pairs under interspecific differential regulation. We are now developing and integrating a set of R packages for the analysis.

研究分野：植物システム生物学

キーワード：バイオインフォマティクス ネットワーク解析 共発現解析

1. 研究開始当初の背景

遺伝子共発現解析とは、実験条件にわたった遺伝子発現パターンの類似尺度(例、ピアソン相関係数)を算出し、機能既知遺伝子の発現パターンとの類似性から機能予測を行う手法の1つである(Fukushima et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009)。

研究代表者は、これまでポストゲノム機能解析を促進するデータ統合手法の開発に従事してきた。その過程で、共発現の概念を拡張したディファレンシャル共発現(以下 DC)手法に着目した。DCとは、2つの実験条件間における共発現関係を互いに比較することで、統計的に有意に異なる共発現関係を同定する(図1)。

実用作物であるトマトの葉と果実との間での DC 遺伝子について調べた結果、リコピンやフラボノイド生合成経路の鍵酵素遺伝子が DC 遺伝子に含まれる可能性が示唆された(Fukushima et al. *Plant Physiol.*, 2012)。この過程で、共発現遺伝子および DC 遺伝子とその周りの共発現ネットワークの接続形態との間に重要な関連性が隠されているのではないかという仮説を得た。これらに基づき、細胞内プロセスの背後にある遺伝子発現調節ネットワークについて信頼性の高い情報を与える解析法開発の着想を得た。

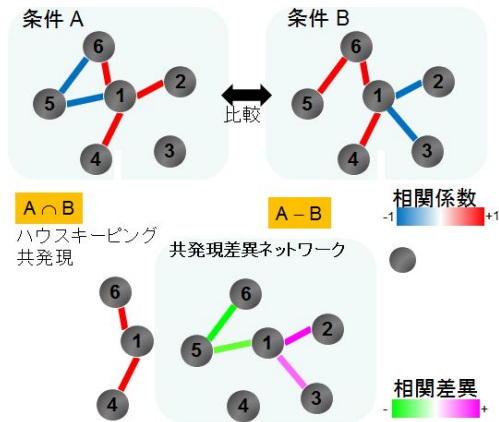


図1 ディファレンシャルネットワークの概念図

2. 研究の目的

植物が有する代謝経路に関わる遺伝子発現調節ネットワークの理解は、作物収量の増大や有用物質生産能力の向上のために役立つ。その調節ネットワークの性質を明らかにするため、研究代表者が開発してきた「ディファレンシャル共発現法」をコア技術として *in silico* な遺伝子発現調節ネットワーク推定法の開発を行う。特に、実用作物のトマトに焦点を当てて、共発現ネットワークの接続形態に基づいた遺伝子の重要性づけを行うとともに果実肥大等の有用形質に資する遺伝子の機能予測を行う。

ゲノム情報はもとより機能ゲノミクスデータについても、モデル植物のみならず実用作物への応用展開が望まれている。本課題で開発する推定手法は作物における有用形質

に關与する遺伝子機能を明らかにするための作物間比較研究の基盤となる。さらに、他ナス科作物にただちに应用可能であり、社会的にも需要が高い研究といえる。

3. 研究の方法

ゲノムワイドな DC とネットワーク統計量とを統合した、遺伝子発現調節ネットワークの推定法を開発する。具体的な流れは以下の通りである：

- (1) マイクロアレイ/RNA-seq データの分類と前処理
- (2) DC とネットワーク統計量に基づく調節ネットワーク推定法を開発
- (3) トマトのトランスクリプトーム共発現ネットワークを利用した解析ツールの開発

トマトの果実肥大と単為結果性といった重要な代謝経路の解明およびその遺伝子調節ネットワークの理解に向けた鍵因子候補の探索を行う。

4. 研究成果

(1) トマトのトランスクリプトームデータに DC を適用する例として、花の発生に関わる因子に着目した。葉サンプル群における共発現ネットワークと果実サンプルとのものとの比較の結果、DC 遺伝子として同定された例を図2に示す。この中には花の発生に関連する遺伝子群が統計的に有意に過剰出現しており、果実成熟に関わる既知の重要な遺伝子 *MADS-RIN* が含まれていることがわかった。他にも花発生に関わる *MADS-box* 遺伝子が存在した。このネットワークに含まれる遺伝子群の近接中心性[ネットワーク中のノード(遺伝子)の構造に基づく重要性を表す特性量]を調べた結果、果実成熟に重要な *MADS-RIN* 遺伝子を含む *MADS-box* 遺伝子群が、必ずしも次数(リンクの数)の高い「ハブ」が多いわけではないことがわかった。ゲノムワイドなディファレンシャル共発現とネットワーク統計量とを統合することで、遺伝子発現調節ネットワークの推定を洗練できることが示唆された。

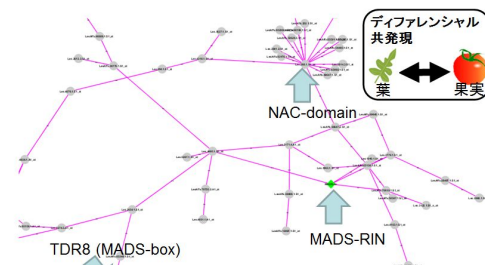


図2 トマトの果実と葉との間のディファレンシャル共発現ネットワーク

果実で共発現が強まった集団には、成熟に関わる重要な因子 *MADS-RIN* が含まれていることがわかった。他にも2つの *MADS* 遺伝子(矢印部分)が含まれていた。点が遺伝子を、線が DC 関係を表し、果実で共発現が強まった関係を示唆する。

(2) もう一つの例としてトマト葉の形の多様性に着目した。葉の形態が大きく異なるトマト種、すなわち食用種のトマト (*Solanum lycopersicum*) およびその野生種トマト2種 *S. pennellii* と *S. habrochaites* の葉の異なる発生ステージ別 RNA-seq データセット (Ichihashi et al. *PNAS*, 2014) を用い、トランスクリプトーム比較を行った。その結果、ディファレンシャル共発現解析は、種間で互いに異なった遺伝子共発現クラスター (それぞれの種で、葉の発生の違いを反映すると考えられる共発現遺伝子群の集まり) を構成する、種間での劇的な共発現パターンの変化をとらえた。このことはトマト種の各々は、葉の特徴を形作る細胞内分子ネットワークを調節する制御因子を種特異的に用いていることが示唆された。すなわち、葉の形態的多様性の背後にある共通した遺伝子共発現パターンあるいは種特異的な遺伝子共発現パターンの存在を暗示している (論文投稿準備中)。

(3) 情報解析基盤整備の一環として、研究代表者が開発したRソフトウェアパッケージ DiffCorr (Fukushima *Gene*, 2013) のスクリプトを引き続き改良し、ドキュメントの充実に努めた (Fukushima and Nishida, 2015)。

本研究課題により、遺伝子発現調節ネットワークの鍵となる新規転写因子や代謝経路の鍵酵素遺伝子の機能予測の精度を高めることが示唆された。さらなるデータ統合を行うことで、作物等の重要形質に関与する未知機能遺伝子の予測・機能同定の促進が期待できる。トマトの果実肥大と単為結果性に関わる候補因子群については、実験検証を進めている。本研究課題で取り組んだアプローチは、植物バイオマスの利活用に向けた植物のもつ有用形質に関与する遺伝子発見や有用物質の代謝経路解明に役立つと確信している。

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 10 件)

Fukushima A., Nakamura M., Suzuki H., Yamazaki M., Knoch E., Mori T., Umemoto N., Morita M., Hirai G., Sodeoka M., Saito K., "Comparative Characterization of the Leaf Tissue of *Physalis alkekengi* and *Physalis peruviana* Using RNA-seq and Metabolite Profiling", *Front. Plant Sci.*, 査読有, 7:1883 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.01883

市橋 泰範, 福島 敦史, "植物科学におけるトランスクリプトーム解析の最前線", *植物科学最前線*, 査読有, 7:110 (2016). http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-review_7C_110-123.pdf

福島 敦史, "植物におけるオミックス統

合ネットワークシステム生物学", *SAR News*, 査読無, 31:9-16 (2016). http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/SARNews/SARNews_31.pdf

Rohani E.R., Chiba M., Kawaharada M., Asano T., Oshima Y., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Fukushima A., Rai A., Saito K., Yamazaki M., "An MYB transcription factor regulating specialized metabolisms in *Ophiorrhiza pumila*", *Plant Biotechnol.*, 査読有, 33, 1-9 (2016). DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.1117a

Mikami Y., Fukushima A., Komiyama Y., Iwase T., Tsuda H., Higuchi Y., Hayakawa S., Kuyama K., Komiyama K., "Human uterus myoma and gene expression profiling: A novel in vitro model for studying secretory leukocyte protease inhibitor-mediated tumor invasion", *Cancer Lett.*, 査読有, 379:84-93 (2016). DOI:10.1016/j.canlet.2016.05.028

Fukushima A., Nakamura M., Suzuki H., Saito K., Yamazaki M., "High-Throughput Sequencing and *De Novo* Assembly of Red and Green Forms of the *Perilla frutescens* var. *crispa* Transcriptome", *PLOS ONE*, 査読有, 10:e0129154 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0129154

Ohashi M., Ishiyama K., Kusano M., Fukushima A., Kojima S., Hanada A., Kanno K., Hayakawa T., Seto Y., Kyojuka J., Yamaguchi S., Yamaya T., "Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 in vascular tissues of axillary buds causes severe reduction in their outgrowth and disorder of metabolic balance in rice seedlings", *Plant J.*, 査読有, 81:347-56 (2015). DOI: 10.1111/tpj.12731

Mikami Y., Fukushima A., Kuwada-Kusunose T., Sakurai T., Kitano T., Komiyama Y., Iwase T., Komiyama K., "Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing of sterile-cultured *Eisenia andrei* for immune system research", *PLOS ONE*, 査読有, 10:e0118587 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0118587

Fukushima A., Kanaya S., Nishida K., "Integrated network analysis and effective tools in plant systems biology", *Front. Plant Sci.*, 査読有, 5:598 (2014). DOI: 10.3389/fpls.2014.00598

Fukushima A., Kusano M., "A network perspective on nitrogen metabolism from model to crop plants using integrated 'omics' approaches", *J. Exp. Bot.*, 査読有, 65:5619-5630 (2014). DOI: 10.1093/jxb/eru322

[学会発表] (計 4 件)

福島 敦史, "代謝システムを解き明かすメタボロミクスとデータマイニングの現

状", 第122回日本解剖学会 S16シンポジウム「細胞特性を決める細胞外微小環境と代謝システム」, 長崎大学医学部 (長崎県長崎市), 2017年3月30日. (招待講演)
福島 敦史, "DIY バイオインフォマティクス~細胞間シグナル比較を例として~", 第121回日本解剖学会 S24シンポジウム「硬組織形成における細胞間相互作用を考える」, ビッグパレットふくしま (福島県郡山市), 日本, 2016年3月30日. (招待講演)

福島敦史, 西澤 具子, 小林 誠, 彦坂 晶子, 後藤 英司, 斉藤 和季, 草野 都, "トマト果実肥大に及ぼす代謝変動解明のためのシステム生物学的アプローチ", 第32回日本植物細胞分子生物学会大会, アイーナ いわて県民情報交流センター (岩手県盛岡市), 2014年8月21-22日. (口頭発表)

Fukushima A., "Let's Use R/Bioconductor and Log Your Analysis ", Workshop "Effective Metabolomics Software: From Design to Practice" in the 10th International conference of the Metabolomics Society (Metabolomics 2014), Tsuruoka, Japan, 23 June, 2014. (口頭発表)

[図書] (計1件)

Fukushima, A. and Nishida, K. (2016) "Using the DiffCorr Package to Analyze and Visualize Differential Correlations in Biological Networks (pages 1–34)," in Computational Network Analysis with R: Applications in Biology, Medicine, and Chemistry (368 pages) (eds M. Dehmer, Y. Shi and F. Emmert-Streib), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
DOI: 10.1002/9783527694365.ch1

[その他]

ホームページ等

<https://github.com/afukushima/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福島 敦史 (FUKUSHIMA, Atsushi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号： 80415281