

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510272

研究課題名(和文) 遺伝子共発現ネットワーク解析を用いたイソフラボノイド生合成関連転写因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of isoflavonoid biosynthesis related transcription factors using gene co-expression network analysis

研究代表者

鈴木 秀幸 (Suzuki, Hideyuki)

公益財団法人かずさDNA研究所・産業基盤開発研究部・主席研究員

研究者番号：80276162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：イソフラボノイド生合成経路に関与する転写因子の単離を目的として、イソフラボノイドを蓄積するアヤメ科植物であるジャーマンアイリス(*Iris germanica*)を対象に、次世代シーケンサーデータ(RNA-Seq)を用いてEST解析の整備を行った。また、ジャーマンアイリスの不定根培養細胞の時系列実験において、カスタムDNAアレイ解析を行った。さらに、ネットワークの描画トポロジーに注目して相関係数の閾値を自動的に決定する金平糖アルゴリズムによる遺伝子共発現ネットワーク解析ソフトを開発した。この解析ソフトを用いて、公開シロイヌナズナDNAアレイデータを用いて、ネットワーク解析の検証を行った。

研究成果の概要(英文)： In order to isolate transcription factors involved in isoflavonoid biosynthesis, we established an EST (expressed sequence tag) data in *Iris germanica* root cultures, accumulating isoflavonoid, using next-generation sequencing instrument illumina HiSeq 1000 with 100 bp paired-end reads. Furthermore, we carrying out transcript expression analysis (using a custom *Iris* DNA array) in subculturing time-course experiment of *Iris germanica* root cultured cells for gene discovery in gene co-expression network analysis.

We established standalone Confeito Java-GUI (gene co-expression network analysis) software that extracted highly-interconnected gene modules. Using the public *Arabidopsis* DNA array resource data (more than 9 thousands), we have shown an application of our developed Confeito Java-GUI software to isolate gene co-expression network module in *Arabidopsis* aliphatic glucosinolate biosynthesis.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：遺伝子共発現ネットワーク解析 EST解析 DNAマイクロアレイ 次世代シーケンサー 転写因子 アヤメ科植物 イソフラボノイド生合成 不定根培養

1. 研究開始当初の背景

(1) 統合オミクスの研究(メタボロミクスとトランスクリプトミクスの融合研究)にネットワーク解析を活用した報告例として、シロイヌナズナを材料に、アントシアニン生合成の転写因子(MYB75)の機能解析やアブラナ科特有のグルコシノレート生合成の転写因子(MYB28, 29)の機能解析を行った例などが挙げられる(図1)。植物の二次代謝生合成遺伝子の機能解析研究において、遺伝子共発現解析を利用することが強力なツールと成り得ることが実証された。

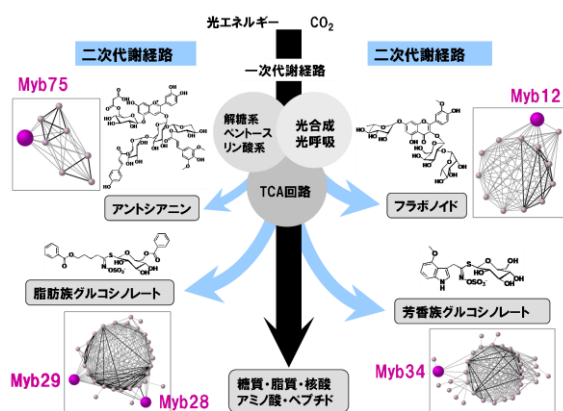


図1 シロイヌナズナの共発現解析(ネットワーク解析より得られたモジュールと二次代謝産物) 赤丸(大):転写因子;赤丸(小):生合成酵素遺伝子

(2) 申請者の所属研究機関では、植物における大量の公開DNAマイクロアレイを活用した、独自の解析アルゴリズム(金平糖)による植物遺伝子共発現解析データベース CoP (<http://webs2.kazusa.or.jp/kagiana/cop/index0.html>)を公開している。既存のネットワーク解析では利用者が相関係数の閾値を任意で設定する必要があるが、我々の開発した金平糖解析では、クラスターの外側と内側の関係の特徴づけたアルゴリズムでネットワークのトポロジーを考慮しながら閾値を自動で設定するため、恣意的でないモジュール(共発現遺伝子グループ)が抽出できる。

(3) シロイヌナズナについて上述のCoPデータベースを精査すると、いくつかの特徴的なモジュールが抽出された。特に、シロイヌナズナに蓄積している二次代謝産物の生合成経路は、少数の転写因子により多くの生合成酵素遺伝子が制御を受けることが示され、結果として特徴的なモジュールとして抽出しやすいことが明らかとなった(図1)。このようなモジュールの特徴が、植物二次代謝産物に共通する制御システムをとらえていると仮定すると、実用植物が含有する二次代謝経路でも、関連する遺伝子群が同一のモジュールに抽出されると推測できる。

(4) 以上のことより、実用植物における二次代謝産物の遺伝子機能解明にネットワーク解析を取り入れることの有益性を予見し、これを取り入れた新しい研究手法の道筋を示すため、本申請の着想に至った。

(5) 現在、250種類以上の植物由来のEST(expressed sequence tag)情報が Plant Genomes Central (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html>)に公開されている。これらEST情報を基にDNAマイクロアレイ用のプローブ設計ができるため、多くの植物でマイクロアレイ作製が進められている。現時点においても20種類以上の植物についてEST情報を基にしたDNAマイクロアレイが設計され、1万実験以上のDNAマイクロアレイデータが Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)にて公開されている。今後、次世代シーケンサーの活用により、植物のEST情報及びそこから得られる遺伝子発現情報は飛躍的に増大すると予想される。

(6) 植物二次代謝に関与する生合成遺伝子の機能解析は、昔から酵素活性を指標に蛋白質のアミノ酸情報を用いるBottom-up型の研究が行われてきた。しかし、activation tag ラインの解析により pap1 転写因子がアントシアニンの生合成の制御因子として単離されて以来、Top-down型(リソースを用いたスクリーニング)研究も有効な手法として注目されてきた。また、大腸菌発現型ライブラリーを作製し、酵素活性のみを指標として酵素遺伝子の単離を行う新たな方法も行われている。

(7) 本申請では、EST情報の有効活用及びモデル植物以外の植物に含まれている固有の二次代謝産物(イソフラボノイド)に注目して、新しい二次代謝研究の実験手法を提唱する。特に、二次代謝産物の制御に関与する転写因子の候補の絞り込みには、DNAマイクロアレイから得られる遺伝子共発現情報が有益であり、ネットワーク手法を融合して、二次代謝産物制御の転写因子の遺伝子選抜を行う新しい解析手法を提唱する。

(8) イソフラボノイドは多くのマメ科植物に含まれており、窒素固定に必要な根粒形成における重要なシグナル物質として考えられているため、マメ科モデル植物を用いて、その生合成が研究されている。一方、進化上、双子葉植物のマメ科と離れた関係にある単子葉植物のアヤメ科にもイソフラボノイドは含まれているが、その役割と生合成遺伝子は全く解明されていない。

2. 研究の目的

申請者はアヤメ科植物ジャーマンアイリス (*Iris germanica*) の EST 整備を開始し、現在、約 9,000 個の EST 解析が終了した。イソフラボノイド生合成酵素遺伝子の候補 EST については想定される経路の大半を単離することに成功したが、制御因子の候補となり得る Myb 様転写因子は 14 種類しか確認されなかった。

本研究では、未だ単離されていない可能性の高いイソフラボノイドの転写因子を単離することを目的として、今後の EST 解読の主流となる次世代シーケンサーによる EST 整備～DNA マイクロアレイ解析～金平糖ネットワーク解析～イソフラボノイド転写因子の機能解析の戦略を立案して実証する。

また、本研究では、ネットワークの描画トポロジーに注目して相関係数の閾値を自動的に決定する金平糖アルゴリズムによる遺伝子共発現ネットワーク解析ソフト (JAVA プログラム) をユーザーフレンドリーなソフト (JAVA-GUI プログラム) に改良する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによる EST 解読

ジャーマンアイリス (*Iris germanica*) の不定根培養に塩化銅処理することにより、イソフラボン (配糖体; 図 2) が蓄積することを連携研究者(明石)が報告しているため、より多くの関連転写因子の配列情報を得ることを目的として、塩化銅処理区と無処理区の不定根培養由来の cDNA について次世代シーケンサー(イルミナ社 HiSeq1000)による 100 bp paired-end (PE) reads (RNA-Seq) を行った。9,000 個の大腸菌クローンライブラリーの EST 配列と HiSeq1000 より得られた EST 配列の全配列を CLC Genomics Workbench ソフトでアセンブル解析を行った。得られた contig 配列を GO (Gene Ontology) 解析と Blast 検索により遺伝子の機能アノテーション作業を行った。

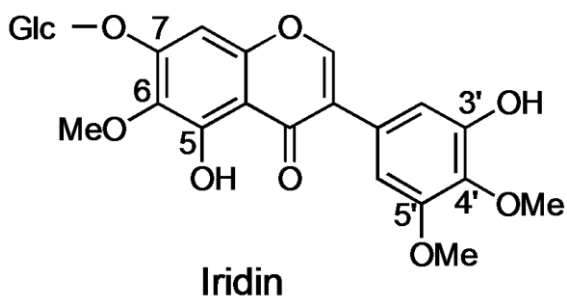


図 2 ジャーマンアイリス不定根のイソフラボン(Iridin)

(2) DNA マイクロアレイ設計

上記で得られた処理・無処理区それぞれのジャーマンアイリス由来の RNA-Seq データから得られた contig 配列を用いて、Agilent 社のフリーソフト eArray7 (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) を用いて 60mer のプローブセットを設計し、8×60K カスタムオリゴマイクロアレイを製作した(1スライド当たり 8アレイを搭載)。上記で得られた遺伝子の機能アノテーションを基に、転写因子及びフェニルプロパノイド、イソフラボノイド生合成の関連酵素遺伝子を網羅できるよう優先的に選抜し、最終的に 1アレイ当たりで 61,656 種類のプローブを掲載した DNA アレイを構築した。

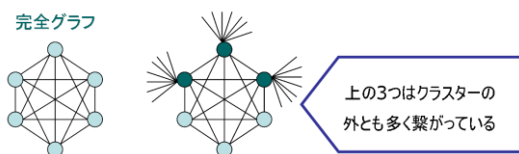
(3) マイクロアレイ実験

ジャーマンアイリス不定根は固体培地から液体培地に移植するとイソフラボノイド生合成が活性化し、イソフラボノイド配糖体(図 2, iridin)を蓄積する事が知られている。イソフラボノイド生合成に関与する転写因子を単離する目的で、移植後の時系列培養細胞 (0 日、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、14 日、21 日、28 日) から、それぞれ全 RNA を調整した。上述で構築した DNA マイクロアレイを用いて、3 反復によるジャーマンアイリスの培養細胞で時系列遺伝子共発現解析を実施した。

(4) 金平糖アルゴリズムによるネットワーク解析(金平糖解析)のソフト開発

金平糖解析とは、相関係数を用いたネットワーク解析の一つで、ネットワークのトポロジーに注目して、クラスターの外側と内側の関係の特徴づけた独自のネットワーク解析である(図 3)。ネットワークの密度と特異率を自動計算して、関連性のある遺伝子群のモジュールを抽出することが可能である(図 3)。

• どれだけ線が繋がっているか (ネットワーク密度)



• どれだけ特異的なノードか (ネットワーク特異率)

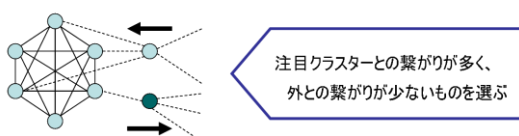


図 3 金平糖解析の概略(ネットワーク指標の導入)

現在、金平糖ネットワーク解析は、各機能が JAVA プログラムによって実行可能であるが、コマンド入力が必要としないユーザーフレンドリーなソフト JAVA-GUI に改良する。

(5) 金平糖 JAVA-GUI ソフトの検証

開発した金平糖 JAVA-GUI ソフトの動作検証を行うために、シロイヌナズナ由来の公開 DNA マイクロアレイ解析データセット「遺伝子数(行):22746 X サンプル数(列):9442」を用いて、金平糖ネットワーク解析を実行した。

(6) イソフラボノイド生合成遺伝子群のモジュール候補選抜

上記のジャーマンアイリス由来の DNA マイクロアレイ解析データセットを用いて、金平糖ネットワーク解析を実行した。現在、転写因子を中心として、イソフラボノイド生合成酵素遺伝子で形成されると予想されるモジュール解析を行っている。

4. 研究成果

(1) ジャーマンアイリス(*Iris germanica*) 由来の RNA-Seq 解析データ

本研究では、9,000 個の大腸菌クローンライブラリーの EST 配列と Hiseq1000 より得られた contig 配列の全配列 (表 1) を CLC Genomics Workbench ソフトでアセンブル解析を行い、データを下記の表にまとめた (表 1)。また、構築された contig の統計情報を表 2 に示した。

表 1. ジャーマンアイリス由来の RNA-Seq データ

	ジャーマンアイリス 不定根
Reads	557, 761, 458
Bases	54, 755, 658, 904
Contig	237, 259
Singleton	2, 439
Unigene	2, 39, 698

表 2. 9,000 個の EST データと次世代 RNA-Seq データから得られた contig の統計情報

	ジャーマンアイリス 不定根
N75	357
N50	655
N25	1, 372
Minimum	131
Maximum	14, 327
Average	544

Count	252, 144
Total	137, 120, 564

(2) ジャーマンアイリス由来の RNA-Seq データの Gene Ontology (GO) 解析

TAIR10 のペプチドデータに対する GO 解析をジャーマンアイリス不定根の未重複配列で行った。ジャーマンアイリス contig が最も多い GO term は、other metabolic processes で全体の約 9.6%であった。続いて other cellular processes (9.4%)、protein binding (4.6%) となっていた。図 4 にはジャーマンアイリスの biological process、cellular component、molecular function 全ての階層を含めた contig の分布 (%) を示した。

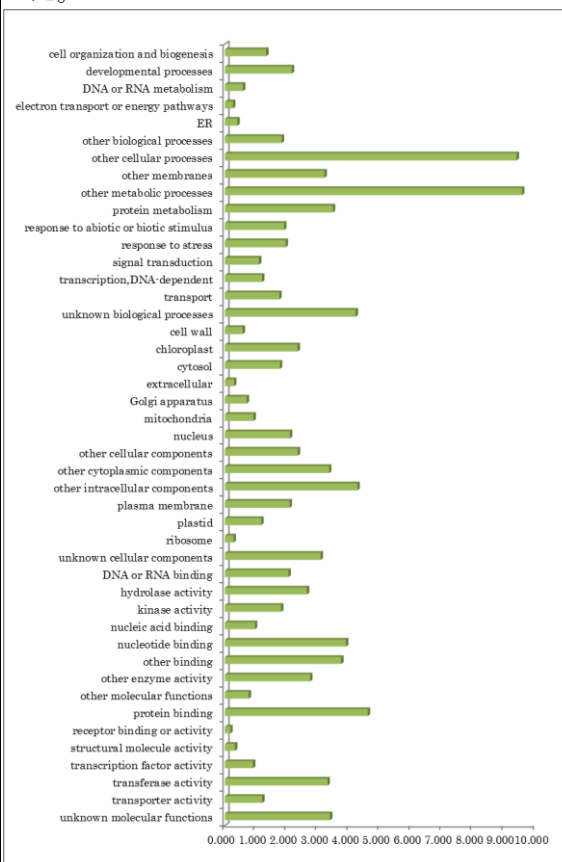


図 4 ジャーマンアイリス不定根 GO 解析: TAIR10

(3) 金平糖アルゴリズムによるネットワーク解析(金平糖解析)のソフト開発

本研究期間では、イソフラボノイド生合成酵素遺伝子の単離と機能解析には成功していないが、今後の共発現遺伝子ネットワーク解析の強力な解析ツールと成り得る金平糖 JAVA-GUI ソフトの開発に成功した (図 5)。

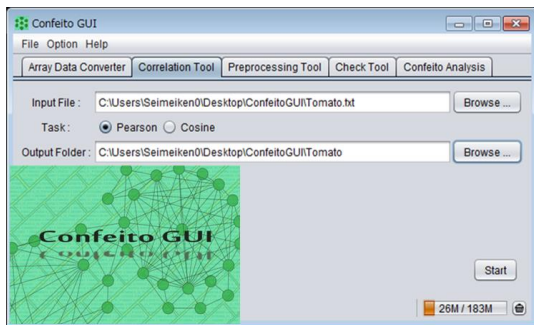


図 5 金平糖ネットワーク解析ソフト (JAVA-GUI)

(4) 金平糖 JAVA-GUI ソフトの検証

シロイヌナズナ由来の公開 DNA マイクロアレイ解析データセット「遺伝子数(行): 22746 X サンプル数(列): 9442」を用いて、金平糖ネットワーク解析を実行した。その結果、シロイヌナズナ由来のグルコシノレート生合成の転写因子 (MYB28, 29) の機能解析を行った論文結果の図と同等な遺伝子ネットワークモジュールが抽出された(図 6)。

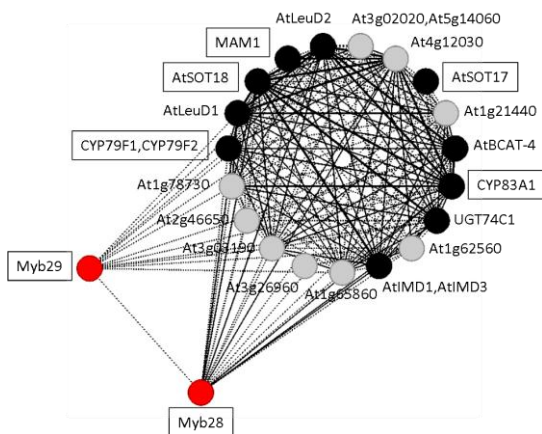


図 6 金平糖 JAVA-GUI ソフトによって得られたシロイヌナズナ由来のグルコシノレート生合成の転写因子 (MYB28, 29) に関するネットワークモジュール

以上、本研究では、有用二次代謝生産植物の物質生産に関与する転写因子候補を効率的に見つけ出す有用な解析ソフトの開発に成功した。今後、RNA-Seq 解析データにも適用可能なように、ソフトの更なる改良を行っている。

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 3 件)

- (1) Shiro Suzuki, Hideyuki Suzuki, Recent advances in forest tree biotechnology, *Plant Biotechnology* **31**, 1–9 (2014)

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.1203b

- (2) Yoko Iijima, Bunta Watanabe, Ryosuke Sasaki, Makiko Takenaka, Hiroshi Ono, Nozomu Sakurai, Naoyuki Umemoto, Hideyuki Suzuki, Daisuke Shibata, Koh Aoki, Steroidal glycoalkaloid profiling and structures of glycoalkaloids in wild tomato fruit, *Phytochemistry*, **95**, 145–157 (2013)

DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.07.016

- (3) Eiji Takita, Katsunori Kohda, Hajime Tomatsu, Shigeru Hanano, Kanami Moriya, Tsutomu Hosouchi, Nozomu Sakurai, Hideyuki Suzuki, Atsuhiko Shinmyo, Daisuke Shibata, Precise Sequential DNA Ligation on A Solid Substrate: Solid-Based Rapid Sequential Ligation of Multiple DNA Molecules, *DNA Res*, **20** (6) : 583-592 (2013)

doi: 10.1093/dnares/dst032

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 尾形善之、細内敦、渡邊弘法、青木俊夫、柴田大輔、明石智義、鈴木秀幸 アイリスマイクロアレイのデザインとジャーマンアイリス培養細胞での時系列発現解析、第 31 回植物細胞分子生物学会、平成 25 年 9 月 11 日、北海道大学、札幌

- (2) 鈴木秀幸、永島良樹、玉山方子、解良康太、秋元奈弓、荒武、櫻井望、柴田大輔、千葉洋、尾形善之 ネットワーク解析機能を備えた MS/MS データ解析ツール (MSMS_search) の開発、第 31 回植物細胞分子生物学会、平成 25 年 9 月 10 日、北海道大学、札幌

- (3) 藤野尚人、杉山圭吾、名川賢治、山崎達也、吉田 佐央理、本橋令子、田中良和、鈴木秀幸、高橋征司、中山亨 アイリスマイクロアレイのデザインとジャーマンアイリス培養細胞での時系列発現解析、第 31 回植物細胞分子生物学会、平成 25 年 9 月 10 日、北海道大学、札幌

- (4) 古謝詠喜、丸山佳紀、鈴木秀幸、田口悟朗、ソバのルチン生合成に関わるラムノシルトランスフェラーゼの単離と機能解析、第 31 回植物細胞分子生物学会、平成 25 年 9 月 10 日、北海道大学、札幌

- (5) 飯島陽子、鈴木秀幸、柴田大輔、青木考 トマト果実の成熟に依存する配糖化酵素の機能解析、第 31 回植物細胞分子生物学会、平成 25 年 9 月 10 日、北海道大学、札幌

(6) 渡邊弘法、清水好美、岩崎真悟、米山恵介、遠藤有紗、柴田大輔、鈴木秀幸、青木俊夫、明石智義 特有フラボノイドを蓄積するアヤメ科属植物の EST 解析、第 30 回植物細胞分子生物学会、平成 24 年 8 月 5 日、奈良先端科学技術大学院大学、奈良

(7) Kota Kera, Norimoto Shimada, Tomoyoshi Akashi, Toshio Aoki, Tina Kanamori, Daisaku Ohta, Koh Aoki, Daisuke Shibata, Hideyuki Suzuki, Metabolomics-oriented molecular cloning and functional characterization of flavonoid 8-hydroxylase from Lotus japonicas, International Conference of Natural Products Biosynthesis (ICNPB), 2012 June 19th, Awaji Yumebutai, Awaji, Japan

(8) 嶋田典基、明石智義、青木俊夫、金森千奈、太田大策、青木考、柴田大輔、鈴木秀幸 ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析、第 29 回植物細胞分子生物学会、平成 23 年 9 月 8 日、九州大学箱崎キャンパス、福岡

(9) 鈴木秀幸 ウリ科植物の苦味配糖体サポニン生合成系酵素遺伝子群の機能解析、新学術領域「生合成マシナリー」第 2 回公開シンポジウム、平成 23 年 6 月 4 日、東京大学薬学部、東京

(10) 鈴木秀幸 ネットワーク解析を用いた(植物)生合成研究、新学術領域「生合成マシナリー」第 2 回若手シンポジウム、平成 23 年 7 月 2 日、理化学研究所、埼玉

〔図書〕(計 1 件)

1. Suzuki H, Takita E, Ohyama K, Sawai S, Seki H, Sakurai N, Muranaka T, Ishimoto M, Sudo H, Saito K, Shibata D Multi-Gene Transformation for Pathway Engineering of Secondary Metabolites. The Handbook of Plant Metabolomics. Metabolite Profiling and Networking, W Weckwerth, Kahl G eds, Chapter No12 227-244, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
研究代表者
鈴木 秀幸 (SUZUKI HIDEYUKI)
公益財団法人かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部・主席研究員
研究者番号：80276162

(3) 連携研究者
尾形 善之 (OGATA YOSHIYUKI)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：90446542

(3) 連携研究者
明石 智義 (AKASHITOMOYOSHI)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：80328707