

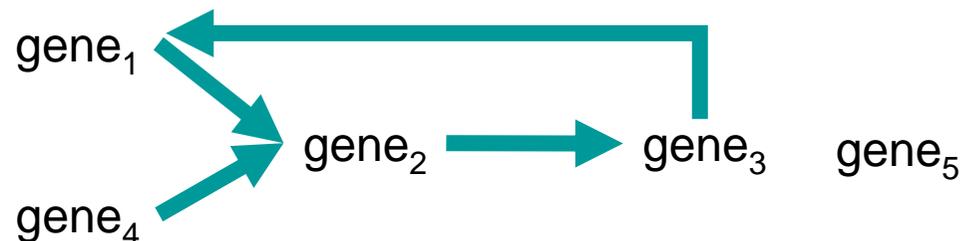
# ネットワーク解析(1/8)

## -ネットワーク解析の必要性-

遺伝子同士の相互関係、制御関係はわかるだろうか？

	1min.	5min.	10min.	20min.	30min.
gene <sub>1</sub>	<b>0.03</b>	0.65	1.05	1.01	<b>3.07</b>
gene <sub>2</sub>	0.89	<b>2.00</b>	<b>4.08</b>	0.89	1.06
gene <sub>3</sub>	1.00	1.01	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>	1.33
gene <sub>4</sub>	<b>2.00</b>	1.02	0.88	0.98	0.80
gene <sub>5</sub>	1.02	0.99	0.76	1.20	1.03
...	...	...	...	...	...
gene <sub>n</sub>	...	...	...	...	...

regulatory networkとして...



# ネットワーク解析(2/8)

## -ネットワーク解析とは？-

---

## ネットワーク解析とは？

マイクロアレイから得られた発現プロファイルデータを統合的に解析することで、細胞内における**遺伝子間相互作用の解明を目的とした研究**

## ネットワーク解析のアルゴリズム

- Boolean Model (Akutsu et al. 1999)
- Bayesian Model (Friedman et al. 2000)
- 微分方程式 (Chen et al. 2000)
- Graphical Gaussian Model (Toh & Horimoto 2002)

## ネットワーク解析の目的

遺伝子制御ネットワークの解明

ゲノム創薬への応用

# ネットワーク解析(3/8)

## -Boolean Model (多階層有向グラフ)-

Gene Expression Matrix

Gene	G1	G2	G3	G4
Wild type	1	1	1	1
G4 deletion	1	1	2.5	-
G3 deletion	1	1	-	0.2
G2 deletion	1	-	0.4	3.0
G1 deletion	-	0.1	0.1	0.3

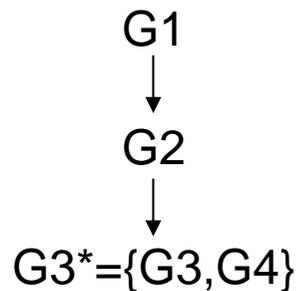
Binomial relationship

G4 affects G3  
 G3 affects G4  
 G2 affects G3  
 G2 affects G4  
 G1 affects G2  
 G1 affects G3  
 G1 affects G4

Adjacency Matrix

	G1	G2	G3	G4
G1	0	1	1	1
G2	0	0	1	1
G3	0	0	0	1
G4	0	0	1	0

Multi-level digraph



Skeleton Matrix

	G1	G2	G3*
G1	0	1	0
G2	0	0	1
G3*	0	0	0

G3\*={G3,G4}

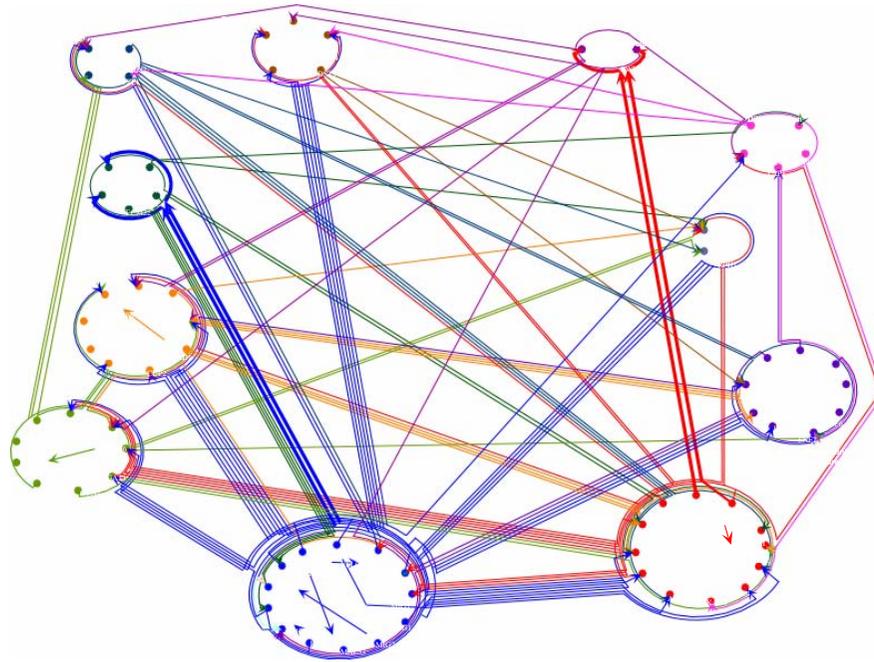
Partition genes into equivalence sets

	G1	G2	G3*
G1	0	1	1
G2	0	0	1
G3*	0	0	0

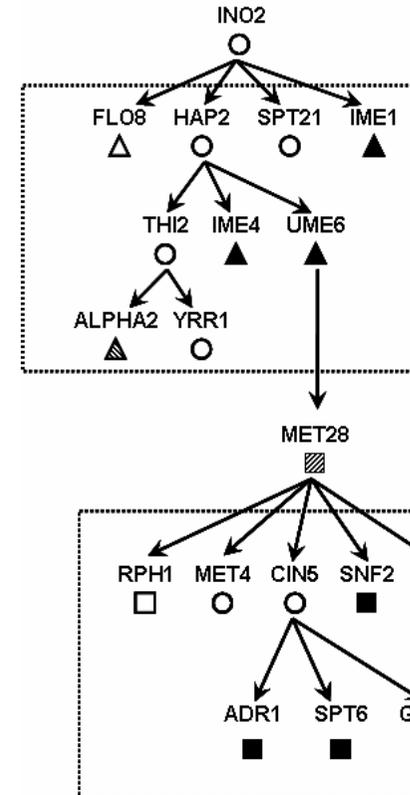
G3\*={G3,G4}

# ネットワーク解析(4/8)

## -Boolean Model 解析例-



Boolean Modelによる転写因子の相互作用ネットワーク



### Cell division

- △ 分化
- ▲ 減数分裂 / 有糸分裂
- ▲ 接合反応

### DNA replication

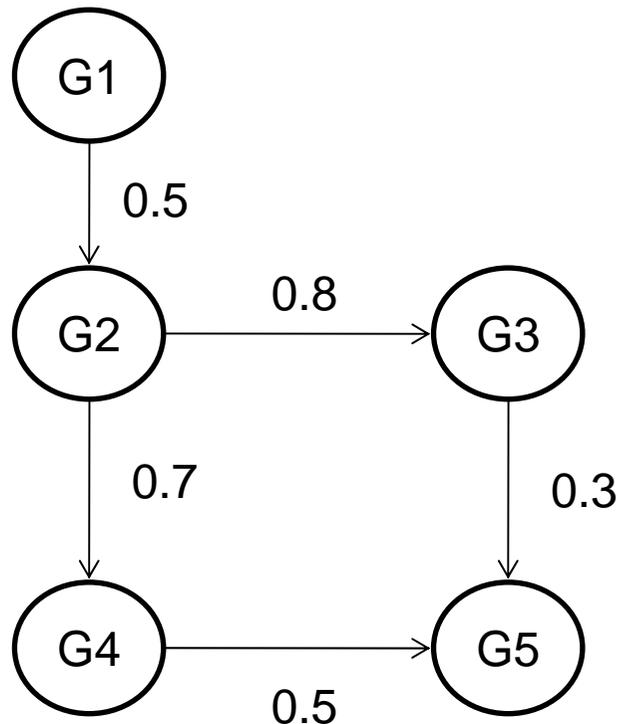
- DNA 修復
- クロマチン / 染色体構造
- ▨ 染色体分離

細胞分裂からDNA複製への転写因子ネットワーク

# ネットワーク解析(5/8)

## - Bayesian Model -

- 各遺伝子が他の遺伝子から受ける影響を条件付き確率で表したグラフ



- ある遺伝子が“1”になったとき、その遺伝子の影響を受ける他の遺伝子が“1”になる確率
  - 非循環グラフ
  - 初期状態を決め、次のステップの各遺伝子の発現確率を求める
- 適用例が最も多い  
× 計算時間がかかる

# ネットワーク解析(6/8)

## -graphical Gaussian model-

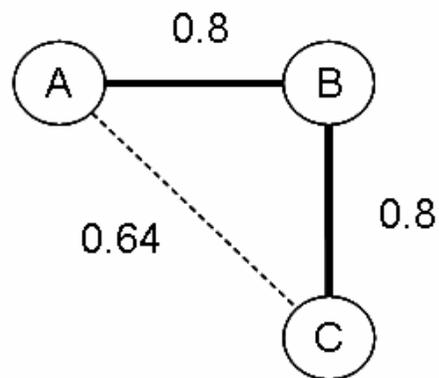
### 相関係数行列

A	1.00		
B	0.80	1.00	
C	0.80	0.64	1.00

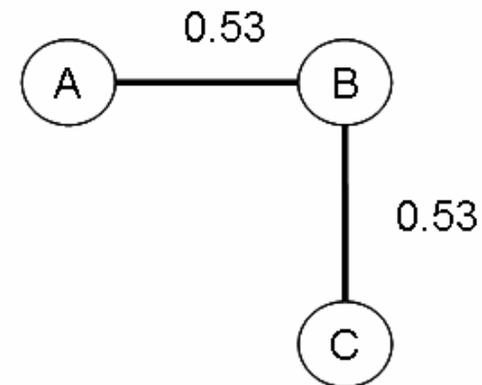
### 偏相関係数行列

A	1.00		
B	0.53	1.00	
C	0.00	0.53	1.00

相関係数から推測された関連性



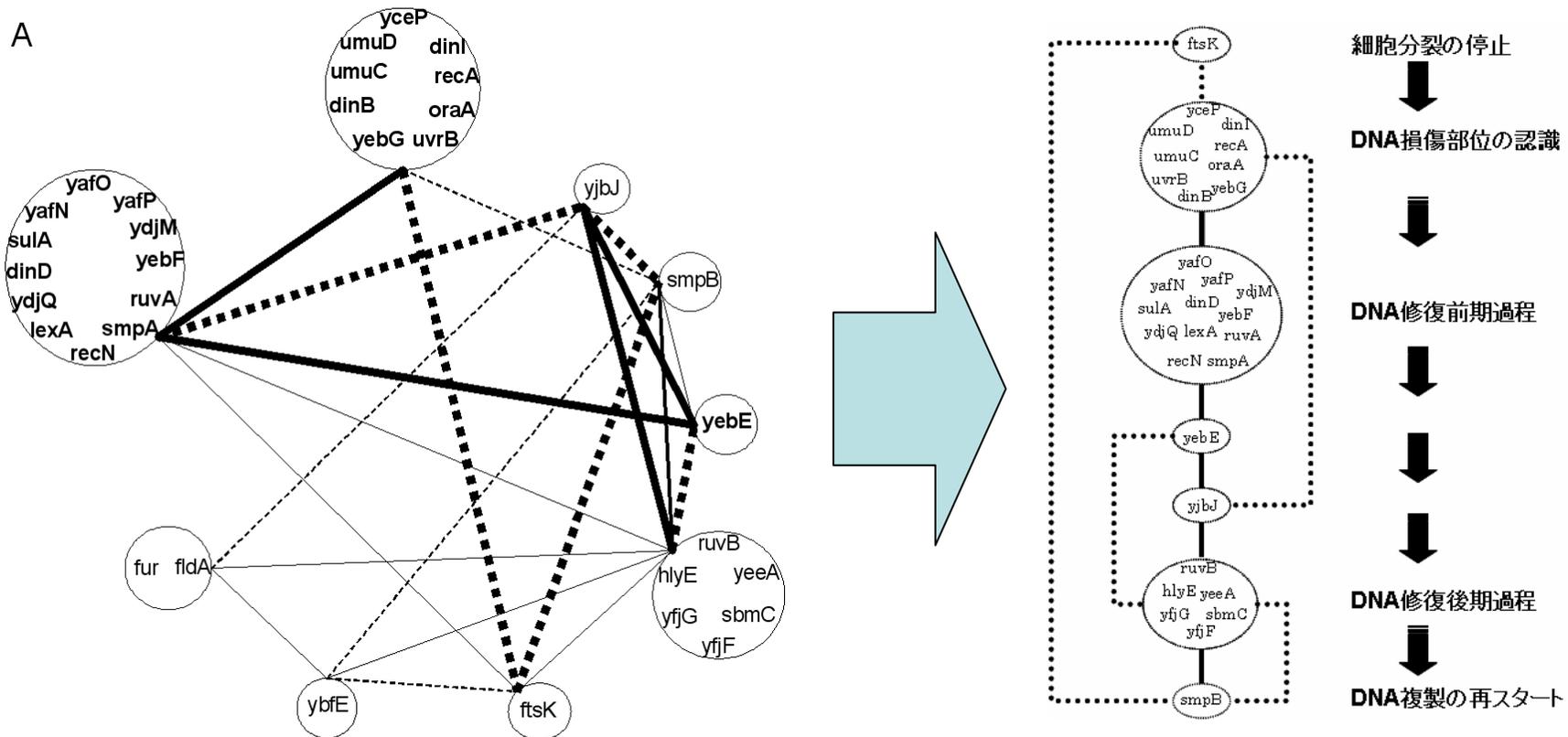
偏相関係数から推測された関連性



# ネットワーク解析(7/8)

## -graphical Gaussian model 解析例-

### E.coliのSOS応答遺伝子群の制御ネットワーク

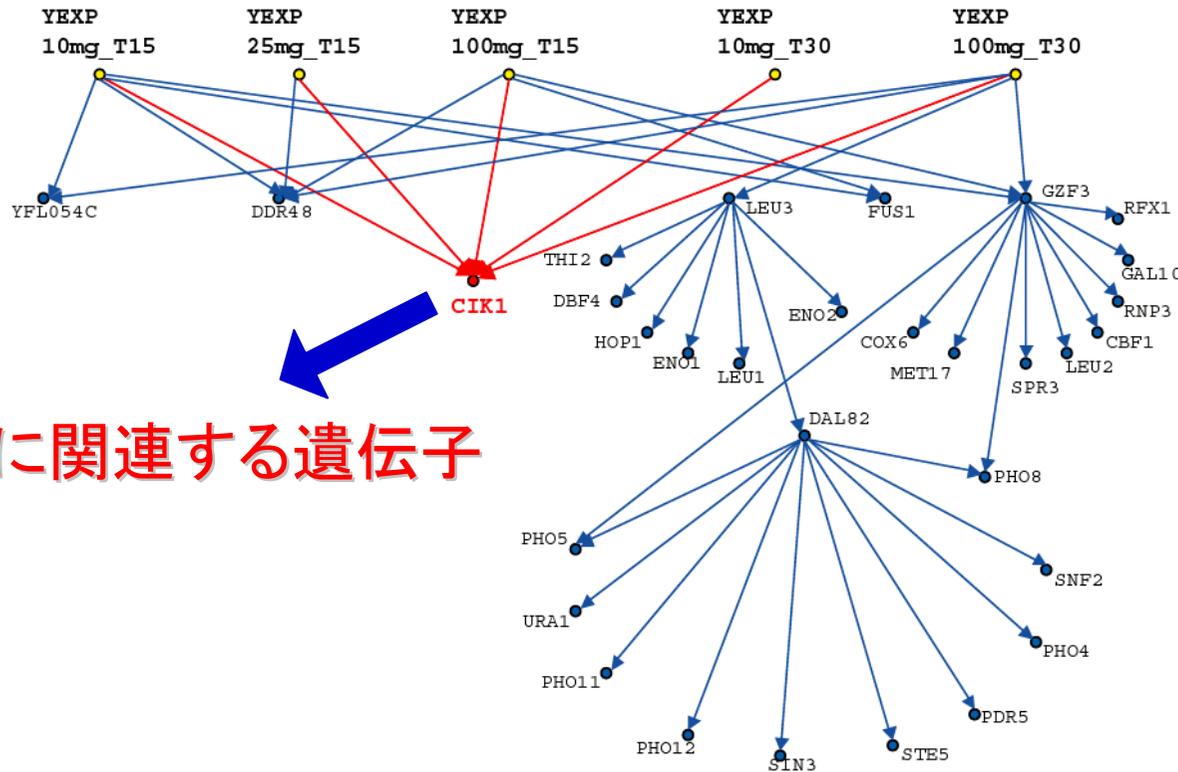


# ネットワーク解析(8/8)

## -薬剤ターゲット遺伝子の同定-

既存の市販抗真菌剤 Griseofulvin  
 フェノタイプ⇒有糸分裂時の紡錘体並びに染色体構造に阻害

Fig.2b



紡錘体形成に関連する遺伝子

# プロテオーム

---

- プロテオーム解析とは？
- 発現プロテオーム
  - 発現プロテオームとは？
  - 発現プロテオームの実験的手法
  - 発現プロテオームのインフォマティクス
- 相互作用プロテオーム
  - 相互作用プロテオームとは？
  - 相互作用プロテオームの実験的手法
  - タンパク質相互作用のインフォマティクス

# プロテオーム解析とは？(1/3)

## -プロテオームの基本-

---

- 定義** 生物のゲノムの産物の総和、すなわち個体あるいは一つの細胞で**発現しているタンパク質全ての動態**を要素とする集合
- 由来** タンパク質を意味する**Protein**と**Genome**を組み合わせで作られた造語。
- 目的** 従来のように1つ、あるいは少数のタンパク質に限らず…**タンパク質群が**生物活性を発現する様子を**系統的、網羅的に解析**することを目的としている。

# プロテオーム解析とは？(2/3)

## -代表的プロテオーム解析-

---

### 1. タンパク質の同定

質量分析法

### 2. タンパク質のプロファイリング (発現プロテオーム)

二次元電気泳動法

### 3. タンパク質の相互作用解析 (機能プロテオーム)

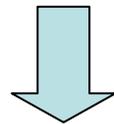
酵母2ハイブリッド法 (Y2H)

PD-MS法

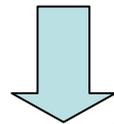
# プロテオーム解析とは？ (3/3)

## -プロテオーム解析のフローチャート-

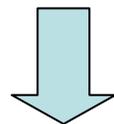
### タンパク質の分離精製



遺伝子の同定 ← ゲノム情報



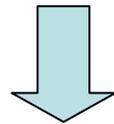
相同性検索 → タンパク質の特性・動態



### タンパク質の機能解明



翻訳後修飾	代謝速度	会合
立体構造	発現量	阻害作用
相互作用	発現時期	酵素活性
アミノ酸組成	局在性	生理作用



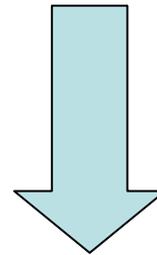
### データベース化

# 質量分析法 (1/6)

## -質量分析法とは？-

---

タンパク質の質量(分子量)を測定する技術



## 質量分析装置

タンパク質や、タンパク質をプロテアーゼ処理して得られるペプチドの質量を正確に測定する装置

ペプチドを質量分析計内部で断片化し、断片の質量解析から構造情報(アミノ酸配列やアミノ酸組成など)を得ることができる装置

# 質量分析法 (2/6)

## -質量分析装置(MS)の構成-

---

### イオン源

試料をイオン化し、生成イオンを質量分析計  
の方向へ加速

### 質量分析計

イオンを $m/z$ (質量/電荷)に従い分離

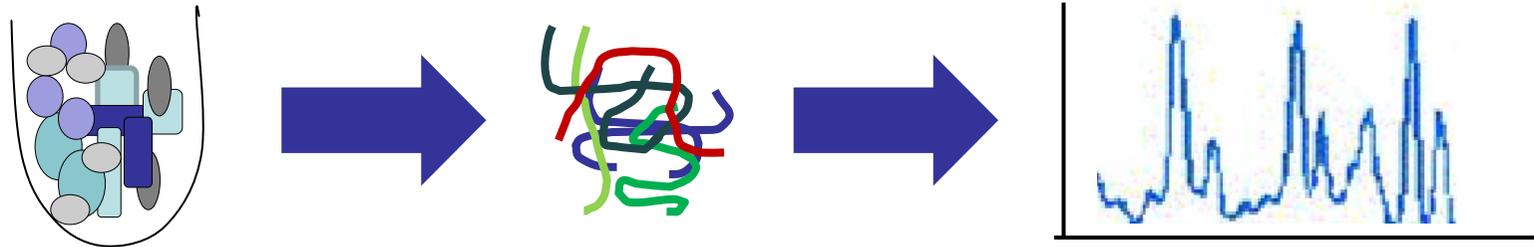
### イオン検出器

分離されたイオンを検出

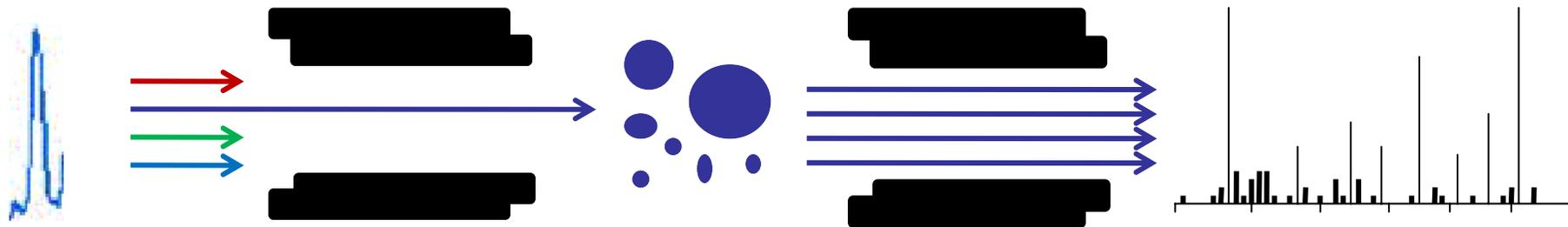
# 質量分析法 (3/6)

## -質量分析装置 (MS)のストラテジー-

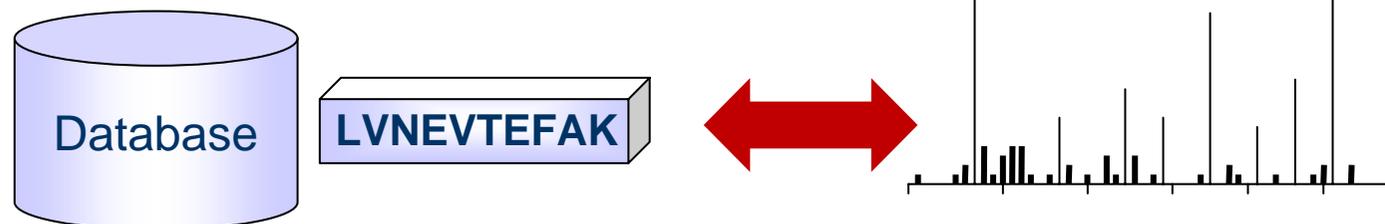
### ペプチドの単離



### 質量分析による配列決定



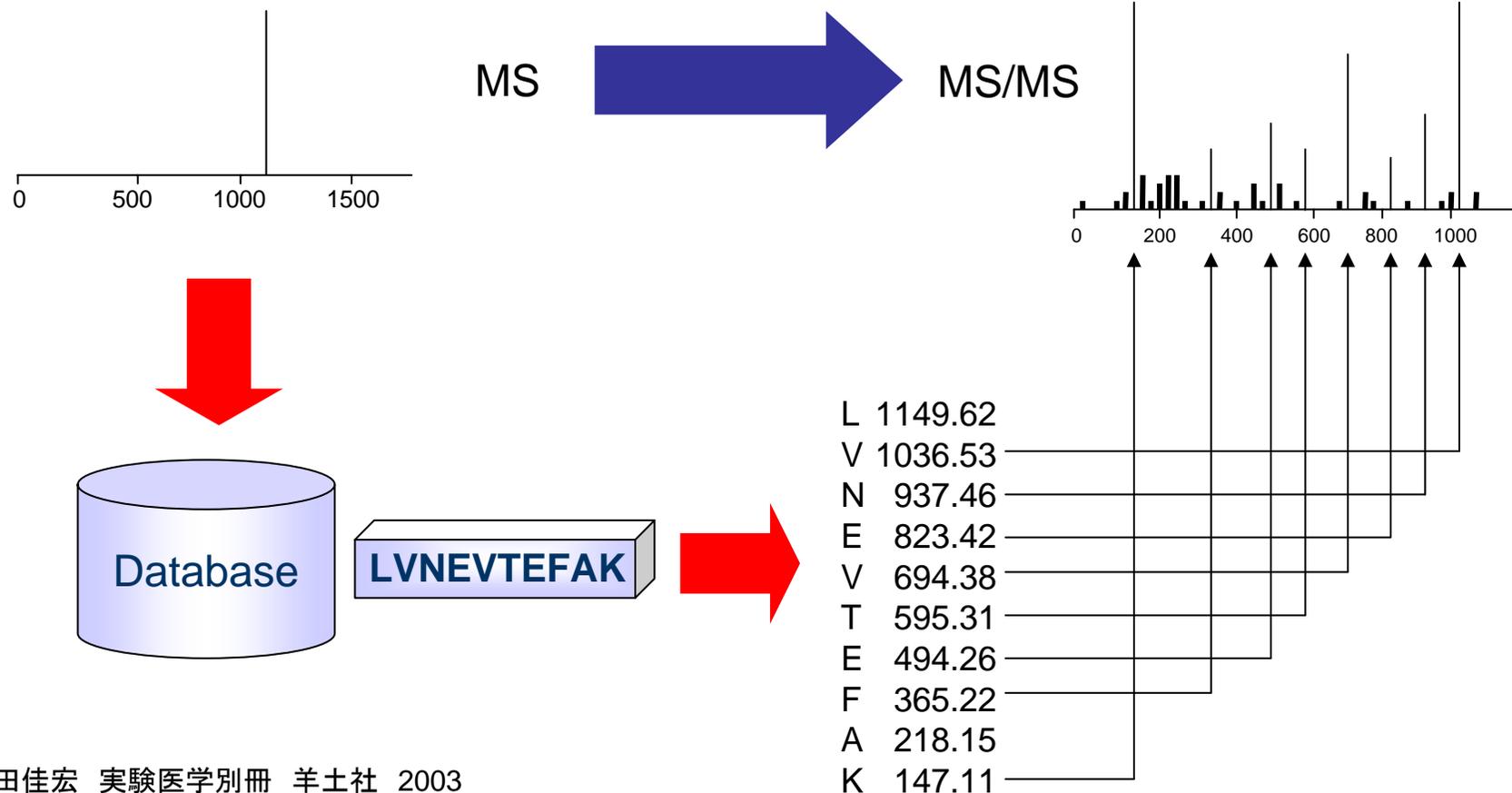
### データベースとの照合 (質量タグ法)



# 質量分析法 (4/6)

## -質量タグ法-

タンパク質の酵素消化断片の質量値と、MS/MSによる部分的な内部配列情報を用いてデータベース検索を行いタンパク質を同定する方法  
 $m/z = 1149.62$



## 質量分析法 (5/6)

-質量分析装置(MS)を用いたプロテオーム解析-

---

二次元電気泳動、染色、画像解析



スポットの切り出し、プロテアーゼ処理、ペプチドの抽出



MALDI-TOF MS、ナノLC-MS/MS



プロファイリング、タンパク質同定

# 質量分析法(6/6)

## -プロテオーム解析におけるMSの役割-

---

### タンパク質の同定

ペプチドマスフィンガープリンティング  
MS/MSによる配列分析  
ショットガン分析

### タンパク質の定量

同位体標識法

### タンパク質の翻訳後修飾の解析

### タンパク質・タンパク質相互作用の解析

BIA-MS

表面プラズモン共鳴測定

# 網羅的プロテオーム解析

## -発現プロテオームと相互作用プロテオーム-

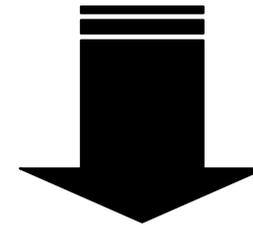
### 発現プロテオーム

生体細胞内において、発現しているタンパク質の網羅的解析



### 相互作用プロテオーム

プロテオームレベルでのタンパク質間の相互作用の解析



システムとしての生命現象の解明

疾患関連タンパク質、パスウェイ発見による  
発病の機構解明・薬物の作用機構の解明

# 発現プロテオーム(1/6)

## -実験的手法-

---

## 発現プロテオームの実験的手法

二次元電気泳動

質量分析

同位体標識法

分子スキャナー

アフィニティークロマトグラフィー

# 発現プロテオーム(2/6)

## -発現プロテオームとは?-

---

- 網羅的解析

- 細胞内のタンパク質を網羅的に解析し、全てのタンパク質の機能を解明しようとする研究

- ディファレンシャルディスプレイ

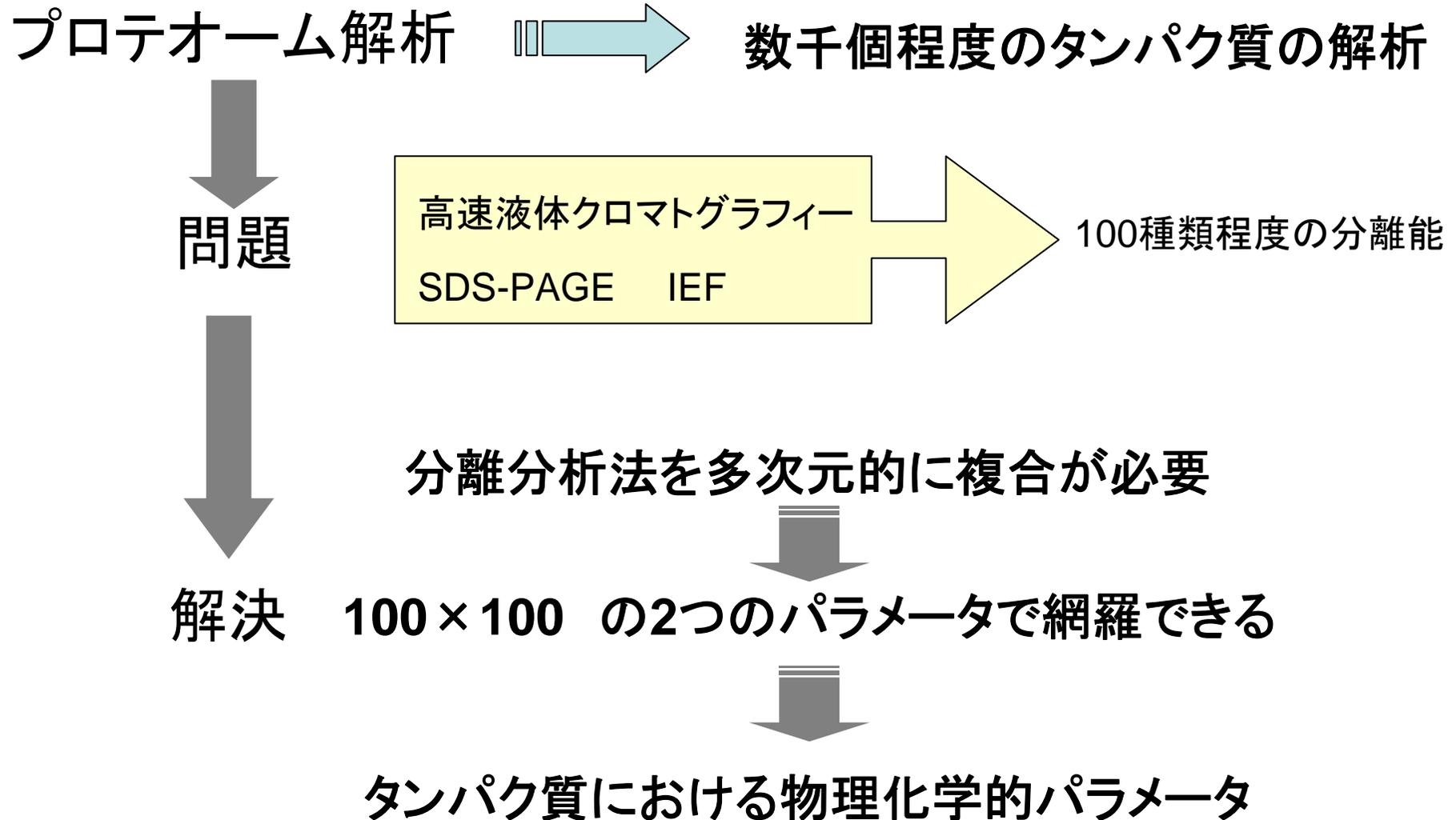
- 病気・薬物・ストレス・成長・分化などで特異的に変動するタンパク質を解析する研究

⇒ 生体細胞内で発現しているタンパク質の同定

⇒ 発現しているタンパク質の機能の解明

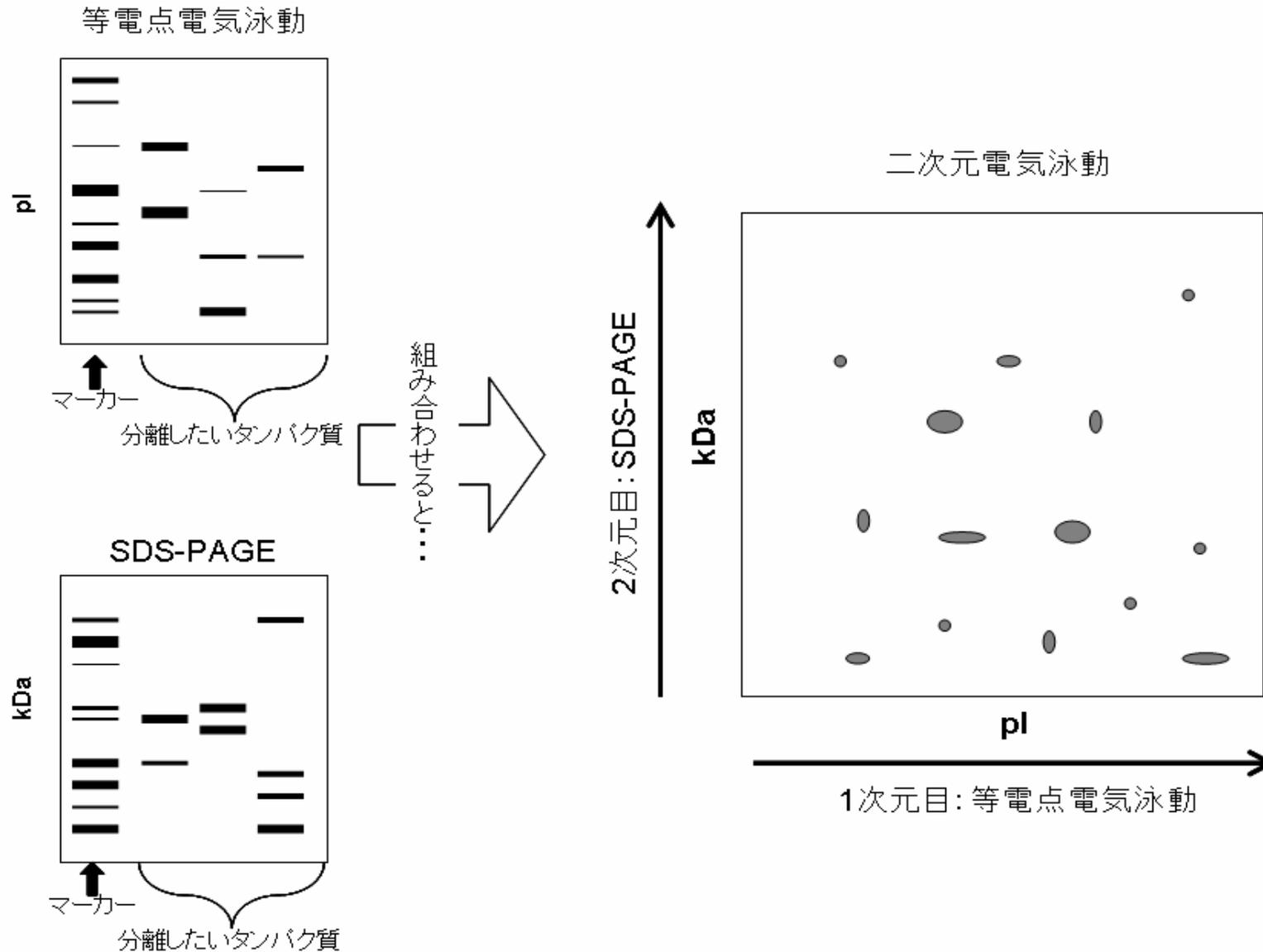
# 発現プロテオーム(3/6)

## -二次元電気泳動とは?-



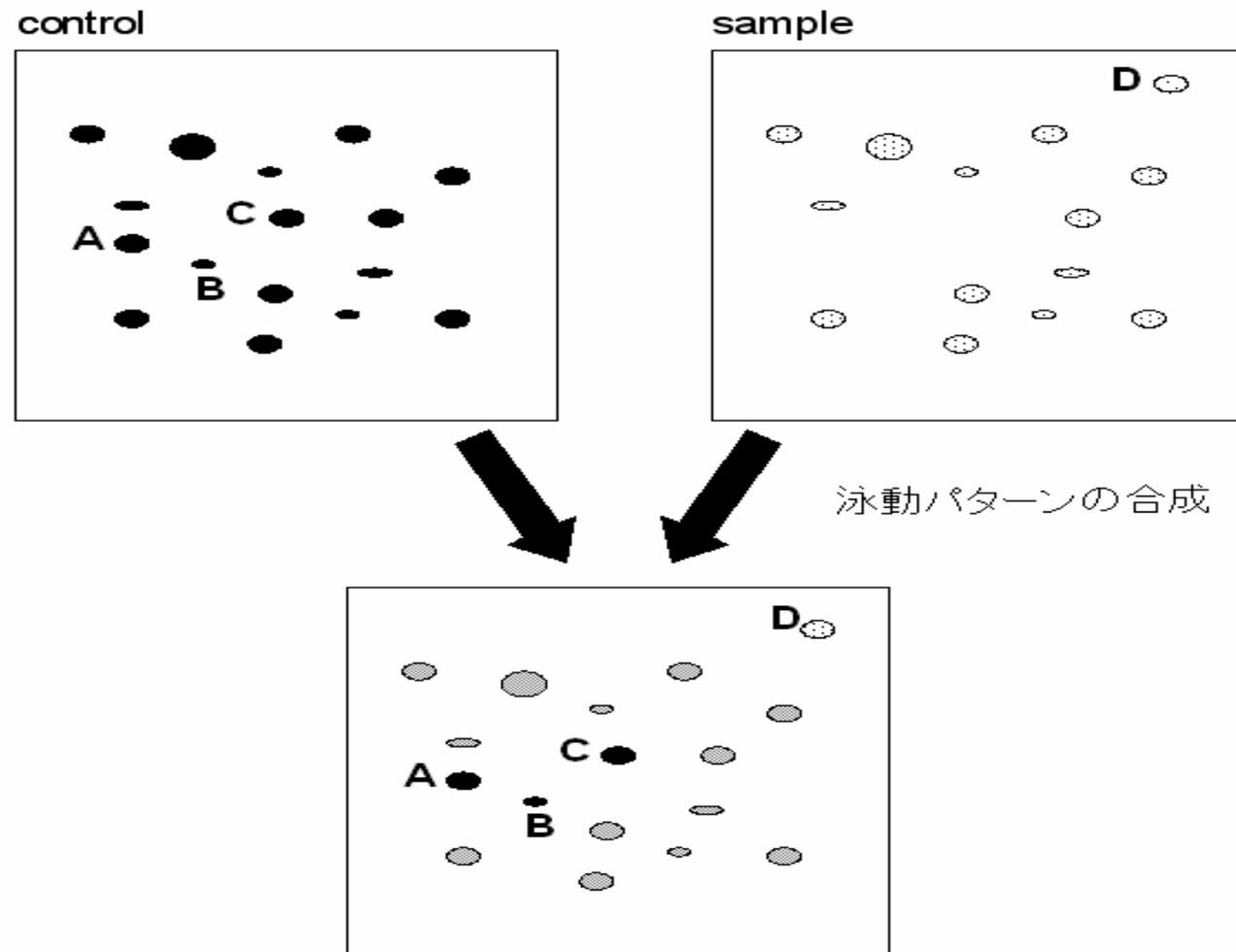
# 発現プロテオーム(4/6)

## -二次元電気泳動法-



# 発現プロテオーム(5/6)

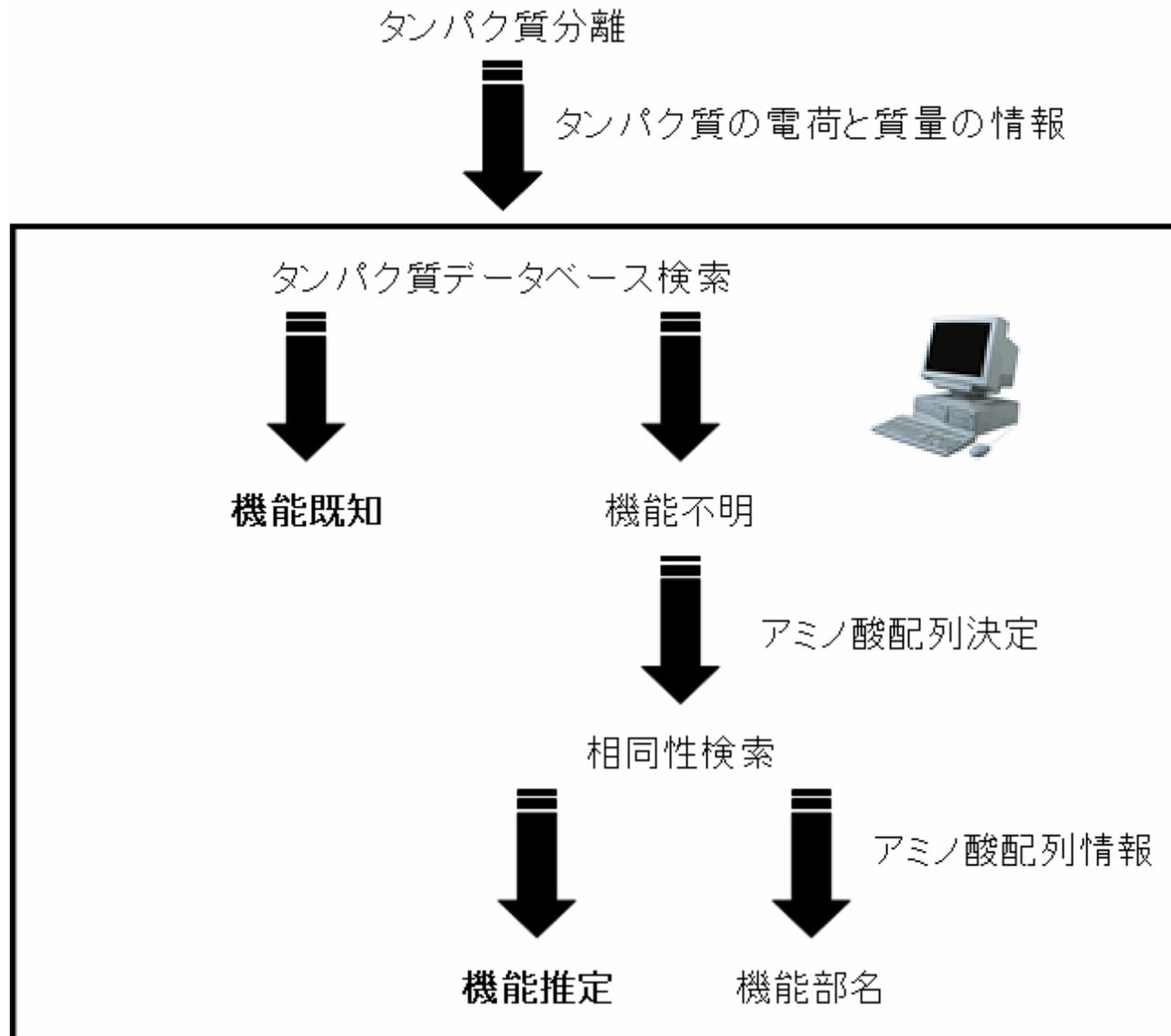
## -ディファレンシャルディスプレイ-



A,B,C: **sample**で特異的に消失するタンパク質  
 D: **sample**で特異的に発現するタンパク質

# 発現プロテオーム(6/6)

## -発現プロテオームにおけるインフォマティクス-

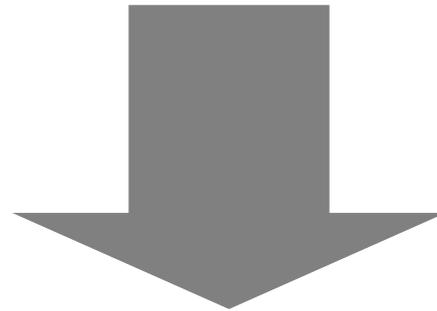


# 相互作用プロテオーム(1/12)

## -相互作用プロテオームとは?-

---

高次の生命現象は  
タンパク質間のネットワークに担われている



タンパク質間相互作用の網羅的解析が必要

# 相互作用プロテオーム(2/12)

## -相互作用プロテオーム研究-

---

## 相互作用プロテオームの実験的手法

PD-MS法 (プルダウンー質量分析法)・TAP法  
Y2H (酵母2ハイブリッド法)

## タンパク質の相互作用の情報解析

ドッキングシミュレーション:  
相互作用の分子機構に関する解析・予測

タンパク質間相互作用のインフォマティクス:  
ゲノム情報を利用したタンパク質間の相互作用の予測

# 相互作用プロテオーム(3/12)

## -質量分析によるタンパク質複合体解析法-

---

プルダウンー質量分析法  
(PD-MS法)

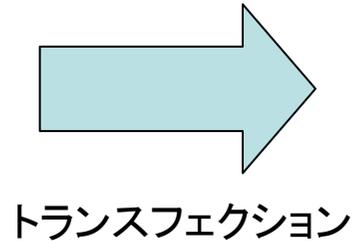
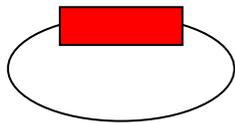
TAP法

# 相互作用プロテオーム(4/12)

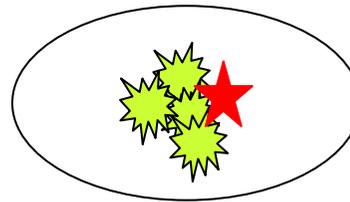
## -PD-MS法-

### 発現プラスミド

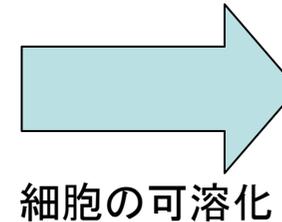
bait タンパク



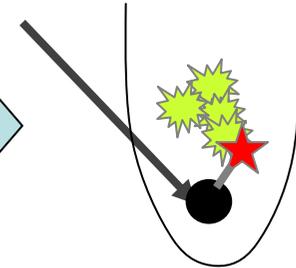
### 細胞



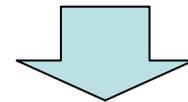
アフィニティービーズ



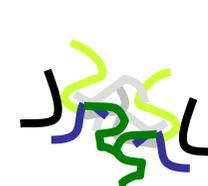
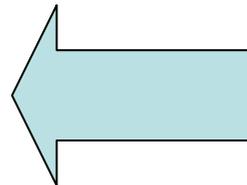
### プルダウン



複合体の分離



質量分析による、  
アミノ酸配列の決定



プロテアーゼによる  
限定分解

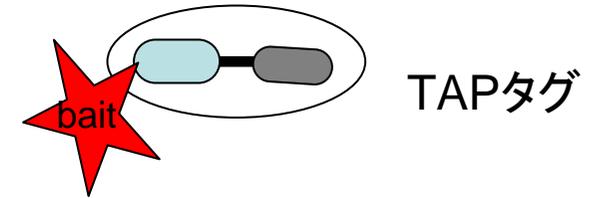


**複合タンパク質の同定**  
**タンパク質間相互作用の解明**

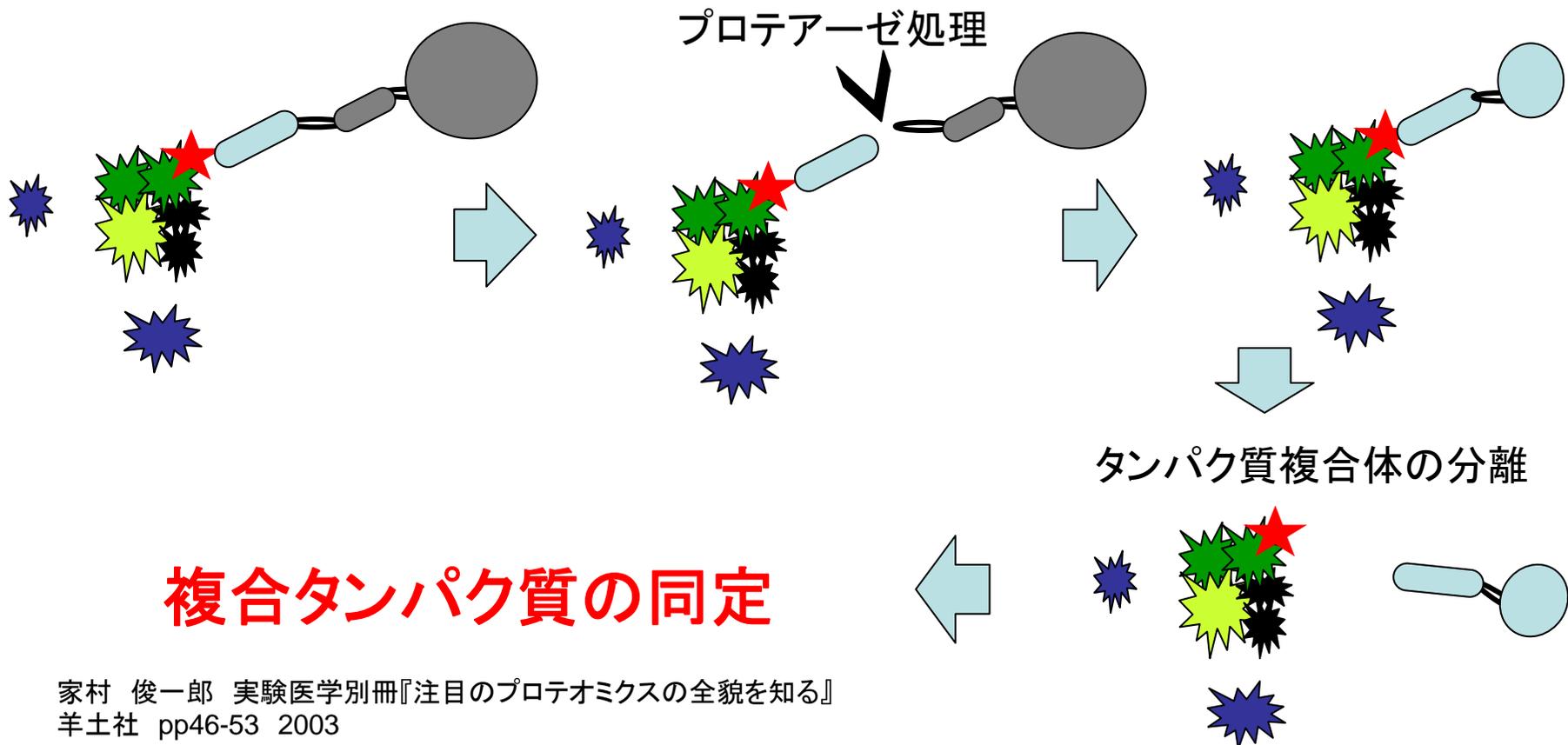
# 相互作用プロテオーム(5/12)

## -TAP法-

原理の異なる2種類のPDにより、非特異的吸着を極力排し、質の高いデータを獲得



TAPタグ

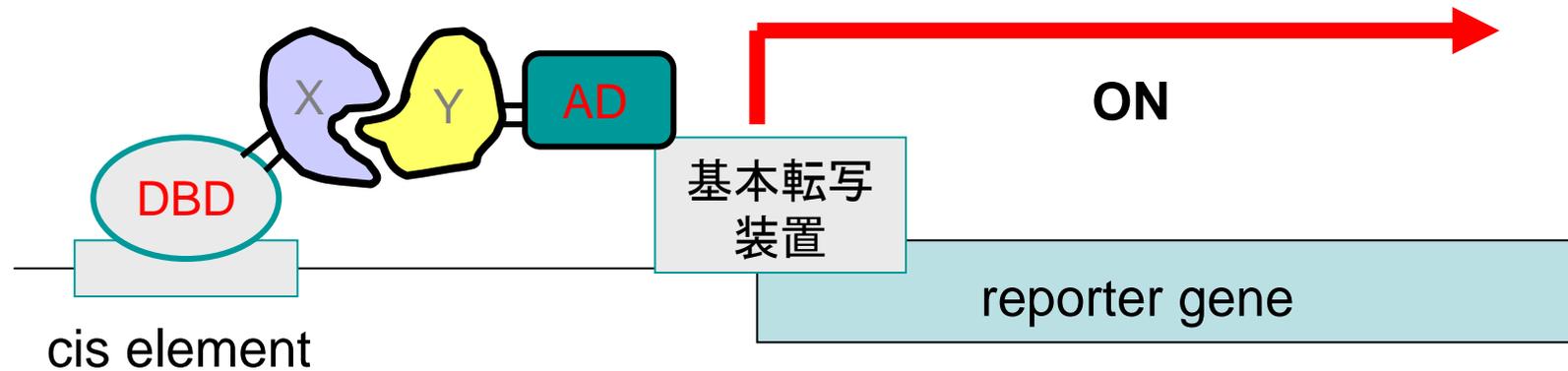


# 相互作用プロテオーム(6/12)

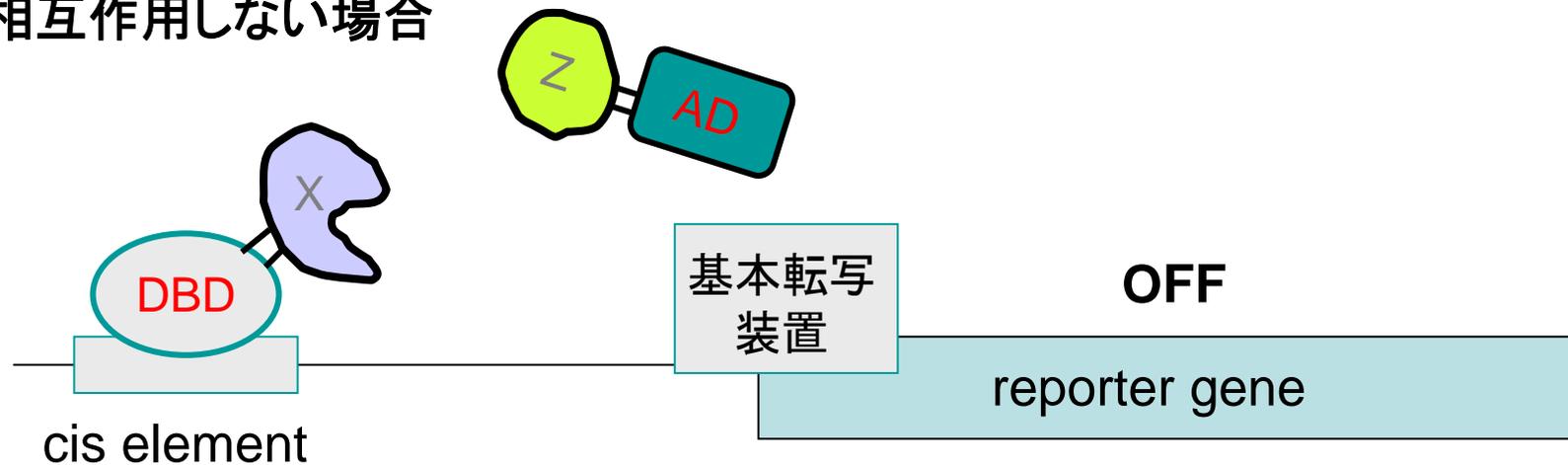
## -Y2Hの原理-

XとYが相互作用する場合

DBD・・・DNA結合ドメイン  
AD・・・転写活性化ドメイン



XとZが相互作用しない場合



# 相互作用プロテオーム(7/12)

## -大規模Y2H解析からのプロテインネットワーク-

---

大規模Y2H解析



時間的・空間的には共存しない複合体を含んだ  
巨大ネットワーク



既存知識の参照



同定されたY2H相互作用に、生物学的なもつともらしさ  
の判断基準となる情報を付加



局所的ネットワークの構築

# 相互作用プロテオーム(8/12)

## -タンパク質間相互作用に関するインフォマティクス-

---

### タンパク質間相互作用の分子機構に関する解析・予測

ドッキング・シミュレーション

### ゲノム情報を利用したタンパク質間相互作用推測

Conservation of Gene Neighborhood

Phylogenetic Profile 法

Rosetta Stone 法

Mirror Tree 法

*in silico* 2-hybrid 法

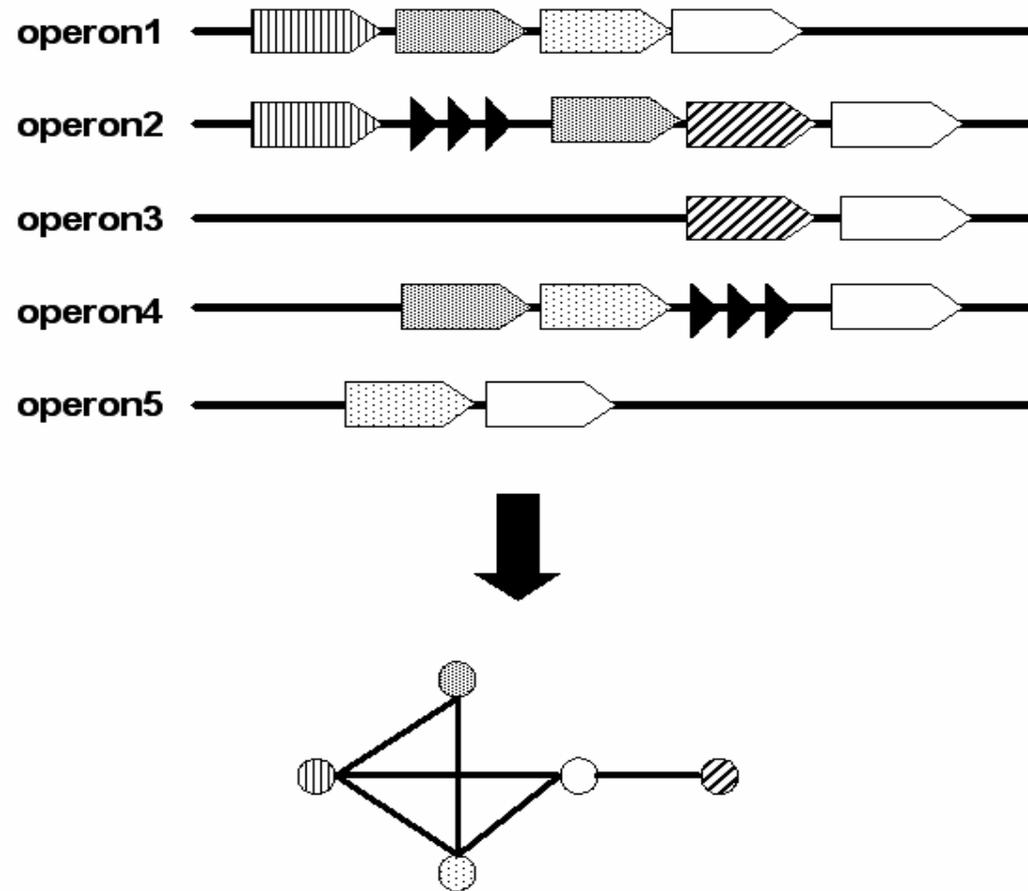
Sequence Motif 法

Joint 法

# 相互作用プロテオーム(9/12)

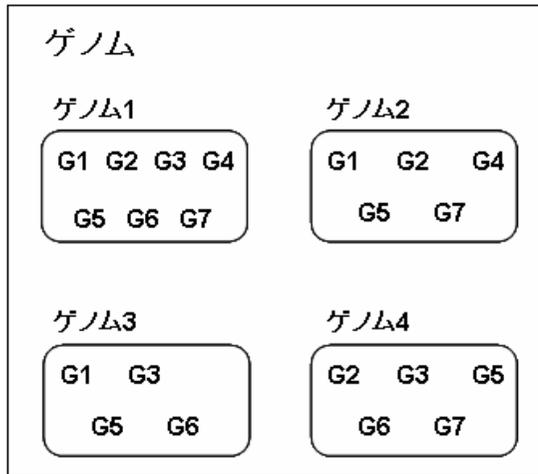
## -Conservation of Gene Neighborhood-

複数の細菌ゲノムにおいて、オーソログな遺伝子のペアが近接して、もしくは同じ順序で存在する場合、その遺伝子がコードするタンパク質は機能的に関連があると考えてネットワークを再構築する方法



# 相互作用プロテオーム(10/12)

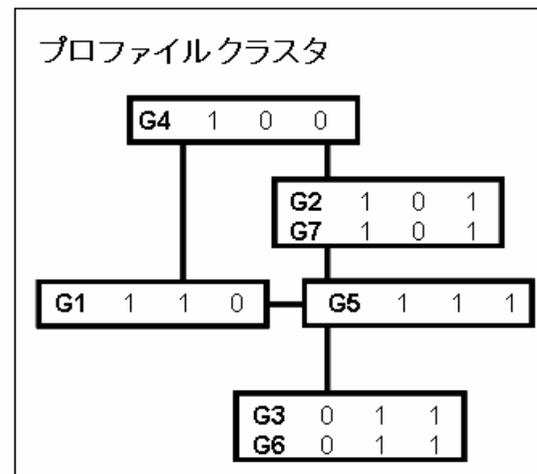
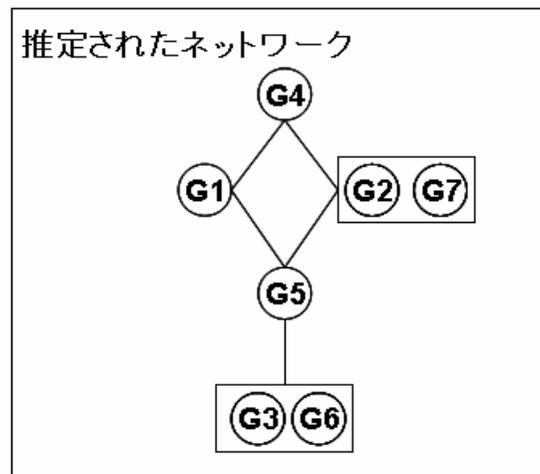
## -Phylogenetic profile法-



系統プロファイル

遺伝子	ゲノム			
	1	2	3	4
G1	1	1	0	
G2	1	0	1	
G3	0	1	1	
G4	1	0	0	
G5	1	1	1	
G6	0	1	1	
G7	1	0	1	

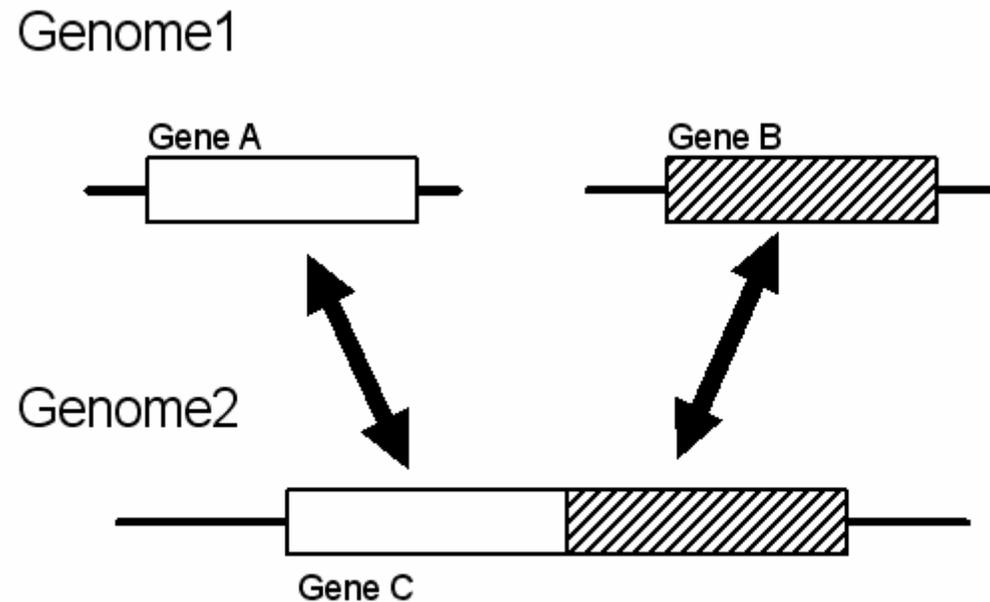
相互作用する遺伝子は進化の過程で、ゲノム中でともに保存されるか、あるいは消滅するという仮定のもと、ゲノム上における有無の挙動が類似するものは、機能的にリンクしたものであると推測していく方法。



# 相互作用プロテオーム(11/12)

## -Rosetta Stone 法-

あるゲノムでは別の遺伝子としてコードされている2つのタンパク質が、別のゲノムでは融合した1つの遺伝子としてコードされている場合、この2つのタンパク質は機能的に関連があると推測する。



Enright, A.J., *et al. Nature* Vol.402;86-90;1999  
Marcotte, *et al. Science* Vol.285;751-753;1999

# 相互作用プロテオーム(12/12)

## -プロテオーム解析用ソフトウェア-

---

### ホモロジー検索サーバ

FASTA	<a href="http://fasta.genome.ad.jp">http://fasta.genome.ad.jp</a>
BLAST	<a href="http://blast.genome.ad.jp">http://blast.genome.ad.jp</a>
MOTIF	<a href="http://motif.genome.ad.jp">http://motif.genome.ad.jp</a>

### ペプチドの質量スペクトルからタンパク質を同定するためのソフトウェア アミノ酸組成によるタンパク質の同定

AACompIdent	<a href="http://www.expasy.org/tools/aacomp/">http://www.expasy.org/tools/aacomp/</a>
ProteinProspector	<a href="http://prospector.ucsf.edu/">http://prospector.ucsf.edu/</a>

### 翻訳後修飾の推定

FindMod	<a href="http://www.expasy.org/tools/findmod">http://www.expasy.org/tools/findmod</a>
GlycoMod	<a href="http://www.expasy.org/tools/glycomod/">http://www.expasy.org/tools/glycomod/</a>

### ペプチドマスフィンガープリンティング、シーケンス検索

Mascot	<a href="http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html">http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html</a>
MassSearch	<a href="http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/subsection3_1_3.html">http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/subsection3_1_3.html</a>

# まとめ

---

- トランスクリプトーム・プロテオーム研究の目指すもの
- トランスクリプトーム・プロテオーム研究とバイオインフォマティクス

## まとめ(1/2)

# -トランスクリプトーム・プロテオーム研究の目指すもの-

---

### トランスクリプトーム・プロテオーム研究とは・・・

これまでの、個々の遺伝子やタンパク質を対象とした研究と異なり、生体細胞内で実際に機能している遺伝子やタンパク質全体を対象とした**網羅的・包括的な解析研究**

### トランスクリプトーム・プロテオーム研究の目的とは・・・

**未知遺伝子やタンパク質の機能推定**  
**遺伝子間・タンパク質間の相互作用の解明**

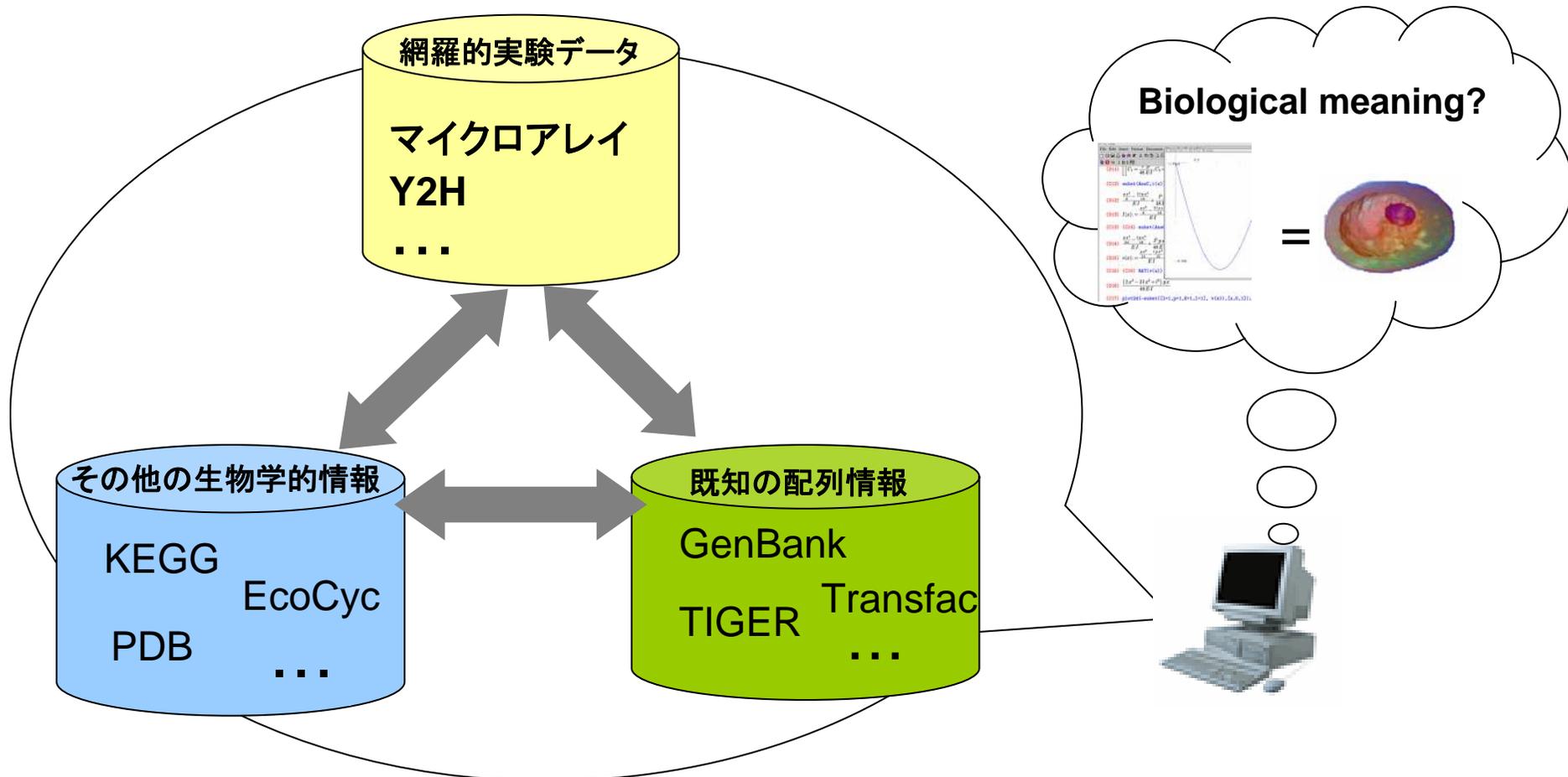
### トランスクリプトーム・プロテオーム研究の将来は・・・

高次生命システムの解明  
医薬への応用

# まとめ(2/2)

## -バイオインフォマティクスの役割-

大量データのデータベース化から数理モデルによる**数値データの解析**によって、**最終的な生物学的知見**を得るまでの解析研究。



---

# トランスクリプトーム解析・ プロテオーム解析入門

2010. 9. 28

於 独立行政法人科学技術振興機構  
住宅棟1階会議室

産業技術総合研究所  
生命情報工学研究センター

油谷 幸代