

課題名 インタラクトーム解析からの生物知識獲得

代表研究者 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授 伊藤 隆司

1. 代表研究者による成果概要報告

1-1. 研究開発のねらい

出芽酵母蛋白質の網羅的 2 ハイブリッド解析によって始まったインタラクトーム解析は、今や機能ゲノム科学の最重要分野のひとつとして認識されるに至った。それに伴いインタラクトームを扱うバイオインフォマティクス (BI) も長足の進歩を遂げつつある。この分野の次なる課題は、対象とする相互作用の拡大と解析の深化であろう。その為には、インタラクトームインフォマティクスの更なる発展は勿論、新規の実験手法・計測技術の開発による新しいデータの取得も必要である。とりわけ、これまでのインタラクトームデータにはない特性、すなわち定量性と時間分解能、を備えたデータの取得が重要である。そして BI と連携しない機能ゲノム計測はあり得ないから、新しい大規模解析を支援する BI 技術とデータの特性を知識発見に活用する BI 技術が平行して開発されねばならない。

このような認識に基づいて、本研究開発では、従来の蛋白質間相互作用に加えて、遺伝子間相互作用、蛋白質-DNA 相互作用、および蛋白質-脂質相互作用を解析する技術の開発を試みた。特に従来までの定性的な相互作用カタログ化から、相互作用ネットワークのダイナミクス理解につながる定量的情報の獲得へと、内容を深めることを目指して定量に力点を置いた。そして定量計測を支援する BI 技術の開発も進めて大規模な計測系の構築を行い、データの定量性を知識発見に活用する新しい手法の開発を進めた。このように計測技術開発と情報技術開発が相互に密接な連携を取りながら、インタラクトーム解析からの生物学的知識発見の推進を目指す。

1-2. 研究開発の成果

○蛋白質間および蛋白質-核酸相互作用解析グループ

- 1) 蛋白質間相互作用の定量解析とプロファイリングの基盤技術として、クロスリンクを利用した新規タンデムアフィニティ精製法と質量分析による解析系を開発した。
- 2) ユビキチン化蛋白質の同定およびプロファイリングの基盤技術としての新規パラレルアフィニティ精製法と質量分析による解析系を開発した。
- 3) 相互作用破壊による機能解析と相互作用ルール発見促進に必要な相互作用部位マッピングの為に、保証付き逆 2 ハイブリッド法と加速化システムフットプリント法を開発した。
- 4) 転写因子結合ゲノム断片と発現遺伝子の絶対定量の基盤技術としてゲノム DNA と cDNA を競合増幅によって絶対定量を可能にする GATC-PCR 法を開発した。
- 5) GATC-PCR 法に基づくゲノムワイド計測システムを構築する為に、特異性の高いプライマー設計アルゴリズムを考案して、ほぼ全遺伝子に対するプライマー設計と合成を行った。自動分注装置、384 穴 PCR 装置、マルチキャピラリー DNA シークエンサーからなる計測系を構築し、生物情報統合解析支援システム開発グループの開発した AQUOS を統合することでゲノムワイドの遺伝子絶対定量システムを構築した。

- 6) 転写因子と標的遺伝子群の機能的相互作用を解析する方法として、転写因子の人工的活性化手法を開発した。
- 7) 転写因子と標的遺伝子の相互作用に対するゲノム修飾の影響を解析する分子遺伝学的技術として、メチル化依存性酵母 1 ハイブリッド法を開発した。

○蛋白質-脂質相互作用解析グループ

- 1) フォスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) と PX ドメインの相互作用を定量的に解析するプレート法を開発した。
- 2) p47^{phox} の PX ドメインにおける PIP と蛋白質の競合的相互作用を見出した。

○生物情報からの知識発見ツール開発グループ

- 1) 蛋白質の立体構造データから、従来法よりも高い精度で相互作用領域予測を行う手法を開発した。
- 2) データベースから抽出した大規模な名詞辞書に基づき、相互作用を含む名詞間の関係情報を抽出するためのテンプレートを自動的に発見する手法を開発した。
- 3) 相互作用に伴うカルモジュリンの立体構造変化に関して、中央のリンカーヘリックスが構造変化を担っているという新しい知見を得た。

○生物情報統合解析支援システム開発グループ

- 1) データマイニングの代表的手法である相関ルール発見技術を用いて、蛋白質相互作用データからの生物知識発見の基盤技術を開発した。
- 2) 発現遺伝子の絶対定量を行う GATC-PCR 法により産出されるデータの定量支援システム AQUOS を開発し、実験データ管理と自動バンド同定による実験支援を実現した。
- 3) GATC-PCR 法による発現遺伝子絶対定量データの理解や解釈を支援するシステムの開発を進めた。具体的には、一定以上あるいは以下の発現量を持つ特定の遺伝子群の機能や特徴を、その遺伝子群に特異的に関連付けられている既存知識を提示することによって予測せしめ、同遺伝子群の役割を理解することを支援する手法の研究開発である。既存知識としては、GO (Gene Ontology) 等の体系化された技術チームのみならず、様々な条件下で実施された遺伝子発現実験の結果も用いている。特に後者の利用によって、単なる表層的な理解にとどまらず新しい生物知識の発見につながる可能性が確認できた。
- 4) 発現量を単に遺伝子を絞り込むための数値として使うのではなくて、発現量自体を重みとして解釈にも用いるように上記手法の拡張を行った。これにより、遺伝子の絞込みに入り込まざるを得ない利用者の恣意や思い込みなどの主観や真偽が疑わしい経験則を排除した、より客観的な結果を得ることが期待できると同時に、絞込みによって生じる発現情報のロスを最小限に抑えることができる。
- 5) 上述の研究開発技術を実装したデータ解析システムを構築し、一部の機能を Web 上から利用可能な形で公開した。同システムは、特定遺伝子の上流配列に特異的な転写因子結合パターンを探索する機能や GATC-PCR 法の絶対定量性を活かしたデータ解析インタフェースなども備えておりチーム内の生物知識発見ワークベンチとして活用されている。

1-3. まとめ

蛋白質間、蛋白質-核酸、遺伝子間、蛋白質-脂質相互作用など広義のインタラクトームデータを取得する為の実験技術の開発を行った。単なるカタログ化ではなくて、定量的計測やパーティションなどの生物知識発見に直結する新しいタイプの実験技術や、これまでに組みの少ない相互作用に力点を置いた。これらのうち、遺伝子間相互作用解析の基礎となる遺伝子断片の絶対定量に関しては、基盤技術としてゲノム DNA を標準とするアダプタ付加競合 PCR(GATC-PCR)を開発し、計測支援的 BI 技術の開発と連動して、大規模な計測システムを構築した。更にデータの持つ定量性という特性を結果の解釈に活用する解釈支援的 BI 技術を開発し、それらの技術を用いたツールを提供する Web システムを構築した。このシステムはトランスクリプトームのみならず、各遺伝子に何らかの計測値という属性が付与されるゲノムワイド計測データ全般の解釈に応用可能なものである。

2 . 統括の見解

遺伝子発現を絶対定量化する手法として GATC-PCR 法を開発したことや定量実験を支援するシステム AQUOS を開発したことは、体系的な生物学的解析と情報科学的解析の連携が有効に働いたことを示すものであり優れた成果といえる。今後は、この絶対定量値を生かした蛋白質 - 核酸相互作用や難易度の高い蛋白質 - 脂質相互作用のインタラクトーム解析などにより得られる実験データを、その質も吟味しつつデータベース化し、新たな生物知識の発見がなされることを期待する。

3 . 主な論文発表

国内 1 件、国外 16 件 主なものを以下に記す

1. Oyama, T., Kitano, K., Satou, K. & Ito, T. Extraction of knowledge on protein-protein interaction by association rule discovery. *Bioinformatics* **18**, 705-714 (2002).
2. Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D. & Sumimoto, H. Phosphorylation of p47^{phox} directs PX domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4474-4479 (2003).
3. Minakuchi, Y., Satou, K. & Konagaya, A. Prediction of Protein-Protein Interaction Site Using Support Vector Machines. The 2003 International Conference on Mathematics and Engineering Techniques in Medicine and Biological Sciences (METMBS'03), 22-28 (2003).
4. Feng, S.-Y., Ota, K., Yamada, Y., Sawabu, N. & Ito, T. A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 922-925 (2004).
5. Onda, M., Ota, K., Chiba, T., Sakaki, Y. & Ito, T. Analysis of gene network regulating yeast multidrug resistance by artificial activation of transcription factors: involvement of Pdr3 in salt resistance. *Gene* **332**, 51-59 (2004).