

ショウジョウバエ概日時計の ゲノムワイドな発現解析

上田 泰己

山之内製薬(株) NEDO-GIプロジェクト システムバイオロジーグループ
東京大学大学院医学系研究科 細胞分子薬理学教室

我々はショウジョウバエ概日リズムに関与する遺伝子群を網羅的に解析するため、体系的かつ定量的な全RNAの発現解析を行った。全遺伝子の振動解析を行い発現パターンの順位づけを行った結果、全時計遺伝子が高順位に含まれることが明らかになった。次に遺伝子機能データベースから遺伝子機能カテゴリー情報を取得し、概日リズムで制御されている生理機能を系統的に予測することに成功した。さらに、各酵素の発現パターンを代謝データベースを用いて解析した結果、概日リズムで振動している可能性の高い物質を見出した。最後に全遺伝子を染色体上にマップし、隣接する遺伝子の発現パターンを比較することによって、クロマチン高次構造変換によって転写制御が起こっている可能性が高い染色体領域を発見した。網羅的遺伝子発現情報を各種データベースを用いて統合的に解析することで、新しい生理現象・物質・制御が明らかになりつつある。

1. 真核生物のゲノムプロジェクト

ゲノムプロジェクトにより出芽酵母⁴⁾、線虫¹⁰⁾、ショウジョウバエ¹⁾、シロイヌナズナ¹²⁾、ヒト⁹⁾、¹⁵⁾など真核生物のゲノム配列が1997年から次々と明らかになってきている。2002年の出芽酵母の近縁種である分裂酵母¹⁶⁾のゲノム配列決定に象徴されるように、ゲノムプロジェクトは現在近縁種のゲノム配列決定へと移行しつつある。例えばヒトの近縁種であるマウス、シロイヌナズナと同じ高等植物であるイネなどのゲノムプロジェクトが既に進行しており、近年中に公開されることになっている。また線虫、ショウジョウバエについても近縁種のゲノムプロジェ

クトが既に始まっている。さらにパブリックに進行しているゲノムプロジェクト以外にも、イネやマウスのゲノムはベンチャー企業がゲノム解読の終了を発表しており、一部の製薬企業やアカデミアが既に有料でデータベースを利用している。今後「二本目のゲノム」つまり近縁種のゲノムが決定されていくことによって比較ゲノムが可能となり、プロモーター上での近縁種間での保存領域が次々と明らかになっていくことが予想される。時計遺伝子のPer1のマウス・ヒト間での比較ゲノム⁸⁾によって明らかになった保存領域に5つのE-boxやDBPの結合配列がマッピングされたように、近縁種間で

の保存上流領域を同定することで、遺伝子の転写制御に関する情報が急速に明らかになっていくことが予想される。概日時計研究のように転写の制御が重要な役割を担っている生命現象の研究分野にとって、ここ数年の近縁種ゲノムプロジェクトの進行は無視できないものとなるはずである。

2. 網羅的発現解析技術

ゲノム配列の決定を受けて近年のもう一つの大きな技術革新が進行している。ジーンチップやcDNAマイクロアレイのような網羅的発現解析技術である。一度の実験で一万余を超える遺伝子の発現状態を把握できる技術が、多少割高ではあるが現実のものとなっている。概日時計の研究でもシロイヌナズナ⁷⁾を皮切りにラット⁶⁾、ショウジョウバエ^{3, 10, 11)}と網羅的な発現解析が行われている。網羅的発現解析によって得られるデータは非常に多くの情報を含んでおり、さまざまなデータと統合させて解析していくことによって有用な情報を引き出すことができる。例えば似たような遺伝子発現を示す遺伝子上流のゲノム配列を解析することで転写制御配列を抽出することが可能である¹¹⁾。現在はヒト、マウス、ショウジョウバエ、シロイヌナズナのような高等真核生物においては、転写開始点近傍の情報が完備されていないので網羅的なプロモーター解析が困難ではあるが、近縁種ゲノム間での比較ゲノムが可能となれば、保存領域だけを解析することで転写制御配列を探索する領域を劇的に減らすことが可能である。例えばPer1の場合、ヒト・マウス間での保存領域の総和は~1kbであり⁸⁾、この値は酵母のプロモータ

ー領域(数百bp)と近いオーダーである。ゲノムプロジェクトや網羅的発現解析が生み出す膨大なデータの出現によってバイオインフォマティクス分野の生物学研究における重要性が現在急速に高まっている。本総説では以上のような研究の流れを意識しながらショウジョウバエの概日リズムのゲノムワイドな発現解析¹¹⁾およびそのデータの解析について簡単に述べたい。

3. ショウジョウバエ概日時計の発現解析

我々はショウジョウバエにおける概日時計がどのようにして広汎な遺伝子発現を制御しているのかを理解するためにオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(GeneChip)を用いて明暗条件、恒暗条件でショウジョウバエのゲノムワイドな遺伝子発現解析を行った。2週間明暗条件で同調させたショウジョウバエの成虫を明暗条件あるいは恒暗条件に置き、2日間にわたって4時間おきにサンプリングを行った。約100匹のショウジョウバエの頭部から抽出した総RNAを用いてGeneChip解析を行ったところ、振動していることが知られている時計遺伝子あるいは時計関連遺伝子全て(*period*, *timeless*, *clock*, *cryptochrome*, *vriille*, *takeout*)が、高い振幅で振動していることが見出された。別途測定した定量的PCRのデータと比較したところ、位相のみならず振幅の大きさまで近似した定量性の非常に高いデータがGeneChip解析から得られることがわかった。これらの遺伝子の発現データには共通して1) 振動が美しい、2) 振幅が大きい、という2つの性質が見出された。1) は概日周期の余弦波との相関係数が有意に高いという客観的な

表現に言い換えることが可能である。2) はサンプリングノイズに比べて発現データの変動が有意に大きいと言い換えられる。1)、2) それぞれの性質について波形フィルター、振幅フィルターを作成し、両フィルターとも95%のランダムデータをカットするように閾値を定めた。このようにして抽出された振動遺伝子は明暗条件で約712遺伝子、恒暗条件で454遺伝子であった。このうち115遺伝子が両方の条件で概日振動していた(図1)。次にこれらの遺伝子の発現振動が時計

によって制御されているのかを確かめるために、Clock変異体での発現解析を行った。明暗周期で4時間ごとに2日間にわたってサンプリングし、GeneChip解析を行ったところ、これらの遺伝子の大部分の発現振動がClock変異体では消失することが見出された(図1)。さらに115遺伝子を形の美しい順(余弦波との相関係数が高い順)に並べ替えてみると、1位が*timeless*、3位が*vriIle*、5位が*clock*、7位が*cryptochrome*、23位が*period*、24位が*takeout*、と高順位に時計遺伝子、時

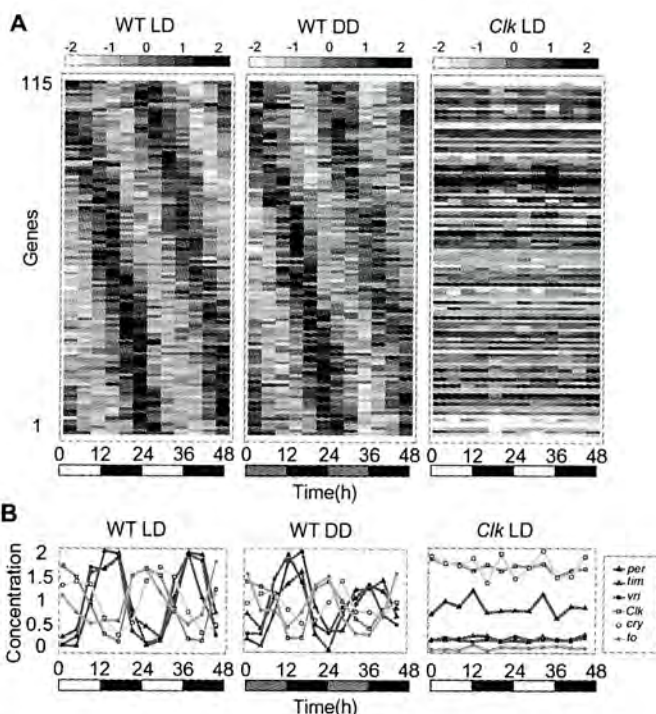


図1. ショウジョウバエ頭部のゲノムワイドな発現解析

- A. 野生体および*Cik*変異体における概日振動遺伝子の発現。野生体(WT)の明暗条件(LD)および恒暗条件(DD)の時系列データは平均、標準偏差がそれぞれ0、1になるように正規化してある。*Cik*変異体(*Cik*)の明暗条件(LD)の時系列データは、野生体の明暗条件での時系列データの平均値を減じ、標準偏差で除してある。野生体の明暗条件での位相(ピークの時間)および恒暗条件での位相(ピークの時間)を推定し、2つの位相の平均値を計算して、その値が早い順に遺伝子を並べ替えている。概日振動遺伝子の野生体の明暗条件、恒暗条件での振動は*Cik*変異体の明暗条件ではほとんど消失する。
- B. 時計遺伝子および時計関連遺伝子の時系列データ。野生体(WT)の明暗条件(LD)および恒暗条件(DD)の時系列データは平均値が1になるように正規化してある。*Cik*変異体(*Cik*)の明暗条件(LD)の時系列データは、野生体の明暗条件での時系列データの平均値で除してある。

計関連遺伝子が集中することがわかった。すなわち時計機能に深く関わっていると予想される遺伝子ほどこの順番付けで上位に位置することが予想される。

概日時計によって生体の代謝が制御されていることが知られている。時計によって物質の代謝がどのように制御されて

いるのかを推測するために、代謝のデータベースと発現情報とを統合的に解析することを試みた。最初に代謝物質のデータベースであるLIGANDデータベース⁵⁾からショウジョウバエのゲノムの中で現在知られている酵素群および酵素によって触媒される生体物質のデータを取得し

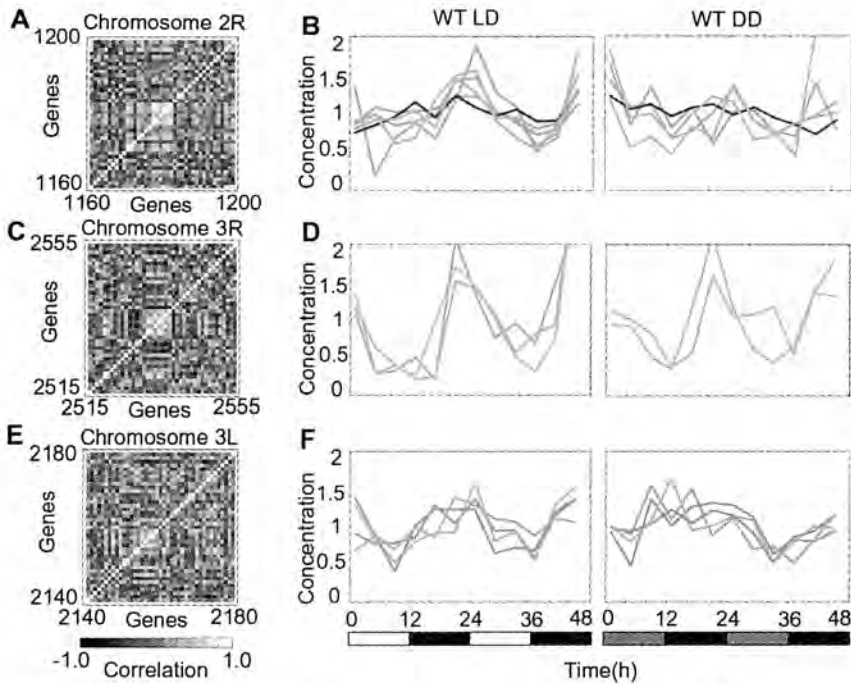


図2. 染色体近傍領域の共発現領域。発現相関マップ (A, C, E) の明るい正方形は2つの遺伝子の時系列データの相関係数が高いことを示している。縦軸、横軸上の番号は染色体上の遺伝子の番号 (染色体左腕あるいは右腕の左端に存在する遺伝子を1とする) を示す。共発現している遺伝子の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) の時系列データ (B, D, F) は各条件における平均発現量が1となるよう正規化してある。

- A. 第2染色体右腕における遺伝子発現の相関マップ。中央の明るいブロックは近接する6つのP450遺伝子 (Cyp6a17, Cyp6a23, Cyp6a19, Cyp6a9, Cyp6a20, Cyp6a21) の共発現領域を示している。
- B. 6つのP450遺伝子 (Cyp6a17, Cyp6a23, Cyp6a19, Cyp6a9, Cyp6a20, Cyp6a21) の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) における時系列データ。
- C. 第3染色体右腕における遺伝子発現の相関マップ。中央の明るいブロックは近接する3遺伝子 (CG11891, CG11889, CG10513) の共発現領域を示している。
- D. 3遺伝子 (CG11891, CG11889, CG10513) の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) における時系列データ。
- E. 第3染色体左腕における遺伝子発現の相関マップ。中央の明るいブロックは近接する3遺伝子 (CG7646, CG7654, CG7433) の共発現領域を示している。
- F. 3遺伝子 (CG7646, CG7654, CG7433) の明暗条件 (LD) および恒暗条件 (DD) における時系列データ。

た。次に明暗条件、恒暗条件それぞれにおいて概日振動遺伝子のリストと各生体物質のリストを比較検討した。具体的には、一つの物質が関わる反応を触媒する酵素群の中から概日振動遺伝子を数え上げ、そのような状態が偶然に起こる確率を超幾何分布を用いて計算した。P値(-Log(確率))が高い順に物質を抜き出した結果、いくつかの生体物質がショウジョウバエの頭部で振動していることが示唆された。特に、明暗条件においては、GABA、グルタミン酸などの神経伝達物質や、NADPH、NADH、NAD、NADHなどの細胞内での酸化還元反応に重要な物質などが振動していることが示唆された。酸化還元物質の振動はMcKnightらが報告しているClockやNPAS2のDNA結合活性がNAPDHの酸化還元状態による制御されているという報告と関連して注目している。またショウジョウバエにおける光情報の伝達にGABAやグルタミン酸がどのように関わっているのか興味深い。この他にもGeneOntologyデータベース²⁾という遺伝子の機能分類を行っているデータベースからその機能カテゴリーと各カテゴリーに分類される遺伝子名のリストを取得し、明暗条件、恒暗条件で振動していると予測される生理現象を抽出している。この手法によって例えば光受容のシグナル伝達系が有意に明暗周期で振動していることが予測されている。

最後に概日時計による転写制御機構について解析するために全てのショウジョウバエ遺伝子を染色体上にマップした。染色体上で近傍に存在する遺伝子群が共通した発現制御を受けている部分を抜き出したところ、染色体上で複数の領域が共通な発現制御をうけていることがわか

った(図2)。このような染色体領域の制御の詳細はまだわかっていないが、概日時計によって染色体の高次構造が制御されている可能性があるのではないかと考えている。

4. おわりに

現在概日振動遺伝子の転写開始点をゲノムワイドに決定している。これにより概日時計の分子機構の詳細があきらかになってくるのではないかと期待している。概日時計を単なる振動体ではなく時計たらしめている分子機構とはどのようなものであろうか?単純な負のフィードバックよりも複雑な機構が予想される概日時計の分子システムの全貌の解明に向けて、ゲノムプロジェクトの成果や最近の技術革新を最大限に利用できればと考えている。

参考文献

- 1) Adams MD, et al.: *Science* 287: 2185-2195. (2000)
- 2) Ashburner M, et al.: *Nat Genet* 25: 25-29. (2000)
- 3) Claridge-Chang A, et al.: *Neuron* 32: 657-671. (2001)
- 4) Goffeau A, et al.: *Nature* 387: 5 (1997)
- 5) Goto S, et al.: *Nucleic Acids Res* 28: 380-382 (2000)
- 6) Grundschober C, et al.: *J Biol Chem* 276: 46751-46758 (2001)
- 7) Harmer SL, et al.: *Science* 290: 2110-2113 (2000)
- 8) Hida A, et al.: *Genomics* 65: 224-233 (2000)
- 9) Lander ES, et al.: *Nature* 409: 860-921

- (2001)
- 10) McDonald MJ and Rosbash M: *Cell* 107: 567-578 (2001)
 - 11) Roth FP, et al.: *Nat Biotechnol* 16: 939-945 (1998)
 - 12) The_Arabidopsis_Genome_Initiative: *Nature* 408: 796-815 (2000)
 - 13) The C. elegans Sequencing Consortium: *Science* 282: 2012-2018 (1998)
 - 14) Ueda HR, et al.: *J Biol Chem* 19: 19 (2002)
 - 15) Venter JC, et al.: *Science* 291: 1304-1351 (2001)
 - 16) Wood V, et al.: *Nature* 415: 871-880 (2002)