

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310140

研究課題名(和文) 酵母の量的均衡遺伝子が作るネットワークの全容解明

研究課題名(英文) Analysis of the network constructed by dosage balanced genes in yeast

研究代表者

守屋 央朗 (Moriya, Hisao)

岡山大学・その他部局等・准教授

研究者番号：60500808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：量的均衡遺伝子とは、2つ以上の遺伝子の発現量が互いに均衡しており、そのバランスが乱れた時に、細胞機能に異常をもたらす遺伝子のことを言う。私たちは、これまでに「遺伝子つなひき法」という実験手法を用いて、わずかに遺伝子コピー数を上げただけで細胞機能が破たんする遺伝子(量感受性遺伝子)の同定を試みてきた。本研究ではこれを進め、出芽酵母の115個の量感受性遺伝子を同定するとともに、これらのうち、13の量的均衡関係を見出した。この研究は、ゲノム上の量感受性遺伝子の組織的同定としては、あらゆる生物で初めてのことであり、複数の量的均衡遺伝子を一度に同定した初めての例である。

研究成果の概要(英文)：Dosage balanced gene (DBG) is a gene whose expression is balanced against more than two genes, and the perturbation of the balance causes cellular dysfunction. Using a genetic method designated "genetic tug-of-war", we have been trying to identify "dosage sensitive genes" whose minor overexpression cause cellular dysfunction. In this study, we proceeded this analysis, and identified 115 dosage sensitive genes in the budding yeast genome. We further identified 13 dosage-balanced interactions. This study is the first example for the systematic identification of dosage sensitive genes in a organism's genome, and for the identification of multiple dosage balanced genes at a time.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：遺伝子ネットワーク タンパク質ネットワーク 量感受性遺伝子 量的均衡遺伝子 酵母 ゲノム

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

1. 研究開始当初の背景

細胞内には数千から数万のタンパク質が存在し、それらが協調的に働いて細胞の生命機能を果たしている。これらのタンパク質の発現量は、細胞が生命機能を最も効率よく営む事ができるよう、最適化されていると考えられる。一方で、環境の変化や変異、タンパク質発現のゆらぎなどの摂動の影響を受けて、タンパク質の発現量は最適な値からずれてしまう事がある。このような摂動にもかかわらず、細胞が機能を発揮できるのは、タンパク質の発現が多少変動しても、安定的に生命機能を発揮できる特性、「ロバストネス (頑健性)」を備えているからである。

一方で、実際の細胞においてどのタンパク質をどの程度変動させたら細胞の機能が破綻するのかという事は全くわかっていなかった。私たちは、遺伝子のコピー数をどこまで上げたら細胞の機能が破綻するか (コピー数限界) を調べる実験系、「遺伝子つなひき法」を酵母において開発し、タンパク質の過剰発現に対する細胞システムのロバストネスを調べた (Moriya *et al.*, *PLOS Genetics* 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子つなひき法を利用して、真核細胞のモデル細胞である出芽酵母のすべての遺伝子についてそのコピー数限界を測り、細胞内でのタンパク質の発現限界には差があるのか、あるとしたらそれはどのような理由によるものかを明らかにする事を目的として研究を開始した。

ところで、本研究を開始した際に、既に私たちの実験結果から、わずかにしか発現量を上げられない遺伝子 (ここでは、「量感受性遺伝子」と呼ぶ) の性質として、その遺伝子がコードするタンパク質が複合体をつくって

おり、その複合体の間の量的なバランスの乱れが量感受性の原因である事を見いだしていた (このようなバランス関係にある遺伝子の事を「量的均衡遺伝子」と呼んでいる) (Kaizu *et al.*, *PLOS Genetics* 2010)。また、量的均衡遺伝子は、ヒトでは疾患の原因の候補遺伝子である事を研究分担者の牧野らは報告している (Makino *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010)。そこで、本研究では、上記の研究で同定された量感受性遺伝子のうち、どれが量的均衡遺伝子であるのかを同定する事も目指した。

さらに私たちは、「量的均衡遺伝子が染色体上に散在すると、見えないネットワークを形成しこれが染色体の構成を拘束する事ができる」という新しい染色体安定性制御の仮説も提案した。本研究の最終目的は、量的均衡遺伝子がつくるネットワークの全容を明らかにする事である。

3. 研究の方法

本研究で用いる中心的な実験手法は、上述の「遺伝子つなひき法」である。遺伝子つなひき法は、私たちが独自に開発した実験手法であり、遺伝子のコピー数をどこまで上げたら細胞の機能が破綻するか (限界コピー数) を調べる事ができる。遺伝子のコピー数が上昇するとそれに伴ってタンパク質の発現量も上昇すると考えられる事から、この実験手法は、タンパク質の過剰発現の限界を測定する手法であるとも言える。

出芽酵母の全遺伝子の解析では、遺伝子つなひき法用のプラスミドに酵母のそれぞれの遺伝子を組み込み、そのコピー数を酵母細胞内で何コピーまで上げられるかを調べた。本研究ではこれを6000すべての遺伝子について

行った。実際には、本研究の開始時点で、すべての遺伝子を対象とした一次解析は終了していた。本研究ではここで得られてきた量感受性遺伝子の候補について、精度を上げた解析を行い、量感受性遺伝子の同定を行った。

さらに、量的均衡遺伝子の同定を行うために、量感受性遺伝子に対するパートナー遺伝子の同定を行った。パートナー遺伝子の同定は、別のプラスミドにのせたパートナー候補の遺伝子のコピー数を上げる事で、量感受性遺伝子のコピー限界が上がるかどうかで確認した。

4. 研究成果

本研究の結果、出芽酵母の6000の遺伝子すべての遺伝子のコピー数限界が測定できた。これは、あらゆる生物を通して初めての知見である。その結果、酵母の80%以上の遺伝子については、そのコピー数を100倍以上に上げても細胞機能は破綻しない事が明らかになった。これは、上述したように細胞のシステムが非常にロバストにできている事の実験的な裏付けと言える。

一方で私たちは、わずか10コピー以下のコピー数上昇で細胞を死に至らしめる115の量感受性遺伝子を同定した。これらのタンパク質は、細胞骨格や細胞内輸送に関わるタンパク質が多く見られた。また、情報学的な解析から、そもそもの量の多いタンパク質をコードしている遺伝子が量感受性遺伝子になりやすい、タンパク質複合体の構成成分をコードしている遺伝子が量感受性遺伝子になりやすい、という事を見いだした。前者は、タンパク質の機能とは関係なく沢山のタンパク質がつくられ/壊される事によって生じる負荷「タンパク質負荷 (Protein Burden)」が、後者は、複合体内でのバランスが乱れる「量的不均衡 (Stoichiometry Imbalance)」が、量感受性の原因である事を示唆している。

そこで私たちは、前者についてはモデルタンパク質として緑色蛍光蛋白質 (GFP) 用いた解析により、タンパク質負荷が実際に量感受性の原因となる事を示した。さらに後者については、3で述べた量的均衡のパートナーを同定する実験を行い、13の量的均衡にあるパートナーを見いだすとともに、量的均衡が量感受性の原因となる事を示した。

上記の13の量的均衡遺伝子がつくるネットワークは、出芽酵母の16本の染色体全体にばらついており、このネットワークが染色体の構成を規定しているという私たちの仮説が裏付けられた。

本研究から、115の量感受性遺伝子が同定された。タンパク質負荷や量的不均衡が量感受性遺伝子を生む原因である事はわかったが、これがすべてを説明できる訳ではない。量感受性遺伝子のように、わずかな量の変動で細胞の機能に大きな影響を与える遺伝子は、病気の原因になると考えられる。今後は上記以外の量感受性を生み出すメカニズムを明らかにする必要がある。

さらに本研究では、80%以上の遺伝子が100コピーに上げても細胞機能を破綻させない事も見いだした。この驚くべきロバストネスがどのようなメカニズムによって保証されているのかは基礎生物学的知見から大変興味深い。また、そのようなロバストネスを保障するメカニズムの破綻は、疾患の原因となる事も考えられる。次なる目標はロバストネスを保障するメカニズムの解明であろう。その1つとして、私たちは量的不均衡を回避するメカニズムの解明を、平成26年度からの基盤研究 (B) の支援を受けて行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件) すべて査読あり

- ① Sasabe M, Shintani S, Kintaka R, Kaizu K, Makanae K, Moriya H., Evaluation of

- the lower protein limit in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* using TIPI-gTOW., *BMC Syst Biol.* 2014 Jan 7;8(1):2. doi:10.1186/1752-0509-8-2.
- ② Tsunematsu Y, Ishikawa N, Wakana D, Goda Y, Noguchi H, Moriya H, Hotta K, Watanabe K., Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk., *Nat Chem Biol.* 2013 Dec;9(12):818-25. doi: 10.1038/nchembio.1366.
- ③ Chino A, Makanae K, Moriya H, Relationships between Cell Cycle Regulator Gene Copy Numbers and Protein Expression Levels in *Schizosaccharomyces pombe*., *PLoS One.* 2013;8(9):e73319. doi:10.1371/journal.pone.0073319.
- ④ Yamanishi M, Ito Y, Kintaka R, Imamura C, Katahira S, Ikeuchi A, Moriya H, Matsuyama T., A Genome-Wide Activity Assessment of Terminator Regions in *Saccharomyces cerevisiae* Provides a "Terminatome" Toolbox., *ACS Synth Biol.* 2013 Feb 20; doi: 10.1021/sb300116y.
- ⑤ Naito T, Yatsushashi A, Kaji N, Ando T, Sato K, Moriya H, Kitano H, Yasui T, Tokeshi M, Baba Y., Parallel Real-Time PCR on a Chip for Genetic Tug-of-War (gTOW) Method., *Anal Sci.* 2013;29(3):367-71. https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/29/3/29_367/_article
- ⑥ Makanae K, Kintaka R, Makino T, Kitano H, Moriya H, Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method., *Genome Res.* 2013 Feb;23(2):300-11. doi: 10.1101/gr.146662.112.
- ⑦ Moriya H, Makanae K, Watanabe K, Chino A, Shimizu-Yoshida Y., Robustness analysis of cellular systems using the genetic tug-of-war method., *Mol Biosyst.* 2012 Oct;8(10):2513-22. doi: 10.1039/c2mb25100k.
- ⑧ Ishiuchi K, Nakazawa T, Ookuma T, Sugimoto S, Sato M, Tsunematsu Y, Ishikawa N, Noguchi H, Hotta K, Moriya H, Watanabe K., Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics., *Chembiochem.* 2012 Apr 16;13(6):846-54. doi:10.1002/cbic.201100798.
- ⑨ Moriya H, Chino A, Kapuy O, Csikász-Nagy A, Novák B., Overexpression limits of fission yeast cell-cycle regulators in vivo and in silico., *Mol Syst Biol.* 2011;7:556. doi:10.1038/msb.2011.91.
- [和文総説] (計 5 件)
- ① 守屋央朗 「生命システムのロバストネスとは何か？」 細胞工学 2014 年 1 月号特集 (監修)
- ② 守屋央朗 「タンパク質の発現量の変化に対する細胞システムのロバストネスを測る」 細胞工学 2014 年 1 月号 pp19-25
- ③ 守屋央朗 「酵母の持つすべての遺伝子の限界コピー数の計測」 生物物理 vol. 53 No. 6 pp323-326, 2013
- ④ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 「酵母のすべての遺伝子の「限界コピー数」を測る」 実験医学 2013 年 6 月号 pp1401-1405
- ⑤ 恒松雄太 守屋央朗 渡辺賢二 「出芽酵母発現システムを利用した天然物の生物合成」 化学と生物 2012 年 3 月号 pp163-174
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 雀部正毅、進谷紗弓、守屋央朗 「TIPI-gTOW 法によるタンパク質発現の下限限定の試み」 (口頭発表) 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会 2013 年 9 月 8 日 (仙台市青葉区)
- ② 蒔苗浩志、守屋央朗 「出芽酵母における misfoldedGFP の過剰発現による細胞毒性の発揮メカニズムの解析」 (ポスター) 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会 2013 年 9 月 8 日 (仙台市青葉区)
- ③ 守屋央朗 「酵母だから測れる (?), 過剰発現のコピー数限界」 (口頭発表) 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 (兵庫県神戸市)
- ④ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 「ミトコンドリア関連の量感受性遺伝子 (DSG) と PPH3 の遺伝的相互作用」 (ポスター) 第 35 回日本分子生物学会年会 2012

- 年 12 月 12 日 (福岡県福岡市)
- ⑤ 蒔苗浩司、守屋央朗 「タンパク質の過剰発現が引き起こす細胞毒性の定量」 (ポスター) 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 (福岡県福岡市)
 - ⑥ 蒔苗浩司、金高令子、牧野能士、守屋央朗 「出芽酵母がもつすべての遺伝子の限界発現量を測る」 (ポスター) 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 (福岡県福岡市)
 - ⑦ 茅野文子、守屋央朗 「分裂酵母の細胞周期に存在するフィードバックの解明」 (口頭発表) 酵母遺伝学フォーラム 2012 年 9 月 5 日 (京都府宇治市)
 - ⑧ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 「ミトコンドリア関連の量感受性遺伝子 (DSG) と PPH3 の遺伝的相互作用」 (ポスター) 酵母遺伝学フォーラム 2012 年 9 月 5 日 (京都府宇治市)
 - ⑨ 守屋央朗、蒔苗浩司 「タンパク質の過剰に対して、細胞の各プロセスは異なった頑健性を持っている」 (口頭発表) 酵母遺伝学フォーラム 2012 年 9 月 4 日 (京都府宇治市)
 - ⑩ Masataka Sasabe, Sayumi Shintani, Koji Makanae, Hisao Moriya 「Development of a method for measuring the lower limit of gene expression」 (ポスター) 2012 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting 2012 年 8 月 1 日 (アメリカ、ニュージャージー州)
 - ⑪ Reiko Kintaka, Koji Makanae, Hisao Moriya 「Identification of genes in balance with dosage sensitive genes」 (ポスター) 2012 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting 2012 年 8 月 1 日 (アメリカ、ニュージャージー州)

- ⑫ 進谷紗弓、蒔苗浩司、守屋央朗 「遺伝子発現の下限測定法の開発」 (ポスター) イーストワークショップ 2011 年 11 月 12 日 (香川県さぬき市)
- ⑬ 金高令子、守屋央朗 「Dosage sensitive gene と均衡関係にある遺伝子の同定」 (ポスター) イーストワークショップ 2011 年 11 月 12 日 (香川県さぬき市)
- ⑭ 守屋央朗 「酵母細胞システムのロバストネス解析」 (口頭発表) 生物物理学会第 49 回年会 2011 年 9 月 16 日 (姫路市書写)

[その他]

雑誌論文⑥のプレスリリースが、山陽新聞 (2012. 12. 29)、日本経済新聞 (2013. 1. 7) に掲載された。マイナビニュース (2012. 12. 28) で紹介された。雑誌論文⑨のプレスリリースが、山陽新聞 (2011. 12. 7) に掲載された。NHK 岡山放送 (2011. 12. 8) のニュースで紹介された。ホームページ等
<http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM1a/b/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守屋 央朗 (MORIYA HISAO)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・准教授
研究者番号：60500808

(2) 研究分担者

牧野 能士 (MAKINO TAKASHI)

東北大学大学院・生命科学研究科・准教授
研究者番号：20443442