

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18466

研究課題名(和文)細胞内タンパク質ネットワーク動態の定量的モニタリングテクノロジー

研究課題名(英文)A technology to quantitatively measure protein interactomes

研究代表者

谷内江 望(Yachie, Nozomu)

東京大学・先端科学技術研究センター・准教授

研究者番号：60636801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：複数の遺伝型が関わる細胞の生育を一斉に計測することのできるDNA Barcode Fusion Genetics (BFG) 法を開発し、これをタンパク質の相互作用をスクリーニングする酵母ツーハイブリッド(Y2H)法と組み合わせたBarcode Fusion Genetics (BFG)-Y2H法を開発した。さらに、BFG-Y2H法が既存のY2H法と同等の精度をもつことを示し、任意のタンパク質スペースが関わるインタラクトームを1人の研究者が2-3週間でスクリーニング可能であること、最低でも250万のタンパク質ペアについて一斉にインタラクトームを得られることを実証した。

研究成果の概要(英文)：We remain one or two orders of magnitude away from a complete interaction map for humans and other major model organisms. Completion will require screening at substantially larger scales with many complementary assays, requiring further efficiency gains in proteome-scale interaction mapping. Here, we report Barcode Fusion Genetics-Yeast Two-Hybrid (BFG-Y2H), by which a full matrix of protein pairs can be screened in a single multiplexed strain pool. BFG-Y2H uses Cre recombination to fuse DNA barcodes from distinct plasmids, generating chimeric protein-pair barcodes that can be quantified via next-generation sequencing. We applied BFG-Y2H to four different matrices ranging in scale from ~25 K to 2.5 M protein pairs. The results show that BFG-Y2H increases the efficiency of protein matrix screening, with quality that is on par with state-of-the-art Y2H methods.

研究分野：合成生物学

キーワード：DNAバーコード インタラクトーム 超並列DNAシーケンシング 酵母ツーハイブリッド タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

がん等のヒトの疾患が単一の遺伝子や単純なパスウェイの損傷として説明できる例は少なく、その殆どは複雑な細胞内ネットワーク全体の不全として考えなくてはならない。近年、網羅的なタンパク質間の相互作用（インタラクトーム）が計測可能になり、医学分野においては、患者個人のゲノム変異情報をリファレンスインタラクトームにマッピングすることで病態予測や予後予測の精度が向上することが示されている。また疾患関連変異が他のゲノム変異に比べて有意に多くのタンパク質間相互作用を阻害することも知られている。したがって、パーソナルゲノム情報に加えてヒト組織から固有のインタラクトームを計測することができれば、より高精度な病態予測が可能になると考えられるが、現在までにそのようなテクノロジーはない。

ゲノム情報を用いたヒトの疾患動態の予測はチャレンジングな課題である。例えばがんにおいては、ドライバー変異を起点に腫瘍細胞に様々な変異が引き起こされ、そのフェノタイプはゲノム全体に生じた多様な変異の総体としての結果である。次世代 DNA シークエンシングは腫瘍組織中のゲノム変異の網羅的な同定を可能にし、患者のカルテ情報とともにがんゲノム情報が取得できるようになった。しかしながら、多数の遺伝子に観察されるがんゲノム変異は（ドライバー変異を除いて）患者間で共通のものが極端に少なく（共通責任遺伝子候補が疎）、患者の病態をゲノム変異情報から既存の病態や細胞形質に紐づける（クラスタリングする）手法には限界がある。近年、このようなアプローチにおいて細胞内分子ネットワーク情報、特にヒトの網羅的なタンパク質間相互作用情報であるリファレンスインタラクトームが有効であることが示されている（Vidal et al. 2011 *Cell*）。2013 年には UCSD の Trey Ideker らが「ある遺伝子に損傷があると、その遺伝子が関わる分子ネットワークの部分構造が損傷を受ける」という前提において、患者の変異情報を分子ネットワーク上で近傍にある遺伝子群に転嫁し、該当する疾患サンプルの責任遺伝子候補群の数を増やすことでゲノム情報からのがん種の判定精度、肺がんや卵巣がんなどの予後予測精度を向上させた（Hofree et al. 2013 *Nat. Methods*）。

このように、より形質に近い分子ネットワーク情報の活用によってゲノム情報を病態情報に「転写」するフレームワークが有効であることが示される一方、任意の遺伝子の損傷によって影響を受ける遺伝子回路はリファ

レンスインタラクトームで近接する遺伝子全てに関わるわけではなく、その影響は一部である。また、遺伝子変異によって不都合な分子間相互作用が新たに生じることもある。したがって、高精度の疾患動態予測のためには患者個人のパーソナルインタラクトーム計測が有効であると考えられることができる。

2. 研究の目的

短 DNA リードを大量に解読できる次世代シーケンシング技術の登場によって「DNA バーコード」という考え方が大規模な細胞の表現型解析を可能にした。例えば、出芽酵母の一遺伝子破壊株のコレクションはそれぞれ人工合成された DNA バーコードを破壊された遺伝子座をもつ。このため全ての破壊株を混合して一斉に細胞プールを薬剤などの環境下でスクリーニングすることができ、スクリーニング後の不均質な細胞集団は破壊株毎の DNA バーコード数を次世代シーケンシングによって数え上げることで解析できる（Hillenmeyer et al. 2008 *Science*）。同様に、ベクター上に siRNA や CRISPR sgRNA をエンコードする DNA も DNA バーコードとして扱うことができる（Berns et al. 2004 *Nature*; Shalem et al. 2014 *Science*; Wang et al. 2014 *Science*）。これらのベクターをプール化して一斉に培養細胞にトランスフェクションし、スクリーニング後にバーコード数を定量することで対応する遺伝子それぞれへの損傷応答を網羅的に解析することが可能になった。

一方でこの方法論は細胞あたり改変や編集を二つ以上組み合わせた大規模スクリーニングに持ち込むことはできなかった。例えばヒトの遺伝子は約 20,000 あるが、ヒトのタンパク質間相互作用の網羅的（インタラクトーム）スクリーニングのためには 200,000,000 の 2 タンパク質の組合せ全てについて合成 DNA バーコードを準備することが必要であった。

これまでにこのようなこの問題を解決するために、Cre-loxP 反応を利用して、1 細胞内それぞれで異なる二種類のバーコードを連結させ、細胞集団を超並列シーケンシングで一斉に解析する Barcode Fusion Genetics (BFG) 法を開発した。本研究では、これをタンパク質の相互作用をスクリーニングする酵母ツーハイブリッド（Y2H）に応用した BFG-Y2H 法を完成させることを目的とした。

3. 研究の方法

BFG-Y2H法ではDB-XおよびAD-YプラスミドにそれぞれXまたはY特異的なDNAバー

コードカセットをもつ DB-X 細胞株および AD-Y 細胞株を準備する。DB-X バーコードカセットは UP タグおよび DN タグと呼ばれる二つの DNA バーコードから構成され、UP タグは loxP および lox2272 配列で挟まれる。同様に UP タグと DN タグをもつ AD-Y バーコードカセットでは、DN タグが loxP および lox2272 配列で挟まれる。次に、対象となる X 群および Y 群に対応する細胞株を混合、接合によって X-Y ペアを全て持つ二倍体の細胞集団を得る。これを Y2H 選択培地に移し、タンパク質相互作用をもつ Y2H 陽性の細胞集団を一斉に選択する。この後、Cre の発現を誘導すると、各細胞内で DB-X および AD-Y プラスミドの loxP 間と lox2272 間において DNA 組換えが引き起こされ、DB-X の UP タグと AD-Y の DN タグがプラスミド間で交換される。これによって AD-Y および DB-X プラスミド上でそれぞれ UP タグと UP タグの連結及び DN タグと DN タグの連結が生じる（バーコードフュージョン）。細胞からプラスミドを抽出後、PCR によって連結バーコード産物を増幅、超並列 DNA シークエンシングによって解析する。連結バーコードそれぞれのリード数を数えることによって全ての X-Y ペアについて定量的な相互作用のスコアが得られる。

4. 研究成果

BFG-Y2H 法を用いて、これまでに最低でも 250 万のタンパク質ペアについて相互作用の有無を 1 人の研究者が 2-3 週間程度で高品質にスクリーニングできることを実証した。既存の Y2H 法は細胞の生育の有無を定性的に評価するバイナリーシステムであったが、BFG-Y2H 法によって定量的にタンパク質間相互作用を評価できるようになり、相互作用スコアの強さとともに既報のタンパク質間相互作用の再補足度が高くなることが観察された。また、BFG-Y2H 法で高い相互作用スコアを示したタンパク質ペアおよび陰性であった複数のタンパク質ペアについてルシフェラーゼ再構成 (GPCA) 法によって検証した。GPCA 法ではルシフェリンを酸化して発光させるルシフェラーゼを二つに分断させたものそれぞれに X および Y を融合させたものをヒトの培養細胞において発現させ、ルシフェリンの発光によって X-Y 間の相互作用を試験する。本検証において BFG-Y2H 法から得られる相互作用スコアと GPCA 法から得られるルシフェリンの発光強度が有意に相関し、両アッセイから得られる定量値がタンパク質間相互作用の強度を反映したものであることが示唆された。さらに、タンパク質間相互作用の立体構造が結晶構造解析またはホモロジーモデリングによって得られているもの

のうち、相互作用面における非共有結合の数が多いタンパク質ペアが BFG-Y2H 法の相互作用スコアによって有意に濃縮されることが観察され、BFG-Y2H 法の相互作用スコアと結合強度の関係が示された。

患者のゲノム情報をインタラクトーム情報に転写することが疾患動態を解釈に役立つことが明らかになるにつれて、今後達成されるヒト全インタラクトームカタログの決定を超えて高速に患者個人から個別のインタラクトームを高速に計測する技術の重要性が増してきた。患者個人または患部サンプルの動態には遺伝子の変異パターン、転写のプライミングバリエーション、タンパク質の翻訳後修飾など多様な「プロテオフォーム」が関わる。「パーソナルインタラクトーム」の同定にはプロテオフォームによるスクリーニングスペースの組合せ爆発に対応できる異次元のテクノロジーの創出が必要であるが、これらを可能にする基盤として BFG-Y2H 法を樹立した。

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 17 件)

1. Mori H, Evans-Yamamoto D, Ishiguro S, Tomita M & Yachie N* (2018) Fast and global detection of periodic sequence repeats in large genomic resources. *bioRxiv* doi: 10.1101/309039 (*Corresponding author)
2. Despres PC, Dube AK, Nielly-Thibault L, Yachie N & Landry CR (2018) Highly efficient CRISPR gene editing in yeast enabled by double selection. *bioRxiv* doi: 10.1101/262808
3. Jo M[†], Chung AY[†], Yachie N[†], Seo M, Jeon H, Nam Y, Seo Y, Kim E, Zhong Q, Vidal M, Park HC, Roth FP & Suk K (2017) Yeast genetic interaction screen of human genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: identification of MAP2K5 kinase as a potential drug target. *Genome Research* 27, 1487-1500 ([†]Co-first)
4. Ghanegolmohammadia F, Yoshida M, Ohnuki S, Sukegawa Y, Okada H, Obara K, Kihara A, Suzuki K, Kojima T, Yachie N, Hirata D & Ohya Y (2017) Systematic analysis of Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. *Molecular Biology of the Cell* 28, 3415-3427
5. Yachie N, Robotic Biology Consortium & Natsume T (2017) Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. *Nature*

- Biotechnology* 35, 310
6. Nishida K, Arazoe T, **Yachie N**, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z & Kondo A (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353, aaf8729
 7. **Yachie N**^{†,*}, Petsalaki E[†], Mellor JC, Weile J, Jacob Y, Verby M, Ozturk SB, Li S, Cote AG, Mosca R, Knapp JJ, Ko M, Yu A, Gebbia M, Sahni N, Yi S, Tyagi T, Sheykhkarimli D, Roth JF, Wong C, Musa L, Snider J, Liu Y-C, Yu H, Braun P, Stagljar I, Hao T, Calderwood MA, Pelletier L, Aloy P, Hill DE, Vidal M & Roth FP* (2016) Pooled-matrix protein interaction screens using Barcode Fusion Genetics. *Molecular Systems Biology* 12, 863 (†Co-first; *Corresponding author)
 8. Rich MS, Payen C, Rubin AF, Ong GT, Sanchez MR, **Yachie N**, Dunham MJ & Fields S (2016) The Effects of Cis-Regulatory Mutations in the SUL1 Gene on Sulfate-Limited Fitness in Yeast. *Genetics* 203, 191-202
 9. Sahni N, Yi S, Taipale M, Fuxman Bass JI, Coulombe-Huntington J, Yang F, Peng J, Weile J, Karras GI, Wang Y, Kovács IA, Kamburov A, Krykbaeva I, Lam MH, Tucker G, Khurana V, Sharma A, Liu Y-Y, **Yachie N**, Zhong Q, Shen Y, Palagi A, San-Miguel A, Fan C, Balcha D, Dricot A, Jordan DM, Walsh JM, Shah AA, Yang X, Stoyanova AK, Leighton A, Calderwood MA, Jacob Y, Cusick ME, Salehi-Ashtiani K, Whitesell LJ, Sunyaev S, Berger B, Barabási A-L, Charloteaux B, Hill DE, Hao T, Roth FP, Xia Y, Walhout AJM, Lindquist S & Vidal M (2015) Widespread Macromolecular Interaction Perturbations in Human Genetic Disorders. *Cell* 3, 647-660
 10. **谷内江 望** (2017) 長鎖DNA合成のオートメーション化による生命科学の未来. *実験医学* 別冊あなたのラボに AI×ロボットがやってくる, 80-91
 11. 山本-エヴァンス 楠 & **谷内江 望** (2017) AI・LabDroidと交わす言葉をつくりだす. *実験医学* 別冊あなたのラボに AI×ロボットがやってくる, 124-129
 12. 石黒 宗, 増山 七海 & **谷内江 望** (2017) オミクス科学における実験数の組合せ爆発に挑む DNA バーコード技術. *生化学* 89, 538-545
 13. 石黒 宗, 森 秀人 & **谷内江 望** (2017) DNA バーコードおよびゲノム編集用いた細胞系譜の一斉追跡技術. *生体の科学* 68, 273-281
 14. 石黒 宗, 森 秀人 & **谷内江 望** (2017) DNA バーコードによる生命科学実験の限界突破. *実験医学* 35, 5, 119-127
 15. 増山 七海, 山本-エヴァンス 楠 & **谷内江 望** (2017) タンパク質間相互作用ネットワークの超高速マッピング. *バイオサイエンスとインダストリー* 75, 27-32
 16. 山本-エヴァンス 楠, 増山 七海 & **谷内江 望** (2016) バーコードフュージョン遺伝学. *医学のあゆみ* 259, 832-838
 17. 関 元昭 & **谷内江 望** (2016) DNA バーコードを利用したシングルセル研究の新展開——細胞情報を他の階層に紐づける生物学へ. *医学のあゆみ* 258, 275-280
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. Consortium of Biological Sciences 2017 (ConBio2017), Symposium on Since Cell Biology, Kobe, Japan, December 2017
 2. Consortium of Biological Sciences 2017 (ConBio2017), ShinBio Symposium, Kobe, Japan, December 2017
 3. Japanese Society for Cell Synthesis Research, Kyoto, Japan, October 2017
 4. Japan Human Proteome Organization (JHUPO), Osaka, Japan, July 2017
 5. Japanese Society of Developmental Biologists, Tokyo, Japan, May 2017
 6. CIFAR Genetic Networks Workshop, Tokyo, Japan, April 2017
 7. RIKEN Sakura Symposium, Yokohama, Japan, March 2017
 8. Annual Meeting in Awaji for Systems and Synthetic *E. coli* Biology, Awaji, Japan, March 2017
 9. Physical Approaches for Growing and Evolving Populations, Tokyo, Japan, February 2017
 10. Japanese Society for Quantitative Biology, Okazaki, Japan, January 2017
 11. The molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan, December 2016
 12. International Conference on Single Cell Research 2016, Tokyo, Japan, November 2016
 13. Informatics In Biology, Medicine and Pharmacology, Tokyo, Japan, September 2016
 14. The University of Tokyo, Biological Science Symposium (BIO UT) 2016, Tokyo, Japan, April 2016
 15. CIFAR Genetic Networks Workshop, Toronto, Canada, April 2016
 16. The University of Tokyo, Institute of Medical Science, IIS Retreat, Tokyo, Japan, March

2016

17. Chemical Society of Japan, Kyoto, Japan,
March 2016
18. International Symposium on Genome
Microbiology, Tokyo, Japan, March 2016
19. Biochemistry and Molecular Biology 2015
(BMB2015), Illumina Seminar, Kobe, Japan
December 2015
20. Biochemistry and Molecular Biology 2015
(BMB2015), Single Cell Workshop, Kobe,
Japan December 2015
21. Cancer and Metabolism, Kanazawa, Japan,
July 2015
22. NGS Field, Tsukuba, Japan, July 2015
23. Illumina Genome Summit 2015, Tokyo, Japan,
June 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://yachie-lab.org/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

谷内江 望 (YACHIE, Nozomu)

東京大学・先端科学技術研究センター・准
教授

研究者番号 : 60636801