

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02427

研究課題名(和文) 遺伝子発現の環境応答量は発現量ゆらぎを用いて予測できるか？

研究課題名(英文) How accurately can we predict the expression status of a gene using stochastic noise in expression?

研究代表者

津留 三良 (Tsuru, Saburo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：80594506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の発現状態は、何を指標にすればどれくらい予測できるだろうか？近年の先行研究から、環境変化による発現変化量(環境応答量)と発現量の確率的な発現変動(ゆらぎ)の大きさが正の相関関係をもつことが示唆されている。本研究は、この正相関の予測を実験によって検証することである。そのために、各遺伝子の発現量が蛍光標識された大腸菌ライブラリーを様々な環境条件で培養し、フローサイトメーターによって個体レベルで発現量を計測した。その結果、環境応答量と発現量ゆらぎの間に正相関があることが実証できた。この結果は、発現量のゆらぎを指標とすることで、発現量の環境応答量を予測しうることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、大腸菌を用いて、遺伝子発現量のゆらぎと環境変化が正に相関することが示された。この実証実験の成果は、理論的背景の正当性を支持するものであり、遺伝子発現量の変化しやすさの異なる指標が連動していることを示している。このことは、遺伝子発現量のゆらぎを事前に計測することで、環境変化前後の発現変化量のある程度予測できることを示唆している。これらの成果は、細菌の発現量の予測や設計を図る応用分野に大きな示唆を与えるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：How accurately can we predict the expression status of a gene using which indicator? Previous studies have suggested a positive correlation between the extent of expression change in response to environmental fluctuations (plasticity) and the magnitude of stochastic expression fluctuations (noise). This study aims to experimentally verify this noise-plasticity coupling. To accomplish this, we cultured an E. coli library labeled with fluorescent markers for each gene's expression levels under various environmental conditions and measured the expression levels at the single cell level using flow cytometry. The results confirmed a positive correlation between plasticity and noise in gene expression level. This finding suggests that noise in gene expression can serve as an indicator for predicting the environmental response of gene expression levels.

研究分野：システム生物学

キーワード：遺伝子発現 ゆらぎ 大腸菌 環境応答

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現状態を予測することは、細胞工学の中心課題の一つであるとともに、生物に対する理解度を測る一つの尺度でもある。遺伝子の発現量を予測するためには、遺伝子発現の分子基盤の解明だけでなく、発現量変化が従う規則や予測指標の解明が必須である。遺伝子の発現量は、環境変化に応じて変化するだけでなく、例え一定の環境であっても生体内分子の小数性や分子運動の不規則性等に起因するノイズによって、確率的(酔歩的)にゆらぐことが分かってきた(図1A)。この確率性によって生じる遺伝子発現量のゆらぎは、同じ環境履歴をもつクローン細胞間(図1Bの GFP を発現する大腸菌個体間)の発現量の分散として定量できる。

申請者は、大腸菌の遺伝子発現量のゆらぎの特性と環境応答における役割を探る研究をこれまで進めてきた。その成果として、環境変化前のゆらぎと環境応答量(環境変化前後の変化量の集団平均)が無関係ではなく正に相関しうることを示唆する実験証拠を世界に先駆けて発見した。この正相関は、環境変化前に計測可能なゆらぎを指標とすることで、環境変化後のその遺伝子の発現変化量を予測できることを示唆している。しかしながら、調べた遺伝子(数個)や環境の種類(数種類)が極めて少数であるため、その一般性が最も大きな課題として残っている。近年の報告では、生物情報学的解析からこの課題に迫り、正の相関が(遺伝子及び種方向に)より一般的なのではと提唱されているが、適切に検証できる実験データがないために実証できていない。このように、適切な実験検証が進展していないために、環境が変化した際の遺伝子の発現状態は、何を指標にすればどれくらい予測できるか?という核心的な問いは、未解決課題であった。

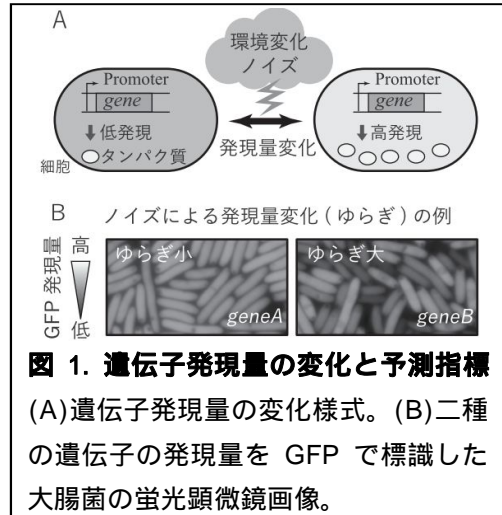


図 1. 遺伝子発現量の変化と予測指標 (A)遺伝子発現量の変化様式。(B)二種の遺伝子の発現量を GFP で標識した大腸菌の蛍光顕微鏡画像。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子の発現状態を予測する新たな手法を築くために、ゆらぎと環境応答量の正の相関関係が多くの遺伝子で一般的に成り立つかを調べることである。そのために、大腸菌の多数の遺伝子に着目し、様々な環境条件下で発現量とそのゆらぎを計測する。得られた実験データに基づき相関解析を行って、環境変化前のゆらぎから環境応答量をどの程度説明できるか検証する。さらに、予測精度が遺伝子のどんな特徴によって左右されるかを明らかとする。一般性を検証し、予測精度を今後改善するための指針を提示することで、遺伝子発現状態を予測する学術分野の推進を図る。

類型を破る本研究手法の特徴は、環境変化前の発現量のゆらぎと環境変化前後の発現量を計測することで、事前情報(ゆらぎ)と事後情報(環境応答量)の正確な対応がついた実験データが得られる点にある。ゆらぎを調べる研究と環境応答量を調べる研究は独立に実施されてきたため、両者が正確に対応づけられた実験データがこれまで取得されてこなかった。ゆらぎは、遺伝子型や環境ごとに変化しうることが報告されている。また、遺伝子発現の環境応答量も、環境履歴や細胞の遺伝子型に依存することが一般的によく知られている。にもかかわらず、従来の研究手法では、本来実験で揃えるべきこれらの条件を無視して収集された実験データに基づいて相関関係を議論してしまっており、ゆらぎと環境応答量の対応関係が適切に扱われてこなかった。本研究で用いる手法では、こうした条件をすべて揃えることができるため、解析に適した信頼性のある実験データを取得でき、実証実験における従来の課題を突破できる。

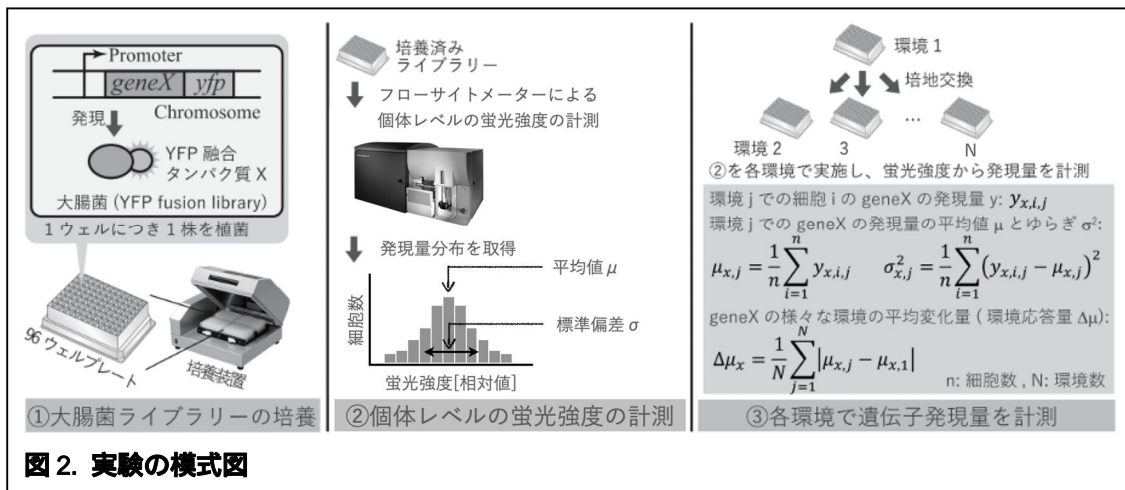


図 2. 実験の模式図

3. 研究の方法

各遺伝子の発現量が蛍光標識された大腸菌を様々な環境条件で培養し、フローサイトメーターを用いて各遺伝子の発現量を個体レベルで計測する。得られた個体レベルの蛍光強度を解析し、環境変化前後でのゆらぎ(分散)と環境応答量(平均変化量)が遺伝子ごとに対応づけられた実験データを取得する。この実験データに基づいて相関解析を行い、環境変化前のゆらぎから環境応答量がどの程度説明できるかを示す。具体的には図2の要領( ~ )で実験を行う。

大腸菌ライブラリーの培養：遺伝子が、YFP 融合タンパク質として翻訳される大腸菌ライブラリーを用いる。96 ウェルプレートで培養する(1株/ウェル)。

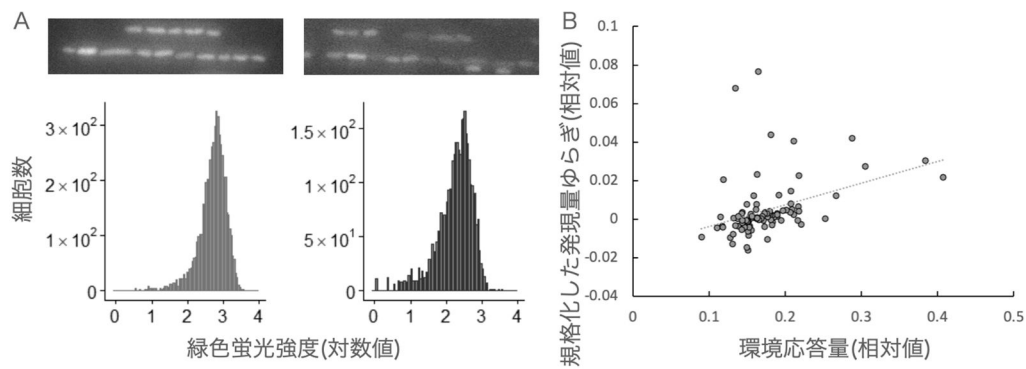
個体レベルの蛍光強度の計測：培養液をフローサイトメーターに供し、個々の細胞の緑色蛍光強度を計測する。一集団/ウェルあたり数万細胞のデータを取得し、geneX の発現量分布を得る。

各環境で遺伝子発現量を計測：大腸菌ライブラリーを数十種の異なる環境で培養(主に培地中に加える栄養素の種類が異なる)し、各環境で を実施する。発現量分布から各環境(j)で、各遺伝子(x)について細胞ごと(i)の遺伝子発現量(y)を求め集団の平均値( $\mu$ )とゆらぎ( $\sigma^2$ )を計測する(j=1 が環境変化前)。平均値の変化を様々な環境について求め、環境応答量( $\mu$ )を得る得られた実験データを用いて相関解析を行い、遺伝子発現量のゆらぎと環境応答量の正の相関関係の実証を行う。

#### 4. 研究成果

まず、染色体上の遺伝子の発現量を融合蛍光タンパク質の蛍光強度によって定量できる大腸菌ライブラリーから、報告されている発現量が計測機器の計測可能範囲内に収まる 87 株を無作為に選別した。これらの株に対して、蛍光顕微鏡画像による画像解析のため、青色蛍光タンパク質を恒常発現する遺伝子組み換えを行った。これらの株を 27 種の異なる栄養環境下で培養し、個体レベルの蛍光強度をフローサイトメーターで計測した。図 3A は得られた発現量分布の例であり、この解析手法によって顕微鏡画像と妥当な結果が得られることが確認された。先行研究によって、発現量ゆらぎは、平均値依存性を示すことが知られており、本研究で得られた発現量のゆらぎもその影響を受けていることが確認された。この交絡要因を取り除くため、遺伝子発現量ゆらぎの発現量依存性を移動平均によって規格化し、これを規格化した発現量ゆらぎとして以降の解析に用いた。環境応答量については、これまでの研究で平均値依存性は報告されておらず、本研究でも確認されなかったため、当初予定の通り、発現量分布の対数値の 27 環境条件間の標準偏差を用いた。

このようにして得られた遺伝子発現量のゆらぎと環境応答量について、相関解析を行った結果、両者が正の相関関係を持つことが明らかとなった(図 3B)。これまでの理論研究から、遺伝子発現量のゆらぎと環境応答量の正の相関は、その遺伝子の機能に応じた進化によって形成された「変化しやすさ」を反映していると考えられている。このことを確かめるために、増殖に対する必須性に依存して発現量のゆらぎと環境応答量がどのように変化するかを調べた。その結果、非必須遺伝子に比べて、必須遺伝子では、ゆらぎが小さいだけでなく、環境応答量も小さいことが分かった。また、非必須遺伝子では、ゆらぎと環境応答量の間にある程度強い正の相関関係(スピアマンの順位相関係数 0.63,  $P < 0.05$ )が確認されたが、必須遺伝子では、有意な相関が検出されなかった。以上の結果は、必須な遺伝子では、発現量の恒常性に対する選択が強かかっていることを裏付けており、ゆらぎと環境応答量の正の相関が、遺伝子の機能に応じた進化的な遍歴を反映していることを支持している。実際、調べた中で高い環境応答性を示す非必須遺伝子には、栄養環境に依存して代謝を切り替える役割担う遺伝子が多く観察された。こうした高い環境応答性と大きなゆらぎが、どのような分子機構によって実現されているかは今後の解析として残されているが、本研究の成果は、遺伝子発現量のゆらぎを指標として環境応答性を推定する重要な実験証拠であり、理論的背景の正当性を支持するものである。



**図 3. 遺伝子発現量ゆらぎと環境応答量の正相関**(A)融合 YFP によって蛍光標識された大腸菌の代表例(2 株)。上は蛍光顕微鏡による緑色蛍光の画像であり、下はフローサイトメーターで得た発現量分布。左の株(Pgk を蛍光標識)は、右の株(CarA を蛍光標識)に比べ、遺伝子発現量のゆらぎが小さい。(B)87 遺伝子、27 環境条件で得た発現量分布から得た発現量ゆらぎと環境応答量の関係。横軸(横軸)は、発現量分布の対数值の 27 環境条件間の標準偏差であり、ゆらぎ(縦軸)は、発現量分布の対数標準偏差を発現量依存性で規格化した相対値である。スピアマンの順位相関係数は 0.52( $P < 0.05$ )であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takano Sotaro, Takahashi Hiromi, Yama Yoshie, Miyazaki Ryo, Furusawa Chikara, Tsuru Saburo	4. 巻 13
2. 論文標題 Inference of transcriptome signatures of Escherichia coli in long-term stationary phase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32525-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shibai Atsushi, Kotani Hazuki, Sakata Natsue, Furusawa Chikara, Tsuru Saburo	4. 巻 12
2. 論文標題 Purifying selection enduringly acts on the sequence evolution of highly expressed proteins in Escherichia coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/g3journal/jkac235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kanai Yuki, Tsuru Saburo, Furusawa Chikara	4. 巻 50
2. 論文標題 Experimental demonstration of operon formation catalyzed by insertion sequence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1673~1686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金井雄樹, 津留三良, 古澤力
2. 発表標題 挿入配列活性によるオペロン構造形成の実証実験
3. 学会等名 第17回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金井雄樹, 津留三良, 古澤力
2. 発表標題 オペロン構造が組み上がる過程を実験的に再構成する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井雄樹, 津留三良, 古澤力
2. 発表標題 挿入配列活性によるオペロン構造形成の大腸菌を用いた実証実験
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井雄樹, 津留三良, 古澤力
2. 発表標題 オペロン構造を基本とする遺伝子発現制御機構の起源に関する IDE 仮説の実証実験
3. 学会等名 第46回生命の起原および進化学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Saburo Tsuru, Atsushi Shibai, Chikara Furusawa
2. 発表標題 大腸菌を用いた実験室内進化におけるタンパク質の配列進化速度の制約
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saburo Tsuru, Atsushi Shibai, Chikara Furusawa
2. 発表標題 A ubiquitous law in the rate of divergentevolution of protein sequence
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝井厚, 堀之内貴明, 古澤力, 津留三良
2. 発表標題 高変異率条件における細菌の長期実験進化
3. 学会等名 日本進化学会第 20 回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井雄樹, 津留三良, 古澤力
2. 発表標題 トランスポゾーム発現大腸菌によるゲノム縮小の進化実験
3. 学会等名 定量生物学の会第九年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------