

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02428

研究課題名(和文) パーソナルインタラクトーム計測技術の開発

研究課題名(英文) A technology to measure personal 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・客員准教授

研究者番号：60636801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：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、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。本研究ではBFG(barcode fusion genetics)法を利用した高速インタラクトームマッピング技術を利用してパーソナルインタラクトーム計測技術の開発を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム変異情報をヒトの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、インタラクトーム情報を個人レベルで調べることが可能になればパーソナルゲノム情報に加えてより高度な細胞あるいは疾病の動態予測が可能になる。またより高速なインタラクトーム測定技術の開発は様々な生物種のゲノム情報がどのように形質として転写されるのか知る大きな手がかりともなり、本技術が医療分野および基礎生物学分野に与える影響は大きい。

研究成果の概要(英文)：Human disorders and cancers are rarely interpreted by a single gene defect but rather by a malfunction of the cellular network. The recent deep sequencing-based screening methods have enabled high-throughput identification of human protein interaction maps. Furthermore, computational studies have shown that phenotypic prediction of mutations can be improved using cellular network information. This study aimed to develop a personal interactome technology using a high-throughput interactome screening method BFG-Y2H (barcode fusion genetics-yeast two-hybrid) that we have established previously.

研究分野：合成生物学

キーワード：タンパク質間相互作用 インタラクトーム 酵母遺伝学 DNAバーコード 超並列シーケンシング

1. 研究開始当初の背景

(1) パーソナルインタラクトーム 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として現れる。近年の超並列 DNA シークエンシング技術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 (共通する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. *Cell* 2011)。2013 年には「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が向上することが示された (Hofree et al 2013 *Nature Methods*)。このように、より情報としては表現型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。

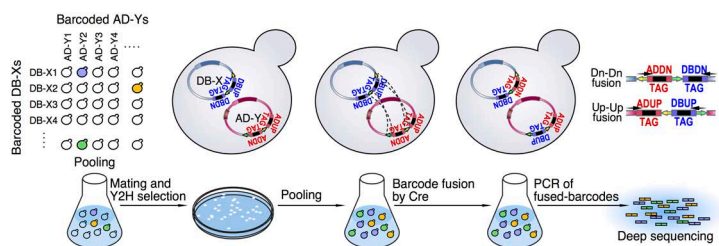


図1 BFG-Y2H 法によるインタラクトームの一斉スクリーニング

(2) 高速インタラクトームスクリーニング 研究開始前に我々は DNA バーコードを利用して酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法によるインタラクトームスクリーニングを高速化する Barcode Fusion Genetics (BFG)-Y2H 手法を開発していた (Yachie et al 2016 *Molecular Systems Biology*)。Y2H 法では試験

される X と Y をコードする遺伝子がそれぞれ Gal4 転写因子の DNA 結合ドメイン (DB; DNA binding domain) と転写活性ドメイン (AD; activation domain) と融合される (DB-X 及び AD-Y)。タンパク質 X-Y 間に相互作用がある場合には Gal4 転写因子が再構成され、選択遺伝子マーカーが発現するため、相互作用の有無は選択的条件下における酵母細胞の生育の有無によって試験される。

BFG-Y2H 法 (図 1) でははじめに 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。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、細胞内で Cre の発現を薬剤によって誘導すると、各細胞内で DB-X および AD-Y プラスミドのバーコードが連結する (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インタラクトームを一斉に同定できる (図 2)。

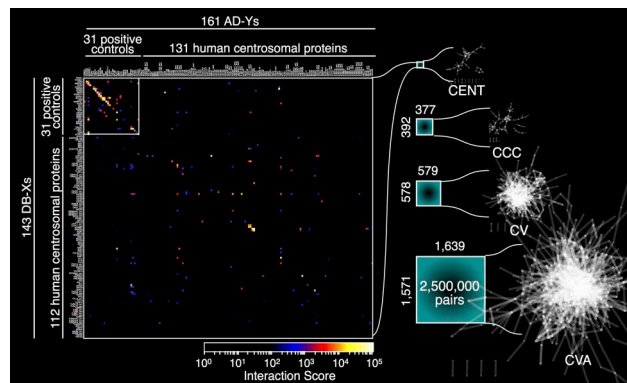


図2 BFG-Y2H 法によって得られた様々なインタラクトーム。最大のもは 250 万ペアからスクリーニングされた結果。

2. 研究の目的

BFG-Y2H 法がインタラクトームスクリーニングを高速化した一方で、BFG-Y2H 法を含めて直接的な相互作用を計測できる高品質手法はいずれも ORF クローンの利用を前提としており、現状では任意の組織や生物種のインタラクトームを *de novo* で計測することは困難である。がんなどの疾患動態を理解するために、高品質のパーソナルインタラクトームを取得する重要性は増しているが、このためには任意の検体から得たトータル RNA サンプルを元に高速に ORF ライブラリーを合成できる手法が必要である。そこで本研究では以下の研究計画に示す通り、トータル RNA からバーコードが付加された ORF ライブラリーを作成する手法、および水-油系エマルジョンを用いたこの反応系の超並列化手法の開発に取り組んだ。これによって任意のサンプルからバーコード化された ORF を高速に得て、BFG-Y2H 法によって高速にパーソナルインタラクトームを計測するパイプラインの樹立を進めた。2020 年に入って、国際プロジェクトがヒトリファレンスインタラクトームの大部分を決定したばかりであるが (Luck et al 2020 *Nature*)、早い段階において高速にパーソナルインタラクトーム (の部分スペース) を一斉に同定できる技術の確立を進めた。

3. 研究の方法

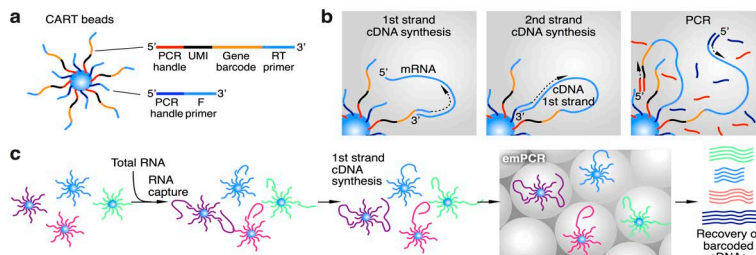


図 3 水-油エマルジョンと DNA バーコードを用いた emperor 法。(a) 任意の RNA を捕捉し、特異的な DNA バーコードを連結して cDNA を合成するための capture reverse transcription (CART) ビーズのデザイン。(b) CART ビーズ上でのバーコード化 ORF の合成。(c) エマルジョンによる物理的区画化と CART ビーズを用いたバーコード化パーソナル ORF プールの作成。

BFG-Y2H 法は huORFeome ライブラリーなど既に樹立された ORF ライブラリーがあれば、これの ORF それぞれに特異的な DNA バーコードを紐付けて素早くインタラクトーム計測を行うことができる。しかしながら、現状診断などに有効なスピードで任意の臨床サンプルからトータル RNA を得て、ここから ORF ライブラリーを確立し、バーコード化するような手法はない。このため、本研究では水-油系エマルジ

ョン系と DNA バーコード化ビーズを用いてライブラリー作成時における様々なバイアスが最小化されたバーコード化パーソナル ORF ライブラリー合成手法 emperor (*en masse* generation of personalized ORFeome library) の開発を進めた。この emperor 法では、遺伝子毎に特異的な DNA バーコードカセットと連結した逆転写プライマーと増幅用プライマーがビオチン-アビジン結合によって表面に固相化された CART ビーズ (図 3a) がはじめに解析対象スペース内の ORF 全てについて準備される。本ビーズ上では DNA バーコードカセットと連結した cDNA を合成できるようになっている (図 3b)。ヒト組織からトータル RNA を得て、多種類のビーズ群と混合し、ビーズのみを精製することによって、ビーズ表面に特異的な RNA 産物が捕捉されたものを得る (図 3c)。1st strand cDNA を合成後、これをエマルジョン内に PCR 試薬と共にカプセル化して PCR 反応を行い、PCR 競合やプライマー間の干渉がない状態でそれぞれの ORF をプール状で一斉に増幅する。各 ORF はそれぞれ設計された DNA バーコードカセットと特異的に連結し、回収されたバーコード化パーソナル ORF プールは一斉に Gateway BP 反応によって Gateway Entry ベクターにクローニングされる。得られたバーコード化パーソナル ORF プールは混合状態のまま Gateway LR 反応によって Entry ベクターから Y2H ベクターにサブクローニングすることができ、得られたバーコード化 Y2H ベクター (DB-X または AD-Y) を混合状態のまま酵母株に形質転換することで、BFG-Y2H 法のための細胞集団が得られる。これを BFG-Y2H 法に適用することによってパーソナルインタラクトームを得られると考えた。

4. 研究成果

(1) サーベイススペースの確立 はじめに、研究開発のための基盤となる試験 ORF スペースを準備した。標準タンパク質間相互作用情報として複数のタンパク質相互作用同定技術で同定されたタンパク質相互作用データセットである hsPRSV1 と文献ベースで報告されているタンパク質相互作用データセット Lit-BM-13 の和集合を取り、これと BioGRID データベースにおいて Y2H 陽性であるものと大規模高品質 Y2H データ HI-II-14 の積集合を取ることで、410 のタンパク質間相互作用を得た。このスペースに含まれる ORF について研究開発においてトータル RNA を得る HEK293 細胞における発現レベルを確認した (図 4)。次に、ここからホモ二量体を形成するものを除き、436 遺伝子 (305 Y2H 陽性ペア) を得て、これを最終的な開発用サーベイススペースとした。

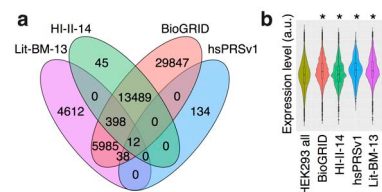
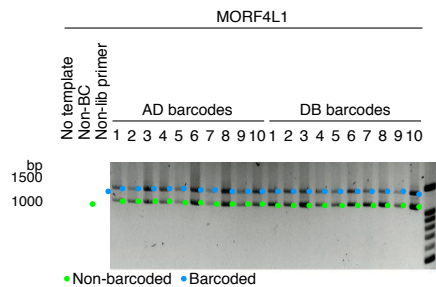


図 4 既存の Y2H インタラクトームデータセット (a) とそれらに含まれる遺伝子群の HEK293 細胞における RNA 発現量 (b)。

(2) CART ビーズ作成系の確立 ターゲットとなる ORF についてそれぞれ特異的なバーコード化 cDNA 逆転写プライマーを合成する手法を確立した。ここでは、過去に樹立した BFG-Y2H 法の DNA バーコードライブラリーから DNA バーコード部分を PCR 増幅後、これを ORF 特異的な逆転写用プライマー配列を持つ forward (Fw) プライマーと Gateway 反応用の配列を持つ reverse (Rv) プライマーによって再増幅する。この際、再増幅用の Rv プライマーがビオチン修飾されており、PCR 再増幅後、これをアビジンでコーティングされた磁気ビーズによって捕捉、二本鎖開裂反応後に cDNA 逆転写用プライマーとなる一本鎖 DNA が固相化された磁気ビーズを精製する。この反応一つから得られる磁気ビーズが対応する ORF のための CART ビーズとなる。本研究では 96 ウェル PCR プレートを用いてこの CART ビーズが並列に作成できることを示した。また得られた CART ビーズそれぞれを用いて 96 ウェル PCR プレートによる独立反応系で HEK293Ta 細胞から得たトータル RNA からターゲットとなる ORF を安定的に増幅できることを示し、この効率が DNA バーコードの配列に依存しないことを示した (図 5)。



(3) BFG-PCA 法の開発

Y2H 法は物理的に結合する直接的なタンパク質間の複合体形成を捉えるのに優れているが、転写因子複合体の再構成を利用するために、対象とするタンパク質 X と Y を酵母細胞内での発現と核内移行を必要とする。このため、膜タンパク質など細胞内局在と協調したタンパク質間相互作用を捉えにくいことが知られている。一方で、酵母では dihydrofolate reductase (DHFR) 変異体を利用した protein complementation assay (PCA) がタンパク質間相互作用をスクリーニングする手法として知られている。タンパク質 X および Y それぞれ DHFR を分断したものに融合したものを細胞内で発現させるとタンパク質間相互作用によって DHFR が再構成されるときのみ細胞が methotrexate (MTX) 耐性を獲得する。DHFR の再構成による MTX 耐性獲得は細胞の様々な場所で生じるタンパク質間相互作用によって得られるため、比較的多様なタンパク質間相互作用を捉えることができると考えられている。一方で、これまでに DHFR 断片を染色体遺伝子コード領域に導入して酵母から内在的に発現するタンパク質の相互作用を大規模に計測する手法はあったが、プラスミドベクターを用いて外因性の遺伝子がコードするタンパク質の相互作用を計測した例はなかった。そこで我々は BFG-Y2H 法で用いるベクターを基礎に BFG-PCA 法のためのツールキットベクターを構築し、PCA 法によってヒトインタラクトームが高速に計測できる系の開発を進めた。BFG-PCA 法によって hsPRsv1 の一部、ヒト、出芽酵母、分裂酵母におけるプロテアソーム関連遺伝子、核膜孔関連遺伝子のインタラクトームを計測したところ、BFG-PCA 法の感度が BFG-Y2H 法よりも優位に高いことを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ishiguro Soh, Mori Hideto, Yachie Nozomu	4. 巻 52
2. 論文標題 DNA event recorders send past information of cells to the time of observation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 54～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpa.2019.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuyama Nanami, Mori Hideto, Yachie Nozomu	4. 巻 52
2. 論文標題 DNA barcodes evolve for high-resolution cell lineage tracing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 63～71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpa.2019.05.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Marchant Axelle, Cisneros Angel F, Dube Alexandre K, Gagnon-Arsenault Isabelle, Ascencio Diana, Jain Honey, Aube Simon, Eberlein Chris, Evans-Yamamoto Daniel, Yachie Nozomu, Landry Christian R	4. 巻 8
2. 論文標題 The role of structural pleiotropy and regulatory evolution in the retention of heteromers of paralogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e46754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.46754	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 該当する
1. 著者名 Celaj Albi, Gebbia Marinella, Musa Louai, Cote Atina G., Snider Jamie, Wong Victoria, Ko Minjeong, Fong Tiffany, Bansal Paul, Mellor Joseph C., Seesankar Gireesh, Nguyen Maria, Zhou Shijie, Wang Liangxi, Kishore Nishka, Stagljar Igor, Suzuki Yo, Yachie Nozomu, Roth Frederick P.	4. 巻 10
2. 論文標題 Highly Combinatorial Genetic Interaction Analysis Reveals a Multi-Drug Transporter Influence Network	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Systems	6. 最初と最後の頁 25～38.e10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cels.2019.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Despres Philippe C., Dube Alexandre K., Seki Motoaki, Yachie Nozomu, Landry Christian R.	4. 巻 11
2. 論文標題 Perturbing proteomes at single residue resolution using base editing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15796-7	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 該当する

1. 著者名 Kim Jae-Hong, Seo Yeojin, Jo Myungjin, Jeon Hyejin, Lee Won-Ha, Yachie Nozomu, Zhong Quan, Vidal Marc, Roth Frederick P., Suk Kyounggho	4. 巻 9
2. 論文標題 Yeast-Based Genetic Interaction Analysis of Human Kinome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1156 ~ 1156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051156	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 該当する

1. 著者名 Sakata Rina C., Ishiguro Soh, Mori Hideto, Tanaka Mamoru, Tatsuno Kenji, Ueda Hiroki, Yamamoto Shogo, Seki Motoaki, Masuyama Nanami, Nishida Keiji, Nishimasu Hiroshi, Arakawa Kazuharu, Kondo Akihiko, Nureki Osamu, Tomita Masaru, Aburatani Hiroyuki, Yachie Nozomu	4. 巻 na
2. 論文標題 Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 na
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41587-020-0509-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marchant Axelle, Cisneros Angel F., Dube Alexandre K, Gagnon-Arsenault Isabelle, Ascencio Diana, Jain Honey A., Aube Simon, Eberlein Chris, Evans-Yamamoto Daniel, Yachie Nozomu, Landry Christian R	4. 巻 NA
2. 論文標題 The role of structural pleiotropy and regulatory evolution in the retention of heteromers of paralogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/564401	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yachie N
2. 発表標題 DNA barcode technologies to dissect heterogeneous biological systems
3. 学会等名 The 13th Intn'l Workshop on Advanced Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yachie N
2. 発表標題 Recording cellular events in DNA
3. 学会等名 Asian Synthetic Biology Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yachie N
2. 発表標題 Recording cellular events in DNA
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷内江 望
2. 発表標題 Bringing the sense of amazing yeast genetics to mammalian biology
3. 学会等名 第22回酵母合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷内江 望
2. 発表標題 Synthetic DNA memory devices to measure molecular and cellular dynamics
3. 学会等名 生命科学系フロンティアミーティング 2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷内江 望
2. 発表標題 Developing new genome editing technologies
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nozomu Yachie
2. 発表標題 A new genetic marker to analyze molecular dynamics of a same clone in complex cell populations
3. 学会等名 The 91st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nozomu Yachie
2. 発表標題 Scaling up massively parallel experiments using DNA barcodes
3. 学会等名 JST ImPACT Artificial Cell Program, Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nozomu Yachie
2. 発表標題 Chasing molecular and cellular dynamics using DNA barcodes
3. 学会等名 Cell Mapping Symposium, San Diego, US (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nozomu Yachie
2. 発表標題 We do not have a time machine, but can install a recording system to a cell
3. 学会等名 Asian Synthetic Biology Association 2018, Ceju, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Yachie Laboratory at the University of Tokyo http://yachie-lab.org/

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			
カナダ	Laval University	University of Toronto	Mt Sinai Hospital	