

令和 4 年 4 月 4 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16207

研究課題名(和文) 遺伝子発現ゆらぎの分散と多峰性が進化速度におよぼす影響の測定

研究課題名(英文) Quantifying how variance and multi-modality of gene expression affect evolution rate

研究代表者

近藤 洋平 (Kondo, Yohei)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教)

研究者番号：00724444

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)：遺伝子の発現量といった単体では生物の生存率への影響が大きい要素が進化を通していかに形作られてきたかを調べるため、タービドスタットによる連続培養、微小流体デバイスによる一細胞動態観察、および自動化された画像解析パイプラインの作成による高効率の実験室進化システムの構築をした。また、モデル生物である分裂酵母について蛍光タンパク質と連結した薬剤耐性遺伝子の過剰発現株、細胞周期関係因子の過剰発現株など、細胞生物学的研究に有用な株を作出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の進化実験はその進化生物学的意義に加え育種などの応用においても潜在的に大きな有用性を持つが、コスト面の制約に加えて実験とその後の解析に専門的人材が必要となるという理由により、長期かつ大きなスケールでの実施が難しい。本研究では、長期培養を可能とする培地の組成や培養温度といった条件の検討から自動化された画像解析パイプラインによる細胞の特徴づけまでという研究全体にわたった最適化を実施した。また研究途中で作出した、蛍光タンパク質との連結によって可視化された薬剤耐性分子を保持した酵母株も今後の研究の助けとなると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate how evolutionary processes have affected gene expression level and statistics which often produce only minor effects on cellular fitness, long-term lab evolution experiments and subsequent single-cell analysis would be effective. To build an efficient lab-evolution system, we combined three elements: (1) stable long-term culture by a turbidostat device, (2) a microfluidic device for characterizing cellular dynamics at a single-cell level, (3) an automated image analysis pipeline. Besides, we have produced several useful fission yeast strains such as fluorescently-tagged drug exporter and cell signaling components.

研究分野：定量生物学

キーワード：分裂酵母

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

同一の遺伝情報を持つクローン細胞集団内でも、遺伝子発現レベル、つまりとある遺伝子から翻訳されるタンパク質の数はばらつく。そしてこのばらつきによって不均一な表現型が生じる。この遺伝子発現のばらつき度合いはプロモーター配列やヒストン組成の変化を通して生物進化において選択圧を受ける性質であることがわかってきている。特に最近、発現のばらつきが病原体の薬剤耐性獲得やがんの悪性化に関与しているとの仮説も提案され、実験室進化による検証が期待されている。しかし、発現のばらつきが適応度や進化速度を上げるか下げるかといったごく基本的な問いにおいても未だに見解の一致が見られていない。その理由として (1) 遺伝子発現の確率的分布の統計的性質、具体的には平均・分散・多峰性などを独立に制御することが難しい、(2) 実験室進化に必要な長期の培養に加えて進化後の株の全ゲノムシーケンスや一細胞動態の観察・解析が必要となり資金的および人的コスト面の負担が大きい、といったことが挙げられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1) 合成生物学的手法を採用して発現のばらつきの統計的性質を詳細に制御するとともに、(2) 自動化された連続培養および自動化された画像解析パイプラインの作成による実験室進化の効率化を実施することで、上記の問題を解決する。

3. 研究の方法

(1) 人工遺伝子回路による発現分布の制御

分裂酵母野生株における主要な多剤排出トランスポーターである bfr1 を欠損した株に、改めて蛍光タンパク質によってタグ付けした bfr1 を、人工遺伝子回路とともに染色体に組み込む。このとき、エストラジオール発現誘導システム（分裂酵母での例は Ohira, Yeast, 2017 など）とプロモーターへの変異導入を組み合わせ、二峰の発現分布を示す株、単峰で様々な分散を示す株のセットを作出する。二峰株は、正のフィードバック回路を挿入し、その強度を発現誘導因子であるエストラジオールの濃度によって調整することで、二峰分布が得られるよう制御する。一方、単峰株はプロモーター変異導入によって発現分布が様々な異なる変異株のセットを得たのち、それぞれの平均発現レベルを誘導因子エストラジオールの濃度調整によって同一に揃える。

(2) 自動化された連続培養および自動化された画像解析パイプラインの作成

連続培養システムについては既存のタービドスタットデバイスを利用し、培地組成や培養温度を最適化する。一細胞観察はマザーマシンと呼ばれる微小流体デバイスで実施し、その画像解析については、Python によって実装する。観察に用いるデバイスおよび表現型の定量化について図1にまとめた。

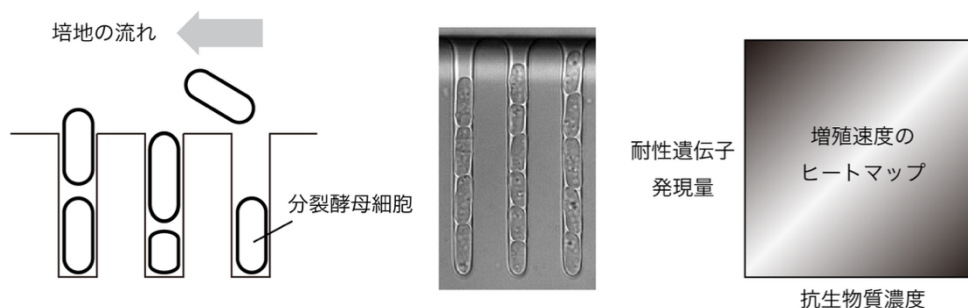


図1：(左) 微小流体デバイス「マザーマシン」の概要。(中) デバイス中の分裂酵母の微分干渉像。(右) 定量化すべき細胞表現型の概要。

4. 研究成果

(1) 人工遺伝子回路による発現分布の制御に関する研究成果

多剤排出トランスポーター bfr1 を分裂酵母野生株よりクローニングし、安定性に優れ高輝度の蛍光タンパク質 mNeonGreen によってタグ付けした上で、その発現の定量的制御をエストラジオール発現誘導システムによって可能にした株を作出した (図2)。さらに、bfr1 の発現量によって薬剤耐性の強弱を段階的に制御できることも確認した (図3)。しかし人工転写因子 Z3EV の発現に使用されているプロモーターを変更し、それによって Z3EV の発現量を下げたところ、エストラジオール依存的でない下流の遺伝子発現が見られるようになったため、予定していた株の作出は困難となった。そこで代わりに Tet 発現誘導システムを用いた遺伝子回路の作成を始めたが、こちらは研究計画期間内に完了しなかったため、今後の課題としたい。

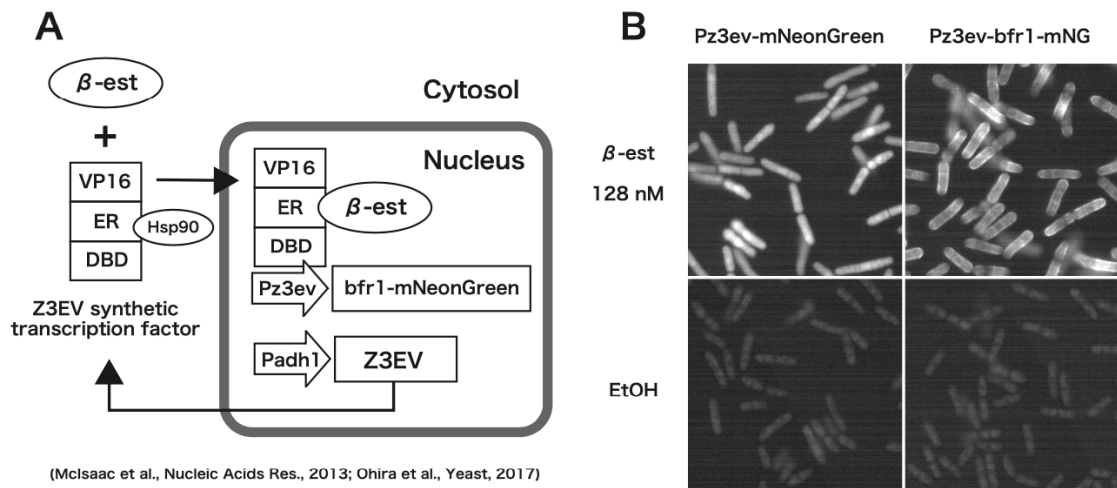


図 2 : (A) エストラジオール発現誘導システムによる *bfr1*-mNeonGreen の発現制御の概要。(B) エストラジオールの有無による *bfr1*-mNeonGreen の発現量の違いが、mNeonGreen の蛍光観察によって確認できる。(C) エストラジオール添加後の *bfr1*-mNeonGreen 発現上昇の観察。数時間程度という速い時間スケールでの発現誘導が確認できる。

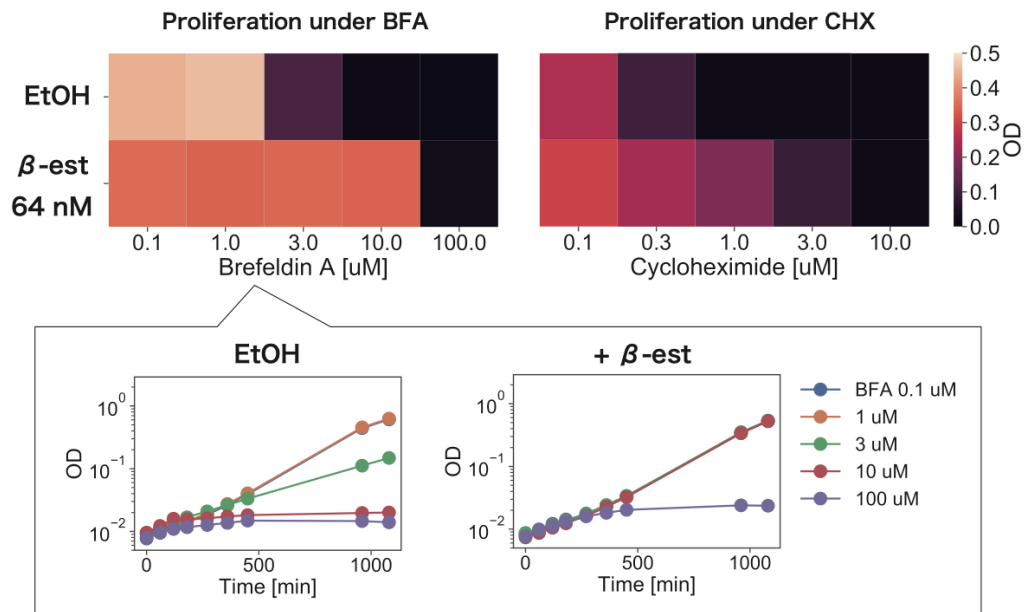


図 3 : (左上) *bfr1*-mNeonGreen 発現量依存的な抗生物質 (ブレフェルジン A) 耐性の定量化。(右上) 作用機序の異なる抗生物質 (シクロヘキシミド) への耐性も同様に *bfr1*-mNeonGreen 発現量依存的に強化される。(下) ブレフェルジン A 存在下での細胞増殖動態の光学濃度による観察。

(2) 自動化された連続培養および自動化された画像解析パイプラインの作成に関する研究成果タービドスタットによって細胞密度を一定に制御し、実験者によるメンテナンスを必要としない長期培養方法の確立を目指していたが、細胞凝集によって培地入出力口が塞がれるとともに培養環境が大きく変わってしまうという問題が生じた。先行研究 (Callens, *Yeast*, 2017) に従って、培地の攪拌速度・培養温度・培地組成を検討したが、細胞凝集を避けて培養が可能になっ

たのは一週間程度であり、当初予定していた長期（約一ヶ月）の培養は困難であることが判明した。そのため、長期培養が必要となった場合は実験者による2-3日おきの定期的な培地の希釈を実施した。

画像解析に関しては、ソーベルフィルタに基づく特徴量によって、マザーマシン内の細胞の伸長および分裂動態を自動的に検出することができた（図4）。また、多くの細胞についてデータを取得する必要がある場合にはマザーマシンのような特殊な細胞配置を仮定しないアルゴリズム作成も行ったが、その精度は実験者による事後の修正を必要とするレベルにとどまった。以上で確立した一細胞動態観察技術とその画像解析プロトコルは他のプロジェクトへも応用できた。

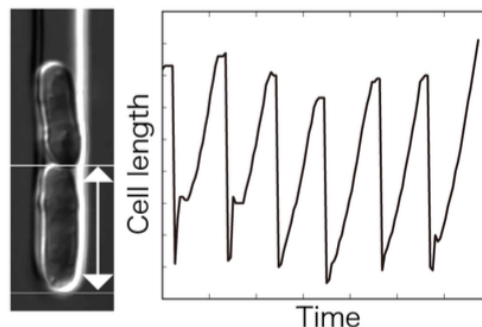


図4：画像解析によって自動化された細胞増殖測定

(3) 予期しなかった成果

多剤排出トランスポーター**bfr1** 以外にも実験室進化のための遺伝子を複数検討した。特に興味深かったのは、本研究で用いている分裂酵母 *S. pombe* の近縁種である *S. japonicus* の細胞サイズ制御因子 Pom1 (sjPom1) を *S. pombe* 細胞に発現させた場合である。図5に示すように sjPom1 は局在が弱く、強い細胞形態異常をもたらす。この観察結果は Pom1 の機能の一つが細胞伸長が起こる領域の設定であること、近縁種 *S. japonicus* が *S. pombe* より大型の酵母であることと整合的である。この分子メカニズムについて現状では明確な結論を出すに至っていないが、変異導入等によって Pom1 の機能と配列の関係を明らかにすることで、酵母における細胞サイズの決定機構の進化過程を解明につながると期待できる。

プロモーター強度

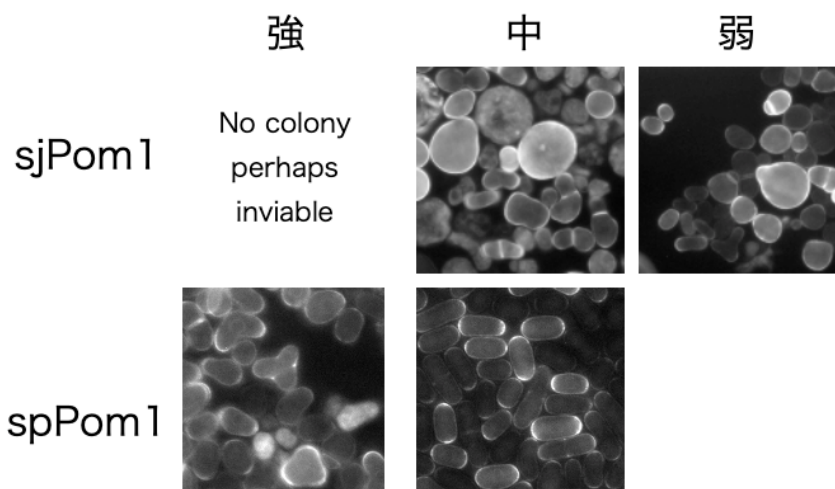


図5：近縁種の sjPom1 を蛍光タンパク質 mNeonGreen によってタグ付けした上で *S. pombe* にて過剰発現させた結果。sjPom1 が強い細胞形態異常をもたらしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakai Keiichiro, Kondo Yohei, Fujioka Hiroyoshi, Kamiya Mako, Aoki Kazuhiro, Goto Yuhei	4. 巻 134
2. 論文標題 Near-infrared imaging in fission yeast using a genetically encoded phycocyanobilin biosynthesis system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.259315	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 Yamamoto Kei, Miura Haruko, Ishida Motohiko, Mii Yusuke, Kinoshita Noriyuki, Takada Shinji, Ueno Naoto, Sawai Satoshi, Kondo Yohei, Aoki Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Optogenetic relaxation of actomyosin contractility uncovers mechanistic roles of cortical tension during cytokinesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-021-27458-3	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yohei Kondo, Yuhei Goto, and Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Stochastic dynamics of expression of multidrug resistance transporter and growth at single-cell level
3. 学会等名 10 th International Fission Yeast Meeting（国際学会）
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
---------	---------