

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20700270  
 研究課題名（和文） 酵母 1 遺伝子摂動株ライブラリによる表現型変化の網羅的解析とその予測システムの開発  
 研究課題名（英文） Comprehensive phenotypic analysis of yeast gene perturbation libraries and development of prediction system  
 研究代表者  
 古澤 力（FURUSAWA CHIKARA）  
 大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授  
 研究者番号：00372631

研究成果の概要（和文）：細胞内の遺伝子を破壊・増強することによって、どのように細胞の表現型が変化するかを理解することが出来れば、目的の表現型を持った細胞をデザインする為の基盤となる。そこで本研究は、酵母の 1 遺伝子破壊・1 遺伝子増強株ライブラリを用いて、その遺伝子破壊・増強の効果を網羅的に測定した。その結果を用いて、遺伝子破壊摂動に対して頑強あるいは脆弱な細胞機能の同定と、発現量変化との相関解析を行った。

研究成果の概要（英文）：A question how cellular phenotype changes by genetic modifications is important for rational design of desired microorganisms for industrial purpose. Here, we comprehensively analyzed the phenotypic changes of yeast strains in single gene deletion library and single gene overexpression library. Based on the data, we found gene functional categories which are robust or fragile for the gene perturbations, and we also analyzed the correlation between expression changes and response to the gene perturbations.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：生体生命システム情報学

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子操作技術の開発により、細胞内の特定の遺伝子に破壊や発現増強といった摂動を与え、それによって細胞の表現型を変化させることが可能となっている。こうした遺伝子摂動の技術を用いることによって、細胞の表現型を思いどおりに変化させることが可

能となれば、工学や医学の分野における生産性や効率を大きく向上させることができる。例えば近年、環境問題との関連から微生物を用いたバイオエタノールの生産の重要性が増しており、その生産性の向上のためには、遺伝子操作によりエタノールの生産性を向上させた微生物の育種が必要となる。

しかしながら、どの遺伝子をどのように操作すれば目的の表現型となるかを予測することは、現在でも非常に難しい問題として残されている。これまでに工学分野でしばしば取られていた手法は、遺伝子への摂動をランダムに与え、その変異体集団の中から望みの表現型に近いものを取り出すという手法であるが、この手法は一定の成功を与えたものの、必ずしも効率的な手法と言えない。それに対し、近年のゲノム情報の獲得と、それを利用したマイクロアレイ実験などの網羅的なデータ取得技術の発展は、これら高度なデータ取得とバイオインフォマティクスを援用した解析技術によって、細胞育種の新たな戦略が提示されるものと期待されている。例えば、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析を用いて、目的とする環境変化に対して発現変動を起こす遺伝子をスクリーニングし、それらに遺伝子操作を加えることによって表現型の変化を引き起こすといった研究が盛んに行われている（例えば、Hirasawa et al., J. Biotechnol. 131,2007）。しかしながら、この手法を用いることによって、発現変化によって遺伝子操作後の表現型変化が完全に予測できるわけではなく、こうした高度なデータ取得とバイオインフォマティクスによる解析が、単に経験論的やランダムに遺伝子を選択する場合と比較して、真に効率的な表現型改変を可能にしているかについては不明な点が多いのが現状となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、1 遺伝子破壊ないしは1 遺伝子発現増強の操作を加えたライブラリを用いて、その遺伝子摂動による表現型変化を網羅的に測定する。その表現型変化と他の実験/解析結果との相関を調べることによって、効率的に目的の表現型を獲得する方法論を構築することを目指す。つまり、1 遺伝子への摂動について、それが引き起こす表現型変化の「正解」を全て知った上で、その変化をどこまで他の実験/解析データで予測可能であるかを検証することによって、目的表現型への育種がどこまで効率的に可能であることを明らかにすることを目指す。

その目的へ向けて、酵母の1 遺伝子破壊ライブラリの各株に環境変化ストレス（エタノール・高浸透圧）を与えた場合の増殖速度変化を網羅的に測定し、同条件でのマイクロアレイによる網羅的発現解析結果との相関を解析する。例えば、ストレス添加後に発現量が増加/減少する遺伝子について、その破壊がストレス応答にどのように影響を与えるかを調べることにより、マイクロアレイによる発現解析によって、どの程度遺伝子破壊による影響が予測できるかを検討する。加えて、酵母の1 遺伝子破壊ライブラリと1 遺伝子

発現増強ライブラリの各株を同条件で培養し、遺伝子破壊と増強の効果の相関を解析する。この解析により、1つの遺伝子破壊がある表現型変化をもたらした場合、その遺伝子を発現増強することによって、逆の表現型変化が起こる確率を統計的に評価する。

遺伝子操作による表現型変化と、網羅的発現解析など他の実験データとの関係は、これまでは経験論的に議論されてきた。こうした膨大なデータ間の関係を解析し、データによって何がどこまで予測できるか評価することを目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでの破壊株ライブラリを用いた研究では、固体培地上でのコロニーの有無で細胞増殖を測定するケースが多いが、この手法だと増殖速度の小さい変化を定量的・統計的に解析することが難しい。本研究では、96穴プレートを用いた液体培地での培養系において、細胞濃度変化の時系列を用いて求めることにより、高い精度かつ十分に高速（5000株の測定を4日間）な網羅的増殖速度測定を可能としている。この方法を用いて、酵母1 遺伝子破壊ライブラリの各株（おおよそ5000株）を非ストレス環境、エタノールストレス環境、高浸透圧ストレス環境の3種類の環境で培養し、比増殖速度を定量する。そのデータを統計解析することにより、破壊によってストレス耐性やストレス感受性となる遺伝子を同定し、それらのストレス耐性/感受性をもたらす遺伝子が、同じ条件で取得したマイクロアレイによる網羅的発現解析の結果と対応させる。また、1 遺伝子発現増強ライブラリの各株を非ストレス環境下で培養し、比増殖速度を定量することによって、遺伝子破

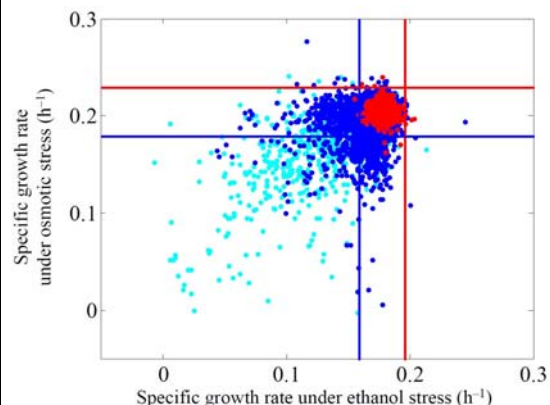


図1：1 遺伝子破壊株のエタノールストレス/高浸透圧ストレス環境化での増殖速度。図中の青点は、1 遺伝子破壊株の2 条件での比増殖速度を示す。赤点は親株の比増殖速度、水色は非ストレス環境化において増殖阻害が生じた1 遺伝子破壊株のデータを示す。赤/青の直線は、親株と比較して有意に耐性または感受性となった破壊株を決めるための閾値を示す ( $p < 0.01$ )。

壊と発現増強による影響が、どのような関係にあるかを解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ストレス環境下における 1 遺伝子破壊の影響の網羅的解析

非ストレス環境・エタノールストレス環境 (8% エタノール)・高浸透圧ストレス環境 (1M NaCl) の 3 つの条件で、酵母 1 遺伝子破壊ライブラリの各株を培養し、その比増殖速度を定量した。その結果、エタノールストレスに対して 864 株 (全体の 18%)、高浸透圧ストレスに対して 637 株 (13%) の破壊株が有意水準 1% でストレス感受性と判定された。まず、エタノールストレス環境下と高浸透圧ストレス環境下での各破壊株の比増殖速度の相関を解析したところ、両者の相関は低いことが判明した (図 1)。このことは、エタノールストレス耐性と高浸透圧ストレス耐性はことなる耐性機構を有することを示唆している。また、この破壊によってストレス感受性を示した遺伝子が、どのような機能カテゴリに集中しているかを統計解析した。結果として、ペルオキシソームに関与する遺伝子を破壊するとエタノールストレス感受性になる、つまりはペルオキシソームがエタノールストレス耐性に関与している可能性を発見するなど、ストレス耐性に関する新たな知見を得ることができた。

次に、この網羅的表現型解析データを用いて、1 遺伝子破壊の影響をマイクロアレイによる発現解析データによって予測が可能かを検討した。マイクロアレイによる発現解析のデータを解釈する場合にはしばしば、環境変化を与えた時に発現量が上昇した遺伝子は、その環境への応答にとって重要であると考えられてきた。しかしながら、本研究で解析した網羅的表現型解析の結果は、破壊によってストレス感受性となる遺伝子において、

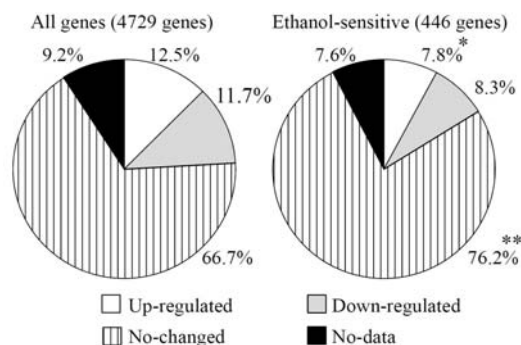


図 2: 破壊によってエタノールストレスへの感受性を示した遺伝子と、エタノールストレス添加後の発現量変化の関係。左の円グラフは全ての遺伝子、右の円グラフは破壊によりエタノール感受性を示した遺伝子のデータを示す。右のグラフでは、発現量の変化がない遺伝子が有意に多い。\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

ストレス添加の後に発現量が上昇している遺伝子の割合は、感受性を示さない遺伝子と比較して有意に低いことが示された (図 2)。このことは、ストレス耐性に関与する遺伝子は、かならずしもストレス添加後に発現上昇を示す割合が高いわけではないことを意味している。この結果は、マイクロアレイによる発現解析によって、ストレス耐性に関与する遺伝子をスクリーニングすることが難しいことを示唆している。

##### (2) 1 遺伝子破壊と 1 遺伝子発現増強の増殖速度への影響の網羅的解析

酵母の 1 遺伝子破壊と 1 遺伝子発現増強ライブラリの各株を合成培地において培養し、その比増殖速度を定量することによって、遺伝子摂動の増殖への影響を解析した。その結果、1 遺伝子破壊ライブラリにおいて 646 株 (14%)、1 遺伝子発現増強ライブラリにおいて 1302 株 (22%) において親株と比較して有意な比増殖速度の低下が見られた。この破壊ないしは発現増強によって増殖低下をもたらす遺伝子の間の相関を解析したところ、両者には有意な相関は発見できなかった (図 3)。また、この摂動によって増殖阻害をもたらす遺伝子の機能カテゴリを調べることによって、例えば破壊と発現増強の双方で増殖阻害をもたらす確率の高い機能カテゴリなどの同定を行った。結果として、細胞周期やストレス応答といった時間的に発現量が変化する遺伝子については、破壊と増強の双方において増殖阻害をもたらす可能性が高い、つまりは遺伝子レベルでの摂動にたいして脆弱であることが統計的に示された。こうしたデータは、酵母の遺伝子摂動による育種についての基礎データになると期待できる (論文投稿中)。

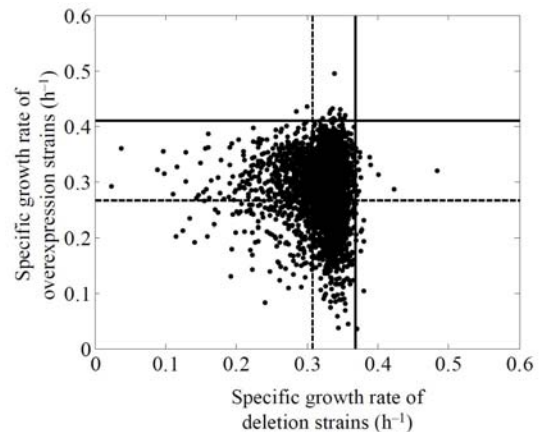


図 3: 1 遺伝子破壊株と 1 遺伝子発現増強株の非ストレス環境下での増殖速度の関係。図中の点は、各遺伝子の破壊/発現増強株の増殖速度を示している。統計解析の結果、これらの点には有意な相関を見出すことは出来なかった。

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 6 件)

Takashi Hirasawa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, *Saccharomyces cerevisiae* and DNA microarray analyses: what did we learn from it for a better understanding and exploitation of yeast biotechnology?, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, published online, DOI 10.1007/s00253-010-2582-7  
Takashi Hirasawa, Aki Ookubo, Katsunori Yoshikawa, Keisuke Nagahisa, Chikara Furusawa, Hideki Sawai, Hiroshi Shimizu, Investigating the effectiveness of DNA microarray analysis for identifying the genes involved in L-lactate production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, vol. 84(6), 2009, 1149-1159  
Thai Nho Dinh, Keisuke Nagahisa, Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA Microarray, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 査読有, vol. 32(5), 2009, 681-688  
Yohei Shinfuku, Natee Sorpitiporn, Masahiro Sono, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*, *Microbial Cell Factories*, 査読有 vol. 8(1), 2009, 43  
Katsunori Yoshikawa, Tadamas Tanaka, Chikara Furusawa, Keisuke Nagahisa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research*, 査読有, vol. 9(1), 2009, 17-30  
Katsunori Yoshikawa, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, Genome-wide analysis of the effects of location and number of stress response elements on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, vol. 106(6), 2008, 507-510

[ 学会発表 ] (計 4 件)

平沢敬, 大久保亜紀, 竹國正矩, 吉川勝徳, 古澤力, 清水浩, 酵母を用いた L-乳

酸生産に関連する遺伝子のゲノムワイドな同定, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日, 横浜

竹國正矩, 平沢敬, 吉川勝徳, 大久保亜紀, 古澤力, 清水浩, 酵母を用いた遺伝子破壊による L-乳酸生産に重要な遺伝子の同定, 酵母を用いた L-乳酸生産における遺伝子破壊の影響の網羅的解析, 生物工学会 61 回年会, 2009 年 9 月 24 日, 名古屋

Katsunori Yoshikawa, Tadamas Tanaka, Chikara Furusawa, Keisuke Nagahisa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, Comprehensive phenotypic analysis of yeast under ethanol stress condition, The 13th international Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2008), Oct. 15, 2008, Dalian, China

平沢敬, 大久保亜紀, 吉川勝徳, 永久圭介, 古澤力, 清水浩, 乳酸生産能を付与した酵母の網羅的遺伝子発現情報に基づいた生産性向上のための育種, 化学工学会 第 40 回秋季大会シンポジウム, 2008 年 9 月 24 日, 仙台

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/furusawa/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古澤 力 (FURUSAWA CHIKARA)  
大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号: 00372631

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし