

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25640110

研究課題名(和文)人工遺伝子回路によって誘導される適応現象のトランスオミクス解析

研究課題名(英文)Transomic analysis of adaptation induced by a synthetic gene circuit

研究代表者

伊藤 隆司 (ITO, TAKASHI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：細胞には、様々な環境の変化に柔軟に適応し、その適応形質を安定に継承する能力があります。この能力は遺伝子回路自体がもつ可塑性に基づくものであり、突然変異は適応状態を固定する役割を果たすという考え方が古くから唱えられてきました。私達は、人工遺伝子回路を介して酵母細胞に選択圧を加えると、それに適応した状態が選択圧消失後も安定に保持される現象を見出しました。その仕組みを調べるために、適応を起こした細胞のDNA、染色体、RNAの各階層を網羅的に調べるトランスオミクス解析を行い、動く遺伝子やヒストン修飾やミトコンドリアの関与の可能性を示唆する結果を得ました。

研究成果の概要(英文)：The cell can adapt to various environmental changes and stably inherit the adapted states to the daughter cells. It has been long argued that such adaptation stems from the plasticity of gene circuits and that mutations play a role in fixation of the state in the population. We used a synthetic gene circuit to expose yeast cells to a selection pressure and found that they can stably maintain an adapted state even after its withdrawal. To address the mechanism underlying this phenomenon, we took a transomic analysis that integratively examines the layers of the genome DNA, chromatin, and RNAs, and revealed evidence for potential involvement of movable genetic elements, histone modifications and mitochondria.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：システムゲノム科学

キーワード：人工遺伝子回路 トランスオミクス 適応

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、環境の変化によって生じた新しい選択圧に対して、しばしば柔軟な適応を示す。この適応能力に関しては集団中に多様性があり、そこに選択がかかって適応能力の高いアレルが固定され(遺伝的同化)、進化が促されるという説がある。50年代の Waddington による実験では、ショウジョウバエ胚のエーテル処理による四枚翅個体の出現に対する人為的選択の反復によって、四枚翅個体の出現率が次第に高まり、最終的にはエーテル処理なしでも四枚翅の個体が得られるに至った。この結果は、四枚翅を出現させる能力(=人為的選択に対する適応能力)における多様性が集団中に存在しており、それが選択されたと解釈されてきた。実際、40年後にこの実験を再現した Hogness らによって、*Ubx* 遺伝子の多型の重要性が示されている。つまり、胸節が重複する *bithorax* 変異体からも明らかのように、発生システム自体が潜在的に持つ四枚翅形成能力が、変異ではなくて環境への応答として表現型模写の形で具現化したところに人為的選択をかけたのがこの実験の本質である。

このような「適応が先にあって変異による固定が後に続く」という進化機構は、表現型可塑性に着目してきた生理学者・発生学者からは重視されてきたが、獲得形質の遺伝に近い考えであるため、集団遺伝学を基盤とするネオダーウィニズムの中では異端視されてきた。しかしながら、適応形質が世代を越えて継承される現象自体は様々な野生生物で繰り返し観察・報告されてきた。

更に最近では、モデル生物においても分子レベルでの証拠を伴った「世代を越えるエピジェネティック遺伝(transgenerational epigenetic inheritance)」の報告も相次いでいる。そして表現型可塑性・適応の分子基盤として、遺伝子回路(転写ネットワーク)の可塑性とエピジェネティクスによる安定継承が注目を集めている。

我々は、出芽酵母におけるキー代謝物の変動をモニターするための人工遺伝子回路の構築に取り組んできた。我々が対象としたのは S-adenosylmethionine (SAM) であるが、酵母には SAM 応答性プロモータが知られていないので、大腸菌 *MetJ* とそのオペレータ *metO* を利用した。*MetJ* は SAM と複合体を形成した時にのみ *metO* に結合できる。そこで *MetJ* に転写活性化ドメイン B42 を融合した *MetJ*-B42 を発現させて、*metO* を持つプロモータによって蛍光蛋白質 Venus と栄養要求性マーカー *HIS3* と *LEU2* を発現する人工遺伝子回路を持つ株を作成した。この株が細胞内 SAM 濃度を反映してレポーター遺伝子を誘導することを確認した上で、ゲノムライブラリーを形質転換し、*His* と *Leu* を欠いた培地で選択を行うことで、SAM レベルを上昇させるマルチコピー・アクティベーターとして *GAL11* の同定に成功した。

この一連のスクリーニングの過程で、我々は奇妙な現象に遭遇した。高い蛍光強度と *His<sup>+</sup>/Leu<sup>+</sup>* の表現型を示し、生化学的にも SAM レベルの上昇が確認されたにも関わらず、回収したプラスミドがインサートを欠くクローンが複数単離されたのである。それらは、興味深いことに、選択圧をかけない状態でも10世代以上に亘って高い SAM 濃度を保ち続けた。つまり、これらの株は、酵母本来の遺伝子回路を含む内在性ネットワークの挙動を変えて SAM レベルを上昇させ、人工遺伝子回路によって加えられた選択圧に対応したものと考えられる。この現象は、突然変異によるものと考えerには出現頻度が高すぎる。更に、様々なストレスによって獲得した形質(高 SAM レベル)が消失することを示す予備的結果も得られており、突然変異による不可逆的適応とは考えにくい。

次に、人工遺伝子回路を持った宿主株をライブラリーの形質転換なしに選択圧に晒したところ、今度はレポーター遺伝子の発現が誘導されているにも関わらず、SAM は上昇していない株が単離された。これらの株では、酵母本来の内在性ネットワークではなくて人工遺伝子回路の部分が適応を起こしたと考えられる。

この現象に興味を覚えた我々は、文献を調査して2006年に Braun らが類似の現象を報告していたことに気付いた。彼らは、必須遺伝子 *HIS3* をガラクトースで誘導されてグルコースで抑圧される *GAL1* プロモータ支配下に置いた *GAL1-HIS3* 株を作成し、グルコース存在下 *His* 非存在下で培養した。すると高頻度で *His<sup>+</sup>* 株が得られ、それぞれの株が遺伝子回路の可塑性(遺伝子発現の stochastic な性質に起因するユニークなトランスクリプトーム形成)を介して適応していたという。しかしながら、*His<sup>+</sup>* 形質の安定性つまり適応したトランスクリプトームの安定継承に関する解析は十分には行われておらず、エピジェネティクスの視点からの解析が完全に欠落していた。一方で、最近になって、同様の適応現象は酵母のみならずショウジョウバエでも起こることが報告され、エピジェネティック制御因子ポリコーム遺伝子群の関与も示された。

我々が見出した適応現象は遺伝子回路(転写ネットワーク)の可塑性とエピジェネティクスを介した安定継承を反映するものである可能性が高く、適切な設定を行えば適応に基づく進化機構を考える上で興味深い実験系になると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々は、出芽酵母に人工遺伝子回路を利用して S-アデノシルメチオニンを高く保つような選択圧を加えると、選択圧に対する適応が誘導されるのみならず、それが選択圧消失後も安定に継承されることを見出した。本研究では、この適応現象についてゲノム・エピ

ゲノム・トランスクリプトームの階層を跨ぐトランスオミクス解析を行うことによって、適応誘導の背景にある遺伝子回路の可塑性と適応した発現パターンの安定継承を司るエピジェネティクス機構の2点を明らかにする。そうして得られた知見に基づいて、遺伝学的・薬理学的手法による適応の強化・解消も試みる。これらの研究を通して、遺伝子回路の可塑性による適応進化の機構を探るとともに、合成生物学的応用を念頭に遺伝子回路の潜在的適応能力の制御にも検討を加える。

### 3. 研究の方法

適応を誘導した株を複数選択した上で、ゲノム配列決定による変異の有無の検討、RNA-Seqによるトランスクリプトーム変動の解析、およびヒストン修飾の解析を行う。

### 4. 研究成果

#### 1) 適応株の選択

人工遺伝子回路を有する株を選択圧存在下 (His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>) で培養した細胞の中から、選択圧がない条件でも人工遺伝子回路支配下にある Venus レポーター遺伝子の発現が高く保たれるものを選択した。

上記の株について HPLC を用いて SAM 濃度の計測を行い、SAM 濃度が低下している株 (No.1) と高く保たれている株 (No.2) を選んで以降の解析に供した。No.1 はインサートを持たないベクターのみを保持していた。一方、No.2 は遺伝子をコードしていない遺伝子間領域をインサートとするクローンを保持していた。No.1 では 5-FOA 処理でプラスミドを脱落させても SAM 濃度は低いままであったが、No.2 では SAM 濃度の低下が認められたが、人工遺伝子回路は適応状態を維持していた。

#### 2) RNA-Seq 解析

No.1 と No.2 の株とそれぞれからプラスミドクローンを脱落させた株および適応前のホスト株について、RNA-Seq を行った。

プラスミドクローンを保持した No.1 株においては、energy reserve metabolic process (RGI1, RGI2) や siderophore transport (FIT2, FIT3) の上昇が見られ、hexose transport (HXT3, HXT4) の低下が観察されたが、その意味合いは不明である。

一方、プラスミドクローンを保持した No.2 のクローンについては、レトロトランスポゾン Ty1 に由来する転写物の発現が顕著に上昇している一方で、Met 合成遺伝子の発現の低下が認められた。後者については、細胞内 SAM 濃度の上昇に対する応答と解釈することが出来る。一方で Ty1 の顕著な誘導は予想外の結果であった。

そこで Ty1 の中から YCL019W を代表として選択して、最初のスクリーニングで得られた適応株についてその発現レベルを定量 RT-PCR 法によって計測し、SAM 濃度との関係

を検討したところ、興味深いことに両者の間に相関関係が見出された ( $R = 0.7$ )。

また、No.2 株についてプラスミドクローンの有無での比較を行った。その結果、プラスミドクローンを保持した状態では、脱落した状態と比較して、形質膜関連遺伝子の発現が高く、ミトコンドリア関連遺伝子の発現が低いことが見出された。

更に、No.2 株でプラスミドを脱落させた株は人工遺伝子回路の適応状態は維持しているので、それと元々のホスト株との比較も行った。その結果、プラスミドを脱落させた場合においても Ty1 の発現は継続していることが見出された。しかしながら、適応の維持のメカニズムを示唆するような遺伝子発現変動は見出されなかった。

#### 3) ヒストン修飾の解析

上記のような発現パターンに関連するエピジェネティック修飾を探るためにヒストン修飾をウェスタンブロット法で検討した。その結果、No.2 株において H3K4me3 のレベルが低下することが見出された。

そこで H3K4me3 レベルが適応に与える影響を検討するため、H3K4 methylase である Set1 の破壊株と H3K4 demethylase である Jhd2 の破壊株について適応を調べた。その結果、set1 株では Venus レポーター遺伝子の発現が上昇して適応様の表現型が観察されたのに対して、jhd2 株では適応の減弱が観察された。以上の結果は、適応の獲得に H3K4me3 が関与することを示唆する。

#### 4) ゲノム配列の決定

変異の影響についても検討を加えるために、ゲノム配列の決定を行った。その際に、プラスミドの脱落操作によっても SAM レベルが高いまま保持される No.3 株も加えて解析を行うことにした。

その結果、No.1~3 株のいずれにおいても、Ty1 の挿入も含めて明瞭な突然変異は見出されなかった。また、各染色体にマップされるリード数については、rRNA 遺伝子座を有する XII 染色体を除けば、染色体サイズと比例しており、aneuploidy も見出されなかった。

ところが、興味深いことにミトコンドリアゲノムにマップされるリード数を野生株と比較すると、No.2 と No.3 において低下が認められた。更に、ミトコンドリアゲノムへのマッピングの状況を視覚化すると No.3 ではミトコンドリアゲノムの一部欠失を示す結果が得られた。これは No.2 株においてプラスミドクローンを保持した高 SAM 濃度状態下ではミトコンドリア関連遺伝子の発現レベルが低下していたという RNA-Seq の結果とも考え合わせると興味深い結果であり、SAM レベルの制御にミトコンドリアが関与することを示すものであった。

#### 5) 考察

以上の解析の結果から、適応の創出に関して、Ty1 発現との相関と H3K4me3 の関与が示唆されたが、両者の関係は今後の課題である。更に SAM レベルに関しては、ミトコンドリアの関与も示唆された。Ty1 やミトコンドリアの関与はいずれも予想外のことであり、仮説駆動型ではないオミクス解析をゲノムおよびトランスクリプトームという複数階層で行った結果、初めて明らかになったものである。より広範なエピゲノム解析までは達成できていないが、こうしたトランスオミク的なアプローチが適応現象の解明に有効であることを示しており、今後の更なる解析に向けての基盤データが得られたと考える。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

梅山大地、伊藤隆司 人工遺伝子回路によって誘導される適応現象のトランスオミクス解析 第36回日本分子生物学会年会 平成25年12月5日 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 隆司 (ITO, Takashi)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：90201326

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：