

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：13901
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2019～2022
課題番号：19K22383
研究課題名（和文）必須遺伝子ロスを補う潜在的代替機構の網羅的探索

研究課題名（英文）Study on bypass of gene essentiality

研究代表者

五島 剛太（Goshima, Gohta）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：20447840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞分裂を制御する遺伝子は広い生物種で共通していることが多いが、一方で、特定の遺伝子を持っていない生物種もある。この場合、その生物種は進化の過程で、まだ私たちが把握できていない遺伝子を使った機構を発達させたと考えられる。本研究では、実験室内で生物の遺伝子変異を蓄積していく方法により、細胞分裂に必須とされてきた遺伝子をひとつ失った酵母が、代替機構を発達させることで致死性を回避し増殖し続けられる例を示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母を使った実験で、細胞分裂に必須と考えられていたタンパク質リン酸化酵素Poloをなくしても、別のタンパク質リン酸化酵素CK1を介した予想外の細胞分裂制御機構が働くことがわかった。両者の同様の関係性は、ヒトの癌患者由来の培養細胞においても確かめられた。Poloの阻害剤は抗癌剤として有力視されているが、癌細胞の分裂（増殖）を抑えるためには、別機構との二重阻害が必要かもしれないことも示唆された。

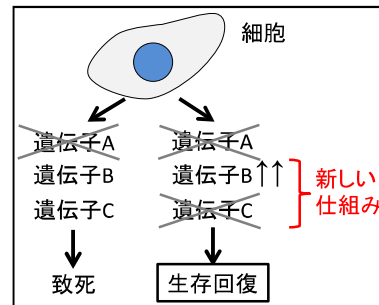
研究成果の概要（英文）：Although genes that control cell division are often conserved in a wide range of species, some species do not have a specific gene. In this case, it is assumed that the species has developed an alternative mechanism during the course of evolution. In this study, by means of experimental evolution, we showed such an example: a yeast strain that has lost a gene “essential” for cell division continued to proliferate by developing an alternative “masked” mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分裂酵母必須遺伝子

1. 研究開始当初の背景

各生物種には、構成する細胞の増殖や生存に必要な遺伝子(必須遺伝子)が数多く存在する。たとえば単細胞生物の酵母では、約 5000 の全遺伝子のうちの 20%が生育に必須の遺伝子である。ところが、近年の様々な生物種の DNA 解析の結果、ある生物種では生育に必須の遺伝子が、別の生物種では進化の過程で失われるという例が数多く認められた。これは、生物種によっては、必要不可欠と思われていた遺伝子がなくとも増殖可能であることを意味しており、増殖を可能にする未発見の仕組みが存在することを示唆している。逆に言



図：研究の概要

うと、ヒトを含めた多くの生物種において、多くの細胞活動に対して、主要機構の他に代替として使われうる機構が潜在していると考えられる。主に必須遺伝子に着目してきた私たちはまだ細胞に備わる機構の全貌を明らかにできていないことが推測される。

2. 研究の目的

本研究では、真核細胞内の必須活動には、よく知られた「主要機構」だけでなく、これまで見逃されてきた「サブ機構」が存在し、特定の細胞種や環境下ではサブ機構が極めて重要な役割を担うという仮説を立てた。そして単細胞真核生物・分裂酵母を用いてこの機構の網羅的同定に挑み、細胞に備わった機構の全貌を解明する基盤の確立を目指す。具体的には、分裂酵母を材料に、必須遺伝子を完全に失った細胞の増殖能力を実験的に回復させることを試みる。そして、増殖能力が回復した要因を分子レベルで突き止めることで、必須遺伝子のロスを代替するサブ機構を明らかにする(図)。多くの遺伝子を解析することで、必須遺伝子を失うという生物進化上のイベントについて、その一般的仕組みを考察する。たとえば、現在の主要機構が発達したのは必然だったのか、あるいは別の進化の方向性もあり得たのか、議論する。本研究は、「主要機構」を主な研究対象としてきたこれまでの細胞生物学の体系を大きく変革させる潜在性を有すると考えた。

3. 研究の方法

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の増殖に必須とされている遺伝子について、常法に従い相同組換えにより必須遺伝子を1コピー分、2倍体の分裂酵母から取り除く(薬剤耐性マーカーで置き換える)。得られた酵母を減数分裂させ1倍体胞子を単離し、薬剤含有培地に蒔く。必須遺伝子が破壊されているため酵母は通常増殖することができないが、(1)紫外線を当ててゲノムに任意の変異を導入する、(2)胞子に対して任意の酵母ゲノム DNA 断片を含む多コピープラスミドライブラリーを導入する、ことで増殖する酵母株を探索する。すなわち、他の遺伝子を人為的に増量したり変異させたりすることで、本来なら増殖不可能な酵母の増殖能力を回復させる(図)。増殖はするものの極めて速度が遅い株が得られた場合は、さらに液体培地内で継時的に希釈と飽和増殖を繰り返すことで(約 200 世代)、増殖能力が最大限に上がった酵母株を単離する(これは「Experimental evolution (進化実験)」と呼ばれる手法である)。いずれの場合も、酵母ゲノムや多コピープラスミドの DNA 配列を解析し、変異部位やプラスミドに含まれる遺伝子を同定する。それにより、こういった代替機能が亢進したのかを明らかにする。

4 . 研究成果

まず、分裂酵母の 92 の必須遺伝子について、常法に従い相同組換えにより必須遺伝子を 1 コピ一分、2 倍体の分裂酵母から取り除いた (G418 耐性マーカーで置き換えた)。得られた酵母を減数分裂させ 1 倍体胞子を単離し、薬剤含有培地に蒔いた。必須遺伝子が破壊されているため酵母は通常増殖することができないが、紫外線を当ててゲノムに任意の変異を導入することで、増殖する酵母株を探索した。その結果、20 もの遺伝子について、他の遺伝子を人為的に変異せることで、本来なら増殖不可能な酵母の増殖能を回復させられた。一部のケースについて酵母ゲノムの DNA 配列を解析したところ、未知だった代替機能が亢進した可能性が示唆された。たとえば、ミトコンドリア遺伝子の欠失株の致死性は、タンパク質分解系の遺伝子の変異により消えた。本研究成果は国際共同研究として発表した (Takeda et al. 2019)。

次に、細胞分裂に必須の機能を果たす遺伝子群に絞って追加解析した。その結果、細胞分裂期の初期から最終盤にかけて幅広く重要な働きをするとされてきた「Polo キナーゼ」をコードする遺伝子を完全に欠失した分裂酵母が、複数のサプレッサー変異により増殖することを見出した。Polo キナーゼは多くの細胞種に保存され、細胞分裂、とりわけ 2 極性の紡錘体の形成に必須とされていたため、生存株の取得は予想外であった。

Polo キナーゼを欠失した生存細胞の全ゲノム配列決定とその後の遺伝的相互作用の実験から、Polo 欠失酵母の致死性の回避は、16 の異なる遺伝子の変異を介して達成されることが明らかになった。これらの中には、Polo キナーゼの下流にあることが示されていた微小管重合核形成因子・gamma-チューブリン複合体の複数のサブユニットの点変異が含まれていた。またすぐには細胞分裂機能と結びつけることができない転写因子 (SAGA complex) もあった。さらに、驚いたことに、細胞分裂との関連が不明なグルコース輸送に関わる遺伝子やグルコース代謝経路に含まれるプロテインキナーゼ A (PKA) 経路の変異も同定した。実際、酵母培養培地に含まれるグルコースの濃度を下げると、Polo キナーゼの完全欠失株は他の変異がないにも関わらず生育した。

グルコース輸送経路を低下されたときに見られた増殖能の回復の要因を調べるため、遺伝学的合成致死スクリーニングを行ったところ、Casein キナーゼ I が重要であることがわかった。Casein キナーゼ I は、少なくとも分裂酵母や主なモデル動物細胞株において、主要な細胞分裂制御因子とはみなされていなかった。しかし、分裂酵母でライブイメージングを行うと、Polo キナーゼの非存在下では紡錘体の形成に決定的に重要であること、Polo キナーゼの存在下でも一定の役割を果たすことを見出した。また、特異的な阻害剤を用いた実験から、ヒト大腸癌由来 HCT116 細胞株において、Polo キナーゼと Casein キナーゼ I を同時に阻害すると、単独で阻害したとき以上に重篤な紡錘体形成異常が認められた。すなわち、Casein キナーゼ I は、通常は Polo キナーゼが支配的である分裂期微小管形成の代替機構を構成していることを示唆している。また本研究は、分裂酵母を用いたサブ機構探索スクリーニング系という、分裂機構の多様性を研究する有力手法を提示することになった。本成果は国際誌に論文発表した (Kim and Goshima. 2022)。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kim Juyoung, Goshima Gohta	4. 巻 119
2. 論文標題 Mitotic spindle formation in the absence of Polo kinase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114429119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2114429119	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 Takeda Aoi, Saitoh Shigeaki, Ohkura Hiroyuki, Sawin Kenneth E., Goshima Gohta	4. 巻 44
2. 論文標題 Identification of 15 New Bypassable Essential Genes of Fission Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 113 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.19025	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Gohta Goshima
2. 発表標題 Evolutionary replacement of genes required for cell division and intracellular transport.
3. 学会等名 seminar (University of Zurich, Switzerland) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Cell division without a gene required for cell division
3. 学会等名 The Biochemical Society and the British Society for Cell Biology -Dynamic Cell IV- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Spindle formation without a gene required for spindle formation
3. 学会等名 Mitotic spindle: From living and synthetic systems to theory (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>五島研究室ホームページ http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~tenure2/goshima.html</p>

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
---------	---------