

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03205

研究課題名(和文)ハプロ不全性の分子メカニズムの網羅的解析

研究課題名(英文)Global study of haploinsufficient genes in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

大矢 禎一 (Ohya, Yoshikazu)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20183767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、出芽酵母の必須遺伝子でハプロ不全性が生じる分子メカニズムを解明することである。増殖に必須なシャペロニンCCT複合体のサブユニットをコードする全8遺伝子(TCT1, CCT2-CCT8)を用いて、遺伝子高発現させた時に、果たして発現量を減らした時と同じ表現型を示すのかどうかを形態的観点から調べた。その結果、過剰発現しても顕著な形態変化は認められなかった。この結果は遺伝子の発現レベルを増加させても減少させても同じ形態表現型が現れるとするバランス仮説を否定し、不十分量仮説を支持した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト遺伝病データベース(OMIM)によると、ハプロ不全性様式のヒトの優性遺伝病は現在700件以上の登録がされている。ヒトゲノムの解析からハプロ不全性遺伝子に対する興味が高まる中で、本研究では遺伝子操作と表現型解析が容易に行える出芽酵母の利点を生かしてハプロ不全性のメカニズムに実験的にアプローチした。得られた結果からは、ハプロ不全性のメカニズムとして不十分量仮説が支持されるようになり、ハプロ不全様式の優性遺伝病の理解に役立つ知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of haploinsufficiency in essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Using all 8 genes (TCT1, CCT2-CCT8) that encode the subunits of the chaperonin CCT complex essential for cell proliferation, it was examined whether overexpression of the genes shows the same morphological phenotypes as haploinsufficient morphological phenotypes. As a result, no significant morphological change was observed even after overexpression. This result denied the balance hypothesis that the same morphological phenotype appears whether the gene expression level was increased or decreased, and supported the insufficient amount hypothesis.

研究分野：遺伝学

キーワード：ハプロ不全性 出芽酵母 CCTシャペロニン複合体 不十分量仮説 CalMorph 形態解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、必須遺伝子のヘテロ接合型変異株の単細胞形態表現型を高次元かつ網羅的に調べて、ハプロ不全が決して例外的な遺伝現象ではないことを 2018 年に発表した(Ohnuki and Ohya, PLOS Biol 2018)。出芽酵母には 1,112 の必須遺伝子があるが、ヘテロ二倍体遺伝子破壊株を使って、幾つの必須遺伝子がハプロ不全性を示すかを調べた。形態データを収集する際の条件の不一致によるばらつきを最小限に抑えるために、完全培地で培養した出芽酵母を初期対数期の正確なタイミングで集菌し、自動画像解析システム CalMorph を用いて各変異株について 200 個以上の細胞を解析した。その結果、少なくともひとつ以上の形態的形質で異常を示す変異株が全必須遺伝子欠損株の 59%あり(FDR=1%)、また最小培地で培養することにより新たにハプロ不全性を示すものを加えると、合わせて 75%もハプロ不全性を示す遺伝子が検出された。半数以上の必須遺伝子がハプロ不全性を示すという発見は今までの常識を覆すものであり、ヒトの疾患遺伝子の診断につながる可能性があるとして医療ニュースコーナーで取り上げられた。

増殖速度の低下を指標にした場合にはハプロ不全性は全必須遺伝子の 9%しか観察されないこと(Deuchebauer et al., Genetics, 2005)から、形態異常を指標にすることがハプロ不全性の検出に非常に有効だったことがわかる。そこで形態異常を指標にしてハプロ不全性が生じる分子メカニズムの解明を行うことにした。

### 2. 研究の目的

ハプロ不全性が生じる要因として、バランス仮説と不十分量仮説の二つが提案されている。各々の遺伝子でどちらの仮説が当てはまるのかを、個々の必須遺伝子の発現レベルを上昇させた時の形態表現型を調べて比較することによって網羅的に検証することにした。バランス仮説が正しいならば、遺伝子の発現レベルを増加させても減少させても同じ複合体の機能が欠損するので同じ形態表現型が現れるはずである。一方、不十分量仮説が正しいとすると、必ずしも同じ形態表現型が現れるとは限らない。既に我々の研究から出芽酵母の 657 の必須なハプロ不全性遺伝子の中で、366 のタンパク質複合体のサブユニットをコードする遺伝子とそれ以外の 291 遺伝子があることを明らかにしている。複合体を形成するサブユニットの遺伝子を高発現させた時に果たして減らした時と同じ表現型を示すのか、複合体にならないタンパク質をコードする遺伝子を高発現した時には果たしてどのように異なる形態表現型が現れるのかを定量的に調べる。それぞれの形態類似度をスコア化した上で、どちらの仮説が当てはまるかを統計的に解析し、各々の必須遺伝子でハプロ不全性が生じる分子メカニズムをタンパク質が持つ特性の点から解き明かすことを目的とした。

### 3. 研究の方法

出芽酵母の複合体を形成する遺伝子の中で、本研究では細胞質 CCT シャペロニン複合体をコードする変異株を用いて研究を行った。CCT は HSP60 ファミリー(シャペロニンファミリー)に属する複合体タンパク質であり、Tct1 から Cct2~Cct8 までの全部で8つの分子量が約 60K のサブユニットにコードされる。大腸菌の GroEL や ミトコンドリアの HSP60 に対する真核細胞の細胞質におけるホモログである。細胞質 CCT シャペロニン複合体のサブユニットの高発現のためには細胞への悪い影響が少なく、 $\beta$ -estradiol の量依存的に発現誘導できるシステム(McIsaac et al., Nucleic Acids Res., 2014)を用いた。通常、発現誘導のために試薬を添加するとそれによる直接的な別の遺伝子の発現誘導や形態変化が見られるのに対して、 $\beta$ -estradiol は出芽酵母に受容体がないので、その影響は

最小限に抑えられる。出芽酵母の CCT シャペロニン複合体のヘテロ破壊株に  $\beta$ -estradiol 発現誘導プロモーター融合遺伝子を組み込んだ酵母菌株を利用した。 $\beta$ -estradiol 存在下、非存在化で栄養源が豊富な YPD 培地で対数増殖期初期まで増殖させた後に集菌し、細胞壁、アクチン、核 DNA を FITC-ConA, Rhodamine Phalloidin, 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) でそれぞれ染色し、出芽酵母の画像解析システム CalMorph (Ohya et al., PNAS, 2005) を用いて細胞形態を定量的に解析した。

## 4. 研究成果

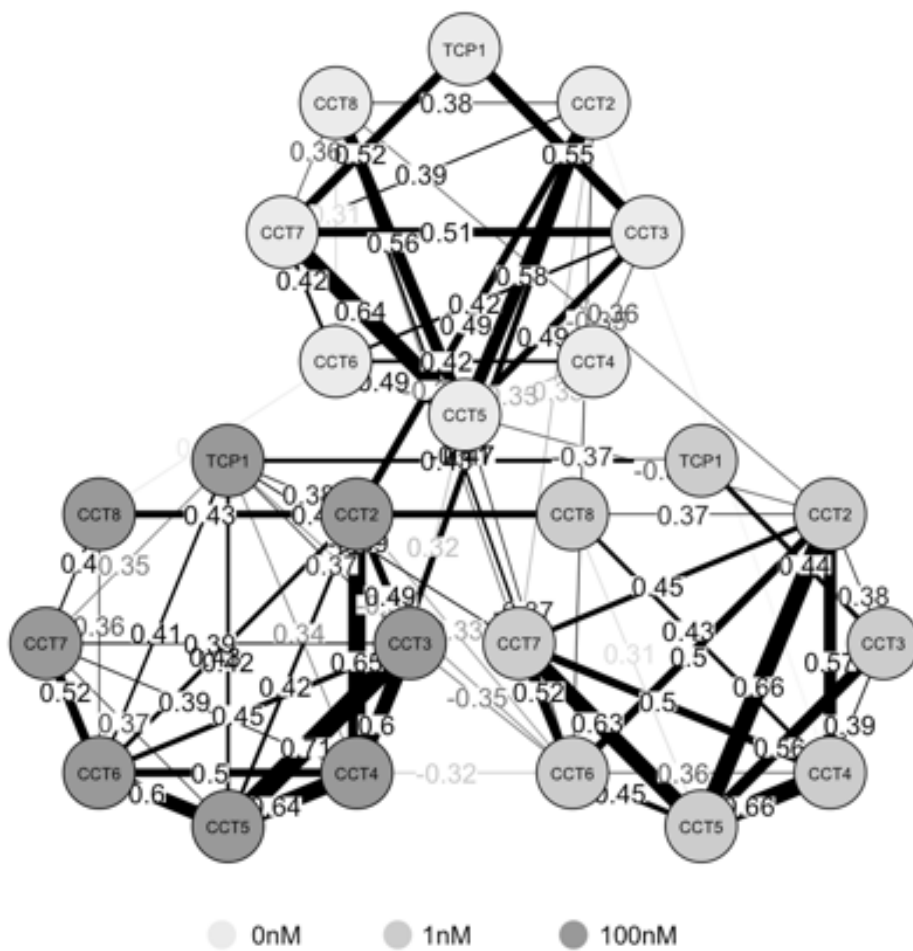
### 4.1 形態異常度の定量的解析

出芽酵母の CCT シャペロニン複合体のヘテロ 2 倍体破壊株 (*TCT1/tct1 $\Delta$* , *CCT2/cct2 $\Delta$*  など) にそれぞれの CCT 複合体サブユニット遺伝子を  $\beta$ -estradiol 発現誘導プロモーターに融合した出芽酵母菌株を用いて、 $\beta$ -estradiol 濃度 0 nM (発現誘導なし)、1 nM (野生型とほぼ同じ発現量)、100 nM (過剰発現) の 3 つの条件で発現誘導変異株を培養し、画像処理システム CalMorph の 501 個のパラメータを使って形態解析した。形態データを解析しやすくするため、パラメータの値に適切な分布関数を当てはめて正規化し、一般化線形モデルによって  $z$  値に変換し、その中央値に対して主成分分析を行った。8 種類の発現誘導変異株それぞれの主成分得点を用いて野生型とのユークリッド距離を計算することで、501 次元のデータを 1 次元に形態異常度として縮約することができた。発現誘導変異株は  $\beta$ -estradiol 濃度 0 nM において、8 株すべてで大きな形態異常度を持ち、ハプロ不全の形態表現型を示した。 $\beta$ -estradiol 濃度 1 nM の形態異常度は 0 nM と比べて有意に小さくなり ( $p < 0.01$ , T 検定)、野生型の表現型への回復が示唆された。また、1 nM と 100 nM の形態異常度には有意な差がなかった。以上の結果から、CCTs 遺伝子の過剰発現は酵母の形態に大きな影響を与えないことが示唆された。

### 4.2 $\beta$ -estradiol 濃度ごとの形態類似度クラスタリング

ある一つの CCT 遺伝子発現誘導変異株が、他の CCT 遺伝子発現誘導変異株や他の  $\beta$ -estradiol 濃度の変異株とどれだけ形態的な類似しているかを確認するため、501 パラメータの  $z$  値の相関係数を計算し、ネットワーク図を作成した。 $\beta$ -estradiol 濃度 0 nM で処理した発現誘導変異株間には高い相関関係 (最大  $R = 0.71$ ) で結ばれていた一方で、異なる  $\beta$ -estradiol 濃度の変異株間では、変異株の組み合わせに関わらず相関が低かった (図)。よって、CCT 遺伝子を過剰発現した酵母の形態は、ハプロ不全の表現型と異なることが明らかになった。

本研究で得られた形態情報と統計解析により、 $\beta$ -CCT 遺伝子を過剰発現すると、その形態はハプロ不全の形態表現型とは異なり、野生型に近づくことが示された。この結果は、バランス仮説を否定し、不十分仮説を支持するものである。従来の実験手法では検出できなかった表現型の微細な変化を捉えることで、複数のハプロ不全性遺伝子間の比較を可能にした出芽酵母の形態解析はハプロ不全の基盤研究に対して有用であると言え、ハプロ不全性のメカニズムを解き明かす非常に強力なツールになり得ることを示すことができた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Okada H, MacTaggart B, Ohya Y, Bi E.	4. 巻 24
2. 論文標題 The kinetic landscape and interplay of protein networks in cytokinesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101917	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 Kintaka R, Makanae K, Namba S, Kato H, Kito K, Ohnuki S, Ohya Y, Andrews BJ, Boone C, Moriya H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Genetic profiling of protein burden and nuclear export overload.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.54080.	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 Isozaki A, Nakagawa Y, Loo MH, Shibata Y, Tanaka N, Setyaningrum DL, Park JW, Shirasaki Y, Mikami H, Huang D, Tsoi H, Riche CT, Ota T, Miwa H, Kanda Y, Ito T, Yamada K, Iwata O, Suzuki K, Ohnuki S, Ohya Y, Kato Y, Hasunuma T, Matsusaka S, Yamagishi M, Yazawa M, Uemura S, Nagasawa K,	4. 巻 6
2. 論文標題 Sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput sorting of large-volume biological compartments.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba6712.	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 Shikanai Y, Yoshida R, Hirano T, Enomoto Y, Li B, Asada M, Yamagami M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Tabata R, Sawa S, Okada H, Ohya Y, Kamiya T, Fujiwara T.	4. 巻 182
2. 論文標題 Callose Synthesis Suppresses Cell Death Induced by Low-Calcium Conditions in Leaves.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2199-2212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.00784.	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 Ohnuki S, Kashima M, Yamada T, Ghanegolmohammadi F, Zhou Y, Goshima T, Maruyama JI, Kitamoto K, Hirata D, Akao T, Ohya Y.	4. 巻 83
2. 論文標題 Genome editing to generate nonfoam-forming sake yeast strains.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1583-1593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1631146	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 Ohya Y, Kashima M	4. 巻 83
2. 論文標題 History, lineage and phenotypic differentiation of sake yeast.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1442-1448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1564620	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 Lin Y, Kotakeyama Y, Li J, Pan Y, Matsuura A, Ohya Y, Yoshida M, Xiang L, Qi J.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Cucurbitacin B Exerts Antiaging Effects in Yeast by Regulating Autophagy and Oxidative Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oxid Med Cell Longev	6. 最初と最後の頁 4517091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/4517091	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 Mikami H, Kawaguchi M, Huang CJ, Matsumura H, Sugimura T, Huang K, Lei C, Ueno S, Miura T, Ito T, Nagasawa K, Maeno T, Watarai H, Yamagishi M, Uemura S, Ohnuki S, Ohya Y, Kurokawa H, Matsusaka S, Sun CW, Ozeki Y, Goda K.	4. 巻 6
2. 論文標題 6 Virtual-freezing fluorescence imaging flow cytometry.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14929-2	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 大矢禎一	4. 巻 58
2. 論文標題 「メンデルの優性の法則」の今	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 75-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Isozaki Akihiko et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Intelligent image-activated cell sorting 2.0	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 2263 ~ 2273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0lc00080a	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 Itto-Nakama Kaori, Watanabe Shun, Kondo Naoko, Ohnuki Shinsuke, Kikuchi Ryota, Nakamura Toru, Ogasawara Wataru, Kasahara Ken, Ohya Yoshikazu	4. 巻 86
2. 論文標題 AI-based forecasting of ethanol fermentation using yeast morphological data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 125 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab188	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 -

1. 著者名 Nakagawa Yuta, Ohnuki Shinsuke, Kondo Naoko, Itto-Nakama Kaori, Ghanegolmohammadi Farzan, Isozaki Akihiro, Ohya Yoshikazu, Goda Keisuke	4. 巻 21
2. 論文標題 Are droplets really suitable for single-cell analysis? A case study on yeast in droplets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 3793 ~ 3803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1lc00469g	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 Ghanegolmohammadi Farzan, Okada Hiroki, Liu Yaxuan, Itto-Nakama Kaori, Ohnuki Shinsuke, Savchenko Anna, Bi Erfei, Yoshida Satoshi, Ohya Yoshikazu	4. 巻 7
2. 論文標題 Defining Functions of Mannoproteins in Saccharomyces cerevisiae by High-Dimensional Morphological Phenotyping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 769 ~ 769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof7090769	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 Garcia Rael, Itto Nakama Kaori, Rodriguez Pena Jose Manuel, Chen Xiaolin, Sanz Ana Belin, Lorenzo Alba, Pavon Verges Monica, Kubo Karen, Ohnuki Shinsuke, Nombela Cesar, Popolo Laura, Ohya Yoshikazu, Arroyo Javier	4. 巻 35
2. 論文標題 Poacic acid, a 1,3 glucan-binding antifungal agent, inhibits cell wall remodeling and activates transcriptional responses regulated by the cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways in yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 21778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100278R	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 Chadani Tomoya, Ohnuki Shinsuke, Isogai Atsuko, Goshima Tetsuya, Kashima Mao, Ghanegolmohammadi Farzan, Nishi Tomoyuki, Hirata Dai, Watanabe Daisuke, Kitamoto Katsuhiko, Akao Takeshi, Ohya Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome Editing to Generate Sake Yeast Strains with Eight Mutations That Confer Excellent Brewing Characteristics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1299 ~ 1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10061299	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10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 大貫慎輔
2. 発表標題 出芽酵母必須遺伝子のハプロ不全性獲得メカニズムの解析
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 大貫慎輔
2. 発表標題 ゲノム編集による泡なし清酒酵母の作出
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保佳蓮
2. 発表標題 真菌の細胞壁に作用する新しい抗真菌薬Jervineの研究
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井理沙子
2. 発表標題 出芽酵母の細胞集団中に含まれる巨大細胞の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 史 文聡
2. 発表標題 セルソータを使った老化細胞の形態解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢禎一
2. 発表標題 酵母フェノーム研究からわかること
3. 学会等名 東京大学CRIIM 微生物ウィーク (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢禎一
2. 発表標題 Sake yeasts: history and future
3. 学会等名 KAAB International Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢禎一
2. 発表標題 Q-Bio symposium
3. 学会等名 From Genome to Morphology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢禎一
2. 発表標題 From Genome to Morphology
3. 学会等名 "JSPS C2C Japan Half Global Kickoff Symposium" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢禎一
2. 発表標題 From Genome to Moprhology
3. 学会等名 EAST Yeast meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 抗真菌剤	発明者 大矢禎一、久保佳蓮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-150447	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗真菌剤のスクリーニング方法、及び、真菌病原性発現阻害剤である抗真菌剤	発明者 大矢禎一、加藤大 騎、長田裕之、平野 弘之、関水久	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-124887	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 桂皮酸誘導体の二量体化合物の製造方法	発明者 富永健一、嶋本康 広、大矢禎一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-184436	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------