

# タンパク質の発現量の変化に対する細胞システムのロバストネスを測る

Measuring Robustness of The Cellular System against Changes in Protein Expression

守屋央朗

Hisao Moriya

細胞の生命活動は、数千から数万のタンパク質が複雑に相互作用することによって営まれている。それぞれのタンパク質の発現量は5,000倍以上も違うが、その量はどれほど厳密でなければならないのだろうか？本稿では、細胞内のタンパク質の発現量の変化に対する細胞システム<sup>注1</sup>のロバストネスについて、筆者らがやっている遺伝子綱引き(gTOW)法を用いた解析を紹介する。明らかになってきたのは“化学量不均衡”が細胞システムに脆弱点を作る分子機構であるということだった。一方で、細胞システムにはこの脆弱点を回避するための機構も組み込まれていることがわかってきた。



限界コピー数、化学量不均衡、遺伝子綱引き法、DSG (Dosage Sensitive Gene)

## はじめに

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のゲノムには、タンパク質をコードする遺伝子が5,820ある<sup>1)</sup>。これらの遺伝子からそれぞれ発現するタンパク質の量は、1細胞あたり100コピー以下から500,000コピー以上と5,000倍以上の開きがある<sup>2)</sup>。特定の培養条件でのそれぞれのタンパク質の発現量は、細胞が最も効率良く生命機能を営むことができるよう最適化されていると考えられている<sup>3)~5)</sup>。一方で、細胞内のパラメータが多少変動しても細胞の機能はロバストに維持されることがわかっており<sup>6)~8)</sup>、これらのタンパク質の発現量にも細胞システムが耐えうる“許容範囲”が存在していると考えられる。

それでは、実際これらのタンパク質の発現量はどれくらい変動しても細胞の機能は維持されるのだろうか。また、その許容範囲はタンパク質の機能やその制御を反映しているのだろうか。筆者らは、酵母においてタンパク質の発現量の上限を評価できる“遺伝子綱引き(genetic Tug Of War ; gTOW)法”を用いてこれらの疑問にアプローチしている。

### 注1 細胞システム

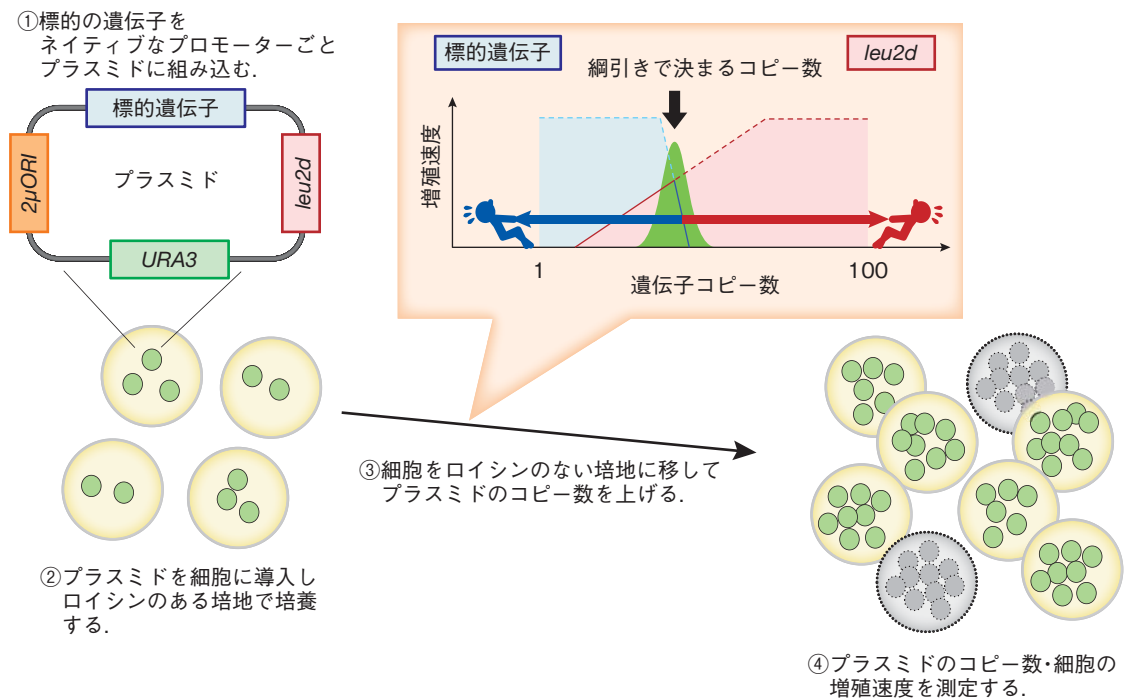
本稿では、様々な生命活動を達成するために細胞に組み込まれた機構を包括的に“細胞システム”と呼ぶ。ここでいう“細胞システム”は、複数の細胞が集まって作り上げる、より高次のシステム(組織など)ではなく、1つの細胞がその生命活動を営むために持っている内部構造のことを指す。

筆者らは、これまでにgTOW法を用いて出芽酵母と分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)の細胞周期制御のロバストネス解析<sup>9)~11)</sup>、ならびに出芽酵母のすべての遺伝子の限界コピー数の測定<sup>12)</sup>を行ってきた。さらに、コピー数上昇に伴うタンパク質発現量の上昇についても解析を行っている<sup>13)</sup>。本稿ではこれらの結果から見えてきた、細胞システムに脆弱性をもたらす“化学量不均衡”と、それを回避するメカニズムを中心に解説する。

## I タンパク質の発現量の変化に対するロバストネスを測る

特定のタンパク質の細胞内の存在量は、非常に単純化して考えれば、mRNAの合成と分解、ならびにタンパク質の合成と分解のバランスで決まる。特定のタンパク質の発現量を上げたり下げたりしたい場合には、これらの速度を制御してやればよい。例えば、プロモーター置換によるタンパク質の過剰発現はmRNAの合成速度を人為的に上げる実験であり、RNAiによるノックダウンはmRNAの分解速度を人為的に上げる実験である。

gTOWは遺伝子のコピー数を上げることでmRNAの合成速度を段階的に上げ、タンパク質の発現量を増やす実験手法である(図1)。発現量の低いロイシン合成酵素のアリル・*leu2d*と標的遺伝子との“選択圧の綱引き”を利用して、“標的のタンパク質をどこまで過剰に発現したら細胞システムが破綻するか(細胞が死ぬか)”を、その遺伝子のコピー数(限



■図1 遺伝子綱引き (gTOW) 法の概略

gTOW法では①～④の4つのステップにより標的遺伝子の“過剰発現の限界コピー数”を評価する。限界コピー数の決定に重要なのは専用のプラスミドにある  $2\mu ORI$  と  $leu2d$  である。  $2\mu ORI$  の性質により、細胞内に導入されたプラスミドは多コピーとなり、細胞集団内でのコピー数がばらつく。  $leu2d$  はロイシン合成酵素をコードする  $LEU2$  の低発現型アリルであり、コピー数が高いほど多くのロイシンを合成できる。これがロイシンのない培地でより高いプラスミドコピー数を持つ細胞を選択する選択圧として働く (→)。ロイシンのない培地でインサートを持たない空ベクターのコピー数は1細胞あたり150程度まで上がる。標的遺伝子の限界コピー数が100以下の場合、プラスミドのコピー数はその限界よりも低くなければならない。これがプラスミドのコピー数を下げる選択圧として働く (←)。結果として生じる標的遺伝子と  $leu2d$  の“綱引き”が、ロイシンのない培地で培養された細胞内のプラスミドのコピー数を決める。このコピー数は標的遺伝子の限界コピー数に近い値となる。プラスミドのコピー数はリアルタイムPCRにより決定し、増殖速度はマイクロプレートリーダーにより測定する。  $URA3$  ; ウラシル合成酵素遺伝子。②での選択に用いる。Moriya H, et al: Mol Biosyst (2012) 8: 2513-2522より改変。

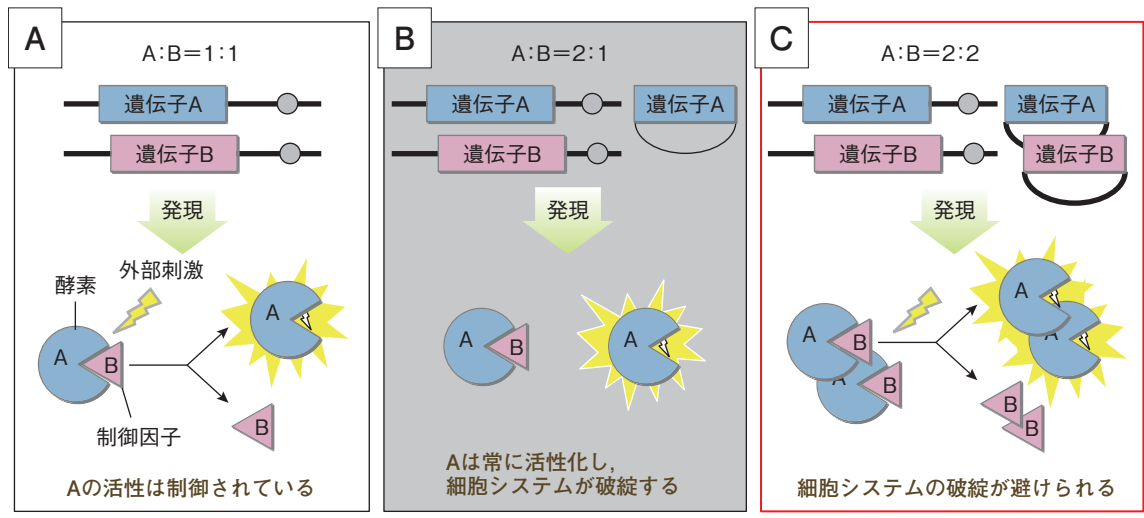
界コピー数)として評価する。gTOWのポイントは、ネイティブなプロモーターを持つ遺伝子の限界コピー数を測定することである。理想的には、ネイティブなプロモーターを持つ遺伝子のコピー数が上がれば、その分だけ“ネイティブな発現量から何倍”という形でタンパク質の過剰発現が起こる。つまりgTOWで測れる限界コピー数は“標的タンパク質がネイティブなレベルから何倍増えたら細胞システムが破綻するか”を反映している。

例えば、ある遺伝子の限界コピー数が2であった場合、その遺伝子がコードするタンパク質が元のレベルから2倍過剰になっただけで細胞システムが破綻することを意味し、ある遺伝子の限界コピー数が100以上である場合、その遺伝子がコードするタンパク質が元のレベルから100倍過剰になっても細胞システムが破綻しないということを意味している。gTOWでは、“特定のタンパク質の過剰(という擾乱)に対する、細胞システムのロバストネス”を測っているとも言える。例えば、上記前者のタンパク質の過剰に対して細胞システム

はロバストネスが低く(脆弱であり)、後者の過剰に対して細胞システムはロバストネスが高い(ロバストである)、と言うこともできる。

## II 化学量不均衡： 細胞システムに脆弱点を生む機構

筆者らは最近、gTOW法を用いて出芽酵母のすべての遺伝子(約5,800)の限界コピー数の測定を行った<sup>12)</sup>。その結果、80%以上の遺伝子は100以上の限界コピー数を持っていることがわかり、酵母の細胞システムは、タンパク質の過剰に対して一般的にロバストであることが示された。一方、わずか10以下の限界コピー数を持つ遺伝子も115存在した。筆者らは限界コピー数が10以下のこれらの遺伝子を特にDSG(Dosage Sensitive Gene)と呼んでいる。これらのDSGには、細胞骨格や細胞内輸送などに関わる構造タンパク質をコードするものが多く含まれていた。



■図2 化学量不均衡の概念図

ここでは酵素とその制御因子を例に化学量不均衡について解説する。

A：通常の状態。遺伝子Aは酵素を、遺伝子Bはその制御因子をコードしている。遺伝子Aと遺伝子Bが同じコピー数存在するとき、酵素Aと制御因子Bはバランスのとれた量比で合成されている。このような状態のとき、外部刺激によるBの解離によって酵素Aが活性化するという制御が成り立ち、細胞システムは正常に維持される。

B：遺伝子Aのコピー数が増えてしまった状態。Bに対して過剰に生産されたAは常に活性化してしまい、細胞システムは破綻する。

C：化学量不均衡を確かめるテスト。遺伝子Aと遺伝子Bのコピー数を同時に増やす。酵素Aと酵素Bが化学量の均衡関係にあるなら、細胞システムの破綻は避けられるはずである。

それでは、わずかに発現を上げただけで細胞システムを破綻させる“脆弱点”はどのような分子機構によって生じているのだろうか？

今ははっきりと見えてきているのは、“化学量不均衡”である。細胞内ではたくさんのタンパク質が協調的に働くが、そこには常に量のバランスがある。最も理解しやすい例は、図1に示したような酵素とその制御因子の関係である。ある酵素の活性がその制御因子により化学量論的に制御されている場合を想定する。酵素と制御因子が1：1の化学量で存在するとき、外部刺激による制御因子の解離の制御が成立する(図2A)。一方、酵素が制御因子に対して過剰になると酵素は常に活性化してしまい、制御が成立せず細胞システムが破綻する(図2B)。

ゲノムワイド解析で見つかったDSGには複合体の構成成分が多く含まれていた。さらに、上記のサブユニットにより制御を受ける酵素(cAMP依存性キナーゼ, Cdc14・Ppz1 ホスファターゼ)、複数のサブユニットからなる構造タンパク質(チューブリンやアクチン, ミオシンなど)、低分子量Gタンパク質とGTPase活性化タンパク質(GAP)・GDP-GTP交換因子(GEF)が含まれていた<sup>12)</sup>。これらすべてのタンパク質に共通しているのは、化学量のバランスが不

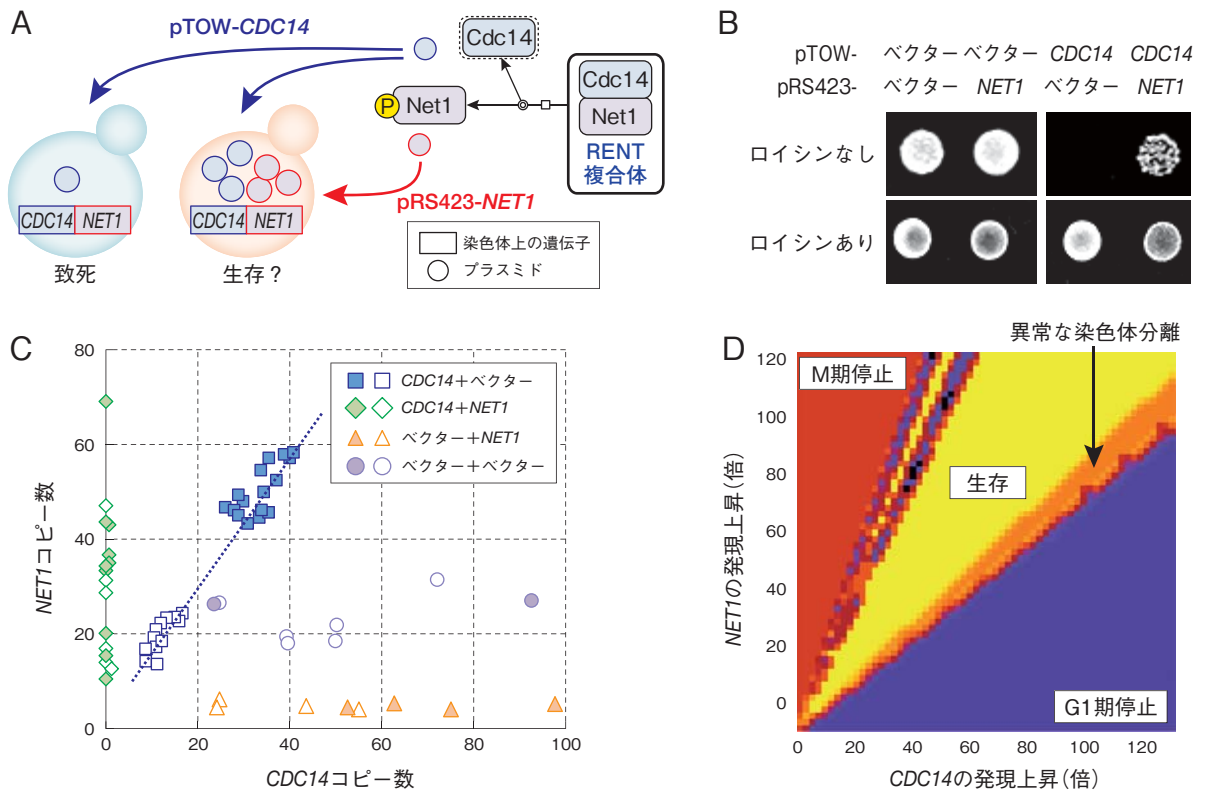
可欠であることである。

実際に化学量不均衡によりこれらDSGの低い限界コピー数が生まれているのかどうかは、図2Cに示したような概念の実験により検証できる。すなわち、DSGと同時に、DSGと均衡関係にある“パートナー”遺伝子のコピー数を上げ、細胞システムの破綻が回避されるかを調べてやればよい。

出芽酵母のM期ホスファターゼCdc14をコードする遺伝子は、2以下という非常に低い限界コピー数を持つ<sup>10)</sup>。筆者らは、この原因が制御因子Net1との化学量不均衡に起因するのではないかと考えた(図3A)。これを検証するために、CDC14とNET1を同時に酵母に導入したところ、CDC14のコピー数を上げても細胞が生存できること(図3B)、生存できた細胞内のCDC14とNET1のコピー数が均衡していること(図3C)を確認することができた。なお、この結果は出芽酵母の細胞周期の“統合的数理モデル<sup>注2)</sup>”によるシミュ

注2 統合的数理モデル

バージニア工科大学の John Tysonらによって構築された、出芽酵母の細胞周期の統合的数理モデル (Chen KC, et al: Mol Biol Cell (2004) 15: 3841-3862)。約30のタンパク質の相互作用の知見を微分方程式で記述し、遺伝子破壊や過剰発現の表現型をできるだけ再現できるようにパラメータを設定した数理モデルである。



■図3 CDC14とNET1の間に見られる化学量の均衡

A: Cdc14はその制御因子Net1と結合しているときは不活性で、離れると活性化することが知られている。CDC14のコピー数を単独で増やすと致死になる。もしCdc14とNet1の化学量不均衡がCDC14制御の脆弱性を生んでいるのだとすれば、CDC14のコピー数とNET1のコピー数を同時に増やしたときに、CDC14のコピー数上昇に伴う致死性が回避されるかどうかを調べればよい。pTOW, pRS423; 出芽酵母用のプラスミド。

B: CDC14のコピー数を単独で上げようとすると細胞は増殖できないが(CDC14とベクター・ロイシンなし)、CDC14とNET1を同時に入れると、CDC14のコピー数を上げて細胞は生育できる(CDC14とNET1・ロイシンなしの条件)。

C: Bで増殖してきた細胞が持つプラスミドのコピー数を測定すると、CDC14とNET1のプラスミドコピー数が均衡していることがわかる。

D: このような“生育のためのCDC14とNET1の均衡”は数理モデルによるシミュレーションの予測と一致していた。

Kaizu K, et al: PLoS Genet (2010) 6: e1000919より改変。

レーションによる予測ととてもよく一致する(図3D)。

分裂酵母の細胞分裂に関わる低分子量Gタンパク質のSpg1をコードする遺伝子も、2以下の限界コピー数を持っている<sup>11)</sup>。筆者らはこの原因が、Spg1のGAPであるByr4との化学量の不均衡であると考え、上記と同様の実験を行い、spg1とbyr4が均衡関係にあることを確認した<sup>11)</sup>。

さらに出芽酵母で見つかった上記のDSGについてもこのような均衡関係が見いだされるかを調べ、先のCDC14-NET1と合わせて14の均衡関係を同定した(表1)。パートナーが見つかった遺伝子はDSGの中でも特に限界コピー数が低いものが多い。このことから、タンパク質の発現量に乱れが生じたとき真っ先に露呈する細胞システムの脆弱性は、化学量不均衡に起因するのだろうと筆者らは考えている。

### Ⅲ 化学量不均衡を避けるには?

上述のように“化学量不均衡”が細胞システムの脆弱点となることがわかった。一方で、限界コピー数が10以下のDSGは全遺伝子の2%程度しかなく、先に述べたように80%以上の遺伝子は100コピー以上に上げて細胞システムは破綻しない。これらコピー数の高い遺伝子がコードするタンパク質は、いずれも図2Aのような化学量論的な制御を受けないタンパク質なのだろうか?

じつは限界コピー数が100以上の遺伝子を作るタンパク質で、まさに図2Aのような化学量論的な制御を受けることが知られているものがある。それは姉妹染色体分配に関わるプロテアーゼ・セパレーズである。出芽酵母のセパレーズ

■表1：均衡関係にあるDSGとそのパートナー

DSG	限界コピー数 <sup>*1</sup>	パートナー	DSGとパートナーがコードするタンパク質の機能
BFA1	3.5	TEM1	低分子量Gタンパク質とそのGAP
CDC14	0.9 <sup>*2</sup>	NET1	プロテインホスファターゼとその制御因子
GLN3	1.5	URE2	転写因子とその制御因子
MYO1	6.5	MLC1	ミオシン重鎖と軽鎖
MYO2	12.1	MLC1	ミオシン重鎖と軽鎖
MYO4	6.5	MLC1	ミオシン重鎖と軽鎖
PPZ1	0.3 <sup>*2</sup>	SIS2	プロテインホスファターゼとその制御因子
PPZ1	0.3 <sup>*2</sup>	VHS3	プロテインホスファターゼとその制御因子
PPZ2	9.3	SIS2	プロテインホスファターゼとその制御因子
SEC4	5.2	SEC2	低分子量Gタンパク質とそのGEF
TPK1	0.9 <sup>*2</sup>	BCY1	プロテインキナーゼの触媒サブユニットと制御サブユニット
TPK2	2.1	BCY1	プロテインキナーゼの触媒サブユニットと制御サブユニット
TPK3	0.6 <sup>*2</sup>	BCY1	プロテインキナーゼの触媒サブユニットと制御サブユニット
TUB2	2.7	RBL2	$\beta$ チューブリンとそのシャペロン

\*1：測定されたプラスミドのコピー数(細胞集団における平均)。半数体の酵母細胞を用いているので、遺伝子は染色体上にもう1コピーある。  
 \*2：限界コピー数が非常に低いため、プラスミドを脱落した細胞が細胞集団に混ざり、細胞集団におけるプラスミドコピー数の平均が1より小さくなったものと考えられる。

Makanae K, et al: Genome Res (2013) 23: 300-311より改変。

Esp1は、そのプロテアーゼ活性を負に制御するPds1と結合した状態では不活性で、Pds1の分解により引き起こされるEsp1の解離により活性化し、姉妹染色体分配を誘導することがわかっている<sup>14)</sup>。先に述べた細胞周期の数理モデルはこの知見に基づいて作られており、その化学量不均衡のせいで、モデルのEsp1の発現を2倍上昇させただけで細胞周期システムは破綻する<sup>10)</sup>。

gTOWで測られたESPIの限界コピー数は100を超えている<sup>10)</sup>。このことから、筆者らはEsp1の化学量論的な制御が内在的に持つ脆弱性が、何らかの付加的な制御により回避されているのではないかと考えた。いくつかの解析の結果、“Pds1がサイクリン依存性キナーゼCDKによるリン酸化により安定化し、Esp1よりも大過剰存在する”ことが、Esp1が単独で過剰になっても活性化しない機構として働いていることが明らかとなった<sup>9)</sup>。このPds1のリン酸化は、Esp1の時期尚早な活性化を避けて、染色体分配に同期性を生むために必要な機構であると考えられている<sup>15)</sup>。この機構は同時に、Esp1の化学量論的な制御の持つ脆弱性を回避するためにも役立っているようだ。

上記のケースは、化学量不均衡を避けるためにEsp1の制御に固有に埋め込まれた機構である。それでは、化学量不均衡を回避するより一般的な機構はないのだろうか？

ところで、読者の中には“gTOW法で遺伝子コピー数を上

げても、それがタンパク質の発現上昇に結びつくとは限らないのではないか？”と思った方もおられるだろう。これは筆者らがgTOWについて発表したときにほぼ100%尋ねられる質問である。出芽酵母では、遺伝子量の変化に対するタンパク質の“量補正”は一般的には働かないとされ、遺伝子コピー数とタンパク質の発現量には正の相関があることが知られているが、すべてのタンパク質にこれが当てはまるわけではない<sup>16)~18)</sup>。もし細胞システムに“コピー数上昇をタンパク質の発現上昇に結びつかせない機構”があるとすれば、それは化学量不均衡を回避するために積極的に働いている可能性もある。

そこで筆者らは最近、分裂酵母の細胞周期制御因子について、コピー数を上げたときにそれがタンパク質の発現量上昇に結びつくかを調べた<sup>13)</sup>。調査した20個の遺伝子の大半では、遺伝子コピー数の増加に伴ってタンパク質の発現量も増加しており、一般的な量補正は存在しないという出芽酵母での知見が再確認された。一方、cdc16とsid2では、コピー数を上昇させてもタンパク質の発現上昇がほとんど起こらないことがわかった。これらのケースではmRNAの発現量は上昇していたことから、タンパク質の合成や分解の段階で何らかの量補正が行われているものと思われる。Cdc16とSid2は分裂酵母の細胞質分裂を制御するSINパスウェイの構成因子で、タンパク質の複合体を形成していることがわかって

いる。筆者らは、これらのタンパク質の発現を単独で上げた場合に生じる単量体タンパク質が、積極的に分解されるのではないかと考えている。

実際、複合体の構成成分であるリボソームタンパク質L25や $\alpha$ チューブリン、ヒストンH3の発現を単独で上げようとすると、急速に分解され、タンパク質の量に反映されないことが知られている<sup>19)~21)</sup>。複合体を形成できなかったタンパク質の積極的な分解は、化学量不均衡を回避する一般的な機構として働いているのかもしれない。

#### IV 化学量不均衡による脆弱性はなぜ残されているのか？

最後に浮かぶ疑問は、ロバストネスの生物学的意義に関するものである。生命は淘汰圧をかいぐりながら進化し、今の状態に落ち着いている。細胞システムが生じた頃にあった脆弱性は、進化の過程で様々な方法で回避され、最終的に現在のロバストな細胞システムができあがってきたのだと考えられる。それでは筆者らが見つけたDSGの化学量不均衡の脆弱性は、なぜそのまま残されたのだろうか？これは細胞システムにとって何か重要な機能の“トレードオフ”なのかもしれない。現在筆者らは、この“重要な機能”として2つを考えている。

1つはダイナミクスとのトレードオフである。これは図2で示したような酵素の活性制御を例にするとわかりやすい。この酵素の制御は、時間やエネルギーが必要となるタンパク質の合成や分解を必要とせず、迅速にかつ可逆性にされるだろう。ここにもし化学量のバランスが乱れたときにタンパク質分解により回避する機構があると、サブユニットが解離した状態(図2では活性化状態)で酵素や制御因子が分解されてしまい、サブユニットが結合した不活性状態に容易に戻れなくなってしまう。細胞の生命活動のある局面で、このようなダイナミックな活性制御が必須であるために、化学量不均衡を生じやすいこのような危険な制御が残らざるをえなかったのではないだろうか。

もう1つは化学量の均衡を使った“染色体構成の拘束”である。DSGとそのパートナーは化学量の均衡を保つため互いの遺伝子数を1:1に拘束する。複数のDSGとそのパートナーが染色体上に分散して存在すれば、互いの数を拘束するネットワークが作られる。もし細胞周期の異常により異数体が生じてしまったら、DSGとそのパートナーの遺伝子数に不均衡が生じる。これは両遺伝子から発現するタンパク質の

化学量不均衡を生じさせるため、細胞システムは破綻し子孫は残らない。現在のほとんどの生物で染色体数が安定に維持されるのは、染色体複製を正確に行う分子機構もさることながら、DSGとそのパートナーが互いを拘束するこのネットワークのせいなのかもしれない。

#### おわりに：gTOWによるロバストネス測定の今後

筆者らの遺伝子の限界コピー数の測定によるロバストネス解析は、化学量不均衡という脆弱点に辿りついた。たくさんのタンパク質が相互作用しながら営まれる細胞システムにおいて、化学量のバランスが重要であることは“当たり前”のように思える。だがこの事実は、細胞システムが“化学量バランスの乱れ”の危険に常に(当たり前に)曝されているということの意味しており、そうであれば細胞システムはそれを回避するための多大なコストを払っているに違いない。

複合体に組み入れられなかったタンパク質の積極的な分解はその1つだと考えられる。上述したように、酵母の大半のタンパク質は100以上の限界コピー数を持つ。これらの中には脆弱性を回避する積極的な機構によって高い限界コピー数(すなわちシステムの高いロバストネス)が保障されているものも多く含まれるだろう。筆者らの目標はそれらの機構をすべて明らかにすることである。

筆者らは、酵母をモデルシステムとして、人工的に遺伝子のコピー数を変動させ、タンパク質の発現量を上げている。遺伝子のコピー数が変化してしまうという事態は、私たちに身近な例で言えば、がんやダウン症候群などの染色体異常を伴う疾患で起こる。このような疾患の細胞では、特定の遺伝子のコピー数が増えたことによりタンパク質の化学量不均衡が起こっている<sup>22)</sup>。一方、進行したがん細胞では、化学量不均衡による不具合が何らかの方法により回避されているらしい<sup>23)</sup>。筆者らは酵母を用いた解析が、がん細胞が獲得した化学量不均衡を回避する機構の解明にもつながるだろうと考えている。

#### PROFILE 守屋央朗

- 岡山大学異分野融合先端研究コア 准教授
- E-mail : hisaom@cc.okayama-u.ac.jp
- 趣味：ボタリング、ちょっとした読書

神戸大学大学院博士課程修了後、三菱化学生命科学研究所(特別研究員)、ワシントン大学メディカルスクール(リサーチ・アソシエイト)、科学技術振興機構ERATO-SORST北野共生システムプロジェクト(研究員)、科学技術振興機構(さきがけ研究者)、岡山大学異分野融合先端研究コア(テニュアトラック助教)などを経て2013年4月より現職。

## 文献

- 1) Cherry JM, et al: Nucleic Acids Res (2012) 40: D700-705
- 2) Ghaemmaghami S, et al: Nature (2003) 425: 737-741
- 3) Zaslaver A, et al: Nat Genet (2004) 36: 486-491
- 4) Dekel E & Alon U: Nature (2005) 436: 588-592
- 5) Wagner A: Mol Biol Evol (2005) 22: 1365-1374
- 6) Barkai N & Leibler S: Nature (1997) 387: 913-917
- 7) Little JW, et al: EMBO J (1999) 18: 4299-4307
- 8) von Dassow G, et al: Nature (2000) 406: 188-192
- 9) Kaizu K, et al: PLoS Genet (2010) 6: e1000919
- 10) Moriya H, et al: PLoS Genet (2006) 2: e111
- 11) Moriya H, et al: Mol Syst Biol (2011) 7: 556
- 12) Makanae K, et al: Genome Res (2013) 23: 300-311
- 13) Chino A, et al: PLoS One (2013) 8: e73319
- 14) Ciosk R, et al: Cell (1998) 93: 1067-1076
- 15) Holt LJ, et al: Nature (2008) 454: 353-357
- 16) Springer M, et al: Mol Syst Biol (2010) 6: 368
- 17) Torres EM, et al: Cell (2010) 143: 71-83
- 18) Pavelka N, et al: Nature (2010) 468: 321-325
- 19) elBaradi TT, et al: Curr Genet (1986) 10: 733-739
- 20) Burke D, et al: Mol Cell Biol (1989) 9: 1049-1059
- 21) Singh RK, et al: Nat Cell Biol (2009) 11: 925-933
- 22) Sheltzer JM & Amon A: Trends Genet (2011) 27: 446-453
- 23) Williams BR & Amon A: Cancer Res (2009) 69: 5289-5291