

酵母のすべての遺伝子の「限界コピー数」を測る

金高令子, 蒔苗浩司, 守屋央朗

われわれは、出芽酵母のすべての遺伝子の限界コピー数を測った。酵母の細胞システムは、その80%以上の遺伝子それぞれが100コピー以上になっても破綻しなかった。一方で、わずかにコピー数が上昇するだけで細胞システムが破綻する遺伝子も100程度見つかった。これらの“量感受性遺伝子”はどんな特長をもっていたのだろうか？

1つの細胞は数千から数万の遺伝子をもっており、それぞれから必要ときに必要な量のタンパク質が発現する。それぞれの細胞内での存在量は一万倍以上も異なるが、この「量」が細胞システムの許容範囲を超えて過剰になると、細胞機能にさまざまな異常が生じる。例えば、ダウン症候群は21番染色体が1本余剰になることで発症するが、これは余剰な遺伝子が過剰に発現することが原因であると考えられている。また、がん細胞では特定の遺伝子が過剰に発現しており、これががん細胞の性質を決定していることが知られている。

上記のように、遺伝子の過剰発現が細胞機能に悪影響を及ぼすことはよく知られているものの、どのような遺伝子の発現がどれくらい過剰になったときに細胞機能に悪影響を及ぼすのか、またどんな分子機構がその原因となっているのかについて、これまで体系的に調べられたことがなかった。そこでわれわれは、真核細胞の単純なモデルである出芽酵母の約6,000の遺伝子すべてについて、「過剰発現の限界」の測定を行った。

遺伝子つなひき法：遺伝子の「過剰発現の限界コピー数」を測定する実験法

これまでに、われわれは標的となるタンパク質の発現量の限界を、その遺伝子の限界コピー数として測る、遺伝子つなひき (genetic Tug-Of-War : gTOW) 法を開発している。この実験法の詳細については、守屋のホームページ¹⁾を参照していただきたいが、簡単にその原理を述べると、限界を知りたい遺伝子をネイティブなプロモーターごと専用のプラスミドに組み込み細胞に導入する。このプラスミドの細胞内でのコピー数は、培地中からロイシンを抜くことで100以上に増やすことができる。標的の遺伝子に過剰発現の限界がある場合、そのコピー数は限界よりも低くおさえられるので、ロイシンのない培地での細胞内のプラスミドコピー数をリアルタイムPCRにより測ることで、標的の遺伝子の過剰発現の限界がコピー数として算出できる。この方法では、タンパク質の発現量の限界を直接測定するのではなく、その遺伝子のコピー数をどこまで増やせるかという方法で検定しているので、われわれは

Measuring the copy number limits of all genes in yeast

Reiko Kintaka¹⁾/Koji Makanae²⁾/Hisao Moriya²⁾: Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University¹⁾/Research Core for Interdisciplinary Sciences (RICS), Okayama University²⁾(岡山大学自然科学研究科地球生命物質科学専攻¹⁾/岡山大学異分野融合先端研究コア²⁾)

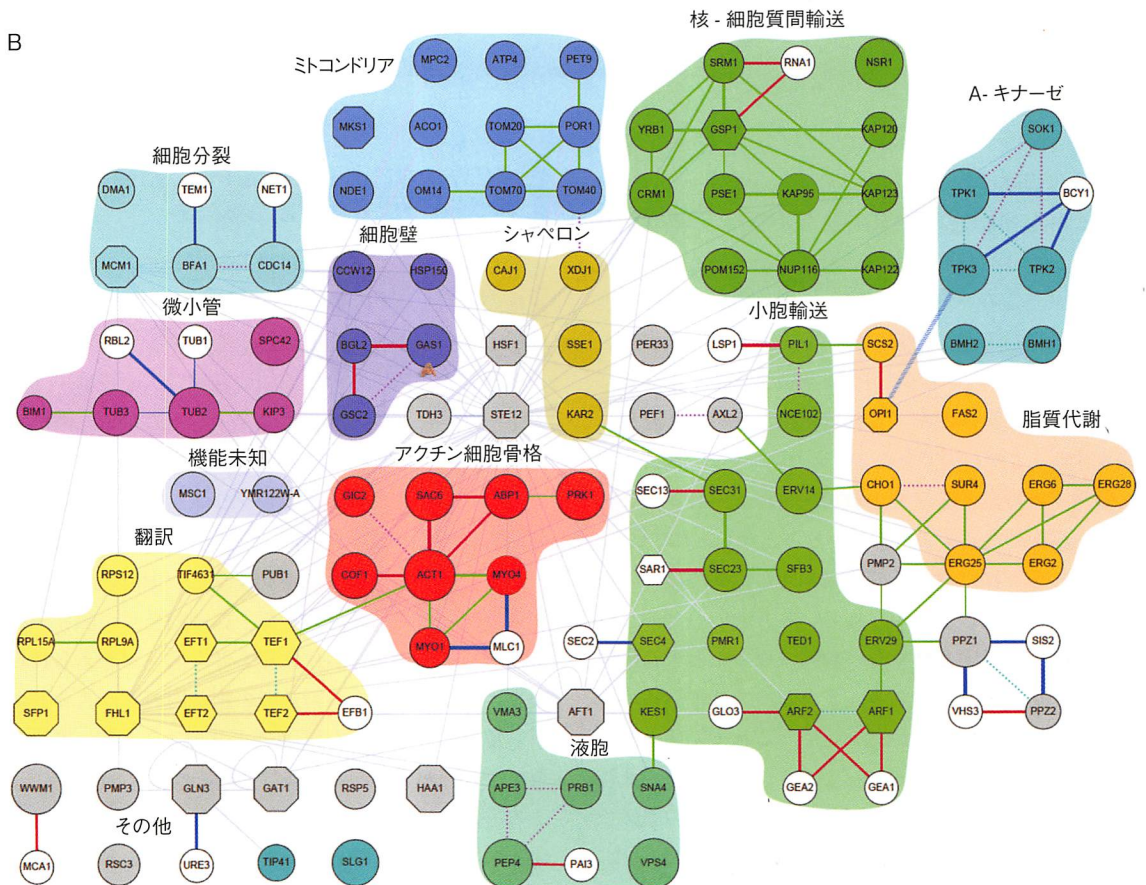
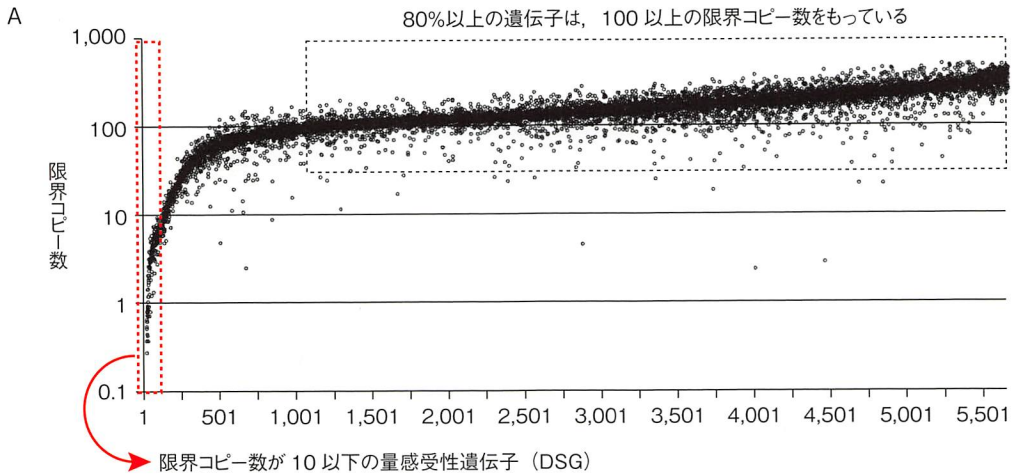


図1 gTOW法による、酵母のすべての遺伝子の解析

A) gTOW法によって解析された、出芽酵母のすべての遺伝子の限界コピー数。2回の解析の平均の低いものから高いもの順に遺伝子を並べてある。B) 115個のDSGの機能と相互作用。それぞれの遺伝子を機能カテゴリごとに色づけし、タンパク質間、タンパク質-DNA相互作用の情報により各遺伝子をつないでいる。白い遺伝子は、図2で調べたパートナー候補遺伝子を示しており、青い太線は実際にパートナー関係にあることが示されたもの(文献5より転載)

gTOW法で得られるデータのことを「過剰発現の限界コピー数」とよんでいる。

gTOW法による出芽酵母の全遺伝子の解析

前述の方法で、われわれは出芽酵母のすべてのタンパク質をコードする遺伝子の限界コピー数を測定した。図1 Aはその結果である。驚いたことに、酵母の80%以上の遺伝子は100コピー以上になっても細胞機能が破綻しなかった。これは、酵母の細胞システムが遺伝子の過剰発現に対して一般的に頑健であることを意味している。その一方で、限界コピー数がわずか10以下の遺伝子も100程度存在していた。われわれは、これらの遺伝子を量感受性遺伝子(dosage sensitive gene: DSG)と名付けた。図1 BはDSGがどのような機能の遺伝子であり、それぞれどのように相互作用しているかを示している。これらの遺伝子には、細胞内の輸送や細胞骨格に関係するものが多く含まれていた。また、細胞内での存在量が多いタンパク質や複合体を形成するタンパク質をコードしているといった特徴がみられた。

「タンパク質負荷」が、DSGを生み出す

DSGは発現量が多い傾向があったことから、われわれはもともと発現量が多い遺伝子のコピー数が増加することにより、タンパク質の合成・分解系に負荷をかけることがDSGを生む機構となっているのではないかと考えた。そこでわれわれは、大量に発現していることが知られている遺伝子のタンパク質コーディング領域をクラゲの緑色蛍光タンパク質(GFP)で置換し、gTOW法により限界コピー数を測定した(図2 A)。その結果、確かに*TDH3*や*TEF1*など大量に発現しているDSGのGFP置換体の限界コピー数は、コントロールベクターのそれよりも有意に低かった(図2 B)。さらに、分解を促進するデグロン配列を付加したGFP置換体を用いた場合、限界コピー数の上限はさらに減少した(図2 A)。これらの結果は、タンパク質の合成・分解に強い負荷をかける遺伝子は、DSGとなることを意味している。なお、タンパク質合成への強い負荷が細胞増殖に悪影響を与える現象は、「protein burden

(タンパク質負荷)」とよばれ、1970年代には関連する報告がある²⁾。本研究では、タンパク質負荷がDSGを生む分子機構の1つであることを示したことになる。

「化学量不均衡」がDSGを生み出す

タンパク質負荷がDSGを生み出す機構であることはわかった。しかし、DSGのなかには発現量が高くない遺伝子も多く存在しており、タンパク質負荷がすべてのDSGに当てはまりそうにない。前述のように、酵母のDSGには複合体の構成成分が多く含まれていたことから、われわれは、複合体をつくるタンパク質どうしの化学量の不均衡がDSGを生むもう1つの分子機構であると考えた。実際にいくつかのDSGには、化学量のバランス関係にありそうな「パートナー遺伝子」が存在していた。そこで、DSGのコピー数とパートナー遺伝子のコピー数を同時に増やすことで、DSGの限界コピー数をあげることができるかを調べた(図2 C, D)。その結果、調べた49ペアのうち13ペアがバランス関係にあることがわかった(図1 B, 青い太線)。これらのことは、複合体の構成タンパク質の化学量の不均衡がDSGを生み出すことを表している。

おわりに—DSGは、ゲノム構造を規定する?

一般的に細胞システムは、遺伝子発現の乱れなどの擾乱にあらがって機能を維持する特性「ロバストネス(頑健性)」を、長い進化の歴史の結果獲得したと考えられている³⁾。酵母の80%以上の遺伝子それぞれを100コピーにあげても細胞機能は破綻しなかったことは、これを支持している。その一方で、わずかなコピー数の上昇で細胞システムを破綻させる遺伝子(DSG)が複数存在している、という事実は何を意味しているのだろうか? われわれは、DSGとそのパートナーがつくる「遺伝子量バランスのネットワーク」が、染色体の構成を規定しているのではないかと考えている。実際にわれわれが同定した13ペアは、酵母の別々の染色体に位置している。複製のミスにより染色体の構成に異常が起きると、このネットワークが破綻し「子孫を残さない」という形で、安定な自己を維持しているのではないだろうか? これは突飛な仮説ではない。酵母の

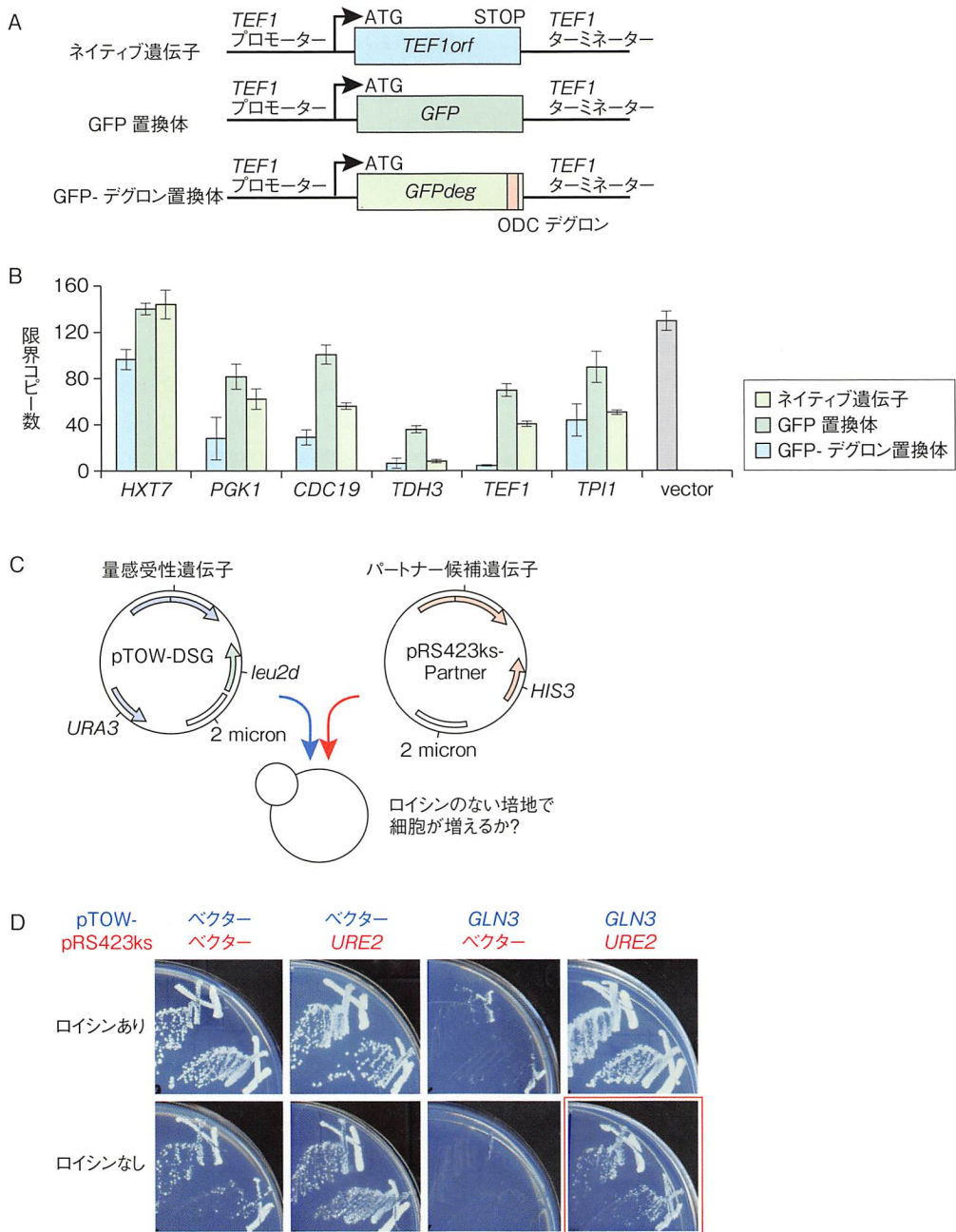


図2 「タンパク質負荷」と「化学量不均衡」がDSGを生み出す

A) タンパク質負荷を調べるためのコンストラクト。発現量の多い遺伝子として、*TEF1* を例に、タンパク質コーディング領域を GFP に置換した GFP 置換体、分解を促進するデグロン配列を付加した GFP- デグロン置換体の構造を示す。これらの遺伝子を gTOW 用プラスミドに組みこみ、出芽酵母に導入後、限界コピー数を測定した。B) 各遺伝子の GFP 置換体 / GFP- デグロン置換体の限界コピー数。TDH3 や TEF1 など、ベクターよりも有意に限界コピー数が低く、GFP の大量な発現そのものが、限界コピー数を決めていていることがわかる。C) DSG とバランス関係にあるパートナー遺伝子を同定する実験の概念図。DSG を gTOW 用プラスミドに、パートナー候補遺伝子を別の多コピープラスミド (pRS423ks) に組み込み、酵母の細胞に同時に導入する。候補遺伝子が実際のパートナーであれば、この酵母は DSG のコピー数上昇を許容するのでロイシンのない培地で生えることができる。D) パートナー遺伝子を同定する実験の例。DSG である *GLN3* とパートナー遺伝子 *URE2* を例に示した。*URE2* の導入により、酵母は *GLN3* のコピー数上昇を許容できるようになった (赤枠) (文献5より転載)

異数体では、タンパク質負荷や化学量不均衡などの強いストレスが細胞増殖に悪影響を与えていることが知られている。一方で、異数性が一般的にみられるがん細胞では、これらのストレスを何らかの方法で回避しているらしい⁴⁾。われわれは今後、酵母のDSGの研究を通じて、この謎に迫りたいと考えている。

文献

- 1) <http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/~hisao/>
- 2) Andrews, K. J. & Hegeman, G. D. : Selective disadvantage of non-functional protein synthesis in Escherichia coli. J. Mol. Evol., 8 : 317-328, 1976
- 3) Kitano, H. : Biological robustness. Nat. Rev. Genet., 5 : 826-837, 2004
- 4) Torres, E. M. et al. : Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. Science, 317 : 916-924, 2007
- 5) Makanae, K. et al. : Identification of dosage-sensitive genes in Saccharomyces cerevisiae using the genetic tug-of-war method. Genome Res., 23 : 300-311, 2013

● 筆頭著者プロフィール ●

金高令子：2010年、岡山大学理学部卒業。'12年、岡山大学自然科学研究科生物科学専攻修了。岡山大学自然科学研究科地球生命物質科学専攻在学中。

Book Information

よくわかる ゲノム医学

好評発売中

ヒトゲノムの基本からテーラーメイド医療まで

監修／菅野純夫 著／服部成介, 水島-菅野純子

ゲノム医学のエッセンスを体系的に解説。個人個人のゲノムに合わせた創薬・治療が当たり前になりつつある時代。知っておくべき知識が豊富なイラストとわかりやすい文章でしっかり身につく!



- ◆ 定価 (本体 3,500 円+税)
- ◆ 2色刷り B5判 206頁
- ◆ ISBN978-4-7581-0928-4

ゲノム情報の医療への応用がわかりやすく学べる最適な教科書

発行  羊土社