

研究課題別評価書

1. 研究課題名

真核細胞の *in vivo* ロバストネス解析

2. 氏名

守屋 央朗

3. 研究のねらい

ロバストネスは生命現象に普遍的に見られるシステムとしての基本特性である。本研究では、出芽酵母を主要なモデル系として、私たちが開発したgTOW法を用いて、細胞のロバストネス発揮の基本原理の解明、ならびに高性能な細胞周期コンピュータモデルの開発を目指す。さらに、細胞種など個別のシステムに存在する脆弱点を明らかにするための一般的な研究の枠組みを確立し、長期的には癌などの疾患に対する新たな治療手段の開発への道をひらく。

4. 研究成果

遺伝子綱引き (genetic Tug-Of-War: gTOW) 法は、「標的遺伝子のコピー数をどこまであげたら細胞システムが破綻するか」を調べることができる。遺伝子のコピー数をあげるとその遺伝子が過剰に発現することから、gTOW では遺伝子の過剰発現に対する細胞システムのロバストネスを評価することができる。私たちは本さきがけ研究以前に、この実験手法を出芽酵母で開発し、30の細胞周期関連遺伝子のコピー数の限界を測定し、出芽酵母細胞周期のロバストネスを解析したり、Chen らが開発した酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデルを評価している (*PLoS genetics* e111)。

本研究ではこの先行研究をさらに拡張し、出芽酵母細胞周期を gTOW により詳細に解析するとともに、このデータを用いて予測精度の高いコンピュータモデルを開発することを当初の目標とした。さらに gTOW を細胞のシステムレベルの解析の一般的な枠組みとして確立することを目的とした。

上記の目的をふまえて、私は本さきがけ研究期間で大きく以下に述べる3つの研究を行った。

(1) 出芽酵母細胞周期の gTOW によるより詳細な解析と、そのデータを用いたコンピュータモデルの改良

(2) 分裂酵母での gTOW の開発と細胞周期関連遺伝子の解析、ならびにそのデータを用いたコンピュータモデルの改良

(3) 出芽酵母のすべての遺伝子の gTOW による解析。

以下にそれぞれの詳細について述べる。

(1) 出芽酵母細胞周期の gTOW によるより詳細な解析と、そのデータを用いたコンピュータモデルの改良

上述の先行研究で私は、細胞周期システムが *ESP1* (セパレーズ遺伝子) の過剰発現に対してロバストである一方、*CDC14* (M 期フォスファターゼ遺伝子) の過剰発現に対して著しく脆弱であることを見いだしている。本研究では、それぞれの遺伝子の過剰発現の限界値を、酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデル (Chen2004 モデル) と比較することで、*CDC14* の過剰発現に対して細胞が著しく脆弱である理由が、その阻害因子 *NET1* との「遺伝子量の不均衡」から生じていることを予想し、これを2次元の gTOW と呼ぶ実験により検証することに成功した。

ESP1 についても同様な遺伝子量の不均衡による脆弱性がコンピュータモデルで予測された。しかし、モデルの予測に反し、実際の細胞は *ESP1* の過剰発現に対してロバストであった。このことから、*ESP1* の阻害因子である *PDS1* との量的な不均衡をさける機構が細胞内に存在していると考え、その機構を同定した。遺伝子破壊株での gTOW 実験と文献の検索、ならびに部位特異的変異を用いた gTOW 実験により、*ESP1* の過剰発現に対する細胞周期のロバストネス発揮

の原理として、*Pds1*を *Esp1*に対して細胞内に大過剰存在させていること、その量を保障するためにサイクリン依存性キナーゼにより *Pds1* がリン酸化され安定化される機構が使われていることが明らかになった。さらにこの機構を組み込み Chenらのモデルを改良した。

私たちはこのようにして、「モデルの予想→gTOW による検証→ロバストネスを生み出す新たな分子機構の同定→モデルへのフィードバック」という、細胞システムのロバストネス発揮の原理の同定と統合的なコンピュータモデルの開発の一般的な枠組みを確立できたと考えている。この研究は、*PLoS genetics* 誌に投稿し、in press となっている。

なお、本研究の過程で、gTOW 実験の精度をあげたり、gTOW 実験の様子を一細胞レベルで観察するため gTOW 用プラスミドの改良し、特許を申請した。

(2) 分裂酵母での gTOW の開発と細胞周期関連遺伝子の解析、ならびにそのデータを用いたコンピュータモデルの改良

分裂酵母は出芽酵母と同様に真核細胞のモデル生物として確立した地位を持っているが、出芽酵母とは進化的に10億年の距離があるとされる。これら2つの酵母ならびにほ乳類などの高等真核生物の細胞周期は、サイクリン依存性キナーゼの制御についてシステムレベルでの共通性が見つかっている。私は、ロバストネスについても真核細胞間に共通性がみられるかを調べる目的で、本研究で分裂酵母でも gTOW 法を開発した。この過程で作られた gTOW 用のプラスミドについては、特許を出願した。

さらに開発した分裂酵母の gTOWにより、分裂酵母の細胞周期で働く約30の遺伝子についてその上限コピー数を測定し、出芽酵母の細胞周期遺伝子の上限コピー数と比較した。その結果、両酵母に共通した「脆弱なコア」が見つかった。さらにこのデータを用いて、Oxford 大学の Bela Novak 教授との共同研究により、分裂酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデルを開発したこの結果は現在論文発表の準備を進めている。

なお、分裂酵母での gTOW 法の開発の過程で、出芽酵母で遺伝子の大規模な機能解析に利用されている遺伝子クローニング法(ギャップリペアー法)が分裂酵母でも有効に機能することを発見し、論文として発表した(Chino & Moriya, *PLoS One*, e9652)。

(3) 出芽酵母のすべての遺伝子の gTOW による解析 (gTOW6000)

出芽酵母は約6000の遺伝子を持っている。本研究では、これらすべての遺伝子のコピー数の上限を gTOW 法によって測定し、細胞システム全体のロバストネスについて議論することを試みた。この一連の研究を私達は gTOW6000と呼んでいる。この大規模な解析は、さきがけ研究のみの規模では実現がむずかしいことから、ERATO-SORST 北野共生システムプロジェクトと共同でおこなった。

ゲノム上のすべての遺伝子をPCRにより増幅し gTOW 用のプラスミドに組み込み、これらのプラスミドを持つ酵母の増殖速度を測定するとともに、細胞が持つプラスミドのコピー数を測定した。現在までにプラスミドの構築とコピー数の測定は終了している。現在、細胞がその過剰発現に対して著しく脆弱であると考えられる一群の遺伝子について、さらに検証を進めている。

gTOW6000の解析は、それぞれの遺伝子をどこまで過剰発現できるのかについての基礎的なデータを提供すると考えている。また、gTOW6000でつくられたプラスミドコレクションは、遺伝子の過剰発現をベースとしたスクリーニング系にも広く利用可能であることから、National Bio-Resource Project (NBRP) 酵母にこのプラスミドコレクションを寄託した。

現在までの gTOW6000の解析による最も大きな成果は、遺伝子がわずか2コピー程度になっただけで細胞のシステムが破綻してしまう遺伝子が20以上あるという発見である。私はこれを説明する分子機構として、上記(1)で発見した「遺伝子量の不均衡」を考えており、その検証のための実験を計画している。これらの研究結果は2010年度にインパクトの高い論文として発表したいと考えている。

その他

gTOW は、私自身が開発した実験手法であり、この実験系を用いた細胞システムのロバストネ

ス解析やコンピュータモデルの開発は、非常にオリジナリティの高い研究の枠組みであると考えている。そのため、社会への認知を高める努力も必要であると考え、本研究の枠組みについて、複数の一般的な出版媒体に解説を発表するとともに、多数の招待講演を行った。

用語解説

統合的なコンピュータモデル: 細胞が持つ特定のシステム(例えば細胞周期制御システム)で働く分子とその相互作用を詳細に記述することで作られるコンピュータ(数理)モデル。究極的には、細胞内で起きているすべての事象を予測できるような、「細胞シミュレータ」に発展していくと期待されている。一方で、細胞内にはあまりにも未知な要素が多いために、統合的なモデルは「人の考えていることを再現する」以上のことはできず、(気象シミュレーターのように)細胞の未知の挙動を予測する能力を持たせることは難しいという考え方もある。

ロバストネスと脆弱性: ロバストネスとは、システムが内乱や外乱にあらがって機能を維持する特性のことをいう。本研究では、細胞(というシステム)が、細胞内で働く遺伝子の過剰発現に対してどの程度機能を維持できるかを、細胞のロバストネスの評価の指標としている。例えば、ある遺伝子が100倍過剰に発現しても細胞が死なない場合、細胞はその遺伝子の過剰発現に対してロバストネスが高い(あるいはロバストである)という。一方、ある遺伝子が数倍過剰に発現しただけで細胞が死ぬ場合、細胞のシステムはその遺伝子の過剰発現に対してロバストネスが低い(あるいは、脆弱である)という。

5. 自己評価

目標に掲げた、gTOW 法を基盤とした細胞のロバストネス解析、コンピュータモデルの開発の枠組みはほぼ完成できた。本研究期間を通じてこの枠組みを広く世界にアピールする機会に恵まれ認知度も高まったと考えている。一方で、原著論文の発表は遅れており、現在出版中の2報の論文のみとなったことについては残念に思っている。しかし、これらのテーマ以外にも論文発表の前段階まで来ている成果があるので、よりインパクトのある形での論文発表を行いたい。

6. 研究総括の見解

出芽酵母での遺伝子の過剰発現の限界値を、酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデル(Chen2004 モデル)と比較することで、*CDC14* の過剰発現に対して細胞が著しく脆弱である理由が、その阻害因子 *NET1* との「遺伝子量の不均衡」から生じていることを予想し、これを2次元の gTOW と呼ぶ実験により検証することに成功した。モデル系の検討から新たな予測が可能な系を構築してきたことは評価する。さらに、この理論を、検証を踏まえつつ、発展させて行って頂きたい。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

① 論文

1. Ayako Chino & Hisao Moriya*, Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One*, Vol.5 No.3 e9652 (2010)
2. Kazukari Kaizu, Hisao Moriya*, and Hiroaki Kitano, Fragilities Caused by Dosage Imbalance in Regulation of the Budding Yeast Cell Cycle, *PLoS genetics*, in press.

*Corresponding author

②特許

研究期間累積件数: 2件

発明者: 守屋央朗、吉田由紀、北野宏明

発明の名称: サッカロミセス属微生物用プラスミドベクター

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構、特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構

出願日: 平成19年11月8日

発明者: 守屋央朗、吉田由紀、北野宏明

発明の名称: シゾサッカロミセス属微生物用プラスミドベクター

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構、特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構

出願日: 平成19年11月8日

③著書・総説

1. 守屋央朗 北野宏明「gTOW 法によるロバストネスの測定」実験医学(2007) Vol.25 No.2 増刊「ゲノム情報と生命現象の統合的理解」 pp191-197, 2007
2. 守屋央朗「頑健さを支えるしなやかさを計測する」生命誌 58
3. 守屋央朗「細胞システムのロバストネスの測定」「現代化学」2009年3月号 (No.456) pp26-32
4. 守屋央朗「生命システムのロバストネスを探る・出芽酵母の研究を中心として」「化学と生物」2009年4月号 pp269-274

④学会発表

1. 「Upper limit dosage of genes involved in cell division cycle in *S. pombe*.」 2007年6月12日 Centre for Computational and Systems Biology (Trento, Italy)
2. 「*In vivo* robustness analysis of eukaryotic cell division cycle using genetic tug-of-war method」 2008年2月4日 International Workshop for Future Challenges of Systems Biology Workshop (FCSB) 2008 (Chiyoda-ku, Tokyo)
3. 「Robustness analysis of cellular systems using genetic tug-of-war method」 2008年7月7日 Surrey UK-Japan Systems Biology Workshop (Surrey, UK)
4. 「*In vivo* robustness analysis of cellular systems using genetic tug-of-war method」2008年7月9日 Systems Biology Centre/Department of Biochemistry, Univ. of Oxford (Oxford, UK)
5. 「*In vivo* robustness analysis of the yeast cell cycle」2010年2月25日 The 13th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference on Systems Biology in Cell Cycle Regulation (NIH, Bethesda, USA)