

酵母 2 μ プラスミドのコピー数変動の数理的解析佐伯 望^{a)}・守屋 央朗^{a, b)}
(農芸化学コース)Mathematical analysis of copy number variation of 2 μ -based plasmids in yeast cellsNozomu Saeiki^{a)}, Hisao Moriya^{a, b)}
(Course of Agricultural Chemistry)

Plasmids with the 2 μ plasmid origin are commonly-used in the genetic engineering of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Intracellular copy numbers of 2 μ plasmids are different depending on the genes inserted into the plasmids. This difference is thought to occur from the difference in the growth efficiency (fitness) produced by the positive- and negative-selection biases of genes inserted in the plasmid. In this study, we made a mathematical model based on this assumption. Computational simulations of the model validated that copy numbers of the plasmids are rapidly settled depending on the fitness created by the gene on the plasmid. The copy number of a plasmid only contains a bias to keep the plasmid in a single copy became average 20 copies per cell when the plasmid is randomly distributed, suggesting that no positive distribution mechanism is required for a plasmid to become multicopy.

Key words : yeast, 2 μ plasmid, mathematical model

緒 言

外来の DNA により生物の機能を制御する遺伝子工学では、外来 DNA の宿主への導入のためにしばしばプラスミドと呼ばれる小分子の DNA が用いられる。プラスミドは多くの場合環状で、宿主の細胞内で複製するための複製起点や、プラスミドが導入された細胞を識別するための選択マーカー遺伝子を持つ。大腸菌や酵母などの宿主生物で遺伝子工学用に用いられるプラスミドは、そもそもその宿主が持つ内在性のプラスミドを改変して作られていることが多い。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 2 μ プラスミドもそのようなプラスミドの 1 つである。S. *cerevisiae* には、2 μ プラスミド (2 μ m DNA, 2 μ m circle) と呼ばれる環状の DNA が内在的に存在している¹⁾。2 μ プラスミドは、その存在が宿主細胞である S. *cerevisiae* にいかなる利益も与えない「利己的な DNA」であると考えられている。2 μ プラスミドは宿主の複製サイクルに伴って増幅する。この増幅は、ローリングサイクル複製によって行われるため、プラスミドは 1 細胞周期で多コピー化することができる^{2,3)}。ローリングサイクルによる増幅は、Flp が触媒するプラスミド分子内の部位特異的組み換えが引き金となって生じ、プラスミド上にコードされた 3 種類のタンパク質を介したフィードバックにより抑制される。さらにこのプラスミドは、STB と呼ばれる DNA 領域を介して宿主の染色体に結合しながら娘細胞に安定に分配される^{2,3)}。結果としてプラスミ

ドの細胞内のコピー数は 50 コピー程度に安定に維持される。

2 μ プラスミドの複製起点を含む DNA 断片に選択マーカー遺伝子を連結させたプラスミドは酵母細胞で数十コピーとなり安定に維持されるため、酵母細胞の遺伝子工学用のプラスミドベクターとして利用されており、総称として yeast episomal plasmid (YEp) と呼ばれている^{4,5)}。YEp プラスミドは、内在性の 2 μ プラスミドがもつ Flp 認識領域 (FRT) を欠失している。従って、このプラスミドはローリングサイクル増幅せず、宿主の DNA と同様に細胞周期あたり 2 倍の複製サイクルを持ち、フィードバックを介したコピー数制御も存在しないと考えられる。実際、様々な YEp プラスミドの細胞内での平均コピー数は、そこに組み込まれた DNA の影響をうけて 9 から 240 コピーとなり、コピー数制御が存在する内在性の 2 μ ミクロンプラスミドと大きく異なる⁶⁾。

YEp プラスミドである pSBI40 や pTOWug2-836, pTOW40836 の細胞内のコピー数も、プラスミド上の遺伝子が細胞に及ぼす影響に応じて変動する⁷⁻⁹⁾。この性質

Received September 25, 2019

a) 岡山大学大学院 環境生命科学研究科

(Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University)

b) 岡山大学 異分野融合先端研究コア

(Research Core for Interdisciplinary Sciences, Okayama University)

を利用すると、プラスミドに組み込んだ遺伝子のコピー数変動が細胞に及ぼす影響を、平均プラスミドコピー数を指標とすることで評価できる。例えば、ロイシン合成酵素 *LEU2* の発現量低下型アレル *leu2d* が組み込まれた pSBI40 を *LEU2* 欠損の酵母細胞に導入し、この酵母株をロイシンのある培地とない培地で培養すると、プラスミドのコピー数はそれぞれ約35と150コピーとなる⁷⁾。これは、*leu2d* の必要性に応じてプラスミドのコピー数が増減することを意味する。一方、このプラスミドに過剰発現が増殖に悪影響を与える遺伝子を組み込むと、プラスミドのコピー数はその悪影響の度合いにより下がる。例えば、細胞周期の制御因子である *MCM1* を標的遺伝子として組み込んだ pSBI40 のコピー数は、ロイシンのある培地とない培地でそれぞれ平均して3.4と11.9コピーとなる。ロイシンのない培地でのコピー数決定のメカニズムは、*leu2d* によるコピー数上昇の選択圧と、*MCM1* 過剰による増殖阻害がもたらすコピー数下降の選択圧との均衡によるものと考えられる。筆者らは、この均衡を利用して標的遺伝子の過剰が及ぼす増殖阻害の度合いを測定する実験手法を、「遺伝子つなひき (gTOW) 法」と呼び、これまでに *S. cerevisiae* のほぼすべての遺伝子 (5,700) について gTOW 法による解析を終了している⁹⁾。また、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても gTOW 法を開発し細胞周期関連遺伝子の解析を行った¹⁰⁾。

gTOW 法の原理はプラスミドの分配と細胞の増殖を加味した以下のモデルで説明できる。このモデルの前提は、gTOW 法にもちいるプラスミドが多コピーであり、適度なばらつきをもって娘細胞に分配されることである。ばらつきの結果生じた多数の細胞の中で、最大の増殖速度を与えるコピー数のプラスミドをもつ細胞が、優先的に成長しプラスミドを複製して、そのコピー数に近いプラスミドをもつ子孫細胞を生じさせる。これが繰り返

返されることで、最終的に集団が持つプラスミドのコピー数は最大の増殖速度を与えるコピー数に収束する。このモデルは YEp プラスミドの性質から直感的に考えたものである。本研究では、上記の前提から gTOW 法で見られるプラスミドコピー数の変動・収束現象が生じるかを理論的に検討するために、プラスミド複製と分配、プラスミドが与える増殖速度の違い (適応度) を組み込んだ数理モデルを構築し、これを用いた計算機シミュレーションを行った。その結果、内在性の安定化機構を持たない 2μ プラスミドのようなプラスミドは、組み込まれた遺伝子が与える適応度により集団中のプラスミドコピー数を変動させる性質をもつことが確かめられた。さらに、ランダムに分配されるプラスミドは、プラスミド維持の選択圧のみで20コピー程度の平均コピー数に保持されることも明らかとなった。

方 法

図1に、構築した数理モデルの概要を示す。この数理モデルは、Sand らの数理モデルを筆者らのケースに合わせて発展させたものである¹¹⁾。

酵母細胞内の YEp プラスミドは、細胞周期に沿って次の様な運命を辿ると仮定する。1) 細胞内のプラスミドは、合成期に DNA の複製にともない2倍に増幅される。2) 2倍に増幅されたプラスミドは、分裂期に母細胞と娘細胞にランダムに分配される。3) 細胞内のプラスミドコピー数の違いが細胞の適応度に違いを生じさせる。1) より、DNA 複製前の細胞内のプラスミドコピー数 (N_{n-1}) と複製後のそれ (N) の関係を、

$$N = 2N_{n-1} \quad (\text{式1})$$

と表すことができる。2) において、 N コピーのプラスミドを持った母細胞が分裂し、 R コピーの母細胞が生じるとき、プラスミドの分配は、

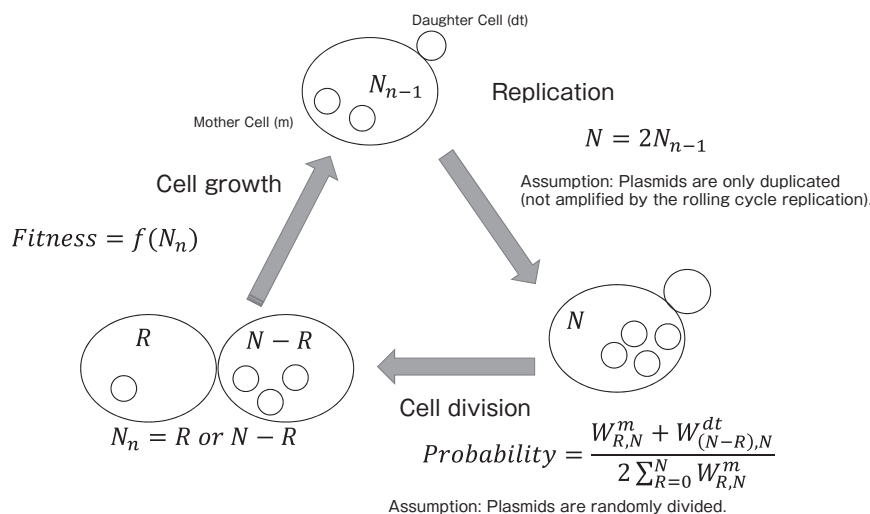


Fig. 1 A mathematical model of 2μ plasmid distribution.

The detail of the model is described in the Methods section.

$$W_{R,N}^m = \frac{N!}{(N-R)!R!} \quad (\text{式 2})$$

の組み合わせを持つ。よって、 N 個のプラスミドを持った母細胞から分裂し、 R 個のプラスミドを持つ母細胞と $N-R$ 個のプラスミドを持つ娘細胞が生じる確率 (*Probability*) は、

$$\text{Probability} = \frac{W_{R,N}^m + W_{(N-R),N}^{dt}}{2 \sum_{R=0}^N W_{R,N}^m} \quad (\text{式 3})$$

となる。3) では、適応度 (*Fitness*) はプラスミドコピー数を変数とする関数として定義した。また、 $Fitness = 1$ はその細胞が野生株と同様の適応度であることを意味する。本研究では、これらの式を Python (バージョン 3.6.6) を用いて計算した。Python の計算用ライブラリとして Numpy (バージョン 3.1.1) を利用した。

結果および考察

遺伝子工学でもちいられる 2 μ プラスミドの栄養要求性マーカーは、大抵の場合、1 コピーあれば栄養要求性を補えると考えられている。そこで、最も単純なモデルとして、次の *Fitness* 関数を定義する。

$$\text{Fitness}(N) = \begin{cases} 1, & N \geq 1 \\ 0, & N = 0 \end{cases} \quad (\text{式 4})$$

式 4 に従った数理モデルによるシミュレーションの結果を図 2 示す。ここで N の最大値は複製前 200 コピー、複製後 400 コピーとし、初期条件を 100 コピーとした。

図 2 A は各世代での細胞集団の変遷を示す。プラスミドコピー数の分布はコピー数の小さい側へと変遷し、最頻値は 1 コピーとなった。図 2 B は各世代での平均プラスミドコピー数を表し、平均コピー数は約 26 コピーで収束した。この変遷は、式 2 のプラスミドの分配の組み合わせの性質から説明することができる。組み合わせの数

$W_{R,N}^m$ とプラスミドのコピー数 R のバリエーションはそれぞれ N に依存する。よって、確率的な分配により小さい N を持つ細胞が生じたとき、その細胞からふたたび大きな N を持つ細胞が生じる確率は低くなる。そのため、世代数の増加に伴い、プラスミドコピー数の分布はコピー数の小さい側へと変遷する一方で、大きな N を持った細胞は大きなプラスミドコピー数 N の組み合わせ $W_{R,N}^m$ とプラスミドのコピー数 R のバリエーションを持つ。このことから式 4 の *Fitness* 関数ではすべての細胞のプラスミドコピーが 0 になることはなく、プラスミドを維持する選択圧のみでもプラスミドコピー数の平均は 20 程度に収束する。以上の結果は、プラスミドが多コピー化するために積極的な分配のメカニズムは必要ないことを示している。

プラスミドの増加は宿主の DNA 複製に負荷となることが考えられる。また、gTOW 実験ではプラスミド上に多コピー化が増殖阻害を引き起こす遺伝子をクローンする。そこで次に、プラスミド増加による悪影響を考慮した *Fitness* 関数を定義した。図 3 と図 4 は、それぞれ、多コピー化が弱い負荷と強い負荷を与える遺伝子を組み込んだ gTOW 実験に対応する *Fitness* 関数と計算機シミュレーションの結果を示す。

図 3 A の *Fitness* 関数は、gTOW 法での限界発現時における性質より次の 3 つの条件：遺伝子マーカー (*URA3*) は 1 コピーあれば栄養要求性を補える、プラスミド数の増加は *Fitness* を減少させる、*leu2d* は 100 コピー程度で栄養要求性を補える、から構築した。シミュレーション結果を図 3 B に示す。2, 3 世代目で分布の大きな遷移が生じ、10 世代目では、ほぼ定常状態に収束した。図 3 B の *Fitness* 関数では、図 4 A の *Fitness* 関数に、プラスミドにコードされたタンパク質のわずかな増加が細胞増

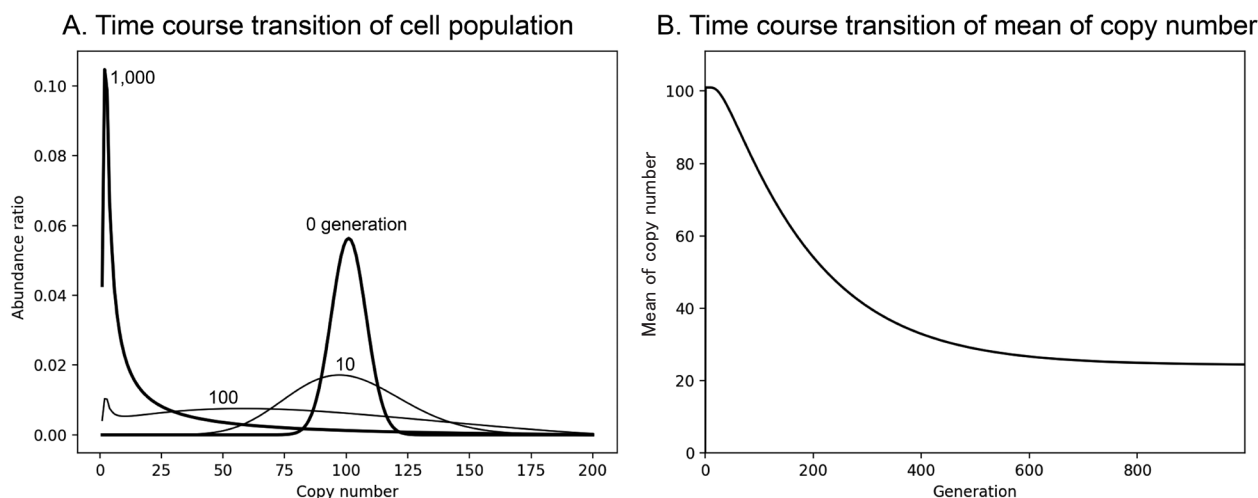


Fig. 2 Simulation results of the 2 μ plasmid distribution model.

A. Time course transition of cell population. Generations are indicated as the numbers.

B. Time course transition of mean of copy number. The simulation was started from the average 100 copies per cell.

殖を阻害するという条件を加えた。その結果を図4Bに示す。この結果、プラスミドの平均コピー数は約7コピーと低く収束した。これらの結果はgTOW法の結果と一致する。以上の結果より、内在性の安定化機構を持たない2 μ プラスミドのようなプラスミドでは、組み込まれた遺伝子が与える適応度により集団中のプラスミドコピー数分布を急速に変動させる性質をもつことが単純な条件による計算機シミュレーションにより確かめられた。

要 約

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子工学でもちいられる2 μ プラスミドの細胞内のコピー数はプラスミドに組み込まれた遺伝子により異なる。これは、プラ

スミドの分配がもたらすばらつきと、プラスミド上の遺伝子が生じさせる正・負の選択圧による増殖速度（適応度）の違いに起因していると考えられる。本研究では、この仮定による数理モデルを構築し計算機シミュレーションで検証することで、適応度に応じて集団中の細胞が保持するプラスミドのコピー数が収束することを検証した。また、ランダムなプラスミド分配を組み込んだ本研究モデルで、プラスミドを維持する選択圧のみでもプラスミドコピー数の平均は20程度に収束したことから、プラスミドが多コピー化するために積極的な分配のメカニズムは必要ないことが分かった。

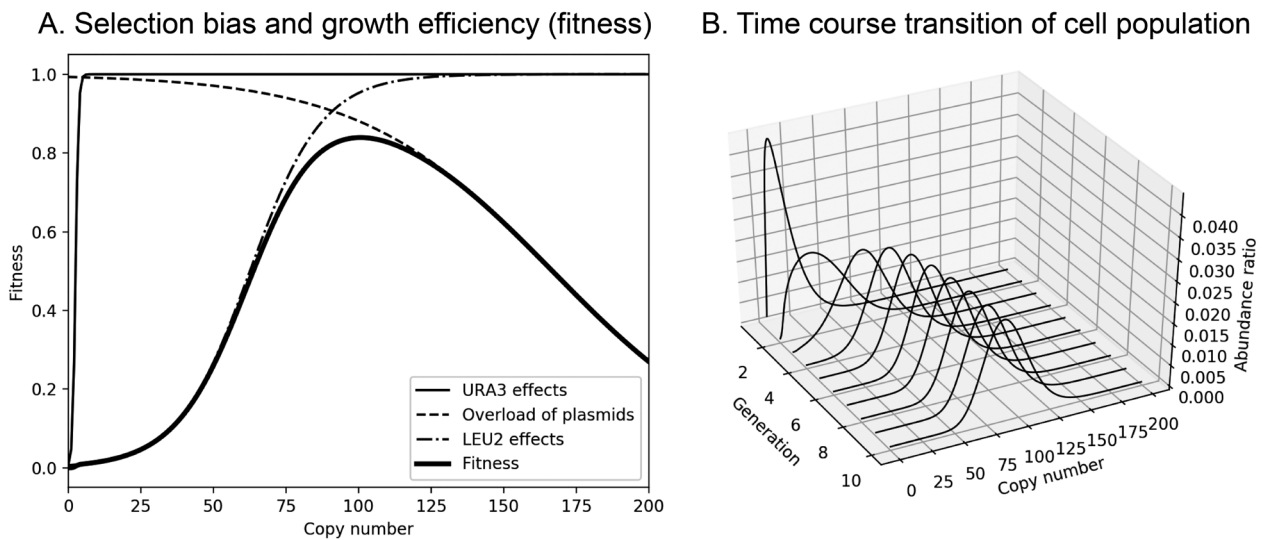


Fig. 3 Simulation of the plasmid distribution with a gene whose overexpression causes weak fitness defect. A. Selection bias and growth efficiency used for the simulation. B. Time course transition of cell population.

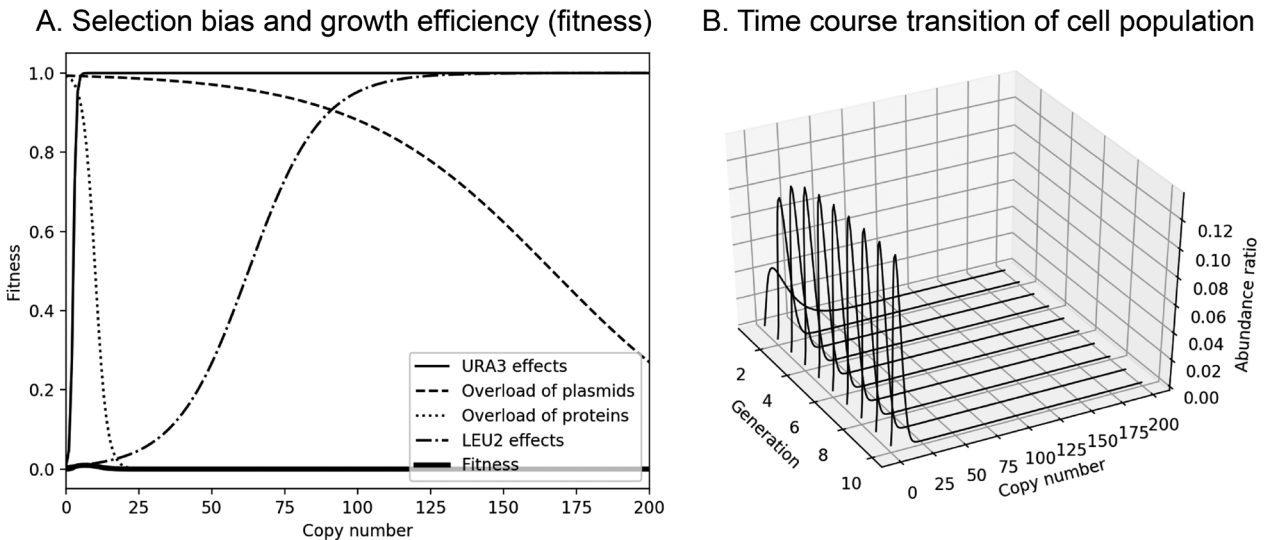


Fig. 4 Simulation of the plasmid distribution with a gene whose overexpression causes weak fitness defect. A. Selection bias and growth efficiency used for the simulation. B. Time course transition of cell population.

引用文献

- 1) Strobe PK, Kozmin SG, Skelly DA, Magwene PM, Dietrich FS, McCusker JH. 2 μ plasmid in *Saccharomyces* species and in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2015 Dec ; 15(8).
- 2) Liu YT, Sau S, Ma CH, Kachroo AH, Rowley PA, Chang KM, Fan HF, Jayaram M. The partitioning and copy number control systems of the selfish yeast plasmid : an optimized molecular design for stable persistence in host cells. *Microbiol Spectr.* 2014 Oct ; 2(5).
- 3) Chan KM, Liu YT, Ma CH, Jayaram M, Sau S. The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* : a miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid.* 2013 Jul ; 70(1) : 2-17.
- 4) Rose MD, Broach JR. Cloning genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol.* 1991 ; 194 : 195-230.2
- 5) Schneider JC, Guarente L. Vectors for expression of cloned genes in yeast : regulation, overproduction, and underproduction. *Methods Enzymol.* 1991 ; 194 : 373-388.
- 6) Fitcher AB, Cox BS. Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1984 Jan ; 157(1) : 283-290.
- 7) Moriya H, Shimizu-Yoshida Y, Kitano H. In vivo robustness analysis of cell division cycle genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2006 Jul ; 2(7) : e111.
- 8) Makanae K, Kintaka R, Makino T, Kitano H, Moriya H. Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res.* 2013 Feb ; 23(2) : 300-311.
- 9) Moriya H, Makanae K, Watanabe K, Chino A, Shimizu-Yoshida Y. Robustness analysis of cellular systems using the genetic tug-of-war method. *Mol Biosyst.* 2012 Oct ; 8(10) : 2513-2522.
- 10) Moriya H, Chino A, Kapuy O, Csikász-Nagy A, Novák B. Overexpression limits of fission yeast cell-cycle regulators in vivo and in silico. *Mol Syst Biol.* 2011 Dec 6 ; 7 : 556.
- 11) Van der Sand ST, Greenhalf W, Gardner DC, Oliver SG. The maintenance of self-replicating plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* : mathematical modelling, computer simulations and experimental tests. *Yeast.* 1995 Jun 15 ; 11(7) : 641-658.