

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04402

研究課題名(和文) 高次元表現型解析を駆使した遺伝情報による細胞の動作原理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the working principle of cells based on high dimensional phenotyping

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝情報による生命体の動作原理、すなわち遺伝型という「原因」が表現型という「結果」にどのように結びつくかという原理を解き明かすことは、遺伝学の中心課題のひとつである。我々は、遺伝型と表現型との関係を明らかにするために、単細胞真核生物の出芽酵母(*S. cerevisiae*)の優れた遺伝学的ツールを駆使し、蛍光顕微鏡で得られる細胞画像を画像解析システムCalMorphにより解析し、形態プロファイリングと形態異常度の二つの観点から高次元表現型を定量的に解析することによって遺伝子機能と形態表現型の間に密接な関係があることを発見した。その関係を用いて、薬剤の細胞内標的を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：It is one of the central issues of genetics to unravel the principle of motion of an organism by genetic information, that is, the principle of how genotype "cause" is linked to phenotype "result". In order to clarify the relationship between genotype and phenotype, we used the excellent genetic tool of unicellular eukaryotic budding yeast (*S. cerevisiae*) and used cell images obtained with fluorescence microscope. We analyzed the images with image processing system CalMorph and found that there is a close relationship between gene function and morphological phenotype. This was achieved by quantitatively analyzing high dimensional phenotype from two viewpoints including morphological profiling and morphological abnormality. Using that relationship, we succeeded in identifying intracellular targets of drugs.

研究分野：Functional Genomics

キーワード：Saccharomyces cerevisiae morphology CalMorph phenotyping

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母は究極の細胞とも呼ばれるモデル真核細胞であり、約 6,000 の比較的少数の遺伝子を有することから遺伝学のさまざまな研究に用いられてきた。既に個々の遺伝子の単独破壊株セットが作成されており、遺伝子機能欠損と表現型との関係を網羅的に調べるいわゆるフェノーム研究が精力的に行なわれている (Brown JA ら(2006)、Hillenmeyer ME ら(2008))。しかしこれらの研究では複数の条件下での増殖速度を測定しており、観測している観点は一つに過ぎない。一方研究代表者は出芽酵母専用の細胞の画像解析システム CalMorph を 2005 年に発表して以来 (Ohya ら 2005)、このシステムを用いて高次元の表現型解析を行ってきた。出芽酵母細胞の細胞壁、パッチ状のアクチン細胞骨格、核 DNA をまず蛍光試薬で染色し、蛍光顕微鏡により 200 個以上の細胞の三重染色像を CalMorph で画像解析するが、最大の特徴は細胞や細胞構造体の形態に関する数値情報を 500 以上の観点で出力できることである。

2. 研究の目的

遺伝情報による生命体の動作原理、すなわち遺伝型という「原因」が表現型という「結果」にどのように結びつくかという原理を解き明かすことは、遺伝学の中心課題のひとつである。研究代表者らは遺伝型と表現型との関係を明らかにするために、単細胞真核生物の出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の優れた遺伝学的ツールを駆使し、蛍光顕微鏡で得られる細胞画像を画像解析システム CalMorph により解析し、高次元表現型を定量的に解析することによって独創的な研究を今まで行ってきた。今回の研究計画では数理モデルを導入することにより解析精度を上げ、高速で高次元の表現型計測システムを導入することにより解析スピードを上げて、生命体のシステム全体を視野に入れた遺伝情報による細胞の動作原理にアプローチする。オーミクス研究にありがちな表面的な解析や方法論の提案に終わることなく、生物学的に意味がある細胞の遺伝子機能ネットワークに関する実質的な知見を得る。他のモデル生物でも類をみないこの野心的な試みは、細胞システム全体を視野に入れた動作原理の理解につながるだけでなく、機能未知遺伝子の機能の同定、新規遺伝子機能の発見、薬剤の標的タンパク質の探索、醸造用酵母の育種などで世界中の多くの研究者や産業界にとって有用な知的資産になる。

3. 研究の方法

本研究計画の解析手法上の特徴は、501 の表現型パラメータに最も適した確率分布を決定した後に一般化線形モデルに組み込んで高次元表現型解析を行うことである。最も適した確率分布の決定は最近研究代表者らが発表した論文 (Yang et al., 2014) に記載した画期的な方法に従う。そもそも 501 の形態パラメータは細胞の大きさや丸さおよび核の位置のような量的な形態情報だけでなく、G1 期や M 期などにある特定の細胞の割合など質的な情報も含み、これらは明らかに異なる統計的性質を持っている。形態パラメータの値 y が取りうる範囲によって、正規分布型 ($-\infty < y < +\infty$)、ガンマ分布型 ($0 < y$)、ベータ分布型 ($0 < y < 1$)、ベータ二項分布型 ($0 \leq n \leq N, n = y \times N, N$ は細胞数) の 4 つに分けられる。それぞれの分布型においてベストな確率分布モデルを検討するために、第一段階として形態パラメータの定義と確率分布モデルの成立条件が一致するモデルを複数候補として選出し、次に 100 回以上繰り返し取得されている野生型酵母のデータ (Ohya et al., 2005) に各確率分布モデルを最尤推定で近似し、赤池情報量基準 (AIC) を指標にして最適モデルを選択する。最後に一般化線形モデルに組み込んで、全部で 1,112 ある必須遺伝子の変異株のデータを用いて高次元表現型解析を行う。

4. 研究成果

優性遺伝と劣性遺伝はもともと Gregor Mendel によって定式化され、現代の遺伝学において基本的な概念になっている。遺伝子の機能欠損はほとんどが劣性遺伝すると長い間考えられてきた。ハプロ不全は、ヘテロ接合体における遺伝子の機能欠損変異に起因して稀に見られる、遺伝子の機能欠損が優性遺伝する現象で、はじめはショウジョウバエで研究されていた。1 コピーの対立遺伝子の喪失が、癌や腫瘍形成、発達障害や神経障害を含むヒト疾患の原因になることが次々に明らかになってきたために、ハプロ不全性を示す遺伝子に大きな関心が寄せられてきている。特に、ゲノム中にハプロ不全性を示す遺伝子が一体いくつあるのかは多くの研究者の関心の的になっていた。

本研究では出芽酵母の二倍体株を使って、幾つの必須遺伝子がハプロ不全性を示すか、細胞形態を指標にして調べてみた。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。CaIMorph に内蔵された自動画像識別器と分類器を活用することにより、高品質の 501 次元の形態情報を得ることができた。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%) 最小培地で培養すると新たにハプロ不全性を示すものもあり、合わせて 75%もハプロ不全性を示す遺伝子が検出された。この数は、細胞増殖速度を指標として算出されたハプロ不全性を示す遺伝子の割合がこれまでの研究では 9%だったことからすると、極めて多くの必須遺伝子の機能欠損が優性遺伝したことになる。

どうしてこのように多くの必須遺伝子の機能欠損変異が優性遺伝したのかを調べるために、形態表現型の特徴をよく表している形質について調べた。出芽酵母の細胞形態に関する量的形質には、平均値を表す形質、割合を表す形質、分散を表す形質がある。例えば娘細胞の大きさに関する形質でいえば、娘細胞の大きさの平均値、娘細胞を持たない細胞の割合、娘細胞の大きさの分散値がそれぞれに相当する。それらの中で、分散を表す形質を数多く用いることで多くの必須遺伝子の機能欠損が優性遺伝することがわかった。分散を表す形質は、ひとつひとつの細胞の形質を調べた後で細胞集団における分散を計算して得られる。したがって、必須遺伝子の機能欠損の多くが優性遺伝したのは、単細胞の形態表現型をより多くの観点から定量的に調べたことによることが明らかになった。

今回の研究でハプロ不全性を示した遺伝子のうち、9割の遺伝子で、同じような機能を持つ遺伝子の欠損突然変異は類似した表現型を示すことが正順相関分析により明らかになった。ハプロ不全性を示す表現型のほとんどに、どのような機能を持つ遺伝子が欠損したかがわかる目印がついていることになる。例えば、様々なタンパク質を正常に機能できるように手助けをする働きのあるシャペロン複合体は、8種類のサブユニットタンパク質が球状に集まって機能しており、各サブユニットのヘテロ接合型変異株は互いに類似した目印がついていた。このハプロ不全性の目印を用いることで必須遺伝子の機能を詳しく研究できると考えられる。以前から知られていた遺伝子間の機能的関係を確認できるだけでなく、今まで未知だった機能的関係を推測することができるようになった。さらにハプロ不全性を示す表現型の類似性に基づいて、遺伝子機能ネットワークの全体像を提示することができた。ハプロ不全性を示す表現型の情報は、複雑な生物学的システムを解析するためだけでなく、細胞内薬物標的を探索するためにも今後使われることが期待される。(本研究成果の内容は発表論文 1. に詳しくまとめられている)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

(雑誌論文)(計 30 件)

1. Ohnuki S, Ohya Y.* (2018) High-dimensional single-cell phenotyping reveals extensive haploinsufficiency. **PLoS Biol.** 16(5):e2005130. (査読有り)
2. Suzuki G, Wang Y, Kubo K, Hirata E, Ohnuki S, Ohya Y.* (2018) Global study of holistic morphological effectors in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics.** 19(1):149. (査読有り)
3. Sukegawa Y, Negishi T, Kikuchi Y, Ishii K, Imanari M, Ghanegolmohammadi F, Nogami S, Ohya Y.* (2018) Genetic dissection of the signaling pathway required for the cell wall integrity checkpoint. **J Cell Sci.** 2018 May 31. pii: jcs.219063. [Epub ahead of print] (査読有り)
4. Ota S, Morita A, Ohnuki S, Hirata A, Sekida S, Okuda K, Ohya Y. Kawano S. (2018) Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Sci Rep.** 8(1):5617. (査読有り)
5. Ghanegolmohammadi F, Yoshida M, Ohnuki S, Sukegawa Y, Okada H, Obara K, Kihara A, Suzuki K, Kojima T, Yachie N, Hirata D, Ohya Y.* (2017) Systematic analysis of Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. **Mol Biol Cell.** 28(23):3415-3427. (査読有り)
6. Ohnuki S, Okada H, Friedrich A, Kanno Y, Goshima T, Hasuda H, Inahashi M, Okazaki N, Tamura H, Nakamura R, Hirata D, Fukuda H, Shimoi H, Kitamoto K,

- Watanabe D, Schacherer J, Akao T*, Ohya Y.* (2017) Phenotypic Diagnosis of Lineage and Differentiation During Sake Yeast Breeding. **G3** (Bethesda). 7(8):2807-2820. (査読有り)
7. Watanabe D, Kaneko A, Sugimoto Y, Ohnuki S, Takagi H, Ohya Y.* (2017) Promoter engineering of the *Saccharomyces cerevisiae* RIM15 gene for improvement of alcoholic fermentation rates under stress conditions. **J Biosci Bioeng.** 123(2):183-189. (査読有り)
8. Piotrowski JS et al. (Ohya Y 30人中26番目) (2017) Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. **Nat Chem Biol.** 13(9):982-993. (査読有り)
9. Ho W-C, Ohya Y, Zhang J. (2017) Testing the neutral hypothesis of phenotypic evolution. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 114(46):12219-12224. (査読有り)
10. Amanianda V, Simenel C, Garnaud C, Clavaud C, Tada R, Barbin L, Mouyna I, Heddergott C, Popolo L, Ohya Y, Delepierre M, Latge JP. (2017) The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of β -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. **MBio.** 8(3). (査読有り)
11. Kawaoka T, Ohnuki S, Ohya Y, Suzuki K. (2017) Morphometric analysis of autophagy-related structures in *Saccharomyces cerevisiae*. **Autophagy.** 10.1080/15548627.2017.1384888 (査読有り)
12. Hirata E, Ohya Y, Suzuki K. (2017) Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One.** 12(7):e0181047. (査読有り)
13. Negishi T, Veis J, Hollenstein D, Sekiya M, Ammerer G, Ohya Y.* (2016) The Late S-Phase Transcription Factor Hcm1 Is Regulated through Phosphorylation by the Cell Wall Integrity Checkpoint. **Mol Cell Biol.** 36(6):941-53. (査読有り)
14. Okada H, Kono K, Neiman AM, Ohya Y.* (2016) Examination and Disruption of the Yeast Cell Wall. **Cold Spring Harb Protoc.** 2016(8): pdb.top078659. (査読有り)
15. Kono K, Okada H, Ohya Y.* (2016) Local and Acute Disruption of the Yeast Cell Surface. **Cold Spring Harb Protoc.** 2016 2016(8). doi: 10.1101/pdb.prot085266. (査読有り)
16. Okada H, Neiman AM, Ohya Y.* (2016) Assay for Spore Wall Integrity Using a Yeast Predator. **Cold Spring Harb Protoc.** 2016(8). doi: 10.1101/pdb.prot085258. (査読有り)
17. Okada H, Ohya Y.* (2016) Fluorescent Labeling of Yeast Cell Wall Components. **Cold Spring Harb Protoc.** 2016 2016(8). doi: 10.1101/pdb.prot085241. (査読有り)
18. Jung PP, Sigwalt A, Ohnuki S, de Montigny J, Ohya Y*, Schacherer J.* (2016) Large-Scale Survey of Intraspecific Fitness and Cell Morphology Variation in a Protoploid Yeast Species. **G3** (Bethesda). 6(4):1063-71. (査読有り)
19. Costanzo M et al. (Ohya Y 54人中44番目) (2016) A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. **Science.** 353(6306). pii: aaf1420. (査読有り)
20. Chuffart F, Richard M, Jost D, Burny C,

- Duplus-Bottin H, [Ohya Y](#), Yvert G. (2016) Exploiting Single-Cell Quantitative Data to Map Genetic Variants Having Probabilistic Effects. **PLoS Genet.** 12(8):e1006213. (査読有り)
21. Jonasson EM, Rossio V, Hatakeyama R, Abe M, [Ohya Y](#), Yoshida S. (2016) Zds1/Zds2-PP2ACdc55 complex specifies signaling output from Rho1 GTPase. **J Cell Biol.** 212(1):51-61. (査読有り)
22. Goshima T, Nakamura R, Kume K, Okada H, Ichikawa E, Tamura H, Hasuda H, Inahashi M, Okazaki N, Akao T, Shimoi H, Mizunuma M, [Ohya Y](#), Hirata D. (2016) Identification of a mutation causing a defective spindle assembly checkpoint in high ethyl caproate-producing sake yeast strain K1801. **Biosci Biotechnol Biochem.** 80(8):1657-62. (査読有り)
23. Piotrowski JS*, Okada H, Lu F, Li SC, Hinchman L, Ranjan A, Smith DL, Higbee AJ, Ulbrich A, Coon JJ, Deshpande R, Bukhman YV, McIlwain S, Ong IM, Myers CL, Boone C, Landick R, Ralph J, Kabbage M, [Ohya Y.*](#) (2015) Plant-derived antifungal agent poacic acid targets β -1,3-glucan. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 112(12):E1490-7. (査読有り)
24. [Ohya Y.*](#), Kimori Y, Okada H, Ohnuki S. (2015) Single-cell phenomics in budding yeast. **Mol Biol Cell.** 26(22):3920-5. (査読有り)
25. Gebre AA, Okada H, Kim C, Kubo K, Ohnuki S, [Ohya Y.*](#) (2015) Profiling of the effects of antifungal agents on yeast cells based on morphometric analysis. **FEMS Yeast Res.** 15(5):fov040. (査読有り)
26. Okada H, Ohnuki S, [Ohya Y.*](#) (2015) Quantification of cell, actin, and nuclear DNA morphology with high-throughput microscopy and CalMorph. **Cold Spring Harb Protoc.** 2015(4):408-12. (査読有り)
27. Ohnuki S, Okada H, [Ohya Y.*](#) (2015) Image-based prediction of drug target in yeast. **Methods Mol Biol.** 2015;1263:319-27. (査読有り)
28. Koyano T, Konishi M, Martin SG, [Ohya Y](#), Hirata D, Toda T, Kume K. (2015) Casein kinase 1 γ ensures monopolar growth polarity under incomplete DNA replication downstream of Cds1 and calcineurin in fission yeast. **Mol Cell Biol.** 35(9):1533-42. (査読有り)
29. Tamura H, Okada H, Kume K, Koyano T, Goshima T, Nakamura R, Akao T, Shimoi H, Mizunuma M, [Ohya Y](#), Hirata D. (2015) Isolation of a spontaneous cerulenin-resistant sake yeast with both high ethyl caproate-producing ability and normal checkpoint integrity. **Biosci Biotechnol Biochem.** 79(7):1191-9. (査読有り)
30. Watanabe D, Zhou Y, Hirata A, Sugimoto Y, Takagi K, Akao T, [Ohya Y](#), Takagi H, Shimoi H. (2015) Inhibitory Role of Greatwall-Like Protein Kinase Rim15p in Alcoholic Fermentation via Upregulating the UDP-Glucose Synthesis Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol.** 82(1):340-51. (査読有り)

〔学会発表〕(計 24 件)

〔図書〕(計 7 件)

1. 久保佳蓮、大矢禎一* (2018) 新しい創薬ツールとしての出芽酵母 (酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開 五味勝也, 阿部敬悦監修)第9章 (査読無し)
2. 大矢禎一*, 根本翔太 (2018) 清酒酵母 今昔物語 -Saccharom yces sake の発見から多様な清酒造り- 酒史研究 33:1-7 (査読有り)
3. 大矢禎一*, 久保佳蓮 (2017) 形態プロファイリングによる細胞内標的予想 日本農薬学会誌 42:91-98 (査読有り)
4. Husain SR, Ohya Y, Puri RK. (2017) Current Status and Challenges of Three-Dimensional Modeling and Printing of Tissues and Organs. Tissue Eng Part A. 23(11-12):471-473. (査読有り)
5. 大矢禎一*, 岡田啓希 (2016) 植物由来の新しい抗真菌剤ポアシン酸研究の魅力 化学と生物 54(10):704-706 (査読有り)
6. 大矢禎一*, 渡辺大輔、岡田啓希 (2015) 酵母の形態情報を発酵・醸造に生かす (発酵・醸造食品の最前線 北本勝ひこ監修) 第1章 (査読無し)
7. 大矢禎一* (2015) 日本の強みバイオテクノロジー 遺伝:生物の科学 69 (4); 332-337 (査読無し)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大矢 禎一 (Yoshikazu Ohya)

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