

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04483

研究課題名(和文) Linking novel bioactive compounds to their targets and pathways using chemical genomics and morphological profiling

研究課題名(英文) Linking novel bioactive compounds to their targets and pathways using chemical genomics and morphological profiling

研究代表者

BOONE CHARLES (Boone, Charles)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：70601342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的遺伝学的相互作用に基づく酵母ケミカルゲノミクス法と高次元バイオイメージングシステムCalMorphを利用した細胞形態プロファイリング法を組み合わせることで化合物の標的を高速に予測する基盤を開発した。確立した基盤を用いて、理研の天然化合物バンク(NPDepo)をはじめ合計7つの化合物ライブラリーに所蔵される化合物13,524個についてスクリーニングを行い、化合物の標的機能の注釈付けを行った。

研究成果の概要(英文)：Combining chemical genomics profiling based on genetic interactions and morphological profiling using a sophisticated image-processing program, CalMorph, we developed a multi-dimensional strategy for linking novel bioactive compounds to their targets and pathways. We established a high-throughput chemical-genetic screening platform to functionally annotate large compound collections in a rapid and systematic manner using next generation sequencing. Furthermore, we assembled a computational platform for functionally annotating compounds to specific biological processes and pathways. Finally, we applied our chemical-genomic/morphological profiling pipeline to annotate 13,524 compounds in total by screening seven diverse compound collections including the RIKEN NPDepo library.

研究分野：yeast chemical genomics

キーワード：chemical genomics morphological profiling yeast target identification

1. 研究開始当初の背景

創薬研究においては、化合物が作用する体内や細胞内の標的(タンパク質)を同定することが非常に重要である。化合物の標的の同定には、それらの物理的相互作用の直接的検出が考えられるが、化合物と標的タンパク質の結合力が弱い場合や試験管内で細胞内の生理的条件を再現できていない場合などは同定が困難である。そこで、物理的相互作用の直接的検出に依らない化合物の標的の同定法開発へのパラダイム転換が必要であった。

研究代表者および研究分担者は真核生物のモデル生物であり遺伝学解析が容易な出芽酵母を用いた、有用な網羅的解析法の開発を行ってきた。研究代表者はこれまでに Synthetic Genetic Array (SGA) 法 (Science, 2001) を開発し、それにより構築した二重遺伝子破壊株の増殖度合いを数値化し、合成致死遺伝子データベースを作成し、遺伝子機能相関プロファイルを描き出すことに成功した (Science, 2004)。これは個々の遺伝子が機能的にどの遺伝子と相互作用するかを網羅的に明らかにしたものである。さらに、この手法により 2300 万対の二重破壊株を作製し、より包括的な相関プロファイルを完成させた (Science, 2010; 2016)。また、出芽酵母遺伝子破壊株セットに対して数十の化合物の感受性を決定し、その情報を合成致死遺伝子データベースと照合することにより、化合物の標的遺伝子とその機能を迅速に推定できることを示した (Nat. Biotechnol., 2004; Cell, 2006)。このゲノムワイドな遺伝学的表現型解析による化合物の作用機構の特徴付けをケミカルゲノミクスプロファイリングと呼ぶ。一方、研究分担者は、細胞形態定量化プログラム CalMorph を開発し、出芽酵母の細胞形態、アクチン、核などの形態に関する高次元表現型データから表現型プロファイルを統計学的に抽出し、パターンの類似性からその条件下で影響を受けている遺伝子機能を推測したり、化合物の細胞標的を推定したりできる表現型プロファイリング法を確立した (PNAS, 2005)。

2. 研究の目的

網羅的な遺伝学的相互作用に基づく酵母ケミカルゲノミクス法と高次元バイオイメージングシステム CalMorph を利用した細胞形態プロファイリング法を組み合わせることで化合物の標的を高速に予測する基盤を開発する。確立した基盤を用いて、ユニークな天然物ライブラリーである理化学研究所の天然化合物バンク (NPDepo) に収蔵される 10,000 化合物について、それぞれの標的を予測/同定する。

3. 研究の方法

理研の天然化合物バンク (NPDepo) の 10,000 化合物をスクリーニングし、酵母に対する細胞活性を確認する。顕著な細胞活性を示した化合物に対して、イメージングスクリーニングを行い、各化合物の標的予測/同定を行い、化合物バンクに収蔵される化合物のクラスター解析を行う。

4. 研究成果

(1) 薬剤感受性株の作製

酵母は細胞壁を持ち、また、薬剤排出機構も発達しているため、化合物が効きにくいと考えられている。そこで、出芽酵母の薬剤に対する反応性を制御する転写因子をコードする *PDR1* および *PDR3* 遺伝子と、薬剤排出ポンプをコードする *SNQ2* 遺伝子を破壊することにより、化合物の作用機序解析に最適な薬剤感受性型株を作製した。

(2) 高速ケミカルゲノミクス法の開発

出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリーでは、各遺伝子を薬剤耐性マーカーと置換して欠失させる際に、薬剤耐性マーカー遺伝子の上流および下流に、各遺伝子固有の 20 塩基から成る「バーコード配列」が挿入されている。酵母ケミカルゲノミクス法に使用する遺伝子破壊株として、生存には必須ではない約 5,000 個の非必須遺伝子から異なる生物学的プロセスに所属する代表遺伝子群 310 個を選抜し、それらの遺伝子破壊株を使うことにした。310 個の遺伝子破壊株は、全て薬剤感受性株を宿主として用いて作製した。各遺伝子破壊株は、個々のバーコード配列を解読することにより識別できるので、酵母ケミカルゲノミクス法では、選んだ 310 遺伝子破壊株セットをまとめて 1 つの化合物存在下でプール培養できる。その後、DNA を抽出して、各遺伝子固有のバーコード配列を次世代シーケンサーにて解読する。また、768 種の異なる化合物処理群を区別できるような「マルチプレックスタグ配列 (10 塩基配列)」をデザインし、そのタグ配列を含むように各遺伝子破壊株の特異的配列のバーコード部分を PCR で増幅した。これにより、768 個の化合物で処理した遺伝子破壊株プールサンプル (96 穴マルチプレート 8 枚分に相当) の PCR 産物を混合して次世代シーケンサーにかけることができ、最終的に解析を行う際にマルチプレックスタグ配列によって化合物を識別・分類し、各化合物存在下での遺伝子破壊株の増減の検出、つまり、ケミカルゲノミクスプロファイリングを高速化して行うことが可能となった。

(3) 化合物ライブラリーのスクリーニング

高速ケミカルゲノミクス法を用いて、理研の天然化合物バンク (NPDepo) や米国の国立衛生研究所 (NIH)、国立がん研究所 (NCI)

の化合物ライブラリーを含む合計 13,524 個の化合物について、化合物の標的機能の注釈付けを行った。

出芽酵母の合成致死遺伝子プロファイリングから、各遺伝子は大きく分けて 17 の生物学的プロセスに属していることがわかっていった (Science, 2016)。合成致死遺伝子データベースとケミカルゲノミクスプロファイルとの照合を行い、各化合物ライブラリーに含まれる化合物の予測された標的について、生物学的プロセスごとにクラスタリングしたところ、例えば、NPDepo ライブラリーには 17 の生物学的プロセスのうち大部分を標的とするさまざまな化合物が含まれていることがわかった。一方、NIH や NCI の化合物ライブラリーに含まれる化合物の標的機能には偏りがみられた。

(4) 予測された標的プロセスの検証

ケミカルゲノミクス法により、25 化合物について「細胞壁」関連の生物学的プロセスを標的としていることが予測された。また、これらの化合物について、高次元パイオイメージングシステム CalMorph を利用して解析を行ったところ、うち 8 化合物について、処理細胞の細胞壁の染色像が化合物未処理の細胞(コントロール)と異なることが示された。さらに、8 化合物で出芽酵母細胞を処理すると、細胞壁の成分の一つである β -1,3-glucan の分解酵素 (Zymolyase) に感受性を示し、細胞溶解が起こるなど、細胞壁を標的とする化合物が示す特徴的な表現型を示した。以上のことから、25 化合物のうち 8 化合物は予測通り、「細胞壁」関連の生物学的プロセスを標的とすることが証明された。よって、ケミカルゲノミクスとイメージングのデュアルアプローチに基づく本法により化合物の標的分子の同定が可能であることが示された。

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 18 件)

1. Nelson, J., et al. MOSAIC: a chemical-genetic interaction data repository and web resource for exploring chemical modes of action. *Bioinformatics*, 34: 1251-1252, (2018). 査読有り (研究代表者: 11 人中 10 番目)
DOI: 10.1093/bioinformatics/btx732

2. Suzuki, G., Wang, Y., Kubo, K., Hirata, E., Ohnuki, S., and Ohya, Y. Global study of holistic morphological effectors in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 19, 149, (2018). 査読有り

DOI: 10.1186/s12864-018-4526-z

3. Piotrowski, JS., et al. Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. *Nat. Chem. Biol.*, 13, 982-993, (2017). 査読有り (研究代表者: 30 人中 30 番目、研究分担者: 30 人中 26 番目)
DOI: 10.1038/nchembio.2436

4. Ohnuki, S., et al. Phenotypic diagnosis of lineage and differentiation during sake yeast breeding. *G3 (Bethesda)*, 7, 2807-2820, (2017). 査読有り (研究分担者: 18 人中 18 番目)
DOI: 10.1534/g3.117.044099

5. Ho, WC., Ohya, Y., and Zhang, J. Testing the neutral hypothesis of phenotypic evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, 12219-12224, (2017). 査読有り
DOI: 10.1073/pnas.1710351114

6. Ghanegolmohammadi, F., et al. Systematic analysis of Ca^{2+} homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. *Mol. Biol. Cell*, 28, 3415-3427, (2017). 査読有り (研究分担者: 12 人中 12 番目)
DOI: 10.1091/mbc.E17-04-0216

7. Aimanianda, V., et al. The dual activity responsible for the elongation and branching of β -(1,3)-glucan in the fungal cell wall. *MBio*, 8: e00619-17, (2017). 査読有り (研究分担者: 12 人中 10 番目)
DOI: 10.1128/mBio00619-17

8. van Leeuwen, J., et al. Exploring genetic suppression interactions on a global scale. *Science*, 354, aag0839, (2016). 査読有り (研究代表者: 42 人中 42 番目)
DOI: 10.1126/science.aag0839

9. Costanzo, M., et al. A global genetic interaction maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, 353, aaf1420, (2016). 査読有り (研究代表者: 54 人中 54 番目、研究分担者: 54 人中 44 番目)
DOI: 10.1126/science.aaf1420

10. Okada, H., Kono, K., Neiman, AM., and Ohya, Y. Examination and disruption of the yeast cell wall. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 8, 78659, (2016). 査読有り
DOI: 10.1011/pdb.top078659

11. Okada, H. and Ohya, Y. Fluorescent labeling of yeast cell wall components. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 8, 85241, (2016). 査読

有り

DOI: 10.1011/pdb.top085241

12. Chuffart, F., et al. Exploiting single-cell quantitative data to map genetic variants having probabilistic effects. *PLoS Genet.*, 12, e1006213, (2016). 査読有り (研究分担者: 7人中6番目)

DOI: 10.1371/journal.pgen.1006213

13. Goshima, T., et al. Identification of mutation causing a defective spindle assembly checkpoint in high ethyl caproate-producing sake yeast strain K1801. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 1657-1662, (2016). 査読有り (研究分担者: 14人中13番目)

DOI: 10.1080/09168451.2016.1184963

14. Jung, PP., et al. Large-scale survey of intraspecific fitness and cell morphology variation in a protoploid yeast species. *G3 (Bethesda)*, 6, 1063-1071, (2016). 査読有り (研究分担者: 6人中5番目)

DOI: 10.1534/g3.115.026682

15. Piotrowski, JS., et al. Plant-derived antifungal agent poacic acid targets β -1,3-glucan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, E1490-1497, (2015). 査読有り (研究代表者: 20人中16番目、研究分担者: 20人中20番目)

DOI: 10.1073/pnas.1410400112

16. Piotrowski, JS., et al. Chemical genomic profiling via barcode sequencing to predict compound mode of action. *Methods Mol. Biol.*, 1263, 299-318, (2015). 査読有り (研究代表者: 9人中8番目)

DOI: 10.1007/978-1-4939-2269-7_23

17. Serate, J., et al. Controlling microbial contamination during hydrolysis of AFEX-pretreated corn stover and switchgrass: effects on hydrolysate composition, microbial response and fermentation. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 180, (2015). 査読有り (研究代表者: 13人中24番目)

DOI: 10.1186/s13068-015-0356-2

18. Gebre, AA., Okada, H., Kim, C., Kubo, K., Ohnuki, S., and Ohya, Y. Profiling of the effects of antifungal agents on yeast cells based on morphometric analysis. *FEMS Yeast Res.*, 15, fov040 (2015). 査読有り

DOI: 10.1093/femsyr/fov040

[学会発表](計22件)(下記は主要なもの9件)

1. Charles Boone 「 Mapping Chemical-Genetic Interactions to Link Bioactive Compounds to Cellular Targets」新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第2回公開シンポジウム, 2018年

2. Charles Boone 「 Mapping Genetic Networks on a Global Scale」From Genetic Networks to a Cellular Wiring Diagram, 2018年

3. Yoshikazu Ohya 「 Mapping Genetic Networks on a Global Scale」CIFAR Meeting, 2017年

4. Charles Boone 「 A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function」 Opportunities and Challenges of Exploiting Synthetic Lethality in Cancer, 2017年

5. Charles Boone 「 Global Analysis of Genetic Interaction Networks in Yeast」 Human and Mammalian Genetics and Genomics: The 57th McKusick Short Course, 2017年

6. 大矢禎一 「 Single Cell Phenotyping of Sake Yeast」バイオイメージ・インフォマテイクスワークショップ、2016年

7. Sheena Li and Charles Boone 「 Functional annotation of biological processes targeted by chemical libraries」 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, 2015年

8. Yoshikazu Ohya 「 New antifungal agents that inhibit cell wall synthesis」 Fungal Cell Wall 2015, 2015年

9. Yoshikazu Ohya 「 High-dimensional morphological phenotyping in *Saccharomyces cerevisiae*」 Annual Meeting of Microbiology in Korea, 2015年

[図書](計1件)

1. 五味勝也、阿部敬悦(監修) シーエムシー出版「酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開」2018年 264ページ (第9章「新しい創薬ツールとしての出芽酵母」久保佳蓮、大矢禎一)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

プレスリリース

1. 化合物の標的機能を決定するツールを開

発 酵 - 酵母の化学遺伝学アプローチで化合物
の標的予測/同定が迅速に-

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170725_1/

2017年7月25日

2. 植物由来の次世代型農業へ

http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/22_entry383/

2015年3月10日

3. 酵母ケミカルゲノミクスデータベース
「MOSAIC」

<http://mosaic.cs.umn.edu/search.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ブーン チャールズ (BOONE, Charles)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源
科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：70601342

(2) 研究分担者

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