

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310127

研究課題名（和文） 出芽酵母の表現型プロファイリングに関する基盤研究

研究課題名（英文） Morphological Profiling in *Saccharomyces cerevisiae* and Development of high-content imaging techniques

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

研究成果の概要（和文）：

研究代表者らは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情報を集めることにより、遺伝子欠損によって変化する表現型プロファイルが遺伝子産物の機能に関係していることを発見した。このことをヒントにして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する（表現型プロファイリング）法を確立した。この方法は、生理活性物質の細胞標的を推定できる新しい方法としても利用できる。犯罪捜査における容疑者プロファイリングと同様に、プロファイルの精度は統計的データの質と量に依存することから、観察対象の表現型を増やすことも試みた。これにより顕微鏡画像から得られる細胞周期や細胞構造の情報を主とする表現型を 1,000 以上のパラメータ（指標）から解析するシステムを構築できた。

研究成果の概要（英文）：

Drug discovery are based on elucidation of the potential mechanisms of action and cellular targets of candidate chemical compounds. We developed high-content imaging techniques in *Saccharomyces cerevisiae*, allowing simultaneous analysis of morphological phenotypes regarding to cell shape, actin and nucleus. We proposed a novel strategy to identify drug targets by combining phenome database and high-content imaging in yeast. In this approach, we infer the cellular functions affected by candidate drugs by comparing morphologic profiles induced by the compounds with the phenotypes of yeast mutants. Using this method and four well-characterized reagents, we successfully identified previously known target genes of the compounds as well as other genes involved with functionally related cellular pathways. We also expanded our morphological analyses on other cellular structures. We succeeded to extract 1,111 parameters from digital images of 9 subcellular structures including cell shape, nuclear DNA, mitochondria, actin structures, spindle pole bodies, septin rings, the vacuole, the cis- and trans-Golgi. With advancements in our study, systematic and comprehensive morphological analyses will inevitably continue to progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：出芽酵母・機能ゲノム・細胞周期
細胞形態・画像解析

1. 研究開始当初の背景

約 6,000 の比較的少数の遺伝子からなる出芽酵母は、個々の遺伝子の単独破壊株セットが作成されており、遺伝子機能喪失と表現型との関係を網羅的に調べるいわゆる Phenome 研究が精力的になされてきた (Warringer J ら(2003)、Dudley AM ら(2005)、Brown JA ら(2006)、Hillenmeyer ME ら(2008))。しかしながらこれらの研究は複数の条件下での増殖速度を測定するという単純なものであり、調べている観点は一つに過ぎない。一方、研究代表者らは、遺伝子の機能喪失という「原因」に対し、できるだけ多くの観点から表現型を観察することが必要だと考えた。そこで、多くの観点からの観察が可能な細胞形態を観察対象として、形態表現型を 501 もの観点で定量的に数値化できるシステムを構築した (Ohtani M ら(2004))。このシステムでは出芽酵母細胞の細胞壁、アクチン細胞骨格、核 DNA を蛍光試薬で染色し、蛍光顕微鏡により 200 個以上の細胞の三重染色像を取得し、細胞形態定量化プログラム CalMorph (カルモルフ) による画像処理を行い、細胞の外形、細胞周期の特定の時期における細胞骨格の配向、細胞中の核の位置関係など、細胞周期ステージ別に集計して出力する。この高次元の形態情報解析法を用い、一倍体非必須遺伝子破壊株全 4718 株について定量的形態情報を取得し、データベース化することで、遺伝学の究極の目標である、遺伝子産物の機能と表現型との間の関係を詳細に明らかにすることを試みた (Ohya Y ら(2005))。その結果、同じ機能に関わる遺伝子の破壊株は類似した表現型を示すことを見だし、形態情報の類似性から遺伝子の機能を予測することができることを示した。

2. 研究の目的

研究代表者らは、上述のように出芽酵母の非必須遺伝子破壊株セットを用いた表現型解析から、遺伝子破壊株の表現型データベースを構築した。そこで本計画では、特定の条件下 (例えば、化合物の添加や遺伝子破壊の導入など) における超多次元の表現型データから表現型パラメータのパターン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する方法 (表現型プロファイリング) の開発とその妥当性の検証を行うとともに、より精密

なプロファイリングを行うための技術基盤の構築を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画は、二つのテーマに大別される。「定量的形態情報を用いた表現型プロファイリング」では、遺伝子破壊株セットの情報を活用して表現型プロファイリングの手法を確立し、それに基づいた作用機序未知分子の細胞内標的探索を行なった。「新しい表現型パラメータに基づく詳細な表現型解析システムの構築」では、画像解析プログラム CalMorph の機能を拡張させて、定量化対象の拡張を行なうとともに、形態情報の比較のためにクラスタリング解析を行い、形態情報に基づく表現型プロファイリングを発展深化させた。

4. 研究成果

4-1. 定量的形態情報を用いた表現型プロファイリング

まず 4718 の非遺伝子破壊株の表現型データベースを利用して、類似した表現型を持つ株を探索するアルゴリズムを開発することを試みた。類似した表現型を持つ株が探索できれば、生理活性物質によって引き起こされる形態変化と同じような形態変化を起こす遺伝子欠損株を探すことが出来る。さらにこの方法を応用すれば、生理活性物質の細胞標的を推定できるはずである。

類似した表現型を持つ株を探索するために、形態的特徴の類似性を比較 (プロファイリング) する手法を開発した。まず、4718 非必須遺伝子破壊株の形態的特徴についてはデータベースを既に我々は得ている。一方で、細胞標的を推定したい生理活性物質を、野生型酵母に 5 段階の異なる濃度で 5 回ずつ処理し、形態情報を取得した。そして形態変化の濃度依存性を Jonckheere 検定の統計量である Z 値を使用して評価した。ここで、実験誤差の影響をなるべく排除するために、501 パラメータのデータから主成分分析を用いて 104 主成分 (寄与率 99%) を抽出し、この主成分上の主成分得点を算出することで、4718 変異株や濃度依存的形態変化の特徴を表す数値を得た。そして最後に両者の相関係数 R を 4718 株すべてについて算出した。相関係数が高い変異株こそが形態変化が類似した変異株、すなわち薬剤標的の候補となる。統計的にそのような変異株を同定するために、

false discovery rate (FDR)が 0.01 の無相関検定を行った。

この方法の有効性は、標的が既に知られている 4 つの薬剤 (Hydroxyurea, concanamycin A, lovastatin と echinocandin B) をモデルケースにして検証した。その結果、重複している成分やマイナーな成分である場合を除いて薬剤の標的は実際に候補として予想され、上位 100 株には関連する機能が欠損した変異株が濃縮されていた。これらの結果から、細胞の形態情報プロファイリングによって、形態変化を引き起こす生理活性物質の細胞標的が推定可能であることが示された (発表論文①、②、④)。

4-2. 新しい表現型パラメータに基づく詳細な表現型解析システムの構築

画像解析プログラム (CalMorph) は、細胞外形、アクチン、核 DNA の形状を記述するために開発され、501 種類の観点 (パラメータ) において定量化された形態を抽出する。本研究では、細胞周期依存的な形態変化をより多面的に解析するため、より多くの細胞内構造体に着目した。その結果、ミトコンドリア、紡錘極体、セプチンリング、液胞、シスゴルジ、トランスゴルジなど、新たに 6 つの細胞内構造体が CalMorph により認識され、定量的な形態解析に用いることが可能になった。これにより、既存の 501 パラメータに加えて、610 パラメータが定義され、計 1,111 パラメータによって出芽酵母の細胞内構造の形態が定義できることが示された。(発表論文⑤)

画像解析プログラムをもちいて、紡錘極体の細胞周期依存的変化を追跡した。CalMorph では、個々の細胞内における蛍光の座標とその明るさを数値化する。それらの情報を用いて、ひとつの細胞内に 2 つの紡錘極体が認識された細胞について、それらの紡錘極体間の距離と母細胞に対する芽の大きさをグラフ化したところ、紡錘極体は、芽の断面積が母細胞のその約半分となるまでは、約 10 pixels (1.295 μm) 以下の short spindle によって近接しており、それ以降芽が成長するにつれて、紡錘極体はさらに分離し、芽に移行することが示された。これは、既知の紡錘極体の形態変化と一致する結果であり、CalMorph による紡錘極体の形態解析の有効性を示すものであった。

もう一方で、研究代表者らは、形態情報の比較のためにクラスタリング解析を行った。表現型の分類はひとつの遺伝子内に生じた複数の変異株についても必要になることがある。Fks1p と Fks2p は 1,3- β -グルカン合成酵素の推定上の触媒サブユニットであるが、グルカンを合成する以外に Fks1p は多機能を持っていることが示唆されていた。そ

こで fks2 の遺伝子破壊株をバックグラウンドとして 10 個の温度感受性変異株を fks1 で単離し、これらの変異株の形態に基づいてクラスタリングをすることにした。

細胞形態の類似性に基づく変異株の階層クラスタリングの結果から、FKS1 遺伝子内に生じたグルカン合成酵素の温度感受性変異株は 3 つのグループに分かれることがわかった。興味深かったのは、その 3 つのグループは Fks1p の機能サブドメインに対応していたということである。最も N 末に近いところに変異を持つクラス 1 変異では細胞レベルのグルカン合成が低下していた。クラス 2 変異はグルカン合成には異常はなく、細胞の極性やエンドサイトシスが異常になっていた。クラス 3 はグルカン合成の活性部位に近いところの変異であり、*in vitro* のグルカン合成活性に影響していた。このように、形態表現型に基づくクラスタリングは Fks1p のような多機能タンパク質の機能ドメインの分離に有効であることが明らかになった。

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 19 件)

①Iwaki A, Ohnuki S, Suga Y, Izawa S and Ohya Y. Vanillin Inhibits Translation and Induces Messenger Ribonucleoprotein (mRNP) Granule Formation in *Saccharomyces cerevisiae*: Application and Validation of High-Content, Image-Based Profiling. PLoS ONE 2013 Apr 24;8(4):e61748 査読有 Doi:10.1371/journal.pone.0061748

②Ohnuki S, Kobayashi T, Ogawa H, Kozono I, Ueda JY, Takagi M, Shin-Ya K, Hirata D, Nogami S and Ohya Y. Analysis of the biological activity of a novel 24-membered macrolide JBIR-19 in *Saccharomyces cerevisiae* by the morphological imaging program CalMorph. FEMS Yeast Research 2012 May 12(3):293-304. Epub 2012 Jan 3. 査読有

Doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00770.x.
③Okada H, Abe M, Asakawa-Minemura M, Hirata A, Qadota H, Morishita K, Ohnuki S, Nogami S, Ohya Y. Multiple Functional Domains of the Yeast 1,3- β -Glucan Synthase Subunit Fks1p Revealed by Quantitative Phenotypic Analysis of Temperature-Sensitive Mutants Genetics 2010 Apr;184(4):1013-24, Epub 2010 Feb 1. 査読有 Doi: 10.1534/genetics.109.109892.

④Ohnuki S, Oka S, Nogami S and Ohya Y. High-content, image-based screening for

drug targets in yeast PLoS ONE 2010 Apr 14;5(4):e10177 査読有 Doi: 10.1371/journal.pone.0010177.

⑤ Negishi T, Nogami S, Ohya Y. Multidimensional quantification of subcellular morphology of *Saccharomyces cerevisiae* using CalMorph, the high-throughput image-processing program Journal of Biotechnology 2009 May 20;141(3-4):109-17. Epub 2009 Mar 31 査読有 Doi: 10.1016/j.jbiotec.

[学会発表] (計 33 件)

① Yoshikazu Ohya Image-based systems biology in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* 2012.08.21 ICSB The 13th International Conference on Systems Biology (招待講演) Toronto University (CANADA)

② Yoshikazu Ohya Chemical-genetic analysis on the elucidation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* 2012.6.8 5th International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis (招待講演) Hotel Zora, Kravata Conference Hall (CROATIA)

③ Ohya Y Hi-Content and Quantitative Morphological Screening for the Drug Targets in Yeast, 2011 Oct 20, 2011 Riken Chemical Biology Symposium (招待講演) Riken Wako Main Campus Saitama

④ Ohya Y Quantitative phenotyping of yeast glucan synthase mutants base on the cell morphology, 2011 Oct 9, 2nd International Fungal Cell Wall Meeting (招待講演) Giens (France)

⑤ Ohya Y Hi-Content and Quantitative Morphological Screening for the Drug Targets in Yeast, 2011 May 11 Keystone Symposium, Omics Meets Cell Biology (招待講演) Alpbach (Austria)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称: 細胞観察装置、細胞観察方法及びそのプログラム

発明者: 大矢禎一 他

権利者: JST

種類: 特許

番号: 2012-259880

出願年月日: 2012.11.28

国内外の別: 国内

②名称: 細胞形態定量値を用いる酵母の生理状態

態の評価方法

発明者: 大矢禎一、野上 識、大貫慎輔 (東京大学)、善本裕之、榎本賢一、堀越杏子 (キリンビール醸造研究所)

権利者: キリンビール

種類: 特許

番号: 2009-0088

出願年月日: 2009 年 7 月 27 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://ps.k.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし