

論文内容の要旨

論文題目

Morphology-based high-dimensional and quantitative chemical phenomics

(化学物質を用いた高次元で定量的な
形態 表現型の網羅的解析)

氏名 大貫 慎輔

[序論]

化学物質が生物に与える影響を観察することで、生命現象を明らかにする化学生物学的アプローチは、複雑な生命システムを解明するための有効な手法の一つである。例えば出芽酵母 *zds1* 変異株が、高濃度の Ca^{2+} に反応して細長い細胞形態を示すことを手掛かりに、 Ca^{2+} に依存した新たな細胞周期進行の制御メカニズムが発見された(Mizunuma *et al.*, 1998)。細胞の形は、様々な遺伝子の機能が複雑に絡み合って制御されており、このような遺伝子機能の相互関係の解明のためには、化学物質に応答して変化する細胞の形を詳細に分析することが有効であると考えられる。そこで、細胞が様々な外的環境に応答して示す形態変化を、高次元で定量的な分析を網羅的にすることで、外的環境に応答する細胞の遺伝子機能が細胞内でどのような相互関係を構成しているかを解明することにした。本研究室では、出芽酵母の顕微鏡写真を 501 の観点 (形態パラメータ) で測定し、細胞の形を高次元で定量的な形態情報として出力することができる CalMorph 画像解析プログラムを既に開発している(Ohya *et al.*, 2005)。しかし、本研究を進めるためには、高次元形態情報の取得の他に次の三つの問題を克服する必要がある。一つ目は、高次元の定量的表現型解析を行う際の手法が確立しておらず、その有効性も実証されていない点である。二つ目は、外的環境に対する細胞応答にどのような遺伝子群の機能が働いているかを統計的に解析する手法が確立していない点である。そして三つ目は、様々な条件で高次元な定量的形態情報を全ての変異株について取得可能にするハイスループットな実験系が存在しない点である。

本研究では、まず一つ目の問題点である高次元な定量的表現型解析手法の確立とその実証を行うために、本研究室でスクリーニングされた 58 の Ca^{2+} 感受性(*cls*)変異株と *zds1* 変異株の、 Ca^{2+}

による形態変化の解析を行った。次に二つ目の問題へのアプローチとして、細胞の形態変化を引き起こす化学物質のスクリーニングとその細胞標的を推定することが必要と考え、高次元細胞形態情報に基づいて生理活性物質の細胞標的を推定する手法を開発した。三つ目の問題へのアプローチとして、様々な実験条件下において形態情報を取得する過程を安価で高速に行うことが可能なハイスループット顕微鏡撮影システムのためのマイクロ流体チップを開発した。

[結果]

1. Ca^{2+} 感受性(*cls*)変異株の形態表現型を用いた高次元の定量的表現型解析手法の確立

当研究室の金井の網羅的スクリーニングにより高濃度 Ca^{2+} 処理で増殖できなくなる *cls* 変異株が 58 株得られた。これらの変異株は細胞外 Ca^{2+} 濃度という外的環境の変化への応答に欠損があるものと考えられる。したがってこれらの変異体の表現型を解析することで Ca^{2+} 応答の機能的相互関係の解明に役立つと考えた。

関連した細胞内機能が影響を受けると類似した形態変化が引き起こされること (Ohya *et al.* 2005) から、*cls* 変異株を Ca^{2+} による形態変化の類似性によって機能的に分類することを試みた。

分布やデータ型の異なる形態パラメータの値を、複数回の実験データを使用して確率分布に変換することで、501 形態パラメータ全てを使ったクラスター分析が可能になった。この値を使用してクラスタリングを行った結果、マルチスケールブートストラップ確率 95%以上で 7

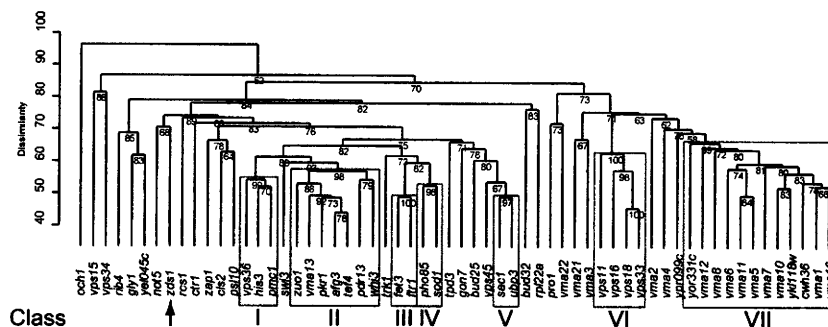


図 1. Ca^{2+} による形態変化が類似する7つの *cls* 変異株クラス

Class III は鉄イオン輸送体活性に関わる変異株、Class VI は液胞融合に関わる HOPS 複合体サブユニットの変異株、VII は液胞 ATPase サブユニットの変異株。矢印は *zds1* 変異株を示す。

クラスが検出され 60 株中 31 株が7つのクラスを形成した (図 1)。有意水準 1%で、各7クラス内で共通した方向に変化したパラメータを検出したところ、検出されたパラメータの組み合わせがクラスによって異なっていたことから、それぞれのクラスは特徴的な形態変化を示すことがわかった。また7クラス中3クラス(III, VI, VIII)は、クラスの中の全ての変異株が関連する遺伝子の変異株によって構成されていた(図 1)。例えば細胞が大きくなり、アクチンが脱局在するという表現型が共通するクラス VII は液胞 ATPase のサブユニットの変異株で構成されていた。一方で、 Ca^{2+} 存在下で細長い芽を持つ細胞が蓄積する *zds1* 変異株に関しては、本研究でも同様の表現型が確認されたが、大部分の *cls* 変異株は、むしろ丸い芽を持っていた。さらに、どの *cls* 変異株も *zds1* 変異株と頑健なクラスを形成しなかった (図 1)。従って、検出された7つのクラスに含まれる *CLS* 遺伝子は *ZDS1* 遺伝子とは異なる経路に関与していると考えられる。

2. 形態変化を引き起こす生理活性物質の細胞標的推定法の確立

2-1. 細胞標的推定のための高次元細胞形態情報プロファイリング

生理活性物質によって引き起こされる野生型出芽酵母細胞の形態変化の特徴と遺伝子欠損によって引き起こされる形態的特徴の類似性の比較 (プロファイリング) によって、生理活性物質の

細胞標的を推定できると考えた。以下に手順を示す。

まず、生理活性物質処理時の形態変化の特徴と比較するために、主成分分析を用いて 4718 非必須遺伝子破壊株の形態的特徴を取得済みの形態情報 (図 2-IV) (Ohya *et al.*, 2005)から次のようにして抽出した。野生型 123 回分の形態情報に正規化を伴う主成分分析 (図 2-V) を適用することで 104 主成分 (寄与率 99%) を抽出し、同主成分上の 4718 変異株の主成分得点を算出することで、変異株の形態的特徴を表す 104 種類の数値を 4718 株すべてについて得た。

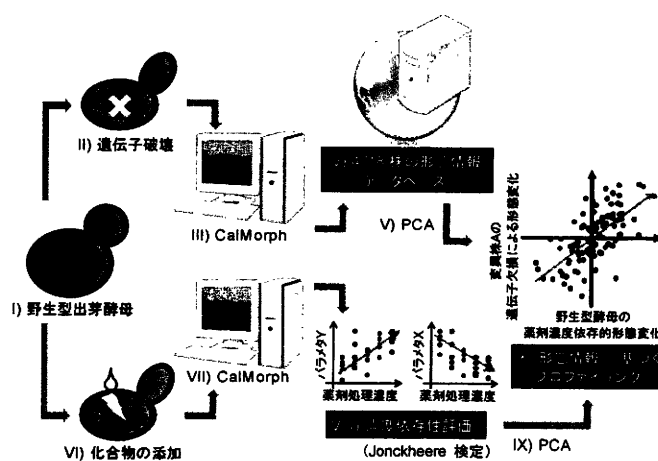


図 2. 高次元細胞形態情報プロファイリングの概要

次に、細胞標的を推定したい生理活性物質を、野生型酵母 (図 2-I) に複数の濃度で 5 回ずつ処理し (図 2-VI)、高次元形態情報を取得した (図 2-VII)。それぞれの形態パラメータにおいて、形態変化の濃度依存性を Jonckheere 検定によって評価し (図 2-VIII)、検定統計量である Z 値を使用して図 2-V で抽出した 104 主成分の主成分得点を算出し、生理活性物質による形態変化の特徴を表す 104 種類の数値を得た (図 2-IX)。そして最後に、図 2-V で求めた主成分得点と図 2-IX で求めた主成分得点の相関係数 R を 4718 株すべてについて算出した。False discovery rate (FDR) が 0.01 の無相関検定を行うことで有意な正の相関を持つ変異株を形態変化が類似した変異株、すなわち細胞標的の候補として検出した (図 2-X)。

2-2. 高次元細胞形態情報の濃度依存的特徴に基づく細胞標的推定

2-1 で示した方法によって細胞標的が推定可能かどうか検証するために、標的が既に知られている 4 つの薬剤を生理活性物質のテストケースとして使用した (表 1)。

表 1. 標的推定に使用した 4 つの薬剤

薬剤名	影響を与える細胞プロセス	4718 遺伝子中の既知の標的	FDR=0.01 で検出された株数	検出された標的既知遺伝子
Hydroxyurea	DNA 代謝	<i>RNR1, RNR3, RNR4</i>	857 株(18.2%)	<i>RNR1, RNR4</i>
Concanamycin A	細胞内の陽イオン濃度恒常性維持	<i>VMA1-VMA8, VMA11, VMA13, VMA16, VPH1, STV1</i>	790 株(16.7%)	<i>VMA1-VMA8, VMA11, VMA13, VMA16</i>
Lovastatin	メバロン酸生合成	<i>HMG1, HMG2</i>	592 株(12.5%)	<i>HMG1</i>
Echinocandin B	細胞壁合成	<i>FKS1, FKS2</i>	609 株(12.9%)	<i>FKS1</i>

高次元細胞形態情報プロファイリングにより、4718 遺伝子中 12%~18%が薬剤標的をコードする遺伝子の候補として検出され、4 つの薬剤全てについて既知の標的が検出された (表 1)。さらに、既知標的の細胞プロセスと機能的に関連する遺伝子がプロファイルの類似する上位 100 株に集まっていた。これらの結果から、高次元細胞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。

3. ハイスループット顕微鏡撮影システムのためのマイクロ流体チップの開発

高次元の細胞形態情報を取得するために、明瞭な顕微鏡画像を得る必要があるが、数マイクロ

メートルの出芽酵母細胞に高倍率レンズを使用して素早く焦点を合わせることは困難であるため、詳細な表現型解析を行うのに十分な解像度で大規模なサンプルの顕微鏡撮影を短時間に行うことが難しい。そこで空気圧により高さを調節可能な流路内に酵母細胞を流し込み、全ての細胞を瞬時に同一焦点面内に保持することが可能なマイクロ流体チップを開発した（図3）。

汎用的な顕微鏡下で本チップを使用して異なる培養条件下の出芽酵母の高倍率な顕微鏡画像を連続的に取得することができた。従来の方法で撮影した場合と比較したところ、チップの使用によって酵母細胞の定量的形態情報に有意な影響は検出されなかった。

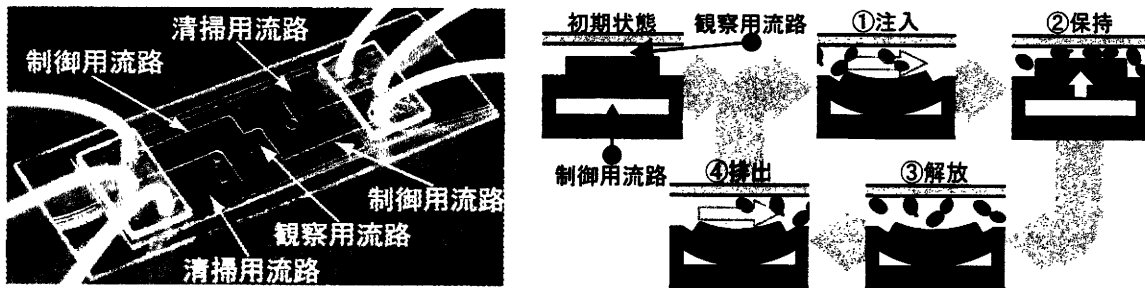


図3. 開発したマイクロ流体チップ(左)と作動様式(右)

[結論]

細胞外高濃度 Ca^{2+} 処理時の *cls* 変異株の表現型解析は高次元の定量的表現型解析によって Ca^{2+} シグナルの情報伝達経路に関する知見を得た初めての実証例である。細胞外 Ca^{2+} に対する応答が変化している酵母の変異株は Ca^{2+} によって極めて多様な形態変化を示すこと、また約半分の変異株は形態変化に共通点を持つ7つのクラスを形成すること、Zds1p が関与する既知の経路とは異なる Ca^{2+} シグナル伝達経路が存在することがわかった。この高次元の定量的表現型解析の要点は、反復実験を行うことによって、ばらつきをクラスター分析に反映させたこと、そして類似した表現型を示す変異株クラスを確率分布に基づいて統計的に算出したことである。この手法は反復実験によって得られるあらゆるデータに適用可能であり、大規模表現型解析に威力を発揮する手法の一つとなる。

高次元細胞形態情報を用いて、生理活性物質の標的遺伝子を4718株の12~18%に統計的に絞り込むことができ、それら候補の中に既知の標的と機能的に関連する遺伝子が検出されていた。高次元細胞形態プロファイリングは、統計的手法であること、高次元の細胞形態に基づいていること、予備知識無しに4718遺伝子から標的候補を検出できることから、生理活性物質による処理だけでなく温度変化や遺伝子操作などの形態変化を引き起こす様々な実験条件に応用可能な汎用的手法である。また多様な生理活性の特徴を捉えることで様々な生理活性物質の標的推定が可能であることから、ゲノムワイドな標的探索を容易にする。この手法によって、形態変化に影響を及ぼす生理活性物質とその標的を探索することが可能となった。

マイクロ流体チップを使用して異なる培養条件下の出芽酵母の高倍率な顕微鏡画像を連続的に取得することが可能となった。さらに開発したチップの自動化と並列化を行うことで、大規模な高次元細胞形態情報を取得可能になると考えている。

本研究で築いた基盤的技術を応用して形態変化を引き起こす生理活性物質の探索や様々な条件下における変異株の表現型解析を行うことで、外的環境に应答する細胞の遺伝子機能間における相互関係の全貌解明につながる足がかりとなると考えている。