

課題名 遺伝子破壊株イメージ・マイニング

代表研究者 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授 森下 真一

1. 代表研究者による成果概要報告

1-1. 研究開発のねらい

生物個体の最小単位である細胞の増殖は、非常にたくさんの遺伝子産物が、複雑に相互作用し、巧みに連携することによって制御されていることが明らかにされつつある。幾つかのモデル生物種においては、ゲノム配列の解読が完了し、ゲノムにコードされる遺伝子数が明らかにされている。ポストゲノムの更なる展開としては、様々な生命現象の各事象に着目し、個々の事象に関与する新規因子の同定を目指すことによってその分子メカニズムを明らかにしようとする方向性と、細胞を一つのシステムとして捉え、その枠組みの中で個々の遺伝子産物がどのように機能しているのかを体系的に理解しようとする方向性の二つの局面を迎えている。

後者の流れでは、個々の遺伝子発現や遺伝子産物間の相互作用、遺伝子産物の細胞内局在に関する網羅的な情報収集が行われ、近年では、これらの情報をもとにした遺伝子機能予測の試みがさかんに行われている。従来、個々の遺伝子機能を明らかにする手法としては、ある遺伝子を欠失させた細胞が、正常に働いている細胞と比べて、どのような変化を示すのかという表現型を詳細に解析し、その因果関係を追及するという方法が取られてきた。しかし、この手法を網羅的に行うためには、一つ一つの遺伝子を欠損させた細胞が必要であり、また、いかに各遺伝子の機能欠損を反映した表現型を効率よく見つけ出すことができるかという点で非常に困難である。従って、網羅的な遺伝子欠損株の表現型解析は遅れているのが現状であり、表現型情報の不足は遺伝子機能の体系的な理解を遅らせている原因と考えられた。

そこで、我々は遺伝学的解析手法が強力に発揮できる出芽酵母の系を用い、既に構築されている網羅的な遺伝子破壊株を実験材料として、個々の遺伝子破壊株が示す細胞形態の異常性に着目した解析を行うことにした。細胞形態の異常性を表現型として解析する理由は、その制御機構が生育環境や増殖過程と密接に連携しており、非常に多くの遺伝子産物の協調的な働きによって維持されていると考えられることから、これを解析することで、より多くの遺伝子機能に関する知見が得られると考えられたためである。各組織や諸器官を形成する細胞種特有の多様な形態形成メカニズムを解明することは生物学の大きなテーマの一つであるが、そのメカニズムの全貌を明らかにするためにも、単一細胞である出芽酵母の形態形成メカニズムを理解することが必須であると考えられる。従って、網羅的に作製された遺伝子破壊株の形態的特徴を表現型の一つとして客観的かつ定量的な情報で表し、迅速に抽出して比較分類することにより、形態制御に関わる新たな因子を同定し、各遺伝子産物の機能予測を行うための情報基盤を確立することが重要である。

1-2. 研究開発の成果

酵母細胞の自動認識と細胞形態パラメータの定量化

出芽酵母遺伝子破壊株の細胞形態及び細胞内構造の状態を細胞の写真から自動認識するには、まず、細胞の外郭、アクチン細胞骨格および核をそれぞれ FITC-ConA、Rh-ph、及び DAPI 蛍光試薬を用いて

三重染色し、各々の染色画像を撮影することが第1のステップである。つづいて FITC-ConA 像から、細胞の大きさ、細長さ、芽の位置などの形態パラメータに基づく個々の細胞形態情報を取得する。3次元の構造をしている細胞を2次元画像として取得するため、小さな芽細胞に焦点を合わせることが困難な場合が多く、芽細胞の認識率を上げる特殊なアルゴリズムの研究に力を注ぎ、エラー率を1%未満に抑えることに成功した(Ohtani *et al. J. Bioinfo. Comp. Biol.* 2004)。次に、Rh-ph 像からアクチン細胞骨格の細胞内局在に関する情報を、DAPI 像からは核の位置に関する情報を抽出することができ(図1)、細胞外郭の情報と組み合わせて分類することにより、細胞極性や細胞周期の進行についての情報も得ることが可能になった(図2)。4784株の全非必須遺伝子破壊株のうち細胞の凝縮が激しいため画像解析が困難な4株を除いた4780株を対象に、91,653枚の顕微鏡画像から、1,907,842個の細胞を抽出し、501個の形態パラメータを定量化し、以下のウェブサイトから公開中である(Saito *et al. Nucl. Acids. Res. Database Issue* 2004)。

Saccharomyces cerevisiae Morphological Database (SCMD, <http://yeast.gi.k.u-tokyo.ac.jp/>)

このサーバーは酵母研究の国際的ポータルサイト SGD(*Saccharomyces* Genome Database)との間で相互リンクされており、1日あたり平均アクセスは約3000である。

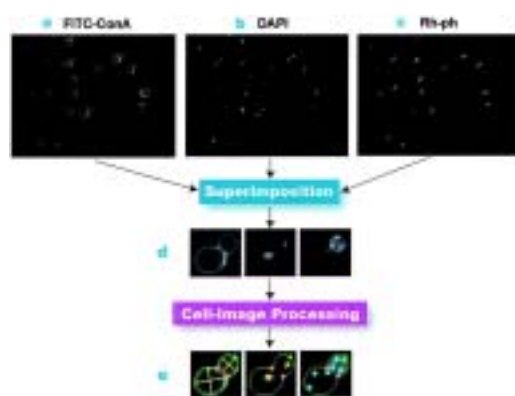


図1 細胞壁(a) 核(b) アクチン(c) を染色し、個々の細胞を認識し、画像を処理する流れ

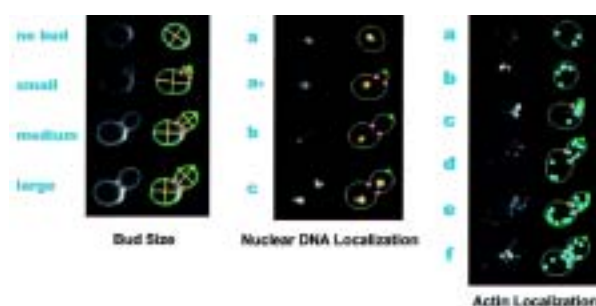


図2 芽細胞の大きさ、核の位置、アクチン分布の情報から各細胞を細胞周期進行に分類

異常な形態をもつ非必須遺伝子破壊株

野生株に比べて、形態が異常に変化する破壊株はいくつぐらい存在するか？ この疑問に答えるためには、対象とする形態パラメータを選択する必要がある、我々は生物学的に意味があると考え形態パラメータを501個選択した。つづいて、野生株を基準に破壊株の異常性を検出する目的に叶うように、野生株における形態パラメータの分布を調査した。野生株から200個以上の細胞を抽出する作業を独立に126回繰り返えし、各形態パラメータについて126個の値を収集し解析したところ様々な分布をもつことがわかった。理由として、画像解析プログラムの出力に誤差が含まれること、野生株の実験条件の微妙な差が生みだす揺らぎなどが考えられる。そこで各形態パラメータの分布を power transformation により正規分布に近似し、標準化することを試み、標準化が可能であった380個の形態パラメータに注目した。

一方、4780の破壊株ごとに200個以上の細胞を抽出する作業を1回だけおこない、各形態パラメータの異常性を、野生株から得られた126個の値の分布に照らし合わせ、片側確率 $1.E-05$ で棄却される破壊株1,924株を形態異常と判定した。片側確率を $1.E-05$ と厳しい基準をとることで、126個の野生株で形

態異常と判定される株は存在せず、つまり、画像処理ソフトウェアの誤り率と野生株間での揺らぎの影響を受けずに、野生株が形態異常であると誤認定する可能性を排除できた。1つの遺伝子を破壊しただけで形態異常を示す破壊株が1,924株も存在するという結果は新しく、従来過小評価されがちであった非必須遺伝子の破壊が、これほどに形態に多くの変化をもたらすことを示す驚くべき知見である。

遺伝子機能の予測

多くの遺伝子破壊株に形態変化が見られたことから、遺伝子産物の機能と細胞形態に密接な関係を見いだすことができるかどうかを網羅的に調べることにした。そのために、全非必須遺伝子破壊株の定量的な形態情報をもとに、どのような遺伝子機能の欠損が形態変化を引き起こしやすいのかを精査した。具体的には、ある機能に関連する遺伝子群の変異株に共通する形態的特徴に着目し、その形態的特徴が類似している変異株を、その機能欠損の候補株として予測し、各候補遺伝子に関する既知の情報を精査した。その結果、特にDNA修復に関わる遺伝子群、細胞壁合成に関与する遺伝子群、アクチン機能に関連する遺伝子群の三カテゴリーについては、既に明らかにされている遺伝子の機能から判断して、予測の正答率が非常に高いと考えられたが、予測された遺伝子の中には既知の情報が無い遺伝子もあった。この予測結果については、さらに実験的な検証を行うことによって、いくつかの遺伝子機能に関する裏付けが得られつつある。また画像解析ソフトウェアを用いることで、我々は細胞壁合成をモニターする新規の細胞周期チェックポイントを発見し、これまでチェックポイントと全く関係がないと思われていた因子群をつなぐ新たなシグナル伝達経路の存在を提示することができた (Suzuki, *et al. Nature Cell Biol.* 2004)。

1-3. まとめ

過去3年間の研究により、遺伝子破壊株の画像解析ソフトウェアは完成し、4780株の全非必須遺伝子破壊株を解析し、2,000株近くが野生株に比べ形態が異常に変異している事実をつきとめた。また新規の細胞周期チェックポイントを発見した。今後は、形態パラメータによる遺伝子のグループ化を行い、細胞内局在およびGene Ontologyとの対応を調べ、機能未知の遺伝子の機能を推定するイメージマイニング法を確立することを目指す。また従来困難と考えられてきた必須遺伝子破壊株から形態パラメータを取得する問題についてはヘテロ二倍体遺伝子破壊株を用いて解決する方法論を得ており、約1200株の必須遺伝子破壊株について解析をおこなう。さらに米国における酵母研究の中心的ポータルサイトであるSGDとの連携、欧州を中心としたYeast Systems Biology Networkの参加メンバーとして本研究アプローチを国際的に広める活動も並行して行う。

2. 統括の見解

出芽酵母遺伝子破壊株のイメージ取得の方法論とイメージ取得アルゴリズムの精度は当初の想定より高度なものとなった。形としての表現型を定量化する試みはバイオインフォマティクスに対する重要な貢献であり、公開された酵母の形態データベースは酵母研究者のサークルでは十分に役立ちうる段階に達している。今後このデータが生物学にフィードバックされ、遺伝子発現との関連づけで、この手法だからこそ発見に至るという成果にまで達することが期待される。また多細胞生物についてもこの手法が活かされればライフサイエンス分野全体への波及効果が大きいと思われる。

3 . 主な論文発表

国内 0 件、国外 20 件 主なものを以下に記す

1. Miwaka Ohtani, Ayaka Saka, Fumi Sano, Yoshikazu Ohya, and Shinichi Morishita. Development of Image Processing Program for Yeast Cell Morphology. *J. Bioinfo. Comp. Biol.* **1**(4), 695-709 (2004).
2. Taro L. Saito, Miwaka Ohtani, Hiroshi Sawai, Fumi Sano, Ayaka Saka, Daisuke Watanabe, Masashi Yukawa, Yoshikazu Ohya, and Shinichi Morishita. SCMD: *Saccharomyces Cerevisiae* Morphological Database. *Nucl. Acids. Res.* **32**, D319-D322 (2004).
3. Masaya Suzuki, Ryoji Igarashi, Mizuho Sekiya, Takahiko Utsugi, Shinichi Morishita, Masashi Yukawa, Yoshikazu Ohya. Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Cell Biology* **6**, 861 - 871 (2004).
4. Jun Sese and Shinichi Morishita. Itemset Classified Clustering. *Lecture Notes in Computer Science*, Vol. 3202, 398-409 (2004).