

線虫ゲノム機能解析情報に基づく発生メカニズムの解析

●杉本 亜砂子¹⁾ ◆大浪 修一²⁾

1) 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 2) 理化学研究所 基幹研究所

<研究の目的と進め方>

線虫 *C. elegans* のゲノムには約 20,000 遺伝子が存在し、これらの遺伝子が時間的・空間的に厳密に制御されて発現し機能することによって発生プログラムが進行する。この遺伝子ネットワークを理解することをめざして、多様なアプローチによるゲノム機能解析が進行中である。そのなかで、DNA マイクロアレイ（“トランスクリプトーム”解析）や網羅的酵母 2-ハイブリッド法によるタンパク質相互作用解析（“インタラクトーム”解析）のデータは数値化が容易であるため大量データのコンピューター解析が行われている。それに対して、体系的な遺伝子機能破壊による表現型解析（“フェノーム”解析）は遺伝子機能を解明するための重要な情報を含んでいるにもかかわらず、データの客観性・定量性が低く、コンピューター解析の対象にすることが困難であった。そこで、本研究では線虫 *C. elegans* の発生プロセスをモデル系として、1) コンピューター解析で使用できる表現型の記録法の確立とデータ取得、2) 表現型データのコンピューター解析、3) 定量的表現型解析とシミュレーションを組み合わせた研究戦略の開発、を実施する。

<研究開始時の研究計画>

1) コンピューター解析で使用できる表現型記録法の確立とデータ取得

ゲノムワイド RNAi 解析により致死性を示した遺伝子群について、遺伝子機能破壊による表現型を客観的・定量的に記録する方法を開発し、データ取得を行う。

1-a) ノマルスキー顕微鏡観察による表現型の記述法の確立とデータ取得（杉本） RNAi による機能破壊表現型プロファイルは複数の独立した指標（細胞数・胚全体の形態・組織分化・器官形成、等）のあらかじめ定めた語彙で記録する。遺伝子の複数の発生時期・複数の組織における機能を明らかにするため、時期特異的 RNAi を行い、胚発生期と孵化後発生期の表現型データを体系的に取得する。この解析結果に基づいて 1-b) ～ c) でさらに詳細な表現型解析を行う遺伝子の優先順位を決定する（2-a 参照）。

1-b) 組織特異的・細胞内構造特異的抗体染色による、表現型の体系的解析（杉本） さらに詳細な表現型情報を得るためのツールとして、特定の組織や細胞内器官を特異的に染色するモノクローナル抗体ライブラリーを整備する。すでに約 40 種の組織または細胞内器官特異的抗体を得ているので、まず野生型における染色パターンをカタログ化する。次に、RNAi 胚をこれらのモノクローナル抗体で染色し、その染色パターンを体系的に画像撮影して記録する。また、染色パターンの変化を表現する指標を定義しコンピューター解析に使用可能な形式でのデータ取得を行う。

1-c) 胚発生期の 4 次元顕微鏡撮影（杉本・大浪） 発生初期に異常を示す遺伝子群の場合は、細胞分裂期の動的な表現型を詳細に解析するために、RNAi 胚の 4 次元ノマルスキー顕微鏡画像を撮影し保存する。また、GFP 発現株を利用して、RNAi 胚の生体分子や細胞内構造の動態を 4 次元的に記録する。初期胚において異

常を示す場合には、ヒストン-GFP やチューブリン-GFP で細胞分裂期の細胞内動態を記録する。形態形成期に異常をしめす RNAi 胚においては AJM-1 (デスモソームタンパク質)-GFP 発現株を用いて、器官形成や細胞形態変化を可視化して画像を記録する。

2) 表現型データのコンピューター解析

2-a) 胚発生・孵化後発生表現型データに基づく遺伝子クラスタリング（杉本） 1-a), 1-b) で記録した胚発生・孵化後発生期の表現型データを数値化し、クラスタリング解析によって表現型の類似性によって遺伝子を分類する。類似した表現型を示す遺伝子群は同じ発生プロセスに関与していることが推測される。このクラスタリングの結果は、1-c) の解析を行う遺伝子群の選択および優先順位決定にも利用する。

2-b) 画像解析を利用した定量的表現型解析手法の開発とその実施（大浪） 初期胚 4 次元顕微鏡画像データ（1-c）から細胞分裂パターンの特徴を現す指標をいくつか定義し、RNAi 胚のそれらの値と野生型胚の値との統計的有意差を用いて各 RNAi 胚の細胞分裂パターンをマイクロアレイデータ様に表現し、クラスタリングする。また、1-b) ～ 1-c) の画像データから、1) 細胞膜の位置の認識による各割球の外形、2) 細胞質流動の速度とベクトル、3) 形態形成時の上皮細胞の形態変化等の定量的情報を取得する新たなアルゴリズムを開発する。

3) 定量的表現型解析とシミュレーションを組み合わせた研究戦略の開発

3-a) 初期発生の非対称性を構築する動的機構の解明（大浪） 最初の分裂の非対称性の確立機構（1 細胞期紡錘体の後極側への移動の機構）をモデル系として、1), 2) で行う定量的測定とシミュレーション、遺伝子操作を組み合わせた、細胞内物理構造の動的挙動の解析戦略を確立する。また、ここで確立した解析戦略を他の発生現象へも応用する。

<研究期間の成果>

1) ノマルスキー顕微鏡観察による RNAi 表現型プロファイリング（杉本） RNAi による機能破壊表現型プロファイルをあらかじめ定めた表現型指標で記録し、表現型データベースを構築した。具体的には、約 6200 遺伝子についての RNAi 一次解析によって同定した約 830 の胚性致死遺伝子について、微分干涉顕微鏡による RNAi 最終表現型の体系的解析を行い、表現型プロファイルを記録した。表現型プロファイルは細胞数・各組織の分化・形態等の独立したカテゴリーについてあらかじめ定義した表現型指標の有無について体系的に表現型を記述することにより行った。得られた表現型プロファイルの類似性に基づいた遺伝子クラスタリングを行い、胚性致死遺伝子群を 16 の表現型クラスターに分類した。このクラスターは機能未知遺伝子の機能予測や、協調して働く遺伝子群の抽出に有用である。この胚性致死表現型データのは *C. elegans* RNAi Phenome Database として公開した。

また、遺伝子の複数の発生時期・複数の組織における機能を明

らかにするため、発生時期特異的 RNAi を行い、必須遺伝子について孵化後発生期の表現型データを体系的に取得した。その結果、胚性致死遺伝子群の約 5 割については孵化後発生においても何らかの異常が観察され、多くの必須遺伝子は複数の発生時期において機能していることが明らかになった。

2) 組織特異的・細胞内構造特異的モノクローナル抗体の作成と染色パターン解析 (杉本) 詳細な表現型情報を得るためのツールとして、特定の組織や細胞内器官を特異的に染色するモノクローナル抗体ライブラリーの整備を行った。胚抽出液から発現量の低いタンパク質を濃縮するために開発した“antigen subtraction”法によって調整した抗原混合液を用いて、特異的な組織・細胞内構造を認識するモノクローナル抗体を約 40 種取得している。これらについて、野生型胚発生期における時間的空間的染色パターンの画像データベースを作成して公開した。これらの抗体は線虫研究者コミュニティのリソースとして分与する体制を整えた。染色される構造としては、生殖顆粒、筋肉繊維成分、核膜、中心体、咽頭内壁、基底膜、等の多様なパターンがある。また、筋肉成分を認識するモノクローナル抗体群については、既存の抗体との二重染色を行い、筋肉繊維のどの成分を認識しているかを解析した。これらの抗体は発生過程の解析に有益なリソースとなると期待される。

生殖顆粒を認識する 10 種のモノクローナル抗体 (mAb) のうち、2 種について抗原を決定した。KT3 mAb の抗原は、免疫沈降および質量分析によって、既知の生殖顆粒構成因子である PGL-3 であることが明らかとなった。それ以外の mAb は Western blotting で特定のバンドを認識しないため、哺乳動物細胞で線虫遺伝子を発現させ、免疫染色によってスクリーニングする方法を構築した。パイロットスクリーニングとして、既知の生殖顆粒構成因子を母集団とするスクリーニングを行い、KT4 は PGL-1 を認識することが確認できた。

この抗原発現スクリーニングの過程で、PGL タンパク質が哺乳動物細胞において生殖顆粒様の顆粒構造を形成することを見いだした。このことを利用して、哺乳動物細胞を用いた顆粒形成能アッセイ系を構築し、線虫の生殖顆粒形成カスケードの一端を明らかにした。

3) 蛍光蛋白質融合遺伝子マーカー群を用いた初期胚細胞ダイナミクスのライブイメージング解析 (杉本) 線虫初期胚の表現型をより詳細に解析するためのライブイメージング用マーカーとして、細胞内構造を標識する GFP あるいは mCherry 融合蛋白質発現株を多数作成した。タンデムに連結した GFP あるいは mCherry を N 末端あるいは C 末端に Gateway クローニングシステムで導入できるような GFP および mCherry 融合タンパク質発現用ベクターをデザインし、蛍光色・蛍光強度、タンパク質標識部位を選択できるようにした。また、遺伝子銃 (パーティクルガン) による線虫への遺伝子導入法を最適化し、複数の GFP/mCherry 標識タンパク質発現ベクターを同時に導入可能とした。この手法を用いて、核、中心体、微小管、アクチン細胞骨格等のさまざまな細胞内構造を標識した株を構築し、さらに二重標識株・三重標識株も作成した。さらに、得られた蛍光タンパク質発現株の胚発生の高時空間分解能 3 次元ライブイメージングを行うために、スピニングディスク共焦点顕微鏡による撮影条件を最適化した。確立したライブイメージング法を用いて、初期胚における以下の細胞ダイナミクス解析を行った。

3-1) 紡錘体微小管の形成機構 GFP:: β -tubulin; GFP:: γ -tubulin; mCherry::Histone H2B の 3 重標識株や GFP::EB1 標識株のライブイ

メージングおよび定量的解析により、 γ -tubulin 依存的微小管と Aurora A キナーゼ依存的微小管が異なる時空間制御を受けており、双方が協調的にはたらくことが紡錘体形成に重要であることを見いだした。

3-2) 1細胞期における中心体動態 中心体と細胞膜を可視化した株を用いて、極性確立に必要な因子 (PAR-2, PAR-3 等) や細胞表層から星状体微小管を牽引する力の制御に関わる因子 (三量体 G タンパク質経路因子等) の RNAi 機能破壊を行い、中心体動態の 4 次元定量的解析を行った。その結果、PAR 機能破壊株における核-中心体複合体の動態異常などの新たな表現型を見いだした。

4) RNAi 胚の 4 次元微分干渉顕微鏡撮影画像の取得と 4 次元細胞分裂ダイナミクスの定量・計算解析 (大浪) 初期胚の形態形成のプログラムを解明するための情報資源として、RNAi により遺伝子機能を不活化した初期胚の 4 次元微分干渉顕微鏡画像の取得を行った。RNAi は feeding 法または injection 法を使用し、画像の取得は、焦点間距離 0.5 μ m、焦点面数 66、時間間隔 20 秒または 40 秒の条件で行った。ゲノム塩基配列情報から推定された全ての遺伝子を標的とした RNAi 表現型解析により同定された全ての胚発生必須遺伝子 (RNAi により 100% の胚発生致死表現型を生じる遺伝子: 全 349 遺伝子) について、RNAi 胚の 4 次元微分干渉顕微鏡画像を取得した。また、標準として野生型胚の 4 次元微分干渉顕微鏡画像を 50 個体分取得した。

初期胚の形態形成のプログラムを解明するための定量情報の情報資源として、RNAi 胚の細胞分裂ダイナミクスの定量情報の取得を、RNAi 胚の 4 次元微分干渉顕微鏡画像と細胞分裂ダイナミクス測定装置を利用して行った。この定量細胞分裂ダイナミクス情報には画像処理を利用して取得した各時点の細胞核の 3 次元輪郭とその位置、およびこれらの時間変化の定量情報が含まれる。また、背景差分法と動的輪郭モデルを応用して、胚の外形状の定量情報を取得した。全ての胚発生必須遺伝子 (349 遺伝子) を対象に、RNAi 胚の定量細胞分裂ダイナミクス情報を取得した。また、標準として野生型の定量細胞分裂ダイナミクス情報を 50 個体分取得した。

高感度で客観性の高い表現型解析を行う目的で、RNAi 胚の 4 次元定量細胞ダイナミクス情報を利用した計算表現型解析を行った。受精から 8 細胞期の間の細胞ダイナミクスの 365 種の特徴を定量的表現型指標として数学的に定義し、各特徴の RNAi 胚と野生型胚の間での差異を、定量細胞ダイナミクス情報を使って計算した。第 3 染色体上の胚発生必須遺伝子 (全 97 遺伝子) に対する RNAi 胚について解析を行い、6958 種の表現型異常を同定した。過去の目視による RNAi 表現型解析により同定された表現型異常は全て、この計算表現型解析で同定された。また、細胞分裂の方向やタイミングなどの目視では異常の検出が困難である表現型指標について、多数の表現型異常を検出した。

初期胚の形態形成のプログラムの解明を目指し、4 次元定量細胞ダイナミクス情報を利用して形態形成のプログラムの進み方を推定する手法を開発した。本手法では、可能な全ての 2 つの定量的表現型指標の組み合わせそれぞれについて、表現型指標の相関を計算し、高い相関を示す表現型指標の組み合わせを選択する。受精卵から 8 細胞期までの 365 定量的表現型指標を対象に、野生型胚 50 個体の相関を計算し、高い相関を示す表現型指標の組み合わせを 1649 種同定した。これらの高相関の表現型指標の組み合わせを時空間にしたがって描画し図を作成し、これを発生フローチャートと名づけた。最も高い相関を示す上位 200 の組み合わせの中で、89% (177/200) の組み合わせについては二つの表

現型指標の間に因果関係を持つ、あるいは、二つの表現型指標が共通の制御因子を持つことを確認した。上位 200 の組み合わせの中で既知の因果関係あるいは共通制御因子を持たない組み合わせについては、未知の因果関係あるいは共通制御因子の存在が予想された。

初期胚の形態形成の物理反応のプログラムを制御する遺伝子制御プログラムの解明を目指し、4 次元定量細胞ダイナミクス情報を利用して発生フローチャートを制御する遺伝子プログラムを推定する手法を開発した。本手法では、高い相関を示す表現型指標の各組み合わせについて、その相関に従わない RNAi 胚を産生する遺伝子を、野生型胚の分布から予測区間を計算して導出する。1649 種の高相関の表現型指標の組み合わせに対して 8349 種の遺伝子を導出した。これらの遺伝子は、それぞれ対応する表現型指標間の相関を生成するメカニズムに関与していることを、初期胚の形態形成における機能が良く解明されている *par-2* と *par-3* 遺伝子について確認した。本手法により導出された遺伝子と表現型指標の組を利用すれば、形態形成の物理反応のプログラム（発生フローチャート）と遺伝子制御ネットワークを連結することが可能になった。

本課題により取得した情報を公開する目的で、情報公開用のデータベースを構築した。野生型胚（50 個体分）および第 3 染色体の胚発生必須遺伝子を標的とした RNAi 胚の 4 次元微分干涉顕微鏡画像および定量細胞分裂ダイナミクス情報、更に、計算表現型解析の結果、発生フローチャート解析の結果、発生フローチャートに対応する遺伝子の予測結果、閲覧用ソフトウェアを公開している。これらの情報が発生の定量・計算解析の重要な情報資源となることを期待している。

5) 公共動画画像を利用した細胞分裂ダイナミクスの定量情報の取得と RNAi 胚の細胞分裂ダイナミクスの定量・計算解析（大浪）

公共の動画画像データの有効活用を目指して、データベースから公開されている RNAi 胚の 2+1 次元の微分干涉顕微鏡動画画像から細胞分裂ダイナミクスの定量情報を取得する装置を開発した。Watson's method と Dynamic threshold binarization method を組み合わせて細胞核の認識のための閾値を決定することにより、画質の異なる動画画像に対する頑強性の高い装置の開発に成功した。本装置を RNAi 胚の 2+1 次元微分干涉顕微鏡動画画像の公共データベースである Phenobank の動画画像に適用し、RNAi 胚の細胞分裂ダイナミクスの定量情報をゲノムワイドに取得した。全ての胚発生関連遺伝子（1349 遺伝子）について、受精から 4 細胞期までの RNAi 胚の 2+1 次元の細胞分裂ダイナミクスの定量情報を取得した。

6) 細胞核/紡錘体の動態を支配する機構の解明（大浪） 生細胞イメージングと画像処理を利用した細胞の動態の測定と計算機シミュレーションを組み合わせた解析により、細胞核の中央化の機構に関する 20 年来の論争に終止符を打った。1980 年代中盤に提唱された細胞核の中央化に関する二つの機構（「押しモデル」と「引きモデル」）それぞれについて、微小管やモーター蛋白質に関する生物物理学的知見に基づいた数理モデルを構築し、計算機シミュレーションにより導出した各モデルでの細胞核の挙動を解析し、モデル間の細胞核の挙動の差異を発見した。In vivo での細胞核の挙動の特徴を、胚の 2+1 次元（2 次元+時間）微分干涉顕微鏡撮影画像と画像処理を利用して解析することにより、細胞核の中央化は主に引きモデルに依存していることを明らかにした。

不等分裂の過程で、分裂期に紡錘体が胚の中心部から非中心位置に移動する機構を明らかにするために、細胞核や紡錘体のマイクロメーター・スケールの運動を生細胞イメージングと画像処理

を利用した解析した。2+1 次元微分干涉顕微鏡画像を利用した細胞核のマイクロメーター・スケールの運動の定量測定により、紡錘体の非中央化の原動力として提唱されていた $G\alpha$ に依存した細胞 cortex の引力が、細胞核の中央化の時期にも働いていることを明らかにした。GFP 標識ヒストンおよび GFP 標識チューブリンの発現株を利用した紡錘体のマイクロメーター・スケールの運動の定量測定により、 $G\alpha$ に依存した細胞 cortex の引力の空間分布が、紡錘体の非中央化の前後で変化することを発見した。これらの知見に基づき、細胞核の中央化から紡錘体の非中央化までの細胞核の動きを支配する機構の数理モデルを構築した。

7) 細胞の形態を制御する機構の解明（大浪） 胚の細胞の形態を制御する機構の解明を目指して、胚の細胞形態に対する細胞骨格の阻害剤の投与の影響を検討した。細胞間の境界面の形態は微小管ではなくアクチンフィラメントに依存することを明らかにした。また、細胞間の境界面が一方の細胞側に膨らむ場合、この細胞の膨らみの形成は、その膨らみによって窪みされる細胞の活性に依存せず、膨らむ細胞の活性に依存することを明らかにした。

細胞を球形化する方法として、細胞の体積を増加させる方法と細胞の表面積を減少させる方法が考えられてきた。計算機シミュレーションおよび理論解析により、細胞を球形化する第 3 の方法として細胞表層部の曲げ弾性を増加させる方法があることを発見した。

胚の細胞の形態や胚内での細胞の空間配置を計算するために、細胞の体積、細胞表面の張力、細胞表面の曲げ弾性、細胞間の相互作用の細胞形態に対する効果を計算するシミュレーションソフトウェアを開発した。

8) 組織の形態形成を支配する機構の解明（大浪） 組織の 3 次元の形態を形成する機構の解明を目指し、組織形態形成過程での個々の細胞の動態の定量情報を取得するツールを開発した。GFP 標識タンパク質を使って細胞境界を可視化したショウジョウバエ気管原基の陥入期の動画画像から細胞境界を自動検出する画像処理アルゴリズムを Canny filter と Hybrid 3D Watershed Algorithm を組み合わせて開発し、検出結果を編集する GUI を開発した。これらのアルゴリズムと GUI を用いて、気管原基組織の陥入期の各細胞の動態の定量情報を取得した。（大浪／生命システム情報 計画研究分担者・林 茂生博士との共同研究）

<国内外での成果の位置づけ>

C. elegans 初期胚の RNAi 表現型解析は海外の 2 つのグループも行っているが、細胞分化や形態形成を含めた胚発生全般、さらには時期特異的 RNAi を用いた複数の発生時期における表現型解析は世界的にも初めてのものである。

発生過程のマーカーとなるモノクローナル抗体は、過去に複数の研究グループでスクリーニングされたが、現在広く使われているものはわずか十数種しかない。今回われわれが取得した約 40 種のモノクローナル抗体は、低発現量タンパク質を濃縮したものを抗原としたことから、既存の抗体とは異なる新規抗原を認識しているものが多く得られており、マーカーとして有用なものが多い。実際、多数の線虫研究者からのリクエストを受け、広く配布している。

生殖顆粒は多くの生物種に存在するが、その生理的機能については不明な点が多い。今回、われわれが取得した生殖顆粒を特異的に認識するモノクローナル抗体や、われわれが確立した顆粒形成能アッセイにより、生殖顆粒の形成プロセスや機能の理解が進んだ。

本研究で確立した GFP 発現株の高分解能 3 次元ライブイメージング技術は世界的に見てもトップレベルのものであり、新規に作成した GFP/mCherry 融合タンパク質発現株を組み合わせることで、これまでに解析が困難だった動的現象を可視化することが可能となった。さらに、発生過程のライブイメージング画像の定量的解析を行っているグループはまだ少なく、特に 3 次元 + 時間軸画像の解析は新規性が高い。この手法を用いて初期胚における細胞骨格系（アクチンおよび微小管）の動態解析を行うことで、細胞極性の確立や紡錘体形成などの重要な細胞内プロセスの制御機構の解明が進んだ。

RNAi 胚の 2+1 次元の微分顕微鏡画像の大規模なコレクションは海外の 2 つの研究グループが既に公開しているが、本研究で構築した 4 次元微分顕微鏡画像の大規模なコレクションは世界初のものである。当コレクションが細胞や発生の基本過程の機構の解明のための重要な情報資源となることを期待している。

本研究で使用した細胞分裂ダイナミクス測定装置は、大浪の研究グループが独自に開発したものであり、この装置と大規模かつ体系的な RNAi 胚の解析とを組み合わせることで本研究で取得した網羅的な RNAi 胚の定量細胞分裂ダイナミクス情報は、網羅的な遺伝子機能の不活性化条件下での形態形成のダイナミクスの定量情報として世界初のものである。本研究の成果に動機付けられ、様々な対象について、網羅的な遺伝子機能の不活性化条件下での形態形成のダイナミクスの定量情報が構築され、定量的あるいは計算科学的手法による発生機構の解析の今後の発展に寄与することを期待している。

本研究で実施した細胞分裂ダイナミクスを対象とした計算表現型解析は、形態ダイナミクスの定量情報を利用した表現型解析として世界初のものである。同様の計算表現型解析が、今後、他の形態ダイナミクスの定量情報を対象に実施され、発生生物学研究を加速することを期待している。

本研究で実施した発生フローチャート解析は、大規模な遺伝子ノックダウン胚の形態ダイナミクスの定量情報からの知識抽出として世界初のものである。本手法が他のシステムのダイナミクスの定量情報に応用され、その分野の発展に寄与することを期待する。発生フローチャートは発生のプログラムについて、既存の手法とは全く異なる性質の情報を与える。発生フローチャートの情報により発生プログラムに関する実験研究の効率の向上が期待される。

本研究で取得した RNAi 胚の定量細胞分裂ダイナミクス情報からの知識の抽出法は、発生フローチャート解析にも多数存在することが期待される。定量細胞分裂ダイナミクス情報を情報資源としたバイオインフォマティクス研究、計算生物学研究の今後の発展が期待される。

画像処理を使った in vivo の動態の測定と計算機シミュレーションを組み合わせた胚の構造変化の機構の解析手法は、大浪のグループが独自に開発した解析手法である。本研究は計算細胞生物学の先駆的研究として世界的に高い評価を受けた。

本研究で開発した細胞の形態の制御のシミュレーションソフトウェアは、細胞の体積、細胞表面の張力、細胞表面の曲げ弾性、細胞間の相互作用の細胞形態に対する効果を計算できる世界初のソフトウェアである。当ソフトウェアが細胞や胚の形態の制御の解明に今後大きく寄与することを期待している。

本研究で実施した、公共データベース（Phenobank）の動画像を利用した大規模な RNAi 胚の定量細胞分裂ダイナミクス情報の取得は、公共データベースの動画像を利用した大規模な定量情報の取得、知識抽出として世界初のものである。本研究は、公共データベースの画像、動画像の利活用の可能性の一端を示した。本研

究を契機に公共データベースの画像、動画像の利活用についての検討が国際的な視点で行われることを期待する。

本研究で開発した、公共データベースの動画像の処理を目的とした細胞分裂ダイナミクス測定装置は、幅広い画質の動画像に適用できるため、個々の研究室の動画像の処理にも適している。今後、本装置の利用方法について研究者コミュニティの間で検討したい。

ショウジョウバエの気管原基の陥入は組織レベルの形態形成の基本的な物理モデルを構築するために最適な系である。本研究により細胞レベルで定量化された組織の 4 次元動態は、今後、形態形成の物理モデル構築の基盤データとして活用する予定である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

GFP 融合タンパク質発現株の作成（Bombardment 法）は効率が非常に低く、スループットをあげることが困難であった。今後ベクター開発やスクリーニング法を改良することにより、染色体挿入株の作成効率を向上させる必要がある。Mos transposon による遺伝子導入法を使うことも検討中である。

高時空間分解能で GFP シグナルの 3 次元 + 時間軸画像を取得するために、顕微鏡セッティングの検討に時間を要した。現在はスピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いているが、すでにその能力の上限まで活用しており、今後もレーザーや CCD カメラ等の検討により、より高レベルの画像を取得することを試みていく。

組織特異的モノクローナル抗体ほとんどが Western blotting で使えないために、抗原決定が困難である。今回、哺乳動物細胞を用いて免疫染色でスクリーニングする方法を確立したので、この手法をハイスループット化することで、抗原決定を進めていきたい。

研究期間の初期に、それまでに使用していた装置の約 2 倍良い時間分解能で 4 次元微分干渉顕微鏡撮影が可能なシステムが発売されたため、顕微鏡撮影システムを新システムに交換した。これに伴い、新システムに最適化した撮影条件の検討、および分裂ダイナミクス測定ソフトウェアの調整を行う必要が生じ、全胚発生必須遺伝子に対するデータの取得が当初の計画よりも大幅に遅れた。そのため、データの取得は研究期間内に終了したが、データの解析が研究期間終了に間に合わなかった。

当初計画では、クラスタリング解析を RNAi 胚の定量細胞分裂ダイナミクス情報に適用する予定であったが、単純にクラスタ解析を適用するだけでは良い結果が得られなかった。良い結果が得られなかった理由としては、発生の過程で異常が時間的に蓄積していくことと、データ数の不足が考えられた。発生の時間を区切ってクラスタリング解析を適用したところ良好な結果が得られることを試行実験により確認している。データ数の不足も重要な要素なので、クラスタリング解析は全胚発生必須遺伝子に対するデータの取得後に行うことが適切と判断し、発生フローチャート解析などの他の解析を先に行った。その結果、クラスタリング解析の結果を研究期間中に取得することができなかった。

当初計画では、細胞質流動の速度とベクトルの測定手法を開発し、解析に利用する予定であったが、以下の理由から実際にはこの課題は実行しなかった。担当を予定していた博士研究員が独立ポジションを得て研究室から独立したため、研究計画を再検討し、細胞の形態ダイナミクスの研究により多くの研究資源を投入する決断をした。

公共データベースの動画像を利用した定量細胞ダイナミクス情報の定量・計算解析において、データベースに野生型胚のデータが登録されていなかったため、野生型標準の設定に苦労した。

<今後の課題、展望>

高解像度の表現型データを収集することとスループットとの兼ね合いが難しい。また、大量の3次元・4次元顕微鏡画像データをどのように処理し、有益な情報を抽出していくかの方法論を今後さらに開発していく必要がある。

表現型解析のためのマーカー作出の技術開発をすすめて、より多彩なマーカーを作成することが必要である。今後はphotoconvertible protein (mEOS2, Dendra2 など) や、蛋白質活性インディケーターも活用することで、さらに詳細な細胞内因子のダイナミクスを解析することをめざす。細胞骨格動態の解析のためには、ライブイメージングの時間的・空間的分解能をさらに向上させることが望ましい。また、細胞骨格系ダイナミクスを解析するための、定量的画像解析法の確立は急務である。

画像データや画像データの解析アルゴリズム、画像データから抽出した定量情報などの情報、画像データに付随する撮影条件などの情報を管理する国際標準が必要。BioImage Informaticsなどの海外のactivityと連携してこの分野の整備を行っていく予定。

細胞膜の動態を高時間分解能かつ高画質で4次元撮影できる高速共焦点顕微鏡システムが欲しい。現在の横河CSU高速共焦点スキャナ+EM-CCDの組み合わせでは胚の深部の画質が不鮮明になる。今後も、顕微鏡会社と連携しながら解決策を探していく。

細胞形態の制御機構の解明、数値モデルの構築のためには、物理パラメータの測定技術や物理的摂動の付加技術が必要。本研究期間に蓄積した自身のアイデアを試しながら、生物物理や工学分野の他の研究者とも連携して技術開発を行っていく予定。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

- 901131029: Han X, Gomes JE, Birmingham CL, Pintard L, Sugimoto A, Mains PE., The Role of Protein Phosphatase 4 (PP4) in Regulating Microtubule Severing in the *Caenorhabditis elegans* Embryo., *Genetics*, 181, 933-943 (2009)
- 901131016: Gassmann R, Essex A, Hu JS, Maddox PS, Motegi F, Sugimoto A, O'Rourke SM, Bowerman B, McLeod I, Yates JR 3rd, et al., A new mechanism controlling kinetochore-microtubule interactions revealed by comparison of two dynein-targeting components: SPDYL-1 and the Rod/Zwilch/Zw10 complex., *Genes Dev*, 22, 2385-2399 (2008)
- 805191057: Takeda, K., Watanabe, C., Qadota, H., Hanazawa, M., and Sugimoto, A., Efficient production of monoclonal antibodies recognizing specific structures in *Caenorhabditis elegans* embryos using an antigen subtraction method, *Genes Cells*, 13, 653-665 (2008)
- 806231029: Konishi, T., Uodome, N., and Sugimoto, A., The *Caenorhabditis elegans* DDX-23, a homolog of yeast splicing factor PRP28, is required for the sperm-oocyte switch and differentiation of various cell types, *Dev Dyn*, 237, 2367-2377 (2008)
- 801272152: Maruyama, R., Velarde, N.V., Klancer, R., Gordon, S., Kadandale, P., Parry, J.M., Hang, J.S., Rubin, J., Stewart-Michaelis, A., Schweinsberg, P., Grant, B.D., Piano, F., Sugimoto, A., and Singson, A., EGG-3 regulates cell-surface and cortex rearrangements during egg activation in *Caenorhabditis elegans*., *Curr Biol*, 17, 1555-1560 (2007)
- 708011831: Hamahashi, S., Kitano, H., and Onami, S., A system for measuring cell division patterns of early *Caenorhabditis elegans* embryos by using image processing and object tracking, *Systems and Computers in Japan*, 38(11), 12-24 (2007)
- 708011902: 福島知紀, 長名保範, 田村友紀, 濱橋秀互, 大浪修二, 天野英晴, 線虫 *Caenorhabditis elegans* 初期胚の細胞分裂パターン計測システムのリコンフィギャラブルシステムによる高速化, 電子情報通信学会論文誌 D, J90-D, 2970-2980 (2007)
- 801211100: Kimura, A., and Onami, S., Local cortical pulling-force repression switches centrosomal centration and posterior displacement in *C. elegans*, *J. Cell Biol.*, 179, 1347-1354 (2007)
- 606021554: Motegi, F., Velarde, N. V., Piano, F., and Sugimoto A., Two phases of astral microtubule activity during cytokinesis in *C. elegans* embryos, *Dev. Cell*, 10, 509-20 (2006)
- 702131902: Motegi, F. and Sugimoto, A., Sequential functioning of ECT-2/RhoGEF, RHO-1 and CDC-42 establishes cell polarity in *C. elegans* embryos, *Nat Cell Biol*, 8, 978-985 (2006)
- 606171709: 濱橋秀互, 北野宏明, 大浪修一, 画像処理とオブジェクトトラッキングを用いた線虫の初期胚の細胞分裂パターン計測システム, 電子情報通信学会論文誌 D, J89-D, 1248-1259 (2006)
- 612201050 : Onami, S. and Kitano, H., Genome-wide prediction of genetic interactions in a metazoan., *Bioessays*, 28, 1087-1090 (2006) .
- 601261951: Furuya, M., Qadota, H., Chisholm, A. D. & Sugimoto, A. The *C. elegans* eyes absent ortholog EYA-1 is required for tissue differentiation and plays partially redundant roles with PAX-6. *Dev Biol*, 286, 452-463 (2005).
- 601280150: Hamahashi, S. & Onami, S. Objective measurement of spindle orientation in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Genome Inform* 16, 86-93 (2005).
- 601280133: Hamahashi, S., Onami, S. & Kitano, H. Detection of nuclei in 4D Nomarski DIC microscope images of early *Caenorhabditis elegans* embryos using local image entropy and object tracking. *BMC Bioinformatics* 6, 125 (2005).
- 601281359: Kimura, A. & Onami, S. Computer simulations and image processing reveal length-dependent pulling force as the primary mechanism for *C. elegans* male pronuclear migration. *Dev Cell* 8, 765-75 (2005).
- 601261959: Yanagi, K., Mizuno, T., Tsuyama, T., Tada, S., Iida, Y., Sugimoto, A., Eki, T., Enomoto, T. & Hanaoka, F. *Caenorhabditis elegans* geminin homologue participates in cell cycle regulation and germ line development. *J Biol Chem* 280, 19689-94 (2005).

2) 学会発表

- Hanazawa, M., M. Yonetani, and A. Sugimoto. Self-aggregation of PGL proteins plays a crucial role in P granule assembly. 17th International *C. elegans* Meeting. 2009: Los Angeles, California, USA.
- Iida, Y., Z. Zheng, and A. Sugimoto. High-Resolution 4D Imaging and Quantitative Analysis of Centrosome Movement in Early *C. elegans* Embryos. CDB Symposium 2009 "Shape & Polarity". 2009: Kobe.
- Sasagawa, Y., K. Yamanaka, T. Urano, A. Higashitani, A. Sugimoto, and H. Ogura. p97-dependent proteolysis is involved in meiotic chromosome segregation via restricting Aurora B

kinase to the specific chromatid sites in *C. elegans*. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 2009: 名古屋.

4. Sugimoto, A. Cellular dynamics during early embryogenesis in the nematode *C. elegans*. 熊本大学 平成 21 年度グローバル COE リエゾンラボ研究会. 2009: 熊本.
5. Terasawa, M. and A. Sugimoto. Identification of γ -tubulin complexes in *C. elegans* embryos. 17th International *C. elegans* Meeting. 2009: Los Angeles, California, USA.
6. Yonetani, M., M. Hanazawa, and A. Sugimoto. Reconstituting *C. elegans* Germ Granules in Mammalian Cells. CDB Symposium 2009 "Shape & Polarity". 2009: Kobe.
7. Yonetani, M., M. Hanazawa, and A. Sugimoto. Structure-function analysis of PGL-3 that play a crucial role in P granule formation. 17th International *C. elegans* Meeting. 2009: Los Angeles, California, USA.
8. 戸谷美夏, 杉本亜砂子. 紡錘体形成に関わる 2 つの微小管制御経路. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 2009: 名古屋.
9. 杉本亜砂子. 細胞から個体へ: 線虫初期胚のライブイメージング解析. 奈良先端科学技術大学院シンポジウム「視る生物学 4」2009: 奈良.
10. Onami, S.: Live cell imaging and image-processing enable quantitative and computational analysis of the development. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009 年 12 月 9-12 日. 神戸.
11. 大浪修一: 定量・計算解析による発生ダイナミクスの理解. 日本機械学会計算力学講演会. 2009 年 10 月 10-12 日. 金沢大学角間キャンパス, 金沢.
12. 京田耕司, 足立絵瑠, 倉持順子, 島田久美子, 大浪修一. 線虫 *C. elegans* 初期胚の細胞分裂ダイナミクスの定量解析. 第 19 回日本数理生物学会大会. 2009 年 9 月 9-11 日. 東京大学駒場キャンパス, 東京.
13. Kyoda, K., Adachi, E., Shimada, K., Kuramochi, J., Onami, S.: Computational analysis of quantitative information of cell division dynamics of early embryos. 17th International *C. elegans* Meeting. Jun 24-28, 2009. LA, USA.
14. Onami, S.: Quantitative cell division dynamics analysis and prediction of the mechanisms of development in *C. elegans*. The 2nd RIKEN-University of Edinburgh Joint Workshop. May 14,15, 2009. British Embassy, Tokyo, Japan.
15. Onami, S.: Quantitative cell division dynamics analysis and prediction of the mechanisms of development in *C. elegans*. The 9th NIBB-EMBL Symposium, Functional Imaging from Atoms to Organisms. Apr 20-22, 2009. Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan.
16. Onami, S.: Quantitative cell division dynamics analysis and prediction of the mechanism of development in *C. elegans*. International Symposium on System Biology and Proteomics in Biomedical Science, Mar 27-29, 2009. Kolkata, India.
17. 大浪修一: 細胞イメージングによるシステム生物学の展開. 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 細胞光計測・制御のための新規バイオ技術形成クラスター シンポジウム. 2009 年 2 月 25 日. 慶應義塾大学理工学部矢上キャンパス, 横浜.
18. 大浪修一: 細胞・発生生物学の超ベタフロップス級コンピュータへの展開. 超ベタフロップス級コンピュータと実験生物学の連携による生命現象への挑戦. 2009 年 2 月 5-6 日. 理化学研究所横浜研究所, 横浜.

ほか 59 件

3) 図書

1. 708021423: Kyoda, K., and Onami, S., DBRF-MEGN method: an algorithm for inferring gene regulatory networks from large-scale gene expression profiles, Introduction to Systems Biology, Humana Press, 2007

4) データベース/ソフトウェア

1. 912040819: K. Kyoda, E. Adachi, J. Kuramochi, K. Shimada, M. Furukawa, R. Arai, M. Urai, E. Masuda, Y. Suzuki, Y. Nagai, T. Oguro, M. Fujita, and S. Onami, Quantitative cell division dynamics in RNAi-treated *C. elegans* embryos <http://so.gsc.riken.jp/dpp/>
第 3 染色体の胚発生必須遺伝子に対する計算細胞分裂ダイナミクス解析のデータを公開。
2. 601262012: R. Maruama, N. Iida, C. Hayakawa, Y. Mochizuki, T. Toyoda, and A. Sugimoto, *C. elegans* RNAi phenome database <https://gaibu00.gsc.riken.jp/Ce-2005/rnai/jsp/index.jsp>
大規模 RNAi による *C. elegans* 胚性致死表現型データベース。遺伝子名・表現型指標・表現型クラスターから検索可能。
3. 607241229: Asako Sugimoto, *C. elegans* monoclonal antibody collection <http://www.cdb.riken.jp/dge/KTmAbDB/KTtop.html>
線虫 *C. elegans* 胚の特異的な細胞種・細胞内構造を認識するモノクローナル抗体コレクションのデータベース。胚発生過程各時期の免疫染色顕微鏡画像が閲覧可能。
4. 601261951: *C. elegans* RNAi phenome database <http://omicspace.riken.jp/Ce/rnai/jsp/index.jsp>
大規模 RNAi による *C. elegans* 胚性致死表現型データベース。遺伝子名・表現型指標・表現型クラスターから検索可能。

5) 総説

1. 91201190: 花澤桃世, 米谷匡史, 杉本亜砂子, 線虫における生殖顆粒の形成と分配, 蛋白質核酸酵素, 54, 2147-2152 (2009), 2009
1. 801272156: 杉本亜砂子, 線虫の比較ゲノム, 比較ゲノム学から読み解く生命システム, 藤山秋佐夫 編 (東京 秀潤社) pp. 105-110., 2007
2. 801272158: 小西隆文, 杉本亜砂子, in vivo イメージングのためのプローブ: 線虫, 実験がうまくいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方, 三輪佳宏 編 (東京 羊土社) pp. 114-118., 2007
3. 606021559: 茂木文夫, 杉本亜砂子, 線虫初期胚の非対称分裂から学ぶ”極性化”, 蛋白質核酸酵素 51, 776-781 (2006),
4. 702131911: 茂木文夫, 杉本亜砂子, 細胞質分裂の開始における微小管のはたらき, 蛋白質核酸酵素 51, 1590-1595. (2006)
5. 612201058: 木村暁, 大浪修一, コンピュータシミュレーションを利用した核の配置のダイナミクス解析, 蛋白質核酸酵素 51, 2172-2179 (2006)
6. 702131925: 杉本亜砂子, 体系的表現型解析で探る線虫の発生機構, 実験医学 25, 151-157 (2007)
7. 702131918: 杉本亜砂子, ゲノムに書かれた発生プログラムを読み解くー線虫をモデル系として, 「ゲノムは何をどのように決めているのか? 生命システムの理解へ向けて」, ゲノム 4 領域公開シンポジウム講演抄録集, (東京: クバプロ), pp. 101-112. (2007)
8. 601281409: 大浪修一, 北野宏明. 発生のシステムバイオロジー. 蛋白質核酸酵素. 50, 798-803 (2005).

9. 601281413: 木村晁、太浪修一．核はなぜ真ん中に？ーコンピュータシミュレーションが明らかにする生命のしくみ．
Bionics. 2, 60-62 (2005).
10. 601262006: 杉本亜砂子、小原雄治．線虫ゲノムの体系的発現・機能解析．蛋白質核酸酵素．50, 2140-2145 (2005).

6) 新聞・テレビ

1. 905161759: 杉本亜砂子、理系白書 「挑戦の時：次代を築く、若手研究者たち」，毎日新聞，2009/1/1110.
2. 801272210: 杉本亜砂子，ミクロの「新大陸」 RNA 研究最前線，「サイエンス ZERO」NHK 教育テレビ，，2008/01/19
3. 801272205: 杉本亜砂子，理研の最前線「線虫が明らかにする個体発生のしくみ」，日刊工業新聞，2007/08/21