

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。

<2008 年度の研究の当初計画>

- 1) 蛍光タンパク質融合遺伝子発現株の作出法の効率化 線虫胚におけるタンパク質の局在を 3 次元ライブイメージングで解析するために、蛍光タンパク質 (GFP・mCherry) 融合タンパク質発現株の作出を効率化する。(杉本)
- 2) GFP/mCherry 融合タンパク質を用いた生体内タンパク質局在解析と表現型解析 初期発生に必要な遺伝子群について、GFP/mCherry 融合遺伝子発現株を作出し、3 次元ライブイメージングによる生体内タンパク質局在解析および表現型解析を行う。(杉本)
- 3) 組織特異的モノクローナル抗体群の抗原同定 線虫胚の特異的な構造を染色する 35 種のモノクローナル抗体の抗原同定を行う。まず、生殖顆粒を認識する 11 種のモノクローナル抗体の解析から着手する。(杉本)
- 4) 細胞分裂パターンデータを用いた発生プログラムの解析 これまでに取得した定量的細胞分裂パターンデータを用いて、発生プログラムの解明を行う。(大浪)
- 5) 画像認識を利用した新たな測定手法の開発 公共データベースの DIC 顕微鏡動画、細胞膜周辺に GFP を発現する株の蛍光顕微鏡動画から胚や組織の形態変化を計測するアルゴリズムを開発する。(大浪)

<2008 年度の成果>

- 1) 線虫胚発生過程の表現型をライブで詳細に解析するために、多様な細胞内構造を可視化するための蛍光タンパク質融合遺伝子発現株の構築をすすめた。GFP/mCherry 発現用ベクター、遺伝子挿入株作製法、3 次元多色タイムラプス画像取得法の改良を行い、高時空間分解能で線虫初期胚における細胞骨格

ダイナミクスを解析するための技術開発を行った。特に、細胞分裂期の紡錘体微小管および中心体動態の解析を重点的にを行った。

紡錘体微小管に関しては、GFP:: β -tubulin; GFP:: γ -tubulin; mCherry::Histon 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。

一細胞期における中心体動態については、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。今後は中心体・細胞膜・核膜を 3 重標識した株を用いてライブイメージングを行うことで、さらに詳細な細胞内ダイナミクス解析を行う予定である。(杉本)

- 2) 線虫胚の特定の組織や細胞内器官を特異的に染色する 35 種のモノクローナル抗体ライブラリーを作製し、発生時期ごとの染色パターン画像データベースを公表した。また、Developmental Studies Hybridoma Bank (Univ. of Iowa) に 17 種のモノクローナル抗体を寄託することにより、これらの抗体を国内外の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、希望者への配布を開始した。DSHB 寄託以前の段階で、計 21 研究室のべ 47 種類の抗体を配布した。(杉本)
- 3) 上記モノクローナル抗体のうち、生殖顆粒を認識する 11 種に着目し染色パターン等のさらに詳細な解析を行った。うち 2 種については、免疫沈降と質量分析、および、哺乳動物細胞を用いた発現スクリーニングにより、抗原がそれぞれ PGL-1 および PGL-3 タンパク質であることを同定した。この抗原発現スクリーニングの過程で、PGL-1 および PGL-3 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。(杉本)
- 4) 第 I、第 III、X 染色体の全ての胚発生必須遺伝子 (全 224 遺伝子) について、RNAi 胚の定量的細胞分裂パターンデータを取得した。第 III 染色体の胚発生必須遺伝子 (全 97 遺伝子) を対象に、RNAi 胚の定量的細胞分裂パターンデータを使った胚発生メカニズムの解析を行った。365 種の表現型指標に基づき、7076 種の表現型を検出した。表現型指標のペア相関を利用して胚の形態形成の過程を推定する手法を開発し、329 指標、1656 関係で構成される発生フローチャートを作製した。ペア相関の外れ値を使い、発生フローチャート中の個々の関係の成立のために働く遺伝子を推定する手法を開発し、8409 遺伝

子機能を推定した。(大浪)

- 5) 多様な条件で撮影された DIC 顕微鏡動画画像に対応する汎用的な細胞分裂パターン測定アルゴリズムを開発した。当アルゴリズムを利用し、公共データベース (Wormbase) に登録されている RNAi 線虫胚の 2D タイムラプス DIC 顕微鏡画像を利用した包括的な RNAi 胚の定量的細胞分裂パターン解析を開始した。RNAi により胚致死表現型が観察される第 I、第 III 染色体の全ての遺伝子 (582 遺伝子) について 4 細胞期までの細胞分裂パターンの取得を終了した。(大浪)
- 6) 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と検出を補助する GUI を開発した。これらのアルゴリズムと GUI を用いて、気管原基組織の形態形成の定量的解析を開始した。(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) ショウジョウバエの細胞膜検出アルゴリズムを応用し、線虫胚の細胞膜を検出するアルゴリズムを開発した。(大浪)

<国内外での成果の位置づけ>

われわれが取得したモノクローナル抗体および GFP/mCherry マーカーは、線虫発生過程の表現型解析を高い時間的・空間的分解能で行うためのツールとして非常に有用である。実際、多数の線虫研究者からのリクエストを受け、配布を行っている。

本研究で確立した GFP/mCherry 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 (特に、二重・三重標識株) を組み合わせて用いることで、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、特に初期胚細胞分裂の 3 次元+時間軸画像の解析は新規性が高い。

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むと期待できる。

遺伝子発現を振動した様々な条件での発生プロセスの 4 次元定量データを大規模かつ網羅的に収集した研究は他に例が無い。本研究により、これら 4 次元定量データを用いた定量的表現型解析の、高感度性、客観性、効率性が初めて具体的に示された。発生フローチャートを使った形態形成過程と遺伝子機能の推定は、いずれも大浪らが独自に開発した 4 次元定量データの解析手法である。これらの手法の有用性が具体的に示されたことから、ゲノム科学、システム生物学研究分野における、これら手法の今後の普及と応用、発展が期待される。

公共データベースで公開されている大規模遺伝子ノックアウトプロジェクトの動画を網羅的に定量化した研究は過去に例がない。公共データベース Phenobank には胚致死の RNAi 表現型を示す全遺伝子 (1259 遺伝子) を標的にしたものを含む RNAi 線虫胚の 40,000 動画画像が保存されている。本研究により、Phenobank に登録されている全ての動画画像の定量化が可能となり、これは公共データベースで公開されている大規模網羅的な遺伝子ノックアウトプロジェクトの動画を定量化した世界初の例となる。

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される予定であ

る。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

GFP と mCherry の二種類の蛍光標識で計 3 タンパク質までの高分解能 3 次元ライブイメージングを行う技術はほぼ確立したが、3 色標識・4 タンパク質以上の同時標識はまだ実施できていない。また、トランスジェニック株の作出効率もまだ十分とは言えず、最近発表された Mos transposon による遺伝子導入法を使うことも検討したい。

線虫胚の細胞膜を 4 次元定量化するために使用する 4 次元高速共焦点顕微鏡の機器および撮影条件の設定に予定以上の時間を要したため、細胞の形態制御に関する数理モデルの構築と計算機シミュレーションを使った解析の実施が予定より遅れた。上記設定はおおよそ最適化されたので、数理モデル化およびシミュレーション研究を H21 年度に重点的に実施する。

<今後の課題>

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。現在は線虫初期胚における GFP, mCherry 等の輝度が低いことがリミットとなっているので、今後は蛍光タンパク質のタンデム連結、改良型蛍光タンパク質の導入、コドン使用頻度の最適化、等も適宜検討する。

細胞の形態制御に関する評価の高い数理モデルは存在していないため、線虫胚の細胞形態のダイナミクスを良く表現する数理モデルの確立が今後の課題である。まずは、既存の複数のモデルの挙動と実際の細胞の挙動を比較し、各モデルの特徴を評価するところから開始し、信頼性の高い数理モデルの確立を目指す。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 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)
2. 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)
3. 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: SPDL-1 and the Rod/Zwilch/Zw10 complex., *Genes Dev*, 22, 2385-2399 (2008)
4. 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*, in press (2008)