

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 ゲノム科学総合研究センター

＜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。

＜2007 年度の研究の当初計画＞

1. 蛍光蛋白質融合遺伝子発現株の作出法の効率化 線虫胚における蛋白質の局在を3次元ライブイメージングで解析するために、蛍光蛋白質（GFPおよびmCherry）融合蛋白質発現株の作出を効率化する。具体的には、Gatewayクローニングシステムを利用した蛍光蛋白質融合遺伝子発現用ベクターの開発、線虫への遺伝子導入法の改良を行う。また、複数の蛋白質を異なる蛍光蛋白質で標識し、同時に3次元ライブイメージングを行うためのイメージング技術の開発を行う。

2. GFP/mCherry融合蛋白質を用いた生体内蛋白質局在解析と表現型解析 これまでの体系的表現型解析で同定した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蛋白質局在解析を行う。また、中心体、細胞膜等の特定の細胞内構造がGFP/mCherryされている株に対してRNAiを行い、初期細胞分裂期の3次元ライブイメージングにより、詳細な表現型解析を行う。得られた4次元画像データに基づき、表現型の定量的評価を行う。

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。抗原同定を行うことで、生体内の特異的な構造の構成成分についての理解が深まると期待できる。まず、生殖細胞に特異的に存在する生殖顆粒を認識する10種のモノクローナル抗体の解析から着手する。抗原決定は、ほ乳類培養細胞内で線虫cDNAライブラリーを発現させ、免疫染色による発現スクリーニングを行う。

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。遺伝子ノックダウンプロファイルの相関が高い表現型指標を連結し、発生時間に沿って整列することにより、発生プロセスのプログラムの推定を行う。また、これらの相関にお

けるはずれ値の検出により、発生プロセスのプログラムに関与する遺伝子の推定を行う。まず、第3染色体の全ての100%胚致死遺伝子、1~8細胞期までの246種の表現型指標を対象に、これらの推定を実施し、手法の評価を行う。

5. 画像認識を利用した新たな測定手法の開発 撮影条件の異なるDIC顕微鏡動画像、細胞膜周辺にGFPを発現する株の蛍光顕微鏡動画像から胚の形態変化を計測するアルゴリズムの開発をH19年度に継続して行う。

＜2007 年度の成果＞

1. 蛍光蛋白質融合遺伝子発現株の作出法の効率化 GFPおよびmCherry融合タンパク質発現用ベクターを作成した。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にデザインし、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。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。

2. GFP/mCherry融合蛋白質を用いた生体内蛋白質局在解析と表現型解析 野生型胚、細胞極性確立に異常を示す*par-2*、*par-3*のRNAi胚、および*par-2;par-3*二重RNAi胚の初期細胞分裂期における中心体の3次元動的な動態を解析した。中心体と細胞膜をGFPで標識した線虫胚をZ軸方向に1.5um間隔で25セクション、10秒間隔でスピニングディスク共焦点顕微鏡撮影した。この4次元画像から中心体の位置情報を手動で抽出し、紡錘体の動態を従来以上の時間的・空間的解像度で解析した。*par-2*、*par-3*および*par-2;par-3*胚においては野生型と同様に一細胞期の紡錘体が前後軸方向に回転するとされていたが、今回の解析により、それぞれの動態が異なることが明らかとなった。他の細胞極性関連遺伝子のRNAi胚の解析も同様に行い、1細胞期、2細胞期の紡錘体の方向制御についてさらに解析を進める予定である。

3. 組織特異的モノクローナル抗体群の抗原同定 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。今後、このスクリーニング法を大規模化して行うことにより、他のmAbの抗原も決定することを計画している。

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 胚発生に必須な第3染色体上の遺伝子(全97遺伝子)に対するRNAi胚の定量的細胞分裂パターンデータと281種の定量的表現型指標を適用し、2583種のRNAi表現型を同定した。これらのデータに対し

て受精から8細胞期までを7時期に分割し発生時間に依存した階層的クラスター分析を行い、第3染色体の発生に必須な遺伝子を16クラスターに分類した。各クラスターは機能が類似する遺伝子により構成されることを確認した。30個体の野生型胚の細胞分裂パターンデータを対象に、相関の高い表現型指標を連結し、8細胞期までの発生プロセス指標ネットワークを作成した。発生プロセス指標ネットワークは発生プロセス指標間の因果関係を正しく反映することを確認した。遺伝子ノックダウンプロファイルの相関関係のはずれ値を検出するアルゴリズムを開発し、発生プロセス指標間の因果関係を支配する遺伝子の推定を行った。推定された遺伝子は発生プロセス指標間の因果関係の原因遺伝子を正しく推定することを確認した。

5. 画像認識を利用した新たな測定手法の開発 Watson's methodとDynamic threshold binarization methodを組み合わせて、様々な画質で撮影された線虫胚のDIC顕微鏡2+1次元動画画像に適応可能な核領域検出アルゴリズムを開発した。核領域追跡アルゴリズムと核領域の形状変化、位置判定アルゴリズムを組み合わせて、4細胞期までの細胞分裂パターンを測定するアルゴリズムを開発した。その結果phenobankより入手したRNAi胚の動画画像50サンプルの96%に対して細胞分裂パターンの測定に成功した。Canny filterとHybrid 3D Watershed Algorithmを組み合わせて、GFPで細胞膜周辺を標識したショウジョウバエの神経上皮組織の動画画像から細胞の境界を高効率で検出するアルゴリズムを開発した。現在、これらのアルゴリズムを効率的に研究に活用するためのGUIを開発している。

<国内外での成果の位置づけ>

発生過程のマーカーとなるモノクローナル抗体やGFP融合タンパク質は、過去にも複数の研究グループで作成されたがその数は限られている。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、表現型解析を高解像度で行うためのツールとして有用である。実際、多数の線虫研究者からのリクエストを受け、配布を開始している。

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3次元+時間軸画像の解析は新規性が高い。

システムティックに発生プロセスの4次元定量化を行い、定量的に表現型を同定した研究は他に例が無い。本研究により、定量的な4次元表現型解析の、高感度性、客観性、効率性が初めて具体的に示された。発生時間に依存した階層的クラスター解析、発生プロセス指標ネットワーク、相関はずれ値の検索による遺伝子機能の推定は、いずれも大浪が独自に開発した解析手法である。これらの手法の有効性が示されたことから、これらの手法の発生生物学やゲノム機能解析分野での今後の普及が期待される。

Phenobankに保存されている線虫RNAi胚の動画画像から高効率で発生プロセスを定量化できるソフトウェアは他に例が無い。Phenobankには線虫全遺伝子に対するRNAi胚の動画画像が保存されており、本ソフトウェアにより線虫の全遺伝子のRNAi胚に対する発生プロセスの定量化が可能となる。全遺伝子のノックアウト胚を対象とした発生プロセスの定量化は世界で初めての試みである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

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。

線虫胚DIC顕微鏡動画画像の細胞分裂パターン測定とショウジョウバエの細胞膜認識のアルゴリズム開発を優先したため、GFP標識線虫胚の細胞膜検出アルゴリズムの開発に手が回らなかった。これはH20年度に行う。

<今後の課題>

GFP単色の高分解能3次元ライブイメージング技術はほぼ確立したので、GFP/mCherryの2色、あるいはGFP/mCherry/CFPの3色でのライブイメージングが行えるように、さらに検討を加える。複数のタンパク質を同時に多色で標識することで、細胞内の動的な現象をさらに詳細に解析できるようになると期待できる。

線虫胚の細胞膜検出にはショウジョウバエの細胞膜検出アルゴリズムが利用できると期待されるが、4次元化に伴う問題（焦点深度に依存した画質の変化etc）の解決が課題。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング（査読付きのものに限る）

- 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, 大浪修一, 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ュ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)
- 2) その他（総説等）
- 708021423（著書）
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
 - 801272156（総説）
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
 - 801272158（総説）
小西隆文, 杉本亜砂子, in vivo イメージングのためのプロローブ: 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