

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18700296
 研究課題名 (和文) 変異体スクリーニングのためのシロイヌナズナ野生型 3 次元標準形状モデルの作成
 研究課題名 (英文) Constructing morphological template models of Arabidopsis thaliana for computational mutant screening

研究代表者
 神沼 英里 (KAMINUMA ELI)
 独立行政法人理化学研究所・生命情報基盤研究部門・研究員
 研究者番号：90314559

研究成果の概要：

モデル植物であるシロイヌナズナを3次元形状計測し、コンピュータ上で3次元形状モデルを再構築し、形状モデルベースで表現型の解析や変異体スクリーニングを行う手法の確立を目的としている。マイクロX線CTを用いて野生型Columbia系統やトライコム変異体系統の個体形状3次元モデル化を行い、定量表現型解析の研究発表や論文投稿を行った。更に、シロイヌナズナの野生型3次元標準形状モデルを作成する第一歩として、まず2次元画像ベースで植物の葉と根の標準形状モデル化を行った。具体的には、植物の葉と根の形状をモデル化するための、ランドマークと呼ばれる標識点をベースとした標準形状テンプレートモデルを定義した。この形状テンプレートモデルを使って、変異体の空間的な遺伝子発現値を、画像解析技術を使って定量抽出する応用研究を行った。2次元画像ベースでルシフェラーゼ発光量から遺伝子発現値を計測する装置を使って、2次元時系列画像情報を収集した。また2次元画像ベースから3次元標準モデルに発現値を疑似カラーマッピングする方法を提案した。位置情報として、葉や根の2次元標準形状モデルを提案した。具体的にはphoton countingカメラシステムを使い、理研PSCで開発されたシロイヌナズナのLuciferase Tagging Lines を用いて2次元発光発現の時系列画像データを収集し、形状モデルをあてはめて構成点から発現値を定量化した。解析の結果、主根と側根との空間的な発現伝播方法が異なる事を示した。また、本葉と子葉とで生体バイオリズムの周期が異なる系統を発見し、バイオリズムが組織特異的であるという従来知見と一致することを示した。これら解析結果を、平成20年9月の植物学会のシンポジウムにて発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,000,000	0	1,000,000
19年度	1,100,000	0	1,100,000
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

モデル植物であるシロイヌナズナを 3 次元形状計測し、コンピュータ上で 3 次元形状モデルを再構築し、形状モデルベースで表現型の解析や変異体スクリーニングを行う手法の確立を目指している。変異体スクリーニング手法などを提案して来たが、実際のスクリーニングを行うときには、変異体の元系統である野生型の形質情報を基準値として知っておく必要がある。しかし現在のスクリーニングの現場では、人が目で見て葉が大きい小さいなどを判断しているため、形質の基準値そのものが存在しない。よって、野生型の形状モデル化を行い、変異体との差を識別するための基準とする必要がある。本研究では、標準形状モデリングのための、方法論の開発を目指す。

2. 研究の目的

個体形態を再構築したシロイヌナズナ 3 次元形状モデルでは、どこが葉や根かといった形状から組織部位の識別はできない。本研究では、組織部位毎に標準形状モデルの提案を目指す。特に、葉や根の標準形状モデルを提案することで、モデルを実際の画像に当てはめたパラメータ抽出ができるようにする。具体的には、植物の葉と根の形状をモデル化するための、ランドマークと呼ばれる標識点をベースとした標準形状テンプレートモデルを提案した。実験では、シロイヌナズナルシフェラーゼタグラインを利用して、モデルを当てはめて変異体の空間的な遺伝子発現値を、画像解析技術を使って定量抽出する定量解析を行った。

3. 研究の方法

レーザ 3 次元スキャナを用いてシロイヌナズナの個体形状を画像撮影し、コンピュータグラフィックス手法でデジタル空間中にシロイヌナズナの形状を復元して、その形状から定量形質を抽出し、野生型に対する変異体スクリーニングを行う「デジタルインシリコ・スクリーニング手法」を提案してきた (Reference 1)。レーザスキャナは、奥行き値を画素値として保持するレンジ画像を生成する。縦横値と奥行き値から、3 次元位置を生成する。隣接点を結ぶと表面が再構成できる。その後でコンピュータ中で形状の定量形質パラメータを決定するが、ポリゴン形状の復元精度に定量形質パラメータの精度は左右され

る。レーザ 3 次元スキャナでは、2 次元画像ベースで撮影が行われるために、形状の再現性が高くなかった。そのため次のステップとして、 μ X 線 CT を導入して 3 次元画像ベースで撮影することで、復元形状の精度向上を試みた (Reference 2)。CT による形状復元では、植物個体形状の 3 次元画像データ (ボリュームデータ) を作成し、**Marching cubes** アルゴリズムを使ってポリゴン表面形状データを生成する。レーザ法も CT 法も、ポリゴン形状が生成されるだけで、葉や根の部位を特定することが出来ない。あらかじめ部位形状モデルを定義しておいて、ポリゴンモデルに当てはめれば、葉や根の特定位置での形状値を議論することが出来る。本研究では、形状モデルを定義して、画像にあてはめて抽出する方法を検討する。応用例として、シロイヌナズナルシフェラーゼタグラインを利用して、提案する葉と根の提案形状モデルを当てはめて、遺伝子発現の定量解析を行った。全体の流れを下記の各 STEP にまとめる。

STEP-1, ルシフェラーゼタグラインの種収集と撮影個体の育成

タグラインの種子を収集し、種数が少ないラインを選択して、種の増やした。撮影に使う個体の育成を行った。

STEP-2, ルシフェラーゼタグラインの発光画像撮影 (1): 試験撮影による系統選抜

約 1000 系統のルシフェラーゼタグラインのうちで、植物個体全体が発光するラインを選抜する。具体的には、撮影前にルシフェリンをかけて数時間置いたサンプルを使って、複数系統を 1 画面に配置した画像を撮影した。発光画像の画面全体での光度を定量化するプログラムを作成することでスクリーニングを行い、高発光で個体全体が発光する系統を選抜した。

STEP-3, ルシフェラーゼタグラインの発光時系列画像の撮影 (2): 本撮影

15 分間隔で 3 日か 5 日連続で時系列画像を撮影した。

STEP-4, 葉と根の形状モデルの定義

葉と根を構成するランドマーク点を定義することで、葉形状と根形状のモデル化を試みた。

STEP-5, モデル当てはめによる解析

定義した形状モデルを、発光画像に当てはめる。手作業および MATLAB 画像処理ツールボックスを用いて、半自動化プログラムを開発してモデルを当てはめた。また、当てはめたモデルのランドマーク点

について、発光値を抽出して時系列による部位変化解析を行った。また部位毎の周波数解析を行った。

4. 研究成果

理研Plant Science Centerの植物ゲノム機能研究チームで開発された、シロイヌナズナの Luciferase Tagging Lines (LucTagライン) を使って、植物の遺伝子発現情報と位置情報の定量抽出実験を試みた。具体的にはVIMカメラを装備したPhotonCounting画像計測システム (Hamamatsu Photonics K.K., ARGUS-50) を使

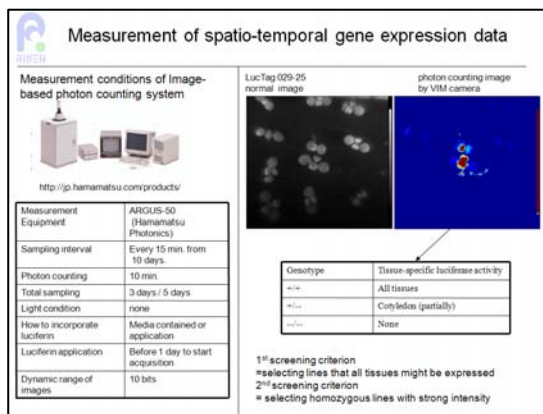


図1：計測装置と撮影画像例

い、2次元発光発現の時系列画像データを収集した。図1の左側が撮影装置である。右側の左図は通常のCCDカメラによる明視野画像、右側がVIMカメラによる発光画像を画像処理フィルタにより処理したものである。中央の個体のみ発光していることがわかる。LucTagラインの数は1000系統を超える為に、既知の画像なしの時系列発光定量データを使って、計測日の10日目付近で高発現を示す系統をランキングした。上位系統で試験撮影をした所、シュート頂分裂組織、本葉と子葉での発現量差や、根冠分裂組織や側根形成部といった位置での発光を、デジタル画像として収集する事が出来た。

計測画像データの収集後、葉と根の形状テンプレートモデルを構築した。図2の左上図はLucTagラインの037-28系統、116-33系統での発光画像例である。疑似カラーマッピング法を使って、高発現だと赤色に、低発現だと青色に着色している。図2の左下図は、根の形状テンプレートモデルによる根のランドマーク点抽出の様子を示している。細線化画像処理手法による、半自動化処理で、主根と側根の位置での発現値を抽出することが出来る。一

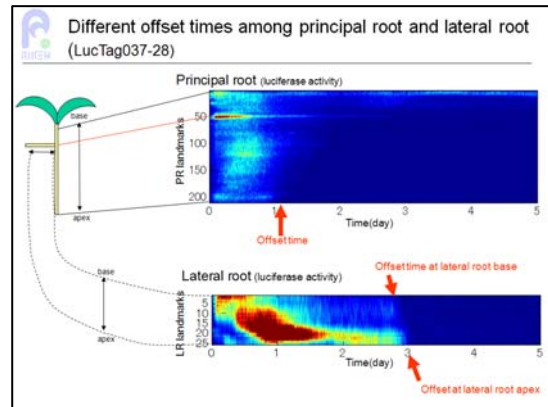


図2 葉と根の形状テンプレートモデル

方、図2の右側図では葉の形状テンプレートモデルの例を示している。葉主脈方向（長軸方向）に各9ランドマーク点を持つ5ラインの構成で、先端のランドマークを重複させている。計37点のランドマーク点で構成される葉形状のテンプレートモデルである。この葉テンプレートモデルを実際の発現画像に応用し、2次元発光画像の葉形状輪郭にフィットさせる。モデルフィットの方法は2段階のステップを踏む。最初に外側輪郭を手作業により抽出する。次に、葉モデルのランドマーク点を4つの葉モデル重心を利用したランドマーク構成ルールを設定して、ルールベースで自動計算する。

次に、時系列発光量グラフの生成を行う。葉や根の部位別に、時系列値を横軸にランドマーク位置を縦軸にした発光量グラフを生成した。図3は、LucTagライン037-28系統の、主根と側根のランドマーク点における5日分の時系列ルシフェラーゼ発光量グラフである。

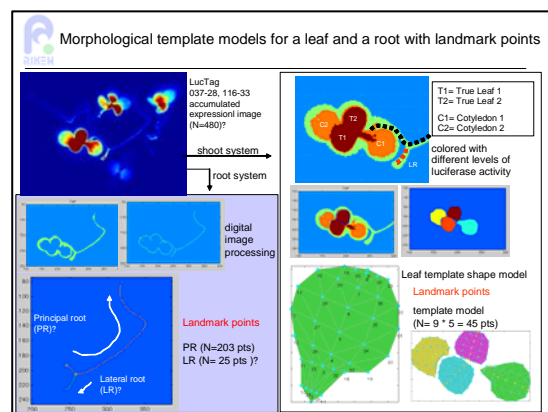
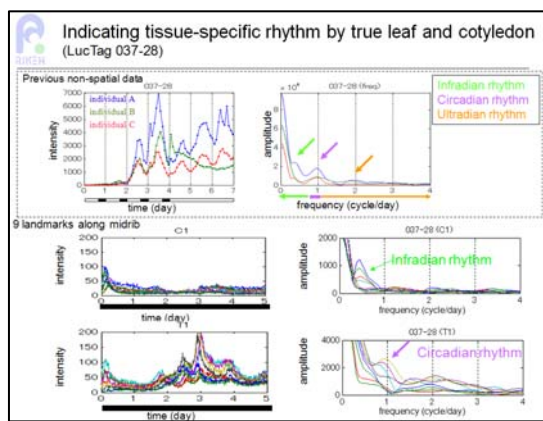


図3 主根と側根のランドマーク点における時系列ルシフェラーゼ発光量

発光量は疑似カラーにより色付けしている。発現量が時間の変化と共に、主根の先端から葉元へと発現量がしていく様子が伺える。

最後に、ランドマーク毎の時系列発現値を

用いて、部位毎の変動を解析する。まず、主根と側根のランドマークについては、ランドマーク間で、発現量相関値を計算した。葉の発現解析としては、第1葉と第2葉に相当する子葉と、第3葉以降の本葉との間で、ランドマーク間の相関値を計算した。また葉の先端と葉元の間での発現変動も調査した。子葉も本葉も、葉元の発現量が葉先の発現量に比べて有意に増加していた。次に、子葉と本葉のランドマーク毎に、周波数解析を行った。本葉は、1日周期で変動するサーカディアンリズムを示した(図4の中段右図)のに対して、子葉は2日周期のインフラディアンリズムを示した(図4の下段右図)。これは、生体リズムは組織特異であるという従来知見を支持する



結果だった。

図4 本葉と子葉の発現値の周波数解析

これらの解析結果をまとめて、2009年9月の植物学会シンポジウムで研究発表を行った。

Reference

- 1) Kaminuma, E., Heida, N., Tsumoto, Y., Yamamoto, N., Goto, N., Okamoto, N., Konagaya, A., Matsui, M., Toyoda, T., "Automatic quantification of morphological traits via three-dimensional measurement of *Arabidopsis*", *The Plant Journal*, Vol.38, pp.358-365, 2004.
- 2) 平成 16, 17 年度 科学研究費補助金 若手研究(B) 神沼英里「シロイヌナズナの葉面特異的分化器官の3次元形状計測と形質定量化」

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kaminuma E, Yoshizumi T, Wada T, Matsui M, Toyoda T., Quantitative analysis of heterogeneous

spatial distribution of *Arabidopsis* leaf trichomes using micro X-ray computed tomography, *The Plant Journal*, 56, 470—482, 2008. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

豊田哲郎, 神沼英里, シロイヌナズナのオミックス総合データベース, 第 50 回日本植物生理学会年会 シンポジウム, Mar. 2009.名古屋

神沼英里, 吉積 毅, 栗山 朋子, 越 智子, 武藤 周, 松井 南, 豊田哲郎 植物形状Template modelを用いたLucTagラインの時空間遺伝子発現定量解析, 第 72 回日本植物学会大会 シンポジウム「バイオイメージングと画像情報処理が拓くもの」, Sep. 2008.高知

神沼英里, 吉積 毅, 栗山 朋子, 越 智子, 武藤 周, 松井 南, 豊田哲郎 デジタルwhole mount in situ hybridizationに向けたシロイヌナズナLucTagラインの遺伝子発現時系列画像の定量化, 第 49 回日本植物生理学会年会, Mar. 2008.札幌

神沼英里, 吉積 毅, 栗山 朋子, 越 智子, 武藤 周, 松井 南, 豊田哲郎 シロイヌナズナLucTagラインを用いた遺伝子発現定量解析, 人工知能学会第 36 回分子生物情報研究会 (SIG-MBI), Jan. 2008.横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神沼 英里 (KAMINUMA ELI)
独立行政法人理化学研究所・生命情報基盤研究部門・研究員
研究者番号：90314559

(2) 連携研究者

豊田 哲郎 (TOYODA TETSURO)
独立行政法人理化学研究所・生命情報基盤研究部門・部門長
研究者番号：20342818

松井 南 (MATSUI MINAMI)
独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機能研究チーム・グループディレクター
研究者番号：80190396

吉積 毅 (YOSHIZUMI TAKESHI)
独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機

能研究チーム・研究員
研究者番号：80342872