

論文内容の要旨

論文題目 体系的 RNAi による線虫の胚性致死表現型プロファイリングとクラスター解析
Profiling and clustering analysis of embryonic RNAi phenotypes in *C.elegans*

氏名 丸山 理香

ゲノム上に存在する遺伝子が特定の生物の形を作り上げる仕組みを理解するためには、個々の遺伝子の解析に加えて、発生段階に関わるそれぞれの遺伝子がどのように協調して使われているのかを解析することが必要である。線虫ではゲノムプロジェクトが既に終了し、約 19,000 の遺伝子が予測されている。さらに、線虫では RNAi 法により遺伝子の機能を一時的に破壊する方法が確立されていて、RNAi による表現型から遺伝子が発生の中の過程に機能するのかが推測できる。また胚が透明であるため胚発生過程の異常をノマルスキー顕微鏡で詳細に観察できる。以上のことから胚発生における遺伝子の機能を網羅的に解析するには、線虫は良いモデル生物であると考えられる。本研究では体系的 RNAi による線虫の胚性致死表現型プロファイリング法の構築、その表現型プロファイルに基づいた遺伝子分類の方法の検討、およびその分類結果の解析を行った。

まず、データの質をなるべく維持しつつ大量に RNAi 解析を行うために、胚性致死表現型観察のための実験系を構築した。RNAi の表現型の浸透度が低い場合でも正確な表現型を観察するために、より多くの胚を観察することが必要である。そのために産卵異常の株に RNAi を行い、さらに経時的に胚発生過程を観察するのではなく、最終表現型のみを観察することにした。この系を用いて、当研究室の前田、南田らの実体顕微鏡での体系的 RNAi

解析により胚性致死の表現型が観察された 326 遺伝子について再度 RNAi を行い、ノマルスキー顕微鏡でより詳細な表現型を観察した。

ノマルスキー顕微鏡で観察した RNAi の最終表現型を体系的に記録するために、画像データに加えて、細胞数、発生段階、細胞の形態、各組織の分化状態に関するあらかじめ定義した観察項目の組み合わせで表現型を記録する方法を確立した。1 回の RNAi 実験で観察した胚の中で最も多くの胚が示した表現型 (Main phenotype) と 2 番目に多くの胚が示した表現型 (Second phenotype) をこの方式で記録し、胚性致死最終表現型プロファイルのデータベースを作成した (図 1)。このデータベースは、使用者が興味に応じて細かい表現型要素の組み合わせから遺伝子を検索できることが特徴である。またそれぞれの観察項目はチェックボックスあるいはプルダウンメニューで表記しているので、表現型データを 0 または 1 のバイナリーデータの組み合わせとして表すことができる。それによって、表現型の類似性を計算機を用いて客観的に比較し遺伝子の分類を行うことが可能になった。

表現型プロファイルによる遺伝子の分類法について検討した結果、具体的には以下のように行うこととした。まず、各遺伝子の示した RNAi 表現型を 130 次元のバイナリーデータに変換したのに対して主成分分析を行なった。階層的クラスタ解析の前に主成分分析を行うことによってデータの次元数を減らすことにより、バイナリーデータに対して直接階層的クラスタ解析を行うよりも、樹形図の解釈が容易になった。今回は 130 次元のデータを、一般的に元のデータの情報を良く反映していると考えられる基準である、累積寄与率が 80%以上という条件を満たす最小の次元数である 17 次元に集約した。そしてこの 17 次元のデータを使って、階層的クラスタ解析により樹形図を作成した (図 2)。クラスタ解析とは異質なものの混じり合っている対象を類似している順番にグループ化していく方法である。樹形図上の距離は主成分得点の類似度を示し、距離が近いほど表現型がより似ていることを表している。そしてこの樹形図に対して、実際の表現型を参照し便宜的に 10 個のクラスタを設定した。これらのクラスタは、各主成分の意味づけに基づいて意味を解釈することが可能であった。

また、樹形図上でのそれぞれの遺伝子の位置を検討したところ、同じ発生過程に働いている既知遺伝子が樹形図上で近傍に位置していた。例えばヒストンと SMC 複合体の遺伝子は染色体の構造を維持するために必要であることが知られているが、それらは核異常の表現型を示す遺伝子のグループであるクラスタ 3 内に位置していた。また *par-1*、*par-6* は初期胚の非対称分裂に必要であることが知られているが、どちらも細胞分化異常の表現型を示す遺伝子のグループであるクラスタ 6 内に位置していた。よって、この方法で同じ発生過程および生命現象に働いている遺伝子をグループ化することができることが示された。

本研究で確立した表現型プロファイル法によって、表現型の類似性を計算機を用いて客観的に比較し遺伝子の分類を行うことが可能になった。表現型プロファイルの類似度に基づく分類は、同じ発生過程で協調して働く遺伝子群の同定に有用であると考えられる。また、この表現型プロファイルとトランスクリプトーム解析やインタラクトーム解析を組み合わせることによって、協調して働く遺伝子群のさらに正確な同定が可能になると考えられる。

Second(Emb) RNAi experiments result

Gene information

predicted gene: ZK1058.2 WormPD
 yk clone: 154d7 WormBase
 genetic gene: pat-3

Embryonic phenotype

General info: Emb show summary
 penetrance: high
 variability: variable photo
 background: sem-4
 clade No.: 8
 Arrested cell number: >500 cell arrest
 Arrested morphological stage: 1-2 fold

Phenotype description

Egg shell shape	Differentiation
<input type="checkbox"/> small <input type="checkbox"/> abnormal <input type="checkbox"/> long <input type="checkbox"/> burst <input type="checkbox"/> round <input type="checkbox"/> variable	compaction <input type="checkbox"/> full gut gut granule <input type="checkbox"/> all <input type="checkbox"/> weak <input type="checkbox"/> multiple places gut cells <input type="checkbox"/> fewer gut cells (>500 cell) <input checked="" type="checkbox"/> intestinal differentiation
Cellular morphology cell <input type="checkbox"/> no polar body <input type="checkbox"/> 1 cell arrest <input type="checkbox"/> osmotic defect <input type="checkbox"/> cell size variable <input type="checkbox"/> cells without yolk <input type="checkbox"/> yolk granule appearance abnormal	hypodermis <input type="checkbox"/> rupture <input type="checkbox"/> lumpy <input type="checkbox"/> proportion abnormal region specific abnormality <input checked="" type="checkbox"/> protrusion head <input type="checkbox"/> others others <input type="checkbox"/> other irregular shape <input type="checkbox"/> floating cells
nuclei multi nuclei <input type="checkbox"/> in center / <input type="checkbox"/> dispersed <input type="checkbox"/> large nuclei <input type="checkbox"/> no nuclei <input type="checkbox"/> abnormal shape <input type="checkbox"/> shallow nuclei <input type="checkbox"/> clear nuclei <input type="checkbox"/> nuclei size variable	pharynx <input checked="" type="checkbox"/> basement membrane <input checked="" type="checkbox"/> differentiated (grinder etc.) <input type="checkbox"/> pharynx attachment abnormal <input type="checkbox"/> abnormal morphology
	muscle <input type="checkbox"/> twitch <input type="checkbox"/> weak (2fold-)
	others cell death <input checked="" type="checkbox"/> PCB necrosis <input type="checkbox"/> vacuole(necrosis)
	overall appearance <input type="checkbox"/> dehydrated <input type="checkbox"/> swollen <input type="checkbox"/> granule excess

図1 胚性致死最終表現型データベース (一部)

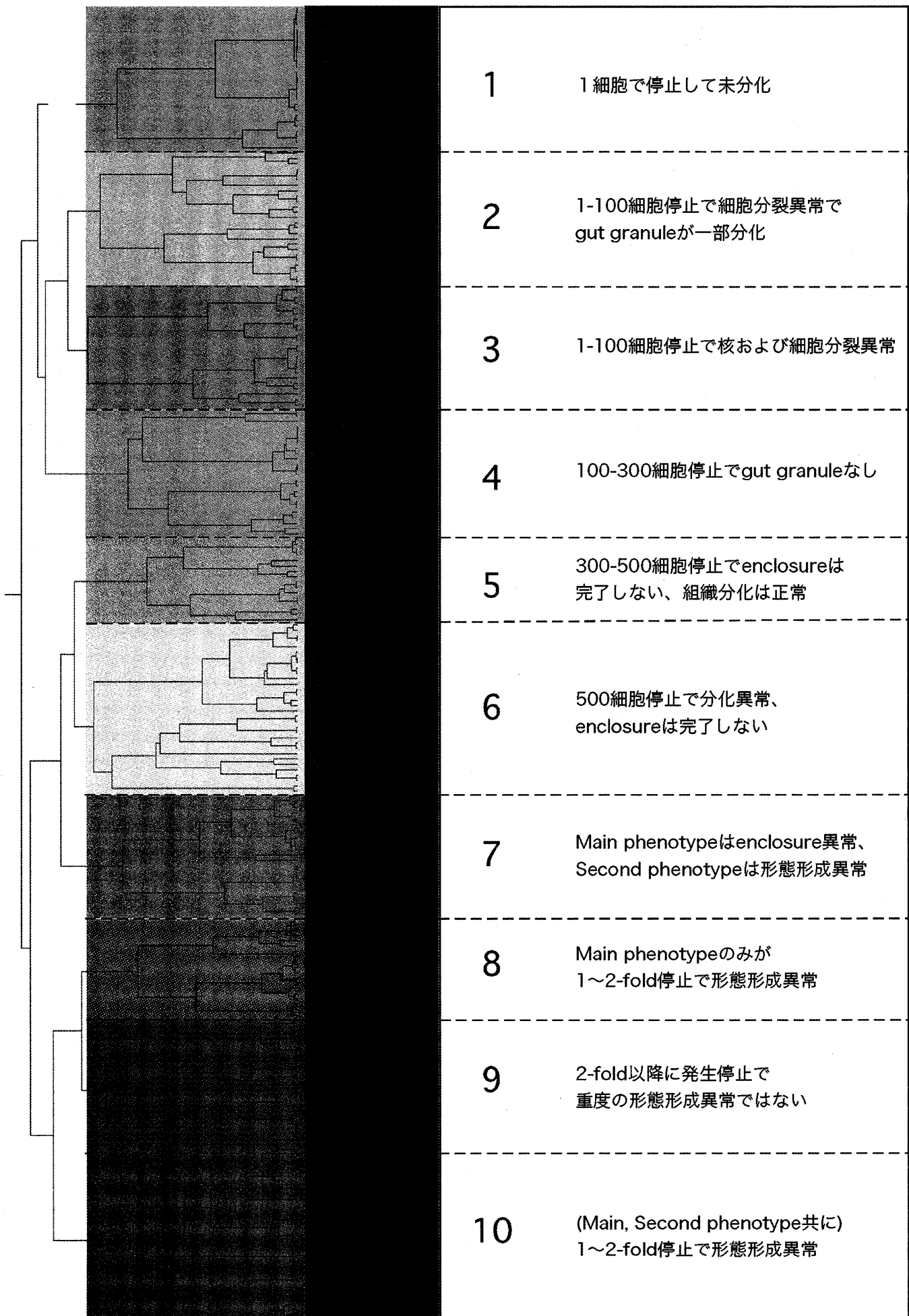


図2 表現型プロファイルの類似度による遺伝子の分類

Main phenotypeとSecond phenotypeを組み合わせた130次元のバイナリーデータに対して主成分分析を行い、得られた第17主成分までの主成分得点から階層的クラスター解析により樹形図を作成した。カラムは左から第1主成分得点から第17主成分得点を色を用いて定量的に示した。緑色が負方向、赤色が正方向の値を表す。