

令和 2 年 11 月 1 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018

受付番号 201860143

氏 名 反田直之

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： カーディフ （国名： 英 国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

栄養輸送と形態形成の相互制御の 3 次元数理モデルによる植物の栄養環境適応の統合解析3. 派遣期間： 平成・令和 31 年 2 月 28 日 ~ 令和 2 年 10 月 27 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： Cardiff University部局名： Systems and Predictive Approaches to Biology5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

派遣期間中の主な目的は、植物の根の形態と栄養輸送の相互作用を統合的に理解するため、数理モデルを用いた栄養輸送シミュレーションの手法を習得・確立することである。主にモデル植物であるシロイヌナズナにおいて、植物の必須栄養であるホウ素の吸収・輸送における根の形態と輸送体の空間分布の影響に着目しつつ、シミュレーションのプラットフォーム開発を行う。

派遣開始後、まず全体の研究遂行計画を受け入れ研究者の Maree 教授と相談し、滞在期間中の研究実施方針を決定した。最終的な目的である植物の根における 3 次元輸送シミュレーションの実現には、大規模なプログラムの実装が必要となる。これを着実に達成しつつ、中間的な成果を得るという観点から、まずはこれまで共同研究を行ってきた 1 次元、2 次元の拡散モデルのシミュレーションプログラムの改善を進めて汎用的なパッケージ化を行い、それらの蓄積を元に 3 次元モデルへの発展を行うという方針を取ることにした。

コンピュータークラスター活用技術の習得

まず前提技術として、シミュレーションの実行に必要な大規模計算のハイスループット処理のためのコンピュータークラスターの活用方法を習得した。カーディフ大学の Bioscience 部門では専用のコンピュータークラスターが利用可能で、これを活用することで高い計算能力とメモリを要求するシミュレーションプログラムを効率的に実行することが可能になる。通常の個人用コンピュータ上での解析と異なり、クラスター上での解析ではサーバー上でシミュレーション環境を構築し、バッチ処理を記述した Job ファイルによってクラスター上のノードにタ

スクを割り当てる必要がある。まずカーディフ大学のクラスター構成、その基盤技術や利用方法を学ぶことで、計算の実行に必要なスキルを習得した。その後必要なライブラリのインストールやスクリプトの整備を行い、実際にシミュレーションを実行できる環境を構築した。

ローカル開発環境の整備

また開発段階での小規模シミュレーション用に、研究室内にワークステーションを立ち上げた。ハードウェア障害によって動作不良のあった 4 台のワークステーションを修繕し、Linux 環境を構築して必要なライブラリのインストールを行った。これによって Maree 教授が開発した 2 次元拡散シミュレーション用のパッケージがローカルコンピュータ上で実行可能になり、根におけるハウ素輸送シミュレーションプログラムの開発が可能になった。研究期間を通してローカルコンピュータで開発を行い、クラスターで実際の大規模シミュレーションを行っていくという体制が整った。

細胞構造モデルの作成

根の細胞間の栄養のやり取りを可視化し、形態と輸送の関係を明らかにするため、根の輪切り方向における 2 次元空間のシミュレーション手法の開発を行った。拡散計算の基盤となる部分はこれまでに開発してきたプログラムが利用可能だが、シミュレーションの空間的な骨格となる根の細胞構造に関する座標データの生成が必要である。これに関して、細胞膜を染色した根の物理切片の 2 次元の共焦点レーザー顕微鏡画像から、根の細胞構造を検出し、モデリングの基盤となる座標データへの変換をおこなう”細胞セグメンテーション”技術の最適化を行った。

これまで Maree 教授が開発してきた Cellular Potts Model をもとに細胞セグメンテーションを行うアルゴリズム、Segmentation Potts Model をもとに、シロイヌナズナの断面像の細胞セグメンテーションを行った。この手法は植物の葉やショウジョウバエの細胞構造のモデリングに用いられてきたが、今回はシロイヌナズナの根の切片像から個々の細胞を認識することを目的とし、パラメータの最適化を行った。結果として大部分の細胞を正しく認識し、分離することが可能になった。しかしながら、一部の細胞では複数の細胞が単一の細胞と認識されたり、あるいは単一の細胞が複数の細胞と認識されたりしてしまうという課題も残っている。原因は顕微鏡画像のシグナル値の不均一性と、根の細胞サイズの多様性によるものと考えている。今回画像解析に供した顕微鏡画像は寒天培地中で栽培した根をビブラトームで切断した 100-200 μm 厚の物理切片を FM4-64 染色し共焦点顕微鏡観察したもので、細胞膜の認識に用いる細胞膜シグナルの強度が低い細胞膜が低頻度で存在し、それが正常な認識の障害となっていることが明らかになった。この問題は細胞サイズを規定するパラメータの調整によって改善できることが明らかになったが、シロイヌナズナの根では内皮細胞と中心柱の細胞等、細胞サイズが大きく異なる組織が存在するため、最適化させる組織によってそれ以外の組織での識別制度が低下することが明らかになった。この点は顕微鏡画像の改善と、一部手動での訂正を加えることで対応する予定である。並行して画像解析ツール ImageJ のマクロによる細胞構造検出を試みた。顕微鏡画像に対してガウスフィルタの適用、Rolling ball 法による背景除去などの処理の後、二値化、スケルトン化処理を行うことで、前述した方法と同様に一部手動での訂正が必要ではあるものの、良好な結果が得られた(図 1)。

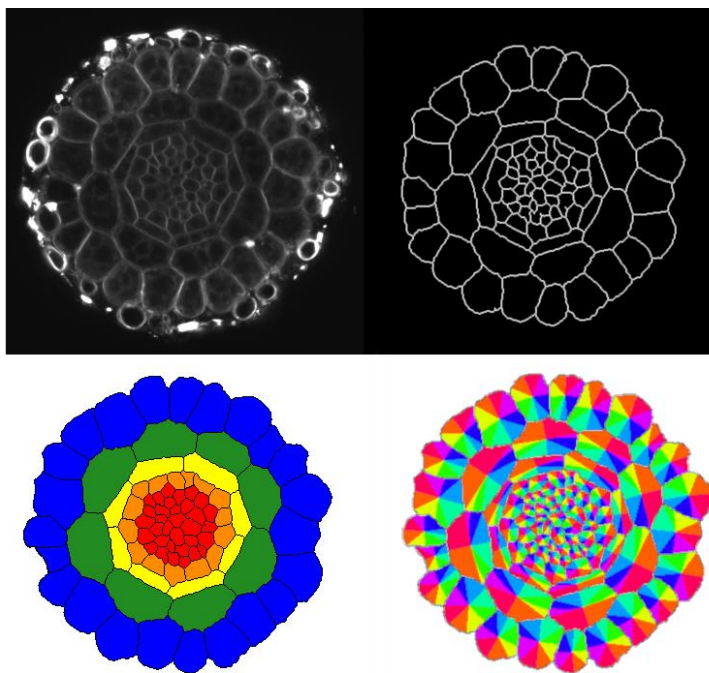


図 1. シロイヌナズナの根の顕微鏡画像を用いたシミュレーション骨格の作成

(左上) ビブラトーム切片を FM4-64 により細胞膜染色した共焦点顕微鏡画像 (右上) 画像の二値化、スケルトン化により抽出した細胞骨格 (左下) 各細胞への組織アイデンティティの付与。シミュレーションにおいて同じ組織に属する細胞に同じ特性を付与するため、組織との関連付けを行った。青：表皮 緑：皮層 黄：内皮 橙：内鞘 赤：維管束 (右下) 各細胞膜への極性の付与。異なる形状の細胞に対して、幾何学的に同意義の輸送体分布を規定するために、細胞領域を組織における相対的な位置関係をもとに 8 つの領域に分割した。同色の領域が他細胞において同等の相対的意味をもつ領域を表す。

根の細胞構造、幾何学的要素が栄養の輸送と分布にどのような影響を与えるかを評価するためには、野生型を模したモデルを用いたシミュレーションだけではなく、ある要素を変化させたときに、栄養の分布やスループットがどのように変化するかをシミュレーションによって評価する必要がある。そのためには、細胞の形状・大きさや数等を変化させた様々な細胞構造モデルが必要である。これを効率的に実現するため、幾何学的パラメータに基づいて根の輪切り構造の細胞モデルを作成するプログラムを作成した。プログラムは R パッケージとして作成し、ユーザーが自分の R 環境にライブラリとしてインストールすることで簡単に利用することができるようにした。パッケージは根のレイアウト作成関数と、2 次元輸送拡散シミュレーションに必要な空間情報等のファイル出力関数からなり、ユーザーは任意のパラメータを変化させて根の構造モデルを作成、出力することができる。これによって、様々な根の形態モデルを用いたシミュレーションが可能になり、根の形態が栄養

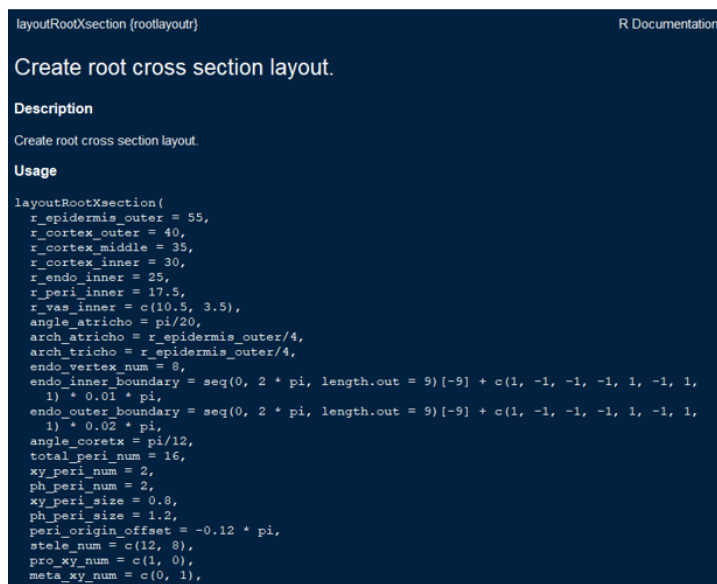


図 2. 開発した R パッケージ rootlayoutr による根のシミュレーション骨格の作成

(左) R パッケージの documentation. ユーザーは関数に各細胞種の大きさ、数、形状等のパラメータを与えることで、任意の細胞種の幾何学的パラメータを変化させた根の構造モデルを作製することができる(右)。同パッケージによって細胞モデルの画像だけでなく、その後の 2 次元輸送拡散シミュレーションに必要な空間構造ファイルを作成することができ、シミュレーションの入力として用いることができる。

輸送に与える影響を評価することが可能になった。

2次元拡散モデルへの輸送体制御の実装

根の中の物質輸送をシミュレーションするには、セグメンテーションして座標データ化した細胞の構造をもとに、離散的なグリッド間で物質の収支を計算する。そのうえで、細胞膜上の輸送体タンパク質による輸送制御の働きを考慮するが、この膜輸送体自体が細胞質内のホウ素濃度依存的に発現変化することが知られているため、これを計算上で考慮する必要がある。Maree教授によって開発が行われてきた C++言語によって記述されたプログラムを改変することによって、2次元拡散モデルの輸送活性項に、細胞質内のホウ素濃度依存的な輸送体活性の調節を微分方程式によって導入した。これによって、細胞膜上の輸送体タンパク質によるホウ素の輸送と、その結果生じる細胞内ホウ素濃度の変化が輸送体タンパク質の活性に与える影響の相互依存関係のシミュレーションが可能になった。プログラムが正常に機能しているかの動作確認のため、一列だけの細胞列のモデルを作成し、細胞質内のホウ素濃度が常に均一になるように拡散係数を高めたうえで輸送シミュレーションを行った。同等の細胞構造について、各細胞、細胞壁内のホウ素濃度、各細胞膜におけるホウ素輸送体活性を変数として微分方程式で記述した1次元モデルを作成し、各変数の時間変化を求めた。両者の結果を比較することで、2次元拡散モデル上で表現した輸送体の制御が意図通りに表現されていることを確認した。

2次元拡散モデルによる輸送シミュレーション

上述の項目にて作成した根の2次元モデルを用いて、ホウ素輸送体の分布からホウ素の吸収過程と定常状態の分布を推定するシミュレーションを行った。まず rootlayoutr パッケージを用いて作成した、野生型の根を模した細胞構造を用いてシミュレーションを行い、動作の確認を行った。種々のテストによって、プログラムが意図した挙動をしていることを確認した。これによって、根がホウ素を吸収する様子を、経時的、空間的に推定することが可能になった(図3)。

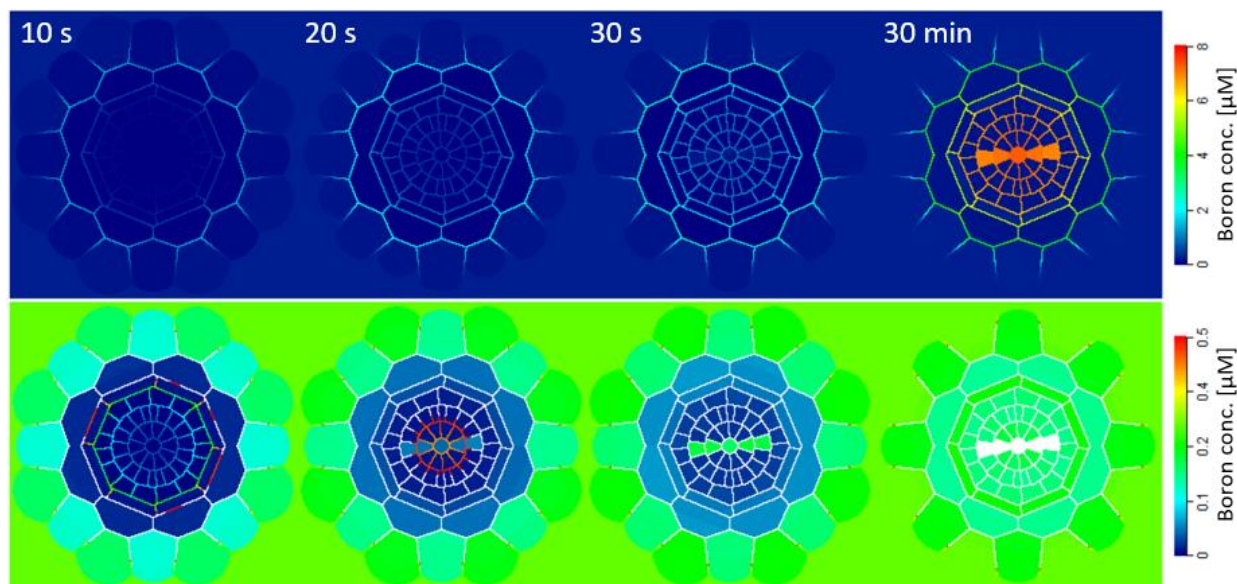


図3. rootlayoutrによって作成した細胞骨格を用いたホウ素の輸送シミュレーション

ホウ素濃度が0の仮定の根を0.3 μM のホウ素を含む培地に置いた場合のホウ素の吸収の様子をシミュレーションした。細胞層によって想定されるホウ素濃度が異なることがわかる。下の図は上の図と同じシミュレーション結果を、低濃度域の濃度差が見えるように異なるカラースケーリングで示したもの。

確立したプラットフォームを用いて、異なる幾何学的パラメータの根の構造モデルについて、輸送体の分布・特性を変化させた様々な場合においてシミュレーションを行い、各要素がホウ素の分布に与える影響を評価した。これらの結果に基づき、根組織の幾何学的特性が規定するホウ素の濃度分布の推定結果と、濃度分布パターンの形成においてホウ素輸送体が果たす役割

とその意義の考察をとりまとめ、日本土壌肥料学会 2020 年度岡山大会(オンライン開催)にて発表した。