

蝸牛管形態形成を司る多細胞動態の解明と
1 細胞レベルの細胞動態解析に向けた
多重スペクトルイメージング技術

石井 衛

目次

要旨	4
略語一覧	6
第一章	7
序論	8
生物にみられる螺旋構造モチーフ	8
蝸牛管の螺旋構造と聴覚機能の関連	8
蝸牛管の螺旋形成に関する遺伝子解析	9
FGF シグナル伝達	10
細胞集団運動と ERK 活性化伝搬	10
蝸牛管ライブイメージングにおける課題	11
材料と方法	13
実験	13
定量化と解析	14
結果	19
1. 蝸牛管の形態的特徴の定量化	19
2. 蝸牛管の形態形成における ERK 活性の可視化	23
3. ERK を介したメカノケミカルフィードバックが細胞運動と ERK 波を説明する	28
考察	31
蝸牛管螺旋形成における ERK 活性	31
ERK 活性化伝搬に関しての他組織と蝸牛管の比較	31
細胞集団運動時の細胞供給	31
蝸牛管形態形成における周辺組織の重要性	32
蝸牛管ライブイメージングの残された課題	32
蝸牛管研究における本研究の意義	32
著者役割	33
第二章	34
序論	35
多細胞動態の 1 細胞解析の課題	35
細胞標識における蛍光輝度の利用	35
Split 蛍光タンパク質	35
細胞を識別するクラスタリング手法	36

Caterpi:3 色の split 蛍光タンパク質の繰り返しを用いた細胞標識技術.....	37
材料と方法.....	38
プラスミド.....	38
プラスミド構築と安定発現細胞株作製.....	40
細胞培養と細胞クローンの作製.....	46
蛍光イメージング.....	46
蛍光スペクトル.....	47
フローサイトメトリー.....	48
タンパク質構造予測.....	48
蛍光輝度に基づいた角度データの算出.....	48
二成分ガウス混合モデルによる FP ₁₁ タグのスクリーニング.....	49
ガウス混合モデルを用いた細胞クラスタリング.....	49
統計.....	50
結果.....	51
1. Caterpi 法に適した split 蛍光タンパク質の選定.....	51
2. split CFP2 繰り返しを用いた輝度増幅と細胞識別.....	53
3. 構造予測モデルを用いた sfCherry3C 改良のアミノ酸変異の探索.....	57
4. mNG ₁₁ のペプチド配列の最適化.....	60
5. Caterpi 細胞標識法の FP ₁₁ タグのスクリーニング.....	63
6. Caterpi 法により 20 種の細胞種が 97%の精度で識別される.....	67
考察.....	71
Caterpi 細胞標識法のまとめ.....	71
既存の多重蛍光イメージングと Caterpi 法の比較.....	71
FP ₁₁ 繰り返しによる線形な蛍光輝度増幅に重要な要素.....	72
タンパク質計算モデリングを用いた split 蛍光タンパク質の改良.....	72
Caterpi 法の今後の可能性と課題.....	72
著者役割.....	73
謝辞.....	74
参考文献.....	75

要旨

本研究では、第一章で特徴的な螺旋構造を持つマウス蝸牛管の形態形成を担う多細胞動態の解明に取り組み、第二章で多細胞動態の 1 細胞レベルの解析を目的とした多重スペクトルイメージング技術の開発に取り組んだ。

聴覚機能を担う内耳には蝸牛管と呼ばれる螺旋状の器官が存在している。この蝸牛管の螺旋構造は聴覚機能に重要であることが示唆されており、その形作りのメカニズムの解明が望まれてきた。これまでに、マウスを用いた遺伝学的手法により、SHH や Wnt、FGF といった形態形成に重要なシグナル分子の同定が進められてきた。しかしながら、螺旋構造形成を担う実際の多細胞動態は不明のままであった。その原因は、蝸牛管を観察する際に用いる生体外培養法では蝸牛管の螺旋構造の形成過程を再現できなかったためである。そこで本研究では、蝸牛管の先端（頂回転）周囲の軟骨のみを剥がし、周辺組織を保ったまま顕微鏡観察することが可能な培養法を新たに確立した。また、*Fgf10* 欠損変異マウスでは蝸牛管が著しく短くなるという過去の研究報告を参考に、FGF シグナル伝達経路の下流の ERK/MAP キナーゼに注目し、FRET バイオセンサーを用いて細胞内の ERK 活性を可視化した。二光子顕微鏡を用いた観察の結果、蝸牛管の外側において先端(頂回転)から根元(基底回転)に向かって ERK 活性化が波のように細胞間を伝搬すること、また同時に、根元(基底回転)から先端(頂回転)に向かって振動波のように細胞が集団運動する様子を発見した。集団運動時の細胞のひずみと ERK 活性化の時系列関係を調べたところ、細胞が伸展した 24 分後に ERK が活性化し、さらにその 24 分後に細胞収縮による組織変形が起きている事を示し、細胞のひずみと ERK 活性が協調的に機能しているというメカノケミカルフィードバックモデルを提案した。このモデルを検証するために、ERK の上流キナーゼである MEK の阻害剤を用いて、ERK 活性を抑制した結果、細胞の運動速度が顕著に減少することを示した。また、数理モデルを構築し、ERK 活性と細胞のひずみが共役しているモデルの妥当性を示した。本研究で発見された蝸牛管外側における ERK を介した細胞集団運動は内側との偏差成長を生み出し螺旋構造を作り出す駆動力になる可能性を示した。本研究成果は、臓器の形作りの基盤的な概念になるだけでなく、蝸牛管の原基（オルガノイド）の成型や設計の基盤となることが期待され、生命科学のみならず再生医療分野への寄与も大きい。

蝸牛管を含む多細胞組織の 1 細胞レベルの細胞動態解析には、多重スペクトル蛍光標識技術が有効である。しかし、既存の蛍光標識は、複数の蛍光タンパク質の組み合わせを生成する上で、Cre/loxP や Flp/FRT を用いたランダムな組み換えや、トランスフェクション効率やゲノム挿入部位のランダム性を利用しており、どちらも確率的な過程に依存している。そのため、正確な細胞のラベル化と識別には制限が伴っていた。本研究では、split 蛍光タンパク質（split FP）を用いた色と強度の変調技術により、合理的に設計された蛍光パターンを生成することで、20 種類の細胞集団を高精度に識別する手法（Caterpi 法）を開

発した。具体的には、3 色の split FP を繰り返しつなぎ合わせ、その繰り返しパターンの違いから生み出される蛍光強度比の違いで細胞を色分けする。split FP の繰り返しによる高輝度化を達成するために、タンパク質構造予測を活用し split mNG3A の C 末端配列の最適化と split sfCherry3C の結合界面の最適化を行い、split mNG3A_{sp} と split sfCherry3C_{sp} をそれぞれ開発した。split CFP2 を加えた 3 種類の split FP の 11 番目の β ストランドを様々なパターンでつなぎ合わせた FP₁₁ タグライブラリーを作製し、その中から高精度で識別できる 20 種類のタグを選定した。これらのタグにより蛍光ラベルされた 20 種の細胞は 97% の精度で識別可能であることを実証した。また、HeLa 細胞だけでなく MDCK 細胞といった他の細胞株を用いても Caterpi 法では、理想的な 20 種の蛍光パターンを正確に生成できることも示した。Caterpi 法は、複雑な生物システムにおいて複数の細胞集団を正確に識別し追跡する必要のある研究において、有用な技術となりうることを示した。

略語一覽

CUBIC - Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Deoxyribonucleic Acid

EdU - 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine

ERK - Extracellular signal-Regulated Kinase

FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorting

FBS - Fetal Bovine Serum

FGF - Fibroblast Growth Factor

FGFR - Fibroblast Growth Factor Receptor

FP - Fluorescent Protein

FRET - Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer

GEF - Guanine nucleotide Exchange Factor

GMM - Gaussian Mixture Model

IRES - Internal Ribosome Entry Site

MAP - Mitogen-Activated Protein

MDCK - Madin-Darby Canine Kidney

MEK - MAPK/ERK Kinase

NLS - Nuclear Localization Signal

PBS - Phosphate Buffered Saline

PBST - Phosphate Buffered Saline with Triton X-100

PCP - Planar Cell Polarity

PFA - Paraformaldehyde

PIV - Particle Image Velocimetry

ROI - Region Of Interest

SHH - Sonic Hedgehog

SUMO - Small Ubiquitin-like Modifier

WD - Working Distance

第一章

蝸牛管形態形成を司る多細胞動態の解明

序論

生物にみられる螺旋構造モチーフ

自然界において螺旋構造は貝殻、角、植物など様々な生物や組織で見られる構造モチーフであるが (Thompson et al. 1942)、螺旋構造が一体どのように形成されるのかは不明な点が多い。螺旋構造は、組織または器官の外側の成長速度が内側の成長速度よりも速いという偏差成長により作られる。この一般原理は、螺旋状の貝殻や植物の屈曲で実験的に証明されている (Johnson et al., 2019; Raup & Michelson, 1965; Smyth, 2016; Wada et al., 2018)。偏差成長を生み出す多細胞動態は、器官や組織ごとに異なるため (Johnson et al., 2019; Saffer et al., 2017)、螺旋構造の形態形成を理解する上では、器官・組織固有のメカニズムを調べる必要があるとなる。哺乳類生物における代表的な螺旋状器官として、聴覚機能を担う蝸牛管が挙げられる。

蝸牛管の螺旋構造と聴覚機能の関連

蝸牛管は聴覚器官として機能する上皮管である。内耳の腹側に位置し、成体マウスでは 1.75 回転した螺旋構造を形成する (図 1)。蝸牛管は、螺旋構造の位置に応じた周波数応答性を持っている。根元（基底回転）では高周波音を、先端（頂回転）では低周波音を認識する。この周波数特異性の形成には、蝸牛管の螺旋構造という形態的特徴が重要であることが示されており (Manoussaki et al., 2008)、螺旋構造の形成機構の解明がこれまで望まれてきた。

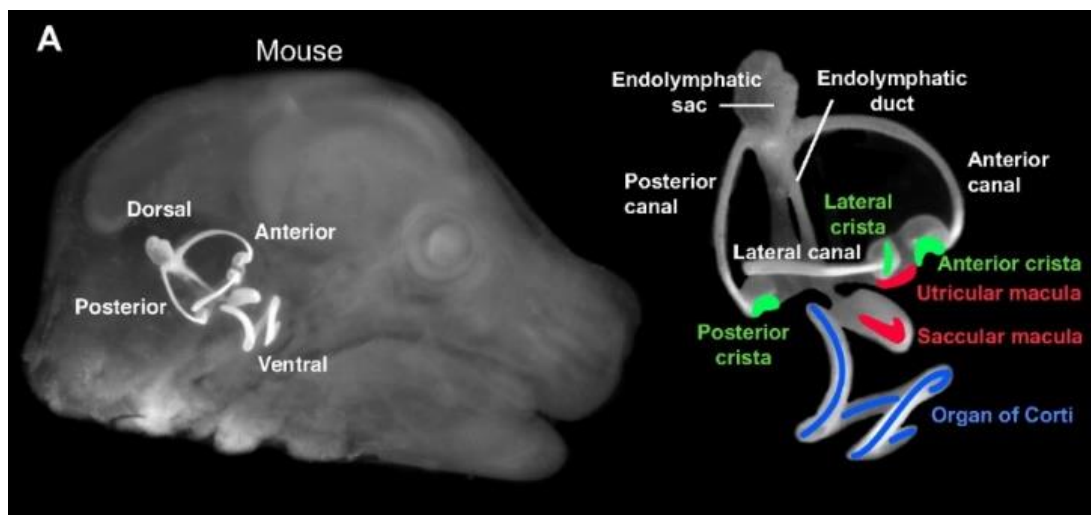


図 1. マウス内耳の形態的特徴 (Groves & Fekete, 2012 より)

マウス胎仔(胎生 15.5 日)の内耳を固定・透明化した標本に白色塗料を注入することで、内耳の液体腔を観察したもの。青色が蝸牛管を示す。

蝸牛管の螺旋形成に関する遺伝子解析

蝸牛管は胎生 12 日から 17 日の間に、内耳の腹側において螺旋状に成長する（図 2）。これまでの蝸牛管の螺旋構造形成に関する研究は、形態に表現型がみられるシグナル分子を遺伝学的な手法で同定することで進められてきた。具体的には、マウスを用いた遺伝子欠損により、蝸牛管中心軸から蝸牛管に投射する蝸牛神経節からの SHH シグナル(Bok et al., 2013; Z. Liu et al., 2010; Tateya et al., 2013)、感覚上皮前駆細胞からの Wnt シグナル(Mao et al., 2011; Montcouquiol & Kelley, 2020; Qian et al., 2007; Saburi et al., 2008; Wang et al., 2005)、そして上皮細胞からの FGF シグナル(Pauley et al., 2003; Pirvola et al., 2000; Urness et al., 2015, 2018)が蝸牛管の形態形成には特に重要であることが明らかにされている。これら全てのシグナル分子の欠損は蝸牛管が著しく短くなる表現型も持つが、そのメカニズムは異なる。

蝸牛神経節からの SHH シグナルは主に蝸牛管の根元（基底回転）から中間領域にかけての細胞増殖を誘導する事で成長を促進させている(Bok et al., 2013)。そのため、*Shh* ノックアウトマウスで蝸牛管が短くなるのは、細胞増殖が抑制された結果であると考えられる。一方で、Wnt-PCP シグナル伝達経路は胎生 14.5 日以降の蝸牛管の内側-外側方向で起きる感覚上皮前駆細胞の配置換えによる収斂伸長を制御している(Chen et al., 2002; Cohen et al., 2020; Driver et al., 2017; Yamamoto et al., 2009)。 *Wnt5a* ノックアウトマウスでも蝸牛管は短くなるが、これは細胞の配置換えに異常をきたし収斂伸長が抑制された結果と考えられる(Qian et al., 2007)。最後に、*Fgf10* 欠損変異マウスでも蝸牛管が著しく短くなるが、この変異マウスでは蝸牛管の細胞増殖に影響は見られない(Urness et al., 2015)。そのため、FGF シグナル伝達経路は細胞増殖とは異なる他の多細胞動態を制御し、その結果、管の伸長を調節していることが示唆される。しかし、その具体的なメカニズムは不明のままである。

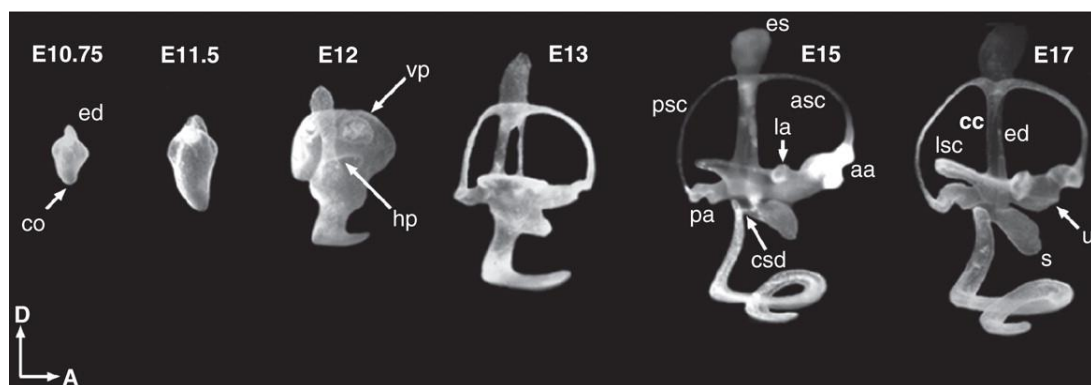


図 2. マウス内耳の発生（Wu & Kelley, 2012 より）

E10.75 から E17 までの胚発生段階における、白色塗料を注入した内耳液体腔の側面図。蝸牛管は三半規管の腹側で螺旋状に成長する。co: 蝸牛管。

FGF シグナル伝達

FGF シグナル伝達の主要な経路は MAP キナーゼ経路である(図 3)。FGF が受容体である FGFR に結合すると、受容体の二量体化が誘導される。この二量体化により、受容体の細胞内チロシンキナーゼドメインが相互にリン酸化される。リン酸化された受容体は、アダプタータンパク質を介して SOS などのグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)をリクルートする。SOS は低分子量 G タンパク質 Ras を活性化し、活性化された Ras は Raf の膜移行を促進する。続けて膜移行し活性化した Raf は、MEK をリン酸化し、最終的には MEK が ERK をリン酸化することでシグナルを下流へと伝達する。リン酸化し活性化した ERK はセリン/スレオニンキナーゼとして機能し、c-Myc などの転写因子をリン酸化することで、細胞の増殖、分化、運動などの重要な細胞機能を制御している。

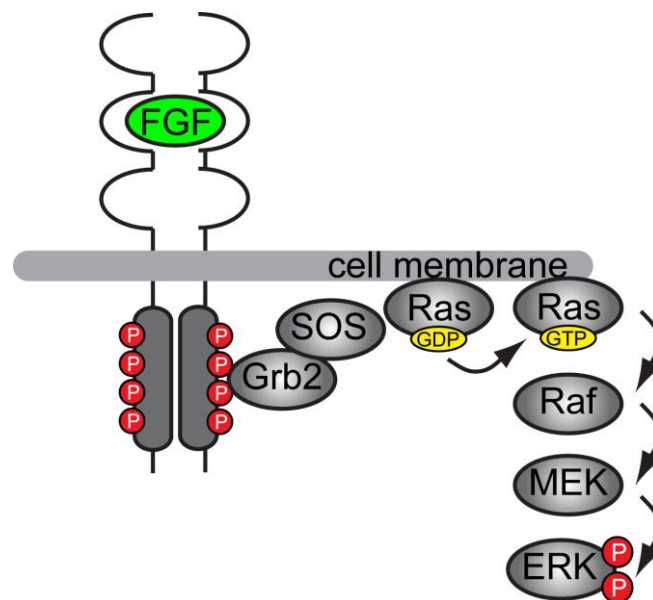


図 3. FGF シグナル伝達系の概要

細胞集団運動と ERK 活性化伝搬

近年では、細胞集団運動において ERK が極めて重要な役割を果たしていることがわかってきている。細胞集団運動の際には、ERK の活性化が運動とは逆向きに細胞間を波のように伝搬している。この現象は、2015 年に Hiratsuka らによって、マウスの耳の創傷治癒で初めて報告された(Hiratsuka et al., 2015)。そして、2021 年には Hino らによって、MDCK 細胞(イヌ腎臓由来の上皮細胞)を用いてそのメカニズムが明らかにされている(Boocock et al., 2021; Hino et al., 2020)(図 4)。この現象は、細胞変形と ERK 活性の協調的なメカニズムで説明されており、具体的には、細胞伸展により引き起こされた ERK の活性化が、自身の細胞収縮を誘導すると隣接細胞を引っ張ることで隣接細胞の伸展が促進され、最終的に隣接細胞

胞の ERK 活性化が誘導されるといった、メカノケミカルフィードバックモデルである。

蝸牛管における、*Fgf10* 欠損変異マウスで蝸牛管が短縮化した理由として、FGF シグナルを介する ERK 活性伝搬が阻害された結果、細胞集団運動が抑制され蝸牛管が短くなったという可能性が挙げられる。しかし、実際に蝸牛管の螺旋構造の形成過程をライブイメージングした例はなく、その詳細は不明である。

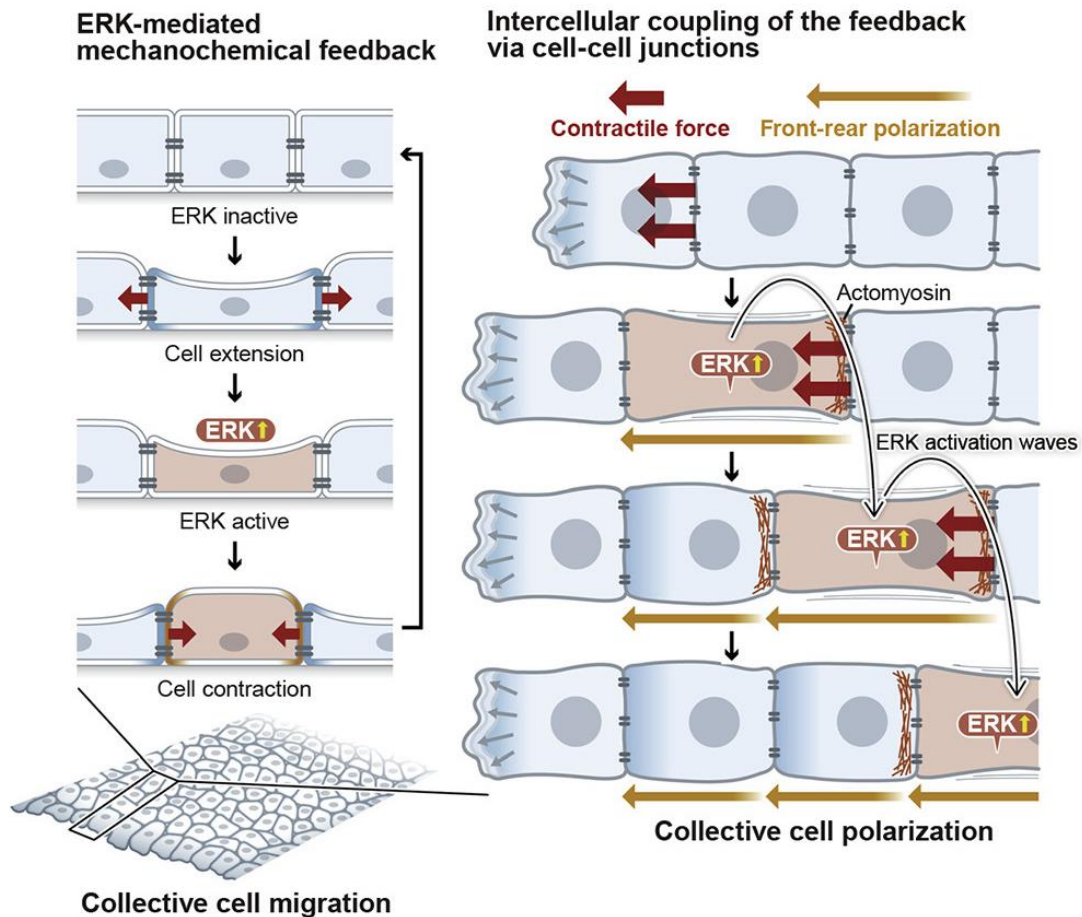


図 4. 細胞集団運動と ERK 活性の伝搬 (Hino et al., 2020 より)

細胞の伸展が ERK 活性化をもたらし、続いて ERK 活性化によって細胞の収縮が起こるというメカノケミカルフィードバックモデル

蝸牛管ライブイメージングにおける課題

蝸牛管は生体外培養条件下で観察可能であるが、これまでの培養方法では螺旋構造の形成過程を再現することができず、その多細胞動態は未解明のままであった。内耳をマトリゲルに包埋する生体外培養法では、蝸牛神経節や軟骨性耳包（軟骨組織）などの周辺組織が保持されるため、蝸牛管の成長が期待できる。しかし、高密度なコラーゲン構造を持つ軟骨組織では光が散乱してしまうため、内部に位置する蝸牛管の顕微鏡観察は極めて困難であ

る。そのため、従来は蝸牛管のみを単離してマトリゲルに包埋し観察する手法が用いられてきた。しかしながら、この方法では蝸牛管が十分に成長せず、螺旋構造の形成過程を捉えることはできなかった。

本研究では、蝸牛管の先端（頂回転）付近の軟骨組織のみを取り除き、周辺組織を保ったまま観察する新たな手法開発を行った。また、開発した生体外培養手法と二光子顕微鏡を用いた深部イメージングを組み合わせ、蝸牛管の螺旋構造形成過程を捉えることに取り組んだ。そして、フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）を用いた分子活性の定量化、および数理モデリングを組み合わせることで、蝸牛管が螺旋構造を作り上げる際の多細胞動態とその分子メカニズムを解明することに取り組んだ。

材料と方法

実験

マウス

FRET イメージングには、ERK バイオセンサー(hyBRET-ERK-NLS)を全身の細胞で発現させたトランスジェニックマウスを使用した(Harvey et al., 2008; Komatsu et al., 2011, 2018)。F-アクチンと核の同時イメージングのために、Lifeact-EGFP (Riedl et al., 2010)と R26-H2B-mCherry (Abe et al., 2011)を交配した。Lifeact - EGFP マウスは EMBL ハイデルベルクの Hiiragi 教授から、R26-H2B-mCherry マウスは RIKEN Large (CDB0204 K) からご提供いただいた。FRET イメージング以外のマウス使用には、清水実験材料(京都、日本)で購入した ICR マウスを使用した。プラグチェック前の深夜を胎生 0.0 日とした。全ての動物実験は動物実験倫理委員会(MedKyo 19090 and 20081)の承認を経て行い、京都大学の実験動物に関する規則に基づいて行った。

阻害剤

阻害実験には下記の阻害剤を使用した。

<u>阻害剤名</u>	<u>販売元と製品番号</u>
Blebbistatin	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #021-17041
Cyclopamine	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #038-19311
SU5402	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #197-16731
PD0325901	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #162-25291

抗体

免疫染色には下記の抗体を使用した。

<u>抗体名</u>	<u>販売元、製品番号、使用濃度</u>
anti-E-cadherin rat antibody	Thermo Fisher Scientific, #13-1900, 1:100 dilution
Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-rat IgG (H+L) antibody	Thermo Fisher Scientific, #A11081, 1:1000 dilution

組織免疫染色

蝸牛管を覆う軟骨の殻を脱殻した後、組織免疫染色と透明化を先行研究(Hirashima & Adachi, 2019)に従って行った。PBS で希釈した 4% PFA を用いて 4°C で固定処理を行った。続けて、0.1 % PBST (Triton X-100/PBS) で希釈した 10% normal goat serum (Abcam, #ab156046) で 3 時間インキュベーションしてブロッキングを行った。そして、一次抗体処理を 4°C で一晩行い、0.1% PBST で洗浄を行った。その後、Alexa Fluor546 を結合した二次抗体処理を 4°C で一晩行った。核染色には、DAPI (Dojindo Molecular Technologies, #D523-10, 1:200 希釈)を

用いた。サンプルを 10 μ L の 1% アガロースゲルで glass-based dish (Greiner Bio-One, #627871)に固定した。次に、CUBIC-R+(Tokyo Chemical Industry Co., #T3741)溶液にサンプルを浸して透明化を行った。画像は、40 倍の対物レンズ(NA = 1.3, WD = 240 μ m, HC PL APO CS2, Leica)、20 倍の対物レンズ(NA = 0.75, WD = 680 μ m, HC PL APO CS2, Leica)を用いて共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8、または 30 倍の対物レンズ(NA = 1.05, WD = 0.8 mm, UPLSAPO30XS, EVIDENT)を用いて共焦点顕微鏡 EVIDENT FluoView FV1000 で取得した。

EdU 染色

マウス胚に EdU を取り込ませるために、PBS で溶解させた EdU 200 μ L (5 mg/mL)を解剖 30 分前の妊娠マウスに腹腔内注射した。組織培養の場合は、固定の 30 分前に終濃度 10 μ M になるように EdU を培地に添加した。EdU の検出を行う前に E-cadherin の免疫染色と DAPI を用いた核染色を行った。EdU は、Click-iT EdU Imaging Kits (Thermo Fisher Scientific, #C10340)を使用して検出した。サンプルは CUBIC-R+で透明化処理を行った後に、共焦点顕微鏡で撮影を行った。

組織培養

内耳をマウス胎仔から解剖し、軟骨組織を脱殻せずに培養した。蝸牛管は、1 μ L growth factor reduced Matrigel (Corning, #356231)で 35-mm glass-based dish (Iwaki, #3910-035)に固定した。FluoroBrite DMEM Media (Thermo Fisher Scientific, #A1896701)に 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, #35050061)と 1% N2 Supplement with Transferrin (Holo) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #141-08941)を加え、2 mL の培地中に、5% CO₂、37°Cで培養した。

生体外培養条件でのライブイメージング

長時間の蝸牛管のライブイメージングを行うため、蝸牛管の先端部に隣接する軟骨性耳包(軟骨組織)を慎重にピンセットで切除した後に、三半規管を取り除いた。単離した蝸牛を組織培養の方法に従い、35-mm glass-based dish に静置した。顕微鏡観察には、25 倍の水浸レンズ (NA = 1.05, WD = 2 mm, XLPLN25XWMP2, Olympus) を備えたインキュベーター型の多光子蛍光顕微鏡 (LCV-MPE, EVIDENT) を使用した。CFP の励起波長は 840 nm に設定した (InSight DeepSee, Spectra-Physics)。FRET バイオセンサーの詳細な撮影条件は以下の通り：スキャンサイズ：800 $\times$ 800 ピクセル、スキャン速度：10 μ s/ピクセル、IR カットフィルター：RDM690 (EVIDENT)、ダイクロイックミラー：DM505 および DM570 (EVIDENT)、蛍光フィルター：CFP 用に BA460-500、FRET 検出用に BA520-560 (EVIDENT)。

定量化と解析

FRET 画像解析

3 $\times$ 3(ピクセル)のウィンドウのメディアンフィルターを用いてショットノイズを除去し

した後に、FRET チャンネルと CFP チャンネルそれぞれでバックグラウンドとなるシグナルを減算した。その後、CFP 強度に対する FRET 強度の比を自作の MATLAB (MathWorks) スクリプトで計算した。スケールバーでは、色が FRET/CFP 比を、輝度が FRET チャンネルの蛍光強度を表している。

蝸牛管の最外上皮層の曲率と厚さの測定

蝸牛管の最外に位置する上皮層の曲率と厚さの測定のために、まず共焦点顕微鏡で E-cadherin の免疫蛍光染色を行い、蝸牛管全体の z-stack 画像を取得した。次に、上-下軸の中央の水平断面の上皮細胞の頂端側と基底側を手動でトレースし、蝸牛管の先端点を手動で設定した。複数回の細線化画像処理を行い、上皮層の頂端側と基底側の中央線を得たのち、15 μm の一定間隔で離散点(x_i, y_i)を曲線に沿ってサンプリングした。最後に、3 次スプライン関数でこれらの離散点をフィッティングし、区間 $[x_i, x_{i+1}]$ における関数 S_i を以下のように定義した。

$$S_i(x) = a_i(x - x_i)^3 + b_i(x - x_i)^2 + c_i(x - x_i) + d_i$$

曲率 κ の定義 $\kappa(x) = S''(1 + S'^2)^{-3/2}$ に基づき、スプライン関数からの曲率は以下のように計算した。

$$\kappa(x) = \frac{6a(x - x_i) + 2b}{(1 + \{3a(x - x_i)^2 + 2b(x - x_i) + c\}^2)^{3/2}}$$

管腔に対しての凸/凹は、 κ においては正/負として割り当てた。そして、層の厚さは、上皮層の曲線に垂直な直線で、頂端側と基底側の間の長さとして定義した。

EdU 強度マッピング

まず、E-cadherin と EdU で染色した蝸牛管の z-スタック画像(8 ビット)を、上-下軸の中央点に対しての z 位置に基づいて上側と下側の 2 つの領域に分けた。z 軸方向に対して、最大蛍光強度を用いたプロジェクション画像を作成した。E-cadherin の免疫染色画像に Otsu 法を用いた二値化処理を行った後に、MATLAB の `bwperim` 関数を適用し蝸牛管の輪郭を自動検出した。蝸牛管の先端を手動で定義し、内側と外側のそれぞれで、頂回転の先端の点から基底回転に向かって輪郭を辿ることで、内側と外側の曲線を定義した。続いて、内側と外側のそれぞれの曲線で先端から一定の間隔で点を定め 20 分割した。内側と外側で対応する点を結び、その線をさらに 10 分割する事で、蝸牛管を小領域に分割した。最後に、各領域内で EdU シグナルの平均強度を測定し、255 で正規化した。

細胞集団運動と ERK 活性

蝸牛管で集団運動している細胞の速度場を計算するため、CFP チャネルの時系列画像に PIV を用いた画像処理を適用した。オスロ大学の Kristian Sveen 教授が配布しているフリーコード MatPIV (GNU public license software) を使用した。時刻 T での速度場は、T と T+ Δt 間の変位から計算した(Δt は撮影間隔の 12 分に設定)。解析領域は 40 ピクセル (約 25 μm 、4-5 細胞径に相当) の正方形に設定し、解析領域の重なりは 50%とした。得られた速度場のデータに対して、ノイズを除去するためにメディアンフィルタリングで平滑化処理を行った。その後、PIV 速度ベクトルの頂回転-基底回転方向の成分(蝸牛管伸長方向の速度)を求め、隣接する解析領域間で伸長方向成分の速度の空間微分を計算した。求めた値を MATLAB の 'smooth'関数を使用して高周波成分を除去し、伸長-収縮速度(extension-shrinkage rate)として定義した。

ERK 活性については、各解析領域内で Otsu 法を使用して CFP 画像に閾値を設定し、細胞質領域を抽出して、二値化した領域内で FRET/CFP 比の平均を計算した。ERK 活性速度(ERK activity rate)は ERK 活性の時間微分として計算した。相互相関解析は MATLAB の xcorr 関数を使用して実行した。

組織の曲率と ERK 活性

まず初めに、蝸牛管の外側の輪郭を手動でトレースした。そして、一辺が 20 ピクセル (約 13 μm) の正方形の解析領域を、トレースした蝸牛管の外側の縁に沿って設定した。解析領域から最も近い蝸牛管の外側の輪郭上の点を曲率計算の基準点に設定した。外側の輪郭線で基準点を中心に 19 μm の一定間隔で 4 点をサンプリングし、基準点での曲率を計算した (蝸牛管の最外上皮層の曲率と厚さの測定を参照)。ERK 活性については、上記 (細胞集団運動と ERK 活性を参照) と同様の方法で定量した。

統計解析

解析に用いた細胞数や、解析領域の数 (n) と独立した実験回数 (N) は、それぞれの図のレジェンドに記載した。以前の研究(Cohen et al., 2020; Driver et al., 2017; Tateya et al., 2019)に基づいて、最低 N=3 回の独立した実験を実施した。統計検定、サンプルサイズ、検定統計量、p 値も同様に図のレジェンドに記載した。p 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなし、以下の 4 つのカテゴリーに分類した。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 、n.s. (有意差なし、 $p\geq 0.05$)

ソフトウェア

画像処理には MATLAB (MathWorks)と ImageJ (National Institute of Health)を使用した。図や画像作成には MATLAB (MathWorks)、Imaris (Bitplane)、および ImageJ (National Institute of Health)を使用した。統計解析には MATLAB (MathWorks)を使用した。

数理モデル

以前の研究(Boocock et al., 2021; Hino et al., 2020)に基づいて、集団細胞運動を単純化し一次元のメカノケミカルカップリングモデルを構築した。このモデルでは、一次元の細胞同士の繋がりを、バネが連なった単純な系にモデル化した。N 個の細胞 ($j=1,...,N$) を弾性定数 k のバネの連なりとして表現し、境界を含む細胞同士の結合部を $i=1,...,N+1$ と位置付けた。すると、各細胞は前方向に向かって力 F で後方に対して収縮力を及ぼすので、 $j=N$ の細胞の収縮力 ($F_j=N$) は $i=N$ の結合点での力 ($F_i=N$) とみなすことができる。上皮細胞は隣り合う細胞と接着しており、粘性摩擦 η_c で弾性力が伝わるので、集団細胞のダイナミクスは以下の式で表される：

$$\begin{aligned}\eta_c \dot{x}_i &= k(\varepsilon_j - \varepsilon_{j+1}) + F_{j=i}, \\ \varepsilon_j &= (x_{i+1} - x_i)/L - 1, \quad \text{for } i=1,...,N \quad \text{and } j=1,...,N\end{aligned}\tag{1}$$

ε は細胞の歪み、 L は平均的な細胞の長さ ($5 \mu\text{m}$) を表している。一番先頭に位置する細胞の前端 ($i=N+1$) では、先端の伸展を反映させるために自己推進力 F_{tip} が加えられる。

ERK 活性と細胞伸展、収縮が共役するモデルでは、細胞運動と ERK 活性の関係は次の式で表す：

$$\eta_E \dot{E}_j = \tanh(\alpha \varepsilon_j) - E_j,\tag{2}$$

この式では、 α は細胞伸展(ε_j)に対して ERK がどれくらい敏感に応答するのかを示しており、 η_E はダイナミクスの時間スケールを示している。続けて、ERK 活性は収縮力へと変換され、次の式で ERK 活性と細胞収縮の関係が示される。

$$\eta_F \dot{F}_j = \lambda E_j^h - F_j,\tag{3}$$

λ は ERK 活性(E_j)がどの程度の細胞収縮を及ぼすのかを決めるパラメーターで、 η_F は ERK 活性後にどのくらいのタイムスケールで収縮力が働くのかを決めるパラメーターである。

一方で、ERK 活性と細胞伸展、収縮の非共役モデルでは、式(2)の代わりに ERK 活性は以下の進行波として表される：

$$E(X) = \left(\sin\left(\frac{\pi X}{w}\right) + vt\right) + 1 \times 0.5\tag{4}$$

w は ERK 活性化の波長の $1/2$ の値を示し、 v は ERK 活性の伝搬速度を示している。よって、

パラメーターは、図 11D から ERK 活性の波長が $168\ \mu\text{m}$ となるように $84\ \mu\text{m}$ に設定し、 v は図 11E から $0.42\ \mu\text{m}\ \text{min}^{-1}$ に設定した。

数値シミュレーション

常微分方程式は、時間ステップ 0.01 で MATLAB を使用してオイラー法により数値的に求めた。細胞数 N は 1000 に設定し、境界 $i=1$ は固定し、 $i=N+1$ は移動境界条件とした。生物学的に妥当なパラメーターは、本研究と以前の研究(Serra-Picamal et al., 2012)に基づいて以下のように設定した： $\eta_C = 40\ (\text{nN}\ \text{min}\ \mu\text{m}^{-1})$ 、 $k = 20\ (\text{nN})$ 、 $F_{\text{tip}} = 6\ (\text{nN})$ 、 $\alpha = 3$ 、 $\eta_E = 30\ (\text{min})$ 、 $\eta_F = 10\ (\text{min})$ 、 $\lambda = 9\ (\text{nN})$ 。

結果

1. 蝸牛管の形態的特徴の定量化

1-1. 蝸牛管の内側・外側の上皮層の曲率と厚みの定量化

本研究論文では、蝸牛管の発生を頂回転-基底回転(Apex-Base)、内側-外側(Medial-Lateral)、上側-下側(Roof-Floor)の3つの軸に沿って記述する(図5)。従来の蝸牛管の形態評価は、管が短くなるなどの定性的な議論に留まっていた。そこで、まず初めに蝸牛管の形態を定量的に評価する手法の確立に取り組んだ。本研究では、蝸牛管の螺旋状形態が形成される胎生12.5日から14.5日を観察対象とした(図2)。4% パラホルムアルデヒド(PFA)で固定したマウス胎仔から蝸牛管を摘出後、細胞の輪郭を観察するために上皮細胞マーカーE-cadherinの免疫染色を行った。透明化剤CUBICを用いて透明化処理を行った後に、共焦点顕微鏡で組織の3次元イメージングを行った(図6A)。胎生12.5日から14.5日にかけて蝸牛管は、管の幅はほぼ一定のまま、螺旋状に成長していくことが分かった。図6Aの黄色の破線で示される上皮層に注目すると、螺旋構造の内側の上皮層が外側の上皮層よりも厚い。そこで、蝸牛管の内側と外側の上皮層の非対称性を明らかにするために、上皮層の厚みと曲率を定量化した(図6B, C)。内側では、胎生12.5日から13.5日では先端(頂回転)から100 μm のところで曲率・厚みともにピークが見られ、内側の上皮は先端から100 μm 付近で上皮が厚くなり、大きく屈曲するという形態的特徴が定量化された。対照的に、外側の単層上皮は、厚み・曲率ともに頂回転から基底回転にかけてほぼ一定であった。F-アクチンを可視化するLifeAct-EGFPマウスと核を可視化するヒストンH2B-mCherryマウスを掛け合わせたマウス胎仔を用いて胎生13.5日の蝸牛管を細胞レベルで形態観察を行ったところ、蝸牛管の外側では単層上皮となっていたのに対して、内側は偽重層化し厚みのある上皮となっていた(図6D)。このような上皮組織の構造の違いが、内側と外側の上皮での10 μm 程度の厚みの違いを生み出していることが明らかになった。

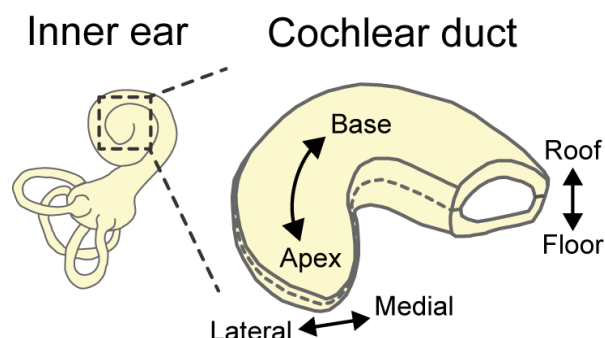


図5. 蝸牛管の構造模式図

内耳、蝸牛管の構造と軸を示した模式図

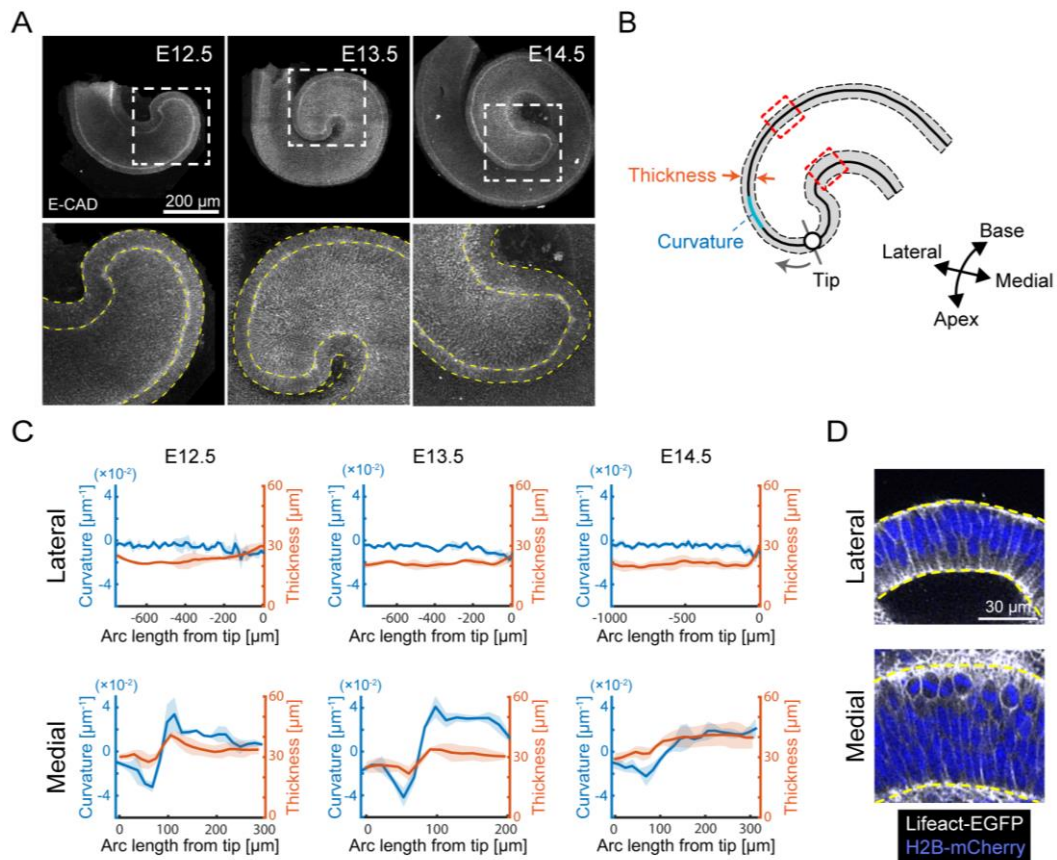


図 6. 蝸牛管発生における形態の定量化

- (A) 胎生 12.5 日から 14.5 日までのマウス蝸牛管における抗 E-cadherin 免疫染色の蛍光画像。下段は上段の点線の拡大画像。黄色の破線は、最外に位置する上皮層を示す。
- (B) 蝸牛管の曲率と厚みを定量化の概略図。
- (C) 胎生 12.5 日から 14.5 日までの蝸牛管の最外の上皮層の頂回転から基底回転の弧長に沿った曲率と厚みの平均±標準偏差を示す。N=3。
- (D) 胎生 13.5 日で F-アクチン (白) と ヒストン H2B (青) を標識した Lifeact-EGFP とヒストン H2B-mCherry の画像。パネル B の赤枠で囲った領域の外側と内側上皮層の細胞の形状と核の位置を示す。スケールバー、30 μm 。

1-2. 蝸牛管の分裂細胞分布の定量

続けて、細胞の形態形成に重要な細胞増殖の分布に関する定量化を、EdU 染色を用いて行った。受精後 12.5 日が経過した妊娠マウスに EdU を腹腔内注射し、30 分後にマウス胎仔を取り出し 4% PFA で固定した。摘出した蝸牛管を用いて EdU 染色を行い、S 期の細胞の分布を観察した (図 7A)。また、蝸牛管全体の形態を捉えるために、E-cadherin の免疫染色も同時に行った。透明化処理後に、共焦点顕微鏡を用いて蝸牛管組織全体の観察を行い、

上側と下側に分割しそれぞれ解析を行った。蝸牛管の位置と EdU 標識細胞の空間分布を定量的に評価する事を試みた。蝸牛管を小領域に分割し、各小領域で標識された EdU の平均蛍光強度を計測した（図 7B、C）。蝸牛管の下側（Floor）に注目すると、頂回転（Apex、矢印で挟んだ領域）方向では内側に分裂細胞が多く分布している。一方で、基底回転（Base、矢頭で挟んだ領域）方向を見ると、外側でも頻繁に細胞分裂が起こっている。続いて、上側（Roof）に注目すると、基底回転よりも頂回転で細胞分裂が起こっているが、内側と外側で顕著な差は観察されなかった。

もし、細胞分裂が蝸牛管の螺旋構造を生み出す主要因である場合、内側よりも外側で頻繁に細胞分裂が起こり、外側の体積増加に寄与するはずなので、細胞分裂が螺旋構造形成の直接的な駆動力ではないことが示唆される。そこで、下側(Floor)の基底回転で分裂した細胞が頂回転に向かって細胞集団運動する速度の外側と内側の差が、偏差成長を生み出しているのではないかという仮説を立てた。

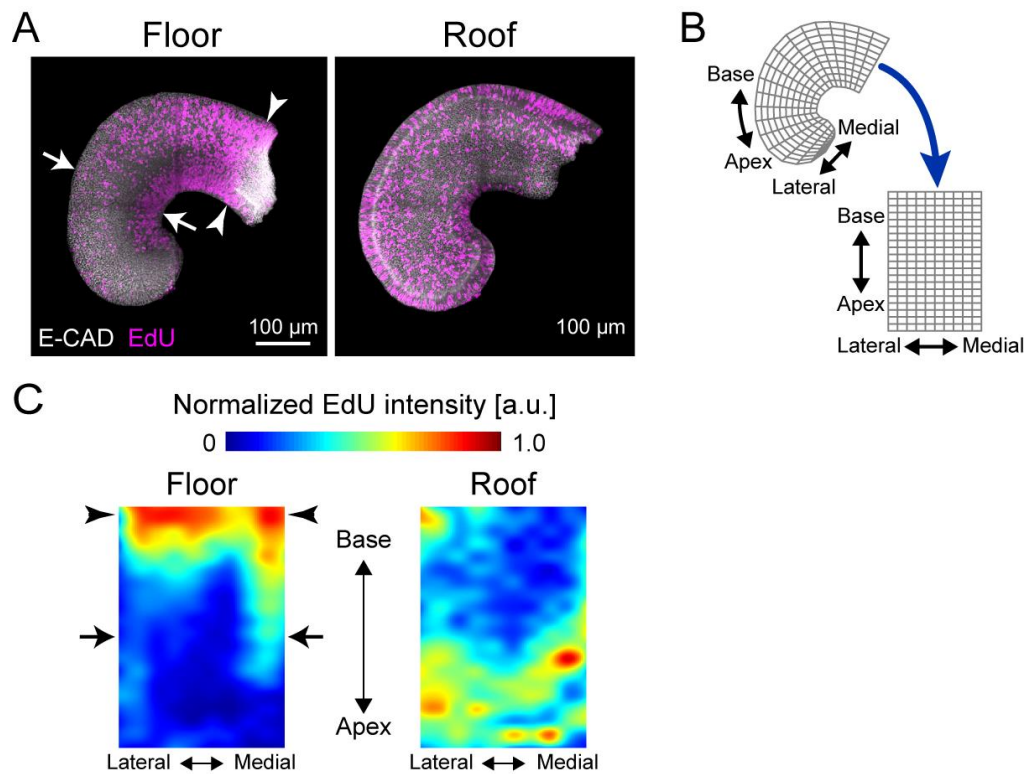


図 7. 蝸牛管発生における細胞増殖の定量化

- (A) 胎生 12.5 日における下側と上側の抗 E-cadherin 免疫染色(白)と EdU 染色(マゼンタ)の最大蛍光輝度を用いた z-プロジェクション画像。矢印は、内-外軸に沿った EdU の輝度に勾配が見られた領域を示す。矢頭は、EdU の蛍光強度の高い基底回転側の領域を示している。
- (B) 蝸牛管の小領域作製と、EdU の蛍光強度定量化の模式図。
- (C) 下側、上側における EdU 平均強度を示したヒートマップ。矢印と矢頭は、(A)と対応する。N=3 の平均を示している。

2. 蝸牛管の形態形成における ERK 活性の可視化

2-1. ERK 不活性化により蝸牛管が短くなる

蝸牛管の形態に表現型を持つ遺伝子変異として、FGF10 が知られている。Urness らは (Urness et al., 2015)、*Fgf10* 欠損マウスでは蝸牛管が著しく短くなるが、細胞増殖に変化は見られない事を報告しており、細胞増殖とは異なる他の細胞動態が管の伸長を調節していることが示唆されていた。そこで、FGF シグナル伝達経路の下流キナーゼであり細胞集団運動に重要な ERK に注目し、蝸牛管形態形成における FGFR-ERK シグナル伝達の影響を調べることにした。

まず初めに、阻害剤を用いて FGF シグナル伝達経路を阻害した際に、実際に蝸牛管が短くなるのかどうかを生体外培養条件下で調べることにした。胎生 12.5 日のマウス胎仔の内耳を取り出し、マトリゲルに包埋し ERK キナーゼ (MEK) 阻害剤である PD0325901 (Barrett et al., 2008)、または FGFR 阻害剤である SU5402 (Sun et al., 1999) を添加し、2 日間組織培養した。最後の 30 分間で、培地に EdU を添加し、細胞増殖に関しても同時に観察を行った。内耳を 4%PFA で固定化した後、蝸牛管を摘出し EdU 染色と DAPI を用いた核染色を行った。観察の結果、MEK 阻害剤、FGFR 阻害剤を添加したところ、蝸牛管全体の EdU シグナルが減少し (図 8A-A''), 蝸牛管の頂回転から基底回転に位置する球形嚢までの外側の弧長も、MEK 阻害剤でコントロール (DMSO 添加) の 70%、FGFR 阻害剤でコントロールの 50% の長さになり、有意に短縮化した (図 8B)。FGFR-ERK シグナル伝達系の阻害が細胞増殖を抑制するという結果は、*Fgf10* 欠損変異マウスの報告とは異なるが、これは *Fgf10* 欠損変異マウスにおいては FGF の他のリガンドが代償的に働いていた可能性が考えられる。

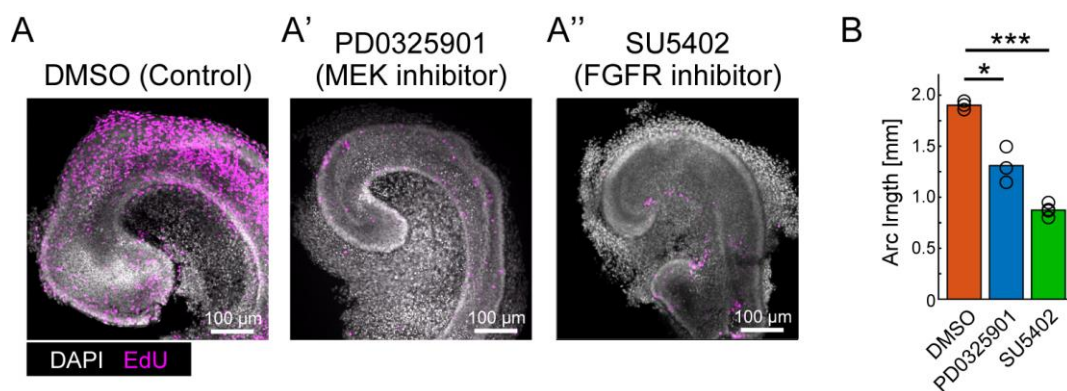


図 8. FGFR-ERK シグナル伝達阻害により、蝸牛管が短くなる

(A) 胎生 12.5 日から 2 日間生体外培養し、EdU (マゼンタ) と DAPI (白) で染色した蝸牛管の最大蛍光輝度を用いた z-プロジェクション画像。それぞれ、DMSO 処理 (A)、1 μ M PD0325901 処理 (A'), 30 μ M SU5402 処理 (A'') を示す。

(B) DMSO (赤)、PD0325901 (青)、SU5402 (緑) で処理した蝸牛管の弧長。N=3。2 標本 t 検定より、 $p = 0.023$ (DMSO-PD0325901)、 $p < 0.001$ (DMSO-SU5402)。

2-2. マウス胎仔蝸牛管の ERK 活性分布

蝸牛管における ERK 活性の空間分布を調べるために、細胞質型 FRET バイオセンサーをユビキタスに発現するレポーターマウス系統を使用し(Harvey et al., 2008; Komatsu et al., 2011, 2018)、ERK 活性を可視化した(図 9)。ERK 活性は下側(Floor)では内側に比べ外側で高く、上側(Roof)では基底回転側(Base)よりも頂回転側(Apex)で特に高いという非対称な分布が観察された。この結果は、すでに報告されている FGFR2 の発現分布とおおむね一致しており、ERK 活性が FGFR2 によって制御されることが示唆される(Urness et al., 2015)。

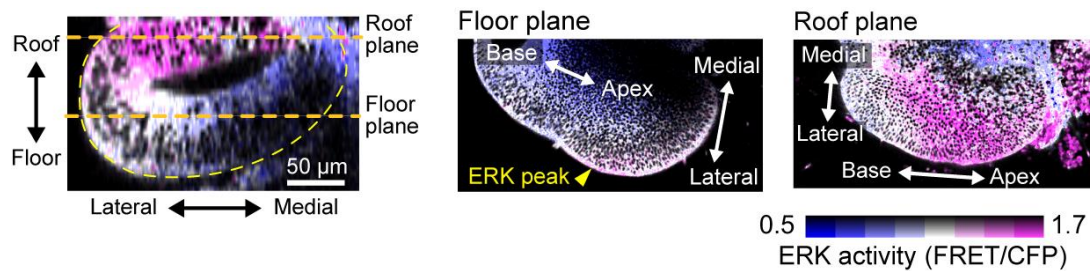


図 9. 蝸牛管の ERK 活性の 3 次元マップ

胎生 12.5 日から 1 日間生体外培養した後の蝸牛管の ERK 活性の 3 次元分布。

2-3. マウス胎仔蝸牛管における ERK 活性伝搬

次に、蝸牛管が螺旋構造を作り上げる際の多細胞動態をライブイメージングで詳細に解析することにした。予備実験において、蝸牛管のみを摘出しマトリゲルに包埋する従来の生体外培養法では、蝸牛管の螺旋構造形成を再現できないことがわかった。そこで、蝸牛管の頂回転付近の軟骨組織のみ取り除き、蝸牛管の蝸牛神経節や軟骨性耳包といった周辺組織を保ったまま観察する新規の生体外培養法を開発した(図 10)。この観察手法を用いて、胎生 12.5 日の胎児から取り出した内耳蝸牛管を約 18 時間、インキュベーター型二光子顕微鏡 LCV-MPE を用いて FRET イメージングを実施した。観察の結果、蝸牛管の外側においてマゼンタで示される ERK の活性化が頂回転(Apex)から基底回転(Base)に向かって細胞間を伝搬する現象を発見した(図 11A)。次に、粒子画像流速測定法(PIV)によって細胞の速度場を定量化し、下側では細胞が直径約 100 μm の集団で、基底回転から頂回転に向かって ERK 活性伝搬とは逆向きに振動波のように細胞集団運動することを発見した(図 11B)。蝸牛管の外側における頂回転-基底回転軸に沿った解析線上の ERK 活性を示すカイモグラフを作成し、ERK 活性が伝搬する際の速度を計算したところ、空間固定座標系で $0.42 \pm 0.078 \mu\text{m}/\text{min}$ であった(図 11C, D, E)。

Hino らや Boocock らの論文を参考に(Boocock et al., 2021; Hino et al., 2020)、細胞伸展と ERK 活性の関係を調べるために、ERK 活性率(ERK 活性の時間微分)と伸縮率(頂回転-基底回転に沿ったひずみ速度)をそれぞれ ERK 活性と PIV 速度から計算した。すると、ERK 活

性率と伸縮率の両方が、時間経過に伴い振動することが明らかとなった(図 11F)。さらに、相互相関解析により伸縮率が ERK 活性率よりも平均 24 分先行しており、細胞が伸縮した 24 分後に ERK が活性化していることが明らかになった。

続いて、阻害剤を用いて ERK 活性伝播を抑制した際に蝸牛管の細胞集団運動にどのような影響が見られるかを調べた。胎生 12.5 日の胎児の蝸牛管のイメージングの途中で MEK 阻害剤 (PD0325901) または FGFR 阻害剤 (SU5402) を添加し ERK 活性を抑制したところ、PIV 速度が大幅に低下した(図 11H)。定量の結果、中央値の値がそれぞれ 42%、48%減少することが分かった。これらの結果により、FGFR-ERK シグナル伝達が基底回転から頂回転方向の細胞集団運動に寄与していることが示された。

蝸牛管の外側の基底回転で分裂した細胞が、細胞集団運動における細胞の供給源になっているのかどうかを調べるために、細胞増殖を薬剤により阻害する実験を行った。蝸牛管の発生において中間から基底回転にかけた領域の細胞増殖に重要とされる SHH シグナルを SHH 阻害剤 (シクロパミン) を用いて阻害した。ERK の活性にはほとんど変化は見られなかったが(図 12A)、シクロパミン添加から 3 時間後には PIV 速度が 16%低下し、添加後 8 時間では、PIV 速度は 62%減少することが明らかになった(図 12B)。これは、Shh シグナル経路の長期間の阻害によって、細胞増殖が抑制された結果、基底回転から頂回転への細胞供給が不足し、細胞運動と ERK 活性伝搬が抑制された可能性が考えられる。

次に、三次元的な螺旋構造を生み出すメカニズムを調べるために、蝸牛管表面のレンダリング画像を用いて、三次元的な ERK 活性の伝搬を解析した。すると、ERK 活性のピークは三次元的には蝸牛管の外側を頂回転・上側 (Roof) から基底回転・下側 (Floor) へと螺旋状に伝搬していくことが分かった(図 13A)。また、螺旋状の ERK 活性伝搬に伴い、ERK 活性波とは反対方向の基底回転・下側から頂回転・上側への螺旋状に細胞集団運動する様子を観察することができた。これらの結果から、外側での ERK を介した螺旋状の細胞集団運動が、螺旋構造の形態形成を担っている仕組みであることが示唆された(図 13B)。

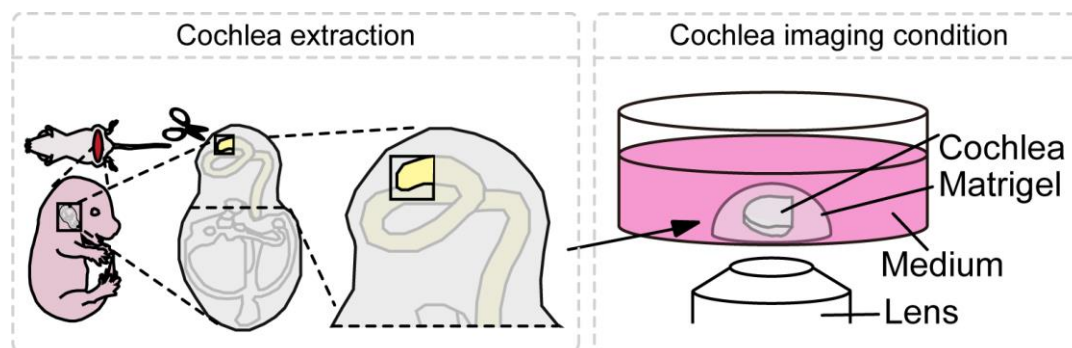


図 10. 蝸牛管の新規生体外培養法

蝸牛管付近の軟骨のみを取り除く新規生体外培養法。

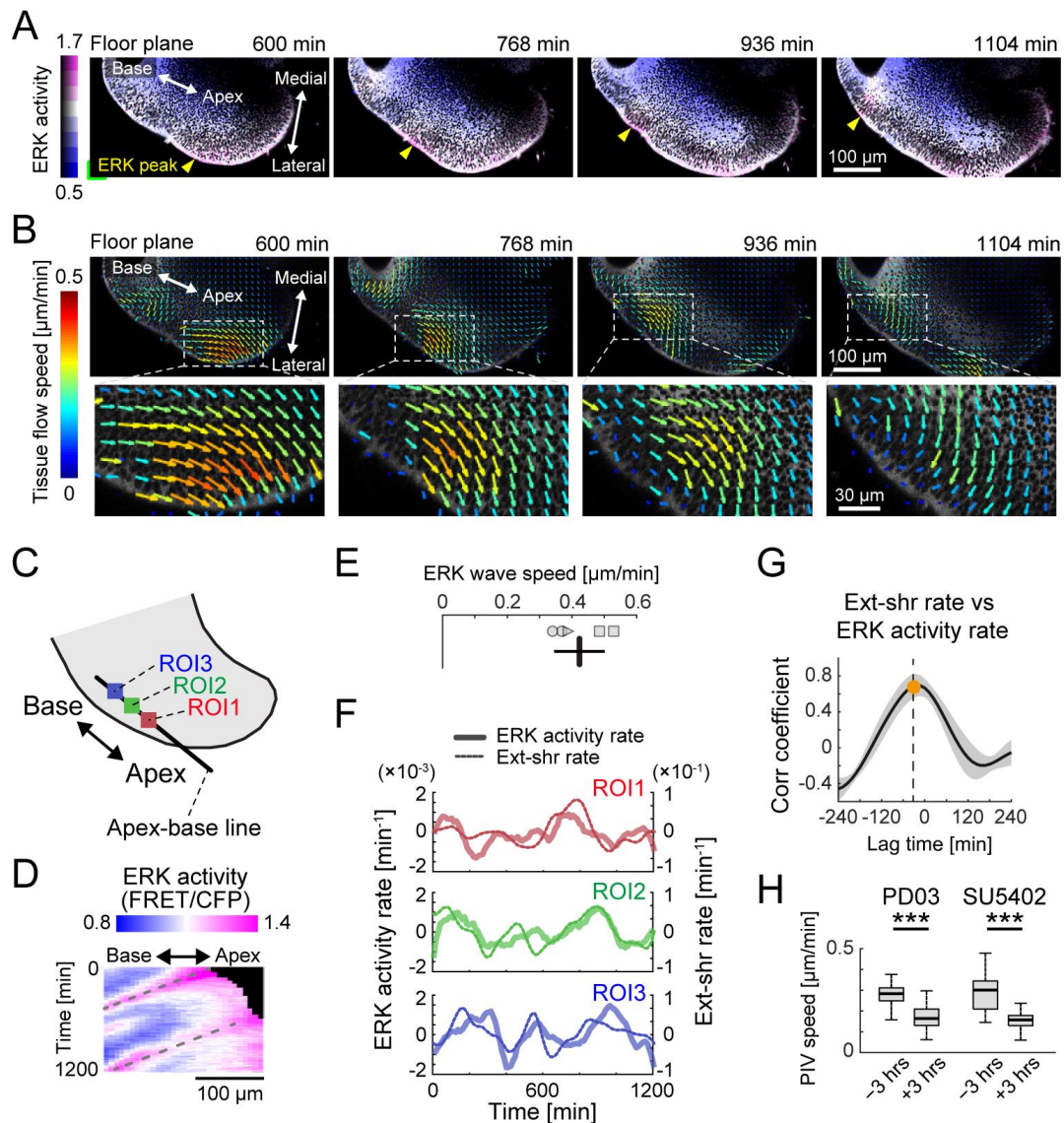


図 11. ERK 活性波は、細胞集団運動を促進する。

- (A) 下側における ERK 活性を示したスナップショット。時間は、ライブイメージング開始時からの経過時間を示している。黄色い矢印で ERK 活性のピークを示す。
- (B) 下側における PIV 速度を示したスナップショット。
- (C) カイモグラフ解析に用いた頂回転-基底回転に沿った解析線と、ROI の位置を示す概略図。
- (D) ERK 活性を示したカイモグラフ。横軸は(C)で示した頂回転-基底回転軸線の位置を示し、縦軸はライブイメージング開始後の経過時間を示す。
- (E) ERK 活性伝搬速度の平均 $\pm$ 標準偏差。3 サンプルから 5 つの波を解析に使用。
- (F) 代表的な 3 つの ROI における ERK 活性率と伸縮率の時系列データ。
- (G) ERK 活性率と伸縮率の相互相関解析の結果を平均 $\pm$ 標準偏差で示す。n=12。
- (H) 1 μM PD0325901、30 μM SU5402 処理前後の PIV 速度。n=285。N=3。2 標本 t 検定より、 $p < 0.001$

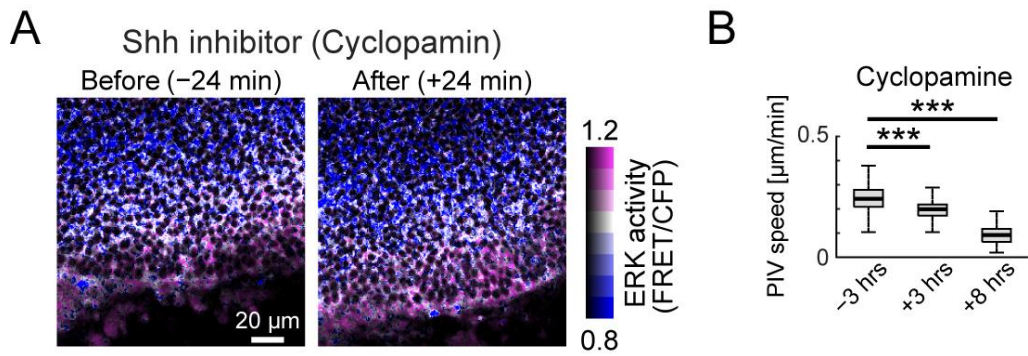


図 12. Shh 阻害剤による摂動

(A) 30 μ M シクロパミン処理前後の ERK 活性。スケールバー：20 μ m。

(B) 30 μ M シクロパミン処理前後の PIV 速度。

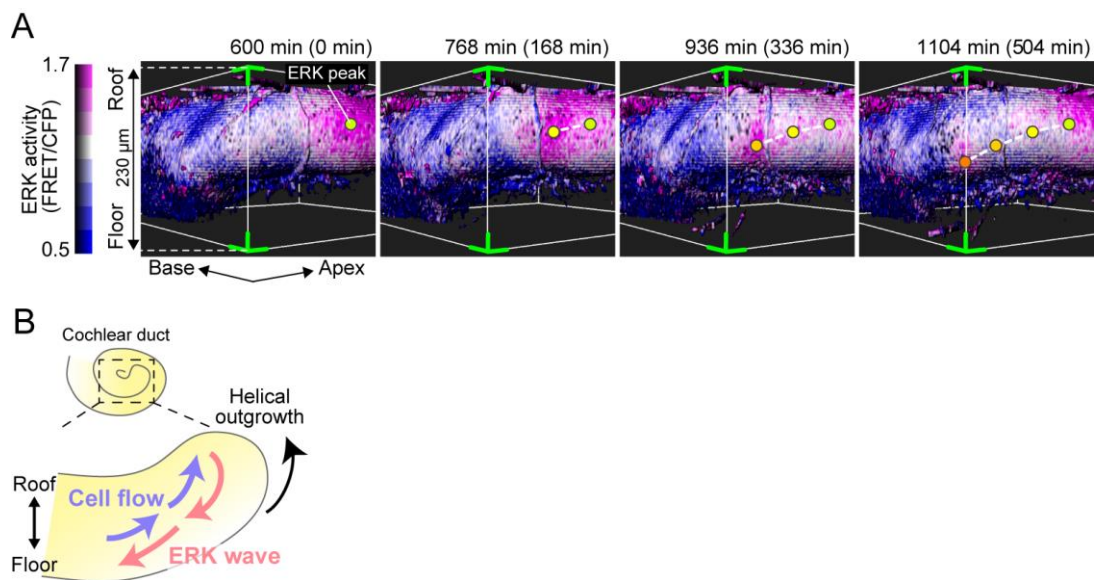


図 13. 蝸牛管の ERK 活性伝搬の 3 次元解析

(A) E12.5 蝸牛管における ERK 活性を示した表面レンダリングのスナップショット。丸印は ERK 活性のピークの遷移を示している。

(B) ERK 活性波と細胞運動を示した概略図。

3. ERK を介したメカノケミカルフィードバックが細胞運動と ERK 波を説明する

3-1. ERK 活性と組織収縮

相互相関解析(図 11G)と阻害剤添加実験(図 11H)から、ERK 活性と細胞集団運動には共役したメカニズムが存在することが示唆された。Hino らの研究により、細胞集団運動は細胞の伸展が ERK 活性化をもたらし、続いて ERK 活性化によって細胞の収縮が起こるといいう ERK 活性と細胞の形態変化が共役したメカノケミカルフィードバックで説明されている(Boocock et al., 2021; Hino et al., 2020)。これらの仮説の検証を進めるために、胎生 12.5 日の蝸牛管をミオシン阻害剤 (ブレビスタチン) 処理することで、アクトミオシンの収縮を抑制した。すると予想通り、ブレビスタチンの添加によって蝸牛管が弛緩する様子が観察され、PIV 速度の中央値が 79%減少したことから(図 14A)、細胞集団運動にはアクトミオシンを介する細胞収縮が必要であることが示された。

ERK 活性化後に細胞の収縮が誘導されるか調べるために、1 細胞レベルの形態変化を調べる必要があるが、シングルセル解析を行うには画像の解像度とシグナルノイズ比が不十分であった。そこで、細胞収縮の結果生じる蝸牛管組織レベルの変形に着目した。胎生 12.5 日の蝸牛管ライブイメージングでは、蝸牛管の外側で ERK が活性化した領域で凹状になっていることが観察された (図 14B)。ERK 活性と曲率を定量化したところ、両者において振動する様子が観察された (図 14C)。相互相関解析の結果、ERK 活性の変化から、平均 24 分遅れて曲率の変化が起こっていることが明らかとなった (図 14D)。

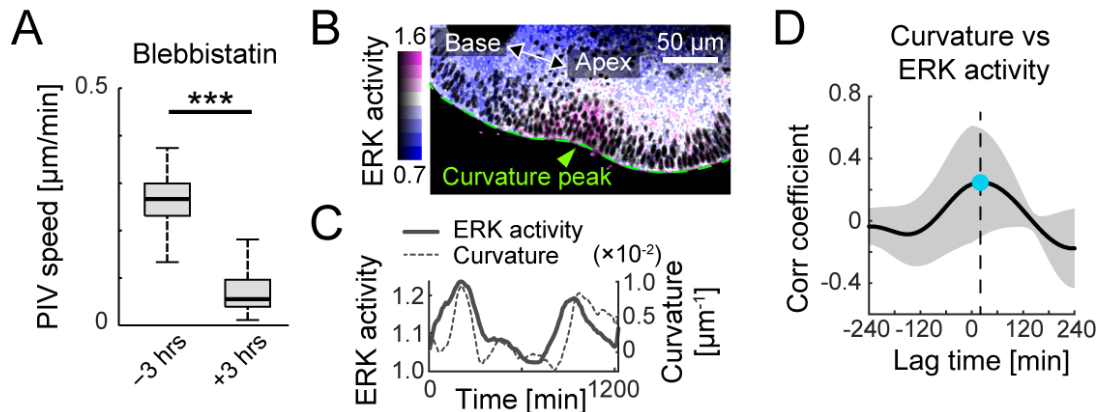


図 14. ERK 活性化と細胞収縮による蝸牛組織変形

- (A) ブレビスタチン処理の前(-3 時間)と後(+3 時間)の PIV 速度。n=258。2 標本 t 検定より、 $p < 0.001$ 。
- (B) 蝸牛管の外側の ERK 活性を示すスナップショット。緑の矢印は、ERK 活性のピークと外側の局所的な変形を示す。
- (C) 代表的な領域における ERK 活性と曲率の時間変化を示した図。
- (D) 外側における曲率と ERK 活性の間の相互相関解析。平均 $\pm$ 標準偏差。n=9。

3-2. ERK 活性伝搬と細胞集団運動の数理モデル

蝸牛管の外側の細胞集団運動では、細胞の伸展の 24 分後に ERK が活性し、さらにその 24 分後に蝸牛組織が収縮する事が明らかになった。この時間的な関係性から、ERK 活性と細胞変形が相互に制御し合うメカノケミカル共役モデルが提案された。この仮説を検証するため、細胞集団の振る舞いを一次元のバネ-質点系として単純化した数理モデルを構築した。具体的には、各細胞をバネで連結された要素として表現し、隣接する細胞間の相互作用を力学的な観点からモデル化した。

メカノケミカル共役モデルでは、ERK 活性と細胞変形が相互に制御し合う系を想定した (図 15A)。図 11D、11F と同様の方法を用いて ERK 活性化の細胞間伝搬を示すカイモグラフおよび細胞収縮率と ERK 活性率の振動を解析した (図 15B、C)。相互相関解析の結果、細胞伸展から ERK 活性化までに 28 分の遅れが生じることが示された (図 15D)。一方で、ERK 活性が一方的に細胞収縮を制御する非共役モデルでは (図 15E)、ERK 活性の細胞間伝搬と細胞収縮率と ERK 活性率の振動は再現されるが、細胞伸展から ERK 活性化までの遅れは約 2 分となる (図 15F-H)。実験で観察された 24 分という時間差は、メカノケミカル共役モデルが予測した 28 分に近い値であり、蝸牛管発生における ERK 活性と細胞変形の相互制御というメカノケミカル共役モデルの妥当性を支持している。

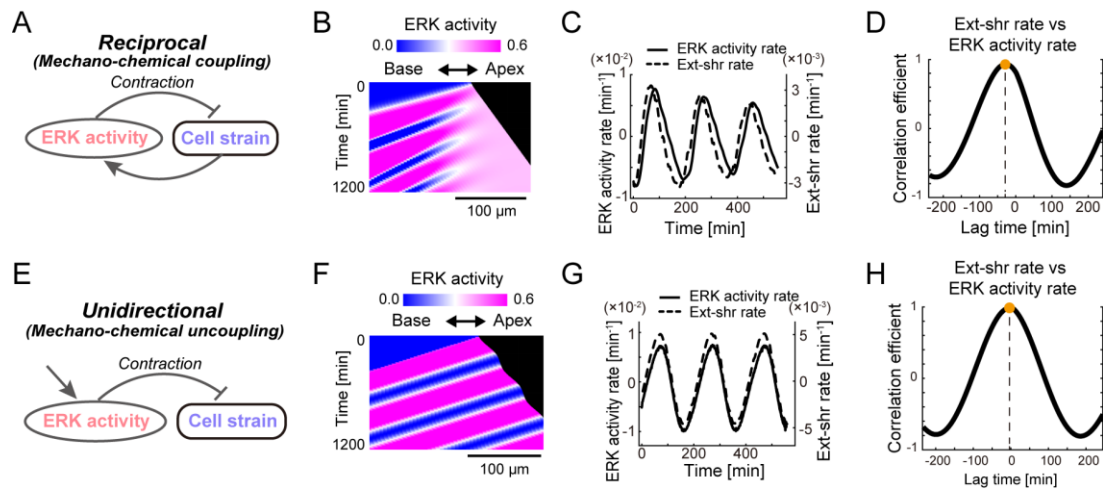


図 15. 数理モデルを用いたメカノケミカルフィードバックモデルの検証

- (A) ERK 活性と細胞進展が相互に制御される共役モデルの概略図。
- (B) 共役モデルを用いたシミュレーションにおける ERK 活性のカイモグラフ。
- (C) 共役モデルを用いてシミュレーションした ERK 活性率と伸長収縮率の時系列。
- (D) 共役モデルにおける ERK 活性率と伸長収縮率の相互相関解析の結果。時間差は-28 分。
- (E) ERK 活性が細胞収縮を一方的に制御する非共役モデルの概略図。
- (F) 非共役モデルを用いたシミュレーションにおける ERK 活性のカイモグラフ。
- (G) 非共役モデルを用いてシミュレーションした ERK 活性率と伸長収縮率の時系列
- (H) 非共役モデルにおける ERK 活性率と伸長収縮率の相互相関解析の結果。時間差は-2 分。

考察

蝸牛管螺旋形成における ERK 活性

これまでの遺伝学研究により、発生過程における蝸牛管伸長の分子基盤が明らかにされてきた。しかし、表現型として蝸牛管が著しく短くなってしまうので、実際に蝸牛管の屈曲をもたらしている多細胞動態は不明であった(Bok et al., 2013; Groves & Fekete, 2012; Urness et al., 2015, 2018)。そこで、新たな生体外培養手法と二光子顕微鏡を利用した組織深部観察法を組み合わせる事で、蝸牛管の発生過程を可視化した。その結果、発生過程における蝸牛管の外側で、基底回転から頂回転に向かって細胞集団運動が起きている事を発見し、また、細胞集団運動は逆向きの ERK 活性化の伝搬により制御される事を明らかにした(図 11A, B)。これらの、多細胞動態と ERK 活性の時空間動態は蝸牛管の屈曲をもたらす基盤的なメカニズム担っている可能性を示した。

ERK 活性化伝搬に関しての他組織と蝸牛管の比較

これまでに、ERK 活性伝搬は MDCK 細胞の集団運動(Aoki et al., 2017; Hino et al., 2020)、ショウジョウバエの気管プラコードの発生(Ogura et al., 2018)、そしてマウスの皮膚の創傷治癒(Hiratsuka et al., 2015)において報告されている。発生過程における蝸牛管の ERK 活性伝搬速度は $0.42 \mu\text{m}/\text{min}$ であるが(図 12E)、これは MDCK 細胞の集団遊走($2.5 \mu\text{m}/\text{min}$)およびマウス表皮の創傷治癒($1.4 \mu\text{m}/\text{min}$)よりも遅い(Aoki et al., 2017; Hino et al., 2020; Hiratsuka et al., 2015)。しかし、発生時の蝸牛管の細胞($4 \mu\text{m}$)、MDCK 細胞($20 \mu\text{m}$)、マウス表皮基底細胞($10 \mu\text{m}$)の細胞長で正規化すると、発生中の蝸牛管の ERK 伝搬速度は $6 \text{ cells}/\text{h}$ になりこれは、MDCK 細胞($7 \text{ cells}/\text{h}$)、マウス表皮基底細胞($8 \text{ cells}/\text{h}$)と近い値になる。従って、蝸牛管の細胞集団運動と ERK 活性伝搬の協調性に関する発見は、先行研究(Boocock et al., 2021; Hino et al., 2020)とともに、メカノケミカルフィードバックモデルとして組織形態形成における細胞集団運動の一般的なメカニズムである可能性がある。

細胞集団運動時の細胞供給

蝸牛管の外側では基底回転から頂回転に向かって細胞が集団運動しているが、PIV 解析により、基底回転から頂回転に向けた細胞運動の速度($0.24 \mu\text{m}/\text{min}$)は管の伸長速度($0.13 \mu\text{m}/\text{min}$)よりも速いという事が明らかとなった。従って、細胞集団運動が管の成長を説明するのに十分であることが示唆される。基底回転の外側で増殖した細胞が、外側で ERK を介した細胞集団運動により外側に組織伸長を促し、内側-外側の偏差成長を生み出すことで、蝸牛管の屈曲をもたらしていると推測される。

実際、*Shh* ノックアウトマウスでは、蝸牛管の基底回転で増殖する細胞数を減少させることで蝸牛管が短くなる。また、*Shh* 阻害剤であるシクロパミンの添加直後では、蝸牛管の PIV 速度に大きな減少は見られなかったが(図 13B)、8 時間経過後には PIV 速度は大幅に

減少した。これは、SHH シグナル経路の長期間の阻害によって基底回転から頂回転への細胞供給が抑制されたことにより、細胞運動と ERK 活性伝搬が抑制された可能性が考えられる。ただし、シクロパミンの添加直後でも僅かな PIV 速度の減少はあったことから、Shh シグナルが細胞運動の制御に関与している可能性も残される。SHH は、蝸牛管の中心軸に位置する蝸牛神経節から分泌されることがすでに報告されており(Bok et al., 2013)、蝸牛管と蝸牛神経節の相互作用をより詳細に調べるのが今後の重要な課題となる。

蝸牛管形態形成における周辺組織の重要性

本研究では、外側の細胞集団運動に着目したが、蝸牛管の形態形成には他にも様々な要因が関与していると考えられ、その一つが蝸牛管を覆う軟骨組織である軟骨性耳包である。軟骨性耳包は、蝸牛管と共に成長することで蝸牛管が成長するスペースを作る役割や、蝸牛管が伸長する上で外側の物理的な障壁となる役割を果たしている可能性が考えられる。実際に、軟骨組織を完全に取り除いた組織培養では蝸牛管の伸長と屈曲を再現することはできなかった。従って、蝸牛管上皮と軟骨間の相互作用は不可欠であり、解明する必要がある課題である。

蝸牛管ライブイメージングの残された課題

本研究では、細胞集団運動がミオシン活性によって制御され、その結果として蝸牛管の外側の局所的な変形が生み出されている事を示した(図 14)。つまり、蝸牛管の外側の各細胞は、自身で機械的な力を生み出し、能動的に運動している。蝸牛管の外側の細胞は偽重層ではなく単層上皮であることから(図 6D)、細胞は基底膜に接着し葉状仮足や細胞突起を用いて基底膜に力を加えていると考えられる(Driver et al., 2017)。しかし、本研究では、蝸牛管は組織深部に位置しており、今回使用した蛍光バイオセンサーを発現するマウスでは 1 細胞レベルの形態解析を行うのに必要な解像度とシグナルノイズ比を持つ画像を取得することはできていない。蝸牛管の 1 細胞レベルの細胞動態は、蛍光ラベル技術や、新たな顕微鏡技術の開発、そして組織培養法の改善によって解決できると期待される。

蝸牛管研究における本研究の意義

本研究では深部組織の 2 光子イメージングを駆使して、発生中の蝸牛管の伸長と屈曲を引き起こす多細胞動態を可視化した。この研究は、発生中の組織形態形成の理解や内耳オルガノイドを構築する上で、どのように左右非対称が生み出されているのかを理解する上で重要になる。また、本研究で確立したライブイメージング技術は、蝸牛管発生の形態形成や細胞運命決定などの更なる基礎研究の基盤的な技術となると期待される。

著者役割

メカノケミカルフィードバックモデルに関する数理モデリングはシンガポール国立大学メカノバイオロジー研究所の平島剛志博士に行なっていただいた。その他全ての実験と解析は筆者が行なった。

第二章

1 細胞レベルの細胞動態解析に向けた 多重スペクトルイメージング技術

序論

多細胞動態の 1 細胞解析の課題

第 1 章の蝸牛管ライブイメージングで残された大きな課題は、組織で 1 細胞レベルの細胞動態を捉えることの難しさである。多細胞組織における 1 細胞レベルの解析には、各細胞を異なる色で標識する多重スペクトル蛍光標識技術が有効となる(Livet et al., 2007)。しかし、厚みのある組織のイメージングに威力を発揮する多光子顕微鏡には励起波長の切り替えを高速にできないという制約があり、汎用されている多光子顕微鏡では、事実上、励起波長は二波長に限定されている。そのため、多数の蛍光タンパク質を同時に励起することは難しい。現状では、多重蛍光標識を用いたライブイメージングは、共焦顕微鏡やライトシート顕微鏡が用いられており、生体深部の一細胞レベルの細胞動態解析は困難を伴う。よって、励起波長の限られた制約の中で多くの細胞を標識可能な技術が求められている。

細胞標識における蛍光輝度の利用

蛍光スペクトルに加え輝度変化で細胞を識別することができれば、励起波長制約の中で多くの細胞を区別する技術開発の糸口になると考えられる。一般に蛍光輝度は蛍光タンパク質を直列に繰り返すことで増幅させることができる。しかし、複数の蛍光タンパク質を繰り返し繋げると、遺伝子サイズが大きくなってしまう問題が生じる。そこで、split 蛍光タンパク質が有効と考えた。

Split 蛍光タンパク質

split 蛍光タンパク質 (split FP)は、11 本の β ストランドから構成される β バレル型蛍光タンパク質 (FP)を複数の断片に分割したのちに再構成する手法であり、1-10 番目の β ストランド(FP₁₋₁₀)と 11 番目の β ストランド(FP₁₁)に分割したものが例示できる (Cabantous et al., 2005) (図 16)。それぞれの断片は蛍光を発することはないが、両断片が同時に存在する場合、自己会合し発色団を形成することで蛍光を発するようになる。そのため、FP₁₋₁₀ をあらかじめ細胞で発現させることで、FP₁₁ のタグ付けにより目的タンパク質の蛍光ラベルが可能になる(Cho et al., 2022; Leonetti et al., 2016)。更に、FP₁₋₁₀ が十分に存在する条件では、目的タンパク質に FP₁₁ を直列に繰り返した配列をタグ付けすることで、高輝度な蛍光ラベルが可能であることが知られる(図 17) (Goudeau et al., 2021; D. Kamiyama et al., 2016; R. Kamiyama et al., 2021)。よって、split 蛍光タンパク質を利用することで、全長の蛍光タンパク質をタンデムに繰り返す場合に比べ、大幅に遺伝子サイズを短縮することができる。



図 16. split 蛍光タンパク質の概略図 (Cabantous et al., 2005 より)

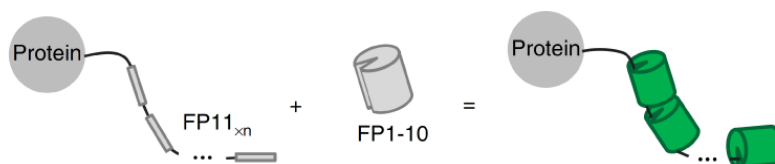


図 17. split 蛍光タンパク質繰り返しによる高輝度化の概略図 (Kamiyama et al., 2016 より)

細胞を識別するクラスタリング手法

蛍光波長や蛍光輝度の情報を元に機械学習のクラスタリングを利用することで、細胞を分類・識別することができる。クラスタリングの代表的なものの1つがガウス混合モデル (GMM) である。このモデルでは、各クラスターの蛍光輝度などのデータが正規分布であるという仮定の下で複数の正規分布の重ね合わせとして分類予測する。

予め分類する予定の各クラスターのデータが分かっている場合、一成分 GMM を順々に適応し正規分布を推測し、その重ね併せとして分類予測モデルを構築する。この分類予測モデルは、複数のガウス分布の重み付き和として確率分布をモデル化しているため、どのクラスターに分類されるかだけでなく、どのくらいの確率で分類されるのかを推定することができる(図 18)。

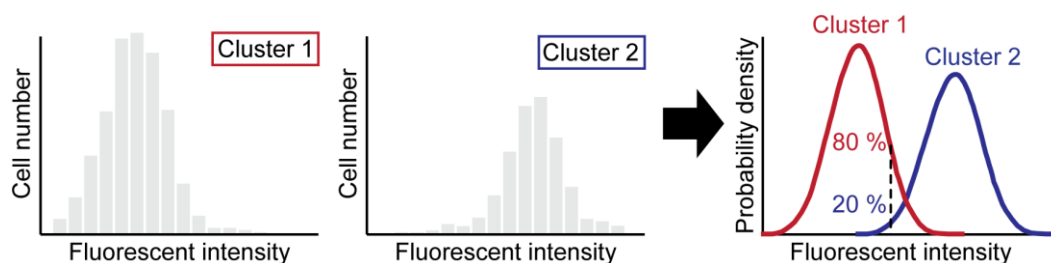


図 18. ガウス混合モデル(GMM)によるクラスタリング法の概略

各クラスターを一成分 GMM 事前学習し分類予測モデルを構築した模式図。

Caterpi:3 色の split 蛍光タンパク質の繰り返しを用いた細胞標識技術

本研究では3色のsplit 蛍光タンパク質のFP₁₁を直列に繰り返しつなぎ合わせることで、多様な蛍光強度変調を作り出し、細胞を識別する技術の開発を目指した(図 19 上)。このCaterpi 法(**C**olor and **i**ntensity modulation with split **F**luorescent **P**rotein)と命名した技術は主に3つのステップから構成される。1つ目のステップは3種のFP₁₋₁₀を発現するHeLa細胞の作製と20種類のFP₁₁タグを用いた細胞の蛍光標識である(図 19 左下)。2つ目のステップは、蛍光顕微鏡を用いた各細胞の蛍光輝度の測定と、ガウス混合モデル(GMM)を用いた輝度比率の学習である(図 19 中央下)。3つ目のステップでは、蛍光ラベルされた細胞を混ぜて、同時観察したのち、学習後のGMMによりどの細胞タイプに分類されるのか判定する(図 19 右下)。以上の3つのステップを用いて、細胞を設計された色で蛍光標識し、識別する技術開発に取り組んだ。

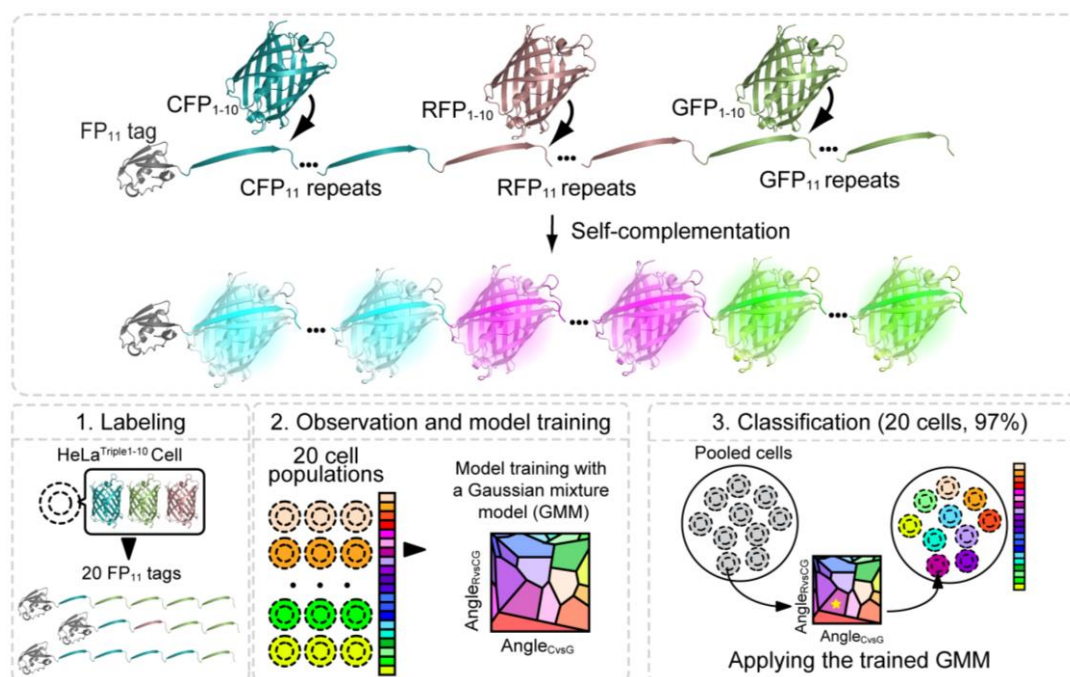


図 19. Caterpi: split 蛍光タンパク質繰り返しを利用した細胞識別技術の概略図

材料と方法

プラスミド

以下の cDNA はコドンをもとに最適化し、GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)で合成した：sfGFP₁₋₁₀ (Cabantous et al., 2005), CFP2₁₋₁₀ (Köker et al., 2018), mNeonGreen3A₁₋₁₀ (Zhou et al., 2020), sfCherry3Csp₁₋₁₀, mRuby4₁₋₁₀ (Tamura et al., 2021), ΔSUMOstar (L. Liu et al., 2008)。また、Cerulean₁₋₁₀ (Tamura et al., 2021)と YFP1₁₋₁₀ (Köker et al., 2018)は sfGFP₁₋₁₀ から、mNeonGreen3K₁₋₁₀ (Zhou et al., 2020)は mNeonGreen3A₁₋₁₀ から、sfCherry3C₁₋₁₀ (Feng et al., 2019)は sfCherry2₁₋₁₀ (Addgene: #82603)から部位特異的変異誘発により作製した。H2B の cDNA は Addgene (plasmid # 11680 for Histone H2B; Cambridge, MA)のプラスミドよりサブクローニングを行った。

split 蛍光タンパク質のアミノ酸配列

Cerulean	Cerulean ₁₋₁₀ MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTCLKFICTT GKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIS FKDDGKYKTRAVVKFEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNANS NVYITADKQKNGIKANFTVRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPD NHYLSTQTVLSKDPNEK* Cerulean ₁₁ (CFP2 ₁₁ と同様) RDHMLVHEYVNAAGIT*
CFP2	CFP2 ₁₋₁₀ MSKGEELFTGVVPILVELEGEVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTCLKFICTTG KLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISF KDDGKYKTRAVVKFEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNSDN VYITADKQKNGIKANFTIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN HYLSTQSVLSKDPNEK* CFP2 ₁₁ RDHMLVHEYVNAAGIT*
sfGFP	sfGFP ₁₋₁₀ MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTCLKFICTT GKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISF KDDGKYKTRAVVKFEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNSHN VYITADKQKNGIKANFTVRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN HYLSTQTVLSKDPNEK*

	sfGFP ₁₁ (CFP2 ₁₁ と同様) RDHMLVHEYVNAAGIT*
YFP1	YFP1 ₁₋₁₀ MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTCLKFICTT GKLPVPWPTLVTTLGYGVCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIS FKDDGKYKTRAVVKFEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNH NVYITADKQKNGIKANFTVRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPD NHLYSYQSVLSKDPNEK* YFP1 ₁₁ (CFP2 ₁₁ と同様) RDHMLVHEYVNAAGIT*
mNG3A mNG3Asp	mNG3A ₁₋₁₀ MVSKGEEDNMAASLPATHELHIFGSINGVDFDMVGQGTGNPNDEYEELNL KSTKGDLQFSPWILVPHIGYGFHQYLPYPDGMSPFQAAMVDGSGYQVHR TMQFEDGASLTVNYRYTYEGSHIKGEAQVMGTGFPADGPVMTNTLTAA DLCVSKMTYPNDKTIISTFKWSYTTVNGKRYRSTARTTYTFAKPMAAKY LKNQPMYVLRKTELKHS* mNG ₁₁ TELNFKEWQKAFTDMM* mNG3Asp ₁₁ TELNFKEWQKAFTDD*
mNG3K	mNG3K ₁₋₁₀ MVSKGEEDNMAASLPATHELHIFGSINDVDFDMVGQGTGNPNDEYEELNL KSTKGDLQFSPWILVPHIGYGFHQYLPYPDGMSPFQAAMVDGSGYQVHR TMQFEDGASLTVNYRYTYEGSHIKGEAQVIGTGFPADGPVMTNTLTAA WCMSKMTYPNDKTIISTFKWSYITVNGKRYRSTARTTYTFAKPMAANYL KNQPMYVFRKTELKHS* mNG ₁₁ TELNFKEWQKAFTDMM*
sfCherry3C	sfCherry3C ₁₋₁₀ MEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGHPYEGTQTARLKV TKGDPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFTWERVMN FEDGGVVAVTQDSSLQDGQFIYKVKLLGINFSDGPVMQKKTMGWEAST ERMYPEDGALKGEINQRLKLDGGHYDAEVKTTYRAKKPVQLPGAYDV DIKLDITSHNED* sfCherry3C ₁₁ YTIVEQYERAEARHST*

mRuby4	mRuby4 ₁₋₁₀ MVSKGEELIKENMRTKVVMEGSVNGHHFKCIGEGEGRPYEGVQTMRIK VIEGGPLPFAFDILATSFMYGSRTFIKYPADIPDFFKQSFPEGFTWERVTRY EDGGVITVTQDTCLEDGELVYNVKVSGVNFPSNGPVMQKKTKGWEPNT EMMYPVDGGLRGYTDIALKVDGGGHLHCNFTTYRSKKTVGNIKMPGV HAVDHRLERIEESDN* mRuby4 ₁₁ ETYVVQREVAVAKYSN*
sfCherry3Csp	sfCherry3Csp ₁₋₁₀ MEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGHPYEGTQTARLVV TKGDPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFTWERVMN FEDGGVVVYTQDSSLQDGQFIYKVKLLGINFSDGPVMQKKTMGWEAS TERMYPEDGALKGEINQRLKLDGGHYDAEVKTTYRAKKPVQLPGPYD VDIKLDITSHNED* sfCherry3Csp ₁₁ TTIVEQYERAEARHTT*

ΔSUMOstar のアミノ酸配列

(MGHHHHHHGSLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPE)THINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLM
EAFAKRQGKEMDSLTFLYDGIEIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQ(IGGRDDLPSL)

プラスミド構築と安定発現細胞株作製

FP₁₋₁₀ の作製

まず初めに、Tol2 トランスポゾンシステムを利用したプラスミド pT2A-IRES-iRFP670 を pT2A ベクター(Kawakami et al., 2004)に iRFP670(Shcherbakova & Verkhusha, 2013)と配列内リボソーム進入部位(IRES)(Akagi et al., 2003)の cDNA をサブクローニングすることで作製した。続いて、CFP2₁₋₁₀ の cDNA を PCR で増幅した後に、Gibson assembly 法(Clontech, Mountain View, CA)により挿入し、pT2A_CFP2₁₋₁₀-IRES-iRFP670 を作製した。また、pT2A_IRES-iRFP670 と pT2ADW (IRES-puro 遺伝子を含む)(Komatsu et al., 2018)ベクターに、sfCherry3Csp₁₋₁₀, mNeonGreen3Asp₁₋₁₀, CFP2₁₋₁₀ を P2A 配列(Kim et al., 2011)でつなぎ合わせた cDNA をサブクローニングした。これにより、pT2A_FP₁₋₁₀x3-IRES-iRFP670 と pT2ADWpuro_FP₁₋₁₀x3 を作製した。pT2A ベクターと pCS-TP (Kawakami et al., 2004)を共にトランスフェクションすることで安定発現細胞株を作製した。

FP₁₁ の作製

pPBpuro_EF1a をベクターに使用し(Yusa et al., 2009)、CFP2₁₁(x1)、CFP2₁₁(x2)、CFP2₁₁(x4)、

CFP2₁₁(x8)を含むプラスミドを作製した。ヒストン H2B、自己切断ペプチド P2A 配列、mCherry、および SV40 ラージ T 抗原由来の核移行シグナル(NLS、配列:PKKKRKV) (Kalderon et al., 1984)をコードする cDNA を PCR で増幅し、pPBpuro_EF1a ベクターに Gibson assembly 法で組み込み、pPBpuro_EF1a_Histone H2B-P2A-mCherry-NLS を作製した。次に、合成した CFP2₁₁ もしくは CFP2_{full-length} の cDNA (CFP2₁₋₁₀ cDNA と CFP2₁₁ の PCR 増幅により作製) を pPBpuro_EF1a_Histone H2B-P2A-mCherry-NLS に組み込み、

pPBpuro_EF1a_CFP2_{full-length}/CFP2₁₁(x1)-mCherry-NLS を作製した。この時、CFP2₁₁ 繰り返し配列を作製するために、CFP2₁₁ の 5'側に *Bgl*III、3'側に *Bam*HI と *Not*I を組み込んだ。CFP2₁₁(x2) を作製するため、*Bgl*III/*Not*I で処理した CFP2₁₁(x1)を含んだ断片をインサートに、*Bam*HI/*Not*I で処理した断片をベクターとして用いて、Ligation High Ver. 2 (TOYOBO) を使用しライゲーションを行った。同様の方法で CFP2₁₁(x4)と CFP2₁₁(x8)を作製した。ライゲーション処理で CFP2₁₁ を含んだインサートの代わりに、sfCherry3Csp₁₁ や mNeonGreen3Asp₁₁ を含んだインサートに置換することで、3 種類の FP₁₁をつなぎ合わせた FP₁₁ ライブラリーを作製した。

また、それぞれの実験に応じて、プラスミドの各遺伝子配列を下記の通りに置換した：puromycin 耐性遺伝子 (puro) を blasticidin S 耐性遺伝子 (bsr) に置換、ヒストン H2B を ΔSUMOstar に置換、mCherry を EBFP2 や mTagBFP2 に置換、そして NLS を HIV-1 rev タンパク質由来の核外移行シグナル (NES、配列：LPPLERLTLD) (Fischer et al., 1995)に置換。

sfCherry3Csp と mNG3Asp の作製

sfCherry3C₁₋₁₀ の変異体はオーバーラップ伸長 PCR 法で作製し、IRES-bsr (blasticidin S 耐性遺伝子) を含む pPB ベースのベクター(Yusa et al., 2009)に In-Fusion を用いた Gibson assembly 法で組み込んだ。sfCherry3C₁₁ と mNeonGreen3A₁₁ の追加の変異体は合成後、IRES-puro (ピューロマイシン耐性遺伝子)を含むpPB ベースのベクター(Yusa et al., 2009)に Ligation High Ver. 2 (TOYOBO) を用いて挿入した。安定発現細胞株は、pPB のプラスミドと一緒に pCMV-mPBbase (Wellcome Trust Sanger Institute より入手) をトランスフェクションすることで樹立した。

使用したプラスミドのリスト

図 20、29 で使用したプラスミド一覧

Cerulean	mNG3K
pT2A_Cerulean ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670	pT2A_mNG3K ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670
pPBpuro_H2B-Cerulean _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mNG3K _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mNG ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mNG ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS
CFP2	sfCherry3C
pT2A_CFP2 ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670	pT2A_sfCherry3C ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670

pPBpuro_H2B-CFP2 _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-sfCherry3C _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-sfCherry3C ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-sfCherry3C ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS
sfGFP	mRuby4
pT2A_sfGFP ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670	pT2A_mRuby4 ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670
pPBpuro_H2B-sfGFP _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mRuby4 _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mRuby4 ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mRuby4 ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS
YFP1	mNG3Asp
pT2A_YFP1 ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670	pT2A_mNG3A ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670
pPBpuro_H2B-YFP1 _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mNG3A _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mNG3Asp ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-CFP2 ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-mNG3Asp ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS
mNG3A	sfCherry3Csp
pT2A_mNG3A ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670	pT2A_sfCherry3Csp ₁₋₁₀ -IRES-iRFP670
pPBpuro_H2B-mNG3A _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-sfCherry3Csp _{full-length} -P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-mNG ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-sfCherry3Csp ₁₁ (x1)-P2A-EBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-mNG ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS	pPBpuro_H2B-sfCherry3Csp ₁₁ (x4)-P2A-EBFP2-NLS

図 21-24 で使用したプラスミド一覧

pT2A_CFP2₁₋₁₀-IRES-iRFP670

pCS-TP

pPBpuro_EF1a_H2B-CFP2_{full-length}-P2A-mCherry-NLS

pPBpuro_EF1a_H2B-CFP2₁₁(x1)-P2A-mCherry-NLS

pPBpuro_EF1a_H2B-CFP2₁₁(x2)-P2A-mCherry-NLS

pPBpuro_EF1a_H2B-CFP2₁₁(x4)-P2A-mCherry-NLS

pPBpuro_EF1a_H2B-CFP2₁₁(x8)-P2A-mCherry-NLS

pCMV-mPBase

図 26 で使用したプラスミド一覧

sfCherry3C の改良

pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀

pPBbsr_sfCherry3C_{1-10M}(E207G)

pPBbsr_sfCherry3C_{1-10M}(H76Y)

pPBbsr_sfCherry3C_{1-10M}(A107Y)

pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(A78K)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(H18R)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(T42Q)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(K48V)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(D53Q)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(K48E, T50K)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(H205D)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(D208S)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(R150V)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(A193P)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(K48R)
pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀M(A193P, A107Y, K48V)

pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(Y1D)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(T2K)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(T2R)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(Y1E)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(T2I)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(E5D)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(R9D)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(A10M)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(A12V)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(Y1T)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(Y1R)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(T2E)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(I3R)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(S15Q)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(S15T)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(Y1T, T2I, I3D)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁M(Y1T, S15T)-P2A-mTagBFP2-NLS

pCMV-mPBase

蛍光スペクトルの測定

pPBbsr_sfCherry3C₁₋₁₀

pPBpuro_H2B-sfCherry₁₁
pPBbsr_sfCherry3C_{1-10M}(A193P, A107Y, K48V)
pPBpuro_H2B-sfCherry_{11M}(Y1T, S15T)
pCMV-mPBase

図 28 で使用したプラスミド一覧

pPBbsr_mNG3A₁₋₁₀
pPBpuro_EF1a_H2B-mNG₁₁(x8)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_EF1a_H2B-mNG_{11M1}(x8)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_EF1a_H2B-mNG_{11M2}(x8)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_EF1a_H2B-mNG_{11M3}(x8)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_EF1a_H2B-mNG_{11M4}(x8)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_EF1a_H2B-mNG_{11M5}(x8)-P2A-mTagBFP2-NLS
pPBpuro_EF1a_H2B-mNG_{11M6}(x8)-P2A-mTagBFP2-NLS
pCMV-mPBase

図 31 で使用したプラスミド一覧

pT2A_FP₁₋₁₀x3-IRES-iRFP670
pCS-TP

FP₁₁ タグ

pCMV-mPBase

pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(1)1,0,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(33)2,0,2	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(65)1,2,8
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(2)2,0,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(34)2,0,4	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(66)1,4,1
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(3)4,0,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(35)2,0,8	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(67)1,4,2
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(4)8,0,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(36)4,0,1	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(68)1,4,4
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(5)0,1,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(37)4,0,2	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(69)1,8,1
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(6)0,2,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(38)4,0,4	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(70)1,8,2
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(7)0,4,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(39)4,0,8	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(71)2,1,1
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(8)0,8,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(40)8,0,1	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(72)2,1,2
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(9)0,0,1	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(41)8,0,2	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(73)2,1,4
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(10)0,0,2	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(42)8,0,4	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(74)2,1,8
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(11)0,0,4	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(43)0,1,1	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(75)2,2,1
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(12)0,0,8	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(44)0,1,2	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(76)2,2,2
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(13)1,1,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(45)0,1,4	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(77)2,2,4
pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(14)1,2,0	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(46)0,1,8	pPBpuro_EF1a_FP ₁₁ Tag(78)2,2,8

pPBpuro_EF1a_FP11Tag(15)1,4,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(47)0,2,1	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(79)2,4,1
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(16)1,8,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(48)0,2,2	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(80)2,4,2
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(17)2,1,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(49)0,2,4	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(81)2,4,4
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(18)2,2,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(50)0,2,8	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(82)2,8,1
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(19)2,4,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(51)0,4,1	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(83)2,8,2
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(20)2,8,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(52)0,4,2	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(84)4,1,1
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(21)4,1,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(53)0,4,4	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(85)4,1,2
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(22)4,2,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(54)0,4,8	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(86)4,1,4
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(23)4,4,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(55)0,8,1	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(87)4,2,1
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(24)4,8,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(56)0,8,2	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(88)4,2,2
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(25)8,1,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(57)0,8,4	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(89)4,2,4
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(26)8,2,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(58)1,1,1	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(90)4,4,1
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(27)8,4,0	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(59)1,1,2	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(91)4,4,2
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(28)1,0,1	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(60)1,1,4	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(92)4,4,4
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(29)1,0,2	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(61)1,1,8	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(93)8,1,1
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(30)1,0,4	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(62)1,2,1	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(94)8,1,2
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(31)1,0,8	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(63)1,2,2	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(95)8,2,1
pPBpuro_EF1a_FP11Tag(32)2,0,1	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(64)1,2,4	pPBpuro_EF1a_FP11Tag(96)8,2,2

図 33-36 で使用したプラスミド一覧

pT2ADWpuro_FP1-10x3

pCS-TP

pCMV-mPBase

pPBbsr_EF1a_FP11Tag(4)8,0,0	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(54)0,4,8
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(8)0,8,0	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(56)0,8,2
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(11)0,0,4	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(64)1,2,4
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(16)1,8,0	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(68)1,4,4
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(18)2,2,0	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(70)1,8,2
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(19)2,4,0	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(72)2,1,2
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(25)8,1,0	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(78)2,2,8
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(34)2,0,4	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(84)4,1,1
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(36)4,0,1	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(92)4,4,4
pPBbsr_EF1a_FP11Tag(50)0,2,8	pPBbsr_EF1a_FP11Tag(95)8,2,1

細胞培養と細胞クローンの作製

HeLa 細胞と Lenti-X 293T 細胞は、それぞれ Human Science Research Resources Bank と Clontech から購入した。両細胞株は、10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) と 1% penicillin/streptomycin (Nacalai Tesque) を添加した DMEM (Wako Pure Chemical Industries) で培養した。MDCK 細胞 (ECACC 84121903) は、RIKEN BioResource Center (番号 RCB0995) を通じて European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) から購入し、10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) と 1% penicillin/streptomycin (Nacalai Tesque) を添加した DMEM (Wako Pure Chemical Industries) で培養した。

トランスポゾンを介した遺伝子導入では、pT2A_CFP2₁₋₁₀-IRES-iRFP670 または pT2A_FP_{1-10x3}-IRES-iRFP670 を pCS-TP と共に HeLa 細胞に 293fectin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて共トランスフェクションした。得られた HeLa 細胞は、CFP2₁₋₁₀ または FP_{1-10x3} の発現量の高い細胞を選抜するため、iRFP670 蛍光を指標に FACS Aria IIu cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いてソーティングした。ソーティング後の細胞から細胞クローニングを行い、HeLa^{CFP2 1-10_iRFP670} 細胞および HeLa^{FP1-10x3_iRFP670} 細胞を樹立した。pT2ADWpuro_FP_{1-10x3} は、HeLa 細胞の場合は 293fectin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて、MDCK 細胞の場合は Amaxa nucleofector (Lonza, Basel, Switzerland) による電気穿孔法を用いて、pCS-TP とともにトランスフェクションした。遺伝子導入した細胞は 5 µg/mL の puromycin (no. P-8833; Sigma-Aldrich) で選抜した後、細胞クローニングを行い、HeLa^{FP1-10x3} 細胞株もしくは MDCK^{FP1-10x3} 細胞株を樹立した。

蛍光イメージング

split 蛍光タンパク質の評価のため、24 ウェルプレートの HeLa 細胞に、100 ng の FP₁₁ プラスミド[FP_{full-length}, FP_{11(x1)}, または FP_{11(x4)}]と 400 ng の FP₁₋₁₀ プラスミドを 293fectin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて共トランスフェクションした。細胞は collagen type I (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) をコートした glass-based 24 ウェルプレート (AGC Inc., Tokyo, Japan) に播種し、48 時間培養した。イメージング 1 時間前に、10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) と 1% penicillin/streptomycin (Nacalai Tesque) を添加した DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) に培地交換し、観察した。

FP₁₁ 標識のため、pPBbsr_EF1a-ΔSUMOstar-CFP2_{11(xa)}-mNG3Asp_{11(xb)}-sfCherry3Csp_{11(xc)} (FP₁₁ タグ)を pCMV-mPBase と共に、HeLaFP^{1-10x3} 細胞では 293fectin を用いて、MDCK^{FP1-10x3} 細胞には電気穿孔法を用いて共トランスフェクションした。遺伝子導入した細胞は 10 µg/mL の blasticidin S (Calbiochem, San Diego, CA) で選抜し、collagen type I をコートした glass-based 24 ウェルプレートに播種した。

細胞の観察は、Leica TCS SP8 FALCON 共焦点顕微鏡 (Leica-Microsystems, Wetzlar, Germany) を使用し、下記の設定を用いた：HC PL APO 20x/0.75 dry CS2 対物レンズ、HC PL

APO 40x/1.30 OIL CS2 対物レンズ、Leica HyD SMD ディテクター、80 MHz パルス周波数の白色レーザー、Diode 405 (VLK 0550 T01; LASOS, Jena, Germany)、440 nm ダイオードレーザー (PDL 800-D; PicoQuant, Berlin, Germany)、そして 37°C、5% CO₂ を維持するためのステージトップインキュベーター (Tokai Hit, Fujinomiya, Japan)。イメージングには以下の励起波長と蛍光検出波長帯を使用した：

<u>蛍光タンパク質</u>	<u>励起波長</u>	<u>検出波長</u>
EBFP2	405 nm	410-450 nm
Cerulean、CFP2	440 nm	460-490 nm
sfGFP	488 nm	500-550 nm
YFP1	514 nm	520-550 nm
mNG3A、mNG3K、mNG3Asp	506 nm	510-550 nm
sfCherry3C、sfCherry3Csp	594 nm	600-645 nm
mRuby4	561 nm	580-645 nm
iRFP670	650 nm	660-760 nm

バックグラウンドシグナルを除去するため、蛍光検出のタイムゲートは 1.0 ns から 6.0 ns に設定した。

CFP2、mNG3Asp、sfCherry3Csp のマルチカラーイメージングでは、以下の励起波長と蛍光検出波長帯を使用した：

<u>蛍光タンパク質</u>	<u>励起波長</u>	<u>検出波長</u>
CFP2	440 nm	450-500 nm
mNG3Asp	506 nm	515-580 nm
sfCherry3Csp	594 nm	605-645 nm

バックグラウンドシグナルを除去するため、mNG3Asp と sfCherry3Csp の蛍光検出のタイムゲートは 0.2 ns から 6.0 ns に設定した。

画像の処理と解析には ImageJ(Schneider et al., 2012)を使用した。蛍光強度の定量化では、Cellpose アルゴリズム(Stringer et al., 2021)を用いて画像のセグメンテーションを実施した。また、蛍光強度の計算には独自に作成した MATLAB (MathWorks) と Python スクリプトを使用した。

蛍光スペクトル

split sfCherry3C と split sfCherry3Csp 蛍光スペクトル解析は、Leica TCS SP8 FALCON 倒

立顕微鏡を用いて行った。画像は HC PL APO 20x/0.75 dry CS2 対物レンズを使用し、546 nm で励起して取得した。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー解析では、細胞を 3% FBS を含む PBS に懸濁し、FACS Aria IIu cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて解析またはソーティングを行った。蛍光検出には以下のレーザーと検出フィルターの組み合わせを使用した：

蛍光タンパク質	励起レーザー波長	検出フィルター波長
CFP2	407 nm	ET470/24m (Chroma Technology Corp., Bellows Falls, VT)
mNeonGreen3Asp	488 nm	DF530/30 フィルター (Omega Optical)
sfCherry3Csp	561 nm	DF582/15 フィルター (Omega Optical)
iRFP670	633 nm	DF660/20 フィルター (Omega Optical)

細胞の凝集体は、サイズと顆粒度によるゲーティングで除外した。データ解析には FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR) を使用した。

タンパク質構造予測

split mNG3A と split sfCherry3C および split sfCherry3Csp の会合状態の構造予測は AlphaFold Multimer (Evans et al., 2022)を用いて行なった。split sfCherry3C 改良の飽和変異とクラスター変異導入は、Rosetta の relax モジュールを用いてロータマーの最適化とバックボーンの最小化を行い、Interface Analyzer モジュールを用いてインターフェースエネルギー (dG_{separated}) の計算を行った (Benjamin Stranges & Kuhlman, 2013; Tyka et al., 2011)。また、split mNG3A₁₁(x8)の構造予測は AlphaFold (Jumper et al., 2021)を用いて行われた。タンパク質構造の可視化は PyMOL(<http://www.pymol.org/>)を用いて行なった。

蛍光輝度に基づいた角度データの算出

はじめに、個々の細胞から CFP2、mNG3Asp、および sfCherry3Csp のシグナルを測定し、蛍光強度データを取得する。これらの測定値を三次元座標系で表現し、CFP2 強度を x 軸、mNG3Asp を y 軸、sfCherry3Csp を z 軸にプロットした。続いて、各細胞について、独自に作成した Python スクリプトを用いてデカルト座標系 (x, y, z) を球面座標系 (r, Angle_{RvsCG}, Angle_{CvsG})に変換した。座標変換には一般的な球面座標変換に関する方程式に基づいて行った。

$$r = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2}$$

$$\text{Angle}_{\text{CvsG}} = \tan^{-1}(y/x)$$

$$\text{Angle}_{\text{RvsCG}} = \cos^{-1}(z/r)$$

これらの式において、 x 、 y 、 z はそれぞれ CFP2、mNG3Asp、sfCherry3Csp の蛍光強度を表している。値 r は合算された蛍光強度を表し、三次元空間における原点からデータ点までの距離として計算される。

二成分ガウス混合モデルによる FP₁₁ タグのスクリーニング

96 種類の細胞集団から得られた個々の細胞の蛍光強度の測定値を角度座標 ($\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ と $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$) に変換した。クラスタリングにおける外れ値の影響を減らす目的で、両方の角度データにおいて、それぞれのクラスター中心から離れた上位および下位 10% のデータ点を外れ値として除外した。2 成分のガウス混合モデルによる教師なしクラスタリングを `scikit-learn` (バージョン 0.24.2; Barupal & Fiehn, 2019) を用いて実装し細胞種の全ての組み合わせで、2 集団の識別精度を求めた。ランダムサンプリングでは、96 種類の細胞集団から、非復元単純ランダム抽出により事前に定めた数の細胞種を選択した。すべての計算解析は独自に作成した Python スクリプトを用いて実行した。

ガウス混合モデルを用いた細胞クラスタリング

前処理として CFP2、mNG3Asp、および sfCherry3Csp の蛍光強度を、全 20 種類の細胞種における中央値で正規化した。これらの正規化された蛍光輝度値を用いて、その後の解析のために $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ と $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ を計算により求めた。

分類モデルは `scikit-learn` ライブラリーで実装されたガウス混合モデル (GMM) を用いた。各細胞種について、順々に 1 成分 GMM を適用しモデル訓練を行なった。訓練データセットは全データの 80% (合計約 2.9×10^4 個の細胞、各細胞集団につき 10^3 個以上の細胞) で構成され、20 種類の異なる細胞集団からの二次元特徴量 ($\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ 、 $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$) を含んでいる。訓練された GMM を混合細胞の角度データに適用し、予測された細胞ラベルを視覚化した。20 種類の各クラス k について、入力データ点がそれぞれの GMM モデルに属する確率を計算し、クラス所属の尤度を表した：

$$P(x|\theta_k) = N(x|\mu_k, \Sigma_k)$$

ここで x は入力データ点、 θ_k は k 番目の GMM モデルのパラメーター、 $N(x|\mu_k, \Sigma_k)$ は平均 μ_k と共分散 Σ_k を持つ正規分布を表す。その後、各データ点について全クラスにわたる確率の合計が 1 となるように確率を正規化した。：

$$P(k|x) = P(x|\theta_k) / \sum_j P(x|\theta_j)$$

上記の計算により予測されたクラスのカテゴリ確率を可視化した。すべての計算解析は独自に作成した Python スクリプトを用いて実行した。

統計

すべての統計解析は Python を用いて実施した。サンプルサイズの事前決定には統計解析を使用していない。統計的有意差の評価には Welch の t 検定を使用した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表示した。両側検定において P 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなし、4 つのカテゴリに分類しました：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、および n.s.（有意差なし、すなわち $p \geq 0.05$ ）。

結果

1. Caterpi 法に適した split 蛍光タンパク質の選定

まず初めに Caterpi 法に適した split 蛍光タンパク質(split FP)の選定を行った。ここでは、2つの選定基準を設けた。1つ目は、split FP の蛍光輝度が本来の蛍光タンパク質 (FP_{full-length}) に匹敵する明るさを持つことである。2つ目は、11 番目の β スtrand(FP₁₁)の繰り返しにより蛍光輝度が増幅することである。この 2 点を調べるために、既報の split FP に対して(図 20A)、full-length FP、split FP₁₁(x1) (FP₁₁ が 1 つ)、split FP₁₁(x4) (FP₁₁ が 4 つ) の 3 つの場合の蛍光輝度を測定した。予備実験において FP₁₁ のみでは機能しないことが分かっていたので、融合タンパク質としてヒストン H2B を採用し、FP_{full-length}, FP₁₁(x1), FP₁₁(x4)をそれぞれつなげた(図 20B)。カルボキシ末端側で核局在シグナルを付けた EBFP2 を 2A ペプチドで発現させることにより、EBFP2 の蛍光強度で発現量を校正した。FP_{full-length}, FP₁₁(x1), FP₁₁(x4)のプラスミドのそれぞれをその 4 倍量の FP₁₋₁₀のプラスミドと共に、HeLa 細胞にトランスフェクションし、2 日後に共焦点顕微鏡で観察した。FP₁₋₁₀ の発現量は IRES で発現する iRFP670 の蛍光輝度で確認する事ができるため、iRFP670 蛍光が認められる細胞において、核における split FP の蛍光輝度を定量化した(図 20C)。全ての蛍光タンパク質に対して FP_{full-length} の値が 1 になるように正規化し、比較を行った。

FP₁₁(x1)が FP_{full-length} に対し 9 割以上の輝度を示したのが、CFP2, sfGFP, mNG3A, mNG3K であった。また、FP₁₁(x4)が FP₁₁(x1)に対して中央値の値が 2 倍以上の輝度上昇が認められたのは、Cerulean, CFP2, sfGFP, YFP1 であり、最大は CFP2 で 3 倍であった。よって、Caterpi 法に最も適する split 蛍光タンパク質は CFP2 だと分かった。FP₁₋₁₀ のアミノ酸配列の相同性が高い split 蛍光タンパク質は FP₁₁ が交差性に結合するため、CFP2 と同時に利用することができるのは、mNG3A, mNG3K のいずれかと mRuby, sfCherry3C のいずれかの 3 種となる(Tamura et al., 2021)。mNG3A では、mNG3K に比べ FP₁₁(x4)のわずかな輝度増幅が認められた。split sfCherry3C と split mRuby4 はどちらも全長型に比べ大幅に輝度値が減少するが、split sfCherry3C は 7 割程度にとどっていた。

よって、最適な 3 種の split 蛍光タンパク質の組み合わせは split CFP2, split mNG3A, split sfCherry3C であると結論付けた。しかし、split mNG3A は mNG₁₁(x1)から mNG₁₁(x4)への輝度増幅が 1.3 倍に留まり、split sfCherry は sfCherry₁₁(x1)が sfCherry3C_{full-length} に比べて 0.7 倍の蛍光輝度しか示さないの、Caterpi 法には現状利用することはできない。

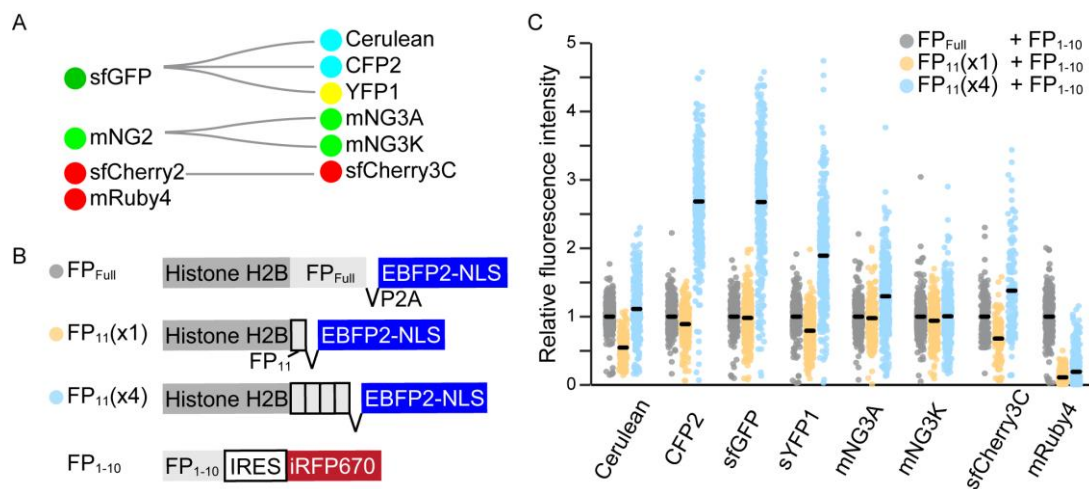


図 20. split 蛍光タンパク質の選定

- (A) 本研究で使用された split 蛍光タンパク質同士の進化的関係を示した系統樹。
- (B) コンストラクトの構造: 全長蛍光タンパク質 ($FP_{full-length}$)、単一の FP_{11} 断片 [$FP_{11}(x1)$]、または 4 回繰り返しの FP_{11} 断片 [$FP_{11}(x4)$] をそれぞれヒストン H2B に融合したタンパク質と、相補的な FP_{1-10} 断片を示す。
- (C) $FP_{full-length}$ 、 $FP_{11}(x1)$ または $FP_{11}(x4)$ と FP_{1-10} 断片を発現する HeLa 細胞(トランスフェクション比は 1:4)における相対蛍光強度の定量解析。測定は共焦点顕微鏡で行われた。黒線は中央値を示す ($n > 130$ 細胞)。

2. split CFP2 繰り返しを用いた輝度増幅と細胞識別

2-1. split CFP2 繰り返し配列のプラスミド構築

CFP2₁₁ 繰り返し配列を用いた蛍光輝度増幅により細胞識別が可能かどうかを検証した。まず初めに、CFP2₁₁ の繰り返し配列を持つプラスミドの構築を行った(図 21)。最初に、ヒストン H2B-CFP2₁₁(x1)の融合タンパク質の遺伝子をコードするプラスミドを作製した。このプラスミドでは、CFP2₁₁(x1)配列の 5'末端に *Bgl*III 制限酵素部位、3'末端に *Bam*HI と *Not*I 制限酵素部位が配置するように設計した。*Bgl*III/*Not*I で制限酵素処理した断片(インサート)と *Bam*HI/*Not*I で制限酵素処理した断片(ベクター)をライゲーションする工程を繰り返す事で、(x2)、(x4)、(x8)を作製した。先行研究(D. Kamiyama et al., 2016)を参考に、CFP2₁₁ 断片間には GGSGG をリンカー配列として組み込んだ。この時、*Bgl*III-*Bam*HI 接合部では、6 つのヌクレオチドがグリシン(G)とセリン残基(S)をコードしており、リンカー配列の一部として機能するように設計した。

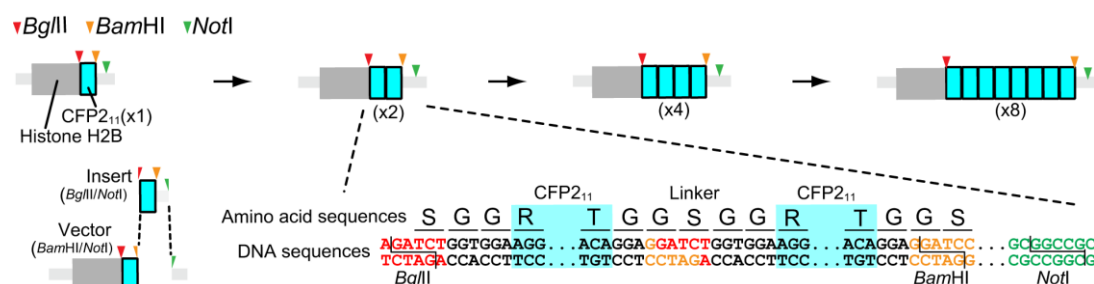


図 21. split CFP2₁₁ 繰り返し配列作製の概略

CFP2₁₁(x1), (x2), (x4), (x8)コンストラクト作製方法の模式図。CFP2₁₁(x2)における塩基配列とアミノ酸配列を示す。

2-2. split CFP2 繰り返しによる蛍光輝度増幅

続いて、CFP2₁₋₁₀ を安定発現する HeLa 細胞(HeLa^{CFP2 1-10} 細胞)を作製した。そして、作製したヒストン H2B に CFP2₁₁ (x1)、(x2)、(x4)、(x8)を融合したタンパク質をそれぞれ HeLa^{CFP2 1-10} 細胞で安定発現させた(図 22A,B)。また、コントロールとしては、全長の CFP2(CFP2_{full-length})をヒストン H2B に融合したタンパク質を HeLa^{CFP2 1-10} 細胞で安定発現させた。核の mCherry 蛍光で正規化すると、split CFP2 は full-length CFP2 と同等の蛍光輝度を示した。また、CFP2 蛍光強度は CFP2₁₁ 繰り返しで約 1.7 倍ずつ増加した。これは、最大値が 2 倍であるので許容される値と判定した(図 22C)。

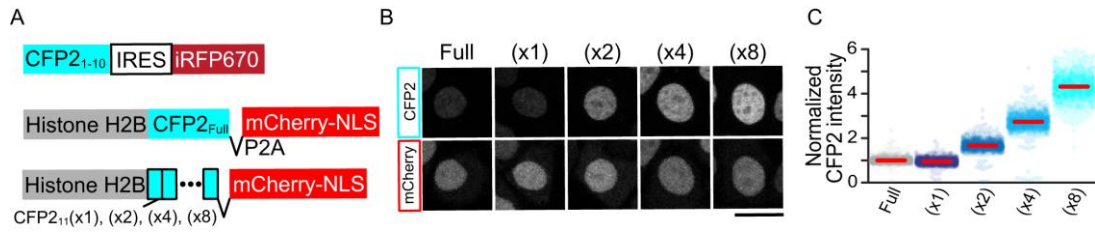


図 22. split CFP2 繰り返しによる輝度増幅

- (A) コンストラクトの構造: CFP2₁₋₁₀ と、ヒストン H2B タグ付きの CFP2_{full-length} または CFP2₁₁(x1)、(x2)、(x4)、(x8)の融合タンパク質を示す。
- (B) CFP2₁₋₁₀ と CFP2_{full-length} または CFP2₁₁ 繰り返しを安定共発現する HeLa 細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像。スケールバーは 20 μm 。
- (C) ヒストン H2B タグ付き CFP2₁₁(x1)、(x2)、(x4)、(x8)を発現する HeLa 細胞における CFP2 蛍光輝度の定量。full-length CFP2 の中央値が 1 になるように正規化。赤線は中央値を示す。(N=3, n > 130 細胞)。

2-3. ガウス混合モデルを用いた細胞識別の精度算出

続けて、異なる数の CFP2₁₁ 繰り返し配列を発現する細胞を識別した場合に、精度がどの程度になるかを評価した(図 23A)。4 種類の細胞を別々のディッシュで観察した後に定量化し、(x1)、(x2)、(x4)、(x8)のそれぞれに対して、mCherry と CFP2 の蛍光輝度を示すデータセットを作成した。このデータセットを基にした細胞分類の前処理として mCherry と CFP2 の蛍光強度を極座標変換し、蛍光強度比を 0°から 90°の範囲の角度($\text{Angle}_{\text{mCherry vs CFP2}}$)で表した。これは、パラメーターを圧縮し、クラスタリングの予測精度の向上を図るためである。(x1)、(x2)、(x4)、(x8)のそれぞれに対する $\text{Angle}_{\text{mCherry vs CFP2}}$ データをモデル学習に用いる訓練用データセットと、モデル検証に用いるテストデータセットに分割した。モデル訓練用のデータを用いて、(x1)、(x2)、(x4)、(x8)の $\text{Angle}_{\text{mCherry vs CFP2}}$ の値を順々に、クラスタリング手法の 1 種であるガウス混合モデル(GMM)で学習させる。この学習の操作により、4 種の細胞を識別するための $\text{Angle}_{\text{mCherry vs CFP2}}$ の最適な境界を決定することができる。

続けて、テストデータを用いてモデルの評価を行った。テストデータの、 $\text{Angle}_{\text{mCherry vs CFP2}}$ の値を訓練した GMM に適応し、(x1)、(x2)、(x4)、(x8)のどれに分類されるのかを予測する。この予測と、実際に細胞が持つ正解を比較することで、モデルの識別精度を評価した。その結果、GMM モデルは全体で 96%の精度に達することが分かった(図 23B)。CFP2₁₁(x8)が最も低い精度(93.9%)を示し、(x8)発現細胞の 6.1%が(x4)として誤分類されていた。

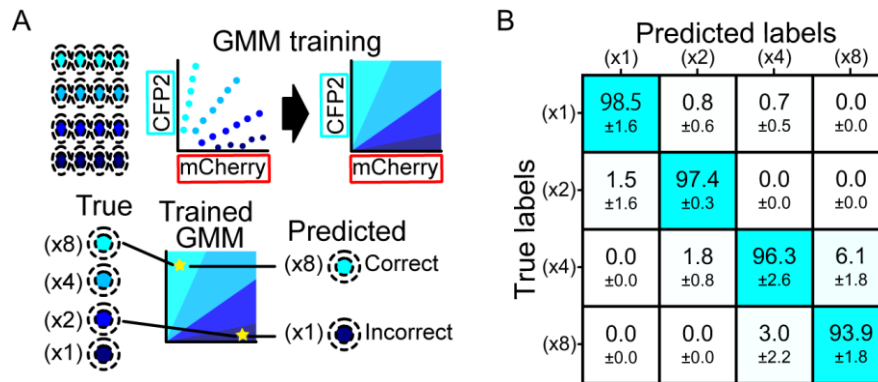


図 23. CFP2₁₁ 繰り返し発現細胞のガウス混合モデルを用いた細胞識別の精度

(A) CFP2₁₁(x1)、(x2)、(x4)、(x8)ラベル化細胞に対するガウス混合モデル(GMM)の訓練と、テストデータを用いた識別精度算出過程の模式図。

(B) 正解ラベルと予測ラベルを比較し算出した識別精度を示す混同行列。データは 3 回の独立した実験の予測精度の平均±標準偏差を示す。色の濃淡は、予測精度の平均を示している。

2-4. CFP2₁₁ 繰り返しを発現する 4 種の混合細胞の識別

最後に、(x1)、(x2)、(x4)、(x8)の異なる CFP2₁₁ 繰り返し配列を持つ 4 種類の細胞を混ぜた状態から分類することができるのかどうかを調べた。まず、4 種の混合細胞を共焦点顕微鏡で観察し、CFP2/mCherry 比の画像を生成した(図 24 左)。続けて、96%の精度で分類可能と示された訓練後の GMM を適用し、個々の細胞を(x1)、(x2)、(x4)、(x8)のいずれかに分類し、GMM のラベル分布として表示した(図 24 中央)。蛍光比画像では、多くの細胞の核が青、シアン、緑、オレンジ色の 4 色のいずれかで表示されており、4 種の細胞が混ざっていることが分かる。オレンジ色の細胞は CFP2 の蛍光輝度が高く、最大の繰り返し数である(x8)である可能性が高いが、実際その多くが GMM ラベル分布では(x8)に属する細胞であると予測されていた。このように、GMM ラベル分布の正当性は蛍光比画像と目視で確認できた。

GMM の特徴としては複数のガウス分布の重み付き和として確率分布をモデル化しており、(x1)、(x2)、(x4)、(x8)の 4 種にそれぞれどのくらいの確率で分類させるかを算出することができる。これは当に、GMM ラベルの信頼度として解釈することができる。この GMM ラベル信頼性分布も視覚化した(図 24 右)。

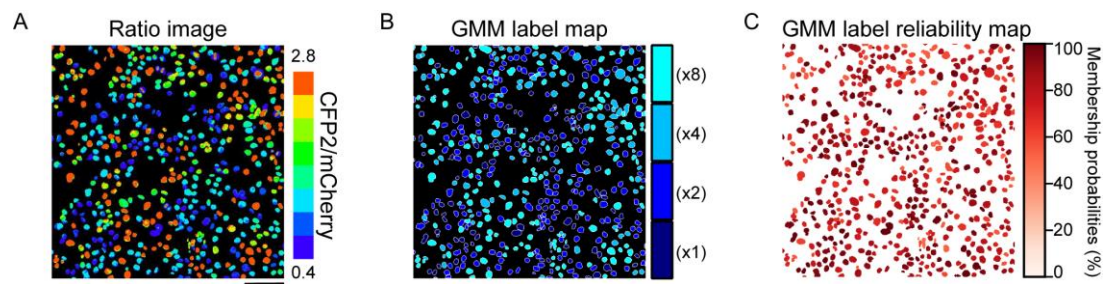


図 24. CFP2₁₁ 繰り返し発現細胞の識別とその信頼性マップ

- (A) 異なる CFP2₁₁ 繰り返し数 [(x1)、(x2)、(x4)、(x8)]を発現する細胞を混ぜた混合細胞の CFP2/mCherry の蛍光強度比を示す画像。スケールバー：100 μ m。
- (B) パネル(A)の各細胞に訓練後の GMM を適用し得られた細胞分類の分布。個々の細胞を特定のコピー数 [(x1)、(x2)、(x4)、(x8)]に割り当てたマップを示す。
- (C) パネル(B)で示した細胞分類の際の分類確率マップ。GMM 分類の際の信頼度を示す。

3. 構造予測モデルを用いた sfCherry3C 改良のアミノ酸変異の探索

前述のように CFP2 以外の split FP はそのままでは十分な性能を有していない。まず、split sfCherry3C について、繰り返しによる輝度増幅とそれによる細胞識別を可能にするために、改良することを試みた。split sfCherry3C の問題は、FP₁₋₁₀ 断片と FP₁₁ 断片の会合効率が低い(Feng et al., 2019)、全長の sfCherry3C と比べて、split sfCherry3C は 7 割程度の蛍光輝度しか示さず、蛍光輝度が低いことである。

そこで、タンパク質構造予測の手法を駆使し、split sfCherry3C の会合効率を向上させ、その結果、高輝度化が期待されるアミノ酸変異を網羅的に探索した。まず初めに sfCherry3C₁₋₁₀ と sfCherry3C₁₁ が会合した構造を AlphaFold Multimer(Evans et al., 2022)を用いて予測した。続いて、タンパク質構造予測ツール Rosetta を用いて sfCherry3C₁₁ のアミノ酸に対し部分飽和変異を導入し、結合安定性のスコア(dG separated)が減り、会合効率が高くなると予想される変異を調べた(図 25A)。続けて、導入した部分飽和変異から 7Å 以内に位置するアミノ酸にクラスター変異を導入し、周辺のアミノ酸を最適化することで結合安定性のスコア(dG separated)の更なる減少を試みる。この計算を sfCherry3C₁₁ 上の 1 番目から 16 番目の全てのアミノ酸に対して行い(図 25B)、中でも特に結合安定性のスコア(dG separated)の減少が見込まれ、split sfCherry3C の高輝度化が期待される 22 ペアのアミノ酸変異を割り出した。

各変異を導入した sfCherry3C_{1-10M} と sfCherry3C_{11M} を HeLa 細胞で安定発現させ輝度値を定量化した(図 26A,B)。その結果、およそ 5 種のアミノ酸変異ペアで中央値の比較で split sfCherry3C の高輝度化が認められた。中でも特に高輝度化した上位 3 種の変異ペアの全てを導入した変異体を作製したところ、2.5 倍の高輝度化に成功し、これを split sfCherry3Csp と名付けた(図 26B,C)。split sfCherry3C と split sfCherry3Csp の蛍光スペクトルを測定したところ、概ね一致した(図 26D)。

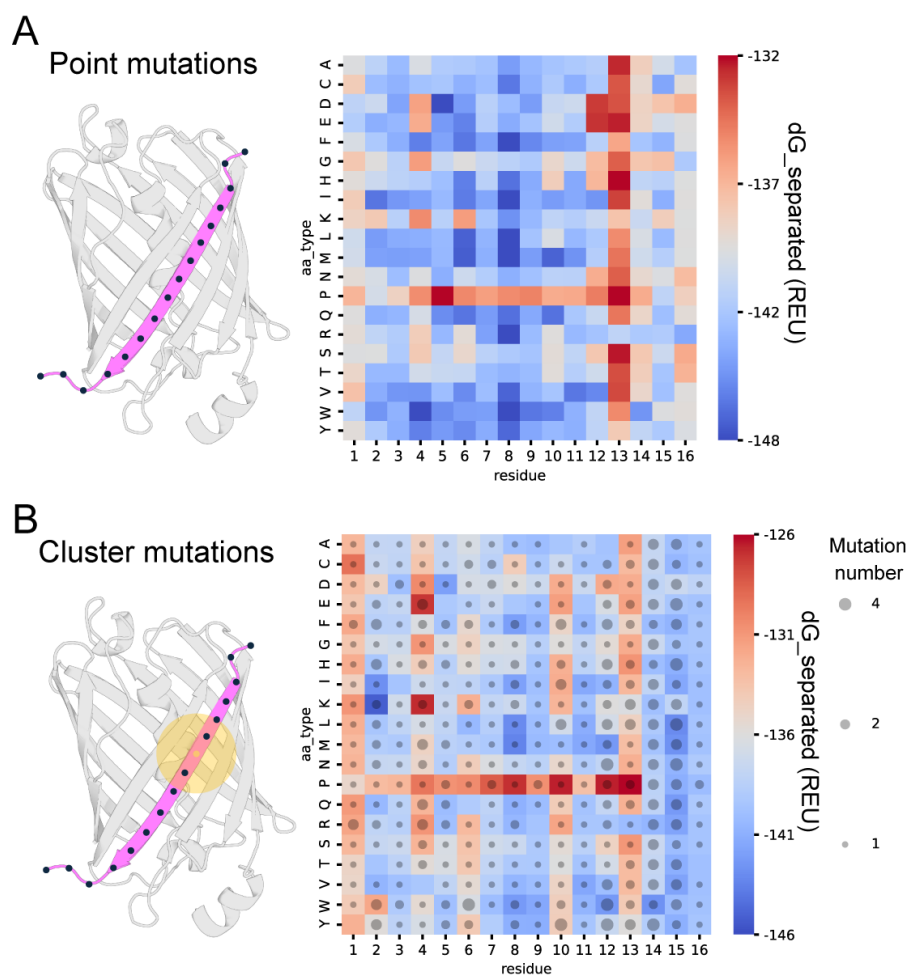


図 25. タンパク質構造予測を用いた sfCherry3C 改良の変異探索

- (A) sfCherry3C₁₁ の飽和変異と Rosetta を用いて算出した $dG_{\text{separated}}$ 値のヒートマップ。 $dG_{\text{separated}}$ 値が低い方ほど結合により安定化することを示す。
- (B) パネル(A)で求めた結合安的化に寄与する sfCherry3C₁₁ 上の各アミノ酸点変異周辺 (7 Å 以内) にクラスター変異を導入し、再計算した $dG_{\text{separated}}$ 値ヒートマップ。野生型の split sfCherry3C から導入されたアミノ酸変異の数を各カラムの中心の点の大きさで表している。

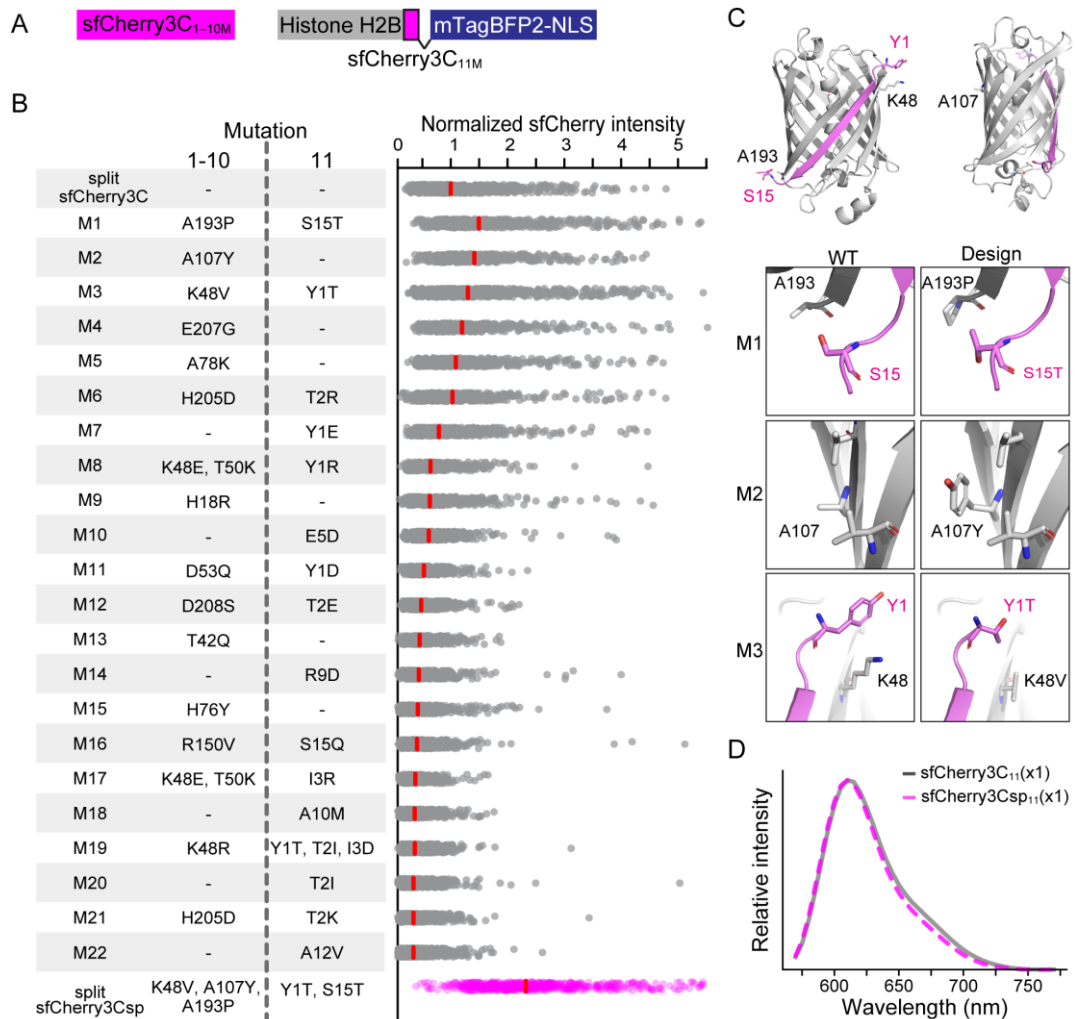


図 26. split sfCherry3C の改良

- (A) コンストラクトの構造：sfCherry3C₁₋₁₀ の変異体(sfCherry3C_{1-10M})とヒストン H2B タグ付きの sfCherry3C₁₁ 変異体(sfCherry3C_{11M})の模式図。
- (B) sfCherry3C_{1-10M} と sfCherry3C_{11M} の変異体リスト。ヒストン H2B タグ付き sfCherry3C_{11M}(x1) と sfCherry3C_{1-10M} を安定的に共発現する HeLa 細胞の sfCherry3C 蛍光強度を示したビースウォームプロット。split sfCherry3C の蛍光輝度の中央値が 1 になるように正規化。赤線は中央値を示す。
- (C) AlphaFold Multimer を使用して生成し、PyMOL で可視化した split sfCherry3Csp の予測構造モデル。色は sfCherry3Csp₁₋₁₀ (灰色) と sfCherry3Csp₁₁ (マゼンタ) に対応する。split sfCherry3C と split sfCherry3Csp の変異アミノ酸周辺のタンパク質構造の拡大図。
- (D) split sfCherry3C または split sfCherry3Csp を発現する HeLa 細胞の 546 nm レーザー励起による蛍光スペクトル

4. mNG₁₁ のペプチド配列の最適化

続けて、split mNG3A の改良に取り組んだ。split mNG3A の問題点は mNG₁₁ (x1)に対して mNG₁₁ (x4)の輝度増幅が 1.3 倍に留まり、繰り返しにより十分に蛍光輝度を増幅できないことである。mNG3A₁₁(x4)の輝度増幅率が小さい理由として、mNG₁₁ 繰り返しでは mNG₁₁ ペプチド同士が相互作用することで、mNG3A₁₋₁₀が各 mNG₁₁に会合できなくなっていると考えた。それは、GGSGG リンカーでつなげた mNG₁₁ を 8 回繰り返したアミノ酸配列を Alpha Fold(Jumper et al., 2021)を用いて構造予測したところ、4 つの α ヘリックスが凝集した構造が 2 つ見られたためである(図 27A)。この 4 つの α ヘリックスを含んだバンドル構造の内側では mNG₁₁ の中から、5 つの疎水性アミノ酸(F5, W8, F12, M15, M16)の側鎖が疎水性コアを形成していた。ここで、split mNG3A に着目すると(図 27B)、M15, M16 は mNG₁₁ の C 末端の天然変性領域に位置しており、削ることができると考えた。また、F12 は β スtrandを形成する最後のアミノ酸であり、かつ、 β バレルの外向きのアミノ酸であるため、split mNG3A 蛍光に与える影響は小さいと予想される。そこで、フェニルアラニン(F)から水酸基の加わったチロシン(Y)へと変異導入を試みた。以上の 2 つのアミノ酸欠損や変異を用いて、疎水性コアを崩壊させ、mNG₁₁ 繰り返しの際の凝集構造を抑制する事を試みた。同時に、アスパラギン酸を追加する変異も試し、静電反発により mNG₁₁ 繰り返しの凝集構造の抑制も試みた。

mNG₁₁ の野生型と 6 個の変異配列(M1~M6)を 8 回繰り返したもの(x8)を H2B に融合し、mNG3A₁₋₁₀ と共に HeLa 細胞で安定発現させた(図 28A,B)。発現量は mTagBFP2 の蛍光輝度で較正した。その結果、C 末端のメチオニン 2 アミノ酸を削ることが mNG₁₁ 繰り返しの高輝度化に最も寄与することが分かった(図 28C)。最も高輝度化した mNG₁₁ 変異配列 M3(mNG3Asp と表記)はアスパラギン酸を追加した配列だった。mNG₁₁ を改変した split mNG3A を split mNG3Asp と名付けた。

mNG3Asp と sfCherry3Csp の split 蛍光タンパク質の性能評価を行い CFP2 と比較した。図 20 で行った実験と全く同じ実験を、mNG3Asp と sfCherry3Csp で行い、split FP の蛍光輝度と split FP 繰り返しによる輝度増幅率を調べた(図 29)。結果、split mNG3Asp は(x4)は(x1)に対し、2.3 倍高輝度化し、split sfCherry3Csp の(x1)は full-length sfCherry3Csp の 0.8 倍の輝度値を示し、(x4)は(x1)の 3 倍高輝度化し、split CFP2 と同等の輝度増幅率を達成することが示された。

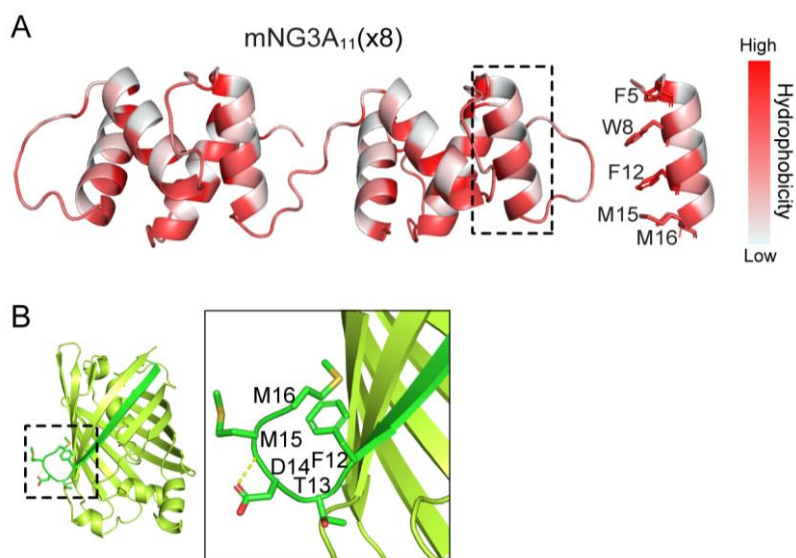


図 27. mNG₁₁8 回繰り返し配列と split mNG3A の構造予測

- (A) GGSGG リンカーを用いて、mNG₁₁ を 8 回繰り返したタンパク質の構造予測。
PyMOL で可視化し、色は各アミノ酸における疎水性度を示している。黒い点線で
囲んだ mNG₁₁(x1)に対応する構造を右側に示す。
- (B) AlphaFold Multimer を使用して生成し、PyMOL で可視化した split mNG3A の予
測構造モデル。異なる色は mNG3A₁₋₁₀ (黄緑) と mNG3A₁₁ (緑) に対応する。

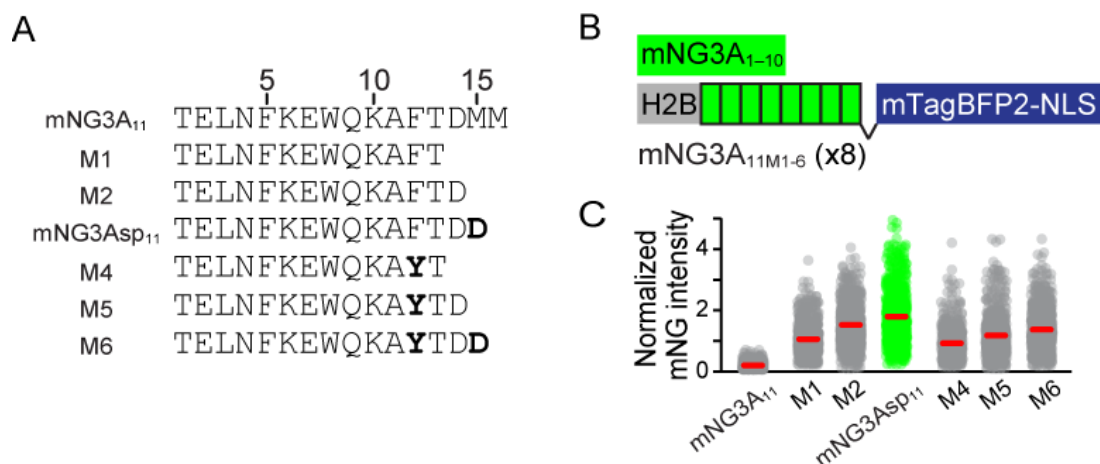


図 28. mNG₁₁ ペプチド配列の改良

- (A) mNG3A₁₁ の野生型と変異体 (mNG3A_{11M}) のアミノ酸配列。
- (B) コンストラクトの構造: mNG3A₁₋₁₀ と、ヒストン H2B タグ付き mNG3A_{11M}(x8)。
- (C) mNG3A₁₋₁₀ とヒストン H2B タグ付き mNG3A_{11M}(x8)を安定的に共発現する HeLa
細胞における mNG3A 蛍光強度の定量的解析。M1 の中央値が 1 になるように正規
化。赤線は中央値を示す。

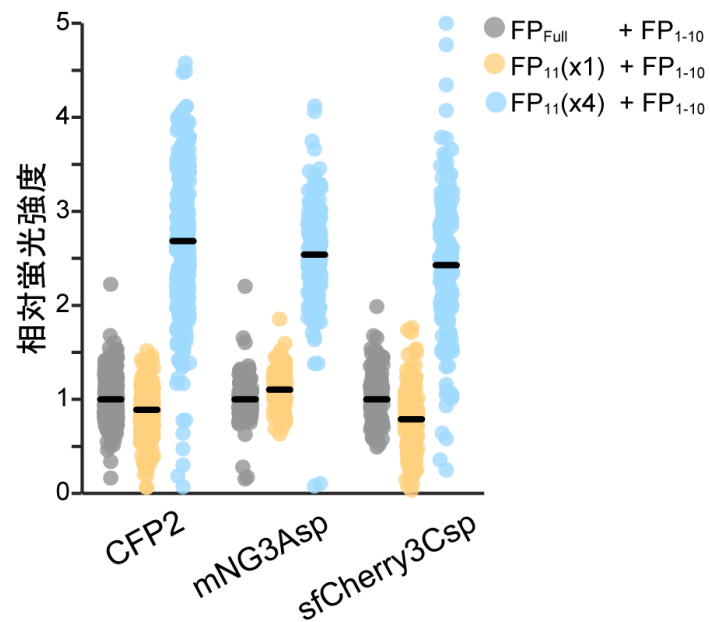


図 29. split mNG3A と split sfCherry3Csp の評価

各 FP₁₋₁₀ 断片と共に、ヒストン H2B タグ付き FP_{full-length}、FP_{11(x1)}または FP_{11(x4)}を発現する HeLa 細胞（トランスフェクション比 1:4）の相対蛍光強度の比較解析。データはベースウォームプロットで示され、中央値は黒線で表示。各条件につき $n > 130$ 細胞。測定は共焦点顕微鏡により実施。

5. Caterpi 細胞標識法の FP₁₁ タグのスクリーニング

5-1. FP₁₁ タグライブラリーの構築

続いて、識別可能な蛍光強度変調をもたらす split CFP2、split mNG3Asp、split sfCherry3Csp の FP₁₁ の繰り返し回数の組み合わせを選定することにした(図 30)。まず初めに、3 色の FP₁₋₁₀ を高発現するクローン細胞を作製した。3 色の FP₁₋₁₀ を P2A 配列で繋いだ後ろに IRES-iRFP670 を導入した遺伝子配列を用い、iRFP670 の蛍光輝度の高い細胞をフローサイトメーターで分取した後に、細胞クローニングを行った。続けて、FP₁₁ タグのライブラリーの作製に取り組んだ。ここでは、ヒストン H2B の代わりに SUMOstar タンパク質(L. Liu et al., 2008) の N 末端、C 末端の天然変性領域を欠損させた ΔSUMOstar を用いた。これは、ΔSUMOstar はヒストン H2B よりもサイズが小さく、かつ細胞全体の形態を解析することができると考えられるため採用した。ΔSUMOstar タンパク質に、CFP2、sfCherry3Csp、mNG3Asp の順番でそれぞれの FP₁₁ を(x0), (x1), (x2), (x4), (x8)のいずれかで組み合わせつなぎ合わせた。この時、合計の繰り返し回数が(x12)以下になる 96 種に絞り、96 種全てのプラスミドをサンガーシーケンにより FP₁₁ リピート配列の塩基配列を確認し、FP₁₁ ライブラリーとした。

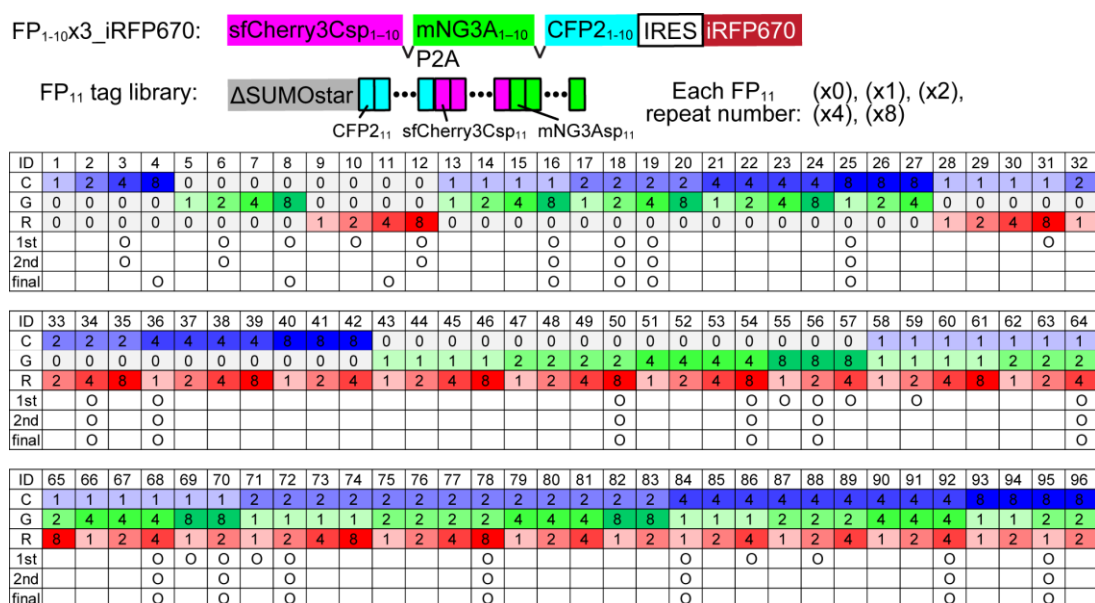


図 30. FP₁₁ ライブラリーの作製

FP₁₋₁₀x3_iRFP670 と FP₁₁ タグの発現コンストラクトの模式図(上)。ΔSUMOstar タグに CFP2₁₁、sfCherry3Csp₁₁、mNG3Asp₁₁ を (x0)、(x1)、(x2)、(x4)、(x8)で組み合わせで融合している。96 種類の組み合わせからなる FP₁₁ タグライブラリー表 (下)。各 FP₁₁ の繰り返し回数は、「C」(CFP2₁₁)、「G」(mNG3Asp₁₁)、「R」(sfCherry3Csp₁₁) と表示。マーク(O)は一次、二次スクリーニングの過程および、最終的に選定された FP₁₁ タグを示す。

5-2. 96 種 FP₁₁ タグを用いた細胞識別精度のペアワイズ解析

3 色の FP₁₋₁₀ を安定的に高発現する HeLa 細胞クローンに 96 種の FP₁₁ タグを導入し安定発現させ、蛍光標識された 96 種の細胞を共焦点顕微鏡で観察した。画像データを用いて、各細胞種の CFP2, sfCherry3Csp, mNG3Asp の蛍光輝度を定量した。CFP2 単色での蛍光輝度による細胞識別と同様に、前処理として、球面座標系に変換し、2 つの角度 $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ 、 $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ を用いて、蛍光輝度の相対比を示す散布図を求めた(図 31A 上)。次に、96 種の中から 2 種の細胞種を選び取り、教師なし二成分ガウス混合モデルを用いて全ての細胞を 2 種にクラスタリングする。クラスタリングされた細胞種と、実際の細胞種を比較することで、2 種間のクラスタリング精度を算出する(図 31A 下)。2 種細胞間の $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ 、 $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ の散布図が十分に異なり、正確に分類できた場合、精度が高くなる。この計算を全ての 96 種の細胞種の総当たりに対して行った(図 31B)。

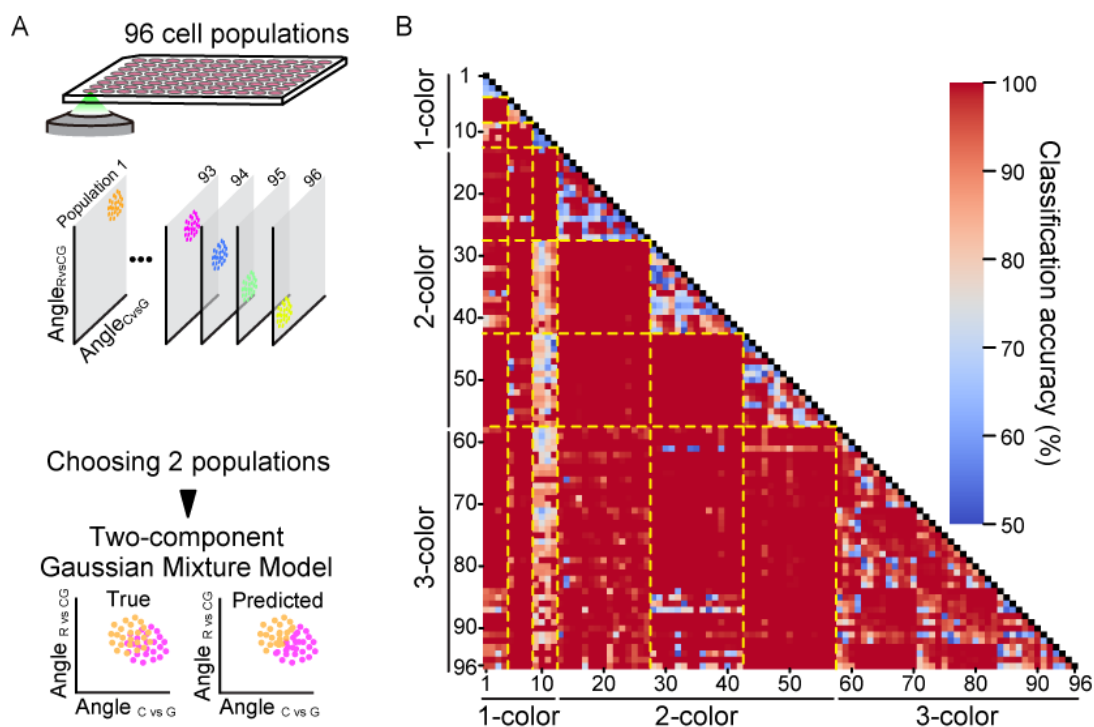


図 31. FP₁₁ タグで標識された 96 細胞種の総当たり識別精度

(A) 96 細胞種の観察と、総当たり分類精度計算過程の模式図

(B) FP₁₁ タグで蛍光標識された 96 種類の細胞種間のペアワイズ分類精度を示した図。

FP₁₁ タグの順番は図 30 の ID 番号に対応させている (各集団につき $n > 230$ 細胞)。

5-3. FP₁₁ タグ選定のスクリーニング

これを基に何種類の細胞がどのくらいの精度で識別できるかどうかを計算により求めた(図 32A)。具体的には、20 個の細胞種を選び取る場合、96 個から 20 個の細胞種をランダムに選び取る。選ばれた 20 細胞種の総当たりの識別精度を図 31B から取り出し、その中の最小値、すなわち最も識別が困難なペアの精度をもとめる。この試行を 10^7 回繰り返した。 10^7 回の施行の中で、最小のペアワイズ識別精度が最大となった値を図示した(図 32B)。その結果、最適な 20 個の FP₁₁ タグで標識された細胞種では、全ての組み合わせにおいて 90%以上の精度で識別可能であることが明らかとなった。一方で 30 種の細胞を選び取った場合は、60%まで減少した。最終的に 20 種類の FP₁₁ タグに絞り込むことを目的に、第一スクリーニングとして 30 種の候補を選び取った。

第一スクリーニングで選定した 30 種の細胞種に対して共焦点顕微鏡で蛍光観察した後、フローサイトメーターで蛍光輝度測定を行なった。その結果、20 種の FP₁₁ ラベルは 90%以上で識別できることが示され、同時にフローサイトメーターを用いた場合では、顕微鏡よりは精度は落ちるが 85%以上の精度で識別可能であることが示された(図 32C)。これをもとに 20 種類の FP₁₁ タグの選定を行なった。

最後に、単色の FP₁₁ タグを目視により選びなおした。単色の FP₁₁ タグに関しては、CFP2₁₁ は(x4)が、mNG3Asp₁₁ は(x2)が sfCherry3Csp₁₁ は(x8)が第二スクリーニングの後に選定された。ただし、単色の FP₁₁ タグでは(x1)、(x2)、(x4)、(x8)のいずれを選んでもよい。そのため、より明るく標識するために CFP2₁₁ は(x8)を、mNG3Asp₁₁ は(x8)を、sfCherry3Csp₁₁ は(x4)を用いるように変更した。sfCherry3Csp₁₁(x8)は細胞内で凝集体を形成してしまったため(x4)を採用する事にした。

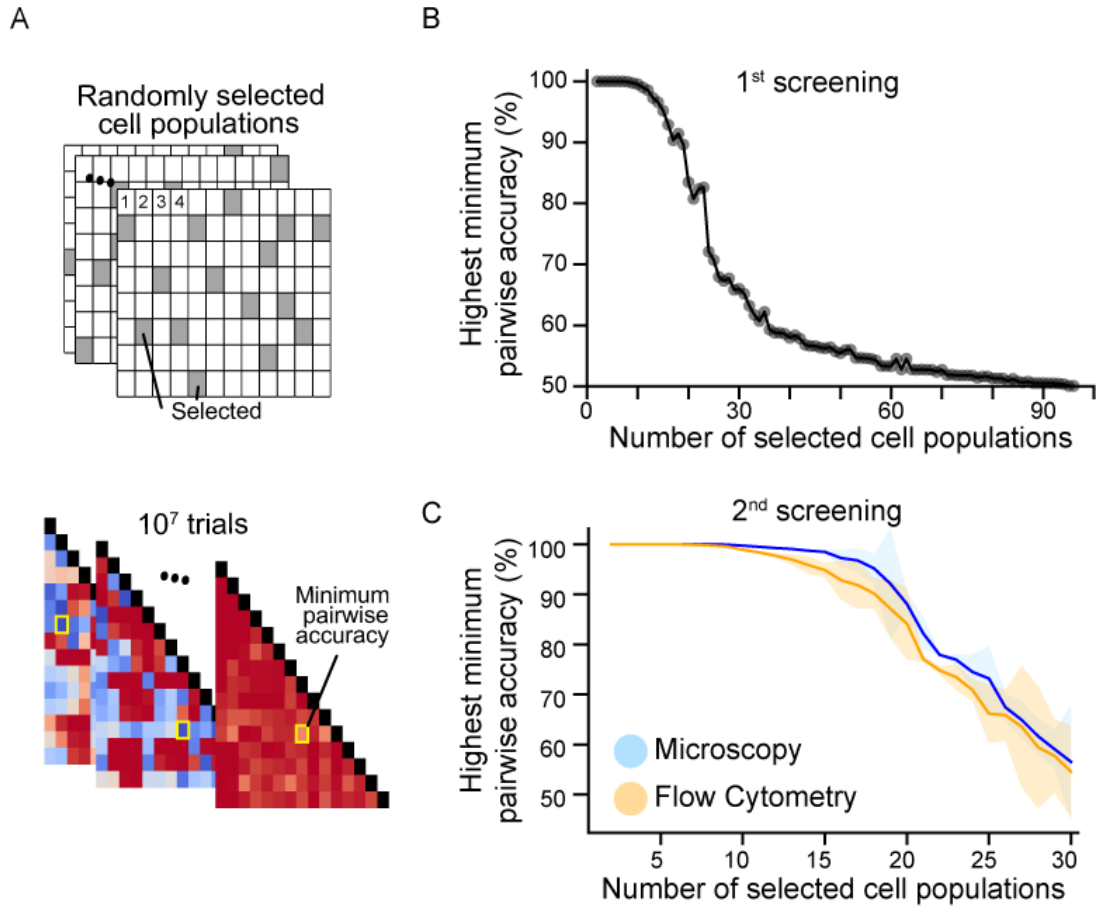


図 32. FP₁₁ タグの最適な組み合わせの選別

- (A) FP₁₁ タグ選定の計算過程の模式図。96 の細胞種からのランダムな選択によるサブ集団の形成と、最小のペアワイズ識別精度の計算過程を示す。
- (B) 細胞サブ集団のサイズ(X 軸)と最小のペアワイズ精度(Y 軸)示したプロット。10⁷ 回の試行の中で最小のペアワイズ精度が最大となった値をプロットしている。
- (C) 30 候補の細胞集団の細胞サブ集団のサイズ(X 軸)と最小のペアワイズ精度(Y 軸)示したプロット。10⁷ 回の試行の中で最小のペアワイズ精度が最大となった値をプロットしている。細胞はそれぞれ、共焦点顕微鏡（青）とフローサイトメーター（オレンジ）を用いて観察された。3 回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差を示す。

6. Caterpi 法により 20 種の細胞種が 97%の精度で識別される

6-1. Caterpi 法で蛍光標識された 20 種類の細胞観察

選定した 20 種類の FP₁₁ タグを用いて、蛍光標識された細胞種を同時観察した後に識別することを試みた。最初に、FP₁₋₁₀ を発現させる遺伝子の改良を行なった。iRFP670 の蛍光輝度を利用して FP₁₋₁₀x3 の高発現細胞を分取する方法から、IRES- Puromycin 耐性遺伝子を用いて高濃度の Puromycin 薬剤処理により細胞の選抜を行えるようにした。5 ug/mL の高濃度 Puromycin 処理後に細胞クローニングを行い、FP₁₋₁₀ 高発現 HeLa 細胞クローンを樹立した。選抜した 20 種の FP₁₁ タグをそれぞれ導入し 20 種類の蛍光標識された細胞種を作製し、共焦点顕微鏡を用いてそれぞれ別々に観察した。CFP2 の蛍光を青色、mNG3Asp の蛍光を緑色、sfCherry3Csp の蛍光を赤色で表し、重ね合わせて表示した(図 33)。一連の Caterpi 法による細胞標識を MDCK 細胞でも適用し、HeLa 細胞同様に 20 色の蛍光標識が達成されることが示された。

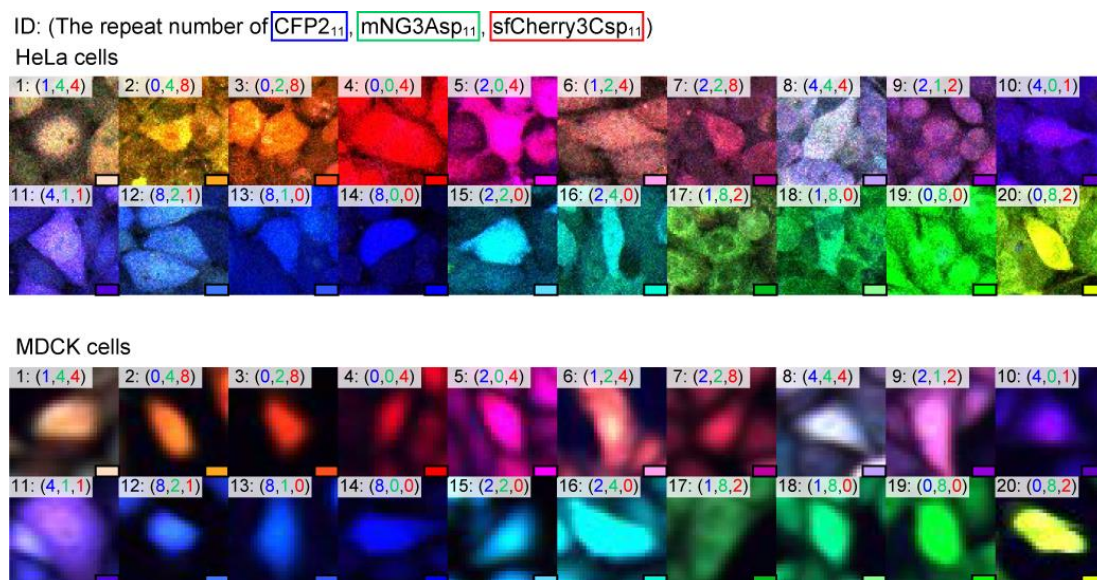


図 33. Caterpi 法を用いた細胞蛍光標識

20 種の FP₁₁ タグを用いて蛍光標識された HeLa 細胞(上)と MDCK 細胞(下)の画像。CFP2 蛍光画像を青色、mNG3Asp 蛍光画像を緑色、sfCherry3Csp 蛍光画像を赤色で表示し重ね合わせた RGB 画像。それぞれ、Leica 共焦点顕微鏡 SP8(HeLa 細胞)と EVIDENT FV10i-LIV(MDCK 細胞)を用いて撮影。画像の左上に各 FP₁₁ (CFP2₁₁、mNG3Asp₁₁、sfCherry3Csp₁₁) の繰り返し数を表示。

6-2. 20 細胞種識別のためのガウス混合モデルの学習

CFP2、mNG3Asp、sfCherry3Csp を重ね合わせた画像の最大値のプロジェクション画像を作製し、細胞分画画像ソフトである Cellpose を用いて細胞のセグメンテーションを行った。細胞セグメンテーション画像を基に各細胞の平均蛍光輝度を定量化した。各 20 種の全細胞を球面座標系に変換し、CFP2、mNG3Asp、sfCherry3Csp の蛍光輝度の相対比を意味する 2 つの角度 $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ と $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ を求めた(図 34 左)。その 2 次元の角度データにガウス混合モデルを適用し、各クラスターの特徴付けを行った。これにより、 $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ 、 $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ 座標における 20 種の細胞ラベルの境界と、そのラベルの信頼度の割り当てを求めることができ、これを視覚化した(図 34 中央、右)。学習したガウス混合モデルをテストデータに適用し、識別精度を算出したところ、97%に達することが分かった(図 35)。

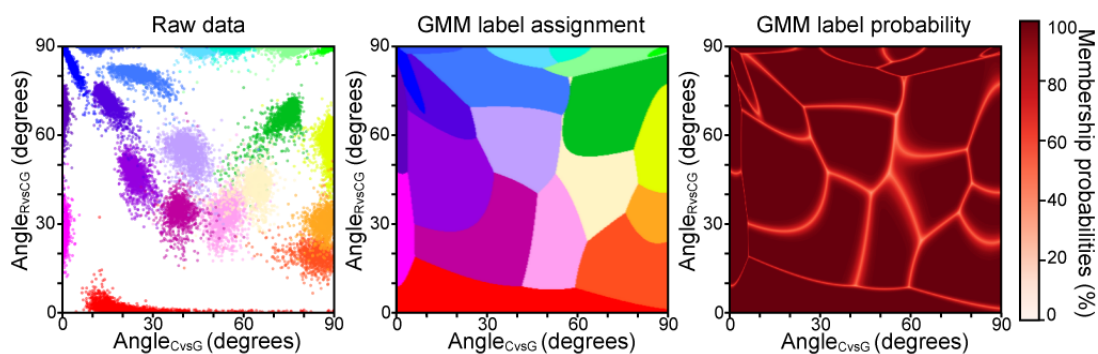


図 34. GMM を用いた 20 細胞種の識別と信頼度の割り当て

左：20 種類の異なる細胞種の $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ と $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ の分布を示す散布図。(各集団につき $n > 1000$ 細胞)。中央：ガウス混合モデル(GMM)分類に基づく $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ と $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ におけるラベル割り当て図。右： $\text{Angle}_{\text{CvsG}}$ と $\text{Angle}_{\text{RvsCG}}$ におけるラベル分類確率の割り当て図

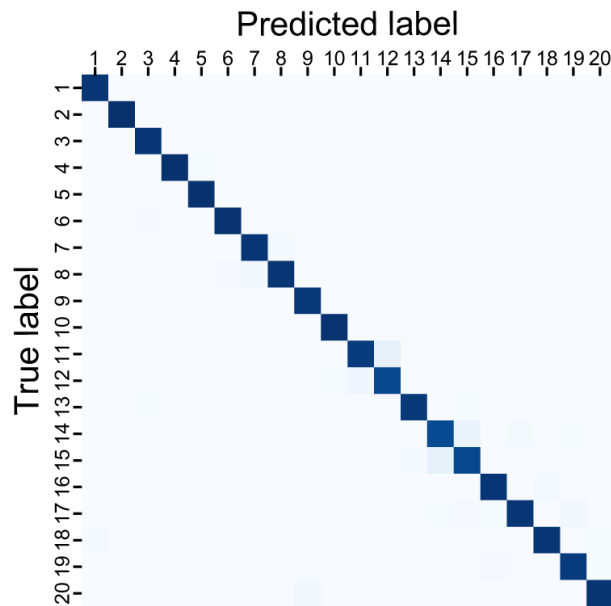


図 35. GMM を用いた 20 細胞種の識別精度

正解ラベルと予測ラベルの比較により求めた予測精度を示す混同行列。色の濃さは分類精度を示す。全体の平均精度は 97%。

6-3. 20 細胞種混合細胞の識別

20 種類の細胞種を同密度で混ぜた細胞集団を作製し、共焦点顕微鏡を用いて観察しタイリング画像を取得した(図 36A)。先ほどの学習後の GMM を用いて各細胞を 20 種の細胞種へとクラスタリングを行い、その結果をラベル画像で示した(図 36B)。同時に、細胞が 20 種の集団にクラスタリングする際の確率密度分布に基づいた、ラベル付けの信頼度を一番右の画像で示した。色が濃いほどクラスター中心に近く信頼度が高いことを意味する。まとめると Caterpi 法は 20 種類の細胞集団を 97%の精度で識別できる手法であり、ラベル付けの信頼度も同時に評価できることが示された。

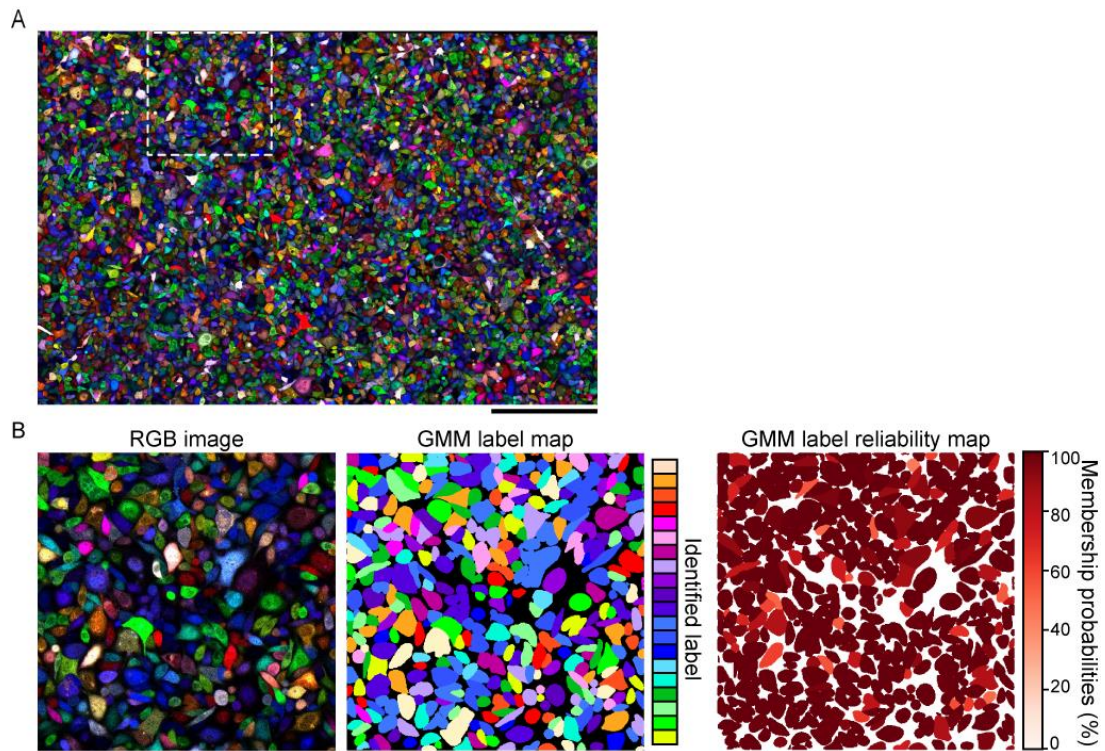


図 36. Caterpi 法を用いた 20 細胞種の識別

- (A) Caterpi 法によって標識された 20 種の HeLa 細胞を混ぜた混合細胞の高視野 RGB 画像 (CFP2：青色、mNG3Asp：緑色、sfCherry3Csp：赤色で表示)。スケールバー：500 μm 。
- (B) パネル(A)の点線領域の拡大画像(左)。訓練後の GMM モデルを適用し、20 細胞種に識別したラベルマップ(中央)。GMM ラベルの際の、分類確率を示した信頼性マップ(右)

考察

Caterpi 細胞標識法のまとめ

本研究では、split 蛍光タンパク質(split FP)の繰り返しを用いた蛍光強度変調による細胞識別技術 (Caterpi 法) を開発した。Caterpi 法では split CFP2 に加え、繰り返しによる輝度増幅率を改善した split mNG3Asp と、タンパク質の構造予測の手法により 2.5 倍 高輝度化した split sfCherry3Csp を用いた。3 種の split FP を異なる回数でつなぎ合わせた FP₁₁ タグの中から、細胞識別に最適な 20 種類の組み合わせをスクリーニングにより選定した。20 種の FP₁₁ タグで蛍光標識された細胞種は、ガウス混合モデル(GMM)により混ぜた状態から、97% の精度で識別することが可能であった。また、20 種の細胞種への分類の確率密度分布から計算される信頼度も同時に評価できることも示された。

既存の多重蛍光イメージングと Caterpi 法の比較

複数の蛍光タンパク質を組み合わせた多重蛍光標識法は、大きく 2 つの方法に分類される。1 つ目は、Cre/loxP や Flp/FRT などの組換え酵素を用いて、複数の蛍光タンパク質遺伝子の組換えが確率的に起きる現象を利用するものである(Cai et al., 2013; Ghigo et al., 2013; Livet et al., 2007; Loulier et al., 2014; Snippert et al., 2010; Tabansky et al., 2013; Veling et al., 2019)。そして、2 つ目は、トランスフェクションやウイルスを使って遺伝子を挿入し、そのゲノム挿入部位のランダム性を利用するものである(García-Marqués & López-Mascaraque, 2013; García-Moreno et al., 2014; Kumamoto et al., 2020; Sakaguchi et al., 2018; Weber et al., 2008)。これら 2 つのアプローチはいずれも多色生成のメカニズムが確率的過程に依存している。一方で、Caterpi 細胞標識法では、単一遺伝子の FP₁₁ タグにより理想的に設計された FP の組み合わせで細胞を標識するものである。この技術は、split FP を利用したことで、通常の蛍光タンパク質と比べてはるかに小さい遺伝子サイズの FP₁₁ を、様々な組み合わせで直列に繰り返すことが可能になったことで達成された。Caterpi 細胞標識法は複雑な生物現象の中で異なる細胞種を同定する場合や長期的な細胞追跡といった、正確な蛍光標識と同定が必要な場合に特に有用になる。ただし、Caterpi では、遺伝子導入法に関するさらなる検討が必要となる。具体的には、複数の FP₁₁ タグの混入を防ぎながら、各 FP₁₁ タグを標的細胞集団に選択的に導入する手法開発が必要になる。これは、単一コピーの遺伝子をゲノムに挿入することが出来る Landing Pad システム(Matreyek et al., 2020)を組み合わせることで、達成することができると考えられる。

Caterpi 細胞標識法の蝸牛管への応用

Caterpi 細胞標識法は、3 種類の限られた蛍光タンパク質を最適に組み合わせることで、FP₁₁ タグの発現量に依存せず 20 色の異なる色を生成できることを示した。split CFP2 と split mNG3Asp をメインレーザー (840 nm) で同時に二光子励起し、split sfCherry3Csp をサブレ

ーザー（1040 nm）で二光子励起可能であると予想され、多色イメージングにおける二光子顕微鏡の利用という新たな可能性を開いた。この手法を蝸牛管発生研究へ応用することにより、蝸牛管深部の個々の細胞の長期的な追跡が可能となる。第一章における蝸牛管ライブイメージングでは細胞の 3 次元動的な動態解析が困難であったため 2 次元の回転に着目したが、Caterpi 細胞標識法を用いることで、螺旋構造を形成する際の 3 次元動的な細胞動態を解明できると期待される。

FP₁₁ 繰り返しによる線形な蛍光輝度増幅に重要な要素

split FP を 8 回繰り返した FP₁₁(x8)は、理想的には線形に蛍光輝度が増幅し、FP₁₁(x1)の 8 倍のシグナル強度になるはずである。しかし、本研究では、split CFP2 を用いた場合で、蛍光輝度の中央値が約 5 倍の増加に留まった。これまでの先行研究から、線形な輝度増幅を達成するためには、FP₁₁ の融合タンパク質が重要となることが示唆される。Kamiyama らの先行研究(D. Kamiyama et al., 2016)では、 β -チューブリンに sfGFP₁₁(x3)と sfGFP₁₁(x7)をタグすることで、それぞれ 3 倍と 7 倍のシグナル増強を報告している。また、Leonetti らの先行研究(Leonetti et al., 2016)は Lamin A/C に sfGFP₁₁(x4)をタグして 4 倍の輝度増幅を達成している。一方で、Kamiyama らの先行研究(R. Kamiyama et al., 2021)では Ten-m に sfGFP₁₁(x7)をタグしたが 4 倍のシグナル増幅に留まっていた。以上のように、FP₁₁ 繰り返しによる線形な輝度増幅を達成するには、FP₁₁ に融合するタグタンパク質の最適化が必要である。

タンパク質計算モデリングを用いた split 蛍光タンパク質の改良

本研究により、split FP の改良にタンパク質構造予測の手法が有効であることが示唆された。通常の split FP の改良では、FP₁₋₁₀ と FP₁₁ の間にスペーサー配列を組み込んだ状態で突然変異誘発を起こし蛍光輝度が増加した変異体を選び取る(Feng et al., 2017)。しかし、この従来のアプローチでは、FP₁₋₁₀ と FP₁₁ をスペーサー配列でつないだ際の会合状態のタンパク質構造が、独立した FP₁₋₁₀ と FP₁₁ の会合状態のタンパク質構造とはわずかに異なる可能性がある。そのため、構造予測を用いて独立した FP₁₋₁₀ と FP₁₁ の会合状態を予測する事で、スペーサー配列を用いた場合では発見されなかったアミノ酸変異が同定できたと考えられる。この構造予測を用いた最適化は、他の split FP にも広く適用可能であり、イメージングツール開発として split FP の改良が期待される。

Caterpi 法の今後の可能性と課題

Caterpi 法による細胞識別数は、青色や近赤外光の蛍光を持つ split FP の開発と細胞内局在を活用した融合タンパク質の利用により、大幅に増加していく可能性がある。また、細胞分類モデルに用いる機械学習手法を改良することで識別精度は向上していき、より定量的かつ正確なデータ解析が可能になると期待できる。Caterpi 細胞標識法は、設計された蛍光色を用いて細胞を標識し識別することができるため、発生生物学、免疫学、細胞生物学など

の多様な分野における複雑な生命現象の研究に貢献する新たな手法となる。

著者役割

本研究は申請者が立案し、実験を行った成果をまとめたものである。しかし、`split`
`sfCherry` の構造予測を用いた変異体探索の部分のみは金城智章博士に行なっていただいた。

謝辞

本研究および論文作成を進める上で、多くのご指導を下さった松田道行教授、シンガポール国立大学メカノバイオロジー研究所の平島剛志博士に深くお礼申し上げます。

第一章の研究を進める上で、蝸牛管の解剖方法や貴重なご意見を頂きました京都先端科学大学の楯谷智子教授、第二章の **split** 蛍光タンパク質の構造予測による変異探索を行なっていただいたノースカロライナ大学の **Brian Kuhlman** 教授、金城智章博士、実験に関する議論をしていただいた徳島大学の寺井健太教授、また細胞分類の機械学習手法に関する議論を交わしていただきました青木一洋教授、名古屋大学の近藤洋平講師に心より感謝申し上げます。

そして、日々の研究生生活の中で大変お世話になった生体制御学研究室、細胞周期学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、研究遂行にあたり、日本学術振興会特別研究員制度のご支援を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。

石井 衛

連絡先: ishii.mamoru.77c@gmail.com

本学位論文は以下の学術論文に基づいて書かれたものである。

Mamoru Ishii, Tomoko Tateya, Michiyuki Matsuda, Tsuyoshi Hirashima

Retrograde ERK activation waves drive base-to-apex multicellular flow in murine cochlear duct morphogenesis

eLife, 10:e61092, 2021

参考文献

- Abe, T., Kiyonari, H., Shioi, G., Inoue, K. I., Nakao, K., Aizawa, S., & Fujimori, T. (2011). Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging. *Genesis*, 49(7), 579–590.
- Akagi, T., Sasai, K., & Hanafusa, H. (2003). Refractory nature of normal human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13567–13572.
- Aoki, K., Kondo, Y., Naoki, H., Hiratsuka, T., Itoh, R. E., & Matsuda, M. (2017). Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. *Developmental Cell*, 43(3), 305–317.e5.
- Barrett, S. D., Bridges, A. J., Dudley, D. T., Saltiel, A. R., Fergus, J. H., Flamme, C. M., Delaney, A. M., Kaufman, M., LePage, S., Leopold, W. R., Przybranowski, S. A., Sebolt-Leopold, J., Van Becelaere, K., Doherty, A. M., Kennedy, R. M., Marston, D., Howard, W. A., Smith, Y., Warmus, J. S., & Tecle, H. (2008). The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(24), 6501–6504.
- Barupal, D. K., & Fiehn, O. (2019). Generating the blood exposome database using a comprehensive text mining and database fusion approach. *Environmental Health Perspectives*, 127(9), 2825–2830.
- Benjamin Stranges, P., & Kuhlman, B. (2013). A comparison of successful and failed protein interface designs highlights the challenges of designing buried hydrogen bonds. *Protein Science*, 22(1), 74–82.
- Bok, J., Zenczak, C., Hwang, C. H., & Wu, D. K. (2013). Auditory ganglion source of Sonic hedgehog regulates timing of cell cycle exit and differentiation of mammalian cochlear hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), 13869–13874.
- Boockock, D., Hino, N., Ruzickova, N., Hirashima, T., & Hannezo, E. (2021). Theory of mechanochemical patterning and optimal migration in cell monolayers. *Nature Physics*, 17(2), 267–274.
- Cabantous, S., Terwilliger, T. C., & Waldo, G. S. (2005). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 23(1), 102–107.

Cai, D., Cohen, K. B., Luo, T., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2013). Improved tools for the Brainbow toolbox. *Nature Methods*, 10(6), 540–547.

Chen, P., Johnson, J. E., Zoghbi, H. Y., & Segil, N. (2002). The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development*, 129(10), 2495–2505.

Cho, N. H., Cheveralls, K. C., Brunner, A. D., Kim, K., Michaelis, A. C., Raghavan, P., Kobayashi, H., Savy, L., Li, J. Y., Canaj, H., Kim, J. Y. S., Stewart, E. M., Gnann, C., McCarthy, F., Cabrera, J. P., Brunetti, R. M., Chhun, B. B., Dingle, G., Hein, M. Y., ... Leonetti, M. D. (2022). OpenCell: Endogenous tagging for the cartography of human cellular organization. *Science*, 375(6585).

Cohen, R., Amir-Zilberstein, L., Hersch, M., Woland, S., Loza, O., Taiber, S., Matsuzaki, F., Bergmann, S., Avraham, K. B., & Sprinzak, D. (2020). Mechanical forces drive ordered patterning of hair cells in the mammalian inner ear. *Nature Communications*, 11(1).

Driver, E. C., Northrop, A., & Kelley, M. W. (2017). Cell migration, intercalation and growth regulate mammalian cochlear extension. *Development (Cambridge)*, 144(20), 3766–3776.

Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Žídek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstein, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E., Kohli, P., Jumper, J., & Hassabis, D. (2021). *Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer*. *bioRxiv*.
doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>

Feng, S., Sekine, S., Pessino, V., Li, H., Leonetti, M. D., & Huang, B. (2017). Improved split fluorescent proteins for endogenous protein labeling. *Nature Communications*, 8(1).

Feng, S., Varshney, A., Coto Villa, D., Modavi, C., Kohler, J., Farah, F., Zhou, S., Ali, N., Müller, J. D., Van Hoven, M. K., & Huang, B. (2019). Bright split red fluorescent proteins for the visualization of endogenous proteins and synapses. *Communications Biology*, 2(1), 1–12.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattajt, L. W., & Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev Activation Domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82(3), 475–483.

García-Marqués, J., & López-Mascaraque, L. (2013). Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity. *Cerebral Cortex*, 23(6), 1463–1472.

García-Moreno, F., Vasistha, N. A., Begbie, J., & Molnár, Z. (2014). CLoNe is a new method to target single progenitors and study their progeny in mouse and chick. *Development (Cambridge)*, 141(7), 1589–1598.

Ghigo, C., Mondor, I., Jorquera, A., Nowak, N. J., Wienert, S., Zahner, S. P., Clausen, B. E., Luche, H., Malissen, B., Klauschen, F., & Bajénoff, M. (2013). Multicolor fate mapping of langerhans cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 210(9), 1657–1664.

Goudeau, J., Sharp, C. S., Paw, J., Savy, L., Leonetti, M. D., York, A. G., Updike, D. L., Kenyon, C., & Ingaramo, M. (2021). Split-wrmScarlet and split-sfGFP: tools for faster, easier fluorescent labeling of endogenous proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 217(4).

Groves, A. K., & Fekete, D. M. (2012). Shaping sound in space: The regulation of inner ear patterning. *Development*, 139(2), 245–257.

Harvey, C. D., Ehrhardt, A. G., Cellurale, C., Zhong, H., Yasuda, R., Davis, R. J., & Svoboda, K. (2008). A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19264–19269.

Hino, N., Rossetti, L., Marín-Llauradó, A., Aoki, K., Trepát, X., Matsuda, M., & Hirashima, T. (2020). ERK-Mediated Mechanochemical Waves Direct Collective Cell Polarization. *Developmental Cell*, 53(6), 646-660.e8.

Hirashima, T., & Adachi, T. (2019). Polarized cellular mechano-response system for maintaining radial size in developing epithelial tubes. *Development (Cambridge)*, 146(23).

Hiratsuka, T., Fujita, Y., Naoki, H., Aoki, K., Kamioka, Y., & Matsuda, M. (2015). Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *ELife*, 2015(4), 1–18.

Johnson, A. B., Fogel, N. S., & Lambert, J. D. (2019). Growth and morphogenesis of the gastropod shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 6878–6883.

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3 PART 2), 499–509.
- Kamiyama, D., Sekine, S., Barsi-Rhyne, B., Hu, J., Chen, B., Gilbert, L. A., Ishikawa, H., Leonetti, M. D., Marshall, W. F., Weissman, J. S., & Huang, B. (2016). Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein. *Nature Communications*, 7, 1–9.
- Kamiyama, R., Banzai, K., Liu, P., Marar, A., Tamura, R., Jiang, F., Fitch, M. A., Xie, J., & Kamiyama, D. (2021). Cell-type-specific, multicolor labeling of endogenous proteins with split fluorescent protein tags in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(23), 1–11.
- Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., & Mishina, M. (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Developmental Cell*, 7(1), 133–144.
- Kim, J. H., Lee, S. R., Li, L. H., Park, H. J., Park, J. H., Lee, K. Y., Kim, M. K., Shin, B. A., & Choi, S. Y. (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE*, 6(4), 1–8.
- Köker, T., Fernandez, A., & Pinaud, F. (2018). Characterization of Split Fluorescent Protein Variants and Quantitative Analyses of Their Self-Assembly Process. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15.
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., & Matsuda, M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Molecular Biology of the Cell*, 22(23), 4647–4656.
- Komatsu, N., Terai, K., Imanishi, A., Kamioka, Y., Sumiyama, K., Jin, T., Okada, Y., Nagai, T., & Matsuda, M. (2018). A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14.

Kumamoto, T., Maurinot, F., Barry-Martinet, R., Vaslin, C., Vandormael-Pournin, S., Le, M., Lerat, M., Niculescu, D., Cohen-Tannoudji, M., Rebsam, A., Loulier, K., Nedelec, S., Tozer, S., & Livet, J. (2020). Direct Readout of Neural Stem Cell Transgenesis with an Integration-Coupled Gene Expression Switch. *Neuron*, 107(4), 617-630.e6.

Leonetti, M. D., Sekine, S., Kamiyama, D., Weissman, J. S., & Huang, B. (2016). A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(25), E3501–E3508.

Liu, L., Spurrier, J., Butt, T. R., & Strickler, J. E. (2008). Enhanced protein expression in the baculovirus/insect cell system using engineered SUMO fusions. *Protein Expression and Purification*, 62(1), 21–28.

Liu, Z., Owen, T., Zhang, L., & Zuo, J. (2010). Dynamic expression pattern of sonic hedgehog in developing cochlear spiral ganglion neurons. *Developmental Dynamics*, 239(6), 1674–1683.

Livet, J., Weissman, T. A., Kang, H., Draft, R. W., Lu, J., Bennis, R. A., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166), 56–62.

Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Franc, Y. Le, Supatto, W., Matho, K. S., Ieng, S., Fouquet, S., Dupin, E., Benosman, R., Chédotal, A., Beaurepaire, E., Morin, X., & Livet, J. (2014). Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron*, 81(3), 505–520.

Manoussaki, D., Chadwick, R. S., Ketten, D. R., Arruda, J., Dimitriadis, E. K., & O'malley, J. T. (2008). The influence of cochlear shape on low-frequency hearing. In *PNAS* (Vol. 105, Issue 16).

Mao, Y., Mulvaney, J., Zakaria, S., Yu, T., Morgan, K. M., Allen, S., Basson, M. A., Francis-West, P., & Irvine, K. D. (2011). Characterization of a Dchs1 mutant mouse reveals requirements for Dchs1-Fat4 signaling during mammalian development. *Development*, 138(5), 947–957.

Matreyek, K. A., Stephany, J. J., Chiasson, M. A., Hasle, N., & Fowler, D. M. (2020). An improved platform for functional assessment of large protein libraries in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 48(1), 1–12.

Montcouquiol, M., & Kelley, M. W. (2020). Development and patterning of the cochlea: From convergent extension to planar polarity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(1).

Ogura, Y., Wen, F. L., Sami, M. M., Shibata, T., & Hayashi, S. (2018). A Switch-like Activation Relay of EGFR-ERK Signaling Regulates a Wave of Cellular Contractility for Epithelial Invagination. *Developmental Cell*, 46(2), 162-172.e5.

Pauley, S., Wright, T. J., Pirvola, U., Ornitz, D., Beisel, K., & Fritzsche, B. (2003). Expression and function of FGF10 in mammalian inner ear development. *Developmental Dynamics*, 227(2), 203–215.

Pirvola, U., Spencer-Dene, B., Xing-Qun, L., Kettunen, P., Thesleff, I., Fritzsche, B., Dickson, C., & Ylikoski, J. (2000). FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *Journal of Neuroscience*, 20(16), 6125–6134.

Qian, D., Jones, C., Rzadzinska, A., Mark, S., Zhang, X., Steel, K. P., Dai, X., & Chen, P. (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Developmental Biology*, 306(1), 121–133.

Raup, D. M., & Michelson, A. (1965). Theoretical morphology of the coiled shell. *Science*, 147(3663), 1294–1295.

Riedl, J., Flynn, K. C., Raducanu, A., Gärtner, F., Beck, G., Bösl, M., Bradke, F., Massberg, S., Aszodi, A., Sixt, M., & Wedlich-Söldner, R. (2010). Lifeact mice for studying F-actin dynamics. In *Nature Methods* (Vol. 7, Issue 3, pp. 168–169).

Saburi, S., Hester, I., Fischer, E., Pontoglio, M., Eremina, V., Gessler, M., Quaggin, S. E., Harrison, R., Mount, R., & McNeill, H. (2008). Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nature Genetics*, 40(8), 1010–1015.

Saffer, A. M., Carpita, N. C., & Irish, V. F. (2017). Rhamnose-Containing Cell Wall Polymers Suppress Helical Plant Growth Independently of Microtubule Orientation. *Current Biology*, 27(15), 2248-2259.e4.

Sakaguchi, R., Leiwe, M. N., & Imai, T. (2018). Bright multicolor labeling of neuronal circuits with fluorescent proteins and chemical tags. *ELife*, 7, 1–28.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.

Serra-Picamal, X., Conte, V., Vincent, R., Anon, E., Tambe, D. T., Bazellieres, E., Butler, J. P., Fredberg, J. J., & Trepap, X. (2012). Mechanical waves during tissue expansion. *Nature Physics*, 8(8), 628–634.

Shcherbakova, D. M., & Verkhusha, V. V. (2013). Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nature Methods*, 10(8), 751–754.

Smyth, D. R. (2016). Helical growth in plant organs: Mechanisms and significance. *Development (Cambridge)*, 143(18), 3272–3282.

Snippert, H. J., van der Flier, L. G., Sato, T., van Es, J. H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A. M., van Rheenen, J., Simons, B. D., & Clevers, H. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 143(1), 134–144.

Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021). Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, 18(1), 100–106.

Sun, L., Tran, N., Liang, C., Tang, F., Rice, A., Schreck, R., Waltz, K., Shawver, L. K., McMahon, G., & Tang, C. (1999). Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3- or 4- carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidenyl]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptor tyrosine kinases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(25), 5120–5130.

Tabansky, I., Lenarcic, A., Draft, R. W., Loulier, K., Keskin, D. B., Rosains, J., Rivera-Feliciano, J., Lichtman, J. W., Livet, J., Stern, J. N. H., Sanes, J. R., & Eggan, K. (2013). Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Current Biology*, 23(1), 21–31.

Tamura, R., Jiang, F., Xie, J., & Kamiyama, D. (2021). Multiplexed labeling of cellular proteins with split fluorescent protein tags. *Communications Biology*, 4(1), 1–8.

Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Hamaguchi, K., Torii, H., Ito, J., & Kageyama, R. (2013). Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Development (Cambridge)*, 140(18), 3848–3857.

Tateya, T., Sakamoto, S., Ishidate, F., Hirashima, T., Imayoshi, I., & Kageyama, R. (2019). Three-dimensional live imaging of *Atoh1* reveals the dynamics of hair cell induction and organization in the developing cochlea. *Development (Cambridge)*, 146(21).

Thompson DW (1942) On Growth and Form (Book)

Tyka, M. D., Keedy, D. A., André, I., Dimaio, F., Song, Y., Richardson, D. C., Richardson, J. S., & Baker, D. (2011). Alternate states of proteins revealed by detailed energy landscape mapping. *Journal of Molecular Biology*, 405(2), 607–618.

Urness, L. D., Wang, X., Doan, H., Shumway, N., Noyes, C. A., Gutierrez-Magana, E., Lu, R., & Mansour, S. L. (2018). Spatial and temporal inhibition of FGFR2b ligands reveals continuous requirements and novel targets in mouse inner ear morphogenesis. *Development (Cambridge)*, 145(24).

Urness, L. D., Wang, X., Shibata, S., Ohyama, T., & Mansour, S. L. (2015). Fgf10 is required for specification of non-sensory regions of the cochlear epithelium. *Developmental Biology*, 400(1), 59–71.

Veling, M. W., Li, Y., Veling, M. T., Litts, C., Michki, N., Liu, H., Ye, B., & Cai, D. (2019). Identification of Neuronal Lineages in the Drosophila Peripheral Nervous System with a “Digital” Multi-spectral Lineage Tracing System. *Cell Reports*, 29(10), 3303-3312.e3.

Wada HMatsumoto D (2018) Twisting Growth in Plant Roots Plant Biomechanics (Book)

Wang, J., Mark, S., Zhang, X., Qian, D., Yoo, S. J., Radde-Gallwitz, K., Zhang, Y., Lin, X., Collazo, A., Wynshaw-Boris, A., & Chen, P. (2005). Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nature Genetics*, 37(9), 980–985.

Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C., & Fehse, B. (2008). A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular Therapy*, 16(4), 698–706.

Wu, D. K., & Kelley, M. W. (2012). Molecular mechanisms of inner ear development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8).

Yamamoto, N., Okano, T., Ma, X., Adelstein, R. S., & Kelley, M. W. (2009). Myosin II regulates extension, growth and patterning in the mammalian cochlear duct. *Development*, 136(12), 1977–1986.

Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., & Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature Methods*, 6(5), 363–369.

Zhou, S., Feng, S., Brown, D., & Huang, B. (2020). Improved yellow-green split fluorescent proteins for protein labeling and signal amplification. *PLoS ONE*, 15(11 November), 1–13.