

2022年度 生物学セミナーE (前半) スケジュール

日付	Luria-Delbrück の実験	イメージング
10/31	1. 概要説明 2. (+) Streptomycin plate に大腸菌をまく 3. (-) Streptomycin plate に大腸菌をまく	-
11/1	1. コロニーカウントとPoisson分布の考察 2. Streptomycin 耐性株の植菌 3. 変異率についての考察	-
11/2	1. ゲノムDNA調製 2. PCR (反応中に実験原理などの解説) 3. 電気泳動 4. Sequencing (時間的に可能ならやる)	-
11/3	休み	休み
11/4	11/2 にできなかった場合はTAがSequencing	-
11/5	休み	休み
11/6	休み	休み
11/7	シーケンス結果の確認と解析	-
11/8		1. 蛍光顕微鏡の説明 2. 色々なオルガネラの撮影 3. ImageJ 入門： 画像の基礎 電気泳動度の定量 HeLa細胞の核の同定 自作マクロの作り方
11/9		細胞伸長の定量
11/10	予備日	予備日

# 実習プロトコル1

## <大腸菌を用いてPoisson分布を体感する>

Day 0 by TA

1. LB 培地 1 mL に 大腸菌 (XL10 Gold株) を植菌する. 培養温度は 37°C.

Day 1 by TA

2. 一晩培養したカルチャーを LB 培地で100倍希釈して 37°C で培養を続ける. 2-3 時間くらい経ったところで実習開始.

Day 1

3. 各自渡された大腸菌サンプルの OD<sub>600</sub> を測定する. 1 OD<sub>600</sub> は  $4 \times 10^8$  cells/mL に対応.

4. 大腸菌の密度が 300 cells / mL になるように LB 培地で希釈する.

5. 100  $\mu$ L の細胞懸濁液を LB 寒天培地に撒いて塗り広げる. 一人当たり 10 枚.

6. 37°C のチャンバーにプレートを手置きして一晩培養する.

Day 2

7. 自分のプレート10枚について, 形成されたコロニーの数をカウントする. コロニー数とコロニー数の2乗を表に書き込み, それらの平均 ( $a$  および  $b$  とする) を計算する. 標本分散の値は  $b - a^2$  で計算できる. 不偏分散は, サンプル数を  $n$  とすると  $\frac{n}{n-1}(b - a^2)$  で求められる. コロニー数平均と不偏

分散の値を比較してみよう. 分散を平均で割った値 ( $\sigma^2/\mu$ ) は Fano factor, Dispersion index などと呼ばれ, 確率分布の分散性を表現する指標である. 理想的には今回の実験ではこの値が 1 になるはずである. 自分の結果がどうなっているか計算してみよう.

### <不偏推定量> unbiased estimator

標本から測定した推定量の期待値が, 母集団のそれと等しいとき, その推定量を不偏推定量と呼ぶ. 標本平均は母集団平均の不偏推定量であるが, 標本分散は母集団分散の不偏推定量ではない.

Plate #	コロニー数	コロニー数の2乗
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
平均	$a$ :	$b$ :
不偏分散		

## 実習プロトコル2

### <Luria-Delbrück Fluctuation Test>

———— Day 0 by TA ————

1. LB 液体培地で培養した大腸菌を 10 cells/mL に調整して, 96-well deep well plate に 0.5 mL ずつ分注する (x 2 plates). 37°C で 24時間振盪培養する.

———— Day 1 ————

2. いくつかの well のOD<sub>600</sub>を測定する. 一つの well の中でどれくらいの細胞周期(世代)イベントが発生したのかを見積もる. 1 OD<sub>600</sub> は  $4 \times 10^8$  cells/mL に対応する.

### Total cell cycles ~ $N$

3. 培養液全量を, 50  $\mu$ g/mL の streptomycin を含む LB 寒天培地にまく. 一人当たり 12 個の well を適当に選んでプレーティングする. 37°C のインキュベータで1日培養する.

———— Day 2 ————

4. 生えてきたコロニーの数を集計する. コロニー数の分布のばらつきを評価する. 変異率の見積もりのために重要なのは, コロニーが生えなかったプレートの割合.

5. コロニーを 50  $\mu$ g/mL の streptomycin を含む LB 液体培地 0.5 mL に植える. 37°Cで一晩振盪培養する.

———— Day 3 ————

6. 大腸菌のゲノムDNAを調製する. DNA purification Kit (#A1120, Promega) を用いる.

6-1. 1.5 mL のエッペンチューブに培養液を全量回収する.

6-2. 10,000 rpm で 1 分間遠心し, 菌体を沈殿させて上澄をピペットマンで除く.

6-3. Nuclei Lysis Solution を 300  $\mu$ L 加えてよく懸濁する.

6-4. 80°C で 5 分間加熱する. 菌体が溶解してサンプルの透明度が増すはず.

6-5. 10 mg/mL の RNase 溶液を 1.5  $\mu$ L 添加し, 転倒攪拌した後, 37°Cで15 分間静置する.

6-6. 100  $\mu$ L の Protein Precipitation Solution を加え, ボルテックスでよく混ぜる.

6-7. サンプルを冷蔵庫に入れて5分間冷却する.

6-8. 15,000 rpm で3分間遠心し, 変性したタンパク質を沈殿させる.

6-9. 沈殿物が入らないように注意しながら上澄をピペットマンで新しいエッペンチューブに移す.

6-10. Isopropanol 300  $\mu$ L を加え, ゆっくりと転倒攪拌すると, DNAが析出する.

6-11. 15000 rpm で 2分間遠心してDNAを沈降させ, 上澄をデカンテーションで捨てる.

6-12. 70% ethanol を 300  $\mu$ L加え, デカンテーションで捨てる.

6-13. 残った液をスピンドウンして, ピペットマンを用いて完全に吸い取る.

6-12. チューブの蓋を開けたまま15分間風乾させる.

6-13. TEを 50  $\mu$ L 加え, 65°Cで加熱してDNAを溶解する.

6-14. 15分経過したところで一度ボルテックスする. さらに15分間65°Cで加熱する.

## 7. PCRと電気泳動

反応組成は以下の通り. rpsL は primer 500, 501, gidB は primer 502, 503 を使う.  
反応条件は以下の通り. 約1時間かかる.

試薬	体積 / $\mu\text{L}$			
2x Go Taq Master Mix	10	95°C	3 min	
MilliQ water	10	95°C	30 sec	
Primer fwd (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.4	55°C	30 sec	25 cycles
Primer rev (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.4	72°C	45 sec	
gDNA	2	72°C	3 min	

primer500	ACACCTTTTCGGCATCGCCCT	rpsL
primer501	GCATGGAAATACTCCGTTGTTAA	rpsL
primer502	CGTAGCGCATAACGCATTAAAAATG	gidB
primer503	CCAGTTATATCAGTAGAAACCTGGT	gidB

反応が終わったら 2  $\mu\text{L}$  をアガロースゲル電気泳動し, gel Red で染色する.

8. カラム精製とDNAシーケンスの発注 (TAがやる). Primer 500, 502 を使う.

9. シーケンス結果の確認は次週に行う.

# ImageJ 入門

ImageJは、アメリカ国立衛生研究所（NIH）でWayne Rasbandにより開発が始められた。最初のリリースは1997年である。オープンソース[注1]でパブリックドメイン[注2]の画像処理ソフトウェアである。Javaの仮想マシン上で動作し、プラグインやマクロによる拡張性が高い。科学研究における画像解析に広く利用され、生物学ではデファクト・スタンダードの解析ツールとなっている。

ImageJを使って解析した結果・画像を論文に掲載する際には、論文に次の引用を行うことが推奨されている。ダウンロードは無料であるが、こうした形でのクレジットが助成金を得て開発を続行するために今後も必要となる。

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". Nature Methods 9, 671-675, 2012.

[注1] オープンソース(英: open source): コンピュータソフトウェアをバイナリプログラムのみの配布ではなく、プログラムの設計図であるソースコードが入手でき、目的を問わず利用、修正、頒布できることの明示的な許可および、それを利用する個人や団体の努力、利益を遮ることがないライセンスを適用したコンピュータソフトウェアと、そのソフトウェア開発の手法。

[注2] パブリックドメイン(public domain): 著作物や発明などの知的創作物について、知的財産権が発生していない状態または消滅した状態のことをいう。日本語訳として公有という語が使われることがある。

<以上 Wikipedia より引用>



実際には Fiji という ImageJ の拡張版をお勧めする (<https://fiji.sc/>)。

Fiji is an image processing package — a "batteries-included" distribution of ImageJ, bundling many plugins which facilitate scientific image analysis.

Built-in Macro Functions という強力な関数群が提供されており、アイデア次第でかなり色々なことができる。( <https://imagej.nih.gov/ij/developer/macro/functions.html> )

## 【実習】

自分の PC に Fiji をダウンロード・インストールする。

Windows 用と Mac OS 用があるので注意。Linux 用もある。

既にインストールされている場合はやらなくてよい。

## 1. 画像データの特徴

File > Open Samples > Blobs

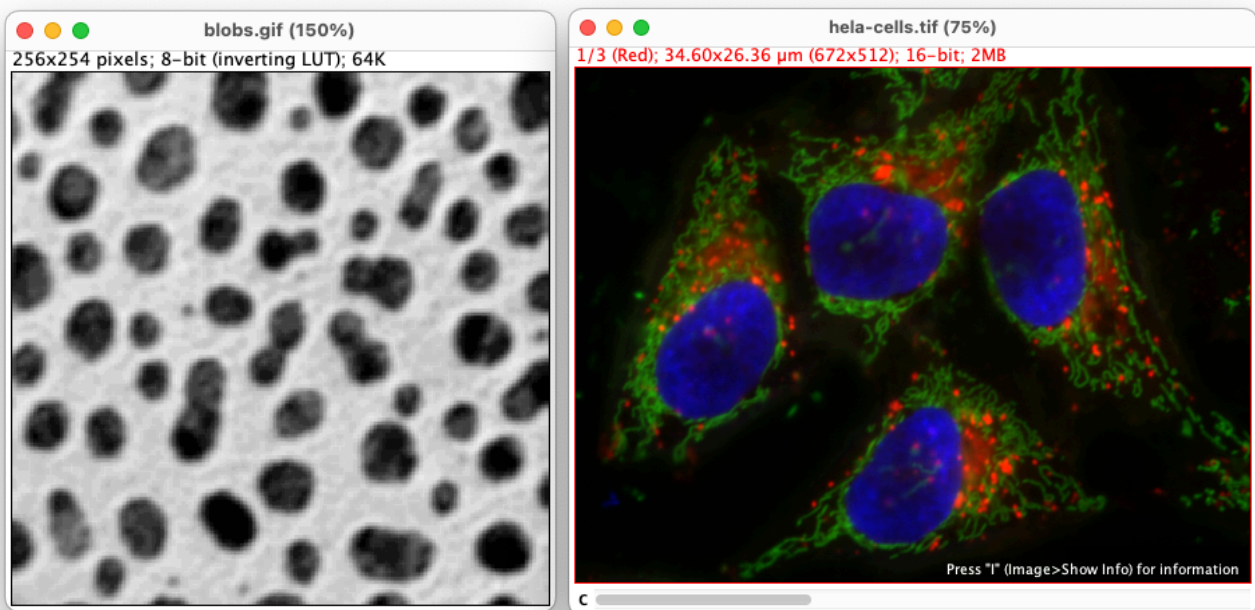
File > Open Samples > HeLa Cells (48-bit RGB)

■ カラー・グレースケール

■ bit depth

■ 画像におけるピクセル座標

■ 画像の保存形式 (TIFF, JPG, PNGなど)



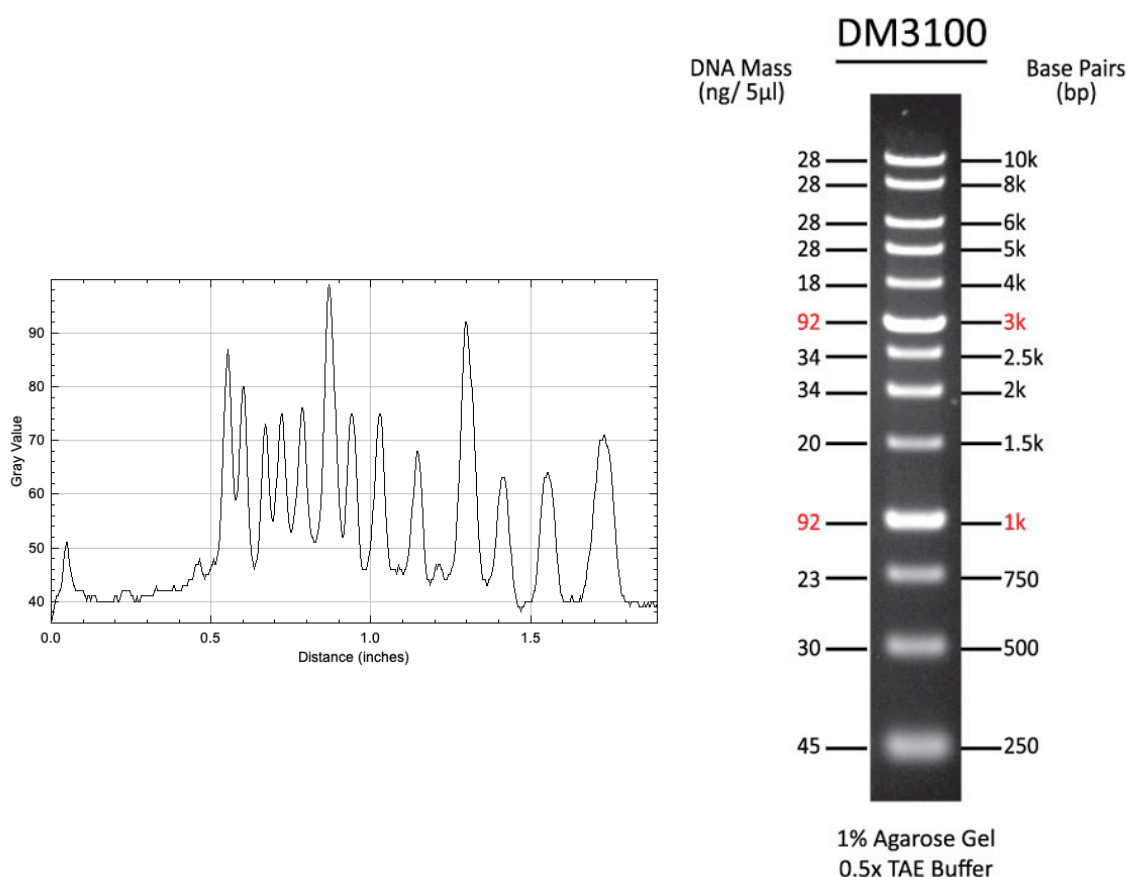
---

Memo

## 2. DNAアガロースゲル電気泳動写真の解析

- 電気泳動の写真を読み込む. File > Open . . .
- マーカーのレーン上で直線を引いて, Analyze > Plot Profile . . . で見てみる.
- プロットにカーソルを合わせると座標が下の方に表示されるはず. 13本のピークの「X座標」をExcel/Numbers/メモ帳などを使って記録する.
- 下図のマーカー情報に従って, それぞれのピークに対応するDNAの長さを入力する.

Distance/inch	Length/bp
0.553	10000
???	???
???	???

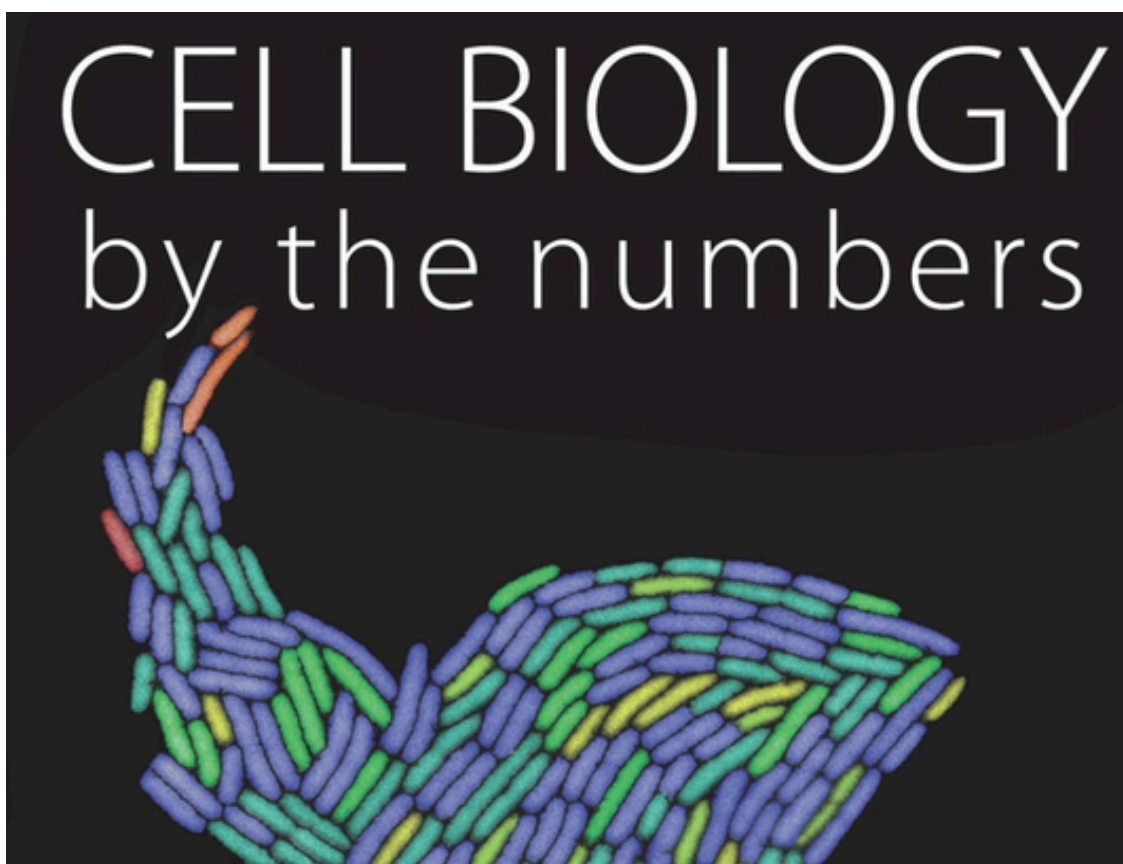


- ImageJ の Curve fitting 機能を使って泳動度とDNAの長さの関係を知る. Analyze > Tools > Curve Fitting . . .  
どのモデルでフィッティングすれば良いか知っていますか??
- フィッティングの結果を使って, 目的のPCR産物の長さを推定する. ここでMacro recorder の使い方を説明するので, それに従って進める.

### 3. HeLa のサンプル画像を使った segmentation

File > Open Samples > HeLa Cells (48-bit RGB)

- Segmentation は画像解析の中でも頻出の課題.
- 画像ごとの特徴をよく理解して様々な戦略をとる.
- 今回の実習ではフィルタを使う方法を主に解説しつつ, ピクセルに直接アクセスする方法も示す.
- For loop と if 文は是非理解する. これだけで多くのことができるようになる.
- 機械学習については今回の実習では触れないが, 興味があれば調べてみるとよい. FijiのPlugin の中にも簡便な機械学習機能がある (Trainable Weka Segmentation).



### 4. 自作マクロにショートカットキーを割り当てる

File > Open Samples > Embryo

- マニュアル操作とオートメーションを組み合わせた作業の効率化は有効な手段
- String (文字列) の概念も理解しておく役立つ



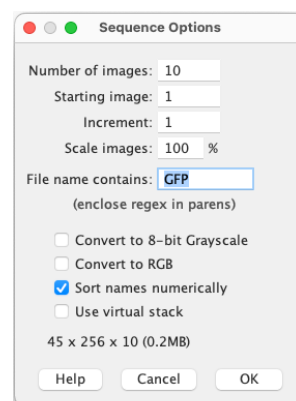
# 分裂酵母細胞タイムラプスデータの解析

マイクロ流体デバイスを用いて撮影した分裂酵母のタイムラプス画像の解析を通じて、様々なプログラミングを体験する。基本的には imageJ macro language を用いるが、適宜エクセルなど他のソフトを使ってもよい。

1. 各自担当する画像データを受け取る。Pos0\_x (x = 1,2,3,4,5) という名前のついたフォルダをPCの適当な場所に保存する。保存先のパス名に日本語が含まれない方が無難。GFPxxxx.tif および RFPxxxx.tif がそれぞれ1983枚ずつ含まれていることを確認する。

2. Fiji を起動する。

3. File > Import > Image Sequence でPos0\_x フォルダを選択すると右のようなポップアップが出るので、Number of images: のボックスに10程度の小さめの数、File name contains: のボックスに GFP と入力して OK ボタンをクリック。



4. 細胞の segmentation を行うマクロを説明に従って作っていく。

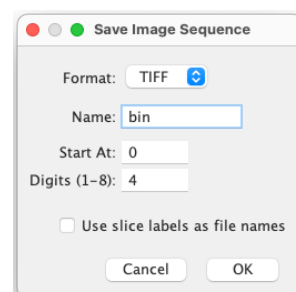
**[重要]** マクロを開発中に書き換えたら、逐一 **Plugins > Macros > Install** で再インストールしなければならない。

5. マクロができれば GFP 画像 1983 枚を全て image sequence として開いた上で、マクロを走らせる。3分程度かかる。

6. 白黒画像ができれば、image sequence として保存する。

File > Save as > Image sequence

Name: は何でも良いが(ただし GFP と RFP は不可)、ここでは bin としておく。GFP 画像が保存されているフォルダ内に保存する。



7. 細胞系列をトラッキングするマクロを作成する。

ROI manager を開き直す必要があるときは、

Analyze > Tools > ROI Manager

8. Cell size trajectory を見て、白黒画像の修正が必要であればマニュアルで行う。

Pencil Tool の色を黒にして、マウス操作で細胞の輪郭を書き足す。輪郭を消す必要がある場合には Pencil toolの色を白にする。修正した白黒画像は上書き保存する。Step 6 と同じように保存すれば (Name を Step 6 で設定したものと同じにすることを忘れないように)、上書き保存するかどうか聞かれるのでOKにする。

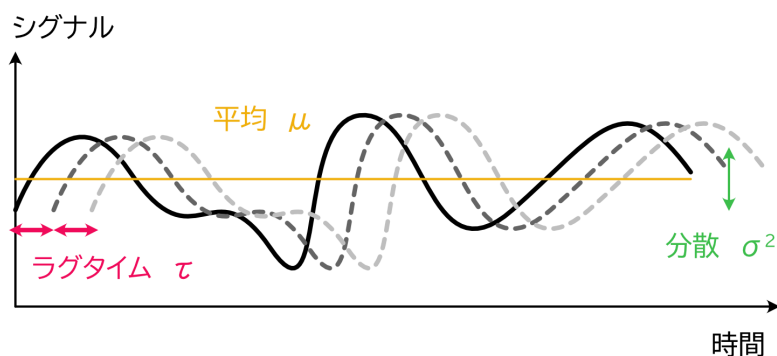
9. トラッキングをやり直して、修正が反映されているか確認する。

10. 問題なければ Results table を保存する。拡張子は .txt を推奨。

11. 解析用のマクロ・プログラムを作る。解析したい内容は以下。

- 細胞周期の長さの平均とばらつき(CV)
- 細胞サイズ・GFP・RFPのヒストグラム
- 細胞が生まれた時のサイズ(Birth size)と、そこからの1細胞周期の長さの関係
- 細胞が生まれた時のサイズ(Birth size)と、そこからの1細胞周期で増加したサイズの関係
- 1細胞周期の長さ、と、到達した細胞サイズ(Max size)の関係
- サイズ成長とタンパク質合成の uncoupling
- 自己相関関数(コレログラム):細胞サイズ・GFP輝度・細胞周期長

【自己相関関数(係数)について】



時系列データについて、その平均 $\mu$ を引いて中心化したものを  $X$  とする。つまり  $X$  の平均は0で、分散は元のデータと変わらず $\sigma^2$ となっている。この時、相関係数の定義

$$\rho = \frac{E[(X - E[X])(Y - E[Y])]}{\sqrt{E[(X - E[X])^2]E[(Y - E[Y])^2]}}$$

において、 $X$  を中心化時系列データ、 $Y$  をラグタイムの分だけずらした時系列データと考えれば、 $E[X] = E[Y] = 0$  となるので、

$$\rho = \frac{E[XY]}{\sqrt{E[X^2]E[Y^2]}}$$

さらに、 $E[X^2] = E[Y^2] = \sigma^2$ なので、これを代入すると

$$\rho = \frac{E[XY]}{\sigma^2}$$

これを自己相関係数と呼び、ある時系列データが自分自身とどのような相関関係にあるかを調べるための一つの指標として使われることがある。

# レポート課題

<大腸菌を用いてPoisson分布を体感する>

1. Poisson 分布に従う事象の例を(最低)一つ挙げよ. 生物学的なものでなくてもよい.
2. <Advanced> Poisson 分布に従う確率変数の期待値と分散が等しいことを証明せよ.

<Luria-Delbrück fluctuation test>

3. 突然変異仮説が支持される結果であったかどうか, 理由とともに述べよ.
4. rpsL もしくは gidB (rsmG と呼ばれる場合もある) 遺伝子に変異があった場合には, 具体的な内容をレポートすること. どのような塩基変異があったのか? アミノ酸はどのように変わったか? AlphaFoldも積極的に利用してみよう.

<Advanced> 以下のようなツールを使って変異型蛋白質の簡易的構造予測を行ったり, 構造モデルの表示や編集ができるので, 興味があれば使ってみよう.

AlphaFold2 Colab (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>)

PyMOL (<https://pymol.org/2/>)

<ImageJ 入門>

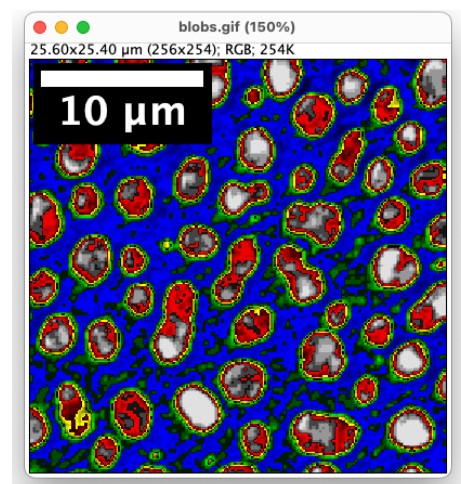
5. サンプル画像 Blobs に対して Lookup table を変更して適当な擬似カラーをつけた上で、スケールバーを書き込んだものを作る (右の例を参考に). スケールは自分で適当に設定して良い. 使用する機能は

Image > Lookup Tables

Image > Type

Analyze > Set scale . . .

Analyze > Tools > Scale Bar . . .



6. 画像を白黒反転させるマクロを作成して提出する. 元画像と反転画像も提出. 例えば Blobs 画像は 8 bit なので, あるピクセルの値が  $x$  であれば, それを  $255 - x$  に変換すれば良い.  
(Hint) 関数が返す値は自分が適当に名前をつけて設定した変数に格納できる. その変数を以降のマクロの中で使うことができる. 関数の引数として用いることもできる.

7. <Advanced> サンプル画像 Blobs を二値化して blobs を同定する. 同定した blobs が分かるようなマスク画像あるいは ROI を示した画像を提出する. マクロ化した場合はそれも提出する.

画像の端にあって切れているものは除くことが望ましい。blobs のサイズ分布を調べ、平均・標準偏差・最大値・最小値をレポートする。余裕があればサイズ分布のヒストグラムを作る（bin幅は各自で適当に決めて良い）。

（Hint）この画像の場合には、「大津の二値化法」と呼ばれる有名な手法が良い結果を与える。

Image > Adjust > Auto Local Threshold > Otsu

また、Analyze Particles は目的の物体のピクセル値が 255、バックグラウンドが 0 でないとうまく動かない。もし逆の状況になってしまったら（目的物体が0で背景が255）レポート課題6を応用して反転させるか、Process > Binary > Convert to Mask を試してみる。

8. 分裂酵母細胞のタイムラプス画像解析について、Generation time 時系列データの自己相関関数のプロットを提出する。また、Generation time の親子相関を示す散布図を作成して提出する。さらに、この散布図に関してピアソンの相関係数を計算し、それが自己相関関数のラグタイム 1 の時の値と近いことを確認する。

<その他>

感想などあれば自由に記述してください。

本実習のプロトコル・rpsLのシーケンスデータ・マクロの例などは以下のサイトにあるので、必要に応じて各自ダウンロードして下さい。

<https://github.com/HidenoriNakaoka/jisshuu2022>