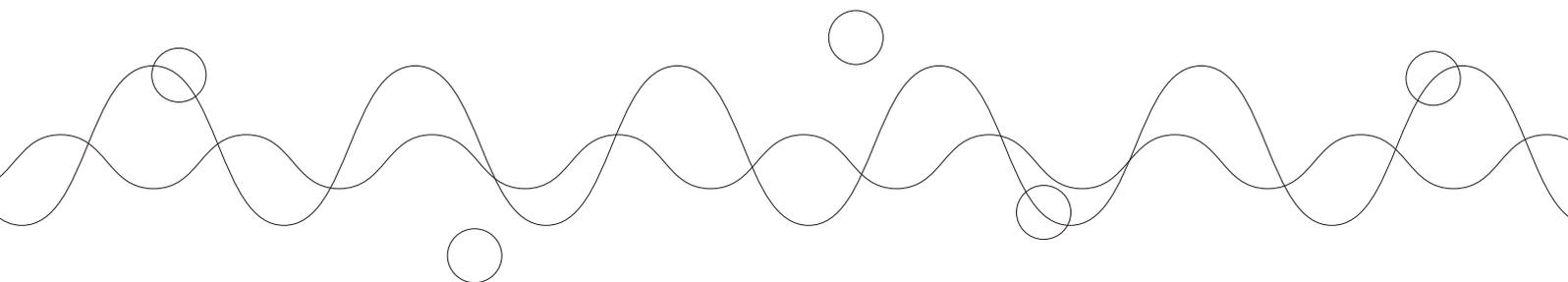


CRDS-FY2020-WR-01

科学技術未来戦略ワークショップ報告書
アトミック・セル・ダイナミクス

～細胞内機能素子の動的構造・局在・数量と
機能の相関（因果）の解明と革新的技術開発～

令和元年11月10日（日）開催



国立研究開発法人科学技術振興機構 研究開発戦略センター
Center for Research and Development Strategy, Japan Science and Technology Agency

目 次

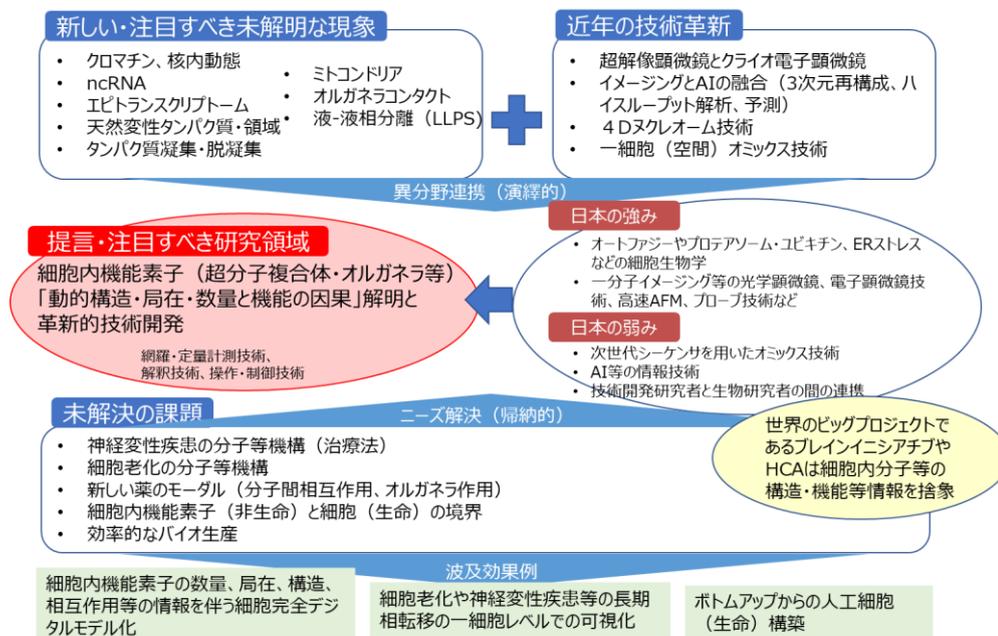
1. 開催趣旨とサマリー	1
2. 話題提供	3
第一部：疾患等と高次動的構造（オルガネラ、超分子複合体）、 機能（遺伝子発現機構とタンパク質制御）の関係～生化学・分子生物学などの視点～	
永井 義隆（大阪大学）	3
田中 元雅（理化学研究所）	8
高橋 暁子（公益財団法人がん研究会がん研究所）	11
康 東天（九州大学）	15
遠藤 斗志也（京都産業大学）	19
有本 博一（東北大学）	23
木村 宏（東京工業大学）	27
廣瀬 哲郎（北海道大学）	32
第二部：先端技術等と高次動的構造（オルガネラ、超分子複合体）、 機能（遺伝子発現機構とタンパク質制御）の関係 ～生物物理学、構造生物学、ケミカルバイオロジーなどの視点～	
太田 啓介（久留米大学）	38
高橋 康史（金沢大学）	43
立川 正志（京都大学）	47
築地 真也（名古屋工業大学）	51
福田 善之（東京大学）	57
上田 昌宏（大阪大学、理化学研究所）	63
青木 一洋（自然科学研究機構生命創成探究センター）	68
岩崎信太郎（理化学研究所）	73
3. 総合討論：一部と二部をつなぐ展望・方策（この領域を進める上での気づき、課題）	77
付録A. 開催趣旨・プログラム	84

1. 開催趣旨とサマリー（ワークショップから得られた示唆）

CRDS は国内外の科学技術動向及びそれらに関する政策動向の俯瞰、分析に基づき、課題を抽出し、研究開発戦略の提言を行っている。今回は国として推進すべき戦略的な基礎研究領域についてワークショップを開催し、議論を行った。

冒頭、CRDS から、下記の絵図のように仮説を提示した。それは、近年の新しい技術と現象、さらに世界の Human Cell Atlas (HCA) や Genome Project-write (GP-write)、Synthetic Yeast 2.0 (Sc2.0) などの構成的な合成生物学プロジェクト事例の先を見据えると、まだまだ細胞内の機能素子の時空間情報を定量的かつ網羅的に計測できる技術が必要であろうというものである。

それに対し、関連する研究について有識者から話題提供を行って頂き、最後に議論を行った。



戦略スコープ（注目すべき研究領域）の概要（仮説）

議論の結果を下記にまとめる。

研究の方向性

以下の4つのような意見が出た。これらは関連している。

- 分子生物学のように遺伝子をノックアウトして表現型を見ながら機能を探る研究だけでなく、生命現象に関して定量的な議論をしていくことが重要である。
- 生物を物理学的視点でも考えることができるようになりつつある。非平衡状態を考えることも必要である。
- 単一分子の相互作用だけでなく、LLPSのような超分子状態で研究していくという視点が重要である。
- 細胞内での分子やオルガネラ等の位置と時間（過渡的）の生命科学が必要になってきている。

研究推進方法

国のプロジェクトにおける異分野連携や先端技術・機器プラットフォーム、研究総括の目利きやディレクションの重要性が示唆された。

- 個別の技術とか個別のバイオロジーとしては世界的な結果があるが、それを連携させるところが日本は弱い。世界の趨勢はそういうところから新しいものが出てきているが、ことごとく後追いになってしまっている。
- 科研費で1人のPIが頑張ってもできないことをやる構造をつくらないと、世界と競争できなくなってきている。高価な先端装置をみんなでシェアするとか、データの数理情報的な解析をできるメンバー・拠点を組み込む等のネットワーク（プラットフォーム）が必要。
- 幅広い異分野の研究者に手を挙げてもらうための仕掛けを入れるのが望ましい。例えば、公募前に異分野研究者同士で話す機会を設ける、生物と物理の総括を2人置く、など。
- 加えて、研究者間の連携が促進される仕組みが必要。例えば、計測とバイオロジーと、あるいは理論とAIとが組み合わせさせたチームで応募することを求める、プロジェクト途中での連携を促す、など。
- バーチャル研究所長としての研究総括の脚本、演出、ミキシングが何より大事。

2. 話題提供

液-液相分離（LLPS）と非膜性オルガネラが関わる神経変性疾患の病態解明

○永井 義隆（大阪大学大学院医学系研究科）

私の専門は、神経内科で神経変性疾患の研究をしており、今話題となっている LLPS、それから膜なしオルガネラというものがあるが、いずれもタンパク質が凝集して脳内に蓄積するという疾患横断的な普遍的メカニズムがある（図 1）。これらの疾患群はタンパク質の構造異常に起因するため、コンフォメーション病、あるいはミスフォールディング病と総称されている。

神経変性疾患にもいろいろな疾患があるが、いずれもタンパク質が凝集して脳内に蓄積するという疾患横断的な普遍的メカニズムがある（図 1）。これらの疾患群はタンパク質の構造異常に起因するため、コンフォメーション病、あるいはミスフォールディング病と総称されている。



図 1

特にアルツハイマー病では、原因タンパク質であるアミロイドβあるいはタウそのものを減少させるといった治療法の研究が長年行われているが、これは実は健常人にもあるタンパク質であり、患者で量が増加しているというエビデンスはない。このようなタンパク質がなぜ凝集していくのかという研究は結構遅れており、本来誰もが持っている野生型タンパク質がどのように凝集するかを理解しないと真の治療ターゲットは見えてこないのではないかと考えている。

タンパク質の凝集メカニズムに関して最近急に研究が進んだのが ALS である。ALS の研究は病原タンパク質の発見が比較的遅れ、近年になってわかってきた。やはり ALS においても分子遺伝学を基盤に研究が進み、1993 年に SOD1 というタンパク質が同定されたが、これはごく一部の ALS の原因にしかっていない。大多数の ALS で蓄積しているタンパク質がわかってきたのが 2006 年で、TDP-43 という RNA 結合タンパク質である。続いて 2008 年には TDP-43 の遺伝子変異が家族性 ALS にて発見され、TDP-43 以外にも、FUS など他の RNA 結合タンパク質の遺伝子変異も次々と同定され、実は RNA 結合タンパク質がキーになっているということがわかってきた。

もう一つ注目すべきことは、ある遺伝子のノンコーディング領域にリピート配列の異常伸長が

あるような遺伝子異常がわかってきた。欧米ではこれが ALS の一番多い原因遺伝子変異である。これはノンコーディング領域の遺伝子変異なので、一見タンパク質が凝集する話とは関連がなさそうであるが、実はこの開始コドン ATG を持たないリピート配列が翻訳されることがわかってきた。これは生物学的にも全く新しい翻訳メカニズムで、RAN translation ; repeat associated non-ATG translation と呼ばれている。次に述べるタンパク質凝集メカニズムの根底にある液-液相分離 (LLPS) に、ALS の原因となる RNA 結合タンパク質だけでなく、RAN 翻訳で産生されるリピートペプチドもかかわっていることが最近わかってきた。

タンパク質が LLPS により集合体をつくることは生理的な現象で、これがいわゆる膜のないオルガネラ (Membrane-less organelles) を形成する根底にある (図 2)。これまでは、ミトコンドリアとか ER、ゴルジ体のように膜によってコンパートメント化されて、1つの構造機能体として細胞内オルガネラと認識されてきた。ところが、実際には膜を持たないオルガネラもあり、細胞質ではストレス顆粒など、核内では核小体、核スペckルなどが知られており、これらは膜のない、または非膜性オルガネラと呼ばれている。このような非膜性オルガネラを構成するタンパク質や RNA は、LLPS という性質がドライバーとなって集合体をつくり、形成されることがわかってきた。ALS の病原タンパク質である TDP-43、FUS などの RNA 結合タンパク質は、LLPS により非膜性オルガネラを形成するタンパク質である。

ストレス顆粒などの非膜型オルガネラは液-液相分離によりタンパク質/RNAが濃縮されて形成される

非膜型オルガネラ (Membrane-less organelles)

- 脂質二重膜を持たない細胞内構造物
- 細胞質内: ストレス顆粒、P-body、生殖顆粒など、
- 核内: 核小体、核スペckル、パラスペckル、カハール小体など
- LLPS現象によりそれぞれ特定のタンパク質やRNAなどが濃縮されて形成される

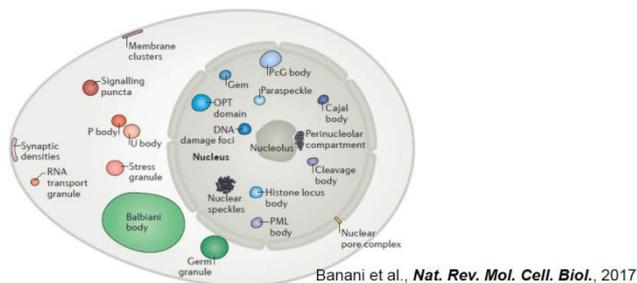


図 2

LLPS とは、溶液の中でも溶質は必ずしも均一に混ざり合わずに、熱力学的な安定性にしたがって溶液が二相に分離するという現象のことである (図 3)。このような溶質として、RNA 結合タンパク質とか天然変性タンパク質等がこのような LLPS を起こしやすい性質を持つことがわかり、この物理化学的な現象がドライバーとなって、細胞内では非膜性オルガネラを形成することがわかってきた。

液-液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS)

液-液相分離 (LLPS: liquid-liquid phase separation)

- 均一な溶液が温度や圧力などの変化によって相溶性が変化し、その結果熱力学的に安定な二相に分離する現象
- 溶質が溶けた溶液中では、LLPSにより溶質が濃縮されて液滴 (liquid droplet) と呼ばれる球状のゲル様集合体が形成される
- 天然変性タンパク質、特にLCDドメインを持つRBPやRNAなどがLLPSを起こしやすい
- 細胞内では、LLPSによりタンパク質やRNAなどが濃縮されて非膜型オルガネラを形成する



図 3

それで、この LLPS が病気とどのように関係するかということについては、どうも RNA 結合タンパク質などはこの LLPS を介して生理的に単量体と重合体状態の平衡にあるが、この平衡が破綻した時に不可逆的なアミロイド凝集をつくって病気を引き起こすのではないかと考えられるようになってきた。なぜこの平衡が破綻するのかということに関して、1 つは量的な変化があって、例えば過剰発現すると平衡がこちらに傾き、タンパク質量を減少させると平衡が逆に傾くと考えられる。あるいは遺伝子変異や翻訳後修飾などのようなタンパク質自身の質的な変化があってもこの平衡が崩れ、最終的に不可逆的な凝集を起こすリスクが上がる。

神経変性疾患を起こす様々なタンパク質の凝集メカニズムとして、原因タンパク質そのもののシス因子、すなわち遺伝子変異や翻訳後修飾による質的变化、あるいは発現量調節による量的な変化を介してこの平衡を破綻させる (図 4)。もう一つはトランス因子で、こういうタンパク質が LLPS により重合体をつくるには、いろいろなタンパク質や、特に RNA などとの相互作用が重要であり、これらの相互作用の障害により質的变化や量的変化を生じたりする。あるいはタンパク質分解などの影響により量的な変動が生じたり、細胞内分子輸送システムの障害でも細胞内での局所濃度が変動し、この平衡が破綻する可能性がある。このような視点から、神経変性疾患の原因タンパク質がなぜ不可逆的な凝集を引き起こすのかを研究していく必要がある。

神経変性疾患における液-液相分離とタンパク質凝集

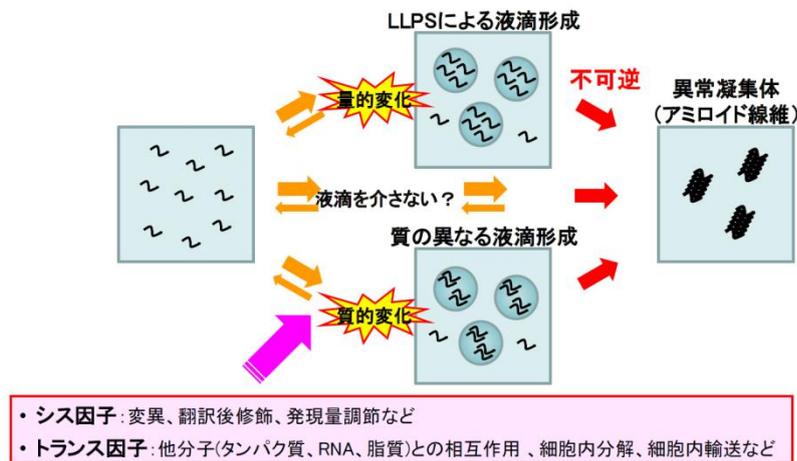


図 4

なぜ今このような研究を進めるべきかということに関しては、こういうタンパク質の生理的な重合と病的な凝集の関連性が最近わかってきて、研究がホットになってきている。そして、これまでのタンパク質研究は、タンパク質単分子あるいは二量体、三量体の複合体のレベルで研究されてきたが、今はもう、タンパク質は必ずしも特定の分子構造を取らなくても相分離によって重合体状態を形成して機能を発揮することがわかってきて、これは生物学的に全く新しい概念である。最後になぜ重要かという、人口高齢化社会を迎えて大きな問題になっている神経変性疾患の病態理解のためには、単なる病的な凝集だけではなく、このような生理的な重合状態の制御メカニズムを理解しないと難しいと考えられる。このような LLPS によるタンパク質重合体を計測したり、分子挙動、ダイナミクスを見るような技術が必要で、こういうものをいろいろな化合物でラベルするような技術ができると役立つのではないかと考えている。以上述べたように、この研究は病気の解明につながる重要な研究である。

質疑応答

○問 多分この中でもう一つ強調すべきポイントは、タンパク質は全ての神経細胞に発現しているはずで、幼若なときも、アダルトになって、あるいは高齢化してもあるという時間軸だけではなく、例えば ALS だったらこのニューロン、ハンチントンならこのニューロンというふうに神経細胞の特異性がなぜ、例えばジェネティックなバックグラウンドが同じであっても起こるのかというのも重要なポイントで、そこも多分、今後の研究のポイントになるのかと考えているがいかがか。

○永井 おっしゃるとおりだと思います。ただ、神経変性疾患の部位特異性というのは実は今は少し変わってきて、パーキンソン病では運動障害が出現するが、かつて私が医学部生だったころには認知機能障害は出現しないと言われていた。しかし、今ではもうパーキンソン病で認知機能障害を認めることは周知の事実で、レビー小体型認知症は同じ疾患スペクトラムであると考えられている。ALS もかつては運動障害のみをきたし、認知機能は保たれると教科書には書いてあった。しかし今は、分子遺伝学的には ALS と前頭側頭型認知症は同じ疾患でスペクトラムであると考え

られており、ALS でも認知機能障害を来しうる。原因分子からの視点で考えると実はそんなに部位特異性は明確ではない。どの部位が障害されやすいかということはあるが、どの部位は絶対障害されないと昔教科書に書かれていたようなことはないと思っている。その部位による脆弱性の話はニューロンそのものを理解しないといけないような、もう少し高次の課題だと感じている。

タンパク質構造と神経変性疾患

○田中 元雅（理化学研究所脳神経科学研究センター）

私たちは長年、タンパク質のミスフォールディングや凝集ということに興味を持って研究している。こういったタンパク質がどうやって脳の中でたまっていくのか、また、最近の多くの報告では、脳内である凝集体ができてから、ある一部のところから凝集体が伝播していくことが知られてきている。そういったことから、伝播ということもより普遍的になってきたので、タウとかシヌクレインといったものの蓄積と伝播が、例えば認知症の発症にどう関与しているのかといったことを知りたい（図 1）。

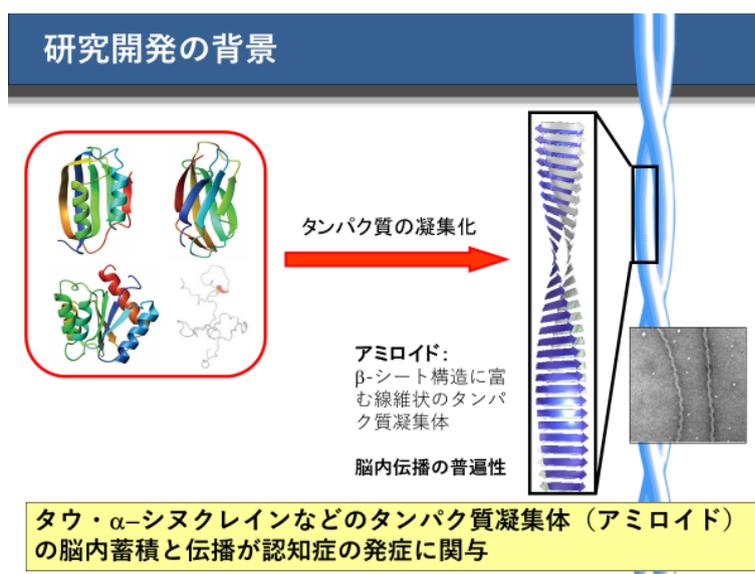


図 1

最近でも切り札とされてきたアデュカヌマブというアミロイドβに対する抗体が思ったほど効果を発揮しなかった。結局のところ、標的分子やその構造というものがいまいち不明でしっかりわかっていない。そういったことから、やはりもう一度基礎研究に立ち返って研究していく必要があるのではないかと考えている。

最近の注目すべき研究動向、技術的なところで言うと、固体 NMR やクライオ電顕の飛躍的な技術革新。固体 NMR に関しては、多分この 5 年間でさらに大幅に感度が上がってくると思うので、クライオ電顕に加えてさらに注目するものだと思う。また、ヒトの認知症患者脳のアミロイドを種にして *in vitro* で増幅して、その構造解析を行うということも最近、クライオ電顕で行われてきて、実際に、脳の中にできるようなアミロイドの凝集体がどのような構造をしているかがわかってきたのは、本当に最近。一方で、動的な過程である、モノマーからオリゴマー、凝集体がどのようにできるのかということも大事だが、そういった研究はまだ立ち遅れている。

では、動的構造解析を可能にするためにどういうことをすればいいか。細胞内の現象を再現できるような *in vitro* の再構成系の開発が必要ではないか。つまり、凝集体と脱凝集というのは細胞の中で常に平衡な状態になっているので、このような平衡の中におけるオリゴマーや凝集体を解析することによって、本当の治療ターゲットがわかってくるのではないかと考えている。

アミロイドの凝集や脱凝集をしっかりと理解していくには、このような再構成系を作り、それが細胞内の現象を再現できるようにし、そういった混合系、平衡系の中で調べることができれば、より標的がしっかりとわかって、またそのメカニズムもわかってくるのではないかと考えている。そういった実験系が一旦できてしまえば、さまざまな分光学もしくは構造生物学の手法を適用することによって、例えばこの場合、認知症関連だが、アミロイドの凝集、脱凝集過程をより詳しく調べたり、もしくはこういった代謝過程に生じる新たな分子種というものも、より同定しやすくなる（図2）。

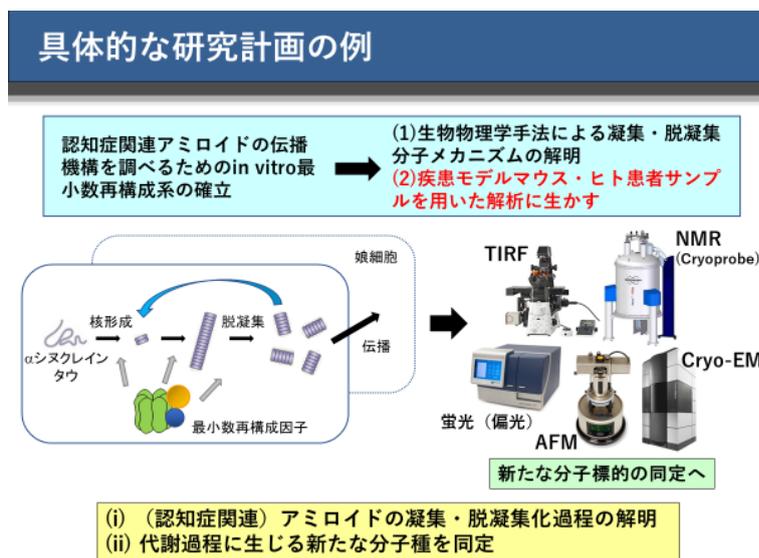


図 2

5年後、10年後、15年後の到達点のイメージに関しては、まず、凝集・脱凝集過程を解明して新たな分子種を同定することによって、その標的分子をまずしっかりと明らかにする、そういったことから創薬、さらには治療、予防、簡便な早期診断につなげていく可能性があるのではないかと考えている。

近年、技術開発に注力しているが、コンディションの良いサンプルをうまく調製することが技術開発と同じくらい大事かと思っている（図3）。このような再構成系ができれば、クライオ電顕や超解像顕微鏡、光ピンセット、あと高速溶液混合というのは、クラシカルにはタンパク質のフォールディング研究でよく使われていたが、こういった手法を改良し、また、生物学だけではなくマイクロ流体デバイス研究の方々とコラボすることによって、反応系においてさまざまな時系列でサンプルを観測して、分光学もしくは構造解析手法に資していくことができる。

技術等への期待（サンプル側も重要）

サンプル側： in vitroの最小数再構成系
測定側： クライオ電顕、蛍光イメージング、高速溶液混合、光ピンセット

クライオ電顕：サンプル作成方法 → アミロイド（オリゴマー）の構造多型の重要性
 蛍光イメージング（超解像）： in transで別の分子を導入後に、構造を比較可能
 高速溶液混合：タンパク質の動的な構造変化を逐次モニター
 光ピンセット：タンパク質構造の揺らぎや、翻訳に共役したフォールディングの構造を高精度に定量化

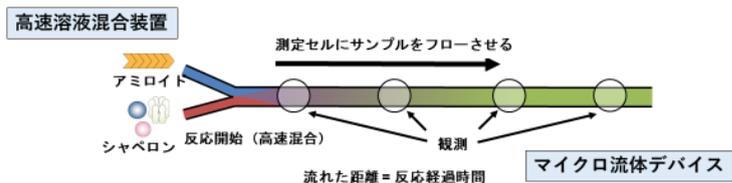


図 3

また、私たちはそういったものを、最終的には疾患の治療や予防に生かしたいため、疾患のモデルマウスや、できればヒトのサンプルから取り出してきた凝集体を使ってこのような再構成系に資して、そういったもののメカニズムを調べていくことも大事なのではないかと考えている。

しかしながら、実は一旦でき上がったタンパク質は、フォールディングした構造がアンフォールディングして凝集に至るという確率は、計算上、相当低い。タンパク質の平均自由エネルギーがこれぐらいだと見積もると、実は一旦フォールディングしてしまえばそれがミスフォールディングして凝集に行くというパスは低いと計算されている。細胞の中ではいろいろなストレスもあるので、タンパク質のミスフォールディングというのは、実はタンパク質の合成途中に起こることも十分示唆されてきている。

そこで、これは一例で、そのようなタンパク質が実際合成されていく最中に新生ポリペプチド鎖がどのようにフォールディングもしくはミスフォールディングするかを、このような光ピンセットを使ったり、あとはこのような系に加えてさらに多角的に実験することに対しては、リボソームプロファイリングを絡めたさまざまなプロファイリング技術も構造生物学と組み合わせることで、より多次的にタンパク質がどのようにフォールディング、ミスフォールディングしていくかがより明らかにされてくるのではないかと考えている。

質疑応答

○問 画像にしてもクライオEMにしてもインセルNMRにしても実験データをつなぐということで、シミュレーションが重要かと思うが、理研の中ではどう考えているか。

○田中 シミュレーションは大事だと思っている。例えばタンパク質の揺らぎ等に関しても、知りたいことがいっぱいあり、私の研究室では杉田さんのグループと一緒に共同研究をして、さまざまな動的な構造解析とところで、直接計測できない部分に関して、そういったところを見積もることをしている。

細胞老化研究がもたらす加齢性疾患制御の可能性

○高橋 暁子（公益財団法人がん研究会がん研究所）

私は細胞老化の研究を行っているが、今は有明のがん研究所にいますので、加齢性疾患の中でも特にがんに着目して研究を行っています。

先進諸国の平均寿命が延びて、いわゆる加齢性疾患の発症率が高くなっていることが我が国でも問題になってきている。これは国立がんセンターの年齢別がんの罹患率のデータであるが、加齢に伴いがんの罹患率が上昇する。この罹患率の上昇に、私たちの体を構成する細胞の老化が関与していることが明らかになりつつある。

内因性のストレス、外因性のストレスによって細胞老化は誘導されるが、年をとると老化した細胞が体中に蓄積されていくことを我々は報告してきた（図1）。なぜ年をとると老化した細胞が蓄積して、これが疾患につながるのか、このメカニズムが最近明らかになってきており、それは、老化した細胞が体の中でさまざまな炎症性の蛋白質や細胞外小胞を分泌し、周囲の組織に慢性炎症を引き起こす Senescence-associated secretory phenotype (SASP) が起こり、それによってさまざまな疾患を引き起こすことが明らかになってきている。

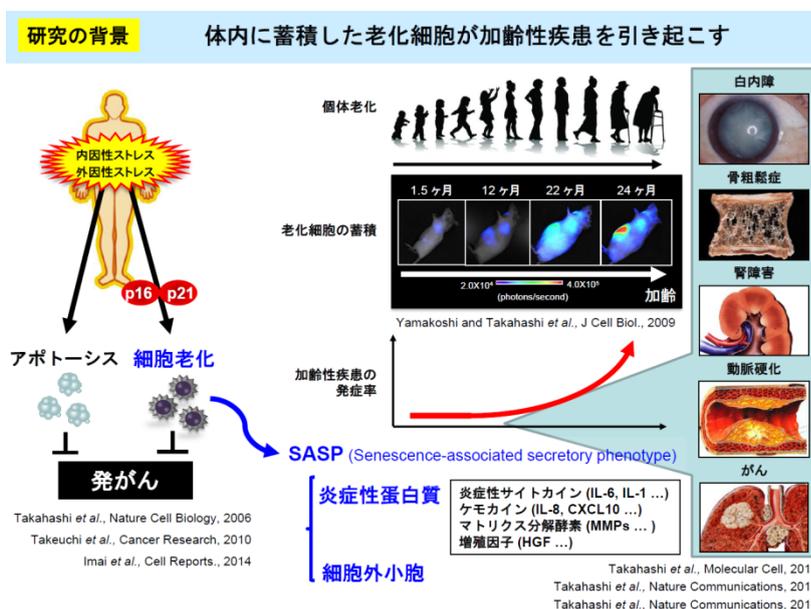


図 1

老化研究がどうやってこれら加齢性疾患の制御に向かっていくかということで、今、大きく 2 つの戦略がとられている（図2）。1つは、細胞老化はがん抑制機構として機能することは証明されているので、老化の誘導そのものをブロックしてしまうとがんが起きてしまう。そこで、一旦老化した細胞を特異的に殺すという Senolytic drugs の開発が進められている。またもう一方で、老化細胞が分泌する SASP 因子が加齢性疾患の発症につながるのだとしたら、この SASP を制御するという戦略が考えられる。この 2 点が今、老化研究の中で注目を集めている分野である。

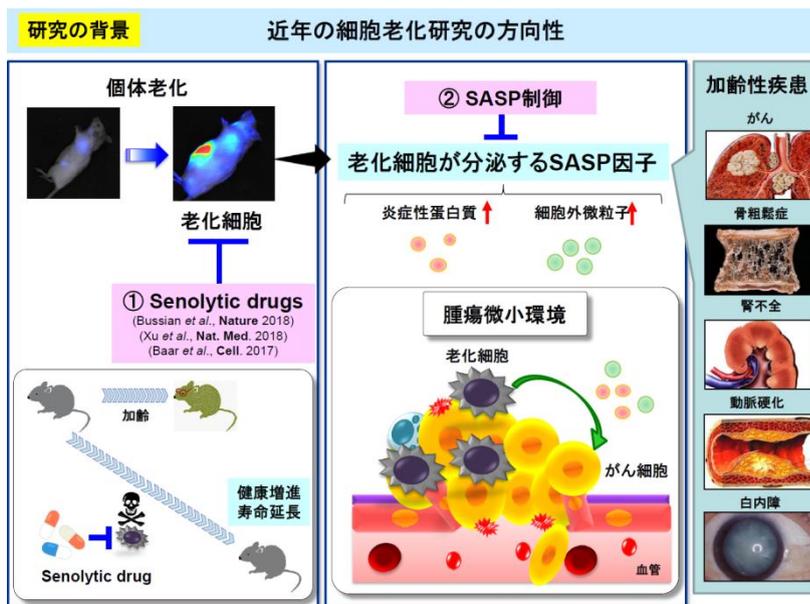


図 2

加齢に伴う病態の原因となる SASP がなぜ起こるのか、我々を含む幾つかのグループがその分子機構の解明に取り組んできた。そして、これまでに核の構造の異常やエピゲノムの異常が SASP 因子の遺伝子発現を引き起こすことが明らかになっている。また、ここ 2~3 年の間に SASP 誘導には細胞質 DNA センサー（cGAS-STING 経路）の活性化が重要であることが示されつつあるが、私たちは STING ノックアウトマウスでは、肥満誘導性の肝がん発症モデルにおいて SASP の誘導が阻害され発がんが抑制されることを証明した。

ここからは、我々のチームが細胞老化で SASP が起こるメカニズムを研究していく上で、直面している問題を交えながら、この領域の研究のこれからについてお話しさせていただきたい。

先ほど細胞質の DNA センサーが SASP の誘導に重要だと申したが、老化した細胞においては、DNA センサーのリガンドとなる核酸が細胞質に多く集積しているのが見受けられる。また、それを理研の加藤先生との共同研究により超解像顕微鏡で観察すると、核膜を透過するような、このような微小核酸が細胞質に出ていて、実際に細胞質で微小核酸が集積していることが観察されている。そこで、老化細胞においてゲノム DNA が切断されるメカニズムを研究しているが、この DNA が切断されるということを定量的、客観的に評価するためには、どうしても数理モデルを作成し計算することが必要になり、さきがけ研究者交流会でお会いした九州大学の鍛冶先生とのコラボレーションにより、ゲノム DNA の切断を数理モデルによって計算し、確かに老化細胞では DNA が切断されやすくなっているということを見出している。

また、我々は老化によってゲノム DNA の遺伝子をコードしてない領域由来のノンコーディング RNA の発現が亢進していることを見出しており、これは加齢に伴い老化したマウスの全身の組織やがん組織で特異的に転写されていることを観察している。このノンコーディング RNA は染色体の分配の異常や染色体の数の異常、またがんのようなコロニー形成能を発揮して、マウスで 100%腫瘍を形成するという現象を観察している。このノンコーディング RNA の機能を解析する上で結合蛋白質を同定したところ、染色体の構造の維持に重要な CTCF というタンパクと結合するというところを見出した。ここから先はもう我々のこれまでの技術を大きく超えていて、染

染色体全体の解析ができなければいけないということで、ATAC-seq であつたり、ChIP-seq、それから今、Hi-C の解析も必要になり、東大の白髭先生を初め多くの先生方とのコラボレーションで研究を行っている。

また、これはさきがけで JST にサポートしていただき、老化細胞において分泌が亢進している細胞外微粒子の解析を行っている。エクソソームと呼ばれている細胞外小胞の解析については、以前は超遠心で回収してきてそれらの性質を MS 解析などで調べていたが、超遠心ではセルフリ一蛋白質や核酸も検出されることが明らかとなり、現在では細胞外小胞を回収する方法も重要であり、それぞれの方法で集めてきた全ての MS 解析、糖鎖解析、それから一つ一つの粒子をまるで FACS のように解析できる、こういったデバイスの開発や機能解析が求められている。それぞれの解析は本当に我々の力だけでは足りなくて、さきがけで出会った多くの先生方との共同研究により進めている。

我々は、がん研究所で樹立された Patient derived xenograft (PDX モデル) を用いて in vivo イメージングで新規の核酸医薬の腫瘍内動態と薬効の評価を行っている。そのためには、患者由来の腫瘍細胞にウイルスなどを導入せずにそのまま観察するという光学プローブ技術が必須であるので、現在、東大の浦野先生らとの共同研究により開発と観察を行っている。また、新規 DDS の開発には東工大学の西山先生やナノイノベーションセンターの片岡先生と共同研究している。

東大の白崎先生との共同研究で、我々は老化細胞が SASP 因子と呼ばれる炎症性蛋白を分泌する様子を観察しているが 1 細胞毎に炎症性蛋白質の分泌を観察してみるとこのように老化細胞には不均一性（ヘテロジェナイティ）が存在している。また、実際に in vivo で老化した細胞を評価しようとする、イメージングマウスで細胞老化シグナルが検出された組織においても、この中のたった 20% ぐらいの細胞が細胞老化マーカー陽性である。つまり、個体老化における細胞の老化の誘導には多様性があり、老化細胞をターゲットとしたような Senolytic drugs や SASP を制御する創薬につなげることを目指すとしたら、生体内で老化細胞や SASP を正確に、客観的に定量評価できるような技術がどうしても必要である（図 3）。

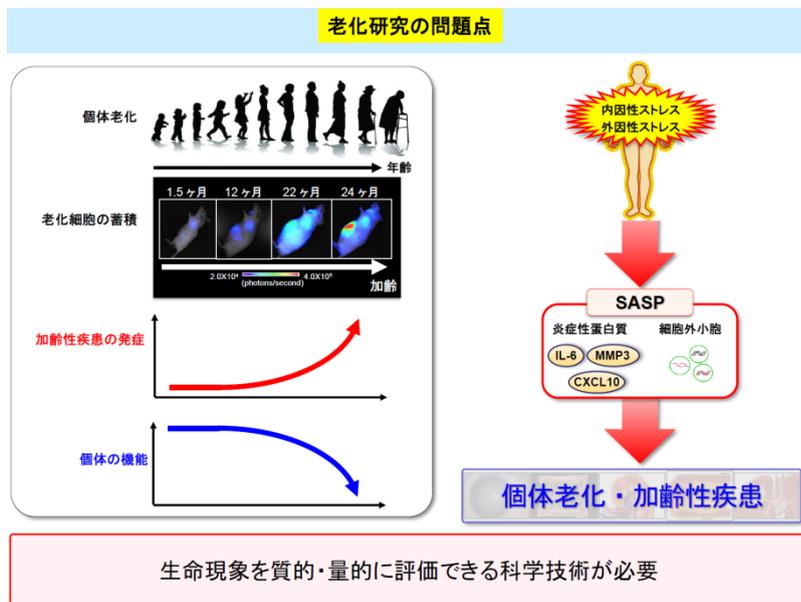


図 3

老化というのは、今日お話しいただく先生方全ての分野と関連するような、あらゆる細胞の中、生体の中の現象が凝縮して病態になっているような状態で、その分子メカニズムの解明、それからそれを制御する方法の開発といったことには、従来の分子生物学を背景とした老化研究者だけではなく、工学や数理学など多くの研究室の最先端の技術とコラボレーションしながら取り組んでいかなければいけないと考えている。

質疑応答

○問 先生の研究がいろいろなコラボレーションをやっているというのはすばらしいと思ってお聞きしたが、日本国内でのコラボレーションで十分なのか、あるいは国外とやったほうがいいケースがあるのか、あるいは日本の中で共同研究で障害になったようなことがあるとか、もう少し工夫したほうがいいことがあるとか、お気づきの点などあれば聞かせていただきたい。

○高橋（暁） 我々がどうしても明らかにしたい細胞老化の現象であったり、測定したいものを持っている技術が海外にしかないとしたら、海外のラボとコラボレーションもすべきだと思っている。ただ、コラボレーションするときどこにアプライしたらいいのかとか、どういった技術が日本にあって、どこのラボにお願いしたらこれが見えるのかといったような情報があると助かる。今はお会いした方々から得られた情報や、周りの先生に「どなたか解析技術をお持ちの先生がいませんか」と聞いてコラボレーションしている現状である。

ミトコンドリア：癌、品質管理

○康 東天（九州大学大学院医学研究院）

基本的には、私はミトコンドリアの品質管理と common disease との関係というところに興味を持っていて、その中の1つ、癌とミトコンドリアではメタボローム解析等をしている。基本的には癌組織というのは不均一で、その中に癌幹細胞がある。そして癌幹細胞が生き残って転移とか再発するという概念がある（図1）。

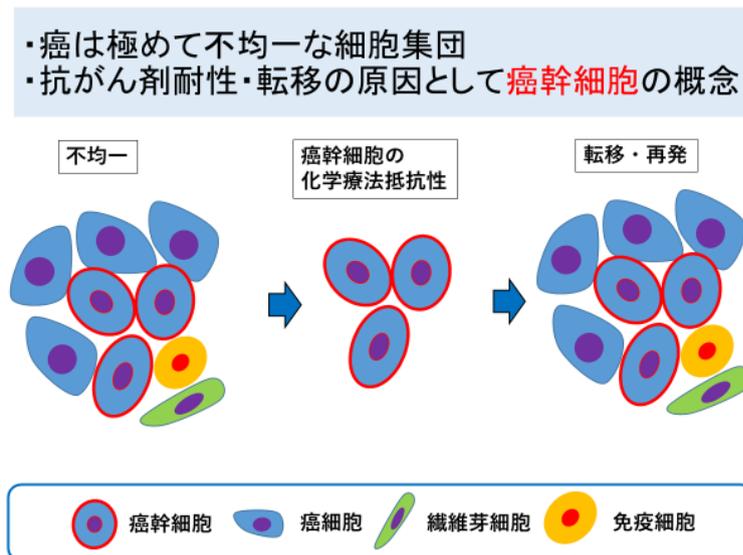


図 1

癌細胞株を使っているのも基本的には均一なはずの細胞を単に非接着の 3D 培養をするだけで、こういうスフェア形成をしてくる（図2）。スフェア形成するというのは、癌幹細胞の一つの大きな特徴だと言われている。これは培養細胞なので、継代しているうちにヘテロになっているのかという疑問がでる。普通はモノレイヤーで培養したものを 3D 培養すると、撒いた細胞数の大体 3~4% ぐらいがスフェアを形成する。もしこれが亜集団であるならば、それらを集めてもう一回 3D 培養をやればほとんど 100% スフェアを形成するはずだと思うが、そうしてもスフェアの形成率はほとんど変わらない。つまり、この使った培養細胞には別に亜集団があるわけではなさそうだということになる。亜集団がないのだったら、どうしてスフェアを形成するのかということ、モノレイヤーからスフェアにすると、いわゆる癌幹細胞関連の遺伝子発現が軒並み上がっていく。それをもう一回モノレイヤーにすると軒並み全部下がっていくということ、可塑性があることがわかる。実際スフェア形成細胞は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化能つまり呼吸能が上がっている。つまりモノレイヤーのときには抗癌剤耐性は低いし、酸化的リン酸化は低い。ところが、スフェア形成すると癌幹細胞マーカーは軒並み上がるし、抗癌剤に対しては耐性が上がり、酸化的リン酸化能も上がっていく。

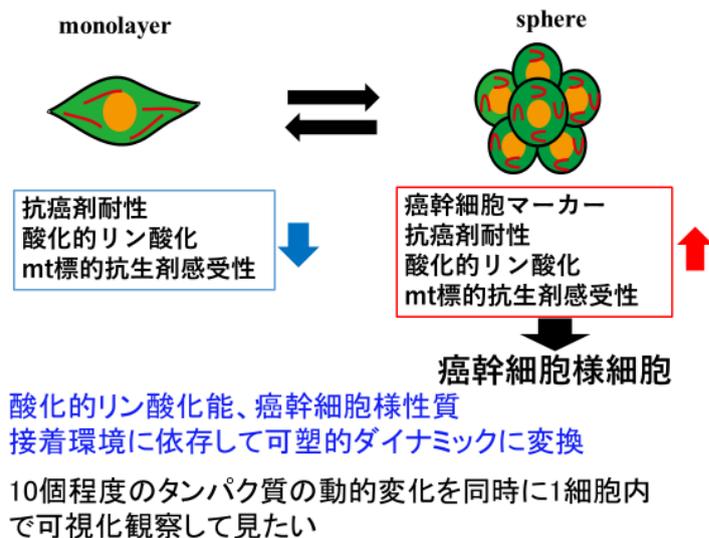


図 2

この現象から 2 つのことに興味を持っていて、1 つは、いわゆる癌幹細胞の微小環境という複雑な概念が出されているが、ちょっとした培養環境の変化だけで癌幹細胞様の変化は起こりうることである。それはきっと、生体内でも似たようなことが起こっているのではないか。だとすると、抗癌剤治療で何か特定の癌幹細胞が生き残るのではなくて、ちょっとした環境の変化で簡単に癌細胞の形質変化が可逆的に起こってしまうので、癌というのは抗癌剤でなかなか全部が死なないのではないかと考えている。

もう一つの興味として、この細胞はミトコンドリアの形がもともとは管状構造をしているが、スフェア形成した細胞では顆粒状になっている。普通ミトコンドリアは機能が落ちると顆粒状になると言われているが、こちらは顆粒状形態になって機能が上がっている。構造と機能の関係は実は一義的でないこともわかる。一般に癌幹細胞では酸化的リン酸化能が高いと言われている。では、例えばこの実験系において顆粒構造をとっていることが、この幹細胞のエネルギー代謝と一体どういうふうに関連があるのかといったことを考えてみたい。実は培養液中の血清を減らすだけでも同じような変化が起こる細胞もある。生体内のように複雑で多様な環境ではなく、きちっと定義された環境で可塑性を引き起こせる系であれば、では何が起こって構造が変化していくのかといったメカニズムを分子レベルで解明しやすいはずで、それを通じて私の興味と臨床的な癌治療に対する興味を結びつけることができるのではないかと考えている。

もう一つの私のメインの興味である品質保証で、DNA、タンパク質に特異的な品質保証機構やもっと全般的な意味の品質保証としてのマイトファジーなどのメカニズムの研究をしていて、そしてこれらの機能不調に伴うミトコンドリアストレスというものにも興味を持ってやっているが、今日はタンパク質の話をしたい。ミトコンドリア内のタンパク質は、大きく LONP1 と ClpXP とミトコンドリアの AAA プロテアーゼ、この 3 つでほとんど分解されている (図 3)。そして、それぞれの異常がそれぞれ異なった病気を引き起こすことがわかっている。

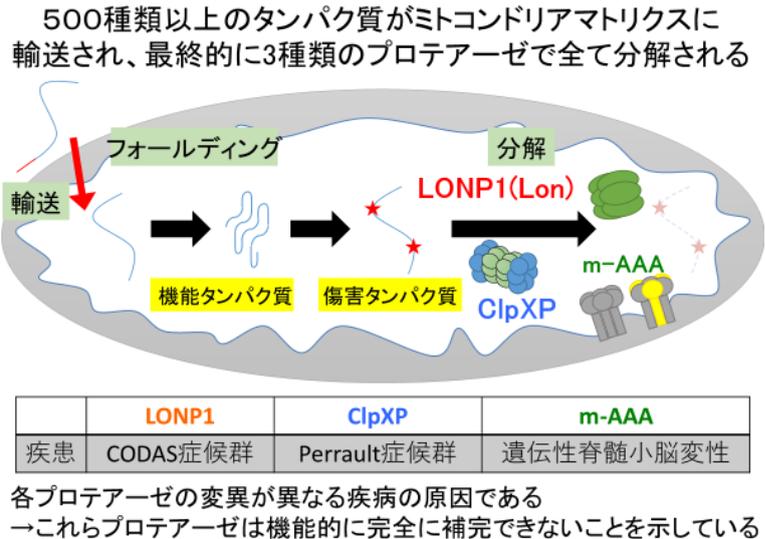


図 3

それで、3つのプロテアーゼをそれぞれノックダウンすると、LON プロテアーゼをノックダウンしたときだけ不溶性のタンパク質が増えてくる。LON は、シャペロン活性とプロテアーゼ活性のドメインを持っている。シャペロンドメインには当然 ATPase のモチーフが含まれ、一般的にシャペロン活性はダメージを受けた基質タンパク質をプロテアーゼ分解できるように構造をほどいていると考えられている。それぞれのドメインの機能不活性変異をつくってみると、プロテアーゼ活性がなくても不溶化をレスキューできる。つまり、この不溶化は LON のシャペロン活性低下が原因なのだということがわかる。そこで、ミトコンドリアにある他のシャペロンタンパク質を軒並みシングルでノックダウンしたりダブルでノックダウンしたりトリプルでノックダウンしても、全く不溶化は起こってこない。

HSP70 だけは、これをノックダウンすると逆に LON ノックダウンによる不溶化を抑制する。なぜだろうと思ってみたら、HSP70 だけが他のシャペロンタンパク質と違ってインポートにも関係している。そこでインポートに関係している TOMM とか TIMM をノックダウンしてみてもやはり抑制できるということで、おそらく LON ノックダウンによる不溶化はインポートに関係しているだろうということになる。

一体どんなものが不溶化されるのかと見てみると DNA 複製とか転写とか RNA に結合するようなタンパク質が多く、これらのタンパク質は天然変性タンパク質 (Intrinsically disordered region) であるものが多い。それで、DICHOT というソフトで Intrinsically disordered region (IDR) の比率を計算してみた。LON ノックダウンによってほとんどが不溶化してしまうタンパク質群とほとんど可溶化のままの2群で IDR 比率を比較すると大きな差が出てくるといったことがわかってきた。

そういうわけで、インポート直後に、この天然変性タンパク質様のものはやはりミスフォールディングしやすく、それをインポート直後に認識して予防していくという、ダメージを受けたタンパク質の分解による品質維持とは異なる新規のタンパク質品質保証機構であると考えている。このミトコンドリアタンパク質の品質保証機構に関しては、こういった一群のタンパク質が一つの大きなターゲットになるのではないかと (図 4)。

天然変性タンパク質に対して

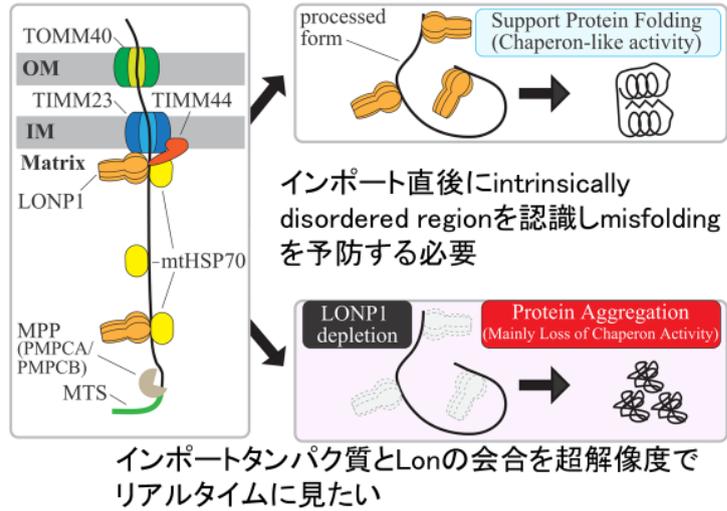


図 4

もしそうだとすると、どうしてこの LON プロテアーゼのシャペロンドメインはタンパク質分解へとつながらない形でそれらを認識できるのだろうか。その結合の結晶構造のようなものを高時間分解能で経過を見ることができたら、この辺をはっきりさせられるのではないか。もう一つは、インポート直後のはずだから、最も短期的には HSP70 と LON とこういったタンパク質の結合は内膜の直下で起こっているということをリアルタイムの超解像度解析で示してみたいと思っている。

オルガネラバイオロジーとタンパク質動態

○遠藤 斗志也（京都産業大学生命科学部）

ミトコンドリアを中心にオルガネラバイオロジーを研究しており、最近では構造生物学のほうに軸足をシフトしているのですが、そのような立場から研究を紹介しつつ、今、どういうことが問題なのか2つほどお話ししたい。

このワークショップのテーマの一つは、細胞生物学にいかにか構造生物学とか先端計測技術を応用して、飛躍的に研究を進めるかということだと思うが、今年6月に細胞生物学会の年会をお世話して、そのときに、構造生物学の研究者が多い蛋白質科学会の年会と合同年会という形にした。そうしたらお互いにすごく関心が深くて、いろいろとセッションが盛り上がったが、会員を調べると、細胞生物学と蛋白質科学会で重複している人はほとんどいない。それが今の日本の現状だ。関心はあるがつなぐものがない。

皆さんご存じのように細胞の中のオルガネラについて近年話題になっているのは、オルガネラとオルガネラが実はつながっている、接触している、そういうオルガネラ間コンタクトの発見で、これはミトコンドリアとERだけではなくて、いろいろなところで見つかってきている（図1）。ここを通して脂質がオルガネラ間を移動するというのは、ほぼ確かだと思う。

オルガネラ間コンタクトを介した物質・情報の交換

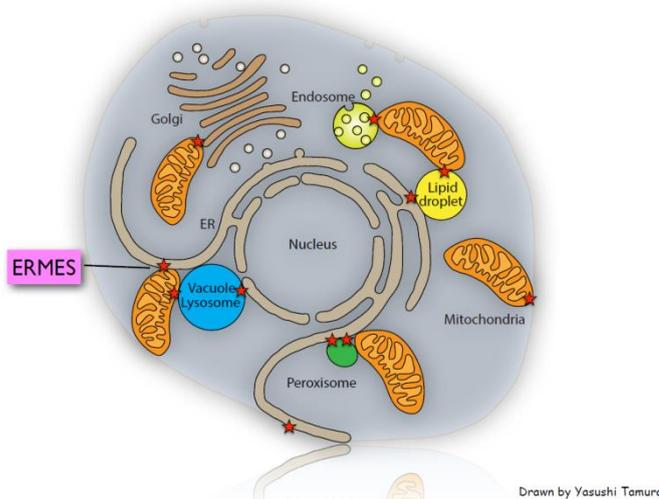


図 1

今日は、タンパク質もオルガネラ間を動くということが第一の話題だ。ドイツの研究だが、ミトコンドリアに入るときに膜タンパク質が合成され過ぎると、キャパシティが足りなくなって凝集してしまう。そういう場合、一旦ERに行って一休みしてからミトコンドリアに行くことでそういうことを防ぐという。つまり、ERとミトコンドリアをタンパク質が移動するという話である。次にC端でミトコンドリアの外膜にアンカーするテイルアンカータンパク質、これはいろいろなオルガネラにあるが、ペルオキシソームに行くテイルアンカータンパク質をミトコンドリアにミスターゲットさせると、Msp1というミトコンドリア外膜のAAAタンパクの働きで分解される。分解する本体はプロテアソームだが、プロテアソームだからユビキチン化が必要だろうというこ

とで、私たちはミスターゲットしたタンパクが何によってユビキチン化されるかを調べた。そうすると、Doa10 というユビキチン化酵素によってユビキチン化されていた。実はこの Doa10 は ER 膜にある。だから、ミトコンドリアに間違っただけでターゲットしたテイルアンカータンパク質は ER のユビキチン化酵素によってユビキチン化され、サイトゾルのプロテアソームで分解されることになる。

次に、このミスターゲットしたタンパクがどこにいるかを調べた。ユビキチン化されると分解されてしまうので、ユビキチン化を止めると、このタンパクはミトコンドリアにいただけではなく、一部は ER にも存在することがわかった。さらに AAA タンパクの Msp1 を過剰発現すると、ミトコンドリアだけではなくむしろ ER にいるもののほうが多くなった。したがって、ミトコンドリア外膜にミスターゲットしたタンパク質は、Msp1 というミトコンドリア外膜の AAA タンパクによって引き抜かれて、ER に行くということがわかった。一旦ミスターゲットされたものが Msp1 によって引き抜かれて、そして ER に移って、ER のシステムでユビキチン化されてプロテアソームで分解されるのである。

こんどは、本来ゴルジに行くタンパク質を人為的にミトコンドリアにミスターゲットさせると何が起こるかを調べた。人為的にミトコンドリアに行かせたゴルジのタンパク質は、やはり Msp1 によって引き抜かれて ER に戻る。しかし、こんどは別に異常タンパクでも何でもないで、そのままちゃんとゴルジに行った。この場合は分解されずに、ゴルジへのターゲティングのやり直しが起こったことになる。つまり、Msp1 は間違っただけでミトコンドリアにきたタンパク質を引き抜いて ER に回し、そこで異常なものは分解、正しいものは正しいところへ行かせるという、タンパク質のトラフィックの「校正」をするタンパクだということがわかった。

このようにタンパク質のトラフィックでも、やり直し、すなわち校正があることがわかってきた。ついこの前までは、オルガネラコンタクトで脂質の移動を見ていたので、細胞の中で特定の脂質が動いていく様子を見たい、そういう技術が必要だと思っていたが、これはいまだに解決していない。それだけではなくて、タンパク質のオルガネラ間の移動も高い空間分解能と高い時間分解能で見たい。さきほどのミトコンドリアに行くものが ER に行くというのは、結果だけを見ているのであって、オルガネラ間コンタクトを通るところ瞬間は残念ながら見られていない。高い時間分解能で見ればオルガネラ間コンタクトを通る様子が見られるかもしれないが、そういう技術が今のところなくて、必要性を痛感しているところである。

第二の話題は、私どもが 30 年以上にわたって研究しているタンパク質の輸送である。1,000 種類におよぶミトコンドリアのタンパク質のほとんどは、ミトコンドリアの外でつくられてミトコンドリアに入ってくる（図 2）。すなわち、ミトコンドリアの膜上のトランスロケーターという装置の孔を通して、タンパク質はミトコンドリア内に入る。こうした通りの入り口にあたるのが TOM 複合体である。1,000 種類のミトコンドリアタンパク質の大部分は TOM 複合体を通して、その後、経路が分かれてミトコンドリアの中で外膜、膜間部、内膜、マトリックス、と各コンパートメントに仕分けられる。ここでは、ミトコンドリアタンパク質の入り口として働く TOM 複合体のことをお話ししたい。

タンパク質入り口の孔：組成の異なる複合体の間の動的変換

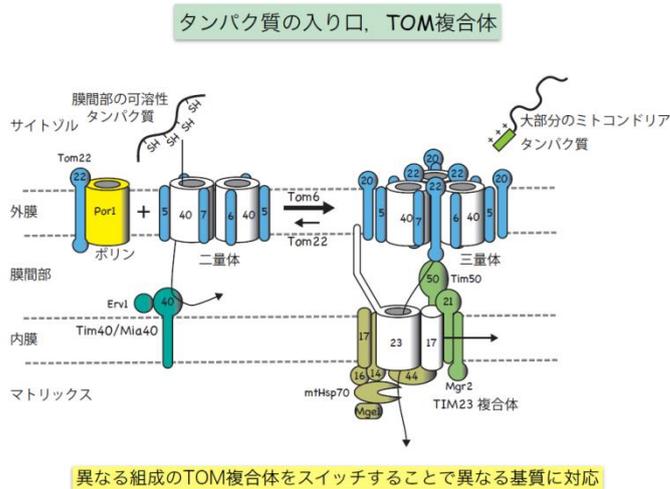


図 2

TOM 複合体は、 β バレル型膜タンパク質の Tom40 チャンネルと複数のサブユニットから成るタンパク質複合体だ。構造生物学的解析が難しいのは、TOM 複合体が単に膜タンパク質複合体というだけではなくて、この三量体がサブユニットの一部が欠けた二量体との間でダイナミックな平衡にあり、三量体と二量体では通す基質が違うことだ (図 2)。つまり、大部分のプレ配列を持ったものは三量体の Tom40 チャンネルを通るが、一部の膜間部のタンパク質は二量体の Tom40 チャンネルを使う。TOM 複合体は、このようにサブユニット組成を変えることで、様々な性質の 1,000 種類におよぶ基質を取り扱うことができるのである。

組成の異なる複合体の構造解析は可能か？

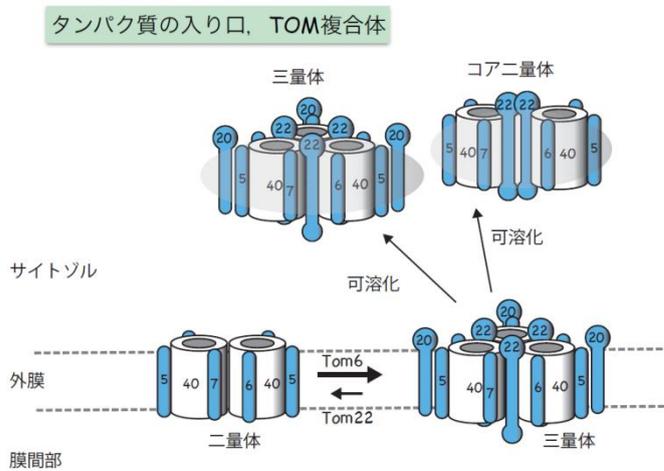


図 3

さらに TOM 複合体は、可溶化すると三量体の一部がコア二量体になる、すなわち精製法によっていろいろな状態をとるので、構造生物学がやりにくい (図 3)。そういう場合には、時間分

2. 話題提供

解能が高い高速 AFM が強力だ。金沢大の安藤先生のところで測定させていただいたが、TOM 複合体を可溶化してマイカの上に撒くといろいろな粒子が見える。よく見ると三量体と二量体と思われる構造体が観られる。さらにこの三量体を見ていると、一部がとれて二量体に変化することがわかる。だから三量体が二量体に変化していく、一部がとれて二量体になるなというのが高速 AFM を使うとわかる。こういう様子が直接観察できるというのは高速 AFM のすごく強いところだと思う。しかし、高速 AFM の空間分解能は分子複合体がやっと見える程度なので、もう少し高い分解能が欲しい。

最近、私たちはクライオ電子顕微鏡観察によって、TOM 複合体の高分解能の構造を明らかにすることができた。これは二量体で、Tom40 チャンネルが互いに斜めに位置して、歪んだような感じになっているが、二つの Tom40 分子の間にリン脂質が入っている。この詳細な構造からわかってきたのは、Tom40 チャンネルには基質が孔の外側を通るルートと内側を通るルートがあって、これらのルートは基質によって使い分けられているということである。二つのルートの基質は、各々 TOM 複合体通過後の下流の因子が違う。プレ配列を持つ前駆体の下流の因子は内膜の TIM23 複合体。一方プレ配列を持たない前駆体の下流因子は TIM23 複合体ではないので、空間的な混み合いを避けるために、出口が孔の反対側に用意されている。こうして、さきほどの三量体と二量体の使い分けに加えて、一つの孔においても、基質別に出口をうまく使い分けている。このような複雑で巧妙な仕組みを用意することで TOM 複合体は 1,000 種類にもおよぶ基質のミトコンドリア膜透過を効率よく行っているのである。

AUTAC を用いる細胞内標的の分解

○有本 博一（東北大学大学院生命科学研究科）

我々はケミカルバイオロジーを専門としている。細胞生物学のような領域で得られた成果の出口というか、現象の制御をしようとするうえでは、やはり化合物が有力である。その最先端についてお話ししたい。

いま基礎医学の研究者は、ノックアウトとかノックダウン実験を必ずする。その結果として何かがその疾患の原因になっているとわかる。疾患の原因がわかったという新聞記事は実際によく見かける。しかし、やはり新薬はできないわけで、なぜか不思議に思っているかたも多いのではないだろうか。ノックアウトやノックダウンの実験では、(間接的に)細胞内の特定タンパク質のレベルを下げていて、一方で、薬をつくる側は化合物でタンパク質を阻害することを目指している。ノックダウンと阻害は、似ているようで似ておらず、端的に言って、阻害剤ではタンパク質は全然消えてなくなる。阻害剤が活躍する典型的な疾患標的タンパク質に酵素が挙げられる。酵素では活性ポケットの小さなくぼみに大事な触媒機能が全部集まってしまっている。このため低分子医薬で蓋をして阻害ができる。しかしタンパク質のなかで酵素活性を持つものはわずかであるし、タンパク質の広い表面が重要である方が一般的である。この場合、小さなくぼみに結合する医薬というのは概念的に全く通用していない。このために、8割のタンパク質がアンドラッグバルな状態のまま何も手つかずになっている。

その中で、今ホットになっているのは、デグレーダーと呼ばれる技術である。米国とか英国では PROTAC に代表される技術が盛んに研究されている。化合物を振りかけるとユビキチンリガーと壊したいものが近づくので、その結果としてユビキチン化が促進されてプロテアソームで壊れるような仕組みを応用している。

デグレーダーは、既存のノックダウン法とは違って細胞内の特定タンパク質を壊す。概念は違っても結果として RNAi のようにノックダウンができ、タンパク質レベルが下がる。

PROTAC はすごく有名になっているが、残念ながら我が国はこの分野で出遅れている。これについては PROTAC の創始者自身も ARVINAS という会社をつくっているが、これを含めていろいろな会社に何百億円ずつお金が入っていて、臨床試験が今年から1つ始まっている。我が国のメジャーな製薬会社も PROTAC を追いかけている。

我々は欧米が先行する PROTAC と違う道を開拓している。これは 2019 年の 10 月 10 日に「Molecular Cell」で発表した我々の論文で AUTAC と名付けた。我々の AUTAC は名前も PROTAC に似ているが、実際には違いがある。一番大きな違いはメカニズムにあり、用いる分解系が違う(図 1)。したがって、化合物を使うのはよく似ているがいろいろ違いがある。オートファジーを使うのは、世界で我々だけで世界で最初である。一番大きい違いは、プロテアソームは、筒状の構造のタンパク質複合体であり、基質が分解されるためにはプロテアソームの小さい孔を通らなければいけないので、タンパク質がほどけなければいけない。つまり分解できる基質は可溶性なものに限定される。しかもタンパク質でなければいけないが、オートファジーは何でも壊せる。その中には、ミトコンドリアも入っている。それを念頭に置くと、AUTAC は PROTAC よりもずっと幅広い可能性がある。

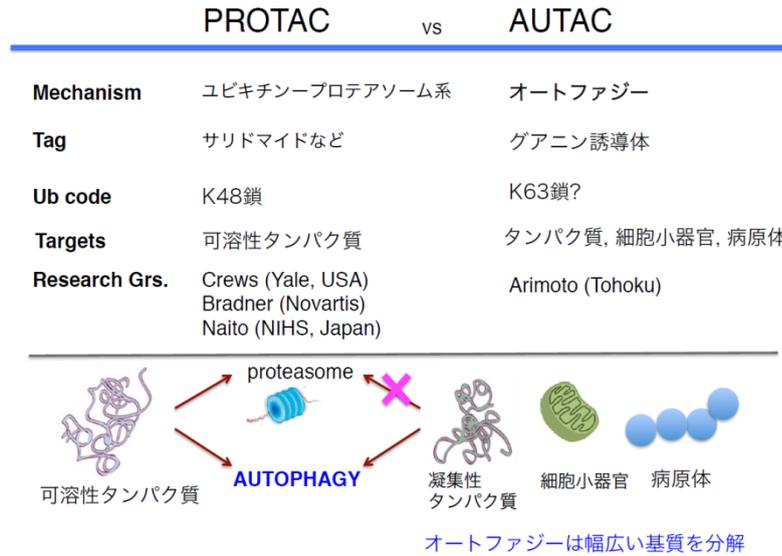


図 1

スタンダードなマクロオートファジーのスキームでは、隔離膜が伸びてきて周囲の細胞質成分を丸飲みする。そのあとリソソームと融合するので、分解はリソソームで起きる。ここがプロテアソーム分解とは違う。オートファジーはいろいろな病気を抑制する働きがあり、実際、オートファジーに関わるコア Atg 遺伝子をノックアウトするとタンパク凝集体などが蓄積することがわかる。このようにオートファジーは明らかに健康に関係しているのに、これまでオートファジー創薬が世界中で一例も成功しないのはなぜか。その一つの大きな理由は、分解に選択性がないからである。

それで我々は、選択的オートファジーという現象に着目している。選択的オートファジーの機構は完全にはわかっていないが、一般的に受け入れられている考えでは、壊したい基質と膜の上のタンパク質を橋渡しする成分（オートファジーレセプター）がいて基質と隔離膜を繋げることによって優先的に分解が進むこととされている。しかし、どうやって選択的オートファジーを再現するかというまでには至っていなかった。

AUTACを用いる細胞内標的の分解

(Molecular Cell 2019, 76, in press)

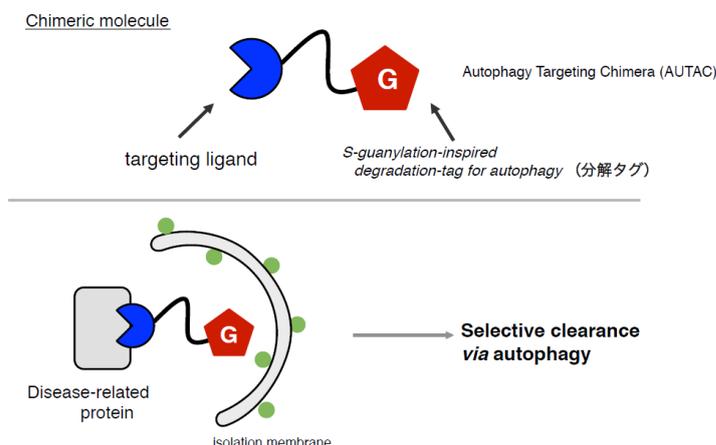


図 2

そんな中で、我々は細胞内に侵入した細菌の排除が選択的に行われることに注目して、A群レンサ球菌のオートファジーを研究した。細菌が最終的にオートファジー分解に至る前に、ある低分子有機化合物の目印が細菌周囲に入っていて、これが選択的に大事だということに気づいた。そこから6年ぐらい頑張り、先ほどのAUTACを先月10日に発表した。AUTACの標的化リガンドは、それぞれ病気に関係するタンパク質に自由にデザインできる。このため自由にオートファジーを呼んでくることができる。オートファジーを呼び寄せる「分解タグ」のほうは、体の中ではcGMP構造が使われるのだけれども、医薬として外部から投与するうえでcGMPは具合が悪いので、有機合成していろいろ化学構造を改変して、有効な分解タグを発明することができた。このAUTAC1というものは、この標的化リガンドとして天然有機化合物を使っており、標的としたタンパク質をノックダウンできる。AUTAC2も同じで、別の疾患関連標的を分解する。このようにAUTACでは、低分子を振りかけるだけでRNAiと同様のノックダウンができる。

PROTACとAUTACの違いを強調して見せるために、機能不全ミトコンドリアを壊したいと考えた。このAUTAC4というものがミトコンドリアの外膜に結合するようにつくってあり、外膜上に分解タグを並べることができる。そうするとミトコンドリアをオートファジー分解できる。ただ、オートファゴソームの大きさの制限から、機能低下した断片化ミトコンドリアだけが優先して壊れるような有用な選択性が見られる。こういう分子が実際にもうできている。こういうことを使えば疾患の改善等にも使えるし、代謝の制御にも使えるかもしれない。

ダウン症由来の線維芽細胞をAUTAC4で処理する実験を紹介する。これはMol Cell論文に出ている例で、ミトコンドリアの機能低下が進み、断片化している。ここにさっきのAUTAC4をかける。そうすると正常な細胞ではミトコンドリアが長く大きいのでAUTAC4化合物が入ってもオートファジー分解が起きない。でも、ダウン症のほうでは起きてくる。結果として、これが処理前に断片化してみえていたミトコンドリアの形態がわずか3日間のAUTAC4の処理でこのように改善する。正常なネットワークの形に変化して、健全な形になってATPも上がってくるのがわかった。

こういう新しい、本来の基礎研究から出てきた AUTAC は、わが国のこれまでの支援によって生まれた新技術であり、これを育てて行くことが重要だろう。10月是我々の論文が出ただけではなくて、オートファジーの創薬応用に関する重要論文が2つ出ている。ひとつは10月30日に出た「Nature」の論文で、中国のグループ。ハンチントン病の原因タンパク質をオートファジー分解する化合物を発見したと主張しているが、提案されているメカニズムが本当に正しいかどうかは、もう少しデータが必要と感じる。実はオートファジーの専門家のクローマー教授らは、似たような実験を行い、オートファジーは起きないということを発表している。このように不確定なことがあるものの、2019年秋はオートファジーを使って疾患原因を取り除くうえでは重要な発表が続いた。これをきっかけにして、世界的にオートファジーを選択的に動かそうというのはウーッとやられるのではないか。せつかくの我が国初の発明が育って行くように、タイムリーな支援体制の構築をお願いしたい。

質疑応答

○問 AUTAC というのは、スクリーニングとか、例えばサイズを見極めるセレクトイビティがあるものとか、そうではない機能を見極めるものというのはどういうふうに見つけてくるのか。もう一つ、やはりマイクロモータだと薬にならないと思うので、これからデザインをして向上させるときに、どういうふうにデザインするかということは何かお持ちでしたら伺いたい。

○有本 まず、大きさだが、我々が最初に研究した A 群連鎖球菌の抗菌オートファジーで生成するオートファゴソームは異常に大きくて、直径が 10 マイクロメートルもある。その例外的に大きなオートファゴソームが AUTAC でも生成するかと思ってやってみたが、実際にできたオートファゴソームの大きさは通常と同じで、直径は大体 0.5 から 1 マイクロメートルぐらい。そういうことを考えると、小さいミトコンドリアが優先して壊れるというのはまったく合理的である。我々の方法でオートファジー分解の目印というのは、抗菌オートファジーを丸ごと再現はしておらず、オートファジーを呼んでくる鍵のところだけの機能を持っているということ。オートファゴソームの大きさを制御するためには、別の因子が関わるのだろう。オートファゴソームを大きくできれば、もっといろいろなものを壊せるようになる。

それから課題は、オートファジーが分解相手の疾患原因を認識する機構をもっと詳しく解明すること。PROTAC では、分解に必要な役者の数が少なく、ユビキチンリガーゼだけであるけれども、オートファジーという現象では 100 ぐらいのオートファジー関連タンパク質が強調して働く必要がある。それらがどういう順番で、集まり機能するかが詳しくわかってくると、AUTAC の改良にもつながる。もう少し活性を上げる方法がわかってくる。

核内動態と遺伝子発現機構

○木村 宏（東京工業大学科学技術創成研究院）

“ヌクレオーム”という言葉が最近注目されているが、その世界的な動向と、これからどうなっていくのかについてお話ししたい。

遺伝子発現制御というのは重要で、細胞の発生や分化、高次生命現象、それから疾患などに大きくかかわってくる（図 1）。その遺伝子発現の出発点となるのは転写で、転写は昔から研究されている。単純にいうと、転写因子が DNA に着いて RNA ポリメラーゼがいくと転写が始まるというだけだが、そこにはいろいろな制御があって、転写因子自身の結合に加えて、ヌクレオームという構造、それからそのヌクレオームがどうやって集まっているか、それが核内でどういう場所にあるかということが大きくかかわってくる。また、もちろんそれらを支配している物理的な要因、動きとか細胞の核の中の粘弾性、密度・濃度が重要であることが最近わかっている。

細胞核内の様々な階層での制御

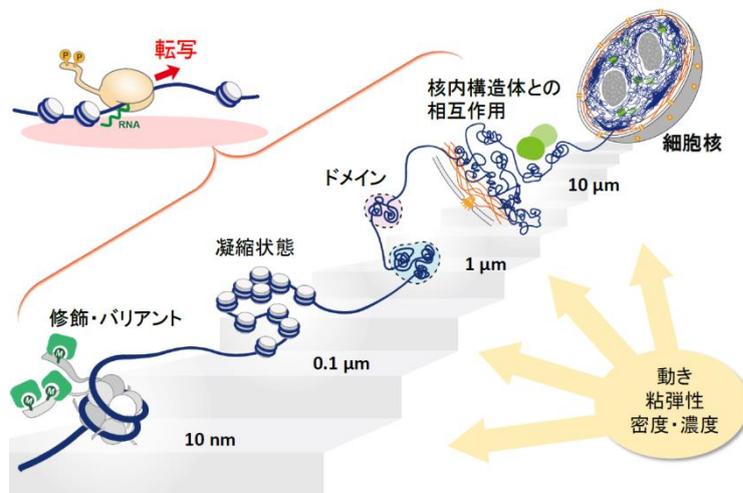


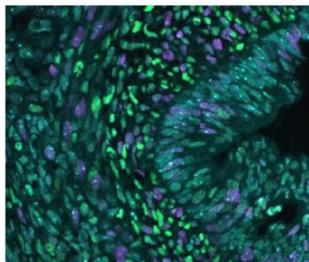
図 1

つまり、やはり核全体を理解しないと転写や遺伝子発現の機構について何事もわからないということがあり、10 年近く前に“ヌクレオーム”という言葉ができた（図 2）。核（ヌクレアス）+オミックスで“ヌクレオーム”になる。特に米国のほうで進んできているのが“4D ヌクレオーム”研究であり、この「4D」はスペースの 3D とタイムで、要するに、時空間で核全体を理解していく、という意味である。核の中には、クロマチンとか核内構造体とか、RNA ボディとかたくさん構造があり、転写を始めとして RNA プロセッシング、DNA 複製・修復・組換えという大事な機能が備わっている。例えばマウス胚の核を、いろいろなヒストン修飾抗体で染めると、さまざまな形とか違いのある核があることがわかる。また、1 つの核のクロマチンの動きを超解像で見ると、何となく動きがある部分とない部分がある。短時間見ているだけでもいろいろなことが見えてくる。つまり、ダイナミックに動いているいろいろなものが制御されることが想像できる。

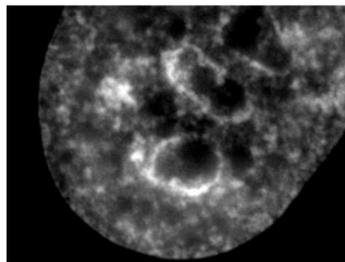
Nucleome : nucleus + ome (核全体)

4D Nucleome: 核全体を時空間
(space “3D” and time)で理解

構造	機能
クロマチン	転写
クロマチンドメイン	RNAプロセッシング
染色体	DNA複製
核内構造体	DNA修復
RNAボディ	DNA組換え
核膜	



細胞周期や分化状態に応じた核構造の変化



局在性や機能の違いによるクロマチン動態

図 2

では、“4Dヌクレオーム”研究で実際に何をやるのか？大事だと言われているのがイメージングとゲノム・エピゲノム、それから情報・数理科学（図3）。これはまさしくこのワークショップのテーマと同じだと思う。核酸やタンパク質のイメージングと機能解析、それと情報・数理科学との融合、さらに、それをスナップショットで捉えるだけではなくて、時間軸に沿って理解することが大事である。

4Dヌクレオーム解析を支える基盤技術

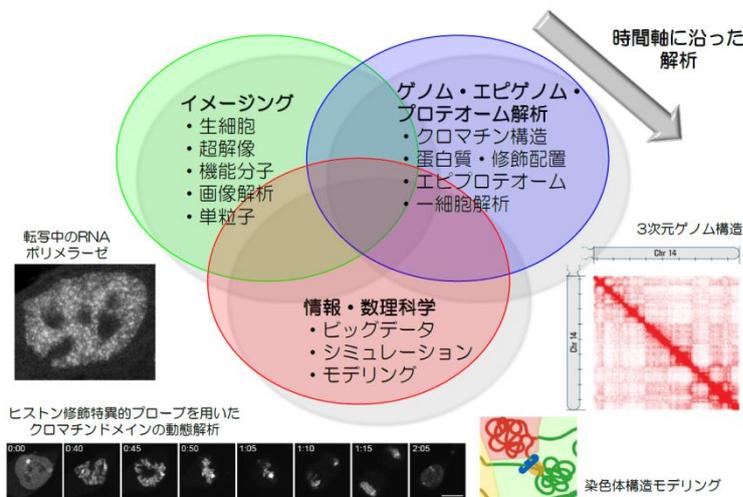


図 3

顕微鏡の分野から見ると、顕微鏡で核が見えたという時代からどんどん技術が進歩し、分子生物学的な解析、それから GFP でライブセルイメージング、あるいは超解像ができるようになって、さらにそのビッグデータをどう計算機科学と融合させるかが今課題になっている（図4）。一方でゲノム解析もかなり進み、普通のゲノムのシーケンスから、メチル化とかアセチル化などの

エピゲノム、さらに、どこがアクセシブルなクロマチンか、あるいはクロマチンの 3D 構造がどうなっているかという情報が得られるようになり、それらと顕微鏡が、ようやく今結びつくようになった。これまでは、顕微鏡では細胞内の局在は見えるが解像度は悪く、エピゲノム解析では解像度は高いがたくさんの細胞サンプルが必要であり、なかなかこの 2 つを同じレベルで議論するのが難しかったが、ようやくできるようになってきた。

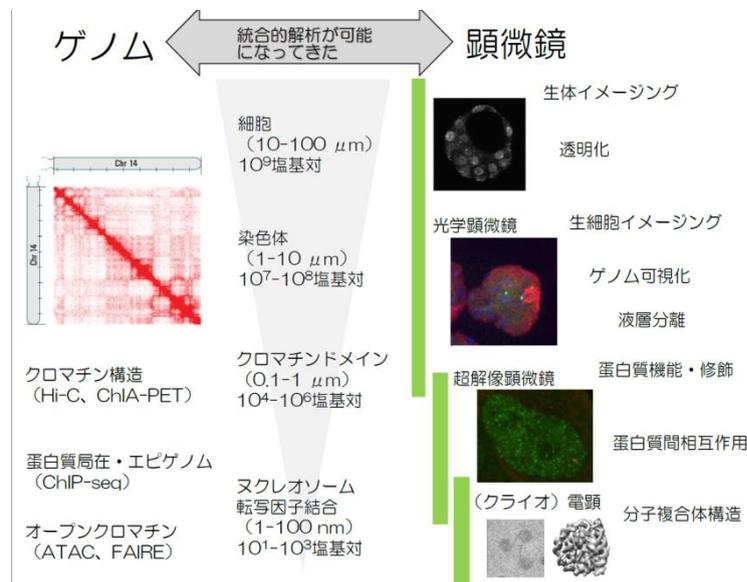


図 4

では、実際に核がどう変わるかという、発生するとき分化するとき、例えば幹細胞からどんどん違う細胞ができてくるが、幹細胞が分化したときには DNA メチル化が発達してくるであるとか、逆に線維芽細胞から iPS 細胞をつくったときにヒストンという分子のアセチル化レベルが上昇してくるということが見える、それから、細胞老化の際には、1 本の染色体が 1 カ所に集まっていったりする。核膜は通常丸いが、早老症の核では歪んでいたりする。このように、発生、分化、老化、病態などに応じて核がダイナミックに変化する。

また、染色体レベルで見ても、コヒーシンや CTCF というループの根元にあると言われているタンパク質などにより、3 次元のゲノム構造が形成され、核内での遺伝子発現の制御、あるいは DNA 修復の制御などに重要であることもわかっている。これらのタンパク質が変異を起こすと疾患になることも調べられている。

問題意識としては、こういった“ヌクレオーム”研究は分野融合の研究であり、異分野融合のハブとしても働くことである。“ヌクレオーム”研究では、数理モデルとかモデル動物開発、核のダイナミクス、それからデータの標準化、そういうものを通して生物学的に意義のあることを見つけていく、あるいは技術開発を行う (図 5)。

2. 話題提供

異分野融合のハブとしてのヌクレオーム研究

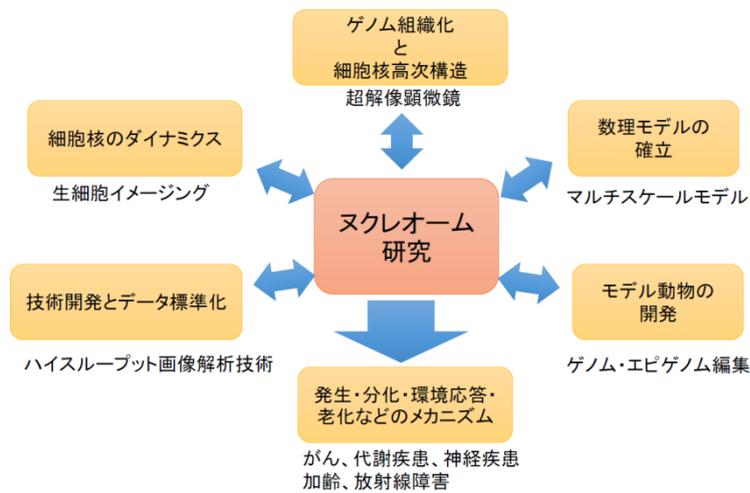


図 5

2013年ごろに“ヌクレオーム”という言葉がちょっと流行り始めたが、米国のNIHではすぐにそれを取り入れて、2015年から4D Nucleome Initiativeが始まった。これだけでもすごく予算規模が大きくて、第1期は主に技術開発であった。それが5年間終わって、来年度から第2期が始まるが、そちらは、疾患であるとか細胞の分化とか、高次生命現象にかかわってくるという話を聞いている。この間に様々技術が開発されて、この4D Nucleome Initiativeを始めた意義があった。米国だけではなくヨーロッパ、それ以外のところを含めて国際組織をつくろうという動きもあって、International Nucleome Consortiumの話が出ている。ヨーロッパもちょうど今年の初めぐらいにネットワークのグラントが採択されて進められている。また、ドイツでは独自に同じようなコンセプトのプロジェクトが始まっている。日本では、これ単独でのファンディングは今のところない。

では、私たちはどうやって“ヌクレオーム”研究に切り込んでいるのかということ、例えば顕微鏡解析のほうでは特定の機能を持つ、例えば翻訳後修飾を受けた、分子の生細胞解析ができるようなツールをつくっている。それは抗体の断片を蛍光標識して打ち込むとか、あるいは遺伝子コード型の蛍光プローブを発現させるということで、細胞の中でヒストン修飾やRNAポリメラーゼの修飾がどう変化するかを見ることができるようになっている。このような技術を用いて転写の動態を観たり、あるいは、数理モデルとあわせてアセチル化の意義を明らかにすることができてきた。様々な技術開発をすることで“ヌクレオーム”研究や、それに留まらず細胞全体での解析に適応できるようになり、今回のトピックにも関連すればいいのかなと思っている。例えば、この研究から派生して、例えば細胞内抗体で安定に発現できるものにFLAGとかHAなどのタグに対する抗体をつなげると、それらのタグが付加されたタンパク質が細胞内で見えるようになっている。今回のトピックに関して、このような技術も使えるのではないかなと思っている。

質疑応答

○問 1 つは、核内動態を理解するためにはシグナル伝達も含めた細胞質、そういうものも理解しないとだめだという考え方に対してどう思われるかということと、2点目は、クロマチンの修

飾、ヒストンの修飾とかいろいろ話を伺ったが、ガンマサテライトと特定のターゲット遺伝子、核内のダークサイド、パーティシペイティドされた不活性化といったような動きは最近どうなっているか。

○木村 最初の点だが、やはり細胞質と核のコミュニケーションが大事で、核と細胞質の輸送、それから細胞の外から来るシグナルが細胞質を通ってくるので、それが細胞核の中に行くというシグナル伝達経路をどう受けとめるかが重要なところで、細胞質とは切っても切り離せない。

ヘテロクロマチンのほうも、最近やはり研究が進んできて、やはりドロップレットみたいなものをつくるのではないかという話もあったりする。ドロップレットがどうヘテロクロマチンになったり、あるいはオープンになったりということに関しての研究が進められてきているが、まだ完全にダークなところが理解できているわけではない。日本にも特にダイナミクスの視点からやっている研究者もいるが、まだドロップレットに関する研究はあまり進んでいない。

RNA と細胞内相分離の研究

○廣瀬 哲郎（北海道大学遺伝子病制御研究所）

私は RNA と細胞内相分離の研究についてお話しさせていただく。これは「ノンコーディング RNA」と「細胞内相分離」という 2 つのホットトピックの接点から見出されたもので、今後新しい展開があるのではないかという期待感が双方の研究分野で高まっている。

もともと 2005 年ぐらいを境にノンコーディング RNA が注目を集めてきた。ここで大事な視点は、ノンコーディング RNA は、タンパク質と複合体をつかって RNP として機能しているという点である。我々は、この視点に立ってノンコーディング RNA の機能解析を 15 年ほど行ってきたが、そこで出会ったのが非膜性構造体である（図 1）。これはパラスペックルという非膜性構造体を示しているが、例えば超解像顕微鏡で観察すると、きれいな二相構造をとっている。この構造の骨格が特異的なノンコーディング RNA であることが分かり、「RNA が細胞内構造の骨格として働いていること」を示した驚くべき発見があった。

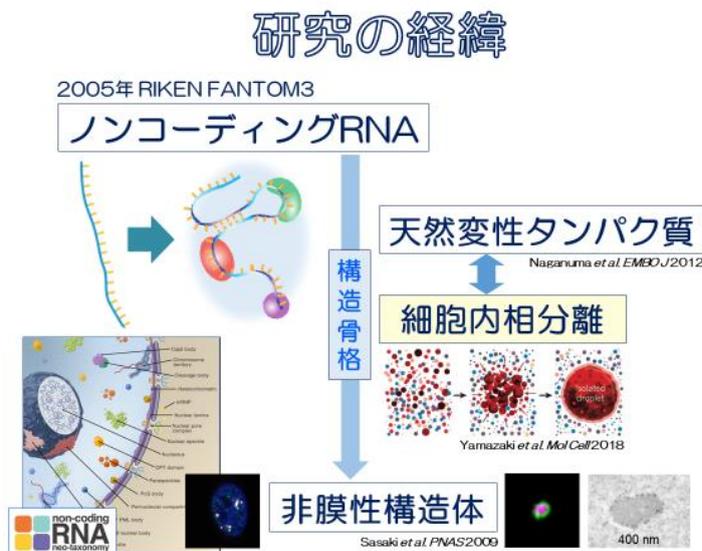


図 1

RNA が働くためにはパートナーとなるタンパク質が必要だが、これらはほとんどが天然変性タンパク質であり、最近これが相分離を介して巨大な非膜性構造体を形成できることがわかってきた。この大きさは、リボソームの 1,000 倍ぐらいの巨大な RNP 複合体で、これほど巨大な構造を構築するための秘密が相分離という機構に隠されていた。それと並行して、タンパク質の分野でも相分離の研究が盛り上がりを見せているが、我々のスタンスはあくまでもノンコーディング RNA から見た相分離の研究であり、この点が我が国オリジナルな、世界では他に例を見ない研究であると言える。

我々は、このノンコーディング RNA を Architectural RNA (arcRNA) と呼ぶことを提唱している（図 2）。こういった RNA は、いろいろな真核生物種に存在しており、いずれの場合も天然変性タンパク質を集約して、細胞内相分離を誘発して巨大な核内構造体を形成していることが共通のメカニズムである。リピート配列からなる神経変性疾患関連の毒性 RNA もこのカテゴリー

に含まれる。重要な点として、これらの非膜性構造体は、arcRNA が転写された染色体座位の近傍に形成される。つまりゲノム上でこういった arcRNA が転写されると、その場で一過的に相分離によって隔離された微細環境が形成される。こうしたことが核内の統合的な制御を可能にしているのではないかと興味深い仮説が提唱されている。

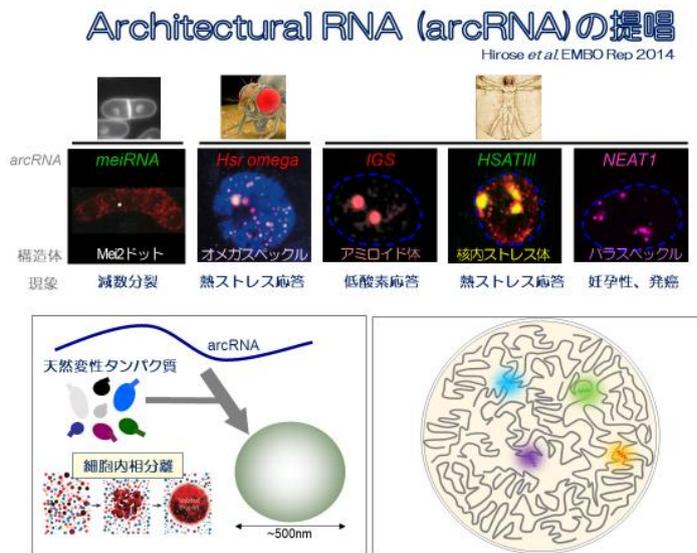


図 2

我々は長年、どのように arcRNA がこれほど巨大な構造体をつくることのできるのか、そのメカニズムを研究してきた (図 3)。その結果、いくつかの arcRNA は天然変性タンパク質を集約して、さらにクロマチンリモデリング複合体を呼びこみ、非膜性構造体を形成するという共通したスキームが描けることがわかり、共通した分子メカニズムが存在する可能性がある。また、タンパク質が様々な機能ドメインから出来ているように、ノンコーディング RNA の中にも機能ドメインがモジュラーに存在していて、それによって機能を発揮していることもわかってきた。

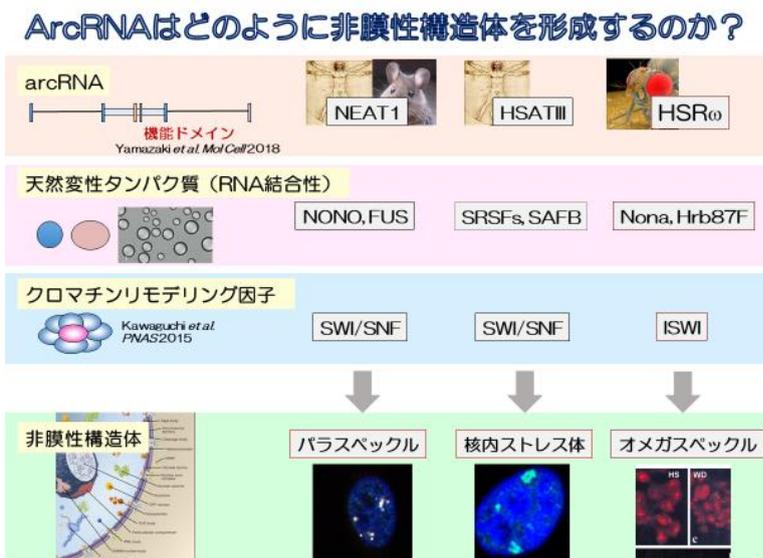


図 3

2. 話題提供

一方で、RNA には相分離に関して全く別の働きがあることが、ドイツの相分離研究の第一人者、トニー・ハイマンらのグループによって提唱されており、RNA が相分離を起こしやすい一群の天然変性タンパク質に、どちらかという非特異的に結合して異常な相分離を起こさないようにしている、いわばバッファーのような役割をしているといったことが提唱されている。つまり核内の環境は RNA の濃度が高いので、タンパク質の異常な相分離は起こらないようになっている。ところが、変異などによってこうした通常核に局在している天然変性タンパク質が、RNA 濃度の低い細胞質に漏れ出てしまうと、そこで異常な相分離を起こしてしまい、それが神経変性疾患の原因になりうる毒性封入体を形成してしまうといった仮説である。

そんな中で、RNA の中でも特殊なセレクションされた arcRNA だけが、こういった核内環境の中でも天然変性タンパク質の相分離を誘導し、非膜性構造体を形成することができる。さらに RNA 単独でも相分離を起こすことがわかっており、短い RNA-RNA 相互作用が集約すると相分離が起こることが示されている。

では、こういった相分離構造体は何のためにつくられるのか、バイオリジカルにどんな意味があるのか（図 4）？ これまでに 3 つのメカニズムが提唱されており、第一に特異的な生化学反応の「るつぼ」として選択的かつ効率的に生化学反応を行わせる場としての機能、第二に因子を構造体に係留して働かなくしている機能。第三に、最近の米国 MIT のヤングらのスーパーエンハンサーの論文などにあるとおり、クロマチン 3D 構造のストラクチャハブとして、RNA と共につくられる相分離構造体がクロマチンのハブ構造をつくっているといったメカニズムが提唱されている。

非膜性構造体は何のために作られるのか？

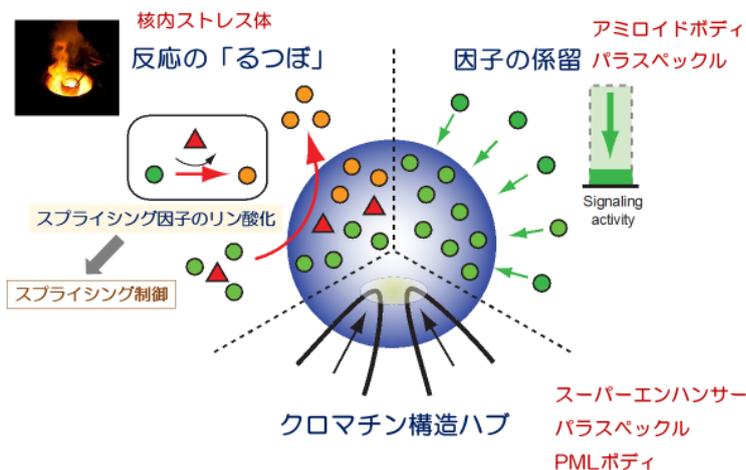


図 4

我々の研究によって、核内ストレス体という RNA 依存的な非膜性構造体が、温度に依存したスプライシング制御因子のリン酸化反応の「るつぼ」として使われていることが見出された。温度変化が起こると、特異的リン酸化酵素がこの非膜性構造体の中に取り込まれて、ここにため込まれているスプライシング制御因子をリン酸化する。その結果として、リン酸化されたスプライシング制御因子が温度変化に応答したスプライシング制御を行うといった巧妙なメカニズムであ

る。非膜性構造体の機能は、未だほとんどわかっておらず、今後いろいろな例が一つ一つ積み重ねられるのではないかと考えられる。

最後に、こういった arcRNA 機能は特殊なごく限られた RNA のみを持つ機能なのかという疑問点に答えるために、我々はゲノムワイドに arcRNA を探索する方法を確立した。まず既知の arcRNA が、通常使われる RNA 抽出試薬に抽出しづらい性質を発見し、この難抽出性を持つ RNA を次世代シーケンサーによる RNAseq によって探索した。例えば我々が長年研究している NEAT1 という arcRNA は、通常のプロトコールに従って細胞から RNA 抽出した場合には少量しか抽出されないが、抽出液を一度注射針に通すなど強い剪断力をかけると 20 倍ほど抽出できるようになる。このように注射針を通す処理によって抽出量が増加する「難抽出性 RNA」がどのくらいあるかを RNA-seq で解析すると、1 種類のモデル細胞で、大体 50 種類ぐらいの難溶性 RNA が同定され、このうち発現量の多い RNA を調べたところ例外なく、核内の未同定な非膜性構造体に局在していることが明らかになった。この難抽出性 RNA-seq 解析をストレス等を与えた細胞株で行うと、新しい RNA 種が同定されてくるので、arcRNA はゲノムのいろいろなところから転写されていて、それぞれのクロマチン部位に様々な非膜性構造体を形成し複雑な核内制御を統合している可能性がある。

今後の実質的な研究課題（図 5）としては、RNA による相分離の誘導機構をきちんと理解していくといった骨太な研究が重要だと考えられる。それから相分離した構造体が、液体からゲル、さらに固体になるという、いわゆる「相転移」にも RNA が制御している可能性があるため、相転移の方向性を決める条件を決定するなどの基礎解析が重要である。そして最後に生体内での相分離の意義をきちんと理解していくことが今後重要となる。そのために必要な技術をここに示した。

RNAと細胞内相分離の実質的研究課題

相分離の誘導機構

1. RNAのバッファー機能とarcRNAの相分離誘導活性の決定要因
2. arcRNAの相分離誘導のための暗号解読
3. 天然変性領域のアミノ酸配列文法
4. 制御因子（翻訳後修飾、RNAヘリカーゼ、分解因子）

相分離体の物性決定要因（相転移）

1. 上記2～4
2. 神経変性疾患構造体におけるRNA機能

相分離の意義

1. 作用分子機構の解明
2. 生理機能の解明
3. 疾患との関わり

技術

- 長鎖RNA合成技術
- In vitro 再構成系
- 光ピンセット操作技術
- 相分離体制御低分子化合物
- 細胞内構造体の物性測定技術
- 超解像ライブイメージング

図 5

長い目で見た場合の研究展開（図 6）としては、相分離というと、いわゆるソフトマター物理学で古くから研究されてきた分野で、物理学者も生物におけるこの盛り上がりをよく認識しているが、今のところ相互の実質的なコラボレーションは実現していない。我々も少しずつ議論を始

めているが、そういった融合研究を推進していくのが今後の重要な展開だと考えられる。それから、相分離と神経変性疾患は密接に関わっているので、そのメカニズムの理解が今後魅力的な課題であろう。特に RNA をターゲットにして疾患関連構造体を操作するような研究は興味深い。そして、前述のソフトマター物理学によって細胞内相分離が理論化できると、相分離の環境を人為的に合成し操作することができるので、合成生物学的発想で相分離環境を細胞の中に再現し、その中で特異的な生体反応を行わせるような研究はおもしろいのではないかと考えている。

今後想定される新たな研究展開

ソフトマター物理学による理論化

1. 基礎概念の適用（ブロック共重合体としてのRNA骨格、マイクロ相分離）
2. 数理モデルによるシミュレーション

医学・創薬研究への展開

1. 神経変性疾患、癌の病因・病態メカニズム
2. 相分離体を標的とした創薬（e.g. 物性の変換）

合成生物学への展開

1. 細胞内の特異部位での相分離環境デザイン
2. 相分離体内での特異的生化学反応の誘導
3. 原始生命の創生（e.g. リボザイム反応加速、ネットワーク化）

図 6

質疑応答

○問 神経変性疾患で、タンパクの構造変化が疾患発症に重要だというのはよくわかるが、プリオンで、インフェクシャスプロテインということまで有名になって、特定のβシート構造を持っているタンパクは、他の個体に移すとそれ自身が他のコンフォメーションを引き起こすという説が覆されたということは聞いていないので、他の神経変性疾患でタンパクに異常があったときそういうことが起こるのであろうか。

○A プルスナー先生が1991年に提唱されたプリオン仮説、97年にノーベル賞になっているが、実際には、このプリオンタンパクですら実験的にはその部分は仮説で厳密には証明されていない。今やプリオン以外のタンパク質も同じようなキャラクターを持っているのではないかと。実際に臨床的に感染するということは明確には証明されていないが、タンパク質のキャラクターとしては持っているのではないかとということで、私どもも、ポリグルタミンタンパク質を用いて、βシートに変わった構造体がやはりネイティブ構造の構造体のタンパク質と相互作用してβシート化がどんどん増幅されるようなデータを持っており、プリオンという特殊なタンパク質ではなくて一般化できるのではないかと考えている。

○B 補足させていただくと、βシート構造がインフェクシャスだと言われているが、実際 *in vitro* でつくったβシートリッチな凝集体を、プリオン病でさえ高効率に感染させることはまだ余りできていなくて、実際に感染性の高い構造体がどういうものかということはまだ誰も知らない。RNA みたいな核酸を入れてあげるとインフェクシャスが強いものができるという報告も最近結

構あり、やはりタンパクと RNA がインタラクションして、それによって何かしら特殊な構造ができてきて、それが感染性の高いものになっていることも示唆されてきている。

3D 電子顕微鏡の現状と研究動向 メゾスケール Biology への展開 ○太田 啓介（久留米大学医学部）

平均化しない三次元電子顕微鏡の話題を提供する。私たちは「生物を構成する分子と生体の形との間のギャップをつなぎたい」という目的を持ち、生物を理解するための 1 つの方法として、十数年前から細胞・組織を電子顕微鏡レベルで三次元観察する手法に取り組んでおり、このギャップを理解する生物学として「メゾスケールバイオロジー」という言葉を使っている(図 1)。メゾスコピックスケールという呼び方をすることもあって、構成している粒子が形になっていくまでのスケールという捉え方で、生物で言えばタンパクが形になるまでの空間を指す。大ききで言うと 10 ナノメートルから数百ナノメートル、人によっては 1 ミクロンとかもう少し大きいところまで含める場合があり、もう少し柔らかい言葉で言うと、オルガネラとかサブオルガネラの形ということになる。電子顕微鏡では、このくらいが 100 ナノメートルのエリアになる(図 2 上赤丸)。ただ、実際これらは三次元空間の中に存在していて、その 3 空間をありのままに解析することは従来技術では難しく、あえてメゾスケールと呼んでいる。

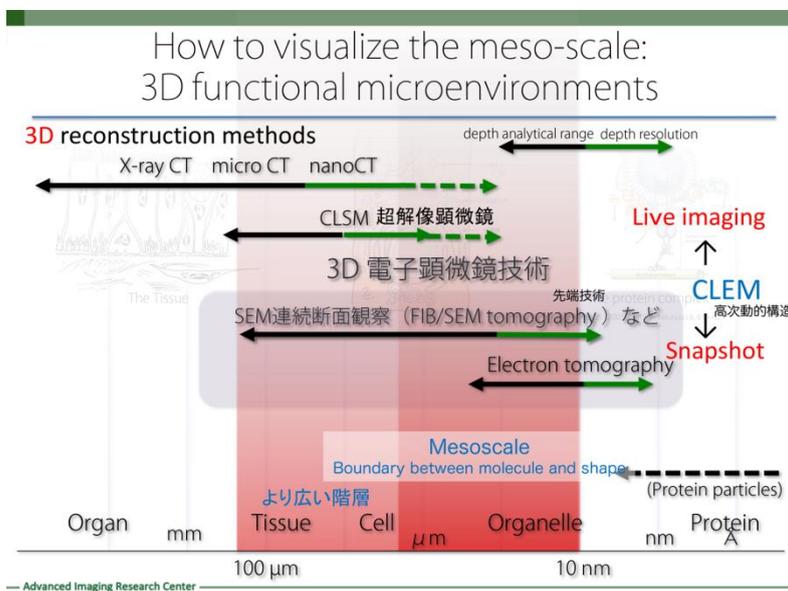
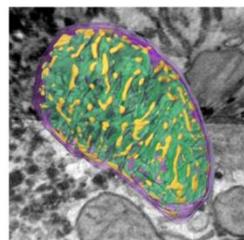


図 1

例) Cristae junctions



TEM



3D 電子顕微鏡

図 2

これは 2012 年の論文で、肝臓のミトコンドリアを見たものである(図 2 下)。クリステという構造がたくさんあるが、その構造を 3 次的に具現化するのは難しいが、3D 電顕法の 1 つ FIB-SEM トモグラフィ法を使うことで初めて可視化した。注目していただきたいのは、この緑色に見えるのがクリステで、黄色いのがクリステジャンクションと呼ばれる現在非常に注目されている構造になる。ミトコンドリア全体での構造や分布はこの方法で初めて見えるようになった。

このメゾスケールの三次元構造はあまり解析が進んでおらず未開拓領域である。実際再構築してみるとその中には知られていない構造がいっぱい出てくる。まさに未知の構造の宝庫で、1 つ再構築するとその中には 3 つぐらいよくわからない構造を発見することがある。最近の観察では、薬物投与とか代謝変化、例えば糖尿病等のモデル動物でのミトコンドリアの構造に注目し、その

微細な三次元構造がどんどん変わってくることを捉えており、ここに形に関わる未確認のメカニズムがあると考えられる。これらは新しい検査とか治療の標的になっていくのではないかと期待している。今後これらのシーズを何とか分子メカニズムに落として行くことが重要だと思っている。

また 100 ナノメートルというエリアは、正確に捉えることができると物理シミュレーションに繋がるモデリングが可能になる。例えば、構成物がよくわかっているウイルス等の場合は、このようなモデリングが可能で、米国ではこれらを計算機中でつくり何が起こるかを考えるというグループがある。我々の場合、生物試料でのモデル化はまだできていないが、歯科材料であるコンポジット材料をメゾスケール解析しモデル化したことがあり、製法の違いによる物性と微細構造の関係をシミュレーションで推測できることがわかった。おそらく生物でも、構成要素と正確な形が理解されることで、このような物理シミュレーションを行うことも夢物語ではないと思っている。

さて三次元電顕法には大きく 3 つの方法があり (図 3)、単粒子解析法、電子線トモグラフィーという方法。(これは後で福田先生がお話しされると思う。) もう一つが FIB-SEM トモグラフィーを含む「SEM 連続断面観察法」である。

メゾスケール領域を解析する 3D電子顕微鏡の現状と動向 1

- 単粒子解析：平均化が必須
- 電子線トモグラフィー Electron tomography
 - タンパク複合体を直接観察できる唯一の方法
 - 樹脂包埋試料 → 氷包埋試料
 - 解析範囲 厚さ300nm (切片一枚分)
- SEM連続断面観察法 Serial Slice SEM (SSS法)
 - FIB-SEMトモグラフィー法 (サブ)オルガネラレベルの解析
 - Serial Block Face SEM法 細胞レベルの解析
 - Array tomography法 組織レベルの解析
 - 樹脂包埋試料が中心(要改善)

— Advanced Imaging Research Center —

図 3

単粒子解析というのはノーベル賞をもらったので説明の必要は無いが、これは平均化しないと形が出てこないというのが最大の弱点になる。もう少し高次な構造になると平均化ができないので、直接観察しなければならない、唯一それが見られる方法として出てきたのが電子線トモグラフィーで、X線CTと同じような方法でデータを取得する。当初は樹脂包埋試料が用いられたが、タンパク粒子まで見える高い分解能をもつため、最近、保存の良い氷包埋試料が用いられるようになってきた。すばらしい方法ではあるが、1つの弱点は、観察範囲が切片1枚分の厚さ、300ナノメートルぐらいまでに限られる。もう少し大きな構造を知りたいとなると、SEM連続断面法になる。このカテゴリーにはいくつか方法があり、私たちが中心に取り組んでいるのがFIB-SEMトモグラフィーという方法である。この中では一番分解能が高く、オルガネラレベル

の解析に最も適した方法である。この方法では試料を FIB—Focused gallium ion beam で少しずつ (nm 単位) 削りながら SEM で断面を観察していくという単純な手法になるが、技術的な大きなブレークスルーはディテクターの進歩で、SEM にもかかわらず TEM のような組織像を観察することができるようになったことで、このような技術が急速に発達した。削るピッチは最小 5 ナノメートル以下まで持っていけるので、そこそこの空間分解能が得られる。

このような技術を使って今後何をしなければいけないかという話については、大きく 2 つある (図 4)。1 つはオルガネラのコンタクトとかオルガネラのネットワークといった細胞生物学的な課題であり、もう一つは、コネクトミクス研究である。メゾスケールが見えるのであれば全部の神経の結合を見たいというわけである。後者はより広く、より正確な情報をとということによってどんどんデータが大きくなっていて、現在 1 ミリ角の脳、ペタバイトクラスのデータを解析する段階になっており、データサイエンティストが不可欠になる。ただ、日本はここが大きく遅れているのが現状である。

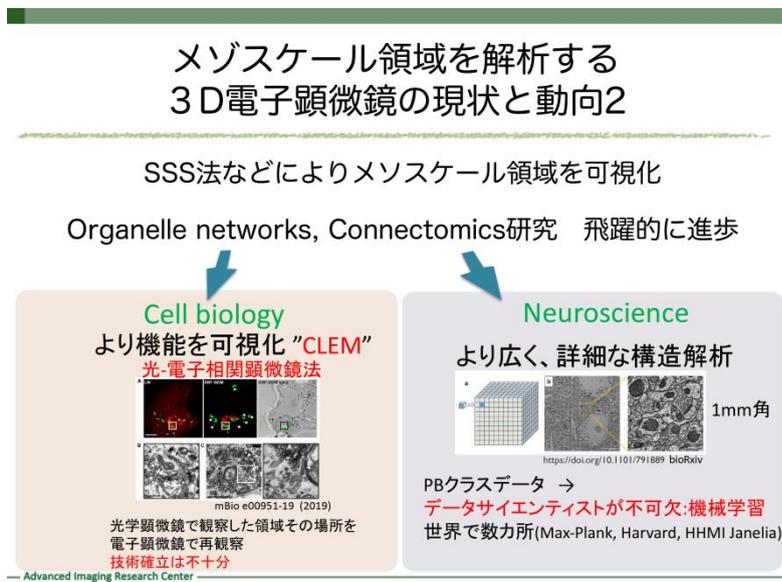


図 4

一方、細胞生物学的な課題は、手先が器用で、小さいラボ同士でコラボレーションすることで達成できるという点で日本に都合がいい。中でもより細胞機能を観察できる CLEM 光—電子相関顕微鏡法は今後重要になると考えている (図 5)。CLEM は光学顕微鏡で観察した同じ場所をそのまま電子顕微鏡で見るという方法である。ここで注意しなければいけないのは、電子顕微鏡はスナップショットしか見られないことであり、経時的に機能を観られる光学顕微鏡と大きく異なる点である。両者の利点をうまく両立させるのが CLEM 光—電子相関顕微鏡法であり、分子の動態、さらに高次構造の動的な機能も見えてくる。従来 CLEM は極めて難しい技術であったが、論文はこのところどんどん増えていて、ここにはやはり SEM の技術革新が大きく関わっている。「細胞のダイナミクスを電顕レベルで見たい」という要望に対し、SEM 高性能化により技術的ボトルネックを見事に回避できるようになったというのが今の時代である。1 つ例として、細胞内のミトコンドリアダイナミクスの CLEM 解析を示す (図 5)。ライブイメージング中に薬剤投与を行いその影響で急速に形が変わっていくその過程の瞬間をそのまま三次元電顕で捉えた

ものである。光学顕微鏡のデータと電顕のデータをこのようにコラボレーションすることができる。

また光学顕微鏡に対して、分解能以外の電顕の特徴は、観察できるのが注目する微細形態だけでなく、その周りを含めて見えてしまう。例えばミトコンドリアと ER とのコンタクトも全部見える。つまり光学顕微鏡で機能タンパクの局在を見て、その周りに何があるかを見ていける。例として、ここに DRP1 というタンパクのパンクチュエートが見えていて、ミトコンドリアが今、分裂するところが光学顕微鏡で見えている。ミトコンドリアの分裂は、この周辺の ER の結合状態が鍵と言われているが、その状態を詳細に調べることができるし、いざとなればタンパクのマッピングもある程度はできるようになってきている。つまり、機能と微細形態を相関して理解することができる様になって来ている。

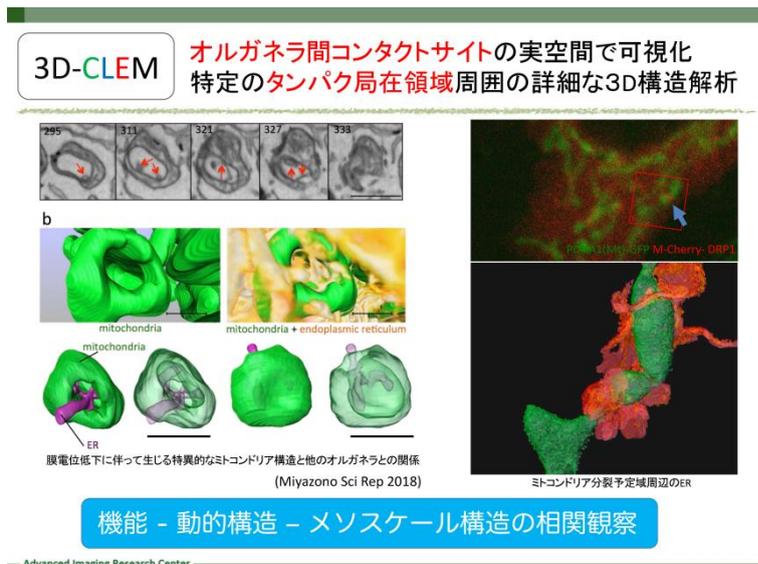


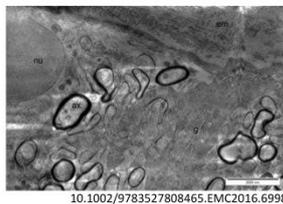
図 5

この 3D-CLEM の技術は先端バイオイメージングのほうで技術提供させていただいて、たくさんのコラボレーションをさせていただいているが、まだ技術的にも取り組まなければいけない課題はたくさんある (図 6)。CLEM に最適なプローブがない。タンパク質を電顕レベルでも簡単にマッピングできる技術をつくらないと最高なものはない。また、微細イメージングは全体がクライオ技術のほうに進んでいるので、クライオ FIB トモグラフィーを含む開発が必要であると考えている。しかし氷に包埋した生物試料はほとんどコントラストがない。ただ、日本の検出器の技術は非常に高く解決の可能はある。分子と形のためのメソスケールがより詳細に理解できれば、そこが創薬のターゲットになっていくのではないかと思うし、将来的には物理の言葉で生物を理解できるようになったらいいと思っている。

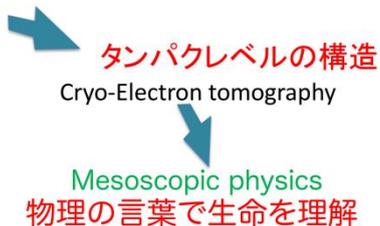
Mesoscale biology fills the gap by visualizing proteins within their functional cellular environments

要素
開発

- 良いCLEMプローブ開発
APEX, Minisog etc タンパクマッピング
- Cryo-FIB-SEM tomography への装置開発



氷包埋試料からのコントラストは不十分



5年・10年後の出口: 微小空間の変化を基にした新たな創薬ターゲット

— Advanced Imaging Research Center —

図 6

質疑応答

○問 氷で包埋した場合に、どのように削って SEM をとるか。ビームを当てると、そこでタンパク質が変性したりいろいろなことが起こると思うが、それをどうやって回避するか。

○太田 削ること自体はそれほど難しくない。帯電という問題はあるが、薄くビームで削っていくこと自体は、技術的な壁はない。FIB で削るときは若干の変性は起こるが、形態レベルでは変性は起こらない。なので、数ナノメートルの分解能までだったら問題ないだろうと思っている。もう一つの問題は、信号が少ないということで、これは今、使っていないレベルのエネルギー帯の電子線を使うと見えるのではないかという技術検証をやっているところだが、こういうものが組み合わせさえしていけば見えるようになる。

走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）を用いた生細胞の超解像度機能イメージング ○高橋 康史（金沢大学理工研究域）

私はナノスケールの開口を有するガラスピペットを用いて細胞の表面をなぞることで、細胞の表面のナノスケールの形状、例えば神経の細胞の表面、形状情報を取得する顕微鏡の開発を行っている。この顕微鏡はユニークで、形をとるだけではなく化学物質を振りかけたり、オルガネラをこれで回収したりする技術をつくっている。

開口径が 100 ナノメートルほどのピペットは、ガラスキャピラリーに熱を加えて伸張することでつくっているが、この中に電解質を入れて、ピペットをサンプルを近接させると計測している電流が減少する。この減少が再現性よく起こるので、この減少を利用してピペットとサンプルとの距離をコントロールすることで形状情報を取得している。このような細かい場所を通る電流というのは安定で、例えばパッチクランプはイオンチャンネルにピペットを当ててイオンチャンネルの開閉を見るし、ナノポアセンサーだと物の通過を捉える。私たちのシステムは、このようにピペットが距離のセンサーになっていて、近づくと針が止まるといった原理で形状を取得している（図 1）。

Measurement technology using ion current

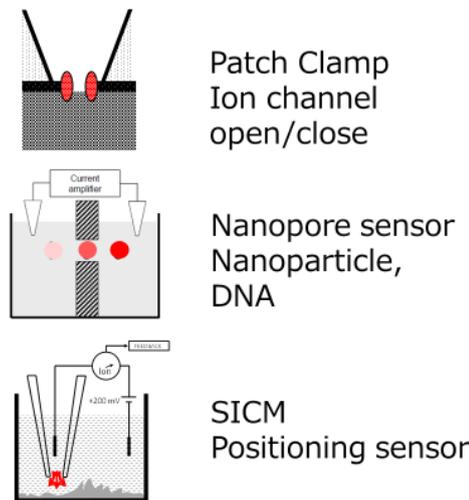


図 1

通常プローブ顕微鏡、AFM も、凹凸が激しい試料の計測は難しいが、私たちは装置からプログラムまで全部つくっているため、針をホッピングさせるように動かすことで、神経の複雑なネットワークだとか、これは有毛細胞で、SEM と遜色ないぐらいの画像を得ることもできる。また、細胞の表面にあるエクソソームも割と簡単に見ることができる。

やはり光学顕微鏡は有効なツールで、Correlative な分析が活発に行われている。SICM では細胞表面の高さ情報が得られるので、共焦点と一緒に利用すると、SICM により得られる高さ情報から焦点の位置を常に細胞の表面に当てて画像を取得することができる。こちらは神経細胞の神経伝達物質を放出しやすい部分を蛍光プローブで染めているが、細胞の形とともに、そのようなアクティブなサイトを可視化することができる。特徴として生きた細胞を観察できるので、例え

ばマクロピノサイトーシスの阻害剤のようなものを加えると、こういう微絨毛がバツとなくなる様子だとか、微絨毛の動きがぴたっと止まる様子を可視化することができる。

AFM とこの SICM は、いわばフォークと箸のような関係で、例えばこのような細胞の割とマクロの計測では SICM は有効。AFM の針はどうしても細胞に触れてしまうので、ちょっとひしやげてしまったりすることがあるが、SICM は電流で形状を取得するので、完全に非接触で細胞の表面を取得することができる（図 2）。

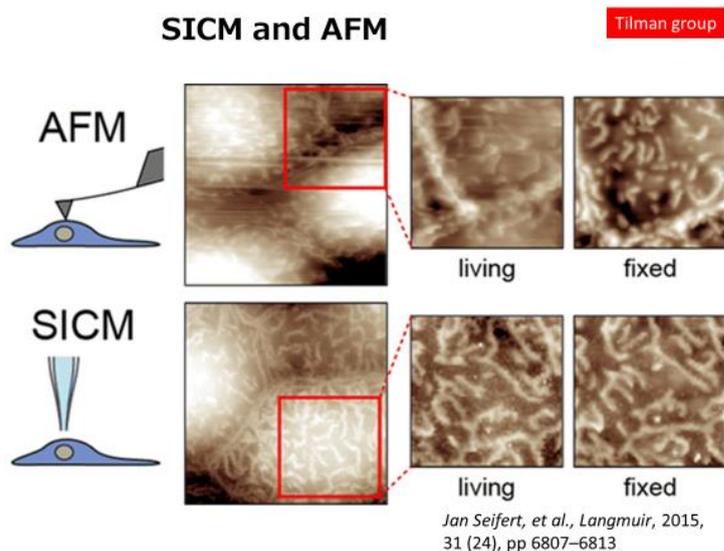
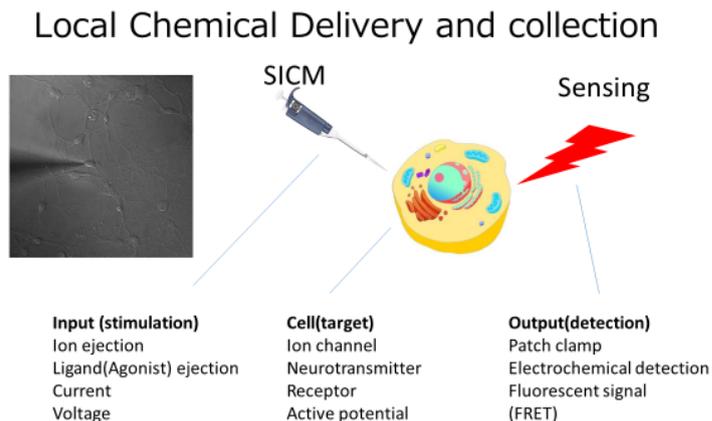


図 2

よく「どのくらいの分解能が出るか」と聞かれるので、こちらに分解能の限界を挙げた。これが今まで報告されている SICM の画像で一番きれいなものであるが、XY 方向で 12 ナノメートル、高さで 1 ナノメートルほどのタンパクの構造を識別することもできる。これよりも細かいサンプルに関しては、AFM が適している。また、高速化に関しても、ホットトピックの 1 つとなっており、こちらはドイツのグループの報告で、1 秒を切るような時間レートで細胞表面のダイナミックな構造を可視化できるようになっている。私たちも高速化には取り組んでおり、こちらは廣川先生のグループが報告されたキネシンによるカーゴ輸送で、通常蛍光プローブで可視化される場所を私たちはこういうふうにも何もラベルせずにスキャンしているが、ダイナミックに細胞の表面の構造が変化して、その構造変化からキネシン由来の分子輸送などを可視化することもできるし、形を捉えるだけではなくイメージング中に回収も行う技術をこれからつくろうとしている。

一番大きな特徴は、ピペットなので観察だけではなく化学物質を出して、細胞を染色したり刺激することができる（図 3）。この SICM を小さなピペットと見立てて、物を回収したり物を刺激したりしてターゲットとなる細胞の応答を蛍光プローブで見てもいいし、パッチクランプで見てもいいし、さまざまな分析をすることによって、細胞の局所を刺激したときに細胞がどういう応答を示すかを見ることができる。



SICM is not only topography imaging,
but also **functional imaging** for live cell.

図 3

例えばパッチクランプと SICM を組み合わせて、表面の形状を取得しながらイオンを振りかける。そうすると、形状情報とともにイオンチャネルのある部分でこちらのパッチクランプのピペットで電流が取得できるで、イオンチャネルの位置を可視化することができる。かなり大きなチャネルしか可視化できないので、スマートパッチという技術を利用している。こちらはシンプルで、スキャンして細胞の形を取得したら、ピペットを持っていきたい位置を PC から選択する。その位置でパッチクランプを行うことによって、人がマニピュレータで操作したのでは難しい細かいスケールのものにパッチすることができる。例えばアクティブポテンシャルがどんなふうに伝わるかが見られる。実際に 2 本の針を使って細胞体と、ここをスキャンして形状を取得した後で見えてきたシナプスボタンに対してピペットをアタッチして、アクティブポテンシャルの伝搬を計測することもできるし、蛍光顕微鏡との相性もいいので、例えばリガンドをピペットから放出して、形を取得しながらどこの位置にレセプターがあるのかをマッピングすることもできる。もちろん、蛍光顕微鏡で抗体がしっかり確立されていればこんなに複雑な方法をとらなくていいが、抗体が確立していない受容体のマッピングに有効で、特に心筋細胞で、病気になると受容体の発現位置が変わってしまうことが SICM と FRET を組み合わせた研究から明らかになっている。

私自身は、この SICM と電気化学計測を組み合わせることで、細胞の形状とともに代謝物とか、例えばニューロトランスミッターの放出などを捉えることができる。これは実際に細胞にカリウムで刺激を加えてニューロトランスミッターの放出を誘導しているが、このピーク一つ一つが放出されているベシクルに対応している。この電流値を積分すると、一つ一つのベシクルにどのくらいニューロトランスミッターが含まれていたかもわかる。外側だけではなく、電極を内側に挿入して細胞内の ROS の計測をして、この赤い位置で細胞の中に電極を挿入しているが、電圧をスイープしていくと、650 から 800mV で酸化されるので、この酸化される電流から、どういう化学物質が細胞内にどのくらいあるかを定量することもできる。

このような、ただ単に形をとるだけではなくケミカルを取得するプローブというのは世界的に活発に開発されていて、あるグループはピペットにイオンチャネルのようなものを再構築して、これを利用して化学物質をセンシングしようということも試みられている。

細胞のナノスケールの形状を取得できるので、例えば粒子のインタナリゼーションを可視化することができ、私たちはこの技術を利用して、例えば京都大学の二木先生が開発されているドラッグデリバリーを目指したオクタアルギニンペプチドがどういふサイトから取り込まれて、その際に細胞の表面の形状がどのように変わるかを可視化したりとか、また、細胞表面からエクソソームがどういふふうに取り込まれたり放出されるかのイメージングを試みている。

SICM は非接触だから表面の力学的な情報は得られないのではないかとよく言われるが、実は AFM でキャリブレーションすると細胞表面の固さも見ることができ、AFM より柔らかい力もこれでセンシングすることができる。

ピペット、回収、振りかけることができるという最大の特徴を生かして、私たちは有機電解液をこのピペットに入れて、電圧をかけると液界面の張力の変化が起こり、このことで数百フェムトリッターの細胞質を回収する技術をつくった（図 4）。この技術を利用して、細胞の局所からメッセンジャーRNA を回収でき、実際にベータアクチン関係のメッセンジャーRNA が細胞のへり部分に多いことがわかってきた。世界的にも、このような細胞から局所の細胞質を回収して RNA を分析するという技術が活発に開発されている。

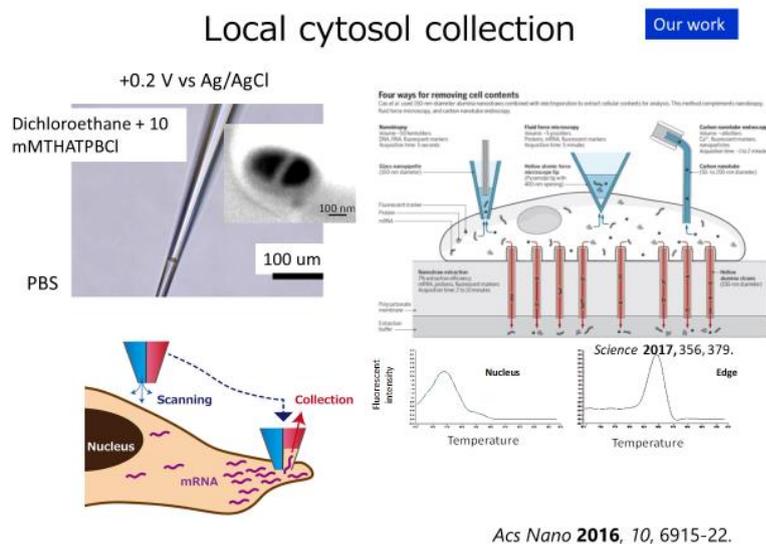


図 4

質疑応答

○問 AFM の場合、探針の設計とか出来によって大分感度が変わったが、この場合、そういうリスクはあるか。

○高橋（康） 100 ナノメートルほどだと、99%同じようなものがつくれる。今、10 ナノ、5 ナノをつくらうとしているが、そこにはやはり少し工夫が必要で、再現性は少し変わってしまう。

オルガネラの数理・シミュレーション研究

○立川 正志（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）

この 10 年で生物学研究の数理モデリングはかなり市民権を得て、その有用性を理解していただける場が多くなっている。一方で、オルガネラの数理モデル研究は、ほとんど進んでいない。数理モデリングというのは、これまで、イメージングに付随して研究することが多い（図 1）。一番上は、ケプラーの法則が発見されたことによって惑星の運動がきれいに記述されて、それによってニュートン力学がつけられたように、組織発生の生物学や 1 細胞の観測がイメージングで行われることによって、それを説明するためのモデリングがなされてきた。

イメージングと数理モデリング

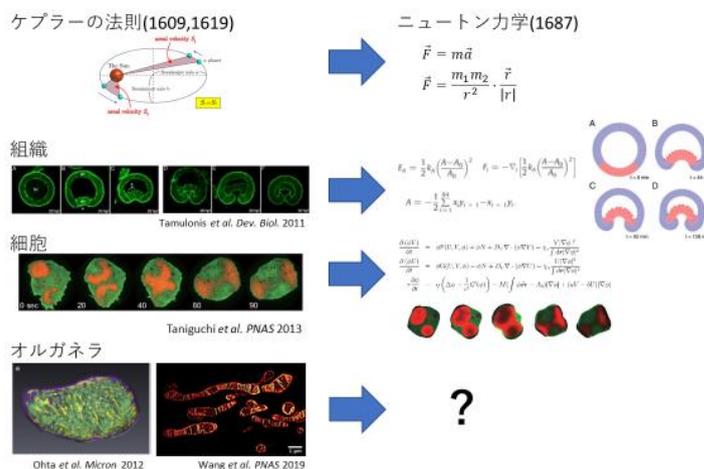


図 1

そういうことを考えると、オルガネラもイメージングを進めていけば、数理が出てくるに違いないということで、これまで超解像顕微鏡がなかった時代にはオルガネラというのはイメージングが全くされていなかったということで、イメージングが進んだ今こそが、この数理モデリングがつけられるときなのではないかと考えている。

では、イメージングがあるまでの細胞生物学と何が異なるのか、オートファジーを例に比較していきいたい（図 2）。こちらは大隅先生のラボで出されたエポックメイキングな論文で、ATG 12 と ATG8 のユビキチン用の反応を突き止めた論文である。分子生物学や生化学的な研究のデータを説明するために、このような分子同士がどのように反応するかという模式図がモデル、ロジックとして使われてきた。それに対して現在、こちらは東大の水島先生のところでとられているイメージングで、オートファゴソームの形成に伴って、例えば ATG と LC3 という分子が異なるような分布をオートファゴソームの上で示すというような、今度は形態とダイナミクスのデータがとられつつある。このデータを説明するのに、我々物理屋がそれを力学であったりダイナミクスであったりして説明することによって、これのロジックをつけ加えることができるのではないかと考えている。

実験と“ロジック”

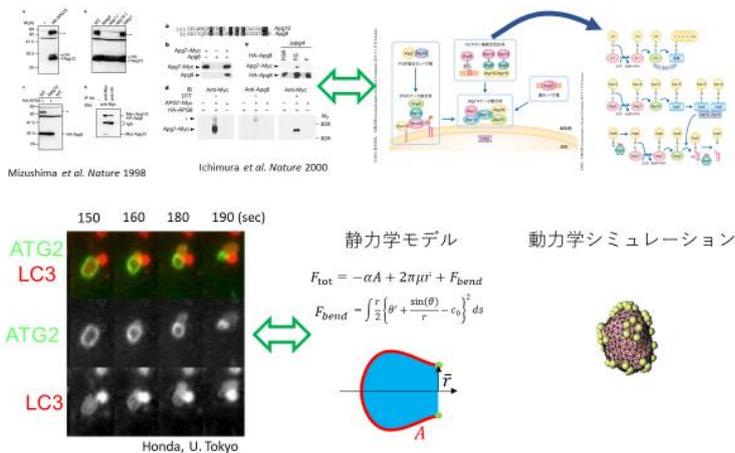


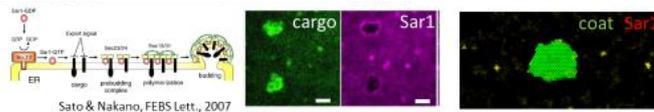
図 2

たまに医学系の研究者の方から、理論をして何がわかるのか、全部遺伝子を見つけてそれを直してやればいいのではないかといった質問をよくされる。こちらに心筋症の原因遺伝子がずらっと並んでいて、原因遺伝子はたくさんあるが、心筋症の症状は大体3つ、ノーマルダイレートとハイパートロフィックと下のものに分かれる。なので、実際は遺伝子や分子はたくさんあるが、それに対応する現象はもっと限定された場合があるときに、この対応関係をきちんとロジックとして理解することによって、もしかしたら全部の遺伝子に対応するような治療法を考えなくても、こちらをターゲットにしてやればいいということが考えられる。この分子から表現型をつなぐロジックを考えることが我々の仕事ではないかと考えている。

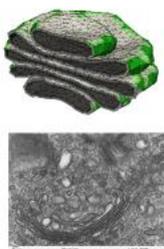
具体的に言うと、分子のシステムからどのように形態がつくられて、その形態がどのように機能を生み出すかということを考えることで、オルガネラの数理の研究を行っている。オルガネラの数理として、3つのターゲットがあると考えている（図3）。1つは、分子ネットワークからパターンとか構造がどうできるか。その分子がつくったパターンとか構造がどのように膜を形づくるのか、さらにその形がどのように細胞プロセスとか細胞機能を生み出すのかというように、3つの研究が考えられる。実際、今、小胞体からゴルジへ運び出されるゾーンに関して、こういう分子パターンがどのように生み出されるかという研究を行い、ゴルジの形をつくったり、例えばオートファゴソームがどのような分子条件のときに、どのようなサイズあるいはどのような分布で生まれるかといったことを研究している。

オルガネラの数理のターゲット

1. 分子反応ネットワークからパターン・空間構造



2. 分子・膜が作る形



吉森lab. web page

3. 形とプロセス・細胞機能

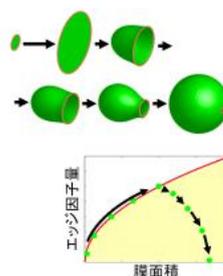


図 3

以降はざっとこの分野を概観したい。まず、分子反応パターンがどのように研究されているかを述べる。細胞の中にはいろいろな分子の反応パターンがあり、それぞれたくさん研究されている。特に細胞の中で重要と考えるのは、small GTPases。small GTPases というのは分子スイッチとして働くので、そのスイッチが細胞の中にドメインをつくって、それが形をつくり出すことがよく知られているが、例えば *Yeast* の分裂のときに使われる *Cdc42* とか、細胞性粘菌のポラリティをつくったりとか、植物の細胞でもこのようにパターンをつくる。このように1細胞レベルでパターンをつくる話はたくさん知られていて、それはかなりたくさんの研究で数理モデルに落とされている。一方で、オルガネラでもたくさんの small GTPases が働いているが、そのモデルは今、私がやっているもの以外は探し出せていない。これからイメージングが進めば、どんどん進んでいこうと考えている。

一方、オルガネラの形についてはちょっと進んでいる。主にテルアビブにいるコズロフさんという方のラボが精力的に進めることによって広がったもので、幾何的に簡単なモデルとか静力学を使って、例えばカベオラとか ESCRT 分子がつくるキャビティだとかゴルジの形を描いて、そこにかかるエネルギーを計算することによって何が起きるかを考えるという研究をされている。コズロフ以外は、基本的には Clathrin mediated endocytosis の話が多い。一方で、形のダイナミクスに関しては、ドイツのゴンパーさんがつくったトライアングレーションというポリゴンを使ったシミュレーションが主に使われている。これはどちらかというと化学物理的なレベルで止まっていて、例えばベシクルにタンパクをつけたらどういふ反応が起こるか、それをどういふふうにするかというシミュレーションの仕方についての幾つかの手法が提案されているだけで、オルガネラに関してどう研究できるかという話はまだほとんどない。唯一、オートファゴソームの最初の構造が研究できるのではないかと研究されている。

細胞プロセス・機能に関しても、やはりコズロフさんたちが精力的に形と関連させてやっている。それ以外にはフランスで1グループ、形をすっ飛ばして、ゴルジなりそれぞれのオルガネラの反応を化学反動的に書くことによってその機能をあらわしてやろうという、形よりも大きなス

ケールでのプロセス、細胞機能に関する数理をやっている研究がある。

最後に非平衡だが、非平衡の研究は日本が強く、岡田先生が東北大学の林先生とやられていることで、揺らぎの定理などを使ってモーターの定量的な解析をする。一方で、膜についても **Active membrane** という形で、熱揺らぎと違うアクティブな揺らぎをどういうふうに定量するかという話がまとめられている。これらは主に観測の定量化と合わせるために強力である。

今現在、明確にオルガネラの数理・シミュレーションという研究領域が発生とか細胞に比べてあるわけではない。しかもやられている研究も偏りがあって、アンバランスな印象がある。ただ、ソフトマター物理や既存の理論生物などで蓄積されているものには、おそらくすぐ使えるものがたくさんあるので、超解像イメージングが進んだ今、これから高まるのではないかと予想している。

ケミカルバイオロジーツール開発

○築地 真也（名古屋工業大学大学院工学研究科）

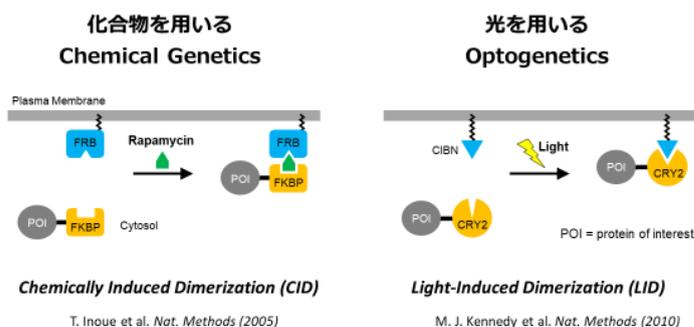
私からはケミカルバイオロジー、特に化合物オンリーのツールと、化合物とジェネティックなアプローチを組み合わせたツールに関して、話題提供させていただきたい。

細胞の中にはいろいろなオルガネラがあって、ひとつつながりになった細胞膜の中にもラフトなどのいろいろな脂質ドメインがあることがわかってきた。重要なのが、このすごくヘテロな空間の中で、細胞の中の分子はそれぞれの局在が決まっています、特に細胞が機能を果たすとき、情報伝達のプロセスではいろいろな分子が局在場所を変える。さらに最近では、いろいろな分子が相分離することもわかってきた。なので、今後この細胞の中のシステムを真に理解するためには、従来の分子構造と機能の相関だけではなく、いろいろな分子の局在と機能の相関だったり、状態と機能の相関、あるいはオルガネラの膜動態と細胞機能の相関といったパラメータを解明していく必要がある。特に現在、オルガネラとか分子局在、あるいは相分離を対象としたケミカルバイオロジーが少しずつ進んできているので、その研究動向をまず紹介させていただく。

欧米と日本の大きな違いは、欧米の研究者はありのままの細胞の様子をただ解析するだけではなく、細胞の中の分子を人為的に操作して解析するという、操作と解析を両方組み合わせたアプローチを積極的に採用している。なので、欧米は分子操作ツールに対する認識がすごく高い。逆に日本は弱い。これは多分、ケミストとかいわゆるケミカルバイオリジストとバイオロジー研究者の間の情報交換の場がかなり少ないことが大きな理由だと思う。

欧米では、細胞の中の分子の局在を操るツールというのはかなり前から開発して、積極的に利用している（図 1）。例えば、これは、基本的に 2 種類のタンパク質を細胞の中に入れて、その 2 種類のタンパク質の二量化をケミカルで誘導したり、あるいは光で誘導して標的タンパク質、この POI の局在を変えるという汎用的な技術で、いろいろなセルバイオロジーのクエスチョンを解明するためのツールとして利用されている。基本的にタンパク質のヘテロ二量化を誘導する技術なので、2 種類のタンパク質を発現させる必要がある。リサーチツールとしては有用だが、この技術を、例えば、創薬等に応用しようと思っても難しい。

欧米発：細胞内分子の局在操作ツール



タンパク質のヘテロ二量化を誘導することを基本原理とした手法

図 1

あるいは相分離に関して言うと、最近、光で細胞内にドロプレットを誘導するといった技術が出だして、今後さらに発展していくのではないかとと思われる（図 2）。

欧米発：細胞内相分離操作ツール

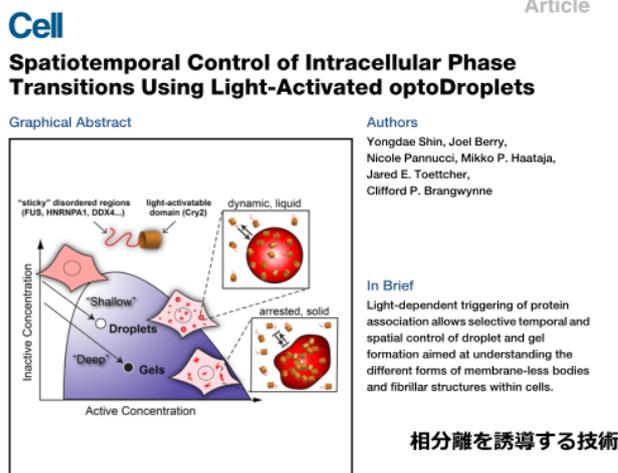


図 2

これに対して私のグループでは、特にケミストリーの観点から、メイド・イン・ジャパンのツールをつくるということにこだわって研究を展開している。2 つ紹介させていただく。1 つが、細胞の中のオルガネラの膜に結合する化合物、こういう化合物ができれば細胞の中のいろいろな解析が可能になる。もう一つは、細胞の中に人工場をつくるという話で、これについては後半で紹介させていただく。

例えば、狙ったオルガネラの膜の表面にくっつくような分子ができれば、その分子にいろいろな別の機能性分子をつけることで、細胞の中の機能解析ツールがいろいろつくれる。例えば、小分子リガンドを膜に結合するモチーフにつけてやると、化合物を培地に振りかけるだけで化合物が中に入って、この結合タンパク質に対する局在移行を誘導する化合物になる。これはうちで開発したツールの一例で、これは細胞の中にジェネティックに遺伝子導入して発現させたタンパク質で、このタンパク質の局在をこの化合物 1 つで変えることができる。今、我々はこのターゲットするモチーフをいろいろ開発していて、例えば、細胞膜の内側に局在移行させたり、微小管に移行させたり、核の中に入れたり、あるいは ER に移行させたりということができるようになってきている（図 3）。

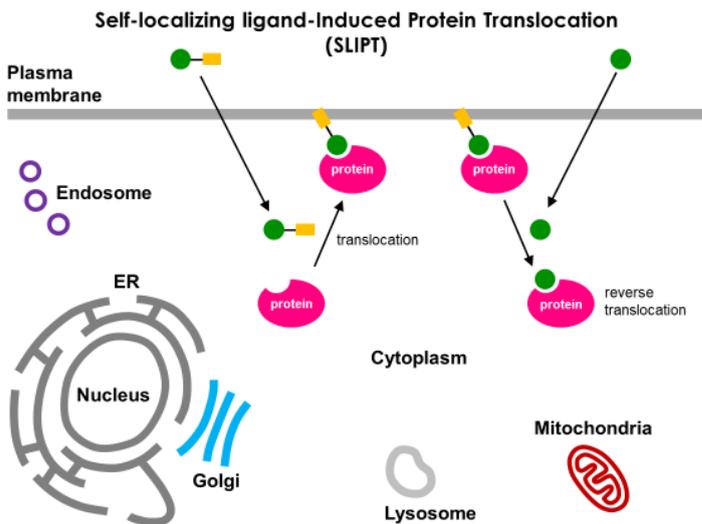


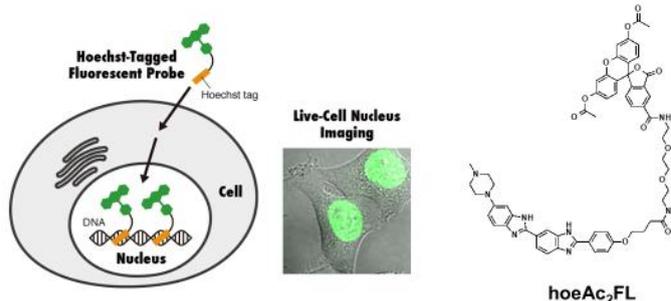
図 3

欧米が開発した二量化を利用するシステムとは違って、我々の系では、化合物 1 個でタンパク質の局在を動かせる。将来的にこれを内在性のタンパク質に適用できると、内在性タンパク質の局在を動かすことで薬理効果を発揮する新しい治療薬等になる可能性もある。あるいは、阻害剤を狙ったオルガネラ膜に連れていくといったアプローチもできるので、ある特定のオルガネラにいるタンパク質だけを阻害するようなオルガネラ特異的な分子創薬に展開できる可能性もある。

さらに、リガンドではなく、例えば、蛍光色素をつけると、当然、新しいオルガネラの可視化プローブがつかれる。例えば、核に結合するモチーフに蛍光色素をつけてあげると核のイメージングプローブがつかれて、いろいろな色素がつけられるので、いろいろなカラーバリエーションを簡単につくることができる (図 4)。例えば、核染色剤 1 つにしても、みんな古典的な青色の蛍光色素を使っているが、我々のアプローチを使ってあげるといろいろな色の蛍光色素がつかれる。そういうツールはすぐ市販化の話が来て、日本からいろいろな新しい研究の試薬を世界中に発信することが可能になる。

2. 話題提供

Hoechst tagging as a new strategy to generate nucleus-targeted chemical probes



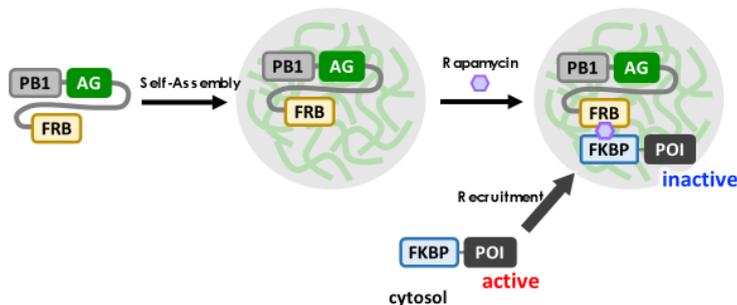
Nakamura et al. *Chem. Commun.* 2014

図 4

あるいは、従来、ゴルジ体をケミカルで染めようと思うと、モレキュラープローブが開発したセラミドベースのものしかないが、これは非特異染色が顕著だ。でも、我々が最近開発した化合物を使ってあげるとゴルジ体をきれいに染めることができる。なので、オルガネラの膜をターゲティングする化合物が開発できると、いろいろな今までにないオルガネラのプローブができて、それはいろいろなオルガネラの動態解析に使える。特に、もしオルガネラの形態が疾患などに関連する場合は、患者さんからとってきた組織に振りかけるだけでその形態や動態解析ができるという、すごく重要なニーズもある。我々は現在、オルガネラの膜に特異的に結合する化合物のレパートリーを拡張することを目指している。これは、世界的に見ても未開拓な領域で、まだ狙える場所がすごく限られているので、うちのグループではそこを開拓していきたい。

細胞の中の分子の局在というのはすごく重要で、もし細胞の中に、細胞が本来持っていないような人工の場をつくることができれば、また新しいテクノロジーにつながるのではないかと考えている。そこで、タンパク質を自分たちでデザインして、自己集合させて、相分離させて、それを細胞の中の人工場として利用するというアプローチを展開している（図 5）。例えば、そういった人工的につくった場にタンパク質を閉じ込めてあげれば、そのタンパク質を簡単に不活性化することができるし、あるいは閉じ込めておいたタンパク質を放出してあげると、タンパク質のアクティベーションが簡単にできる。こういったかなり汎用的なタンパク質の制御技術になる可能性があるということで、我々は細胞内に人工オルガネラをつくるという仕事を今やっていて、セルフアッセムブルするタンパク質をデザインして、それに従来のタンパク質の二量化の技術を組み合わせることで、細胞質中の標的タンパク質 POI を瞬時に人工オルガネラの中に取り込むような系を開発している。

Rapid protein trap system



Yoshii, Yoshikawa, Ikuta et al. *Manuscript in preparation*

23

図 5

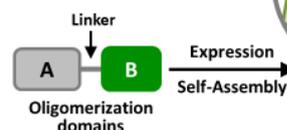
細胞質で最初、アクティブな状態で発現させておくとファンクションがあるが、それをこの技術で人工オルガネラに閉じ込めることで、細胞運動を抑制したり、ほかのいろいろなタンパク質の制御に利用できる（図 6）。これは当然、タンパク質だけではなくて、RNA だったり、RNA—タンパク質コンプレックスを閉じ込めたりする研究ツールになるのではないかと考えていて、こういうアプローチは細胞内相分離の新しい理解につながるし、細胞内の分子を制御する新しい合成生物学的な基盤技術になる。

Future directions

相分離タンパク質のエンジニアリングで切り拓く 新しい生命研究テクノロジー

リンカー長はメッシュサイズを決める

リンカー長と取り込めるタンパク質のサイズ依存性は？



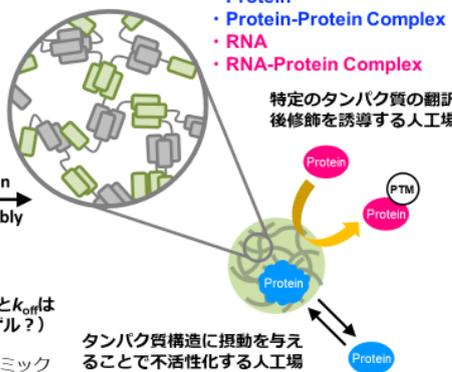
架橋点の数とオリゴマー化の k_{on} と k_{off} は集合体の物性を決める（液滴？ゲル？）

もっとprotein polymerがダイナミックな集合体を作りたい

制御対象分子

- Protein
- Protein-Protein Complex
- RNA
- RNA-Protein Complex

特定のタンパク質の翻訳後修飾を誘導する人工場



タンパク質構造に摂動を与えることで不活性化する人工場

26

図 6

質疑応答

○問 膜がない、メンブレンレスオルガネラの標識をスクリーニングできるような技術は考えられ得るかどうか。

○築地 今あるかと言われるとないが、ケミストリーの原理的には標的さえ決めればできると思う。

細胞のクライオ電子線トモグラフィー

○福田 善之（東京大学大学院医学系研究科）

日本でもクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によるタンパク質の構造解析が有名になりつつあるが、一方でクライオ電子線トモグラフィーについてはあまり知られていない。そのため、実際にどのようなことができて、どのような将来性があるのかといったことについてお話しさせていただく。

これまで、タンパク質の構造を明らかにすることでその機能を解明して、さらにその生命の機能の理解を試みてきたが、やはり X 線結晶構造解析や、単粒子解析の試料はあくまで *in vitro* であって、細胞の中でどのような状態で機能しているのかはわからない。そのため、細胞の中で目的のタンパク質の構造及び、その機能を明らかにすることができれば、細胞の機能解明にとって理想的ではないかと考えられる。しかしながら、実際の細胞の中には目的のタンパク質だけではなくそれ以外のタンパク質も多数含まれているので、目的のタンパク質を見分けることが難しいといった問題がある。

クライオ電子線トモグラフィーの原理を説明すると、まず目的の 1 視野を傾斜して、それぞれの角度で傾斜系列画像を撮影する。そして、その投影像から逆投影することで立体像を再構築する。具定例として、こちらは急速凍結した海馬初代培養神経細胞のトモグラムである。このトモグラムにおいて、右側がシナプス前構造、左側がシナプス後部構造を示している。そして、このシナプス構造においては、シナプス小胞だけではなく、シナプス間隙のタンパク質やアクチンフィラメント、そしてシナプス後肥厚部のタンパク質等も可視化されている。超解像顕微鏡法により、光学顕微鏡における空間分解能はかなり改善しているが、それでもタンパク質 1 分子を直接可視化することは難しい。一方、クライオ電子線トモグラフィーを用いることで、細胞内におけるタンパク質複合体 1 分子、具体例として 26S プロテアソームというタンパク質複合体が直接可視化できることが示された（図 1）。

細胞内タンパク質複合体 1 分子の直接可視化

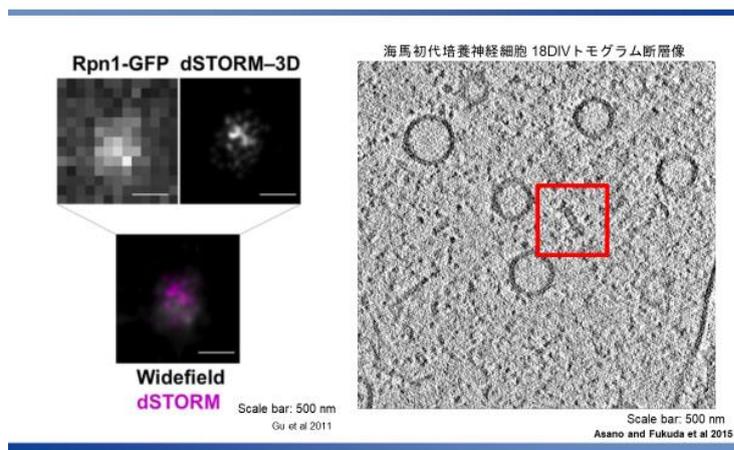


図 1

この可視化された細胞内 26S プロテアソーム分子の構造解析を行うために、サブトモグラム平均化という手法を用いて粒子の平均化を行い、その後各粒子をそれぞれの構造に基づいて分類を行った。構造解析の結果として、26S プロテアソームとしてダブルキャップの粒子とシングルキャップの粒子が得られた。そして、26S プロテアソーム分子においてその機能を調節している 19S 調節因子に焦点を当てて、さらに構造解析を行ったところ、クラス 1、クラス 2 という構造が得られた。マックス・プランク生化学研究所の Prof. Baumeister はプロテアソームの構造に興味を持っており、これまでに酵母由来のプロテアソームの構造と機能状態の関連を明らかにしている。そのため、これまでに報告されている酵母由来の *in vitro* の構造と私たちの神経細胞由来の *in situ* の構造と比較してみた (図 2)。クラス 1 の構造は、この Rpn5、Rpn6 サブユニットの局在位置から s1 に対応していると考えられる。s1 とは基底状態とあって、26S プロテアソームにユビキチンや基質などが結合しておらず、酵素としての機能が活性化していない状態である。一方でクラス 2 は、その構造から s3 に対応していると考えられる。この s3 は、基質を分解している状態の構造である。空間分解能の問題により s1 と s3 の中間体である s2 の構造を見分けることはできなかったが、細胞内の 26S プロテアソーム分子を基底状態、そして基質分解状態という機能に対応した構造に分類することができた。

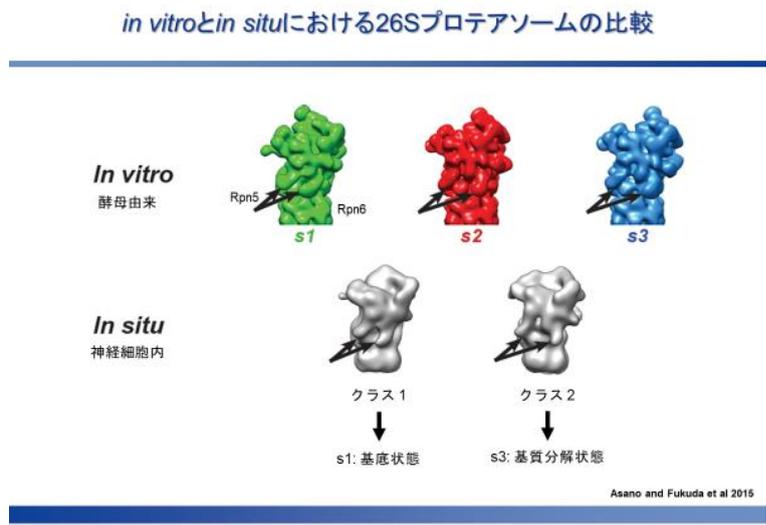
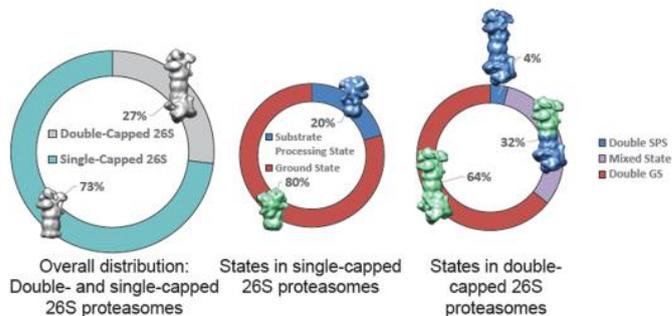


図 2

そして、私たちは、細胞内のタンパク質分子の解析を行ったため、細胞の中で、どれだけの 26S プロテアソームがシングルキャップなのか、どれだけダブルキャップなのか、そしてどれだけのプロテアソームが機能しているか、そしてどれだけのものが機能していないのかといった、精製したタンパク質を試料とする単粒子解析では解析することができない細胞内でのタンパク質分子の挙動についての知見を得ることができる (図 3)。興味深いことに、正常なラットの神経細胞だと大体 20%の分子だけが機能していて、残りの 80%は機能していない。私たちの元同僚が、神経変性疾患などで不要なタンパク質などが蓄積していく際に、徐々に基底状態の粒子の比率が減少して、一方で基質分解状態の粒子が増加することを報告している。そのため、神経変性疾患においては、26S プロテアソームによるタンパク質分解過程が飽和してしまうことで、種々の症状

を発症しているのではないかと考えられる。さらに興味深いことに、このダブルキャップのプロテアソームにおいてそれぞれが独立して制御されているといったことが、私たちの解析から明らかになった。

細胞内26Sプロテアソーム分子の挙動解析

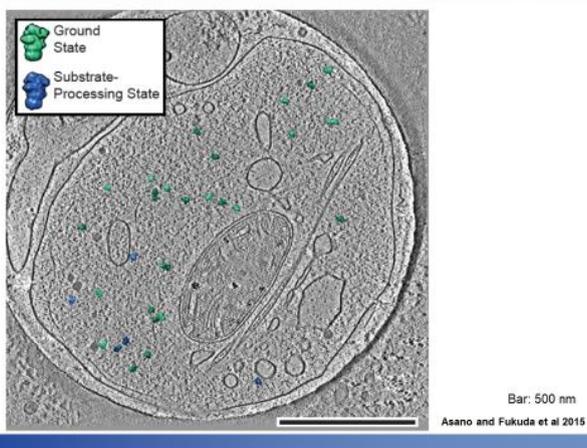


Asano and Fukuda et al 2015

図 3

このクライオ電子線トモグラフィーによる細胞内タンパク質構造解析の一番の利点は、細胞内のタンパク質分子を直接検出しているため、細胞内でのタンパク質分子の局在に関する情報も保持している。したがって、構造解析した粒子を細胞内で検出した位置に戻すことによって、細胞の位置と機能状態の関係性に関する解析が可能である（図 4）。

「その場」でのビジュアルプロテオミクス



Asano and Fukuda et al 2015

図 4

タンパク質の分解過程において、26S プロテアソームだけがその機能を果たしているわけでは

ない。プロテアソームの分解産物は4～25アミノ酸のペプチドであるため、そのままでは新しいタンパク質の合成に用いることはできない。そのため、プロテアソームの代謝産物はさらなる分解過程を必要としており、その分解過程の一つにトリペプチジルペプチターゼII (TPP II) というタンパク質分解酵素が関与していることが知られている。このタンパク質分解過程における機能の関連性から26SプロテアソームとTPP IIは細胞の中で共局在しているのではないかと考えられていたが、これまでその直接的な結果は得られていなかった。この模式図で示されているように、単粒子解析により得られたTPP II分子は紡錘形をしており、この複合体は巨大なホモコンプレックスで、縦が55ナノメートル、幅が30ナノメートル近い構造である。しかしながら、これまでの電子顕微鏡観察において、このような巨大な複合体が細胞の中で観察されたことがなかった。そのため、この単粒子解析により得られた紡錘形のTPP II複合体はタンパク質を精製したときに生じたアーティファクトではないかといった議論が続いていた。

この議論に決着をつけるために、私たちは、クライオ電子線トモグラフィーを用いて、神経細胞内でTPP II複合体の検出を試みた。その結果、紡錘形のTPP II複合体が検出され、さらにTPP IIの近くにプロテアソーム分子が検出された。この細胞内で検出されたTPP II分子をサブトモグラムアベレーシングで平均化することで、明らかな紡錘形を持つTPP II分子の構造が得られた。そして、このTPP IIと26Sプロテアソームの共局在を検討するために実測値とシミュレーションで比較したところ、興味深いことに、大体TPP II分子2つ分、約110ナノメートルの範囲においては有意に26SプロテアソームとTPP IIが共局在していることが示された。

さらに、どのような分子が26SプロテアソームとTPP IIの共局在性をもたらしているのかを解析するために、近距離、中間距離、そして遠距離にTPP IIと26Sプロテアソームのペアを分類し、それぞれのクラスで直接的な結合もしくはリンカー構造が存在しているかの検討を行った。結果として、TPP IIと26Sプロテアソーム分子の間に直接的な結合もリンカーのような構造も見られなかった(図5)。

TPP IIと26Sプロテアソームの間に分子間の結合が見られない

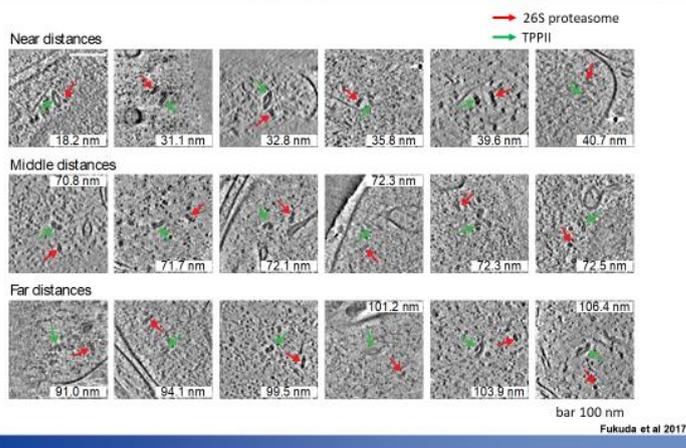
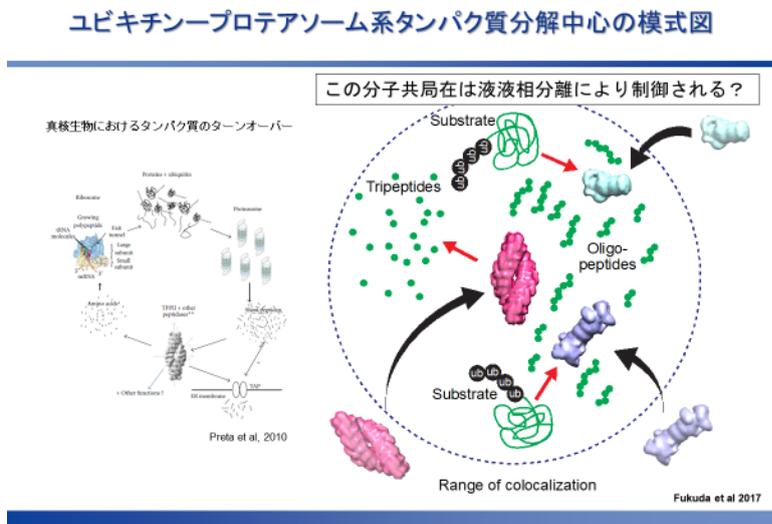


図 5

マックス・プランク分子細胞生物学研究所の Prof. Anthony Hyman は、オリゴペプチドは液

液相分離を引き起こす可能性である物質であると推測している。そのため、私たちは、TPP II と 26S プロテアソーム間の空間的な共局在性は、26S プロテアソームの代謝産物であるオリゴペプチドにより引き起こされる液-液相分離現象によって制御されているのではないかと考えている（図 6）。



本日お示したように、クライオ電子線トモグラフィーは、取得した投影像を逆投影することでその立体構造を取得する。そのため、標識などを用いず、視野にある構造全てを可視化する。そして、細胞内でのタンパク質複合体の検出およびその構造解析を行うことが可能である。これは先程の神経細胞とは異なり、古細菌のクライオ電子線トモグラフィーである。この動画で示されているように、細胞の中には多くのタンパク質複合体が存在しているが、このように種々のタンパク質を検出し、平均化や構造の分類などの構造解析を行うことで、1 細胞における巨大タンパク質複合体の機能状態と空間的局在の関連性についての解析が可能になると考えられる。

本研究動向における今後の方向性として、クライオ電子線トモグラフィーを用いた、細胞内のタンパク質分子の構造解析だけでなく、異なる分子間の局在とその機能の相関についての解明であると考えている。その理由として、細胞内タンパク質の構造解析はドイツで行われ始めており、世界的に広がりつつある領域なので、日本としてもこの時期を逃す理由はない。そして、日本の強みとしては、オートファジーなどの細胞生物学の研究が世界的に進んでいるので、クライオ電子線トモグラフィーなどの新しい手法を用いて得られる知見と、従来の手法により得られている生物学的知見を組み合わせることで、世界に先駆けて細胞生物学のさらなる発展に貢献できると考えられる。

期待される成果として、細胞内のタンパク質を直接解析できるので、ドラッグデリバリーシステムをより高精度で開発できることが期待される。さらには、長期的視点として、加齢した細胞と若い細胞との細胞内でのタンパク質の複合体の分布や機能状態の違いなどを明らかにすることによって、将来に迎えるであろう高齢化社会において生き生きとした社会の実現に貢献できるのではないかと期待される。私たちのような研究方法を開発している者からすると、細胞を観察し

2. 話題提供

て、細胞内の現象を解析することはできるが、そこで得られた知見と細胞全体もしくは個体レベルでの生理学的な意義を紐づけるのは難しい。そのため、生物学を専門としている先生方との密な共同研究を行うことで、より一層の研究の発展が期待されるのではないかと考えている。

質疑応答

○問 日本ではクライオ電顕の整備や開発をどうするんだという話がすごく多く、ドイツでやられてきて同じことを日本でやるとすると、ドイツでの電顕と同じものを日本で買ってドイツの後を追うみたいな議論になりやすいが、その点についてはどう思われるか。

○福田 まず装置的な観点から言うと、現在、東京大学にはマックス・プランクと同等の設備がある。こういった手法は、細胞の中の構造だけを追うというと欧米の後追いになってしまうが、形だけではなくて、1つのものではなく複数の分子間の空間的な相互作用だったり液-液相分離だったり、そういった細胞システムの理解と絡めることによって、後追いではなくインディペンデントな、かつユニークな研究ができるのではないかと考えている。もちろん私1人でやるというのではなくて、こういった現象を示して、さらにそれについて意義づけだったり解釈についてディスカッションすることが必要と考える。

トランススケールシステムバイオロジーのためのスケール横断技術

○上田 昌宏（大阪大学大学院生命機能研究科、理化学研究所生命機能科学研究センター）

私はこれまで、1 分子レベルから分子反応ネットワーク、細胞、多細胞レベルに至る、多階層にわたるライブイメージング技術を開発して、分子の集団運動であるとか細胞の集団運動といった仕組みを調べてきた。イメージング画像の定量的な解析に基づいて数理モデルをつくり、分子の確率的なふるまい、すなわち、揺らぎが上位階層での機能発現にどのような影響を与えるか、そういう研究を行ってきた。

このワークショップの趣旨としては分子スケールあるいはオルガネラスケール、あるいは細胞スケールの知見を統合して活用するような技術開発、あるいは、その研究領域を検討しようということだと理解しているが、細胞スケールと分子のスケールをつなぐというのは、時間にしる、空間にしる、スケールにすれば 10^5 ぐらい離れている対象をつなげないといけないので、そのスケール間をクロスするような技術が必要になる。また、オミックス解析とイメージング解析の知見をつなげるには、スループットが低いと言われているイメージングの技術のほうのスループットを上げていく、それによって要素の多様さに対応できるような、そういった網羅的な手法が必要になる（図 1）。こうした網羅的な、イメージング技術の開発につながるような技術を幾つか紹介させていただきたい。



図 1

これはスイスのルーカス・ペルクマンズらが開発したもので、彼らは蛍光抗体法を自動化した（図 2）。同じ細胞で 40 種類の分子の局在を観察できるようになっている。各セルで 40 種類の分子の蛍光量を測ってクラスター解析をして、先入観なしに分子の共局在解析を実現したり、先入観なしにオルガネラを定義するといったことを実現している。クラスター化されるが、既知のどのオルガネラに帰属されるかわからないものも見つかってきている。この手法は、原理的にはもっと多くの分子種に拡張することが可能であるし、超解像化もできる。そうするとオミックス解

析とつなげていくことができるだろう。

Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states

Science 361, 468 (2018)

Gabriele Gut[†], Markus D. Herrmann^{*}, Lucas Pelkmans[†]

Data-drivenにオルガネラを定義
先入観なしに分子共局在解析
LLPSの検出へも適用

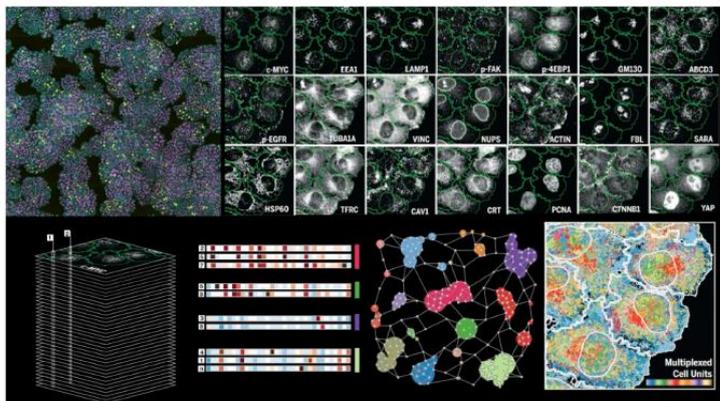
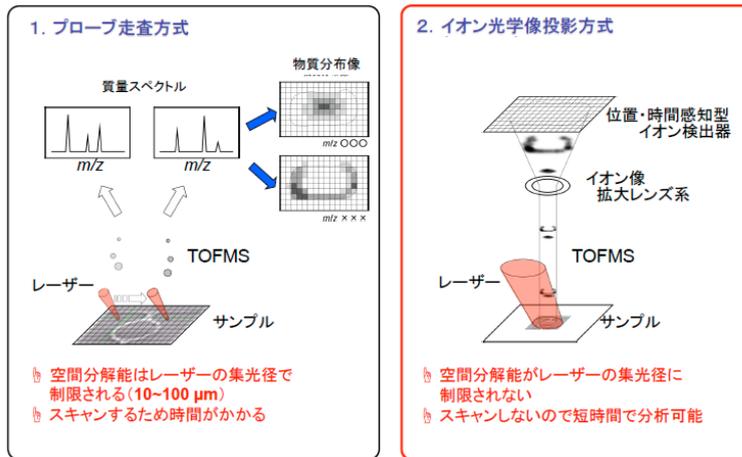


図 2

イメージングとオミックスをつなげる技術としては質量イメージングが広く使われていると思うが、従来法はレーザーを絞って当てて、ある1点で質量のスペクトルをとる方法となっている。レーザーをスキャンしていった質量分布を得るという手法になっているが、今のところ、このレーザー径が10ミクロンぐらいで限界なので、その10ミクロン内の質量分布はイメージングすることができない。このために、細胞内の質量分布を見ることができない。

それに対して我々は、発想を変えて、面でレーザーを当ててサンプル全面を同時にイオン化してやって、その質量の分布をとることができる「像投影型の質量イメージング装置」の開発に取り組んできた(図3)。これは大阪大学理学部の物理の豊田さん、青木さんらが以前JSTの研究費でつくったものを基にして、さらに改良を加えている。

像投影型質量イメージング装置の開発



1マイクロン以下の空間分解能を実現

図 3

実際この装置を用いて、魚を観察してみた（図 4）。これは1センチぐらいの大きさ。これは全体の計測に8時間から10時間ぐらいかかる。既存の装置だと1週間ぐらいかかるような大きさのサンプルになる。この部分を拡大すると、こういうふうに筋肉みたいな組織が見える。それをさらに拡大すると、実はこれ全体が点描画像になっている。この点々一個一個がイオン1個に対応するだろう。

森も木も葉も観る質量イメージング装置の構成とデータ

像投影型質量イメージング装置の開発

完全収束性を有する質量分析部の開発により、イオンの空間分布を保持しながら、質量分析できる。

高い空間分解能と質量分解能を実現
空間分解能: 1マイクロン
質量分解能: 10000
半導体検出部の開発により、さらに性能の向上が見込める。

細胞内、組織内、個体内の質量イメージングの実例 (計測時間: 8時間)

~1万倍の空間スケール差の質量分布を一気に計測

個体 (1 cm)

組織(筋肉) (20 x 500 μm)

細胞 (イオン粒子1個) (20 μm)

青木、豊田(阪大理) 上田(阪大生命)

図 4

この画像はカリウムイオンを見ているが、質量で分けられるので、他にも様々な質量の分布が見えてきているので、理想的には、個体内の組織内の細胞内の、もしかしたらオルガネラ内のイオンの分布、特定の質量を持った分子の分布を網羅的に見ることができるかもしれない。今のところ、この装置でも1マイクロンの空間分解能は出ている。

先ほどのペルクマンズらの方法にしる、この質量分析の方法にしる、細胞を固定して分子の局在を見ることになる。こうした固定を用いた方法だと網羅性を上げていく手法の開発はさらに進むだろう。しかし一方で、生き物を対象にするので、細胞が活着しているときの分子を見たいということがあるだろう。我々も100種類ぐらいの分子を見たいが、同時に見ることはできないので、イメージングの自動化に取り組んでいる（図5）。人間の操作をロボットに置き換え、細胞を探すといった人間の認識にかかわるようなところを機械学習（AI）に置き換えて自動化を進めてきた。細胞内の分子の動態を見たいので、1分子ライブイメージングの自動化を行った。この96穴のウェルの中に細胞が入っている。どの時間にどのタイミングでどの溶液を細胞に与えるかは全てプログラムできる。そして自動で焦点を合わせて自動で細胞を探して、生きて細胞内での蛍光1分子のビデオ画像を撮る。複数の分かれたウェルの中に入っているため、異なる条件での細胞の観察が可能である。得られた画像から、1分子を自動で認識して、位置と蛍光強度の時間変化を追跡することができる。1日で8,000細胞まで見るようになっており、さらに広視野化の開発を進めれば、この100倍ぐらいは高速化できるかもしれない。今のところ1個の細胞の中で同時に複数の分子を見ることができないので、いろいろ限界はあるが、均一な細胞集団であれば、複数の分子種から得られたデータを全てコンピュータに入れて、コンピュータの中で統合することは可能だろう。

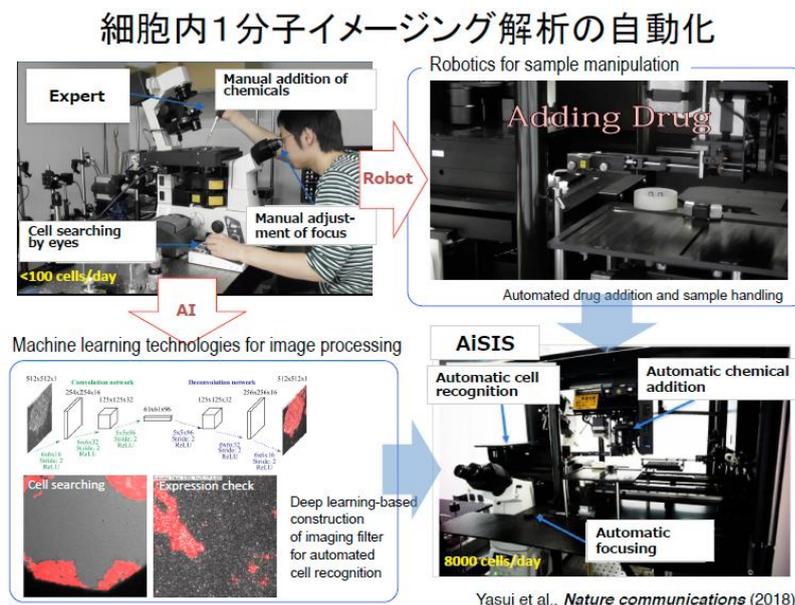


図 5

最後に、阪大の永井健治さんたちが開発を計画しているトランススケール光学顕微鏡を紹介する。1ミクロン以下の空間分解能で1センチを超える大きなサンプルを見たい、ということである。巨大な対物レンズと巨大なディテクターをつくれればできるのではないかと。ただ、これを実際につくるには、レンズだけでおそらく数十億円かかるような話なので、特別な予算措置がないととてもつくれないだろうと思う。このムービーはプロトタイプで撮像したものであるが、こういうふう到一个一個の細胞を見ながら1センチぐらいの領域を同時に観察できる光学顕微鏡を実現できている。巨大なレンズをつくれれば、この細胞の中の分子動態を見ることも可能になってく

る。こうしたアイデアを3年か5年ぐらい前から言っているが、なかなか予算措置も難しいし、日本では実現していない。そうこうしているうちに、実は先月、中国の清華大学の人たちがつくって論文を発表した（図6）。直径16センチ×縦28センチのレンズで、検出器を3×5で並列しているものである。1秒間に5.1ギガピクセル分のデータをビデオレートで転送できる。マウスの脳を見たりとか、ヒト脳のスライスのカルシウムイメージングもやっている。こうした高い空間分解能で超広視野、かつ、高速のライブイメージング技術の開発は、今後、さらに発展する可能性が高い。

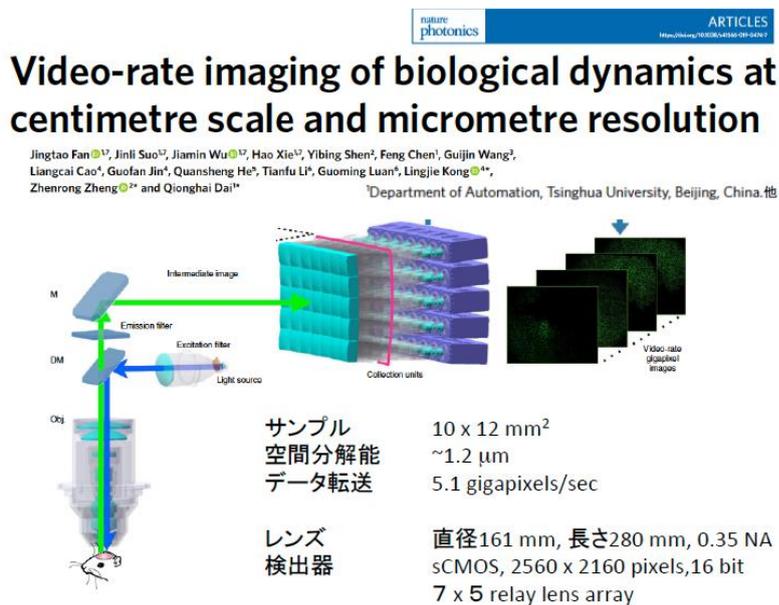


図 6

最後にまとめとして、イメージングとオミックスをつなげるためには、一つは AI とロボット工学を利用した自動化技術の導入が重要ではないか。また、階層間をつなげるトランススケールのイメージング技術については、レンズと検出器の開発が重要となる。これらはどちらも日本が高い技術を有する。新規開発には高額な予算がしばしば必要となるため、こうした技術を集約して開発に取り組める研究拠点が必要であるだろう。

生細胞イメージングによるシグナル伝達系の可視化・定量化・操作

○青木 一洋（自然科学研究機構（NINS）生命創成探究センター（ExCELLS））

我々の体を構成する細胞はさまざまな入力刺激を受け取って、その結果、環境の変化に適用するように表現系をアウトプットする、いわゆる入出力デバイスのようなものである。したがって、いわゆる情報処理をするシステムを細胞は持っており、私たちは細胞内シグナル伝達系と呼ばれる化学反応のネットワークがその大部分を担っていると考えている。これを定量的に明らかにすることを目的として研究している。

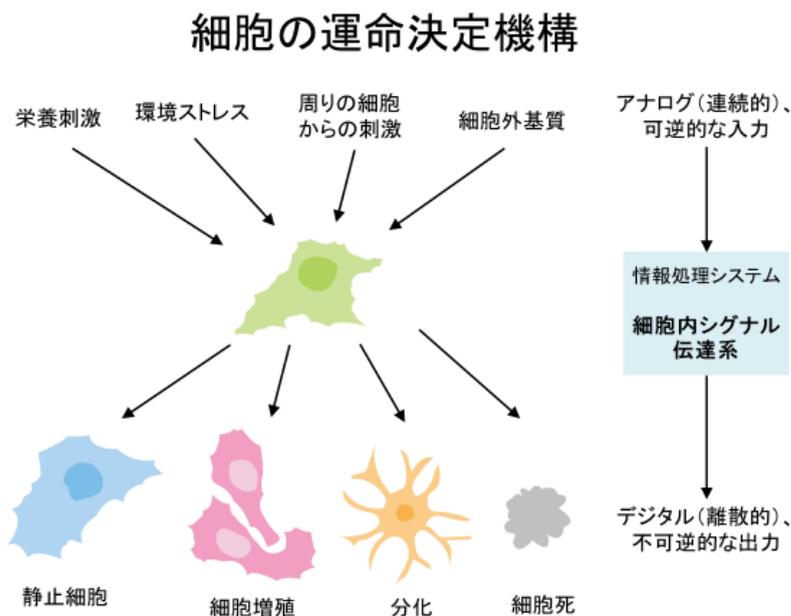
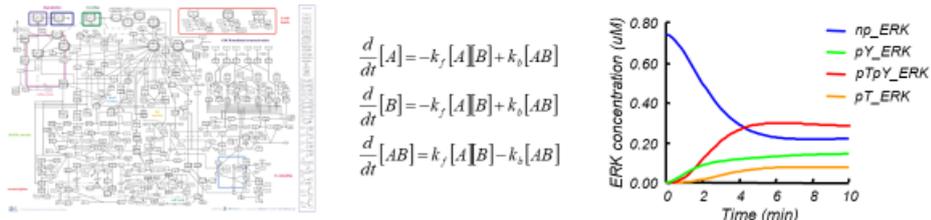


図 1

ここ数十年で遺伝子のクローニングが盛んに行われネットワークの全貌が明らかになってきた。2000年の初頭ぐらいから、こういった複雑なネットワークを理解するためにはシステム生物学的なアプローチが必要だという機運が高まってきた。実際にシステムとしてこういったものを理解して、癌といったシステムが破綻した疾病を制御しようという考え方が出てきた。計算機の発展に従ってこういった考えが出てきたわけだが、それから20年ぐらいたってこれができるかというところ、まだ病態の制御というところまではいけていない。なぜかと考えたときに、モデル化のところまではこのネットワークの形さえわかれば記述できるが、実際に数値計算をするときに、ちゃんと実験的に得られたようなパラメータを使って計算しないと予測性の高いシミュレーションができない。これまでのデータの大半は0か1の情報であり、予測精度の高いシミュレーションには向かない。これからは、0と1の間の情報、つまりどれぐらいこの分子間相互作用が強いのか、どれぐらい酵素反応が早いのかをきっちり定量化した上でボトムアップでモデルをつくらなければいけないのではないかと考えて研究を進めている。

システム生物学的なアプローチと限界

シグナル伝達  モデル化  数理計算



→ システムとしてシグナル伝達を理解し、病態を制御する

問題点

実験的に決められた反応パラメーターの不足

→ 予測性の高いシミュレーションができない

図 2

私たちは生細胞イメージングの方法を使って反応を可視化して、さらに定量化して、ついでに操作しようという、この3つのアプローチで研究を進めている。

可視化に関しては、蛍光イメージングの手法を使う。例えば蛍光共鳴エネルギー移動、FRETの原理に基づくバイオセンサーをつくってきた。例えば、細胞の増殖や癌化に関連する ERK という分子の活性を可視化してみると、これまで生化学的な方法では見えなかった、ダイナミックな ERK の確率的な活性化が見られる。解析を進めると、ERK 活性化の強度、アンプリチュードではなく、発火頻度、すなわち周波数が細胞増殖を決めていることがわかった。また、これは細胞の集団運動の際に ERK の活性が細胞間を伝搬しているのが見て取れるが、イメージングから ERK 活性伝搬の方向性が細胞集団の方向性を決めることを見出した。FRET バイオセンサーを使うと、シアンと黄色の2色の蛍光タンパク質を使うので、複数の分子の活性を可視化するには向かない。そこで単色の蛍光分子で分子の活性を可視化し、同時に複数の分子の活性を可視化することも行っている。例えば、こちらの動画は、ストレスによって活性化するマップキナーゼ p38 と JNK、さらにアポトーシスマーカー Caspase の FRET バイオセンサー、また核のマーカーの5色イメージングしている。こういったものを同時に見ることで、例えば細胞が死んだときに、死ぬ数分前の p38 や JNK の活性がどれぐらい細胞死に寄与しているのかということ、線型解析みたいな方法を使って定量的に示すことができる。

多重イメージングによる細胞死の定量解析

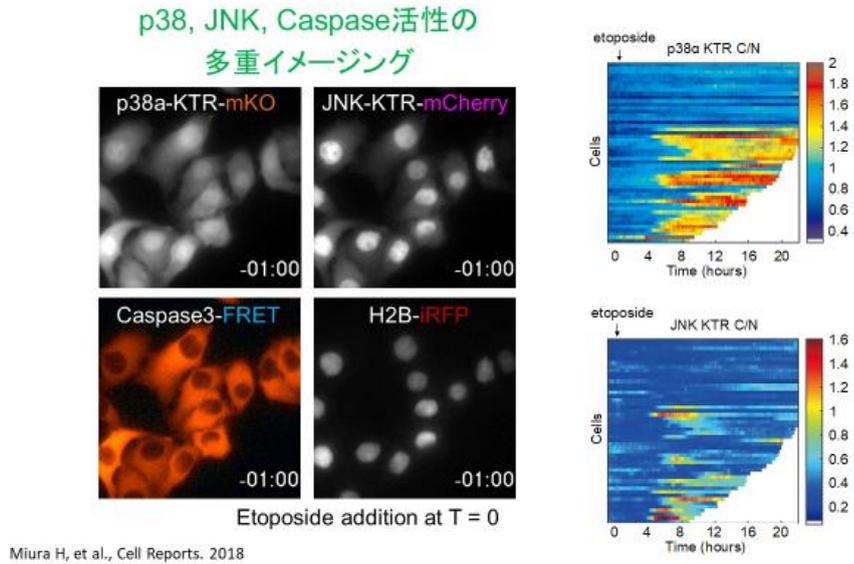


図 3

次に、定量化に関しては遺伝子編集法を使って、内在性分子を蛍光タンパク質分子で標識し、さらに蛍光相関分光法 (FCS) という方法を使うことで蛍光タンパク質の濃度を 1 細胞レベルで、さらに局所的な濃度も定量化することができるようになった。また、拡散速度も測定することができる。こういった方法を使うと、抗体を用いることなく分子の濃度が測定でき、かつ細胞間の不均一性も見えてくる。

遺伝子編集技術と蛍光相関分光法を組み合わせた 内在性シグナル伝達分子の濃度の定量

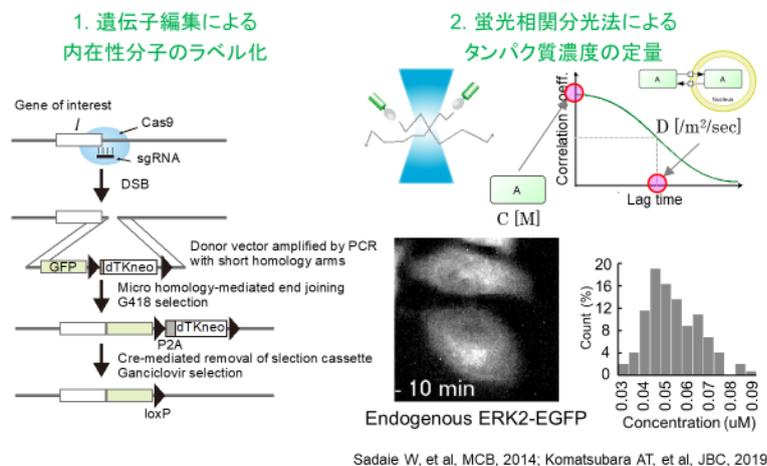


図 4

さらに、緑と赤の蛍光タンパク質遺伝子をノックインして相互相関分光法 (FCCS) を使うと、例えばこの分子とこの分子が細胞の中でどれぐらい結合しているかという情報を 2 つの蛍光の相

互相関から定量化することができる。その結果、細胞の中の複合体の量や解離定数を、細胞質とか核といった領域で、さらには刺激して何分後の値も全て測定することが可能になっている。

最後に操作についてですが、実際にシグナル伝達のダイナミクスを可視化したとき「これって単に相関しているだけではないか」とよく言われるので、やはり操作をしてダイナミクスを自分たちで作り出した上で期待する表現系が出るのかを調べるといふ検証は必要だ。ここでは光遺伝学の方法を使っているが、例えば青色の光を受容するようなタンパク質、クリプトクロームを使ってさきほどの ERK 分子の活性を操作した。先ほどの FRET イメージングで見られたように、ERK 活性の周波数が細胞増殖に大事であり、細胞集団運動においては ERK 活性の伝搬の方向が重要だと述べた。それらを検証するために、光で ERK 活性の振動パターンを構成的に作り細胞が増殖することや、ERK 活性の伝播パターンを光で作ることで、細胞の集団運動を光で誘導することに成功している。こうすることで因果関係をきっちり示すことができる。先ほどのものは青色光を使っているが、実際には、青い光は組織の深部に到達しづらく、また青色光に弱い生物が多いので、長波長側の赤色とか遠赤色光を使ったような光遺伝学ツールも開発している。

長波長の光遺伝学ツールの開発と応用

赤色光/遠赤色光受容タンパク質Phytochrome Bを使った光操作

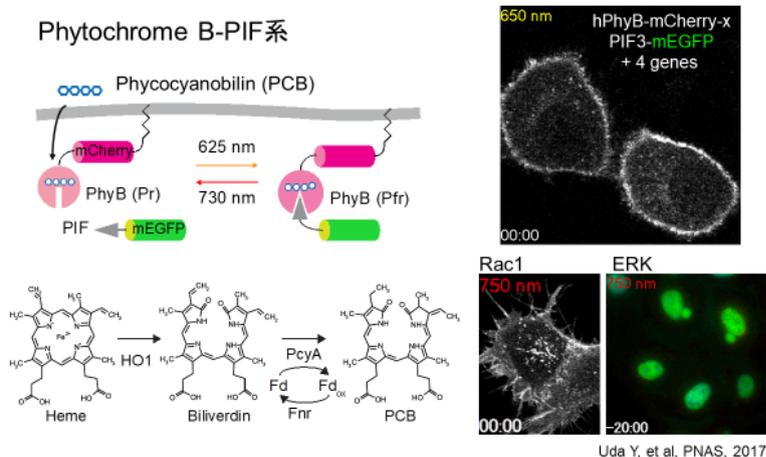


図 5

これは植物のフィトクロム B を使っている。赤色の光を当てると PhyB と PIF がヘテロ二量体化して、遠赤色光を当てると複合体が乖離するというような系だ。ただ、この系は開環状のテトラピロール、フィコシアノビルリンという色素が必要で、光合成をする生物にしか存在しないため、マウス等では使えない。この問題を解決するため、私たちはこの PCB を合成する 4 つの酵素を哺乳類の細胞のミトコンドリアの中に発現させることで、PCB を合成することに成功した。これで全て遺伝子にコードされた形でフィトクロム B-PIF の系ができるようになっている。もちろん、これを使うことでシグナル伝達系の操作もできるようになっていて、今、酵母や線虫といった系にこれらを適用している。

最後に、トレンドトピックスと今後の研究展望を話す。まず、私の近い研究分野で言うと、FRET バイオセンサもどんどんつくられているが、蛍光プローブの開発が進んでおり、流行りは単色物

である。カルシウムのセンサーで有名な GCaMP を例にとると、カルシウムが来ると緑の蛍光が上昇するというものであり、海外のグループから ERK が活性化すると緑の蛍光がポンと上がるというようなバイオセンサーの報告が最近されるようになってきた。ただ、これはバイオセンサーの最適化が非常に大変であるという問題がある。また、光操作の話をしたが、内在性分子を直接に操作しようという研究どんどん出始めている。例えば最近だと、ナノボディと標的分子の結合を光で制御しようというものが、Nature Methods とか bioRxiv に出ている。これは今後進むだろうと思う。あと、液-液相分離が大流行りで、この液相分離を起こすことでシグナル伝達をオンにしたりオフにしたりということが実際に可能になっている。

最後に、さっきのパラメータを全部集めてシグナル伝達をシミュレーションできれば全部予測できるのかという問題についてどうアプローチするのかについて考えなければならない。生化学パラメーターを定量的に測定できるのかという問題、さらにそれを集めたら予測可能なモデルができるのか、という問題がある。実際に岡田康志さんが代表の情報熱力学の新学術だと、これとは違う情報というパラメータも大事だということを言おうとしている。そもそも、例えば全細胞モデル (whole cell model) でモデリングしたときに、自分たちが理解できるところまで落とし込めるのかというところもそもそも疑問である。したがって、この問題はだれかがやらないといけないのではないかと思っている。先週のシステムバイオロジーのカンファレンスで、やはりホールセルモデリングというのは欧米のほうではかなりもうされるようになってきている。今はマイコプラズマ程度だが、大腸菌、酵母、それから ES 細胞をやろうという話が出てきている。これに伴い、構成生物学的なアプローチがさらに重要になってくると考えている。

質疑応答

○問 シグナリングのマグニチュードを計測するのは結構難しいか。どれくらい継続するかとか、どれくらいの強度なのかといった。

○青木 例えば内在性の ERK が 10% 活性化しているか 20% かという定量化については、実際に生化学的手法と FRET バイオセンサーで計測されたものの値と相関をとっている。そこから、どれくらい FRET の値が線形なのか定量的なのかというのは測っており、そこから逆算することで内在性の分子がどれくらい活性化しているというのは計量することができる。

○問 自己免疫疾患の発症というのは、それぞれのシグナル分子をノックアウトするとそれぞれ違った自己免疫が発症する。つまり、異なったリンパ球のクロームがリアクトするようになる。その背景にはシグナリングのマグニチュードのスレッシュホールドがどのリンパ球で、どの抗原にというところがあるのではないかと、そういうものの解析に役立つのではないかと思った。

定量的かつ包括（網羅）的な翻訳の測定

○岩崎信太郎（理化学研究所主任研究員研究室）

リボソームプロファイリングという次世代シーケンサーを使った技術を紹介することで話題提供させていただきたい。

私たち生物学者は遺伝子発現に基本的に興味があるが、もちろん遺伝子の最終産物はタンパク質であり、多くの研究の場合、RNA の量を定量して遺伝子発現としてしまうことが多い。実際に、マイクロアレイや RNA シーケンスといった技術の登場によってこういった傾向は加速しているのではないかと思う。そもそもこの RNA をもって遺伝子発現としていいという背景には、RNA の量とタンパク質の量は細胞の中で相関が高いだろうという暗黙の仮定がある。しかしながら、これは本当に正しいのか。実はこの 2012 年の論文では、同じサンプルから RNA の量とタンパク質の量を丁寧に、かつ定量的に同定したというデータがある。もちろん RNA の量とタンパク質の量は相関するが、私たちが思っていたほど相関は高くなくて、実は 30%から 40%しか RNA の量からタンパク質量を予想することはできないだろうということがわかってきた。RNA の量だけ見てタンパク質量としてしまうのは、ちょっと問題があるということがわかってきた。さらに、例えば翻訳の段階でタンパク質の配列を変えてしまうような制御が多数報告されているので、量的にも質的にも、RNA から実際にできるタンパク質を予想するのは難しい。こういった理由から私たちのグループは、特に翻訳に注目することによって遺伝子発現をより正確に理解することができないだろうかということモチベーションに研究を行っている。

しかしながら、ここで翻訳を研究するに当たって、大きな問題がある。実は私たちの細胞の中には、8 万種類もの mRNA がデータベースに登録されている。古典的な生物学の手法を使うと 8 万種類の RNA の一個一個を研究していく必要がある。これは時間がかかって、スループットも低いし、問題がある。こういったニーズから登場してきたのがリボソームプロファイリング技術になる（図 1）。

まず、皆さんが調べたい細胞を準備する。この細胞を破碎する。このときに、通常リボソームはメッセンジャーRNA に結合しているので、この結合が壊れないような操作をして、細胞抽出液をつくる。ここに RNA 分解酵素を加えると、RNA は途端に全て分解してしまうが、リボソームは大きい複合体で、このリボソームが取り込んでいる mRNA の一部分は分解から免れる。この RNA の断片を私たちはリボソームのフットポイント、足跡と呼んでいる。この断片だけを集めてきて次世代シーケンサーで解析することによって、そのときその瞬間どのメッセンジャーRNA のどの部分がどの程度翻訳していかという、定量的で、かつ俯瞰的なデータを得ることができる。実際にこういう技術を使っているいろいろな生物種の翻訳が司る生命現象について研究してきた。

Ribosome profiling allows to survey translation comprehensively

Iwasaki *et al.* Mol Cell 2019
 Akichika *et al.* Science 2019
 Kurihara *et al.* PNAS 2018
 Matsuo *et al.* Nat. Commun 2017
 Ishikawa *et al.* PLoS Genet 2017
 Iwasaki *et al.* Nature 2016
 Werner *et al.* Nature 2015

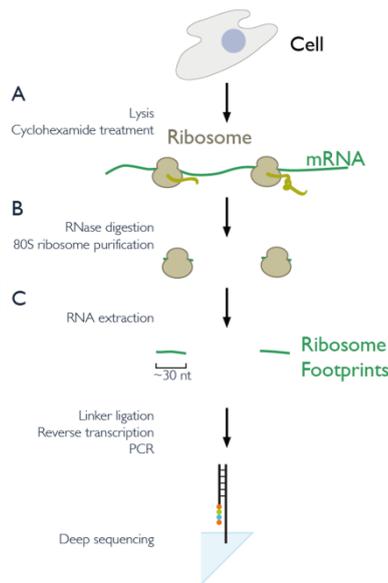


図 1

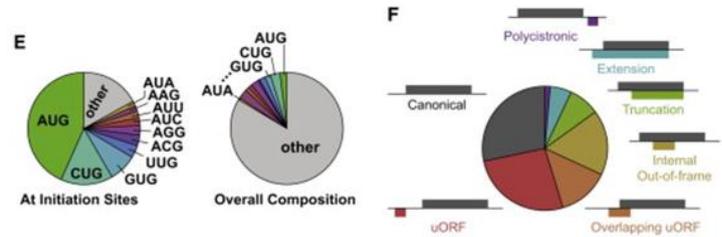
このリボソームプロファイリングの解像度を端的にあらわしたデータ、このデータはメタジーンプロットと言って、得られるフットポイントのリードの 5 プライム端 **【(2)/1:32:15】** をオープンリーディングフレーム、総体的にどの位置から出現するかを見た図になる。リードのほとんどはオープンリーディングフレームから出現する。これはもちろんリボソームがここにいるからである。

また、このリードは一様に分布しているわけではなくて、ギザギザのパターンがある。これは実は 3 塩基の周期性がある。まさに、リボソームというのは実はメッセンジャーRNA が動くときに 1 塩基ごと動くわけではなくて、1 コドン、3 塩基ごとにリボソームは動いていって翻訳を続ける性質があるので、まさにこのリボソームの動きをここでは見ている。つまり、この最初のピークは AUG 開始コドン上のリボソームをあらわしているし、次のコドン、次のコドン、というリボソームの動きのスナップショットを次世代シーケンサーでとることができる。

また、タンパク質量と RNA の相関関係について、特にリボソームフットポイントの数というのは、もともとメッセンジャーRNA 上にあったリボソームの数を反映するので、この量を単純に比較してあげることによって翻訳の効率を比較することができる。それをイーストで応用した例が、実はたくさん翻訳しているメッセンジャーRNA、余り翻訳していないメッセンジャーRNA という選択性があり、最大で 100 倍ぐらい違うこともわかってきている。より高等な生物ではもっとこの差が大きいのではないかと考えている。

また、このリードがとられる mRNA の位置というのは、まさに翻訳されている領域を示すので、どういった領域からこのリードがとられるかを目印に、**de novo** でオープンリーディングフレームを再定義することができる。こういう解析をすると、実は多くのこれまで知られていない新しいオープンリーディングフレームが見つかってくる (図 2)。例えば、私たちは教科書で AUG が翻訳を開始しているんだと習うが、この解析をしてみると、もちろん AUG が一番多いが、CUG とか GUG といった領域からも翻訳が始まっていることがわかってくる。私たちはどこで翻訳が始まるかということすらまだあまりよくわかっていないというのが現状だ。

Translation initiation sites survey



We still do not know where protein synthesis starts....

mESC
Ingolia et al. Cell 2011

図 2

また、ロング・ノン・コーディング RNA でこの解析を行うと、ロング・ノン・コーディング RNA の一部は実は翻訳されていたこともわかる。これはあるデータベースから持ってきたデータだが、驚くべきことに、50 万ぐらいの小さいオープンリーディングフレームがロング・ノン・コーディング RNA をサーベイすると見つかることが報告されているし、その 10% ぐらいは進化的に保存され、さらにその 10% ぐらいはマスペクトロメトリーで同定することができるという、これまでの概念を変えてしまうようなデータがたくさん得られている。

これまで私たちがこの技術を使ってどういう研究をやってきたか簡単にお話ししたい。特に、ここでは私たちは Rocaglamide A、RocA と呼ばれる小分子に注目して研究を行ってきた。1 つ目に、この小分子が強い抗がん作用を持っていることがわかってきている。マウスに投与するとがんの増殖が顕著に抑えられるという有用な活性があることがわかっている。また、翻訳の阻害剤としてもわかっていて、私たち真核生物の翻訳の開始は複雑な経路を経るが、それらに必須な因子の 1 つである eIF4A と呼ばれる RNA 結合タンパク質に RocA が結合して翻訳を阻害することが報告されている。しかしながら、このメカニズムについてはよくわかっていないので、このプロジェクトではそれを理解するために、まずこの阻害剤をかけてリボソームプロファイルに入れるという単純な実験で、何もバイアスなくやってみた (図 3)。そうすると、もちろん翻訳が全体的に減少するが、実はその効果に mRNA の選択性があったということがわかってきた。例えばこの実験だと 30 倍ぐらい、ある mRNA は翻訳抑制するし、ある RNA は余り翻訳抑制されないという選択性がある。こういった特性は、実はこれまで既存で知られていた翻訳の阻害剤について全く想定されておらず、新しい活性であることがわかってきた。

RocA represses translation selectively

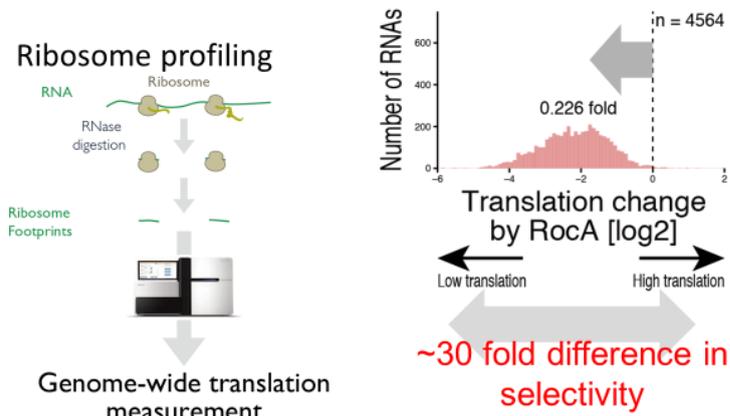


図 3

また、この配列特異性を調べるような次世代シーケンサーの手法を用いてモチーフを探すと、A や G が連続するようなポリプリン RNA のモチーフを特に選り好むことがわかってきて、実際こういうモチーフがあるかないかで選択性が説明できることがわかってきた。この RocA というのは配列非特異的な RNA 結合タンパク質である eIF4A を配列特異的な翻訳のリプレッサーに変えてしまうというユニークな特性があることがわかってきた。RocA が eIF4A に結合してしまうと、このポリプリン配列に安定的に結合してしまっ、それがゆえに、スキヤニングという、リボソームの翻訳の開始の段階を抑制して最終的に mRNA 選択的な翻訳の抑制が起きるとというのがこの抗がん剤の作用メカニズムだったことがわかってきた。特にこういう非特異的 RNA 結合タンパク質に新規の配列特異性を与えるものは、これまで知られておらず、そういった活性を持つ小分子として初めて報告した。

質疑応答

○問 次世代シーケンサーを使った解析は今、だんだんシングルセルにいたりとか、あるいは顕微鏡での局在情報と融合したりしているが、このリボソームプロファイリングの場合はどうか。

○岩崎 今まさに私たちの研究室でシングルセル化しているところで、まだ誰も達成はしていない。

○問 この手法でタンパク合成リボソームのフィデリティ、そういうことはわかるか。間違っ tRNA がくっついて間違っタンパクができてしまうというフィデリティ。例えば、大腸菌だと 10^{-4} ぐらい。マンマリアンでそれが正常とがん細胞でどの程度違っているのかとか。

○岩崎 たとえばコドンと tRNA の組み合わせということで捉えると、その組み合わせを捉える技術はまだない。それは、皆さんとても興味あるところだが、技術的にはそこはまだ達成できていないので、次のチャレンジとしてはまさにそういうところになってくるかと思う。

3. 総合討論

○文部科学省 キーワードとしては、焦点化と既存のプログラムとの差別化、あとは運用の工夫といった3つについて、それぞれのがいいか悪いかということも含めてご議論いただければと思う。

1 つ目の焦点化について、大変広い研究領域の議論になっていると思っている。物量作戦に頼らずとも日本が優位性を持つ分野、日本が今の強みを生かして勝てる部分は何なのかという議論をいただけるとありがたい。

2 つ目の差別化、これまでの分子生物学との違いだったりとか、あるいは細胞生物等との違いというところを必ずしも専門でない方がストンと落ちるような形で、今回の新規性であったり革新性をどう見せていくかといったところについても何かヒントをいただけたら嬉しい。

最後、運用の工夫で、1 部が医療、2 部が技術というところの連携の兆しが見えたのかなと認識している。おそらくこの部分が今回の幹になってくるのではないかとと思っているが、では、それを実現させるために実際に事業としてどのような工夫があるのか。融合というのは典型的な「言うは易し行うは難し」だと思うので、アイデアをいただければ幸いである。

○JST 運営する側の意見として、今までの生物学というのが、物理学的な方向にちょっと派生し始めていて、そこに向かう政策誘導を JST でやってはどうかといった提案にも受け取れた。これは違うなら指摘してほしいが、非膜性構造体、ああいう超分子複合体みたいな生物学を物理学的なアプローチでやる。そのツールとして数理モデルとかケミカルバイオロジーみたいなものを総動員してやっていくのかなと受けとめたが、これは正しいかというのが1 つ目の確認事項である。

2 つ目は、それらが正しいと仮定したときのお願いだが、では、今の日本の課題は何であるかという論点出しをお願いしたい。例えば、凝集のサイエンスみたいなものをもっともっとやらないといけないのか、もしくは細胞内の反応場の構造とか機能をもう少し集中的にやるのか、さらにはその分子ネットワークの物理動力的なところにアプローチするのかとか、今日もいろいろとテーマが出てきた。そういった観点で、どのあたりに軸足を置けばいいのか、論点出しとあわせてご議論いただきたい。

異分野連携の重要性と推進方法

○もし CREST のような形で政策誘導することのメリットを考えるのであれば、今日のトークでも繰り返し出てきているのは、個別の技術とか個別のバイオロジーとしては世界的な結果が今日もたくさん伺えたが、同時に、それを連携させるところが日本は弱くて、そういうところから出てきた新しいことがことごとく後追いになってしまっている。そうすると、CREST みたいな戦略的にトップダウンで行うという話が有効に活用できるようにするには、投資効率が高いのは、優れている人たちをどう組み合わせるかというところで、そういう意味では、何を具体的なクエストとして提示するか。ゴールに対して、例えば計測とバイオロジーと、あるいは理論と AI とが組み合わせあったチームで応募しなければいけませんといった形にすれば、必然的に融合が促進できる形になると思う。その意味で、この目標として、あまり狭くする必要はないと思うが、具体的なクエストの例示として何か「こういう問題」とある程度絞っていくことがすごく大

事なのではないか。多分そういう視点で、特に今日、前半に話題提供していただいたような方から、ご自身の仕事をもう少しだけそれを広げた形で、10年ぐらいのスパンで具体的な問題提起を幾つかしていただけると議論しやすくなる。

○まず連携のやり方で、1つのチームで連携を組むというものと、領域の中でプロジェクトが進行するに従って連携を組むというようなつくり込みも、ぜひやっていただけるとおもしろいと思う。ただ、1つのチームで連携しただけだと、なかなか応募できない先生もいるかもしれないので、中で新たに構成できるようなやり方がいいかなという気もする。

○さきがけの微粒子の領域の中で幾つも共同研究を推進されているという話もあったので、領域ができれば中で自然と連携ができるのかなと、そちらは結構期待している。一方で、最初の提案時にそういう異分野で連携する、そういう連携提案を期待するにはどうすればいいのかなとっていて、欧米では、例えば拠点ではカフェのようなフリースペースのところで自然と融合が生まれると、確かにそういうことができればと思うが、なかなか日本ではそういうことが難しく、特に今回、いろいろ議論を聞いていると、物理学とか情報との融合がすごく重要だということが改めて提示されたと思うが、例えばこういう領域ができたときに、募集の前にそういう人たちを大きな会場にたくさん集めてフリートークしてもらおうとか、そういう機会があると生まれるかなんて思いつくがいかがか。「こういう戦略目標があって、こういう募集をする」と言って、こういう分野の人たち来てくださいと。そしてそういう人たちが、200人とか集まっている喋っていたら、連携してと言われればできるのかなと。

○あらかじめの連携というのも必要だが、それはある程度読んだ連携になってしまって、何か自分の知らない領域が入ってきて「あ、これはいいな」というような、そういう意外性とか「これだったら自分の研究が展開できる」というようなつくり込みができているとすばらしい。そもそも研究が発展するときは、やはり自分の研究をやっていて「こういうところがボトルネックだよ」といったときに、領域が似たような研究者だけで集まっているとそういうことはできないと思うが、異分野の先生方がいたときに「あ、これは使える」という。だからそれは、公募要項の書き方ではないかと。そういうことがうまくわかるような要項をつくっていただければいいのではないか。

○異分野融合というのはすごく難しく、やはり自分の知り合いの中での異分野融合はできるかもしれないが、そういうのはヘテロの集団の中でどういう議論をしていくかが大切。東大のある先生とお話ししたときに、教養学部というのはいろいろな人がいると。その先生の技術は社会科学系の人の理論を応用して、自分の足りないところを取り入れていったということをおっしゃっていた。どういう構想の中でどういう人を結びつけたらいいのかサゼスションしてあげることも、JSTとかAMEDの中ではかなり重要な役目ではないかと思う。例えば築地先生のお話にあったようなものも臨床家を早く入れて、どういう病気に応用できるのかを議論してそれを具体化していくといったような作業が必要なのではないか。だから、例えばプロデューサーといった役職は、POとかPSとかとちょっと違って、何かそういうふうによくアレンジできるような人を配置することも必要なのではないかと思う。

○私もさきがけのアドバイザーをやっていて、やはりさきがけの中でどんどんコラボレーションが進んでいって、そうするとすごくいい仕事ができたりする。ただ、目的のために必要な機能がある程度事前に、チームを組める人、知り合いだけではなく、やはり必要な機能が全部揃った上でのいい提案ができるところに入ってきてもらうというのはやってもいいかなと思う。やはり日

本はイメージングとかそういうところは優れているところがあるが、やはりバイオロジーにつながらないところもあって、そこはやはり、チームをつくれるということが大事なかなと思う。

世の中にコンペティティブで日本がプレゼンスを持てる領域というのは継続的にやっていかないといけないと思う。クライオトモグラフィーなども、米国のほうでは重要視されて、もう拠点を決めている。だから、やはり一つ一つの技術に関して拠点を決めるというのはとても大事だと思う。ばらばらしないで拠点を決めて、Spring-8 なり PF というふうにやったのと同じように、2～3カ所拠点を決めてそこに投資して行って、そこをネットワークでつなぐとかそういうことをやらないと、やはり日本が少ない予算の中でずっと、50年後にプレゼンスを持っていないといかない。そこまで考えた投資というか、テーマの選び方もそうですし、どこだったら競争力があるかというところを真剣に考えて採択して、チームが組めるところにやるのがまず必要ではないかと思う。

○今日ご登壇いただいた先生方、WPI 中にある方、AMED、BINDS の方、あと理研の BDR の先生方、そしてイメージングの支援の ABiS の方、かなりいろいろな支援とか拠点の方がいらっしゃるが、そういうところとの連携の仕方にはどのような方法があるか。

○例えば、合同カンファレンスみたいなものがわかりやすいとは思いますが、あまりフォーマルにしていると結局融合が進まなくなってしまうような気もするので、どのくらい柔らかくやっていいかわからないが、ちょっとお酒を入れつつ話し合ったほうがいいのかもかもしれない。私自身もさきがけの後で、押しかけ講演のようなもので、共同研究が始まったりというケースもあったし、少しアンフォーマルな形で進めたほうがいいのかもかもしれない。あと、若手の意見でどこかの機関と一緒にカンファレンスしたいと言っても、すぐそういうふうにはできないと思うので、そういう声が上げやすいようなシステムがあるといいかもしれない。若手だとどうしても自分の所属している学会しか知らないケースもあるので、そういうところでどなたかに「こういうところもある」と教えていただけると、新しい視野で物が見られる可能性もあるのかなと。今回参加させていただいて、今まで聞いたことのない話を聞かせていただいてすごく勉強になった部分があったので、そういうことを感じた。

○BINDS では合成展開のほうをやっている。プローブをつくったり、いわゆるメドケムでいい化合物をつくったりというところの PO だが、いわゆるツールとなる化合物をつくったりというところでは、多分、BINDS と AMED との連携というのもあると思う。合成のところまでは入っているが物理の人は BINDS に入っていないので、それはまた他を探さなければいけないが、例えばそういう感じでツール化合物とかプローブとか、それに対するいわゆる釣ってくるところとか、そういう形では連携もありかなと思った。

○分子生物学というのはマックス・デリブリックとか物理屋がつくった生物学なので、物理になり出したというのは、逆にある意味、彼らの理想がようやく実現されつつあるという。もともとはシュレーディンガーの「生命とは何か」から始まっている。

○生化学の領域に物理屋さんが入ってくることによって分子生物学ができてきたという話があって、ある意味、今回の提案は分子・細胞生物学ルネッサンスなのかなと思っていて、そういう意味ではやはり新しい、野心的な若い研究者、自分のところでアイデアを、要素技術を持っているが、なかなかよそと接点がないという人を多くリクルーティングしてあげてほしい。そういう意味では、応募要項のところととにかくグループをつくりなさい、そのために、平場で、要素技術だけ持っていて応募したいが連携相手がいないという人を呼んで、そこでディスカッションさせ

るということをやれるといいのではないのかと思う。かつて再生医療のネットワークが始まる時に、熱海でかなり多くの人数で合宿を組んだことがあったが、あのときも平場で、そこでシーズとシーズがかなり結合して新しい研究手法等が出てきたということがあったので、そのためにも横串をつなぐために合コンをやってほしいということを主張したい。

○公募を開始する前に、なかなか出会いの場が少ない。それは2年目以降にやればいいのかなど思っているが、やはりJSTとして異分野融合は、もう何十年もやっているが、やはりそういう人たちはなかなか手を挙げられない。幾ら募集要項に書いてもやはり来ないので、そこをどうしたらいいのかというのはまだわからない。もしかしたら総括を2トップにして、物理の人と生物の人にすぐらいしないと、生物の人が総括になった瞬間に物理の研究者が諦めてしまうというのがあるので、またぜひアドバイスをいただけたらと思う。

○出会い系ワークショップをやったらいいというのは全くとそうだと思うが、時間がないというのもそうだと思う。例えば初年度はチームを組んでいるところはフルでもいいが、それぞれの人はFSみたいな形で少額を与えて、それで最初の領域会議のところでやれば、多分制度設計はできるのではないか。例えば実際に菅野先生のCRESTのときは、さきがけの人たちと合同で領域会議をすることで、さきがけの人たちとチームを組んでということが実際に行われて、それはすごくワークしている。

○2点言いたいことがあって、1つは、さっき海外の研究でコラボがという話が出て、プリンストン大学の話で、内部ですごくうまく共同研究がやられている。例えば液-液相分離が今、プリンストンではすごく流行っているが、それはクリフ・ブラングワインという人が来て、その人を中心にいろいろな人たちと共同研究をしていて、そのオプトジェネティクスを使ったドロップレット形成も、彼とまた違う人たちと一緒に共同研究をやっていることをやっている。ただ、別の大学同士で共同研究が盛んかという、実は余りそうでもない。なので、そこはまたちょっと別の仕組みを考えたほうがいいかな。あと、自然科学研究機構は大学共同利用機関法人で、いわゆる大学の方々と共同研究をやるということである。自分もたくさんやっているが、感覚としてうまくいっているなというのは大体2パターンに分かれていて、高頻度だが低密度にやる、1週間に1回Skypeで高頻度にやるパターンと、もしくは、低頻度だが大学院生とかボスが1カ月ぐらい来て共同研究をこのラボでやる、基生研にあるような機械を使ってやるというパターンというのが、私の共同研究がうまくいっている印象。そういった仕組みをうまくつくれるといいのではないかなと思っている。

○技術と生命現象の組み合わせみたいなことをもう少し意識した領域にしたらいいいのではないか。例えばユニークな計測技術を持っているとかユニークなアルゴリズムがあるとか、プローブでもいいし、そういう何か既に持っているか、あるいはこれからつくろうとしている人を必ず入れ込んで、複数で提案する。そうすると、計算機科学の人と組める場合もあるし顕微鏡の人と組める場合もあるかもしれない。今までの、1つの分子をなくしたときに何が起こるみたいな、そういう余り定量的ではないのが印象としてあるが、やはり定量的な議論をしていくことが大事なのではないかなと思った。

テーマについて

○「これは分子・細胞生物学と何が違うの？」という質問に対しては、科研費を除くと、日本では分子・細胞生物学をサポートするお金がなくなっているというのが今の構造である。やはり科

学の進歩というのはスパイラルで行くので、どうも分子生物学というのはシグナルトランスダクションの絵を描いて、それで終わったみたいな感じになっていたのが、ゲノムとかいろいろなことが出てきて、そしてぐるっと一回転すると一段スパイラルで上がった新しいステージに来ている。そうすると、やはり人材育成も考えて、そういうところにお金を使うような、そういう政策決定はあるのではないかと。問題は、装置をみんなシェアしなければいけないとか、それから難しい数学的な解析をやらしてもらわなければいけないとか、そういうネットワークがないともう世界と競争できなくなっているから、科研費で孤立して1人のPIが頑張ってもできないことをここでやるような、そういう構造につくるのが大切ではないか。

○その分子生物学のところ、例えば非平衡とか過渡的とか、それから細胞内といったキーワードを入れると、リニューアルしたような形になるのではないかと気もした。それから、永井先生のお話で、結果の凝集をやるのではなくてそこに至る過程を調べなくてはならないというのは、「なるほど、そうだな」という思いがして、例えばシス因子とかトランス因子を調べるのは重要なことで、それを押さえることによって腫瘍とか薬物設計のほうにも使える。過程というのは、動的で非平衡で過渡的でもある可能性があるから、こういう切り口はあるなと思った。

○今年度発足した多細胞領域との違いというのは多細胞のほうは細胞はもう既に与えられたものとして、細胞同士の関係がどのように構築されるかということと理解する。細胞間での役割分担とか制御等はわかっていないので、そこは現代風に数値モデリングも含めて細胞間の話をしたい。だから、ここは概念が全く違うと思う。

○ここで得られた生物学的あるいは情報学的、物理学的な知見、新しい生命のストーリーを紡いで社会に発信できるようなプロジェクトなり人材なりというのも、サイド・バイ・サイドで走っていきけるような枠もつくっていただくと、よりよいのではないかと。かつてゲノム ELSI という話もあって、そこまで大規模なものである必要性はないが、そうした人社系、あるいは倫理、そして社会の生物学的なリテラシーを上げる一助になるものが走るといいかと思う。

○日本は今、金が出ないので物量では負けているから、中国の話とか米国の話とかヨーロッパの話の聞くと最低限キャッチアップしなければいけないというか、維持するためのベースマネーみたいな感じでどうしても話が行きがちになる。でも、せっかくプログラムをつくるからにはやはりどこかで一点突破するような、そういう目標も要るかなという気がする。その目標を突破するのは、やはり科学の世界では個人になる。

○今日は凝集とか物理とか動態へのアプローチといった話が出ていて、LLPS に代表されるようなものもテーマの軸として出されたときに、そんなに研究者がいるのかなと。一点突破する個人がどれぐらいいるのかなというのはある。凝集のプロセスというのは本当は誰かがアプローチしないといけないと思うが、どうしても超分子というよりは単一分子にいく方のほうがやはり日本では多い。

○やはり単分子とかそういう分子間、単一分子の相互作用をやってきたということよりも、超分子というタンパク質の状態の研究していくという視点は、今までは少なかった。これから人がいるのかということに関しては、そういうことが必要だという認識はかなり高まっているのは事実。では、既にそれで実績を上げている人がたくさんいるのかということ、まだそこまではいっていないので、どういうふうにしたらいいかという切り口は皆それぞれ持っているが、こういう領域が立ってそういうチャンスができると、そういう研究を進める大きな機動力になるのではないかと。

○いろいろな異分野の人たちを集めるための目標なりテーマなりを考えたときに、やはり何が今

までと違ってきたかということ、細胞でもオルガネラでもそういうレベルで考えるのではなくて、この位置で何が起こるかとか、そういう位置生命科学、そういう時代になってきているのなという気がする。細胞の中でもどこにどういうタンパク質複合体があって、機能はどう違って、それは見るという技術が進むことによって位置の精度が上がってきて、これまですり潰してやっていた生化学が、そういう細胞の中の位置という文脈に当てはめることで理解が格段に、不連続にシフトするような予感がある。そういう対象としては細胞の中のオルガネラでもメンブレンレスでも、何かそういうキーワードがあれば、そういうものに解析技術、それから下から組み立てていく技術、そういうものを持っている人が集まれるいいテーマになるのかなという気がして、それは新しい生命科学の目標かなという気がした。

○時間も入れるといいと思う。

○そう、位置と時間で。

○きょうの表題は、動的構造、局在、数量となっているのはそんなに悪くはないのかなと思っている。超分子という言葉も入っている。

閉会のあいさつ

○永井上席フェロー お聞きしていて私が一番感じたのは、これはPO・総括次第だということ。お金がたくさんあれば、たくさん採択して、みんなが好き勝手にでいいが、おそらくこの研究費は相当の競争率になると思う。それと、特に日本の場合、拠点作り——拠点も、1つだけつくってもしょうがなくて、ある程度分散した拠点づくりをどうするかというのがずっと科学研究の課題だったように思う。それを今回のプロジェクトで試してみるということだと思う。

私自身、CRESTの研究総括を8年近くやっているが、意図的に似ていない人たち、違う人たちを集めた。申請書に書いてあることは大体目処が立っているのも、もちろんそれはそれでやらないといけないが、いかに想定外の新しい展開をもたらすかということで、やはり総括がお見合いさせていた。しばしば似た人たち、似た背景の似た領域の人が集まると、競争相手になってしまっていて交流が進まないということも今まで言われている。そういう意味でバーチャル研究所をつくるということと、ヘテロな人たちですから皆さん知らない技術を持っている。そういうお宝的なものをシェアするという。もう一つ、報告会はフォーマル過ぎてはだめで、前の日に代表だけ呼んでこういう感じで半日、報告会と同じ話をさせる。そうすると、みんな2回聞けばさすがに理解が深まるから、そして一緒に飯でも食べる。そうしているうちに共同研究が進んだということがある。

いずれにしても、この広い範囲だから、脚本、演出かつ合コン仕掛け人、ミキシングをする人という、やはり本当は総括を最初に決めたほうがいいような気がする。今回、日本の一つの研究のモデルにさせていただきたいということ。世界はアンダーワンルーフで、WPIはアンダーワンルーフを目指している。ここはバーチャル研究所なんだとすると、バーチャル研究所長が求められる総括だろうと思う。

○谷口上席フェロー この会の趣旨からは外れるところもあるが、この会とも関係することなので、若干私の存念を申し上げたい。

EMBOの学会に参ると、今日このシーンとは全く違うシーンが見られる。これが日本の姿だと思いますが、女性が圧倒的に少ない。ヨーロッパのEMBOのミーティングに行くと、50%ある

いはそれ以上が女性研究者。それだけ有能な日本の女性研究者の能力をどこかでだめにしているメカニズムがあると思う。これはおそらく日本のサイエンスのこれからを握る重要な課題になる。

もう一つは、応用研究と基礎研究の違い。この応用研究と基礎研究の定義とは何か。何となく基礎研究は科研費、応用研究は JST と言っているが、OECD に「Frascati Manual」というものがある。そこには基礎研究、応用研究、開発研究とは何ぞやという定義がある。よく基礎研究はボーアの象限とか、応用研究はパスツールの象限とか言われているが、そういうものをきちんと我々が認識して語る事が重要なことで、そこが混同されているのではないかという気がする。

それから異分野融合、今日は活発な議論が進んだ。これは普段の学会ではないことで、こういうチャンスがあるからこそ、お互いに意見交換ができる。これは大切にしていきたいと思う。例えば、神経と免疫とか、それから代謝とサーカディアンリズムとか、別分野だと思われていたものをどんどん一緒に研究しないとやっていけないという分野もある。それは領域を立ち上げる前に、異分野の人たちが、もうかみ合わなくたっていい、それでも話をしていると何か生まれてくるというような地道な活動をサポートしていただくといいなと感じた。噂が広まると、やがて若い人たちが大勢やってくる。だから、人を育てるという意味でも重要かと思っている。それから、共同研究、困ったときに誰に頼めばいいかといったことをデータベース化したような仕組みを文部科学省、あるいは JST が、どこかでそういうことを検討していただきたい。すぐに実を結ぶことではないかもしれないが、長期的に見ると結構実を結ぶのではないかと、ぜひそういうこともご検討いただきたい。

それから、日本のサイエンスをどうするかというのは大変重要な問題で、やはり国際交流というのが重要だと思う。もう少し世界と一緒にやって、お互いにメリットがあるような仕組みの構築も重要ではないか。ぜひ発展させていただけたらいいと思う。

最後に、最先端のサイエンスをやっている人だけがサイエンティストではないということをよく考えていただきたい。テクニシャン、それからマウスを飼ってくれている人、それからジャーナリズムで科学をやっている人、それから科学行政にかかわっている方、みんながサイエンティスト。そういう人たちがお互いにリスペクトし合って、そして一緒にサイエンスをエンジョイするんだという、それを醸成していくことが今の日本にとって重要なのではないかと思う。

付録A. 開催趣旨・プログラム

【開催日時】2019年11月10日（日）13:00～18:00

【開催場所】AP市ヶ谷

【参加者】

13:00-13:10

主催者挨拶

永井 良三（JST-CRDS）、仙波 秀志（文部科学省ライフサイエンス課）

13:10-13:20

趣旨説明と事務連絡

島津 博基（JST-CRDS）

13:20-15:00（12分／人、質疑1問含む）

第一部：疾患等と高次動的構造（オルガネラ、超分子複合体）、機能（遺伝子発現機構とタンパク質制御）の関係～生化学・分子生物学などの視点～

永井 義隆（阪大）、田中 元雅（理研）、高橋 暁子（がん研）、康 東天（九大）、遠藤 斗志也（京産大）、有本 博一（東北大）、木村 宏（東工大）、廣瀬 哲郎（北大）

15:15-16:55（12分／人、質疑1問含む）

第二部：先端技術等と高次動的構造（オルガネラ、超分子複合体）、機能（遺伝子発現機構とタンパク質制御）の関係～生物物理学、構造生物学、ケミカルバイオロジーなどの視点～

太田 啓介（久留米大）、高橋 康史（金沢大）、立川 正志（京大）、築地 真也（名工大）、福田 善之（東大）、上田 昌宏（阪大／理研）、青木 一洋（基生研）、岩崎 信太郎（理研）

17:00-18:00

総合討論：一部と二部をつなぐ展望・方策（この領域を進める上での気づき、課題）

佐藤 悠樹（文部科学省ライフサイエンス課）、川口 哲（JST 戦略研究推進部）

閉会挨拶

谷口 維紹（JST-CRDS）

コメンテータ（五十音順）

上村 みどり（帝人ファーマ）、岡田 康志（理研／東大）、坂田 恒昭（塩野義製薬）、嶋田 一夫（東大）、菅野 純夫（東京医科歯科大）、八代 嘉美（神奈川県立保健福祉大学）

■ワークショップ企画・報告書編纂メンバー■

総括責任者：永井 良三	上席フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
谷口 維紹	上席フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
チームリーダー：島津 博基	フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
チームメンバー：蔡 慧玲	主査	(戦略研究推進部)
宮菌 侑也	フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
富田 英美	フェロー	(海外動向ユニット) (2019年12月まで)
荒岡 礼	フェロー	(ナノテクノロジー・材料ユニット)
相田 俊一	主任調査員	(未来創造研究開発推進部)
瀧澤 正之	主任調査員	(経営企画部)

※お問い合わせ等は下記までお願いします。

CRDS-FY2020-WR-01

科学技術未来戦略ワークショップ報告書

アトミック・セル・ダイナミクス

～細胞内機能素子の動的構造・局在・数量と
機能の相関（因果）の解明と革新的技術開発～

令和 2 年 3 月 March 2020

ISBN 978-4-88890-680-7

国立研究開発法人科学技術振興機構 研究開発戦略センター
Center for Research and Development Strategy, Japan Science and Technology Agency

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町
電話 03-5214-7481
E-mail crds@jst.go.jp
<https://www.jst.go.jp/crds/>
©2020 JST/CRDS

許可無く複写／複製をすることを禁じます。
引用を行う際は、必ず出典を記述願います。
No part of this publication may be reproduced, copied, transmitted or translated without written permission.
Application should be sent to crds@jst.go.jp. Any quotations must be appropriately acknowledged.

