

「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

－平成26年度中間評価実施研究課題－

研究総括 上田 泰己

1. 研究領域の概要

本研究領域は、細胞機能の再構成・設計と制御を試みることを通じて生命の本質に迫ろうとする研究を対象とし、生命システムの理解や広範な応用をもたらすコンセプトや基盤技術の創出を目指します。具体的には、

- 1)細胞機能を担う生体分子やその複合体の論理的あるいは効率的な設計や制御
- 2)ゲノム・代謝ネットワーク・無細胞翻訳系・細胞膜分裂など、細胞機能のインフラを支えるプロセスの再構成・設計や制御
- 3)シグナル伝達・遺伝子ネットワーク・細胞間コミュニケーションなど細胞の高次機能を実現するプロセスの再構成・設計や制御
- 4)細胞組織・器官・個体システムの再構成・設計や制御
- 5)細胞機能の設計や制御を目指して化学・物理・情報科学・生命科学などの異分野が輻合し、オープンイノベーションを実現するための枠組みやその構築などに関する研究が含まれます。他に類をみない発想に基づく基礎研究とともに、医療やエネルギー問題などに将来貢献しうる野心的な研究も対象とします。

2. 中間評価対象の研究課題・研究者名

件数： 3件(うち、大挑戦型0件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 研究実施期間

平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月(※平成 29 年 3 月終了予定)

4. 中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(中間評価の流れ)

平成 26 年 11 月 評価会開催

平成 26 年 12 月 研究総括による中間評価

平成 27 年 1 月 被評価者への結果通知、研究計画見直し

5. 中間評価項目

- (1)研究課題等の目的達成に向けた研究の進捗状況及び今後の見込み
- (2)研究課題等の目的達成に向けた研究実施体制及び研究費執行状況

6. 評価結果

メンターでもあるアドバイザーの先生方のご指導を頂きながらこの 5 年型研究者と一期生の研究者は、領域会議で活発な議論を交わし、さらに自主的な勉強会を開催し、この領域の主題「生命とは何か」を探求しています。ヘテロな集団であることが、お互いの研究課題に新しい考えを持ち込み、良い効果があると考えます。論文での公開を通じて、早く、国際的なネットワークを構築することを奨めている。

1. 澤井 哲研究者「細胞形状と運動の自己組織的挙動の理解と操作」

アクチン/PIP3 波の動態の解析と、基質依存性の解析を進めたことにより、その成果を PNAS、Cell Science、Nature Communications 誌などにまとめ、着実に研究を進展させている点を評価します。研究テーマ A から D のそれぞれの課題を着実に進め、連携を図り、その差異や疑問点を解析、検証することによって、より具体的に自己組織化現象を理解することができるような新しい提唱を、期待しています。

2. 船山 典子 研究者「カイメンが工学的に優れた骨格構造を自律的に構築するメカニズムの解明」

本研究で得られた知見から、動物が体を支える内骨格を形成するこれまでに無い新たな動物の形づくりのメカニズムの発見と解明への進展を興味深く、注視しております。外部環境からの物理的な力の感知と骨格の

fine-tuning の仕組みの解明は、後半の研究で、もっとも探求して頂きたいところの1つです。

領域内の研究者やアドバイザーからの助言や共同研究によって、着実に研究が進展していることが、読み取れます。残り2年で、この5ステップの全貌が明らかにされることを楽しみにしております。また、論文での公開を通じて、早く、国際的なネットワークを構築されることを望みます。

3. 持田 悟 研究者「細胞分裂周期の in vitro 再構成への挑戦」

細胞分裂周期の動的変動を in vitro で1つ1つの部品を使って、再構成するために、さきがけ研究の前半で、これまでにない高性能なリン酸化光プローブの開発に成功したことは、今後の研究をつづける上で、大きな成果と評価します。

このプローブを駆使して、CDK、PP2A、及びその他の制御因子を用いて動的なリン酸化バランスの変動を解析し、カエル卵抽出液や細胞との比較から、多くの新しい知見が得られることを楽しみにしています。

7. 評価者

研究総括 上田 泰己 東京大学 大学院医学研究科・教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 27 年 1 月末現在)

上田 卓也 東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授/研究科長

岡田 清孝 自然科学研究機構・理事

影山 龍一郎 京都大学ウイルス研究所・教授

菅 裕明 東京大学大学院理学系研究科・教授

杉本 亜砂子 東北大学大学院生命科学研究科・教授

竹内 昌治 東京大学生産技術研究所・教授

永井 健治 大阪大学産業科学研究科・教授

西田 栄介 京都大学大学院生命科学研究科・教授

野地 博行 東京大学大学院工学研究科・教授

水島 昇 東京大学大学院医学系研究科・教授

(参考)

件数はいずれも、平成 27 年 1 月末現在。

(1) 外部発表件数(5 年型のみ)

	国内	国際	計
論文	0	7	7
口頭	34	20	54
その他	3	1	4
合計	37	28	65

(2) 特許出願件数(5 年型のみ)

国内	国際	計
0	0	0

(3) 受賞等(5 年型のみ)

・澤井 哲

文部大臣賞若手科学者賞(平成 24.4)

(4) 招待講演(5 年型のみ)

国際 6 件

国内 9 件

別紙

「細胞構成」領域 中間評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成27年3月末現在) (応募時所属)	研究費(3年間) (百万円)
澤井 哲 (兼任)	「細胞形状と運動の自己組織的挙動の理解と操作」 (東京大学駒場1キャンパス)	東京大学 大学院総合文化研究科 (同上)	74
船山 典子 (兼任)	「カイメンが工学的に優れた骨格構造を自律的に構築するメカニズムの解明」 (京都大学 大学院理学研究科)	京都大学 大学院理学研究科 (同上)	64
持田 悟 (兼任)	「細胞分裂周期の in vitro 再構成への挑戦」 (熊本大学先導)	熊本大学 大学院先導機構 (同上)	68

研究報告書

「細胞形状と運動の自己組織的挙動の理解と操作」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年12月～平成29年3月

研究者: 澤井 哲

1. 研究のねらい

アメーバ状の細胞運動や食作用は、好中球やマクロファージなどで顕著にみられ、癌細胞が浸潤、転移する際の運動形態もよく知られている。本研究では、細胞運動のモデル生物種である細胞性粘菌のアクチン重合と細胞膜上のフォスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)が、基質接着面で伝播する波となって出現と消滅を繰り返す現象に着目し、この波の動態パターンの出現機構の理解と、これにともなった膜変形の操作をめざす。膜の裏打ちにおけるアクチンの重合と、それによって細胞膜がおさされる過程、アクチンフィラメントの再編成・解体と、ミオシンによって膜が引きこまれる過程は、二つの自己組織化現象と、その間のクロストークがあると見なすことができる。定量的な解析と、微細加工による細胞外環境の操作、細胞内反応の摂動を通して、膜が伸張するタイミングと方向についての、動力学的・幾何学的な性質を特徴づける。脂質シグナルが、増幅と抑制を繰り返しながら、時間と空間的に周期性をもった能動的なパターンがいかにかに形成されるのか、またアクチン重合と膜変形間のフィードバックによっていかなる動態が自己組織化するのか。膜上のリン脂質シグナルにみられるパターン形成と、細胞骨格系に由来する自己組織化現象の二つが組合わさったハイブリッド系としての特性を明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の、基質接着側の膜上で伝播するアクチン/PIP3 波の動態を定量的に特徴付け、波の回転や反転が位相の特異点の数とその周りの位相の空間的配置の方向性によって決まることを示した。さらに特異点の生成と消滅によって、そうした運動の基本モード間の遷移が説明できることと、薬学的、分子遺伝学的にアクチン重合を適度に低下させると、波の発生頻度を低下させることを明らかにした。これらの結果を PNAS に発表した(Taniguchi et al Sawai 2013)。また、自発的な PIP3 波の駆動源として、cAMP 受容体の状態遷移と PI3 キナーゼの上流の Ras 活性化に注目し、その動態を特徴づけた。受容体のリン酸化部位を欠損した細胞では、アクチン重合と cAMP 産生のともに、適応が不完全となり、これと関連して cAMP 刺激後のアクチン波の伝播がより顕著になることが示された。この一部を含む論文を Journal of Cell Science 誌に発表した(Brzostowski, Sawai et al 2013)。また PI3 キナーゼについての解析はあらたにカテキンが抑制因子として有効である可能性が示され、これについての基本的な運動形態の観察を PLoSOne 誌に報告した(McQuade et al Sawai, 2013)。Ras の活性化については、通常、走化性誘引物質 cAMP が時間的に上昇する場合には形質膜上の Ras が一過的に活性化するが、逆に時間的に減少している場合には活

性の変化が生じない。一方で、Ras 活性が自発的に上昇している細胞ではより対称的な応答となり、Ras 活性の一過的な低下を示すことを明らかにした。この性質のため、cAMP 進行波刺激にたいして、波の背面においても勾配検出をしめしてしまうことがわかった。このことから、時間的な変動による勾配検出から一方向的な運動には、自発的な Ras/PI3K の活性化は阻害的であることが明らかになった。この結果を含む論文を Nature Communications 誌に発表した(Nakajima et al, Sawai 2014)。

(2) 詳細

研究テーマ A 「自己組織化ダイナミクスの解析」 細胞性粘菌の基質接着面側の細胞膜を共焦点顕微鏡をもちいてタイムラプス測定をおこなった。測定は、PIP3 への結合に特性があるプレキシシンホモロジー(PH)ドメインタンパクに赤色蛍光タンパク(RFP)を融合したものと、ホスファターゼ PTEN に緑色蛍光タンパク(GFP)を融合した二つを発現した細胞を対象とし、数秒間隔で画像を約15分間にわたって取得した。ウェーブレット変換を用い、最も大きな振幅をもつ周波数成分をとりだし、この主要モードについての偏角を抽出し、これを波の位相とみなしてその空間的分布の時間発展の解析をおこなった。この位相マッピングによる解析から、特異点を抽出し、波の発生頻度の特徴づけをおこない、これがアクチン重合に強く依存する現象であることが明らかになった。また、波同士のぶつかりが波の背面と前面で生じる際に位相の特異点が生じやすいこと、これによって回転ラセン波が生じていることを明らかにした。

研究テーマ B 「ディカップルした細胞の構成と解析」 細胞の膜変形にとって重要と考えられる、情報伝達経路として、特に cAMP 受容体の状態遷移の変異体、さらに PI3 キナーゼ経路と、cGMP 経路をそれぞれ欠損した細胞に着目し、アクチン重合を可視化する Lifeact-RFP/GFP や低分子量 GTP アーゼ Ras の活性化の可視化測定する Raf1RBD-RFP/GFP プローブを導入し、計測をすすめた。また、PI3 キナーゼ活性の抑制剤としてカテキンの有効性を調べた。これまでの共焦点観察に加え、全反射型顕微鏡(TIRF)をもちいたタイムラプス測定をおこない、パターンのより詳細な解析を進めた。

研究テーマ C 「自己組織化ダイナミクスの摂動と操作」 cAMP の刺激や、足場の接着性を変化させる条件で、解析した。アクチン波の発生の基質への接着性の依存性の詳細を調べた。同時に、干渉反射顕微鏡観察の系を導入し、細胞膜と基質間の距離の変動と波ダイナミクスとの関係を解析した。また、比較的分化の度合いが浅い細胞では、受容体からのシグナルに非依存的に Ras の活性が上昇しており、分化が進み走化性能を獲得するにつれて自発的な Ras 活性化が低下することがわかった。これと併行して、アクチン波の発生頻度も低下することから、自発的な波の発生に Ras の基底活性が重要であることが示唆された。また、cAMP 波への走化性においては、Ras の基底活性が高い場合、cAMP の時間的に減少が細胞の前後ろの Ras 活性の違いに変換されてしまうため、細胞が cAMP 波の前面と背面で対称的な動きを示してしまうことがわかった。自発的な Ras/PI3 キナーゼの活性は粘菌の集合過程にとってはむしろ阻害的に働くことが明らかになった。

研究テーマ D 「自己組織化ダイナミクスの理論・数値解析」 フェイズフィールド法をもちいた膜変形のシミュレーションをおこなった。蛍光観察結果に基づき、PIP3 の濃度に応じて外向きに細胞境界が広がり、逆に PIP2 が多いところでは引き込むという単純な規則を加えた。その結果、ショットノイズによって発生したらせん波によって膜が回転をともなって伸張すること、さらに二つの同心円状の波が衝突すると、中心部では波が消滅し、それとは直角の方向への伝播が続くため、伸張方向が90°に交代することが繰り返される、周期的な変形パターンを示していることがわかった。また、波が境界付近で反射されやすい条件として、膜のやわらかさが重要であることが数値計算から示された。

3. 今後の展開

これまでの研究結果を踏まえて、光遺伝学、基質面の物性、構成的なフィードバック回路についての解析をさらに押し進め、これらを組み合わせた波の操作方法の確立を目指す。物理的な障壁や、接着性が空間的に不連続な場合に、アクチン波の伝播がいかに影響を受けるか、さらに他の細胞との接触による影響を調べ、膜変形が細胞でいかに機能しているかについての理解を進め、この側面に注目した細胞の操作法の開発を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

アクチン/PIP3 波の動態の解析と、基質依存性の解析を進めたことにより、研究開始当初と比較して、現象と計測の再現性を格段に向上することができた。明らかにした波自体の発生条件は、当初計画のねらい通りに、アクチンフィラメントと膜の力学的な側面の重要性を裏付けるものである。基質依存性は、探索空間が広く、いまだ理解が足りない面があり、また、PI3K などの欠損株の動態から、波を出現させる不安定性の起源に近づいている。これらの解析から波発生の必要条件が明らかになってきている。反射干渉、共焦点顕微鏡による測定からわかってきたことと、光刺激による操作の要素技術も試行錯誤が進んでいることから、これらを効果的に組み合わせることで構成的な操作へつなげることを計画している。また、さきがけ研究開始当初は、大学着任とラボ立ち上げから日も浅かったが、装置の整備を進められたことで、実験の効率的な実行のための環境を整えることができた。パイロット実験や方向付ける実験をさきがけ研究員がおこない、主に大学院生とともにデータ取得、解析をおこなった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

アクチン/PIP3 波の動態の解析と、基質依存性の解析を進めたことにより、その成果をPNAS、Cell Science、Nature Communications 誌などにまとめ、着実に研究を進展させている点を評価します。研究テーマAからDのそれぞれの課題を着実に進め、連携を図り、その差異

や疑問点を解析、検証することによって、より具体的に自己組織化現象を理解することができるような新しい提唱を、期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. D. Taniguchi, S. Ishihara, T. Oounuki, K. Kaneko & S. Sawai. Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells. . PNAS. 2013, 110, 5016–5021. |
| 2. J. A. Brzostowski, S. Sawai, O. Rozov, X. Liao, D. Imoto, C. A. Parent and A. R. Kimmel. Phosphorylation of chemoattractant receptors regulates chemotaxis, actin re-organization, and signal-relay. J. Cell Sci. 2013, 126, 4614–4626. |
| 3. K. J. McQuade, A. Nakajima, A. N. Ilacqua ¹ , N. Shimada and S. Sawai. The green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) blocks cell motility, chemotaxis and development in <i>Dictyostelium discoideum</i> . PLoS ONE 2013, 8(3): e59275. |
| 4. A. Nakajima, S. Ishihara, D. Imoto & S. Sawai. Rectified directional sensing in long-range cell migration. Nat. Commun. 2014, 5, 5367 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

文部科学大臣表彰若手科学者賞(H24)「細胞集団の自己組織化についての研究」

著作物

澤井哲 石原秀至 中島昭彦 「興奮系の自己組織化現象からみる細胞動態」実験医学 Vol 31(8) 羊土社 2013年4月号 p. 1217–1223.

プレスリリース

1. 平成 25 年 3 月 12 日 澤井哲 石原秀至 「アメーバ細胞の自由自在な形状を決定する仕組みを解明 – アメーバ内で自己組織化する波動と特異点 –」米国科学アカデミー紀要 (PNAS)
2. 平成 26 年 11 月 6 日 澤井哲 中島昭彦 「粘菌の「集まれ!」の合図への応答には、ダイオードのような整流作用が働いている。」Nature Communications(オンライン版 11 月 6 日)

招待講演

1. 新学術領域研究「動く細胞と秩序」公開シンポジウム 「アメーバ運動を誘起する場のリズムと波」2012 年 1 月 27 日 (名古屋大学)
2. JST と BBSRC の日英共同研究のプログラム システム生物学とバイオイメージングのシンポジ

- ウム “Imaging analysis of self-organization in moving amoebae” 2012年1月30日（東大本郷）
- 3.分子ロボティクス研究会 2月例会「アメーバの自発的形狀変化とリン脂質シグナルの自己組織化パターンとの関係」 2012年2月13日（東京工業大学・田町キャンパス）
- 4.CDB Symposium 2012 on Quantitative Developmental Biology “Information Processing and Self-organization in Developing Cells” 2012年3月28日（神戸 理研）
- 5.International workshop on “Active Dynamics on Microscales: Molecular Motors and Self-Propelling Particles”（オランダ Lorentz Center） “Geometries of phosphatidylinositol waves and large-scale membrane deformation during spreading and random movement of *Dictyostelium*” 2012年9月
- 6.東京大学 高校生のための金曜特別講義「粘菌からさぐるいきいきとした状態の科学」(駒場キャンパス 2012年11月30日)
- 7.第51回東京大学物理学教室コロキウム「細胞動態と自己組織化現象:反応-拡散-駆動系」(本郷 2013年1月13日)
- 8.The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 on Quantitative Bioimaging (岡崎基礎生物学研究所 2013年3月17日) “Wave geometries and cell shape dynamics”
- 9.7th International Conference on Engineering Complexity “Resolving traveling wave chemotaxis” (ドイツ Warnemuende 2013年6月11日)
- 10.International Symposium on Systems Biology of Cellular Signaling “Resolving front and back of ‘chemotactic wave paradox’”(東大 本郷 小柴ホール 2013年7月1日)
- 11.NIBB conference Cellular community in mammalian embryogenesis “How cells get together with right tempo and orientation – an example from social amoeba” (岡崎基礎生物学研究所 2013年7月10-12日)
- 12.International Workshop From Soft Matter to Protocell (2013年9月18日 東北大学 仙台片平キャンパス) “Analysis and manipulation of self-organizing lipid signaling”
- 13.理研細胞システムコロキウム (2013年11月8日) 「細胞機能と自己組織化現象」(理化学研究所和光キャンパス 鈴木梅太郎記念ホール)
- 14.細胞を創る研究会 6.0 (2013年11月15日) 「アメーバ状の膜変形に関わる自己組織化ダイナミクス」(慶応大学鶴岡キャンパス)

- 15.時間生物学会サテライトシンポジウム「生物リズム現象の数理フロンティア」(2013年11月11日)「走化性の場とリズム」近畿大学東大阪キャンパス
- 16.大阪大学蛋白質研究所セミナー「細胞が集団になって初めて発現する機能」(2013年11月28日)「細胞の運動性と走化性誘引場の自己組織化」吹田キャンパス
- 17.第36回分子生物学会年会 ワークショップ「生命における自己組織化のメカニズム」(2013年12月6日)神戸ポートアイランド
- 18.名古屋大学生物物理学特別講義セミナー「自己組織化するダイナミクスと細胞動態」(2013年12月12日)名古屋大学理学部
- 19.数学・数理科学と諸科学・産業との協働によるイノベーション創出のための研究促進プログラム「生命ダイナミクスの数理とその応用」(2014年1月20日)東京大学数理科学研究科(駒場キャンパス)
- 20.京都大学 発生・細胞生物学・システム生物学コース 招待講演 “Cellular Sensing of Space and Time” (2014年4月25日)(医学部記念講堂)
- 21.「生物の非平衡構造と時空間ダイナミクス」日本物理学会科学セミナー「非平衡の世界 — 凝縮系から地震、経済、生命まで」(2014年8月7日)(東大駒場数理科学研究科大講堂)
- 22.「階層をつなぐ細胞ダイナミクス」バイオイメーjing学会第23回学術集会 シンポジウム 1「生命・イメージング・データベース」(2014年9月4日)(大阪大学 銀杏会館)

研究報告書

「カイメンが工学的に優れた骨格構造を自律的に構築するメカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 船山 典子

1. 研究のねらい

<建築工学的にも優れたカイメンの骨片骨格は、複数種の細胞の協調作業により構築される>

多くの動物は体内の骨格で体を支え、骨格が動物の形作りの基礎である。カイメン動物も脊椎動物等と同様、体内に形成される骨格を持つが、既知の骨格形成とは異なり、骨片という骨格エレメント(パーツ)を、立て繋げて骨格を形成する。また、最終的な設計図に沿って構築される人工の建築物とは異なり、カイメン骨片骨格は、成長する個体内で複数種の細胞がその場その場での情報と相互作用による協調作業で、骨片を1つ1つ組み上げ、種固有のパターンを持つ秩序構造を構築するという生物ならではの非常に優れた自律的な仕組みである。骨片骨格形成機構について、殆ど手付かずであったが、私達は独自の手法により、作られた骨片を運ぶ大工のような骨片運搬細胞が存在し、これにより骨片がダイナミックに運ばれてから立てられることを見出した。驚くべきことに、進化的に最も原始的な多細胞動物と考えられるカイメンにおいてすでに、複雑な複数種細胞の協調作業による組織構築の仕組みがあるのである。

<非常に多様で複雑なカイメン骨片骨格形成を可能にしている新規ロジックの解明>

生き物の形は、自然が長い時間をかけて作り上げてきた機能的に優れた仕組みを内包している。似た形態を持つものには、同様なロジックが用いられている。逆に非常に変わった形、例えばカイメン骨格の複雑で多種多様な不思議な形には、未知の発生ロジックが隠されていると期待出来る。

私達は骨片骨格形成過程では、体内空間で骨片が立ち、体内空間が広がり、次のステップに影響を与えるはずであるから、「体内空間と骨片骨格構築の細胞協調作業の間に、フィードバック的な互いに制御するロジック」があると考えた。本研究では、「細胞協調作業の解明」、「体内空間による骨片骨格パターンへの制御の解析」「骨片・骨片骨格が支える力という機械工学的な要素を考慮した考察」という、分野横断的な切り口による多角的な解析により骨片骨格形成のロジックを解明することを第1段階の目的とし、さらには、種固有の骨片骨格パターンの範囲内で、骨格形成中に周りの環境からの力(水流、水圧など)に、対応した細胞協調作業の微調整が行われているのではないかと考え、この微調整を可能にする機構の解明を第2段階の目的としている。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、本研究以前に私達が独自に見出していた成熟骨片がダイナミックに骨片運搬細胞という新規の細胞により運ばれ、運ばれた先で骨片が立てられているという現象から明らかになった、既知の内骨格形成とは根本的に異なるカイメンの骨格形成の解析をさらに進めた。本研究により、これまで全く不明であった「骨片が立つ過程」の「骨片が運ばれた先でどの様に一端が持ち上げられ、他端が固定されるか」の詳細な、かつ予想外のステップを解明、その細胞・組織レベルで明らかにした。さらに、骨片骨格が拡張する「骨片が組み上げられる過程」において、すでに立った骨片の先に、どの様に次の骨片が運ばれるのか、そして最終的に繋げられるかという過程のステップをも解明することに成功した。これらの過程におけるステップを解明する事で、骨片運搬細胞が骨片をただ運ぶだけでなく、まさに建物を建築する大工さんの様に骨片骨格形成において中心的な役割を担っていることを見出した。本研究による1段目の骨片が立つ過程の解明により、骨片が立てられる位置の制御について本研究以前に考えていた、例えばパタニングなどによる仕組みで「将来骨片を立てる位置が決まっているのではないか」という仮説の可能性が低いと示唆され、カイメンの骨片骨格形成機構を解明することで、既知の機構とは全く異なる新たな発生原理を見出しつつある。

カイメン骨片骨格形成機構の解明が大きく展開し、複数のステップとそこで働く細胞・組織を明らかにし全体像が見えてきたこの成果は、さきがけ研究者らの助言を得てカイメン側面からの蛍光像の長時間タイムラプス撮影が可能になったこと、さきがけを通じて得た機会により発生生物学、細胞生物学のみならず、生物物理、物性物理、理論生物学、生化学など広い分野の研究者方々と密なディスカッションを行うことが出来、科学的な視野が広がったことによることも大きく、今後の研究にとって大きな収穫である。現在、得られた成果をまとめた論文を作成中である。

(2)詳細

現在論文作成中であり、以下、詳細は記述出来ない部分も多いが得られた成果の概要は以下の通りである。

<研究テーマ A 骨片が立つ位置に運ばれて来た骨片が立てられるまでの細胞協調作業における骨片運搬細胞の役割と関与する細胞種の解明>

すでに、このプロジェクト以前の共同研究によるコンフォーカル顕微鏡での撮影により、骨片が持ち上がる過程を上から撮影することに成功していたが、3次元的な事象であるため、側面からの撮影によるさらなる解析が必須であると考えているに至っていた。本研究で倒立顕微鏡、高感度カメラなどを含む顕微鏡システムを工夫・確立することに成功し、側面からの蛍光像の長時間タイムラプス法の確立に成功した。これにより得られた映像の詳細な解析、及び遺伝子発現解析との組み合わせにより、運ばれてきた骨片の一端が持ち上がるまでの過程と関与する細胞・組織を明らかにすることが出来た。特に運ばれて来た骨片の一端が持ち上がるきっかけとなるステップに着目、これは 10 分程度と非常に短く、また骨片が立つ位置は予測出来ないため解析が非常に困難であった

が、2 時間ほど骨片の動きをタイムラプスで撮影しながらモニタリングし、ねらった瞬間にサンプルを固定、*in situ* hybridization を行うという粘り強さが要求される実験を、本研究で雇用出来たテクニカルスタッフの熱意により成功させ、骨片の一端が持ち上がるきっかけとなるステップに、骨片運搬細胞が関与することを解明出来た。

一方、当初計画していた骨片運搬細胞の単離は、様々の方法を試みたものの、カイメンの非常に高い再生能力、水棲生物としての性質などにより、カイメンの体内を人工的に開けると瞬時に体内の細胞が互いに結合して細胞塊を形成してしまい、成功に至っていない。今後、解決したい課題である。

<研究テーマ B 体内空間による骨片が立つ位置のパターンの制御の解析>

当初は、カイメンの体の成長(基底面の形)を、基質の種類により制限し、基底上皮が三角のカイメンなどを形成し骨片の立つパターンを解析する、または芽球を中心に山なりに体が形成されることから、芽球の殻の変わりに大きさの異なるビーズを入れて個体を形成させ、骨片の立つパターンを解析する計画であった。しかし、カイメンは試みた全ての基質に結合してしまうことが分かった。(おそらくは自身が分泌するコラーゲンマトリクスを用いて固着出来てしまうためと考えられる。)また、芽球からは数日かけてゆっくりと幹細胞が遊走して出てくるため、骨片が立つ前の時期に芽球を除くとほとんどの幹細胞がまだ芽球の殻の中であるために、個体の細胞数が少なく発生が極端に悪くなり実験にならないということも分かった、以上の結果からこれらの実験を行う事ができなかった。

しかし、研究テーマ A、及び同時進行している他のプロジェクトから「骨片が立てられる過程」を解明出来、その中のある1つのステップの仕組みにより、カイメンは新たに体が広がった部分に骨片を立てることが自然に出来ることが明らかになった。

<研究テーマ C 1段目の骨片が運ばれ立つまでの詳細な骨片の動きのトラッキング>

個体の1平面像を4つの視野をステッチングして得、Z 軸方向に 5 μm ステップで 30-40 枚、5 分毎24時間以上という多点タイムラプスビデオ観察が、本研究で購入・確立した顕微鏡システムにより可能となった。Z 軸上にプロジェクションした動画を用い、詳細な立てられた骨片のトラッキングをマニュアルで行った結果、骨片運搬細胞は他の体内細胞と共に、個体の成長に従って体の外側に骨片を運ぶ傾向は持ちながらも、特に特定の場に誘導して運ばれていることは示さないという結果を得た。骨片が立てられた位置は有る程度の間隔性を示すことが多いことから、長い間、仮説の一つとして、「骨片を立てる位置があらかじめ決まっている可能性」を考えていたが、得られた詳細な骨片が運ばれるルート解析から、この仮説の仕組みとは異なる、全く新規の仕組みの存在が示唆された。これは、骨片骨格形成機構の新規性を示す、興味深い本研究の大きな成果である。

3. 今後の展開

<研究テーマ A: 1 段目の骨片の一端が持ち上がる過程の細胞機構の解明>

骨片の外側端が持ち上がるのは、どの細胞種・組織がどの様に関与し、力を生じているのか、タイムラプスによる詳細な観察、骨片の動きの詳細なトラッキング、Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) による遺伝子マーカーの発現解析により解明する。

<研究テーマ B: 外部環境からの物理的な力の感知と骨格の fine-tuning の仕組みの解明>

人工的に物理的な力を与えた条件下での骨片骨格形成を、下からの像、側面からの像のライブイメージング、すでに同定している骨片骨格形成に関与する細胞種特異的遺伝子の発現解析 (WISH) などにより、さらに細胞・組織レベルでの解析を行う。人工的な物理的な力を与える工夫としては、流水下でカワカイメンの芽球からの個体形成を行わせ、その過程を側面からライブイメージング出来る装置を共同研究の開発、立った骨片を揺らす装置の開発、硬度を変化させた基質などを用いる。これらにより、例えば硬度の低い基質、流水下などにおいて、より強固な骨格を組み上げるか、そうであればどのような仕組みで骨格の fine tuning を行うかを解析する。

<研究テーマ C: 骨片が繋がった柱をつなぐ梁のような骨片骨格形成の仕組みの解明>

カワカイメン幼弱個体がある程度育ち、数本の骨片が繋がった柱状の骨片(骨片トラクト)同士をつなぐ梁の様な骨片が繋げられる。この梁としての骨片が繋げられる仕組みと、骨片骨格の調整について、形成される過程の観察、カワカイメン幼弱個体の骨片トラクトの間隔を人工的に変化させる培養法を独自に工夫などにより解明する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

さきがけ経費で顕微鏡・カメラ装置を確立出来、またテクにカルスタッフを雇用できたため、前半 3 年の大きな目標のうち、Transport cells の骨片の運び方に関して、骨片を立てる過程の最後のステップについて成果を得ることができ、当初はさきがけ期間の後半に取り組もうとしていた課題についても解析を進められた部分もあり、遺伝子操作ができない、前例がない等、どのプロジェクトが実際に進められるかは取り組んでみないと分からないカイメン研究において、自身の予想よりも多くの成果を得ることが出来た。ただし、重要課題である Transport cells の可視化これまでの研究と合わせて国際的な学術論文としての発表は今後の課題として残っている。この過程で、さきがけ研究者、総括を含むアドバイザーの先生方からの助言や質問に教えられることが多かった。特にさきがけ同期の研究者とは、分野が非常に異なる中で互いの研究を知りたいという思いから自主勉強会を重ねて来た事ことは大きい。研究の視野が広がると共に異なる分野の優れた研究者との繋がりを得ることが出来たことが、これからの研究を領域横断的に進めて行ける足がかりとなる、この 3 年間最大の成果であったと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究で得られた知見から、動物が体を支える内骨格を形成するこれまでに無い新たな動物の形づくりのメカニズムの発見と解明への進展を興味深く、注視しております。外部環境からの物理的な力の感知と骨格の fine-tuning の仕組みの解明は、後半の研究で、もっとも探求して頂きたいところの1つです。

領域内の研究者やアドバイザーからの助言や共同研究によって、着実に研究が進展していることが、読み取れます。残り2年で、この5ステップの全貌が明らかにされることを楽しみにしております。また、論文での公開を通じて、早く、国際的なネットワークを構築されることを望みます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1.再投稿準備中

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. 2013年10月28日 "How do sponge cells build up the hierarchical spiculous skeleton?"
日本生物物理学会第51回年会(京都)

国際学会

1. 2012年7月5日 "The active stem cell specific expression of sponge Musashi homolog EflMsiA suggests its involvement in maintaining the stem cell state" COS symposium 1st annual symposium (ハイデルベルク)

2. 2012年7月11日 Kazuko Okamoto, Kiyokazu Agata, Noriko Funayama, " Building up the spiculous skeleton: the collaborative work of multiple types of cells in sponges", "Toward Establishing a Gene Functional Analysis Method in a Freshwater Sponge, Ephydatia fluviatilis" Euro EvoDevo 2012 (リスボン)

3. 2013年9月23日 Noriko Funayama, "How do sponges build up the spiculous skeleton ?" International Workshop "Unraveling the Developmental Regulatory Network in Early Animals" (Tutzing)

国内学会など

1. 2012年5月31日 "The active stem cell specific expression of sponge Musashi homolog

EflMsiA suggests its involvement in maintaining the stem cell state", "Building up the spiculous skeleton: the collaborative work of multiple types of cells in sponges" 第45回発生生物学会・第64回生化学会合同年会・神戸

2. 2013年5月30日 "How are the spicule hold-up points regulated? -Observed spicule hold-up process suggests the involvement of the body space in regulation of where spicules are held up" および、"Innovative photomicroscopy and inhibitor Approach to understanding the mechanisms of building up the spiculous skeleton of the freshwater sponge Ephydatia fluviatilis" 第46回日本発生生物学会年会・松江

3. 2013年11月23日 "骨片を細胞が運び1つ1つ組み上げて立てる建築物「カイメン骨片骨格」形成の仕組み" 定量生物学の会第6回年会

4. 2014年3月10-12日 "HOW DO SPONGES BUILD UP THE SPICULOUS SKELETON?" 理研 CDB symposium 2014(神戸)

5. 2014年5月29日 "HOW DO SPONGES BUILD UP THE SPICULOUS SKELETON?" 第47回日本発生生物学会年会・名古屋

6. 2014年10月30日 CREST「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」数理デザイン道場

研究報告書

「細胞分裂周期の *in vitro* 再構成への挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 持田 悟

1. 研究のねらい

地球上に最初に生まれた細胞は《大きさを増し遺伝物質を複製する(間期) ⇔ 2つに分かれる(分裂期)》というサイクル(図1)を繰り返すことで単細胞生物として増殖し、多細胞生物であれば増殖と共にその巨大な体を作り上げてきた。現在、我々はこの細胞という単位を理解し、操作し、そして利用する段階にまで近づきつつある。この進展を支えているのは長年にわたって蓄積してきた遺伝学的解析や、タンパク質の生化学的分析といった地道な研究の積み重ねによる成果であることは疑いようが無い。にもかかわらず、こういった個々の知見を統合することで生きている細胞の振る舞いを説明するのが容易でないことも理解されつつある。その理由の一つは、細胞が多くの構成因子(タンパク質や DNA など)の量や質の変化によって常に変動する、複雑な社会のようなものだからであろう。本研究では、細胞が2つに分かれる過程を指揮する「細胞分裂周期」に着目し、これまでの知見を基に周期の動的変動を試験管内(*in vitro*)で1つ1つの部品を使って組み立てる(再構成する)ことをめざす。これによって生命の根源的な特徴である「増える」ためのメカニズムを理解し、細胞の操作という段階へと進むための基盤とすることが研究の目的である。

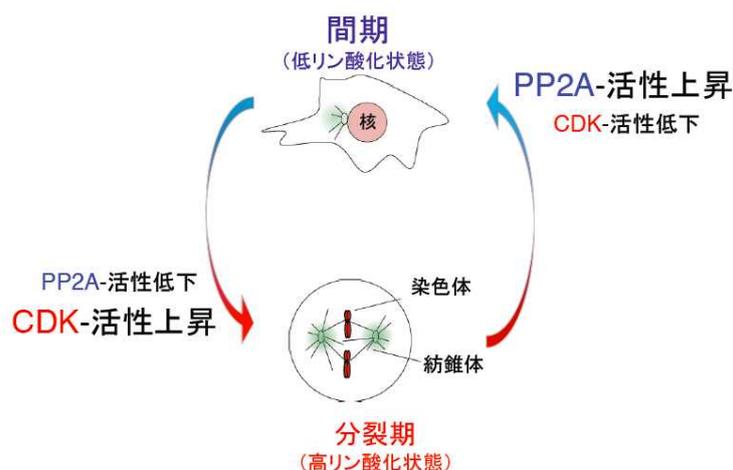


図1、細胞分裂周期は分裂期(下)と、その為の準備をする間期(上)からなる。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞分裂周期は主にタンパク質のリン酸化変動によって駆動されているため、リン酸化／脱リン酸化を触媒する酵素の個々のはたらきを理解し、さらにそれらの間にある制御因子による相互作用を加えることが細胞分裂周期の再構成につながると考えられる。細胞分裂を引き起こす為のリン酸化を触媒するサイクリン依存性キナーゼ(CDK)、分裂期以外における脱リン酸化を担っているIIA型脱リン酸化酵素(PP2A)、そして両者の間には互いに相手の活性に影響を及ぼす制御経路が知られている(図1)。研究を始めるにあたり、どのように細胞周期進行、すなわちCDK基質のリン酸化をモニターするか?という点から着手した。従来のリン酸化検出法(ラジオアイソトープやウェスタンブロット法)は、検出や定量に時間と手間がかかり、なおかつ検体数や時間分解能にも限界があることが難点であった。そこで近年、めざましい発展を遂げている発光タンパク質を用いて、リン酸化を光の強弱で検出するプローブ(リン酸化光プローブ)の開発を行った。その結果、CDKによってリン酸化されると光が約1.4倍に増強する発光タンパク質の開発に成功した(永井健治アドバイザーとの共同研究)。これにより、まず時間分解能が秒単位となった。さらに結果がリアルタイムに判明し、自動化したルミノメーターの使用により複数の実験条件を同時に試すことも可能となった。このプローブ開発の成功によって、細胞分裂周期の動的変動を観察するための最適なシステムができたと考えている。

(2) 詳細

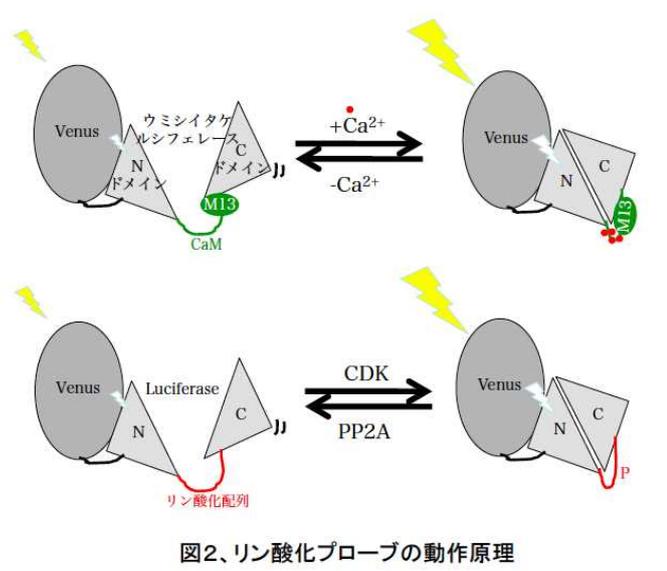
研究テーマ1 「脱リン酸化酵素の網羅的な解析」

細胞分裂周期において複数のリン酸化酵素が重要な役割を果たしていることが明らかになっており、増殖細胞を標的とした薬剤のターゲットとしても注目されている。一方で、脱リン酸化酵素の役割はいまだ未解明の部分が多いが、自然界では強力な毒素の幾つかが脱リン酸化酵素を標的としていることから、その潜在的な重要性は高い。そこで細胞分裂周期にはたらく脱リン酸化酵素を同定することを目指した。具体的にはカエルゲノム中に約40種類あるセリン/スレオニン脱リン酸化酵素のORFを全てクローニングし、組み替えタンパク質を作り、それを抗原としてウサギポリクローナル抗体を作成、さらに抗原タンパク質を用いて親和性精製までを終えた。カエルを対象とした理由は、その卵抽出液が現在のところ唯一、脱リン酸化酵素の生理的な活性測定が可能な実験系だからである。

研究テーマ2 「リン酸化光プローブの開発」

CDK基質のリン酸化を定量的、リアルタイム、高時間分解に検出するため、光プローブの開発を行った(図2)。開発の元となったのは[Saito et al., 2012, Nat. comm., 3, 1262-]で報告された発光タンパク質を基礎とするカルシウムセンサープローブである。このプローブの中で、カルシウムを感知する部位はウミシイタケルシフェレースを分断する位置に挿入されており、カルシウム結合により感知部位の立体構造が変化することによってルシフェレース活性に影響が及んだ結果、光の強度が増減するという原理である。本研究では、このカルシウム感知部位をCDKリン酸化配列で置換した。まず3種類のCDKリン酸化配列で試したところ、リン酸化

前後で 10%程度の光の増強が見られた。より大きな変化を得るために検討するリン酸化配列を5種類に増やすなどさらに改良を加え、より大きな光の増強が見られた。その中から脱リン酸化されるもの、抗体による検出が容易なものといった基準で1種類を選び、さらに実用性の解析を行った結果、このプローブは CDK と PP2A のバランス(反応平衡状態)を良く反映するものだということがあきらかになった。



3. 今後の展開

リン酸化プローブの開発は、細胞分裂周期の再構成系の構築過程を飛躍的に加速するだろう。残りの期間では、CDK、PP2A、及びその他の制御因子の精製タンパク質を用いて動的なリン酸化バランスの変動を解析し、カエル卵抽出液や細胞との比較を行う。再構成系と細胞の間に齟齬が見られる場合には、まだ未知の因子が細胞分裂周期にあるということであり、齟齬の発見自体が本研究の成果となるだろう。そのように徐々に細胞内現象に再構成系を近づけることで、新たな知見を増やしつつ細胞分裂周期の動作原理の解明と、細胞操作への道筋をつける。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者) プローブ開発には予想外に時間がかかったものの、永井アドバイザーの協力を得て、数段階の改良を経て発光の安定性等の問題を解決することができたことは重要な成果であった。これによりリン酸化の検出、定量が格段に簡便でリアルタイムになるため、再構成系構築が加速するだろう。さらにこのプローブは無細胞系(カエル卵抽出液)や細胞内においても機能すると考えられるため利用範囲も広く、研究開始前にはなかった新しい実験技法を得たという意味でも重要な進展である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

細胞分裂周期の動的変動を in vitro で1つ1つの部品を使って、再構成するために、さきがけ研究の前半で、これまでにない高性能なリン酸化光プローブの開発に成功したことは、今後の研究をつづける上で、大きな成果と評価します。

このプローブを駆使して、CDK、PP2A、及びその他の制御因子を用いて動的なリン酸化 balan

スの変動を解析し、カエル卵抽出液や細胞との比較から、多くの新しい知見が得られることを楽しみにしています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1.Satoru Mochida “Regulation of alpha-Endosulfine, an inhibitor of protein phosphatase 2A (PP2A), by multisite phosphorylation” **FEBS Journal** (2014) 281, 1159–1169.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1.Satoru Mochida “Regulation of alpha-Endosulfine, an inhibitor of PP2A-B55 by multisite phosphorylation” The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, 台湾, 2013年11月28-30日

受賞

1.平成24年度 日本プロテインホスファターゼ研究会賞

著作物(総説)

1.Satoru Mochida and Tim Hunt “Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis” *EMBO Report*, (2012) 13, 197–203.

2.持田 悟 “タンパク質リン酸化酵素と脱リン酸化酵素の係による細胞周期制御”
細胞工学 2013年2月号

3.Satoru Mochida “Aurora borealis wraps Plk1 and CDK together.”
Cell Cycle, (2014) 13, 1835.