

「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年度終了研究課題－

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. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 8件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「細胞機能の構成的な理解と制御」領域に設けた選考委員 20 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 先行方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 先行に当たっては、さきがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>) を重視した。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者 (該当ない場合は削除) 3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会 (書類選考会議) へ2課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			13件	内 訳	3年型	10件 (2件)
対象数	354件	30件			5年型	3件 (0件)

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1) 平成23年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・澤井 哲研究者、船山 典子研究者、持田 悟研究者

研究期間が5年で、今年度、終了しないため。今年度は中間評価を実施する (中間評価結果:

http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/midterm_h26hyouka.html)

・田端 和仁研究者、前多 裕介研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2年間延長することが決まったため。



5. 研究実施期間

平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月(3年型)

平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月(5年型、大挑戦)

6. 領域の活動状況

領域会議:6回

第1回領域会議平成24年2月7日(火)～ 8日(水)兵庫県淡路市淡路夢舞台 国際会議場

第2回領域会議平成24年10月2日(火)～4日(木)沖縄科学技術大学院大学(OIST)

第3回領域会議平成25年4月17日(水)～19日(金)理化学研究所、有馬グランドホテル

第4回領域会議平成25年11月17日(日)～19日(火)沖縄科学技術大学院大学(OIST)

第5回領域会議平成26年5月11日(日)～13日(火)静岡県伊豆市 IBM 天城ホームステッド

第6回領域会議平成27年2月2日(月)～3日(火)北海道虻田郡留寿都村 ルスツホテル

IBM 技術セミナー:1 回

平成26年5月11日(日)、13日(火)静岡県伊豆市 IBM 天城ホームステッド

新学術合同シンポジウム:1回

平成27年2月1日(日) 北海道虻田郡留寿都村 ルスツホテル

生命動態合同シンポジウム:1回

平成27年3月16日(月)～17日(火)京都大学稲盛ホール

その他、自主勉強会を年2回程度各地で実施。

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:(その他にも、個別用件で、技術参事は、別日、訪問)

(1)東工大サイトビジット H24/4/15

・瀧ノ上 正浩研究室

・石松 愛研究室

(2)京大サイトビジット H24/6/1

・船山 典子研究室

・前多 裕介研究室

・遠藤 求研究室

(3)九大サイトビジット H24/6/29

・末次 正幸研究室

(4)熊本大サイトビジット H24/6/29

・持田悟研究室

(5)東大サイトビジット H24/8/29,30

・田端 和仁研究室

・茅 元司研究室

・後藤 佑樹研究室

・澤井 哲研究室

・加納 ふみ研究室

(6)理研サイトビジット 同施設内

・猪股 秀彦研究室

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、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。

(事後評価の流れ)

平成 26 年 11 月

評価会開催

平成 27 年 1 月

研究総括による事後評価

平成 27 年 2 月

被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- 1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- 2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- 3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- 4) 「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

9. 評価結果

総論

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課題を推進する新しい試みの領域ですが、一期生、全体的に、当初の想定以上に、予想外の大きな進展が見られたというのが印象的です。外部発表では、論文数 28 件(国際 25 件、国内 3 件)、口頭発表 93 件(海外 20 件、国内 73 件)、その内、海外招待講演 6 件と、国際的にも積極的に活動した結果と思います。また、基礎研究に重点をおく当領域において、創薬やバイオ研究支援関連の特許出願件数9件(国内8件、国際1件)も、評価します。後藤 佑樹研究者や瀧ノ上 正浩研究者など各団体からの受賞も、高い評価の証と言えます。

この領域を運営している中で、特出すべきは、この領域での活発なコミュニケーションです。それぞれが、自らのフォーカスした技術、あるいは、日ごろから疑問を持っている事象であることからこそ、理解を深めることが出来たと言えるのですが、人と人とのつながりの中で、ブレイクスルーが、いろんなところで、起こっているところに、感銘を受けました。こういう新しい研究分野では、ジェネレーションとして、分野全体を伸ばしていく必要があります。一期生の皆さんの団結した牽引力の賜物と、評価しております。

いずれの研究課題も、領域にふさわしい成果を挙げられました。その内から1つ選ぶとすれば、末次 正幸研究者の「大腸菌ミニ染色体の複製サイクルの繰り返しの反応を、精製蛋白質によって再構成に成功」されたことを挙げます。この短い期間に、この領域の趣旨に合致したシンセティックバイオロジーの素晴らしい成果を達成されました。

1. 石松 愛 研究者「人工遺伝子回路を利用して発生現象に迫る」

さがけ期間中に、海外への移動というイベントがありながら、体節サイズは、PSM の「初期サイズ」に対してスケールリングする、「初期値依存性スケールリング」という事象を見出したことは、大きい成果と評価します。この事象をもとに、分子をスクリーニングして、その本体の物質が何かを突き止めていただきたい。

その同定した物質が、ゼブラフィッシュの体節形成にとどまらず、生物のパターン形成において、普遍的に見出される物質かどうかは、大変、興味深い研究対象になります。その過程での体節形成を説明する数理モデルについては、慎重に進めていただきたいと思います。

2. 猪股 秀彦 研究者「動物胚の頑強な相似性を保証する発生場スケールリングのシステム制御機序」

背腹軸形成に寄与する分泌タンパク質の計測系を in vivo で構築しました。定量胚サイズ依存的に Szl 濃度が変化し、さらに Chd の安定性を制御することにより、胚サイズに適した Chd 勾配が構築される「スケールリングモデル」を提唱し、そのスケールリングモデルが数理的・実験的に胚内で機能していることを検証した(Cell 誌発表)ことは、見事な研究の流れと評価します。

今後の展開でも書かれているように、さらに発展的に「発生場の変動・変形」も勾配形状に大きな影響を与えるはずであり、濃度勾配がどのように維持され、適切なパターンを構築しているのかを明らかにすることに、興味が向かいます。成長を伴う組織のスケールリングを含め、体のサイズと組織の比率は、臓器等の再生医療の進展に伴い、理解を深めておく必要があります。その意味でも、このさがけの成果は、高く評価されます。

3. 遠藤 求 研究者「構成的アプローチによる植物の生物時計の組織特異的な役割の解明」

これまで植物の概日時計は細胞自律的であると漠然と考えられてきており、組織特異的な生物時計の機能については、知られていませんでした。今回の研究で、植物組織の遺伝子発現をモニタリングする新規解析手法を開発し、時計遺伝子の発現を組織レベルで定量的に測定することに成功されて、実りある成果を次々に挙げられたことを、高く評価します。

維管束の体内時計は、フロリゲンと呼ばれる花成ホルモンの産生を通じて、個体全体の生理応答を制御していることを示され、植物の体内時計において維管束が非常に重要であることを、提唱されました。

また、維管束の体内時計機能を阻害すると遅咲き表現型を示すことを実証され、今後の育種の応用分野への展開も期待したいと思います。

4. 加納 ふみ 研究者「細胞内環境操作法による疾患モデル細胞の創成」

セミンタクト細胞リシール法を駆使し、分子ネットワークが攪乱された疾患モデル細胞プロトタイプとして、糖尿病肝臓あるいは膵・モデル細胞を構築しました。この成果は、その応用、特に、病態モデル細胞を用いた薬物スクリーニングを含め、高いポテンシャルを秘めています。タンパクの状態から構造を一細胞レベルで見えていく事により、さらに、多くの発展の余地があり、セミンタクト細胞を用いなければ、知り得なかったという事象を見出して、この技術のさらなる展開を期待しています。

5. 茅 元司 研究者「分子複合体と動物個体での機能を結ぶ1分子可視化計測」

ミオシン1分子とミオシン集合体の動態を同時に可視化する1分子計測を行うために、金コロイドの散乱像を獲得する光学系と光ピンセット光学系を組み合わせた精度の高い顕微鏡の開発に成功したことを高く評価します。

階層間の機能をつなぐシミュレーションモデルを駆使して、in vivoにおいて、ミオシン1分子の機能が、オシンフィラメント、サルコメア構造レベルといった高次の階層構造における収縮機能発現にどのように拡張されていくのか、統合的な理解に着実に結びつくことと楽しみにしております。そして、この領域の大きな命題でもある生物の階層構造の理解に貢献するものと思います。

6. 後藤 佑樹 研究者「無細胞合成生物学による人工二次代謝産物の発見と生産」

脱水ヘテロ環化酵素 PatD を用いたアゾリン骨格含有ペプチドの試験管内生合成系を確立して、ヘテロ環骨格含有ペプチドを簡便に合成する in vitro 人工生合成システムを創製しました。この人工生合成系を活用して、生合成酵素の基質認識メカニズムを解明する一方で、酵素の改変や有機化学反応との組み合わせにより、より幅広い種類のヘテロ環骨格含有ペプチドの生産ができることを実証しました。さらに、多様性(1兆種類)をもつランダム二次代謝産物ライブラリーを構築し、望みの標的タンパク質に結合する活性種を迅速にスクリーニングする試験管内分子進化系の確立にも成功しています。

創薬スクリーニングに欠かせない最新技術として、注目を集め、製薬業界から高い評価を得ています。生物と非生物の融合の分野で、このさきがけの短い期間中に多くの成果を挙げられました。そして、これらの成果は、PNAS 論文や特許出願(2件)で、公開し、形にしていることも高く評価します。

7. 末次 正幸 研究者「染色体複製系の周期的駆動にむけた回路の再構成」

大腸菌ミニ染色体の複製サイクルの繰り返しの反応を、精製蛋白質によって再構成を可能にしました。このさきがけ期間に、この領域の趣旨に合致した素晴らしいシンセティックバイオロジーの成果を達成されました。できれば、例えば、試験管の中で160kbのミニ染色体を作って、駆動させることで、一般の方々にも分かるようにすれば、大きな反響があると思います。

是非、アウトリーチの活動を含めて、活動の幅を広げていって頂き、もう一つ大きな世界へ突き抜けて欲しいと思います。

8. 瀧ノ上 正浩 研究者「非平衡人工細胞モデルの時空間ダイナミクス定量解析」

マイクロ流路を利用し、マイクロサイズのドロップレット(油中水滴)を人工細胞リアクターとする独自の構想から、水滴の融合分裂によって人工細胞に非平衡性を与えることに成功しました。また、融合分裂の頻度を制御することで、非平衡性を制御し、人工細胞内で、分子濃度振動を示す非線形化学反応を制御することに成功しました。

このような成果から、細胞レベルで生体の非平衡を制御することにより、生命のさまざまな現象、機能、形態などの研究に、貢献することが期待できます。このデバイスの普及や人工細胞モデルを用いた共同研究が広がることを楽しみに致しております

10. 評価者

研究総括 上田 泰己 東京大学 大学院医学系研究科・教授



領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 26 年 11 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 産業科学研究所・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2月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	5	23	28
口 頭	73	20	93
その他	13	2	15
合 計	91	45	136

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
8	1	9

(3)受賞等

- ・遠藤 求 研究者
 - 日本時間生物学会 ベストポスター賞(H25.9)
 - 内藤コンファレンス ポスター賞(H26.10)
- ・後藤 佑樹 研究者
 - 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H25.4)
 - 日本化学会 第 93 春季年会 優秀講演賞(学術)(H25.4)
 - 日本化学会 生体機能関連化学部会講演賞(H25.9)
 - Excellent Stone Award 4th Asia Pacific International Peptide Symposium)(H25.11)
 - 日本化学会 若い世代の特別講演賞(H26.3)
- ・瀧ノ上 正浩 研究者
 - 第 2 回「明日の象徴」研究者部門(H25.8)
 - 平成 25 年度「東工大挑戦的研究賞」学長特別賞(H25.8)
 - 第 18 回工学教育賞・業績部門(H26.8)

(4)招待講演

国際 6 件
国内 15 件

別紙

「細胞機能の構成的な理解と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年10月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
石松 愛 (兼任)	人工遺伝子回路を利用して発生現象に迫る (ハーバードメディカルスクール)	ハーバードメディカルスクール・ポ ストドクトラルフェロー (さきがけ専任研究者)	40
猪股 秀彦 (兼任)	動物胚の頑強な相似性を保証する発生場スケーリングのシステム制御機序 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 体軸動態研究チーム)	理化学研究所 発生・再生科学 総合研究センター・チームリーダー (理化学研究所 器官発生グループ 研究員)	45
遠藤 求 (兼任)	構成的アプローチによる植物の生物時計の組織特異的な役割の解明 (京都大学 大学院 生命科学研究科)	京都大学 大学院生命科学研究 科・助教 (同上)	40
加納 ふみ (兼任)	細胞内環境操作法による疾患モデル細胞の創成 (東京大学 大学院総合文化研究科)	東京大学 大学院総合文化研究 科・助教 (同上)	40
茅 元司 (兼任)	分子複合体と動物個体での機能を結ぶ1分子可視化計測 (東京大学 大学院理学系研究科)	東京大学 大学院理学系研究 科・助教 (同上)	40
後藤 佑樹 (兼任)	無細胞合成生物学による人工二次代謝産物の発見と生産 (東京大学 大学院理学系研究科)	東京大学 大学院理学系研究 科・助教 (同上)	40
末次 正幸 (兼任)	染色体複製系の周期的駆動にむけた回路の再構成 (立教大学理学部生命理学科)	立教大学 理学部生命理学科・ 准教授 (九州大学 大学院薬学研究院・助 教)	45
瀧ノ上 正浩 (兼任)	非平衡人工細胞モデルの時空間ダイナミクス定量解析 (東京工業大学大学院総合理工学研究科)	東京工業大学 大学院総合理工 学研究科・講師 (同上)	45

研究報告書

「人工遺伝子回路を利用して発生現象に迫る」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 石松 愛

1. 研究のねらい

生物の発生過程では、多くの細胞の協調により、さまざまな擾乱に対して安定なパターン形成が行われる。パターン形成に大きな影響を与えうる擾乱のひとつに、システムサイズの変化が考えられる。特に、発生場のような、限られた数の細胞からなる小さなスケールのシステムでは、その影響は無視できないものと考えられる。最近の研究により、個体間・種間でのサイズの違いに対して、アウトプットであるパターンがどのように保たれるか、というスケーリング問題に対していくつかのメカニズムが明らかになってきている。一方でシステムサイズは、個体間・種間の違いにとどまらず、発生や成長の進行、外的な要因など、さまざまな状況で変化する。さまざまなタイプのシステムサイズの変化に対し、システムは常に同様のアウトプットを示すのか、またその安定性はどのように補償されるのか、といった問いは重要でありながら解明が進んでいなかった。

本研究では、ゼブラフィッシュの体節形成をモデルケースに、システムサイズの変化とそのアウトプットについて、イメージング・擾乱実験・数理モデルを組み合わせることで明らかにしようとした。体節は、背骨などのもとになる、繰り返し構造をもつ組織であり、PSM という未分節の組織が、一定時間おきに一定サイズでくびれきれることで形成される。この時空間的な周期性は、PSM 内で働く時計遺伝子が示す時空間構造によって規定されることが知られている。PSM サイズが個体差・発生の進行によって変化するとき、時計遺伝子の時空間構造や体節サイズはどのような応答を示すのか、またそのメカニズムはどのようなものなのかについて、「初期サイズに対するスケーリング」に着目した研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

生物のパターン形成において、システムサイズとそのアウトプットの関係は重要な問題でありながらあまり研究が進んでいなかった。本研究では、イメージング・胚操作において利点の多いゼブラフィッシュをモデル生物に選び、背骨などの繰り返し構造のもととなる体節の形成過程に着目した。さまざまな要因で体節原基(PSM)サイズが変化した場合の、体節およびその形成を司る生物時計の時空間パターンの応答を調べた。

自然界における PSM のサイズ変化の要因としては、個体差や発生の進行などが考えられる。そこで、これらの要因によって PSM サイズが変化した場合の体節サイズの変化を調べたところ、PSM サイズ変化の要因によって異なる結果を得た。すなわち、個体差による PSM サイズ変化に対して体節サイズは PSM/体節サイズの比率を保って変化する(スケーリング)のに対し、発生の進行に伴う PSM サイズ変化に対して体節サイズはスケーリングせずほぼ一定に

保たれたのである。さらに、体節形成過程の途中で、人為的に PSM サイズを縮小させても、体節サイズは変化しないという実験結果も得た。以上から、体節サイズは、PSM の「初期サイズ」に対してスケーリングする、ということが明らかになった。

次に、体節の初期サイズに対するスケーリングを説明するロジックを考察するため、体節形成を説明する新たな数理モデルを考案した。このモデルでは、振動数および結合強度の異なる 3 種類の振動子集団からなるシステムを考える。このモデルは、振動子集団間の境界の効果により、特殊な前提を置くことなく、PSM サイズに対する体節サイズのスケーリングが自然に説明できる。また、体節形成に伴う集団間の境界位置の変化を考慮に入れることで、スケーリングが初期サイズのみに依存しておこるという現象を説明できることがわかった。

本研究では、システムサイズとそのアウトプットの関係として、「初期サイズに対するスケーリング」という新しい現象を発見した。これは、体節形成にとどまらず、生物のパターン形成において普遍的に見出される可能性のある現象である。

(2) 詳細

個体差および発生 の 進行に伴う PSM サイズの変化に対して、体節サイズがどのように変化するかを調べた。まず、個体差による PSM サイズ変化の効果を調べるため、人為的に胚サイズを縮小させる技術を開発した。また、体節・PSM サイズを正確に定量するため、18 個体を同時に制御温度下でタイムラプスイメージングできる、ハイスループットライブイメージング装置を確立した。このイメージング装置を用いて、対照胚および縮小胚をタイムラプスイメージングし(図 1a)、その PSM サイズと体節サイズの定量を行った(図 1b)。その結果、個体間で PSM サイズが異なる場合には、体節サイズは PSM サイズにスケーリングすることが明らかになった。

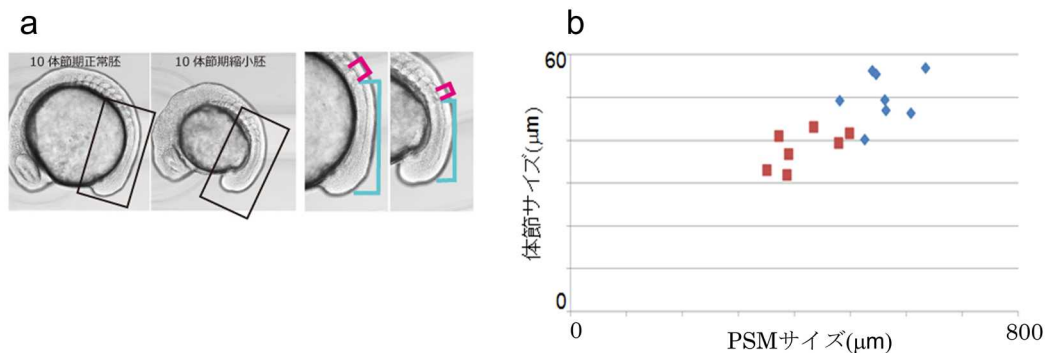


図 1. サイズ縮小胚作成技術と個体間での体節スケーリング。a. 対照胚と縮小胚の PSM (青枠) と体節 (赤枠)。b. 対照胚 (青) と縮小胚 (赤) における PSM と体節サイズの定量。

同様の計測手法を用いて発生段階を追った計測も行い、この場合には、PSM サイズが変化するにもかかわらず体節サイズはほとんど変化しないことを見出した。さらに、実験的に PSM サイズを変えた場合にも、体節サイズは変化しなかった。以上から、体節サイズは、PSM の「初期サイズ」に対してスケーリングする、ということが明らかになった。

初期サイズに対するスケーリングは、これまでに報告のない現象であり、モデリングもチャレンジングなものであるが、結合振動システムに動的な境界を考慮することで、大部分が説明できることが明らかになりつつある。

3. 今後の展開

本研究によって、スケーリングに関する新たな知見を得た。今後は、数理モデルと実験の緻密なフィードバックによる、メカニズムの解明を第一に行う。また、発生におけるパターン形成にとって、初期サイズスケーリングは安定性という観点からのメリットが大きく、他の組織でもおこっている可能性が高い。さまざまな組織におけるスケーリングのパターンを網羅的に記載し、その背後に潜む普遍性を見出したい。また、メカニズムを探る際に必須となる、合成生物学的アプローチに関しても、今後取り組む所存である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

体節におけるシステムサイズの問題について、初期値依存性スケーリングという、当初の期待以上の発見をすることができた点は高く評価したい。一方で、ゼブラフィッシュを使った合成生物学はこれからの課題である。研究の進め方については、研究場所の海外への異動という選択により、研究が飛躍的に進んだ。異動にかかった費用を鑑みても価値のある異動であった。

ゼブラフィッシュという高等多細胞生物を用いて、イメージングをハイスループットかつ定量的に行う研究は現在でも数少ない。本研究の発展の先には、細胞抽出液や培養細胞では行えないような、空間多次元データに基づく遺伝子・薬剤スクリーニング技術といった技術革新を見据えている。また、基礎科学の面でも、発生学のもっとも本質的な問題である「サイズと形」に新たな視点で切り込めたのは意義深く、今後もそのバリエーション・普遍性を探求したい。

(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)

さがけ期間中に、海外への移動というイベントがありながら、体節サイズは、PSMの「初期サイズ」に対してスケーリングする、「初期値依存性スケーリング」という事象を見出したことは、大きい成果と評価します。この事象をもとに、分子をスクリーニングして、その本体の物質が何かを突き止めていただきたい。

その同定した物質が、ゼブラフィッシュの体節形成にとどまらず、生物のパターン形成において、普遍的に見出される物質かどうかは、大変、興味深い研究対象になります。その過程での体節形成を説明する数理モデルについては、慎重に進めていただきたいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. 現在、執筆中。

(2)特許出願

特になし

(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)

研究報告書

「動物胚の頑強な相似性を保証する発生場スケーリングのシステム制御機序」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 猪股 秀彦

1. 研究のねらい

一つの受精卵から再現性よく個体を形づくるには、多くの複雑なイベントが適切に進行する必要がある。特に、様々な組織・器官の形成（パターン形成）はモルフォゲンの濃度勾配が中心的な役割を果たしている。胚の局所から産生・分泌されたモルフォゲンは濃度に応じて異なる組織を誘導し胚に位置情報を与える。したがって、発生過程において濃度勾配は適切な形状に制御される必要がある。

濃度勾配の形状は主に産生・拡散・分解の3要素によって制御されている。拡散速度が大きいとモルフォゲンは迅速に拡散し緩勾配を形成する。逆に分解速度が大きくなると、遠方に拡散する前に分解され急勾配を形成する。したがって、3要素を変動させることにより様々な形状の勾配を作り出すことができる。一方、3要素以外に勾配形状に大きな影響を与える要素が「胚サイズ」である。産生・拡散・分解の速度が一定であっても、胚サイズが小さければモルフォゲンは胚内に素早く広がり充満してしまう。一方、胚サイズが大きければモルフォゲンはなかなか広がらず、胚の局所に濃度勾配が形成されてしまう。したがって、再現性の高い発生過程を維持するには進化的に胚の大きさは厳密に制御されているはずである。

しかし、多くの生物は厳密に胚サイズを制御するのではなく、他の戦略を採用している可能性が高い。たとえば、アフリカツメガエルの卵サイズは直径が 1mm～1.5mm の範囲で揺らいでいる。さらに、Cooke は 1975 年に非常に奇妙な現象を見いだしている。発生初期に外科的に背側と腹側で胚を半割にすると、背側半割胚から半分のサイズの相似形を維持したオタマジャクシが誕生した。このように胚全体のサイズに応じて局所組織（目、口など）が拡大・縮小する現象を「スケーリング」という。つまり、スケーリングは胚サイズの擾乱に対する頑強性を発生システムに付与していると考えられる。

スケーリングはアフリカツメガエルだけでなく、ホヤ、ショウジョウバエなど他の多くの生物にも普遍的に観察される現象である。しかし、発生システムのスケーリング維持機構は長い間謎であった。本課題では胚サイズがどのようにして分子レベルの情報に変換され、さらにどのような機構がスケーリングを保証しているのか解析を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

アフリカツメガエルの背腹軸形成はオーガナイザーから分泌される Chd (Chordin: コーディン) の濃度勾配にしたがって背側-側方-腹側の3つの異なる領域が形成される。本課題では、胚サイズと Chd の濃度勾配に注目して研究を行った。発生システムがスケーリングを保証するためには、胚のサイズに応じて Chd 勾配の形状が適切に制御される必要がある。3つ

の領域を規定する Chd の閾値が一定であると仮定すると、Chd 勾配は大きな胚では緩勾配を、小さな胚では急勾配を形成する必要がある。

濃度勾配の形状は主に産生・拡散・分解の3要素によって制御されている。拡散速度が大きくなると緩勾配を形成し、分解速度が大きくなると急勾配を形成する。したがって、これら3つの要素を変化させることにより様々な形状の勾配を作り出すことができる。発生過程においては胚サイズ依存的にこれら3つの要素が制御され、適切な傾きの Chd 勾配が構築されていると考えられる。しかし、これら3つの要素は発生過程において常に変動しており、解析することは非常に困難である。そこで、Chd の産生量に変動せずに一定な「背腹軸再構築系」の開発を行った。この系を用いることにより、Chd の産生量を人工的に制御することが可能となる。その結果、産生量を変動させても適切な背腹軸が構築されることから、分解または拡散が Chd 勾配の形状を主に規定していることが示唆された。さらに Chd の拡散・分解速度を定量したところ、Chd の拡散速度は早く積極的な制御を受けていないこと、また分解速度が早く 30 分以内に半量の Chd 蛋白質が分解されることが示された。このことから、Chd の勾配形状は主に Chd 分解酵素による分解の影響が大きいことが明らかとなった。

Chd 分解酵素には Szl(Sizzled:シズルド)と呼ばれる阻害因子が存在し、分解速度を制御していることが知られている。より詳細な解析から、胚サイズが大きい場合には Szl の濃度が高くなり、逆に胚サイズが小さい場合には Szl 濃度が低下することが示された。以上の結果をふまえて、胚サイズ依存的に Szl 濃度が変化し、さらに Chd の安定性を制御することにより、胚サイズに適した Chd 勾配が構築される「スケーリングモデル」を提唱した。さらに、スケーリングモデルが数理的・実験的に胚内で機能していることを検証し、Cell 誌に報告した。

(2) 詳細

【背腹軸再構築系の開発】

Chd 勾配を胚サイズにスケーリングするには、勾配形状を規定する産生・拡散・分解が重要な要素となる。しかし、これら3要素は発生過程において動的に変動しており解析が困難である。そこで、Chd の産生量が BMP 活性、胚サイズに影響されことなく一定量である発生場を人工的に再構成した。具体的には、2細胞期に胚内の内在性濃度勾配を取り除くために β カテニンの MO(モルフォリノアンチセンスオリゴ:mRNA に直接結合して翻訳を阻害する)をインジェクションし、Chd 産生領域であるオーガナイザーを消失させた(図 1a)。さらに、Chd-MO も同時にインジェクションすることにより Chd の産生も阻害した。その後、8細胞期の1割球に MO 耐性型(MO が結合する領域にサイレント変異を導入したもの)の Chd mRNA をインジェクションし、胚の局所で Chd を発現させることにより胚内に人工的に Chd 勾配を再構成した。In situ 法を用いて再構成した胚を解析したところ、野生胚と同様に Chd の濃度勾配にしたがって背側-側方-腹側の3領域が適切に再構成されることを確認した(図 1b)。さらに、インジェクションする Chd mRNA 量を適切な量から4倍増強させても、背側-側方-腹側の3領域が形成された。このことから、Chd の勾配形状は主に拡散または分解によって制御されている可能性が示された。

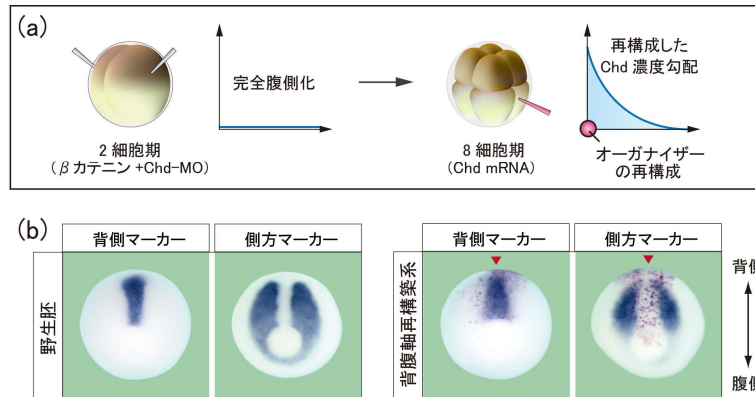


図1 背腹軸の再構築系
(a) 背腹軸再構築系の実験手法。(b) 再構成された勾配に応じて野生胚と同様の背腹パターンを形成する。赤色にラベルされた領域は人工的にオーガナイザーを再構成した部位を示す。

【In vivo における拡散速度、分解速度の定量】

分泌蛋白質の拡散速度および分解速度の定量を in vivo で解析した。拡散速度に関しては FRAP 法(光褪色後蛍光回復法)により解析を行った。Tgf β のシグナルペプチドを付加させた EGFP(分泌型 EGFP)を作成し、その下流に背腹軸形成に関与する様々な分泌蛋白質を付加させ拡散速度を定量した。その結果、Chd、Szl は分泌型 EGFP と同様に速い拡散速度を示し、細胞外マトリックスと結合せずに迅速に胚内に拡散することが明らかとなった。

一方、in vivo における分解速度の定量には新しい手法の開発を行った。HEK293 細胞に強制的に発現させた分泌蛋白質を培養上清から His タグを用いて精製し、等量の精製蛋白質を細胞外領域に相当する胞胚期の胞胚腔にインジェクションした。その後、一定時間培養し胚を溶解した後に C 末端または N 末端抗体を用いて免疫沈降し、反対側の抗体で WB により蛋白質を検出した。これにより、分解されていない全長の蛋白質のみを検出することができる。その結果、Szl 蛋白質は胚内で安定であるが、Chd 蛋白質は 30 分以内に半量が分解されることが明らかとなった。また、Szl により Chd の分解は完全に抑制できることから、Chd の勾配形状は Chd 分解酵素とその阻害因子である Szl により主に制御されていることが示された。

【定量データからスケーリングモデルの構築】

上述した定量結果を用いて新たなスケーリングモデルの構築を行った。Szl の発現は腹側化因子である BMP によって誘導されることが知られている。また、Chd は BMP に直接結合してその活性を抑制する。したがって、Szl は Chd 分解酵素を抑制し Chd がより遠方まで拡散するが、拡散した Chd は Szl 発現領域を抑制する。また、定量結果から Szl は Chd に比べて安定であり、発生過程において胚内に蓄積すると考えられる。

半割を行う発生初期は腹側のみであり、胚全体に Szl が発現している。原腸胚初期になるとオーガナイザーが形成され、背腹パターンの形成が始まる。しかし、野生胚も半割胚もいずれも同じ大きさのオーガナイザーを有するため、半割胚は相対的に背側領域(オーガナイザー)が大きな胚となる。オーガナイザーから分泌された Chd は、野生胚では胚空間が大きいいため Szl を抑制するまでに多くの時間を要する(図 2)。一方、半割胚においては胚サイズが小さいため Chd は迅速に反対側まで拡散し、Szl の発現を短時間で効果的に抑制する。したがって、半割胚は野生胚と比較して Szl 蛋白質の蓄積量が少なく Chd は不安定化する。不安定化した Chd は野生胚に比べてより急勾配を形成し、胚サイズに適した勾配を構築することによってス

ケーリングが保証される。

さらに、上記のスケーリングモデルと定量結果をもとに、反応拡散方程式を用いて数理モデルを構築し、シミュレーション解析を行った(柴田達夫博士との共同研究)。その結果、数理モデルにおいても Szl がスケーリングの要として機能することが示された。また、数理モデルから腹側領域をより大きく切除するとスケーリングが崩壊することが予測されたが、実際に腹側領域を 3/4 切除するとスケーリングは崩壊し背側のみの胚となった。

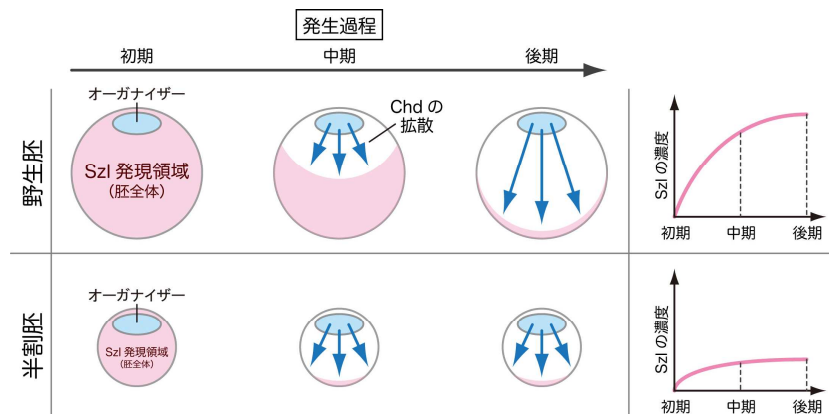


図2 胚サイズに応じて Szl の濃度が変化する
野生胚に比べ半割胚は Chd が迅速に胚全体に拡散し、Szl を抑制するため Szl の蓄積量が減少する。

【スケーリングモデルの検証】

上記で得られたスケーリングモデルが実際に胚内において機能しているか検証を行った。スケーリングモデルでは胚サイズに応じて Chd の安定性が変化し適切な勾配形状をつくると考えている(図 3a)。しかし、Chd の発現量は発生過程において変化するため、Chd の安定性を評価することは困難である。そこで、BMP、胚サイズに影響されことなく Chd の産生量が一定な背腹軸再構築系を用いて解析を行った。背腹軸再構築系を用いて再構成した胚の一部を半割にし、全長胚と半割胚で Chd 蛋白量を比較したところ、Chd の産生量は一定にもかかわらず半割胚において全長の Chd 蛋白量が有意に減少していた(図 3b)。さらに、SzI-MO により Szl の機能を阻害すると全長胚と半割胚の Chd 蛋白量の差は観察されなくなった。このことから、胚サイズは Szl を介して Chd の安定性に変換されることが示され、スケーリングモデルが実際に胚内において機能していることが明らかとなった。

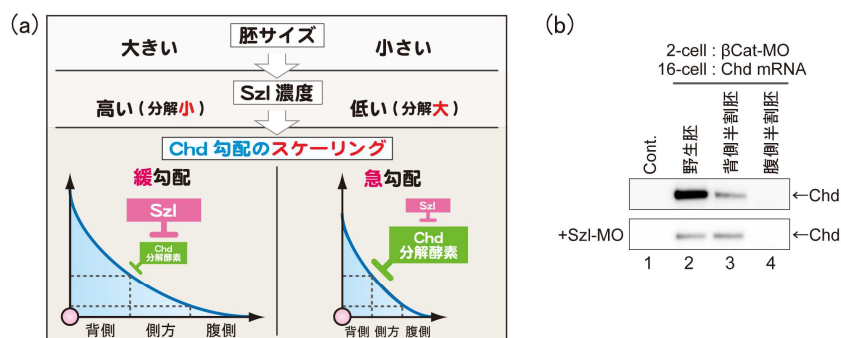


図3 スケーリングモデルと検証実験

- (a) スケーリングモデル、胚のサイズに応じて Szl の蓄積量が変化し Chd の安定性を制御することにより、胚サイズに適した勾配を形成する。
(b) 背腹軸再構築系を用いた検証実験、野生胚に比べ背側半割胚では Chd の蛋白量が減少する。また、この現象は SzI-MO により抑制される。

3. 今後の展開

本課題により、胚サイズ依存的に濃度勾配がスケーリングされる機構が明らかとなった。しかし、実際の発生過程は発生場が動的に変動・変形しており静的な場ではない。今までの発生学は静的な発生場として濃度勾配のパターン形成を記述してきたが、「胚サイズ」が濃度勾配の形状に重要であるように、「発生場の変動・変形」も勾配形状に大きな影響を与えるはずである。このような動的な発生場において濃度勾配がどのように維持され、適切なパターンを構築しているのか明らかにする必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本課題の目的であるスケーリングの分子機構を明らかにした論文を発表した。一方、濃度勾配を胚内で直接可視化し、発生過程における勾配形状の動的な変化を検出することはできなかった。その主たる原因として、アフリカツメガエルの透明度の低さがある。最終年度では新たに胚が透明なゼブラフィッシュの系の立ち上げを行い、濃度勾配の可視化を試みている。また、本研究課題の仕事により、新たに理研 CDB のチームリーダーとして新規のラボを立ち上げることができた。

本研究結果は、複数の新聞・ネットなどで取り上げられ、一般の方々にも「スケーリング」という発生システムがもつ巧妙さを配信することができた。「スケーリング」は多くの生物が共通にもつ普遍的な機構であり、その分子メカニズムが明らかとなれば多くの現象に応用可能であると考えられる。近年、ES 細胞を用いた再生医療が注目を集めているが、移植される組織は患者さんのサイズに適した大きさである必要がある。成長を伴う組織のスケーリング(相対成長)を含め、体のサイズと組織の比率は医療分野においても重要な課題である。

(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)

背腹軸形成に寄与する分泌タンパク質の計測系をin vivoで構築しました。定量胚サイズ依存的にSzl濃度が変化し、さらにChdの安定性を制御することにより、胚サイズに適したChd勾配が構築される「スケーリングモデル」を提唱し、そのスケーリングモデルが数理的・実験的に胚内で機能していることを検証した(Cell誌発表)ことは、見事な研究の流れと評価します。

今後の展開でも書かれているように、さらに発展的に「発生場の変動・変形」も勾配形状に大きな影響を与えるはずであり、濃度勾配がどのように維持され、適切なパターンを構築しているのかを明らかにすることに、興味が向かいます。成長を伴う組織のスケーリングを含め、体のサイズと組織の比率は、臓器等の再生医療の進展に伴い、理解を深めておく必要があります。その意味でも、このさきがけの成果は、高く評価されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, Sasai Y. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning by Embryo Size-Dependent Degradation of Spemann's Organizer Signals. **Cell** (2013). 153. 1296-1311.

(2)特許出願

特になし

(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)

1. 猪股秀彦、柴田達夫. サイズの発生学 -濃度勾配のスケーリング-(解説). 生物物理 (2014). 54. 140-146.
2. 猪股秀彦. 動物胚の相似性維持. 生体の科学 (2014). 65. 424-425.
3. 読売新聞. (2013.6.8) 夕刊
4. Inomata H, Shibata T, Sasai Y. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning by Embryo Size-Dependent Degradation of Chordin. JSMB/SMB (Japanese Society for Mathematical Biology and the Society for Mathematical Biology). (2014).
5. Inomata H, Shibata T, Sasai Y. Scaling of Dorsal-Ventral Patterning by Embryo Size. 第 37 回日本分子生物学会. (2014).
6. Inomata H, Shibata T, Haraguchi T, Sasai Y. Long-Range Regulation of Chordin Degradation via Sizzled Accumulation Directs Robust Self-Shaping of Embryonic Dorsal-Ventral Pattern. 14th International Xenopus Conference. (2012)

研究報告書

「構成的アプローチによる植物の生物時計の組織特異的な役割の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 26 年 12 月

研究者: 遠藤 求

1. 研究のねらい

20 世紀後半、生体の生理現象は分子レベルにまで解体され、後には膨大な分子生物学的な知見が蓄積された。これからの生物学は、得られた知見を統合・再生していくことが重要となる。細胞/分子レベルで明らかになりつつある知見をもとに上位の器官/組織レベルで生体を理解するためには、それぞれの組織の機能特異性(不均一性)を明らかにしたうえでモデルを構築する必要がある。

これまで植物の概日時計は細胞自律的であると漠然と考えられてきており、組織特異的な生物時計の機能についてはほとんど考えてこられなかった。しかし、

① 花成などの実現には、個々の細胞が持つ概日リズムを個体レベルで統合する必要があること、

② ヒト・マウス・ハエなどでは、脳にある強大な生物時計の中枢(主要時計)と末梢臓器にある弱い時計(末梢時計)という形で生物時計機能の組織特異性が知られていること、

③ 少なくとも植物の地上部と根では概日時計の挙動が異なっていること、

④ ある分子の発現パターンとその分子の機能が必要な器官/組織は必ずしも一致せず、こうした例は決して珍しいものではないこと、

などから、植物においても生物時計機能に器官/組織特異性が存在することが強く予想される。

動物の主要時計は、外科的な手術により中枢を切除・移植するといった実験によって発見された。しかし、植物は脳に対応する明確な中枢を持たず、特定の組織を外科的な方法で取り除くことが困難である。また、周囲の影響から切り離された培養細胞系などでは、組織/細胞間の相互作用は失われ、生命現象を生体内のコンテキストで解析することは困難である。しかし、生体内の特定の組織における分子動態を高い時空間分解能で測定することは難しく、平均化された細胞群や生体から切り離された培養細胞系を用いての解析が主流となっている。本研究では、高い時空間分解能で植物の組織/細胞内での分子動態を定量する方法を開発することで、植物における概日時計の組織特異的な役割を明らかにすることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、植物組織の遺伝子発現をモニタリングする新規解析手法を開発し、時計遺伝子の発現を組織レベルで定量的に測定することに成功しました。

動物では、脳に存在する体内時計とその他の臓器に存在する体内時計の機能が異なることが知られていました。植物でも、動物のような体内時計の機能分担が組織レベルで存在

する可能性は指摘されていましたが、組織単離に時間がかかるため、時々刻々と発現量が変わる体内時計に関わる時計遺伝子の発現を、定量的・経時的に測定することは困難でした。

本研究では、各組織での時計遺伝子の発現を迅速に測定するために、組織単離時間を従来法の1/3以下に短縮しました。また、時計遺伝子の発現を非侵襲で測定できる「TSLA法」を世界で初めて開発し、維管束に存在する時計遺伝子の性質が他の組織と大きく異なり、隣接する葉肉組織の時計遺伝子の発現に影響を与えていることを明らかにしました。さらに、維管束の時計機能を阻害するだけで、植物の花の咲くタイミングを遅らせることに成功しました。

(2) 詳細

研究テーマ A「大規模な遺伝子発現解析による組織特異的な発現制御メカニズムの解明」

本研究では、まず、これまで組織レベルでの体内時計の解析を難しいものにしてきた組織単離法の改良に取り組みました。これまでは目的組織でだけGFPを発現させた植物からプロトプラストを作成し、それをフローサイトメーターで単離していたため、組織の単離に約1時間30分～4時間30分ほどかかっていました。そのため、操作中に時計遺伝子の発現量が変わってしまい、体内時計を定量的に測定することは困難でした。今回、超音波処理と酵素処理を組み合わせることで、シロイヌナズナからの組織単離にかかる時間を30分以内に短縮することに成功しました。これにより、単離操作中の遺伝子発現量の変化をほとんど気にする必要がなくなり、初めて定量的に各組織の体内時計を解析することが可能になりました。

この方法を用いて、シロイヌナズナの葉全体、葉肉組織と維管束組織の、時計遺伝子の発現を定量的に測定したところ、発現量や発現リズム、標的遺伝子などが、葉全体と葉肉の発現様式はよく似ているのに対し、維管束はそのどちらとも大きく異なっていることがわかりました。こうしたことから、植物でも動物と同様に体内時計システムは組織ごとに異なっていることが考えられました。

さらに、こうした維管束の体内時計はフロリゲンと呼ばれる花成ホルモンの産生を通じて、個体全体の生理応答を制御していることも示され、植物の体内時計において維管束が非常に重要であることが示されました。

研究テーマ B「さまざまな組織で生物時計機能を阻害した形質転換植物の解析」

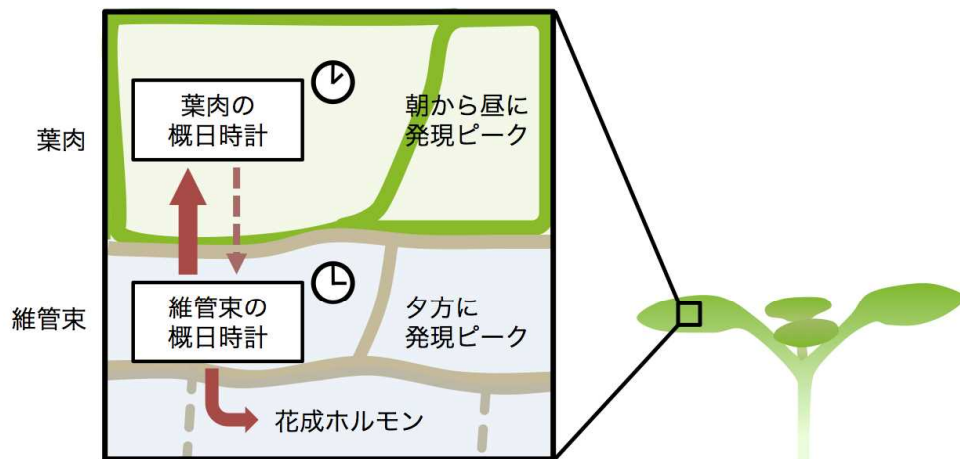
さらに、維管束で時計の働きを阻害すると葉肉の体内時計の働きも阻害される一方で、葉肉の時計の働きを阻害しても維管束の時計の働きには影響がないこともわかりました。こうした時計制御の非対称性は動物でも見られており、植物の体内時計システムは動物と同様に階層構造を持っていることも明らかになりました。

研究テーマ C「Tissue-specific luciferase assay (TSLA) 法の開発」

このことを別のアプローチから確認するために、組織レベルでの遺伝子発現を非侵襲で測定するための新しい方法としてTissue-specific luciferase assay (TSLA) 法を世界で初めて開発しました。従来法では、全ての組織で発光リズムが見られるため、特定の組織における発光量を定量することは困難でしたが、この方法では、ルシフェラーゼという酵素の遺伝子を2

つに分け、組織特異的プロモーターおよび時計プロモーターによって発現させ、2つの発現が重なる時間・空間のみでルシフェラーゼを再構成させることで、特定の組織における時計遺伝子の発現を発光リズムとしてとらえることができます。TSLA法を用いた解析から、同じ時計遺伝子でも維管束と葉全体では異なる遺伝子発現リズムが見られることから、葉肉と維管束の時計システムが異なっていることが支持されました。

研究成果のまとめ



今回、維管束の概日時計は葉肉の概日時計を強く制御している一方で、葉肉の概日時計は維管束の概日時計をそれほど強くは制御できないことが示された。これは植物の概日時計の機能に組織を単位とする階層性があることを示唆している。さらに、維管束の概日時計は花成ホルモンの産生を通じて個体レベルの生理応答も制御していることも明らかになった。

3. 今後の展開

概日時計は多くの遺伝子発現の制御に関わっていますので、花成や細胞伸長など体内時計によって制御されている生理応答の解析も、組織レベルで行っていく必要があることがわかりました。本研究で開発した手法を用いることで、こうした組織レベルでの解析が大きく進むことが期待されます。

また、維管束の時計機能を阻害するだけで植物の花の咲くタイミングを遅らせることができたことから、体内時計は植物の生長調節法開発の新たなターゲットになる可能性が期待されます。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究成果という点では自分の予想以上の成果を残せたと思っている。将来の研究シーズンも多く得ることができ、こうした点については満足している。しかし、植物や概日時計関連の研究

者が少なかったこと、研究手法に関しても共通点が少なかったことから、領域内での共同研究の推進という点では課題が残った。ただ、この点に関しても、将来的には利用したい技術の存在をすることができ、人的ネットワークも生まれていることから、今後の資産になっていくと考えている。

社会・経済への波及効果に関しては未知数だが、植物研究において新たな物の見方を提案できたと考えており、今後、細胞／組織レベルでの解析が活発化していくと感じており、これまで見過ごされていた新たな発見が私の研究分野以外についても見つかると考えている。

(2) 研究総括評価

これまで植物の概日時計は細胞自律的であると漠然と考えられてきており、組織特異的な生物時計の機能については、知られていませんでした。今回の研究で、植物組織の遺伝子発現をモニタリングする新規解析手法を開発し、時計遺伝子の発現を組織レベルで定量的に測定することに成功されて、実りある成果を次々に挙げられたことを、高く評価します。

維管束の体内時計は、フロリゲンと呼ばれる花成ホルモンの産生を通じて、個体全体の生理応答を制御していることを示され、植物の体内時計において維管束が非常に重要であることを、提唱されました。また、維管束の体内時計機能を阻害すると遅咲き表現型を示すことを実証され、今後の育種の応用分野への展開も期待したいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Endo M, Shimizu H, Nohales AM, Araki T, Kay SA. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature*. (2014), 515, 419-422.

(2) 特許出願

特になし

(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

第 20 回 日本時間生物学会、ベストポスター賞受賞

第 38 回 内藤コンファレンス、ベストポスター賞受賞

プレスリリースなど

[紹介記事] Leaf veins share the time of day

Martí, M. C. & Webb, A. A. 2014 *Nature News & Views* 515 巻, 7527 号, 352-353

「シロイヌナズナは組織特異的な時計を持つ」

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9444>

「植物で組織ごとに違う体内時計を発見」

http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/10/20141030_02.html

研 究 報 告 書

「細胞内環境操作法による疾患モデル細胞の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 加納 ふみ

1. 研究のねらい

本研究では、細胞型試験管セミインタクト細胞およびそのリシール技術を駆使して、以下の3つのねらいを持った細胞内生命現象の定量的可視化再構成系の構築を目指す。

1. 細胞内構造が保たれた環境で、生命現象を再構成する: 細胞の中の生体分子は、オルガネラや細胞骨格がつくりだす構造の中で、様々な分子と相互作用しながら、その機能を発揮している。そこで、細胞の中の構造を保ち、生体分子の作用環境が最適化された状態で、生命現象を再構成し、細胞内のオルガネラ・細胞骨格系が作るコンフィギュレーションに依存した生命現象に必要な因子を特定・検証できるようにする。

2. 攪乱された分子ネットワークの中で生命現象を再構成する: 細胞の中の分子群が織りなすネットワークは、成長因子やストレスといった外部からの刺激や、細胞周期や概日時計といった内部からの要請に応答して、変化する。細胞内の分子ネットワークが様々な要因により攪乱され続け、常態のネットワークと異なる平衡状態となったとき、それが病態発現時の細胞内環境に移行したと言える。そこで、攪乱された分子ネットワークを再現し、その中での生体分子のふるまいを検証できる再構成系を確立し、その攪乱に関わる因子の探索・検定が可能な細胞アッセイ系を作る。

3. 細胞内で生起する生命現象を「形態」を指標に定量的に再構成する: 細胞内の「形態」に関わる生命現象—生体分子の局在化や輸送、オルガネラや細胞骨格のダイナミクスなど—は、今まで基本コンポーネントや構造タンパク質の同定を中心に進められ、他の事象から切り離されて研究されることが多かった。しかし、細胞の生体分子はネットワークの中に組み込まれているという視点から考えると、細胞内の状態変動が「形態」の変化に反映されることは容易に想像できる。また、むしろ逆に、「形態」を見ることで、細胞内の状態を推測できる可能性がある。そこで様々な再構成された生命現象を、「形態」変化を指標に定量性を持って解析する一般的手法を構築し、「形態」変化から細胞の状態を判断する系を構築する。

以上の観点から本研究では、攪乱された細胞内分子ネットワークを持つ細胞系のプロトタイプとして、病態が再現された「疾患モデル細胞」を構築する。細胞レベルで再現された疾患状態に対して生化学的・細胞生物学的・網羅的解析を実施し、形態—分子を結ぶ病態研究のための新規ツール・コンセプトを提案する。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞膜可逆的穿孔法であるセミインタクト細胞リシール法を駆使し、分子ネットワークが攪乱

された疾患モデル細胞プロトタイプとして、糖尿病肝臓あるいは膵βモデル細胞を構築した。これらの細胞では疾患を反映した細胞内生命現象（インスリン抵抗性やインスリン分泌不全など）が起こり、糖尿病組織で生起する病態を細胞レベルで再現できた。また、糖尿病態で攪乱されたシグナル伝達や細胞内オルガネラ・細胞骨格形態変化を糖尿病肝臓モデル細胞で検出し、シグナル伝達分子、細胞骨格、初期エンドソームによって構成される構造体（ドメイン）形成が糖尿病肝臓モデル細胞では顕著に阻害されていた。よって、この構造体の形成有無が糖尿病態を示す一つの形態的指標として有用である可能性が示唆された。さらに、マイクロアレイ解析により、糖尿病モデル細胞特異的に発現変動する遺伝子群を抽出し、その中でも2つを糖新生に関与する新規遺伝子として同定することができた。本方法は細胞質の種類を変えることにより、様々な病態モデル細胞構築に応用できる汎用性の広いものである。今回の糖尿病モデル細胞構築により、細胞質交換法は攪乱された分子ネットワークをもつ細胞内環境を再現し、その形態的・分子的揺動を検出し、さらにはその攪乱に関与する因子を探索するために適した方法論の一つであることを示すことができた。

（2）詳細

（研究項目1）セミンタクト細胞リシール技術を用いた疾患モデル細胞の構築

ヒト子宮頸癌由来培養細胞 HeLa 細胞、ラット肝臓由来培養細胞 H4IIEC 細胞、マウス膵β細胞由来培養細胞 MIN6 細胞を用いた、糖尿病モデル細胞の構築に成功した。まず、各細胞のセミンタクト化（ストレプトリシン O 処理濃度・時間など）・リシール化（カルシウムイオン処理濃度・時間など）条件検討を行い、80-90%がコンスタントにリシールされうる条件を確定した。リシール細胞ではオルガネラ・細胞骨格の形態がほぼインタクト細胞と同一であること、またセミンタクト化・リシール化によって負荷される細胞ストレス（p38 MAPK などの活性化）はリシール後 30-60 分でほぼ沈静化すること、リシール MIN6 細胞からもグルコース刺激に応じてインスリン分泌が誘起されることも見いだした。

（研究項目2-A）疾患を反映した細胞内生命現象の再構成

糖新生関連遺伝子 PCK1（phosphoenolpyruvate carboxykinase）や G6PC（glucose-6-phosphatase）は、インシュリン刺激依存的に転写阻害されることが知られており、この反応の正常性が体全体の糖代謝制御機構において極めて重要である。そこで正常・糖尿病モデル H4IIEC 細胞を用いて、インシュリン刺激依存的な PCK1, G6PC の転写阻害を定量的に、PCR を用いて検証した。まずリシール H4IIEC 細胞におけるインシュリン依存的 PCK1 転写阻害は細胞質濃度に依存することを見だし、この結果は導入する細胞質依存的な PEPCK 転写状態が変化しうることを示唆した。次に、正常あるいは糖尿病モデル細胞を用いてインシュリン刺激依存的な PCK1 および G6PC の転写量を検証したところ、糖尿病モデル細胞においてはインシュリン刺激依存的による転写量の減少が正常モデル細胞に対して少ないことがわかった。このことは糖尿病モデル細胞での糖新生関連遺伝子の転写阻害が「起こりづらい」ことを意味しており、糖尿病肝臓の状態（「インスリン抵抗性」として知られている典型的糖尿病フェノタイプ）を細胞レベルで再現できたことになる。さらに、正常肝臓モデル細胞に

においてはリシール後 1~24 時間後のいずれの時間においてもインスリン依存的な PCK1 発現抑制が見られたのに対し、糖尿病モデル細胞では 1 時間後に見られたインスリン応答性阻害が 12 時間後まで継続し、24 時間後になってようやく WT 細胞と同じ程度まで PCK1 発現が抑制された。この結果から、糖尿病モデル細胞質依存的なインスリン応答性阻害はリシール後 12 時間もの長い時間継続することが明らかとなった。

さらに、正常あるいは糖尿病モデル H4IIEC 細胞を用いたインスリン依存的なグルコース産生能の低下について検証した。興味深いことに、糖尿病細胞質を導入したリシール H4IIEC 細胞においては、インスリン存在下でもグルコース産生が低下せず、むしろ~200%まで上昇することが明らかとなった。以上のことから、糖尿病肝臓モデル細胞においてグルコース産生が攪乱され典型的なインスリン抵抗性の状態を反映していることが示唆された。上記の結果からも、糖尿病肝臓モデル細胞においては糖代謝が異常となっていると考えられる。

(研究項目2-B)シグナル分子ネットワークの再構成

リシール糖尿病モデル細胞におけるシグナル伝達およびその攪乱について検討した。H4IIEC 細胞を一晩血清抜き培地で培養した後セミインタクトにし、正常あるいは糖尿病肝臓細胞質を導入し、正常あるいは糖尿病モデル細胞を作成した。リシール後この細胞をインスリン刺激し、その下流に惹起される MAPK シグナル、Akt シグナルの活性化を Western blotting 法によりリン酸化 MAPK あるいはリン酸化 Akt を検出し調べた。その結果、MAPK リン酸化量は正常と糖尿病モデル細胞で差がなかったのに対し、Akt は糖尿病モデル細胞特異的にリン酸化が阻害されていることがわかった。これらの結果は、キナーゼリン酸化可視化プローブを用いたシグナル伝達可視化実験によっても検証できた。MAPK リン酸化可視化プローブ EKAR および Akt リン酸化可視化プローブ Eevee は、それぞれ CFP と YFP の間に MAPK あるいは Akt リン酸化モチーフをもつタンパク質プローブである。リン酸化時の起こる CFP-YFP 間 FRET 効率変化を検出することで、細胞内の MAPK あるいは Akt のリン酸化状態を可視化することができる。EKAR あるいは Eevee リコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ精製し、正常あるいは糖尿病肝臓細胞質とともにセミインタクト H4IIEC 細胞に添加した。リシール後細胞をインスリン刺激し、EKAR の FRET 効率を顕微鏡下で測定したところ、正常・糖尿病モデル細胞とも EKAR のリン酸化が同程度誘導されたことがわかった。それに対し、糖尿病モデル細胞ではインスリン刺激依存的な Eevee プローブの活性化が正常モデル細胞に比較して阻害されることを見いだした。以上のことから、インスリン刺激依存的な Akt 活性化は糖尿病肝臓モデル細胞で阻害されることが明らかになった。また、今回のようなシグナル伝達系に反応する蛍光性プローブを用いる際問題となる「発現量の不均一性」を、本リシール細胞を用いて回避できる可能性があることも認識できた。

またインスリン刺激後にリン酸化 Akt の蛍光抗体法を行ったところ、インスリン添加後 5 分以内という短時間に形質膜付近に Akt が濃縮されたドメインが形成されることがわかった。このドメインにはリン酸化された(活性化した)Akt が濃縮されており、インスリン刺激後 5-15 分で急激に形成され、30 分以内になくなることがわかった。正常あるいは糖尿病モデル細胞で Akt 活性化ドメイン形成を定量化したところ、糖尿病モデル細胞では Akt ドメインが明らかに構

築されにくくなっていることがわかった。インスリン刺激による Akt 活性化ドメイン形成に関わる現象を探索するため、さまざまな細胞内構造体・オルガネラマーカーで蛍光抗体法を行った。その結果、Akt 活性化ドメインはアクチンと共局在すること、そしてエンドソームマーカーEEA1 と一時的に共局在することを見いだした。エンドソームには脂質の1つホスファチジルイノシトール 3 リン酸(PI3P)が特異的に濃縮していることが知られているが、(2-C)で後述するように、糖尿病モデル細胞ではこの PI3P が減少していることを見いだしている。そこで糖尿病肝臓モデル細胞における PI3P 減少と Akt 活性化ドメイン形成阻害との間につながりがあるかどうか調べるため、FYVE リコンビナントタンパク質を利用することとした。FYVE とはタンパク質の PI3P 結合モチーフである。この FYVE タンパク質の GST 融合リコンビナントタンパク質を大量にリシール細胞に導入して FYVE を大量に PI3P に結合させることにより、PI3P 減少と同じ効果が得られるものと考えた。まず GST あるいは GST-FYVE リコンビナントタンパク質を正常肝臓細胞質とともにリシール H4IIEC 細胞に導入した。この条件でインスリン刺激を行い、FYVE タンパク質による Akt 活性化ドメイン形成への影響を検証した。その結果 FYVE 導入細胞では、i) Aktリン酸化(活性化)が顕著に減少、ii) Akt 活性化ドメイン形成が阻害、iii) インスリン刺激前から PCK1 および G6PC の発現が減少し、さらにインスリンに応答した mRNA 量の低下も阻害されることを見いだした。これら(特に iii))は典型的な糖尿病態の細胞のフェノタイプである。以上の結果より、糖尿病態発現細胞では、初期エンドソーム膜上の脂質(PI3P)量の減少と、Akt シグナル伝達系の攪乱が起こっている可能性が示唆された。興味深いことは、Akt 活性の攪乱は肝細胞における「インスリン抵抗性」発現の原因として注目されていることであり、本実験結果は糖尿病態発現時における肝細胞でのシグナル伝達攪乱経路を初めて明らかにしたものとなった。

(2-C)細胞内モルフォダイナミクスの再構成とその攪乱の検証

正常と糖尿病モデル細胞の細胞内オルガネラや細胞骨格の形態を、蛍光抗体法を用いて比較したところ、初期エンドソームマーカーである EEA1 が糖尿病モデル細胞ではシグナルが减弱していることが分かった。EEA1 はエンドサイトーシスに関与することが知られているため、リシール HeLa 細胞を用いて、細胞外からの分子の取込過程エンドサイトーシス過程について検証を行った。A)EGF 受容体の分解過程、B)トランスフェリン受容体のリサイクリング過程、C) コレラ毒素のゴルジ体への逆行輸送過程について調べたところ、糖尿病マウス肝臓細胞質を導入した糖尿病モデルリシール HeLa 細胞では、コレラ毒素の逆行輸送過程が p38 MAPK の活性依存的に阻害されることを明らかにした。糖尿病モデル細胞における p38 MAPK の活性化は細胞がストレス状態下にあることを意味し、また p38 MAPK 活性化によるエンドソーム局在脂質ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI3P)の減少がコレラ毒素輸送阻害とカップルすることを見いだした。以上の結果は、「本研究のねらい」で述べた 1, 2, 3 の目的を正常・糖尿病モデル細胞を用いて実施した例となっている。つまり、糖尿病態という細胞内環境を持った細胞を作成し(ねらい2)、その細胞内シグナル伝達経路の攪乱(ねらい2)やそれを原因とする小胞輸送系路の攪乱(ねらい1)、オルガネラ形態の異常の検出(ねらい3)を行い、糖尿病発現に関わる新規因子の存在を明らかにした。以上の結果は、国際誌 PLoS ONE に論文として発表した。

(3) リンシール糖尿病モデル肝臓細胞の遺伝子発現解析

正常あるいは糖尿病モデル肝臓細胞のマイクロアレイ解析を行った。その結果、17688 遺伝子の中から、2時間という短時間の細胞質暴露でも正常と糖尿病モデル細胞で発現変動する遺伝子を複数抽出できた。そのうち、real time PCR および western blotting により糖尿病モデル細胞での mRNA・タンパク質発現上昇・減少を2つの遺伝子で確認できた。これらの遺伝子を RNAi による発現抑制あるいは過剰発現すると、インスリン依存的な PCK1・G6PC の発現抑制の阻害およびグルコース産生のインスリン応答性が失われ、糖尿病モデル細胞と同様の糖代謝の攪乱が観察された。

3. 今後の展開

現在までに、インスリン抵抗性という病態フェノタイプが再現された糖尿病モデル細胞構築に成功し、病態関連候補因子群を絞り込むことができている。特に Akt シグナル伝達異常とエンドソーム膜上の PI3P 量減少とのカップリングが FYVE タンパク質大量導入実験により示唆されたことから、今後は初期エンドソーム膜に結合する EEA1 のように PI3P 結合ドメインを持つタンパク質に注目し、病態に関わる因子を同定していきたいと考えている。また、マイクロアレイ解析より、糖尿病細胞質依存的に発現変動する遺伝子を抽出してきており、実際これらのうち2つのタンパク質がインスリン依存的な糖新生酵素発現抑制にも関与することを見いだしている。今後はこれらのタンパク質発現の糖尿病モデルマウス週齢依存的な変化などを調べ、病態マーカーとして有用であるかどうかを明らかにする。

また、リンシール細胞を用いたライブラリースクリーニング系を確立できたので、実際に化合物スクリーニングを開始したいと考えている。まずは既に使用されている糖尿病改善薬を用いてスモールスケールで予備的実験を進め、スクリーニング系としての問題点などを洗い出す。それらを克服した後に、市販薬1000種の低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを遂行する予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者) 本研究では細胞内構造体が存在する環境で、分子ネットワークが攪乱された細胞系として、セミインタクト細胞リンシール法による疾患モデル、病態モデル細胞の作製を目指した。本研究ではそのプロトタイプとして、糖尿病肝臓あるいは膵βモデル細胞構築を行い、病態に即したフェノタイプ(肝臓ではインスリン応答異常、膵β細胞ではインスリン分泌異常)をそれぞれのモデル細胞で観察することができ、細胞レベルでの病態再現に成功した。これにより「細胞質交換法」は攪乱された分子ネットワークを持つ細胞の再構成系として有用であることを示すことができた。さらに、糖尿病肝臓モデル細胞の性状解析の結果から、インスリンシグナル伝達の異常およびそれに対応した Akt ドメイン形成阻害を見出した。Akt ドメインはインスリン刺激後一過性に形成されるドメインであり、形態検出が短時間で簡便にできることが特徴である。よって、病態の指標となる形態・構造変化を見つけるという当初の目的に対し、シグナ

ル伝達異常を反映するドメイン生成の有無はこのコンセプトの良い実施例となりうると考えている。さらには、病態関連新規因子の探索についても、有力な2つのタンパク質をマイクロアレイ解析から抽出し、その機能を細胞レベルで検証することができた。以上の結果は、研究開始当初の目的や開発項目を概ね満たすものと考えている。その一方で、現在の研究環境では、個体での機能確認などの実験を行うことは難しく、実際への病気個体との関連を示すことについては課題が残っている。細胞レベルでの機能解析のさらなる充実を踏まえた上で、共同研究先を探し、本方法での新規因子発見を個体研究へと結びつける道筋を模索していきたい。その一つの方法として、病態モデル細胞を用いた薬物スクリーニングがあると考えている。これまでに96wellフォーマットで病態モデル細胞作成のプロトコール決定や遺伝子発現定量、細胞画像取得法などをこのさきがけ研究期間中に確立できたので、これを用いてドラッグリポジショニングなどのスクリーニングを行い、新薬発見や個体への応用を目指したい。

(2) 研究総括評価

セミンタクト細胞リシール法を駆使し、分子ネットワークが攪乱された疾患モデル細胞プロトタイプとして、糖尿病肝臓あるいは膵・モデル細胞を構築しました。この成果は、その応用、特に、病態モデル細胞を用いた薬物スクリーニングを含め、高いポテンシャルを秘めています。

タンパクの状態から構造を一細胞レベルで見ていく事により、さらに、多くの発展の余地があり、セミンタクト細胞を用いなければ、知り得なかったという事象を見出して、この技術のさらなる展開を期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kano, F., Nakatsu, D., Noguchi, Y., Yamamoto, A., Murata, M. A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Perturbation of Endocytic Pathways under Diabetic Conditions. PLOS ONE. 2014. 7 (8), e44127.
2. Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K., Murata, M. PPAR γ -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. Nature Communications. 2013. 4. Article number: 2262.
3. Sugawara, T., Kano, F., Murata, M. Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro)insulin in insulin-secreting cells. Scientific Reports. 2014. 4, Article number: 6952.
4. Nakatsu, D., Horiuchi, Y., Kano, F., Noguchi, Y., Sugawara, T., Takamoto, I., Kubota, N., Kadowaki, T., Murata, M. L-cysteine reversibly inhibits glucose-induced biphasic insulin secretion and ATP production by inactivating PKM2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015 Feb 23. pii: 201417197..
5. Taguchi, Y., Imaoka, K., Kataoka, M., Uda, A., Nakatsu, D., Horii-Okazaki, S., Kunishige, R., Kano, F., Murata, M. Yip1A, a Novel Host Factor for the Activation of the IRE1 Pathway of the Unfolded Protein Response during Brucella infection. PLOS Pathogens. 2015.in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:4 件(3 件非公開)

1.

発 明 者: 村田昌之、加納ふみ

発明の名称: 高脂血症または糖尿病マーカー、及び創薬スクリーニング方法

出 願 人: 神奈川科学技術アカデミー

出 願 日: 2012/3/31

出 願 番 号: 特願 2012-083075

(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)

1. 加納ふみ. リシール細胞技術を用いた疾患モデル細胞の構築とその解析. 第27回バイオメディカル分析化学シンポジウム(若手研究者シンポジウム)、2014年8月21日、帝京大学板橋キャンパス
2. 加納ふみ、村田昌之. セミインタクト細胞リシール技術を用いた病態モデル細胞の構築. 第65回日本細胞生物学会大会シンポジウム、2013年6月19日、名古屋.
3. Masayuki Murata, Fumi Kano. A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Insight into Signal Transduction Cascade in Hyperlipidemic or Diabetic Cells. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), Nov. 27, 2012, Nagoya.
4. Kano, F., Murata, M. (2013) The Semi-Intact Cell System and Methods for Cell Resealing: a Novel Systems Biology Tool to Elucidate Protein Networks with Spatio-Temporal Information. Advances in Systems Biology. 2(1): 6-14.
5. 加納ふみ、堀内雄太、野口誉之、村田昌之. (2012) セミインタクト細胞リシール技術を用いた病態モデル細胞創成とその細胞工学的応用. 細胞工学、秀潤社、Vol. 31 No. 12, 1376-1382.

研究報告書

「分子複合体と動物個体での機能を結ぶ1分子可視化計測」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 茅 元司

1. 研究のねらい

筋肉の収縮は、サルコメアとよばれる周期構造の中央に位置するミオシンフィラメント上のミオシンが周りを囲むアクチンフィラメントに相互作用し、アクチンフィラメントをサルコメア中央方向に引きこむことで収縮を引き起こす。本研究では、まず 1 分子計測技術を駆使して、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメント 1 本ずつが相互作用する最小単位の収縮系を再構成し、ミオシン 1 分子とミオシンフィラメント(ミオシン集合体)の動態を直接かつ同時に捉える実験系を構築する。この実験からミオシン 1 分子の機能がミオシン集合体の機能発現にどのように拡張されていくのか検討する。またこうした実験データを元にシミュレーションモデルを構築し、理論的な理解を深め、さらに得られたモデルパラメータを用いて、サルコメア 3 次元構造を加味したシミュレーションを行い、サルコメア内における動態を予測する。この予測データを検証するために、マウス骨格筋サルコメア内のタンパク質に GFP を融合させたタンパク質を発現させて、in vivo サルコメア動態を計測する実験系を構築し、シミュレーション予測と合わせて、サルコメア内におけるタンパク質の機能発現を検討する。このような 1 分子計測と in vivo サルコメア計測、そしてこの階層間のギャップをつなぐシミュレーションという 3 つの研究アプローチの構成から、ミオシン 1 分子の機能が、ミオシンフィラメント、サルコメア構造レベルといった高次の階層構造における収縮機能発現にどのように拡張されていくのか統合的に理解していく。

2. 研究成果

(1) 概要

1 分子計測においては、ミオシン 1 分子の動態を直接とらえるためにミオシン制御軽鎖を大腸菌で発現させたビオチンタグ入り制御軽鎖と入れ替え、そこにアビジンコーティングした金コロイド粒子 ($\Phi 20-30\text{nm}$) を結合させ、その散乱像を高速カメラで撮影した (10000 フレーム/秒)。また同時にミオシンフィラメントの発した力を計測するため、NEM 化処理したミオシンをコーティングしたビーズ ($\Phi 400\text{nm}$) をアクチン片端に結合させて、光ピンセットでビーズをトラップすることにより、ミオシンと相互作用中の力を計測した (図 1a)。この計測からミオシンフィラメントの発する力とそのフィラメント上にある 1 分子の動態を同時にとらえることに初めて成功した (図 1b)。

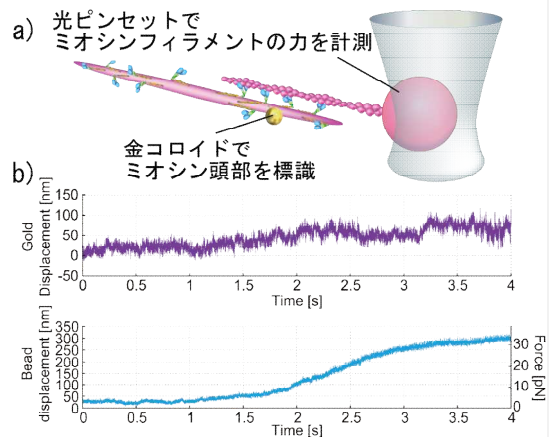


図 1 a) ミオシン 1 分子とミオシンフィラメントの動態を同時計測する実験系, b) ミオシン頭部の変位と集合体による力波形。

ミオシンフィラメントの発する力を解析すると(1mM ATP)、30pN 前後の大きな力を発生させていることがわかった。さらにステップ状に変化する力波形が観測され、特に高負荷におけるステップ状の力発生は、ミオシン1分子では不可能であり、複数の分子が同期して力発生する協同的な特性を示唆する結果である。そこでシミュレーションモデルを構築し、ミオシン分子間の力発生が同期するメカニズムについて検討した。実験データを再現するようにパラメータを推定した結果、低負荷から高負荷にかけて同期して力発生するミオシン分子数が増加する特性がみえてきた。力発生の同期現象を起こす因子として、負荷依存的に力発生状態の遷移率が変化する特性が重要であることがわかった。またパワーストロークとよばれる構造変化による力発生が2段階あると、1段階の場合に比べ同期する確率が上がることも判明した。

このシミュレーションモデルをもとに、サルコメア構造内でのアクチンの変位を予測した。その結果、等尺性収縮(サルコメア長一定)においてでも、その内部にあるアクチンは揺らいでいることが予測された。こうしたアクチン1本の揺らぎを予測した報告はない。そこで、アクチン先端に局在するトロポモジュリンを標識すれば、アクチンの変位を評価できると考え、トロポモジュリン-GFP をエレクトロポレーションによりマウス前頸骨筋に発現させることを試みた。その結果、トロポモジュリン-GFP の発現による縞状の蛍光像が観測され(図 2)、今後はアクチン一本一本の変位を捉えるために発現量の調整や背景光の削減などの検討が必要である。

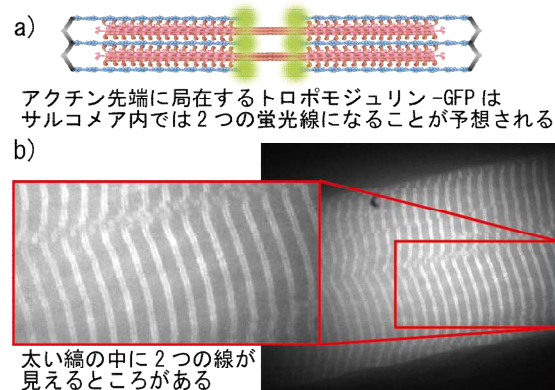


図2 a) 予想されるトロポモジュリンの局在位置と蛍光像(2重線の蛍光像), b) マウス筋肉内におけるトロポモジュリン-GFPの発現。

(2) 詳細

研究テーマ A「ミオシン1分子とミオシン集合体の動態を同時に可視化する1分子計測」

このテーマの達成にあたり、ミオシン1分子とその集合体の動態を同時にとらえる光学系の開発が必須であり、金コロイドの散乱像を獲得する光学系と光ピンセット光学系を組み合わせた顕微鏡を開発することに成功した(図 3)。またミオシンの制御軽鎖にビオチンタグを入れるにあたり、当初はN末端のみに入れていたが、C末端と両方に入れることでアビジン化金コロイド粒子との結合能があがった、また bifunctional にすることにより金粒子の揺らぎを抑え S/N 比を上げることに成功し、ミオシン頭部の動態をとらえるにあたり、より有効な標識が可能となった。これまで分子モーター頭部単体を金粒子で標識し、その動態をとらえた報告はいくつかあるが、この分子を含む集合体の動態も同時に捉え得る光学系の開発は、本研究が初めてである。この実験系を用いて現時点までに多数のデータを獲得しており、ミオシン1分子頭部の動態と同時に、ミオシン集合体の動態を計測することに成功している。現在はその解析法を模索中であり、最終的には、これらの実験データからミオシン1分子の機能とその分子集合体の機能の関わりを明らかにしたい。またシミュレーションで判明してきたミオシン分子間の協同性に重要な因子である負荷依存的な結合時間の変化、2段階の構造変化などについても

これらのデータから検討していきたい。

研究テーマ B「階層間の機能をつなぐシミュレーションモデルの開発」

研究テーマ A におけるミオシンフィラメントの力計測から、上記概要で述べたようなミオシン分子間の協同的な力発生が予想され、その分子メカニズムを明らかにするシミュレーションモデルを構築することに成功した。具体的に説明すると、構造変化に伴う力発生状態の遷移率が負荷依存的であることにより、高負荷においては

遷移率が低い。各分子がアクチンに結合した状態でスタックする。ここである分子の相互作用でアクチンが動き始めると、スタックした分子のストレインがリリースされ、それにより遷移率が上昇し次の状態へ移行できるようになり、構造変化に伴って力発生を一斉に始める。このような負荷依存的な遷移率特性が、ミオシン分子間の力発生を同期させる仕組みである。さらに力発生の同期は、2 段階の構造変化による力発生を持つ場合のほうが、1 段階の場合よりも頻繁に起こることも判明し、2 段階の構造変化による力発生の重要性も示唆された。こうしたミオシン分子間の力発生が同期する可能性を1分子レベルで実験的に示し、そのメカニズムを解く理論モデルを構築できたことは大きな意義があると考えている。さらに、このモデルをもとに in vivo サルコメア構造内におけるダイナミクスを予測するモデルを構築したことにより、これまでは想像されてこなかった、等尺性収縮時におけるアクチンフィラメントの揺らぎ(伸び縮み)を予想できたことは、今後の in vivo サルコメア内における計測の意義をもたらすものである。

研究テーマ C「マウス in vivo サルコメア内における収縮タンパク質動態の計測」

研究テーマ B のシミュレーションモデルからサルコメア内におけるアクチンフィラメントが等尺性収縮であっても、ダイナミックに揺らいでいる可能性が予測された。そこで、この興味深い現象を検証するために、アクチン先端に局在するトロポモジュリンに着目し、トロポモジュリン-GFP をエレクトロポレーションにより発現させた。当初、様々な方法でタンパク質の発現方法について検討したが、比較的若い3週齢程度のマウスに対してエレクトロポレーションにより発現させる方法が最も発現効率が高いことが判明した。発現したトロポモジュリン-GFP を観察したところ、太い縞状の蛍光が見える(図 3)。しかし予想していた細い2本の縞は殆ど観察されなかった。場所により、2本の縞がみえるが、10nm オーダーでの変位をとらえるに十分な S/N 比ではない。おそらく共焦点顕微鏡の観察面である筋線維表面だけでなく深部でも発現しており、これらの GFP 蛍光像が重なるため、シャープな2重線がかき消され、太い1本の線にみえるのだと推測している。今後は、こうした問題点を解決することが in vivo サルコメア計測では重要であると考えている。

本研究の in vivo 計測は、マウス麻酔下での計測ゆえに、マウスの呼吸や拍動により観察視野が揺らぐこと、さらに電気刺激による筋収縮を起こすと観察視野が一瞬にして顕微鏡視野から外れてしまう問題があり、これらの問題点を解決するためのリアルタイムフィードバック

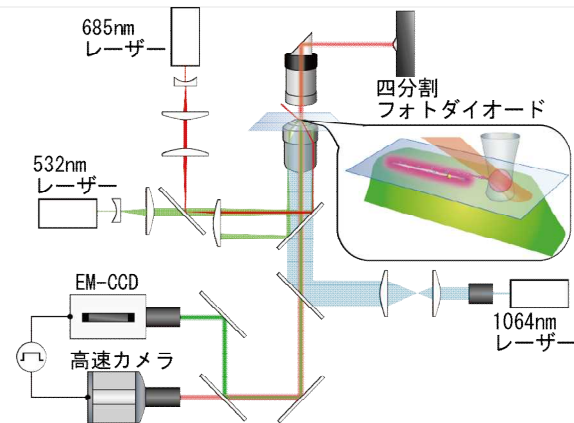


図 3 ミオシン頭部に標識した金コロイド散乱像の変位とミオシンフィラメントの力を計測する顕微鏡の概要。

制御による電動ステージの開発が必要であった。マウス筋肉に蛍光ビーズを注入すると、共焦点顕微鏡観察面より表層の筋線維膜表面付近にビーズは付着する。本研究で開発した顕微鏡では、顕微鏡から出射した光をダイクロイックミラーで、650nm 以上の波長とそれ以下の波長に切り分け、650nm 以下の蛍光は共焦点顕微鏡へ、それ以上の蛍光は高速カメラに投影させた。さらに、高速カメラ前に位置する結像レンズの位置を調整し、筋線維膜表面付近に焦点を結ぶように調整し、その面付近に付着した蛍光ビーズ像のみを高速撮影し、PC 画面上で追跡するビーズを指定して、その重心座標をリアルタイムに計算することで、呼吸や筋収縮による視野の移動量を算出し、1ms 毎にステージコントローラーに移動量コマンドをおくり、ターゲットビーズの位置を常に一定に保つようにステージを動かすリアルタイム制御システムを構築した。この方法により、XY 平面の制御には成功した。しかし、呼吸や収縮による移動は3次元的に起こるため、今後は Z 方向の制御もする必要があることが判明した。何れにしても、生きた動物における in vivo 計測にむけたリアルタイムフィードバック制御システム構築の足がかりとなるものができ、完成にむけた課題も見えてきたのは大きな成果である。

3. 今後の展開

研究テーマ A の1分子計測においては、今後より詳細な解析を進めて、この計測でしか議論することの出来ない1分子の機能とその集合体機能の関わりについて明らかにしていきたい。また、シミュレーションモデルから提唱された負荷依存的な特性、2段階の構造変化なども検証することができるため、こうした検討項目についても考察していく。シミュレーションモデルでは、より3次元的なサルコメア立体構造、また現在はアクチンやミオシンを剛体として近似しているが、これらを弾性体として扱い、より現実的なサルコメア構造を加味したモデルでサルコメア動態をシミュレーションしていく。in vivo 計測においては、まず GFP 融合タンパク質を発現させた筋肉から一本の筋線維を単離し、また除膜した skinned fiber においてトロポモジュリン GFP の蛍光像を観察していく。この実験では、筋肉での in vivo 計測に比べ背景光の影響が少ないので、このような好条件下においてアクチンフィラメントの揺らぎを計測することが可能か検討したい。skinned fiber での力計測は確立された手法であり、ここに発現させたタンパク質の蛍光画像の同時計測を組み込むことで、新しい計測手法が確立できると期待している。ステージのリアルタイムフィードバック制御に関しては、Z(奥行き)方向における制御も必要であることが判明した。この制御には、一般的には対物レンズポジショナーが用いられるが、本研究では高速な制御が必要であり、対物レンズポジショナーは不向きである。今後は、高速に Z 方向のフォーカスを可変できる制御方法を開発していく。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

テーマ A の 1 分子計測については、達成率 70%程度であり、今後の継続的な計測と解析が必要である。この実験は、マイクロ秒で 1-2nm の精度での計測が要求され、極めてチャレンジングな 1 分子計測で、こうした精度での計測ができる実験系を構築できたことには満足してい

る。この実験の特徴はミオシン 1 分子の動態とミオシン集合体の動態を同時に直接とらえて、タンパク質 1 分子の機能と集合体の機能の繋がりを直接評価できる点である。従って、ここから得られる知見は、生物物理分野をはじめ生命機能分野全般において大いに注目が集まると期待している。

テーマ B のシミュレーションは、かなり完成度の高いものが出来たと感じている、達成度は 90%程度と感じており、特に分子間の協同的な力発生のメカニズムを提唱することが出来たのは大きい。さらに、サルコメア構造といった高次の階層構造で起きうるダイナミクスを予測し、興味深い現象を示唆できたことには満足している。今後、このモデルを発展させて、より現実的なサルコメア構造や力学特性を加味すれば、多くの筋肉や心臓研究者の実験データをシミュレートすることのできるモデルが構築できる。特に心臓疾患モデルのシミュレーションや手術後の心機能評価の評価などにも役立ち、医療現場でのツールとしての発展も期待できる。

テーマ C の *in vivo* サルコメア計測は、まだまだ課題の残る状態であり、達成率 50%程度と感じている。この研究では、マウスを対象とするために解剖学的な処置も必要であり、経験のある技官を雇うことで随分と研究を進めることが出来たとは感じているが、前述したように今後の課題を多く残している。筋肉内で標的タンパク質を発現し、その動態をとらえた研究は極めて稀であり、こうした実験系が確立すると、これまでは免疫染色や電顕といった固定画像に頼ってきた筋ジストロフィーなどの近年注目度の高い筋疾患研究にも有用な計測手法として注目され、普及していくことが期待できる。

(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)

ミオシン1分子とミオシン集合体の動態を同時に可視化する1分子計測を行うために、金コロイドの散乱像を獲得する光学系と光ピンセット光学系を組み合わせた精度の高い顕微鏡の開発に成功したことを高く評価します。

階層間の機能をつなぐシミュレーションモデルを駆使して、*in vivo*において、ミオシン1分子の機能が、オシンフィラメント、サルコメア構造レベルといった高次の階層構造における収縮機能発現にどのように拡張されていくのか、統合的な理解に着実に結びつくことと楽しみにしております。そして、この領域の大きな命題でもある生物の階層構造の理解に貢献するものと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kaya M. and Higuchi H. Stiffness, working stroke, and force of single-myosin molecules in skeletal muscle: elucidation of these mechanical properties via nonlinear elasticity evaluation. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013, 70, 4275–4295

(2) 特許出願

該当なし

(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)

参考書、総説

1. 茅 元司 2 章 筋肉ミオシン,「1 分子生物学」 原田慶恵・石渡信一編 科学同人,2014,20-35.
2. 茅 元司 1 分子レーザートラップ顕微鏡によるアクチンとミオシンの物理化学的ダイナミクスの解析. 特集「生化学に新たな視点を与える技術の開発と応用」生化学,2014,86,174-183.
3. 茅 元司,樋口秀男 筋肉の巧みな収縮メカニズム. 感染・炎症・免疫,2012,42,116-123.

招待講演

1. 茅 元司(2014)1 分子顕微鏡を用いて見えてきた筋肉の効率的な収縮メカニズム. 日本光学会年次学術講演会シンポジウム「バイオフィotonicsの展望」筑波大学東京キャンパス文京校舎.
2. 茅 元司(2014)1 分子計測技術を用いて効率的な筋収縮の仕組みを紐解く. 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム「次世代型筋研究の夜明け」国立京都国際会館.
3. Motoshi Kaya (2014) Intermolecular cooperativity of skeletal myosins in myofilaments. Gordon Research Conference (Muscle & Molecular Motors), Mount Snow Resort West Dover, VT USA.
4. 茅 元司(2013)骨格筋ミオシン分子複合体の力発生に特化したミオシン 1 分子の特性とダイナミクス. 第 51 回日本生物物理学会年会シンポジウム「少数個分子の協同が生み出す生命機能のメカニズム」国立京都国際会館.
5. Motoshi Kaya and Hideo Higuchi (2012) Effect of non-linear elasticity of skeletal myosins on force generation in muscle. 56th annual meeting of Biophysical Society, Motility subgroup symposium, San Diego USA.

研 究 報 告 書

「無細胞合成生物学による人工二次代謝産物の発見と生産」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 後藤 佑樹

1. 研究のねらい

幅広い生物種において、多種多様な二次代謝産物が産生されている。これらは産生生物の発生・生殖・細胞増殖などには必須でないものの、異種間の攻撃/防御や病原体の感染防御に利用されており、生物の効率的な生存に重要な役割を果たしている。これら二次代謝産物の中には、産生生物にとってだけでなく人類にとっても有用な生物活性を示すものがあり、古くから薬剤として活用されてきた。しかしながら、この古典的な薬剤開発アプローチでは、天然から発見される化合物に頼っているため、生命が進化の過程で必要とした活性の分子しか入手できず、人類が求める任意の生物活性分子を得られる訳ではない、という潜在的な制限が存在していた。

本研究では、天然の二次代謝産物の化学的な骨格モチーフを活かしつつも、全体的な構造は人工かつ新規な、『人工二次代謝産物』という化合物を提唱している。高い薬効を示す天然物を骨格モチーフとしていることから、人工二次代謝産物は強い生物活性や良好な薬物動態が期待される上、人工的に構築した大規模化合物ライブラリーから望みの生物活性を示す新規化合物を *de novo* に開発するため、任意の活性を示す薬剤の開発が原理上可能である。

具体的には、人工二次代謝産物ライブラリーの構築及び目的活性種の発見を、一貫した試験管内再構成アプローチにより実施することを目指した。この一連の研究を通し、「進化の過程で偶然生み出された二次代謝産物を発見/利用するというセレンディピティーに頼ったアプローチ」から、「人類が必要な効能を持つ化合物を自在に創り出すアプローチ」へとパラダイムシフトを起こすことを長期的な最終目標としている。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、『人工二次代謝産物』の候補化合物として、天然の二次代謝産物に多くみられる、ヘテロ環骨格を主鎖に含むペプチドに着目した。主鎖ヘテロ環骨格は、ペプチダーゼによる分解に対する耐性や標的分子への結合において大きな役割を果たしており、強い生理活性を示すペプチド性天然物の重要な骨格モチーフである。この様な背景から、ヘテロ環骨格含有ペプチドは天然の二次代謝産物としてだけでなく、人工の生物活性分子の候補としても有望な化合物群ではないかと考えた。

具体的には、無細胞翻訳反応と二次代謝産物の生合成酵素とを試験管内で再構成することで、ヘテロ環骨格含有ペプチドを簡便に合成する *in vitro* 人工生合成システムを創製した。また、この人工生合成系を活用して、生合成酵素の基質認識メカニズムを解明する一方で、酵素の改変や有機化学反応との組み合わせにより、より幅広い種類のヘテロ環骨格含有ペ

プチドが生産できることも実証した。さらに、圧倒的な多様性(1兆種類)をもつランダム二次代謝産物ライク化合物ライブラリーを構築し、望みの標的タンパク質に結合する活性種を迅速にスクリーニングする試験管内分子進化系の確立にも成功している。

(2) 詳細

研究テーマ A「改変無細胞翻訳系と翻訳後修飾酵素とを融合した in vitro 人工生合成システムの創成」

脱水ヘテロ環化酵素 PatD と再構成型無細胞翻訳系とを用いたアゾリン骨格含有ペプチドの試験管内生合成系を確立した。本生合成系では、基質の DNA 鎖を加えてインキュベートするだけで、転写反応・翻訳反応・アゾリン環修飾の三ステップの反応が一つのチューブ内で進行し、DNA にコードされた配列のアゾリンペプチドが、選択的かつ高純度に生産されるという特徴を持つ。既存のいかなる合成法と比べても、簡便かつ高汎用性のアゾリンペプチドの生産手法であると言える。

また、別の主鎖ヘテロ環骨格であるアゾール骨格の試験管内生合成システムの構築にも成功している。これについては、申請書で提案した酸化酵素 PatG を用いたアプローチは断念したものの(PatG の酵素活性は試験管内で再構成するのが非常に困難であることを実証した)、酵素的翻訳後修飾と化学的翻訳後修飾とを組み合わせる別の戦略で達成した。これにより、芳香族性のメチルオキサゾール骨格を含む任意のペプチドを生産可能な試験管内人工生合成系を確立した。

研究テーマ B「ペプチド骨格の変換を行う翻訳後修飾酵素反応の分子メカニズムの解明」

テーマ A で開発した試験管内生合成系を活用し、翻訳後修飾酵素の触媒特性及び基質特異性を迅速に評価する方法論を開発した。これにより、PatD 酵素の基質特異性を網羅的に解析し、未知の部分が多かった PatD の基質認識機構に関する新たな知見を、以下の通り得た。

- ・ 基質上に強く保存されている 37 残基のリーダー配列が酵素の活性化に関わることを明らかにした。
- ・ 酵素の活性化に必要な、リーダー配列上の重要なアミノ酸残基を同定した。
- ・ これまで「認識配列」と呼ばれていた、基質上に強く保存される 8 残基の配列モチーフが実際には酵素反応に重要でないことを発見した。実際には、認識配列はリーダー配列と被修飾領域との間に存在するスペーサーとしての役割を持つことを提唱している。
- ・ 以上の結果を基に、PatD 酵素による修飾を受けうる最小のペプチド(ミニマム基質ペプチド)を設計し、実際にアゾリン骨格が酵素により導入されることを実証した。

これらの知見は、これまで不明であった翻訳後修飾型のペプチド修飾酵素の基質認識機構を世界で初めて明らかにしただけでなく、後述するテーマ D におけるアゾリンペプチドライブラリー構築のための基質ペプチドライブラリーを設計する上で重要な情報となった。

研究テーマ C「様々な二次代謝産物ライク化合物の in vitro 生合成」

天然に存在する PatD の基質ペプチドの配列は、その長さや構成アミノ酸が限られており、

PatD が相応の基質特異性を持つことが想定された。この修飾酵素の基質特異性は、人工二次代謝産物候補の化合物ライブラリーの構築に利用する上で障害となる可能性がある。しかしながら、試験管内で反応条件を最適化した本研究の生合成系においては、天然には存在しない様々な配列要素をもつ人工アゾリンペプチドを合成できることが明らかになった。また、遺伝暗号のリプログラミング法を利用した翻訳合成で生産した非タンパク質性アミノ酸を持つ基質ペプチドを PatD で修飾することで、多彩な非天然型アゾリン骨格を構築できることも実証した。この様に、基質ペプチド配列と、合成されるヘテロ環骨格の両方について大きなバリエーションを持たせられることを示したことで、多種多様な二次代謝産物ライク化合物を生産できる生合成系が確立された。

計画書で提案した上記の目標に加え、

- ・ 合成したアゾリンペプチドを化学的に還元することで、アゾリジン骨格含有ペプチドを簡便に生産する手法を確立した。
 - ・ 天然では基質上に存在するリーダー配列を PatD 酵素上に移植することで、自己活性化させた人工改変 PatD 酵素の構築に成功した。これにより、リーダー配列を持たないアゾリンペプチドの合成も可能となった。
 - ・ 自己活性型の修飾酵素を用い、大環状アゾリンペプチドの試験管内生合成にも成功した。
- といった成果も研究展開の中であげることができ、多種多彩なヘテロ環含有ペプチドを簡便に合成する複数の生合成ツールの確立に成功した。

研究テーマ D「細胞機能を制御する新規人工二次代謝産物の探索」

本テーマでは、上記で開発した試験管内生合成系を活用することで、人工二次代謝産物の候補となりうるアゾリン環含有ペプチドの大規模ライブラリーを構築した。具体的には、ランダム縮重コドンからなる mRNA ライブラリーをまとめて生合成系に加えることで、1兆種類を超える異なるアゾリンペプチドの集団をワンポットで生産した。さらに、mRNA ディスプレイ法を組み合わせ、この大規模ライブラリーの中から、任意の標的タンパク質に結合する活性種を迅速に探索する試験管内分子進化実験系を確立することにも成功した。実際に本手法を用いてヒストンやチューブリンの脱アセチル化に関与するタンパク質 SIRT2 に選択的に結合するアゾリンペプチドの探索を実施し、SIRT2 を阻害する人工二次代謝産物の候補となるアゾリンペプチドを複数同定した。

3. 今後の展開

今後は、本研究で確立した人工生合成系と試験管内分子進化系を用いることで、新奇な生物活性を示す人工化合物の創製と生産を目指した研究を、引き続き実施する。天然には存在しない人工二次代謝産物の存在を実証できれば、天然物は現在発見されている以外の生物活性を示し得ないのか？という命題に一定の答えを与えることとなり、「天然化合物の進化と起源」研究に新たな一石を投じうると期待している。

また、高い薬効を示す天然物をモチーフとしていることから、本研究の人工二次代謝産物は既存の創薬アプローチでは対応困難であった疾病関連タンパク質に対しても有効であることが期待される。本研究の人工二次代謝産物を新機軸の創薬候補分子群として活用し、次世代バイオ医薬品として活用する研究も今後も展開する計画である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

計画書で設定した目標の多くは、順調に成果をあげることができたと考えている。特に、研究テーマAとCでは、上で詳述した通り、想定外の研究成果を多く得ることができた。テーマDについては、現時点では人工二次代謝産物の候補化合物を同定したところであり、今後生物活性を確認する必要は残っているものの、本さがけ研究を展開する中で得たノウハウの蓄積は膨大であり、今後の展開も順調に進むと期待している。

また、本さがけ研究の実施体制としては、少人数の学生に参画してもらい、各人に責任を持って取り組める個別の研究テーマを設定する方針で研究を進めた。それにより、学生の責任感と潜在能力を引き出すことに成功し、それが上記の予想以上の成果に繋がったと自負している。

本さがけ研究では、二次代謝産物の類似化合物の汎用合成ツールを開発し、合成化学やケミカルバイオロジーの分野において大きな成果をあげたと自負している。しかし、本計画で目標設定し達成した成果は、あくまでも大きな最終目標に向けた研究展開の第一歩と想定している。今後本成果を発展させることで、より多くの人工二次代謝産物を開発し、新機軸の創薬モチーフとしての地位を確立できれば、既存とは一線を画した新しい創薬アプローチを提示でき、薬学や医学の分野への波及効果を通じて、社会に大きな貢献ができると期待している。

(2) 研究総括評価

脱水ヘテロ環化酵素PatDを用いたアゾリン骨格含有ペプチドの試験管内生合成系を確立して、ヘテロ環骨格含有ペプチドを簡便に合成するin vitro人工生合成システムを創製しました。この人工生合成系を活用して、生合成酵素の基質認識メカニズムを解明する一方で、酵素の改変や有機化学反応との組み合わせにより、より幅広い種類のヘテロ環骨格含有ペプチドの生産ができることを実証しました。さらに、多様性(1兆種類)をもつランダム二次代謝産物ライブラリーを構築し、望みの標的タンパク質に結合する活性種を迅速にスクリーニングする試験管内分子進化系の確立にも成功しています。

創薬スクリーニングに欠かせない最新技術として、注目を集め、製薬業界から高い評価を得ています。生物と非生物の融合の分野で、このさがけの短い期間中に多くの成果を挙げられました。そして、これらの成果は、PNAS論文や特許出願(2件)で、公開し、形にしていることも高く評価します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. B.J. Desai; Y. Goto; A. Cembran; A.A. Fedorov; S.C. Almo; J. Gao; H. Suga; J.A. Gerlt
Investigating the role of a backbone to substrate hydrogen bond in OMP decarboxylase using a site-specific amide to ester substitution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

2014.Oct.21:111(42):15066-71.
2. Y. Goto; Y. Ito; Y. Kato; S. Tsunoda; H. Suga One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase, Chem. Biol., 2014, 21, 766-74.
3. T. Passioura; T. Katoh; Y. Goto; H. Suga Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides, Annu. Rev. Biochem., 2014, 83, 727-52.
4. Y. Goto; M. Iseki; A. Hitomi; H. Murakami; H. Suga Nonstandard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons, ACS Chem. Biol., 2013, 8, 2630-4.
5. Y. Goto; S. Tsunoda; Y. Kato; Y. Ito; H. Suga PatD-FIT system: A versatile synthetic tool for azoline-containing peptides, Pept. Sci., 2013, 50, 89-90.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2 件(1 件非公開)

1.

発 明 者: 菅裕明、後藤佑樹、角田翔太郎

発明の名称: ヘテロ環を含む化合物の製造方法

出 願 人: 国立大学法人東京大学

出 願 日: 2013/3/7

出 願 番 号: 特願 2013-45888

(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)

1. 2013 年 4 月 文部科学大臣表彰 若手科学者賞
2. 2013 年 3 月 日本化学会第 93 春季年会 優秀講演賞(学術)
3. 2013 年 9 月 生体機能関連化学部会講演賞
4. 2013 年 11 月 Excellent Stone Award
5. 2014 年 3 月 日本化学会第 94 春季年会 若い世代の特別講演

研究報告書

「染色体複製系の周期的駆動にむけた回路の再構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 末次 正幸

1. 研究のねらい

生命の根幹をなす現象の 1 つに自己複製が挙げられる。細胞の自己複製は、遺伝情報を複製し、この情報をもとに自身を復元することによって達成される。遺伝情報である DNA を複製するだけであれば、古くから試験管内で再現されている。今や PCR は生命科学に欠かせない技術となっているし、また大腸菌染色体複製の反応を十数種の精製蛋白質とミニ染色体(染色体複製起点 *oriC* をもつ環状 DNA)とを用いて再現するような再構成系も構築されている(ミニ染色体複製再構成系)(Kaguni and Kornberg, 1984)。一方で、生命とはドクドクと拍動するようなシステムであり、細胞内において DNA 複製は細胞周期という自律的な拍動を通じて規則正しく、繰り返されている。

大腸菌の細胞周期においては、染色体複製開始を引き金として、染色体分配や細胞分裂といった下流のイベントがカスケード式に進行する。つまり染色体複製開始の周期的な発動が、細胞周期の拍動をもたらす制御ポイントとなっている。これまでの研究から大腸菌では、複製開始蛋白質 DnaA の活性が複製周期を通じてあたかもサイクリンのようにオシレーションすることが分かり(DnaA 活性オシレーション)、その不活性化と再活性化の分子メカニズムについても個別に明らかとなってきた(Fujimitsu et al., 2009; Katayama et al., 1998; Kurokawa et al., 1999)。興味深いことに、染色体複製サイクルにこれら DnaA 制御機構を組み込んだモデルをたてると、オシレーション回路の基本骨格である「フィードバックループと時間遅延」をみてとることができる。

本研究では、大腸菌ミニ染色体複製再構成系を基盤として、さらに複製の開始、伸長、終結、分離、のサイクルが何ラウンドも繰り返し導くことのできる「複製サイクル再構成系」の構築をめざす。そしてさらに、この系に DnaA 制御機構をうまく組み込むことによって、「DnaA 活性オシレーション」と、それによる「DNA 複製の周期的な繰り返し」を試験管内に再現することに挑戦する。

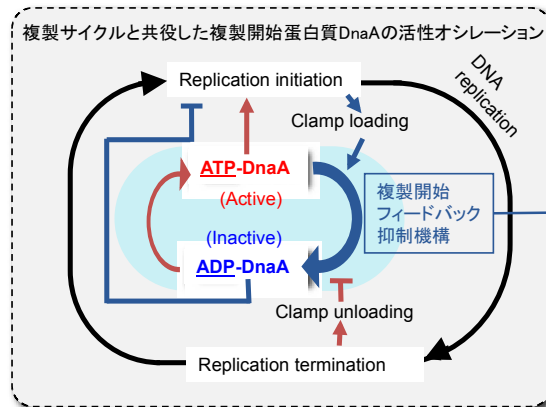
2. 研究成果

(1) 概要 (下図参照)

大腸菌ミニ染色体(複製起点 *oriC* をもつ環状 DNA)の複製再構成系(Kaguni & Kornberg 1984 *Cell*)を基盤に、さらに複製終結および姉妹ミニ染色体分離のプロセスを検討し、1つの反応系において、2ラウンド目以降の複製サイクルが繰り返し導かれる「複製サイクル再構成系」を構築した【成果1 (学会発表^{2, 3, 5})】。複製サイクルの繰り返しは、「複製装置因子クランプに依存した複製開始のフィードバック制御機構」を組み込む事で、ちょうど1回のみに抑える事もできた【成果2 (学会発表^{2, 3, 5})】。詳細な条件検討を経て最適化された複製サイクル再構成系においては、8 kb のミニ染色体であれば、環状 DNA 分子として 5,000 倍を超えての増幅が確認され、また 200 kb もの長鎖環状 DNA

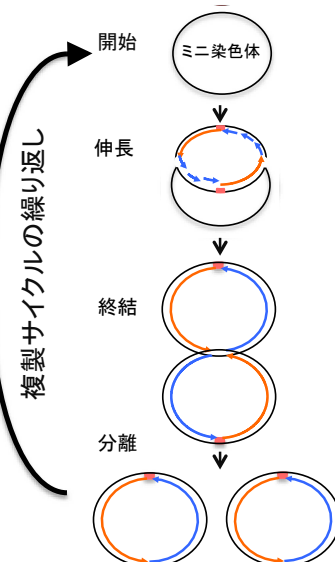
の増幅も確認された【成果3（特願¹）】。本研究ではまた、複製サイクルと共役した DnaA 活性オシレーションを、蛍光蛋白質発現を介して細胞内でリアルタイムに観測する系を構築した。これにより、DnaA 活性オシレーションに依存した遺伝子転写制御の原理について明らかにすることができた【成果4（学会発表^{1, 4}）】。

【成果1】 精製タンパク質による複製サイクル再構成系



【成果4】
DnaA活性オシレーションを介して遺伝子転写が周期制御される。その原理について、蛍光を利用したin vivoリアルタイム観測系を構築し、解明した。

【成果2】
複製サイクルの1回性の制御



【成果3】
複製サイクル再構成系の反応 (30°C, ~2h) で、長鎖環状DNA (8 ~ 200 kb) を指数的に増幅

(2) 詳細

(A) in vitro 再構成

「ミニ染色体複製系の検討」 【成果1(学会発表^{2, 3, 5})】

複製開始には環状のミニ染色体がねじれたスーパーコイル構造をとっている必要がある。DnaA 蛋白質による複製開始反応後、複製起点 *oriC* から両方向に複製フォークが進行し、*oriC* と対極に位置する *ter* 領域で複製が終結する。複製後に生じた姉妹ミニ染色体は絡み合ったままなので、これらは分離されなければならない。分離された姉妹ミニ染色体は元のスーパーコイル構造に戻るため、それらは次のラウンドの複製サイクルへと引き続き進行する事が可能と思われる。この想定のもと、ミニ染色体複製系において、複製後に絡まった姉妹染色体 DNA を分離するための検討を行った。そして、DNA 分離機構の導入に依存して2ラウンド目以降の複製サイクルを繰り返し導くことができる系(複製サイクル再構成系)を構築に至った。

一方で、複製サイクルの繰り返しとともに副次的な長鎖 DNA が産生してくるという問題が生じてきた。そこで再構成系にさらに、*ter* 領域での複製フォークトラップ機構や部位特異的組換え機構の導入を検討した。その結果、どちらの機構を用いても、うまく副次的な DNA 産物の産生を抑える事ができた。

複製サイクル再構成系においては多数の精製蛋白質が必要となる。これらの多くについて、本研究ではより効率の良い精製法を新規に開発した。また、長大なミニ染色体や複製終結領域を持つミニ染色体などを簡便に調製するため、大腸菌細胞内での組換えポップアウトを利用した手法を開発した。このような、本研究遂行の中で構築した手法も、大きな成果といえよ

う。

「長鎖環状 DNA の新規増幅技術(目標外の成果)」 【成果3(特願¹)】

構築した再構成系では複製サイクルを繰り返すたびに環状 DNA 分子を倍化できるので、DNAを指数的に増幅する技術として有用である。実際、詳細な条件検討により最適化した複製サイクル再構成系においては、8 kb のミニ染色体であれば、環状分子 として 5,000 倍を超えての増幅が可能であった。また 200 kb もの長鎖環状 DNA の増幅も確認する事ができた。さらに大腸菌から組換え反応によって取り出したミニ染色体でなくとも、複数の DNA 断片同士を連結して人工的に環状化した DNA についても(*oriC* 配列を含む)、増幅反応の鋳型となることを見出した。

「DnaA 不活性化系の融合」 【成果2(学会発表^{2,3,5})】

DnaA は複製開始後、複製装置因子クランプに依存した機構によって、フィードバック的に不活性化される。この「不活性系」を「複製サイクル再構成系」に融合したところ、複製サイクルの進行がちょうど1ラウンドのみに抑えられた。この結果は、再構成系においてみられていた複製サイクルの繰り返しが、うまく DnaA の複製開始活性に依存して導かれているということを示すものである。

(B) 合成生物学的再構成(in vivo) 【成果4 (学会発表^{1,4})】

大腸菌細胞内における DnaA 活性オシレーションをリアルタイムに検出すべく、蛍光を利用した系を構築した。この系を利用した解析により、DnaA 活性オシレーションと共役した遺伝子転写制御の原理を明らかにすることができた。

3. 今後の展開

「複製サイクル再構成系」に「DnaA 不活性化系」融合して、複製サイクルを1ラウンドのみに抑える事ができた。今後は、1ラウンド目の複製終結ののち、クランプが DNA から外れて(DnaA のフィードバック抑制が解除されて)、「DnaA 再活性化系」をうまく機能させることができるか？が課題である。これが実現できれば、制御的な2ラウンド目以降の複製が導かれるので、それに伴った DnaA 活性オシレーションも導くことができるのではないかと考えている。

複製サイクル再構成系で複製される DNA は遺伝情報そのものである。転写翻訳によってその情報を引き出すことができる。環状 DNA 上に複製サイクル再構成系を構成する全ての蛋白質(20 種以上)を遺伝子の情報にして集積したミニゲノムを構築し、その情報を発現させることができれば、「複製された情報に基づいて、複製サイクル再構成系のハードウェア自体の複製をつくりだす」ことが可能と思われる。複製されたハードウェアは、さらなる世代のミニゲノムの複製を導くだろう。よってこの系は、「自己複製の繰り返し」という、まさに生命の根幹的な現象を再構成することに繋がるのではないだろうか。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況

大腸菌ミニ染色体の複製開始、伸長、終結、分離、そして再複製開始のサイクルが繰り返し導かれるための反応を精製蛋白質によって再構成できた。これは、ミニ染色体が複製を次々と繰り返すための必要十分条件を明らかにしたという点で大きな意義がある。さらに、目的外の成果ではあるが、長鎖環状 DNA を指数的に増幅する革新的な技術の開発に至った。近年の合成生物学や遺伝子工学の潮流とともに、長鎖 DNA 合成技術への期待が増してきている事を考えると、その科学技術及び社会・経済への波及効果は大きい。

一方で、当初の目的である複製の繰り返しを「周期的」に導くにはいまだ至っていない。原因の1つは複製終結後、「クランプを DNA から外して、DnaA のフィードバック抑制経路を解除する」機構がよく分かっていないためであると考えられる。この点、今後さらなる解析的な研究が必要と思われる。このように具体的課題が浮き彫りになってきたことも、試験管内再構成系を用いた解析を進めてきた成果のひとつかもしれない。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

多数の蛋白質を大量精製したり、再構成系における詳細な反応条件を検討したりするのは、かなりの労力が必要であったが、研究補助者の大きな貢献のおかげで、なんとか想定通りに進める事が出来た。また、それぞれの作業を効率的に進めるための機器を購入する事ができたため、特に立教大学准教授として研究室を新たに立ち上げる際にも、研究設備に大きく不自由する事はなかった。

当初、数理モデルを用いた反応パラメーターの最適化なども計画し、進めていたが、実際のところ、再構成系の最適化のためには、ヌクレアーゼのコンタミの除去の検討や、使用するプラスチック製品の検討などといった地道な最適化の貢献が大きかった。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

大腸菌の染色体複製サイクルに関わる機構を試験管内に再構成する事によって、環状 DNA を指数的に増幅する革新的な技術を開発した。本技術が普及すれば、DNA 増幅に、PCR のようなプライマーや温度制御サイクル、さらには細胞を用いた煩雑なクローニング操作はもはや不要である。目的の DNA 断片を *oriC* 断片と連結、環状化して、それを酵素群の詰まった反応液キットと混ぜて 30℃ で2時間程度保温するだけである。外来生物由来の DNA をもつ大腸菌を作る必要はないので、もはや多くの研究室での DNA クローニング実験は、遺伝子組換えの規制対象外となるかもしれない。

多数の DNA 断片をシームレスかつ簡便に連結して、DNA を長鎖環状化する技術は近年進歩しており、Gibson Assembly などが開発されている(Gibson, DG. et.al., 2009 *Nature Methods*)。一方で得られた長鎖環状 DNA を増幅するためには、未だ細胞に頼らざるを得ないのが現状である。本研究で構築した長鎖環状 DNA 増幅法を、このような DNA 連結技術と組み合わせれば、試験管内反応だけで、遺伝子を繋げていって、自在に遺伝子回路やバクテリアゲノムといった長大 DNA を合成する事が出来るのではないだろうか。このようなことが出来るようになれば、合成生物学の分野に大きなインパクトを与える事につながるだろう。

(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)

大腸菌ミニ染色体の複製サイクルの繰り返しの反応を、精製蛋白質によって再構成を可能にしました。このさきがけ期間に、この領域の趣旨に合致した素晴らしいシンセティックバイオロジーの成果を達成されました。できれば、例えば、試験管の中で160kbのミニ染色体を作って、駆動させることで、一般の方々にも分かるようにすれば、大きな反響があると思います。

是非、アウトリーチの活動を含めて、活動の幅を広げていって頂き、もう一つ大きな世界へ突き抜けて欲しいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Su'etsugu, M., Harada, Y., Keyamura, K., Matsunaga, C., Kasho, K., Abe, Y., Ueda, T. and Katayama, T. DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA. <i>Environ. Microbiol.</i> , 15, 3183–3195 (2013) |
|---|

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件(非公開)

(2)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)

主要な学会発表

1. 末次正幸、松本健佑、小林寛子、大腸菌遺伝子転写の細胞周期制御、「細胞を創る」研究会 7.0、東京、2014 年 11 月
2. 末次正幸、松本健佑、小林寛子、片山勉、大腸菌複製サイクルの繰り返しによるミニ染色体 DNA の試験管内増幅、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月
3. 末次正幸、小林 寛子、松本 健佑、片山 勉、再構成アプローチによる大腸菌染色体複製周期の解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会シンポジウム「ゲノム改変による潜在能力覚醒を基にした細菌研究の新展開」、東京、2014 年 3 月
4. Su'etsugu, M., Kobayashi, H. and Katayama, T., An approach to reconstruction of cell cycle oscillation of DnaA activity for replication initiation and transcription regulation. CBI 学会 2013 年大会、東京、2013 年 10 月
5. 末次正幸、小林 寛子、藤光 和之、片山 勉、大腸菌染色体「複製サイクル」再構成にむけた試験管内反応系. 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ボトムアップテクノロジーで細胞システムは創れるのか?」、神戸、2013 年 12 月

研 究 報 告 書

「非平衡人工細胞モデルの時空間ダイナミクス定量解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 瀧ノ上 正浩

1. 研究のねらい

生命システムを「非平衡な条件下で時間発展し続ける分子集合体」として捉える視点が重要であることは、従来から指摘されている。しかしながら、非平衡開放系の理論的基盤が完全には整備されていないことに加え、細胞サイズの非平衡環境を創り出す技術が構築されていないことから、生命システムに対して上記のような視点を持って、定量的な研究を遂行することは、現状では難しい。細胞サイズの非平衡環境を創り出す技術は、非平衡な条件下で時間発展し続ける分子集合体という視点での定量的な生命科学を可能にし、現状の人工細胞研究をさらに発展させることができる。今後、細胞が持つ複雑な機能を再構成して生命システムの神秘に迫っていくために、また、細胞をモデルとした複雑高機能な分子システムを設計・新規構築・制御するために、このような技術が必要不可欠である。そこで、本研究では、非平衡な条件下に置かれた人工細胞の時空間ダイナミクスを定量的に調べることができるような基盤的な技術を構築し、人工細胞研究をはじめとする構成的アプローチの生命科学をさらに加速させることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、非平衡な条件下に置かれた人工細胞の時空間ダイナミクスを定量的に解析するための基盤技術を構築し、構成的アプローチの生命科学をさらに加速することを目指して研究を行った。生命システムは、「非平衡な条件下で時間発展し続ける分子集合体」として捉えることが重要である。しかし、従来は、マイクロサイズの非平衡環境を制御する技術が存在しなかったことから、このような視点で生命システムを定量的に研究することは難しかった。そこで、本研究では、非平衡な条件下にある人工細胞を創り、その時空間ダイナミクスを定量的に調べることができる技術を構築した。

具体的には、マイクロ流路を利用し、マイクロサイズのドロップレット（油中水滴）を人工細胞リアクタとし、水滴の融合分裂によって人工細胞に非平衡性を与えることに成功した。また、融合分裂の頻度を制御することで、非平衡性を制御し、人工細胞内で、分子濃度振動を示す非線形化学反応を制御することに成功した。マイクロ流体デバイスの開発とともに、数学的な定式化を行い、本デバイスに限らず一般的に設計・構築できる枠組みを確立できた。また、細胞サイズの微小マイクロドロップレットを生成する新規手法の構築にも成功した。

今後は、本研究成果の非平衡人工細胞システムを、生命システムが持つ複雑な機能の制御・再構成や、設計・新規構築を実現し促進できる、基盤的な技術・枠組みとなるようにさらに発展させる。これにより、生体高分子の反応ネットワークを制御し、非平衡な条件下にある生命現象の時空間ダイナミクスの解明につなげることができると考えられる。

(2) 詳細

研究テーマ A「非平衡開放系型人工細胞のためのドロップレット融合分裂マイクロ流体デバイスの開発」(原著論文 1)

非平衡な条件下で時間発展し続ける動的な人工細胞の構築には、物質の流入出のある人工細胞の構築が不可欠である。しかしながら、従来の人工細胞は小胞に反応系を閉じ込めてしまい、物質の流入出を制御することが不可能であった。本研究では、マイクロ流体工学を利用し、ドロップレット(油中水滴)の融合と分裂を制御する仕組みを構築し、非平衡開放系型的人工細胞の構築と、その中での非線形非平衡化学反応の制御を目指した。

図 1a は開発したマイクロ流体デバイスの模式図を示している。人工細胞となる反应用的ドロップレット(Reactor droplet)は、流路に固定されており、反応物質の輸送を担うドロップレット(Carrier droplet)は T-junction 流路の部分で生成される。生成された carrier droplet 内の溶液はジグザグ流路で攪拌され、均一になった後に、reactor droplet のところまで運ばれる。図 1b に、実際に開発したデバイスの概観写真を示す。アクリル製の流路で、人工細胞を固定する部分は約 $800\ \mu\text{m}$ 四方で、その両側は電圧印加用電極で挟まれている。電圧を印加しない時は、carrier と reactor のドロップレットは融合しないが、電圧を印加すると融合分裂を起こすことが示された(図 1c)。図 2a は、電圧印加パターンの制御による融合分裂の頻度の制御の方法を示している。融合分裂の頻度が高い程、reactor droplet への物質流入量は大きく、低い程少なくなる。この方法により、実際に物質流入量を変化させ、人工細胞となる reactor droplet の中での非線形非平衡化学反応(pH 振動反応)の振る舞いを制御した(図 2b)。頻度

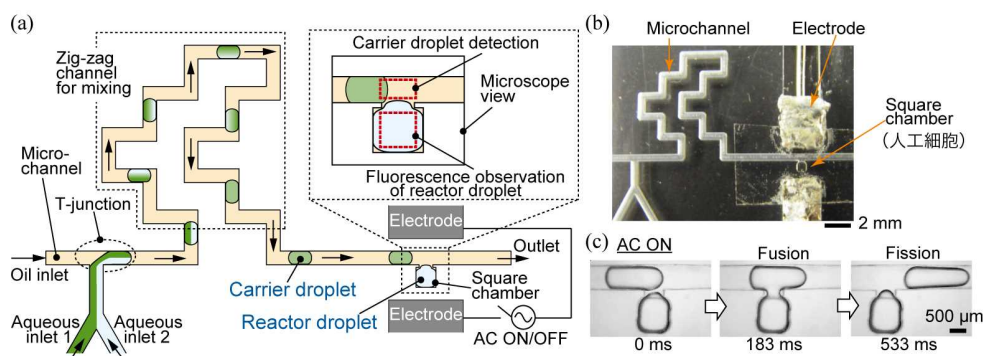


図 1. 非平衡開放系型人工細胞のためのドロップレット融合分裂マイクロ流体デバイス。(a)模式図。(b)実際に開発したデバイスの写真。(c)電圧印加時の融合分裂の様子。

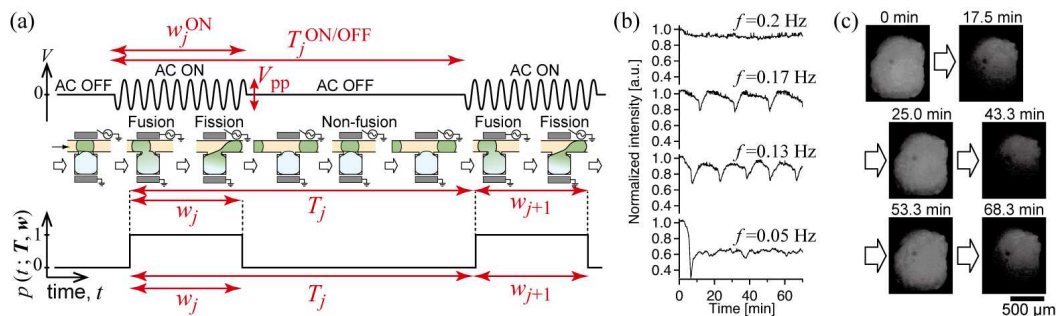


図 2. ドロップレット融合分裂制御による非線形化学反応(pH 振動)の制御。(a)電圧印加による融合分裂制御。(b) pH 振動の制御。 f : 融合頻度。(c)振動時の人工細胞蛍光強度の変化。

が高すぎる場合、低すぎる場合は、反応が定常点に収束するが、その中間的な値で、pH の振動が観察された(図 2b, c)。このように、当初の目的通り、人工細胞ドロップレット内での動的な非線形化学反応の制御と定量的な解析に成功した。

研究テーマ B「小胞融合分裂による非平衡開放系の反応系の数学的な定式化」(原著論文 1)

上記のドロップレット融合分裂制御デバイスのメカニズムを数学的に定式化し、本デバイスの形状や構成に依存しない一般的な概念の構築を目的とした。

一般に、融合分裂が起こっている人工細胞小胞の中での化学反応は、離散的な常微分方程式系で $du_i / dt = f_i(\mathbf{u}) + p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w}) \cdot k_i(c_i - u_i)$ と書ける。ここで、 u_i は人工細胞小胞内の分子濃度、 c_i はキャリア小胞内の分子濃度、 k_i は融合時の分子の拡散速度、 f_i は化学反応、 $p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w})$ は離散的な関数で融合分裂パターン ($\mathbf{T}$: 融合周期、 $\mathbf{w}$: 融合時間) である。 $p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w})$ を Fourier 級数展開することによって、 $p(t; \mathbf{T}, \mathbf{w}) \simeq \mathbf{w} / \mathbf{T}$ であることが示される。これは、物質流入出速度が、融合頻度によって制御できることを示しており、さらに一般的には、 $\mathbf{T}$ をうまく生成することによって、任意の関数の物質流入出速度を実現できるということを示している。このような制御の仕組みを pulse-density modulation と呼ぶ。実際に、本研究では、ホワイトノイズ、正弦波、矩形波、鋸歯状波などの関数形を持つ物質流入出速度を実現し、これらによって非線形化学振動を制御できることを示した。

研究テーマ C「細胞サイズの微小ドロップレット生成デバイスの開発」(原著論文 2)

細胞サイズの非平衡環境を創り出すためには、ドロップレットサイズを細胞と同程度の微小サイズにする必要がある。また、生体分子反応の導入を行う場合、貴重で高価な生体分子サンプルを効率良く内包して微小ドロップレットを作る必要がある。従来のマイクロ流体デバイスを利用すると、送液のためのシリンジやチューブ(送液用の管)にデッドボリュームが発生してしまうので、送液にシリンジポンプやチューブを必要としないマイクロ流体デバイスの構築を行い、従来の問題点を解決することを目指した。

図 3 は本研究で開発したマイクロ流体デバイスの概要図である。このデバイスは、細いガラス管 (Inner capillary) が太いガラス管 (Outer capillary) に挿入された 2 重管が、1.5 mL のディスプレイザブルマイクロチューブに固定された構造をしている。マイクロチューブの底と Outer capillary には油層が装填され、Inner capillary には、ドロップレットに内包されるサンプルの水溶液が装填される。マイクロチューブごと卓上小型遠心機で遠心力 (1, 600G) をかけると 2 重管の中の油層と水相が流れ出し、Plateau-Rayleigh 不安定性により微小ドロップレットが生成される。ドロップレットの直径は、Inner capillary の先端直径とほぼ同じになる。Inner capillary に装填するサンプル量は 0.1–2 μL 程度であり、少サンプルで十分な量のドロップレットを生成できる。図 4a は実際に生成された細胞サイズドロップレットの直径制御 (約 7–14 μm) の様子であり、図 4b は、その細胞サイズドロップレット内でのタンパク質 (緑色蛍光タンパク質、GFP) 発現実験の結果である。本デバイスで作製されたドロップレットで生化学反応実験が可能であり、目的とするドロップレットの生成に成功した。

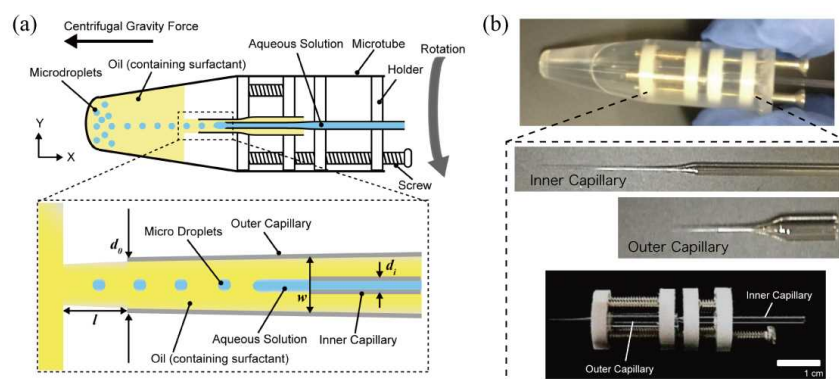


図 3. 細胞サイズドロプレット生成デバイス。(a)デバイスの模式図。細いガラス管 (Inner capillary) が太いガラス管 (Outer capillary) に挿入された 2 重管が、マイクロチューブに固定されている。上が全体像。下が 2 重管内の拡大図。(b)実際のマイクロ流体デバイスの写真。

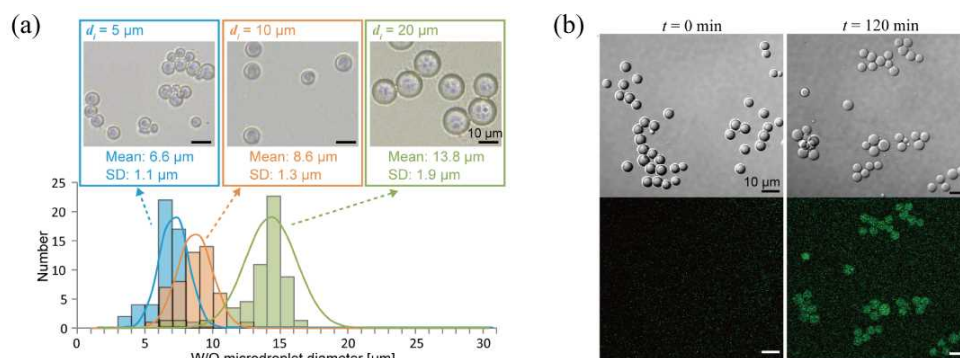


図 4. 細胞サイズドロプレットの生成とドロプレット内の生化学反応。(a)サイズ制御。Inner capillary の直径とドロプレットの直径は同程度にできる。(b)GFP 発現実験。

3. 今後の展開

本研究によって、人工細胞の中で非線形非平衡化学反応を実現・制御する手法が確立された。今後は、人工遺伝子回路などの生体分子反応システムを制御し、より実細胞に近いシステムの設計・構築・制御が展開できると考えられる。また、このシステムは、人工細胞としての利用のみならず、一般に、マイクロスケールの非平衡開放系のチャンバーとして利用できるため、一細胞レベルでの細胞制御や観察を実現する新規デバイスへの発展も可能になると考えられる。従来は難しかった細胞サイズでの非平衡性の制御技術が細胞・組織・個体に関する生物学の新しい計測手法としてさらに展開できると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

[研究目的の達成状況]

本研究課題では、非平衡開放系型の人工細胞を実現するための基盤技術の構築を目標に

研究を行った。研究成果に示した通り、非平衡開放系型の人工細胞を実現するためのマイクロ流体デバイスの開発に成功し、数学的な定式化にも成功した。また、実際に非線形非平衡化学反応の制御にも成功した。従って、概ね重要な目的を達成したと考えられる。細胞機能の理解や制御を行うためには、単純な非線形非平衡化学反応だけでなく、人工遺伝子回路等の生化学反応の実現も必要になると考えられるので、この点に関しては、さらなる研究を進める必要があると考えている。

〔研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)〕

研究費は、マイクロ流体デバイス作製のための大型装置とクリーンルーム設置、非平衡開放系型人工細胞の長時間タイムラプス観察のための顕微鏡システム、および、専属の研究補助者の雇用に充てた。このような研究実施体制・環境を研究スタート時点で構築することができたので、集中して効率良く研究課題を遂行することができたと考えられる。

〔研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込み含む)〕

科学技術への波及効果としては、従来難しかったマイクロメートルスケールでの非平衡開放系化学反応の制御技術が確立できたので、人工細胞構築のみならず、一細胞レベルでの制御や非平衡環境下での一分子レベルでの計測、非平衡条件下での物質生産・材料開発などに応用できると考えられる。社会・経済への波及効果としては、今後、アレイ化・チップ化・自動化などの技術と組み合わせて、創薬スクリーニングなどへの応用が可能になるのではないかと考えられる。したがって、全体としては、今後の科学技術・社会・経済への貢献ができる基盤技術の構築に成功したと考えられる。

(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)

マイクロ流路を利用し、マイクロサイズのドロップレット(油中水滴)を人工細胞リアクタとする独自の構想から、水滴の融合分裂によって人工細胞に非平衡性を与えることに成功しました。また、融合分裂の頻度を制御することで、非平衡性を制御し、人工細胞内で、分子濃度振動を示す非線形化学反応を制御することに成功しました。

このような成果から、細胞レベルで生体の非平衡を制御することにより、生命のさまざまな現象、機能、形態などの研究に、貢献することが期待できます。このデバイスの普及や人工細胞モデルを用いた共同研究が広がることを楽しみに致しております。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Masahiro Takinoue, in preparation |
| 2. Hitoyoshi Yamashita, Masamune Morita, Haruka Sugiura, Kei Fujiwara, Hiroaki Onoe, Masahiro Takinoue, "Generation of Monodisperse Cell-Sized Microdroplets using a |

Centrifuge-Based Axisymmetric Co-Flowing Microfluidic Device”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014.Oct.22. pii: S1389-1723(14) 00354-5

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件(非公開)

(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

1. 平成 25 年度「東工大挑戦的研究賞」学長特別賞(2013 年 10 月 17 日)
2. 第 2 回「明日の象徴」研究者部門(2013 年 10 月 2 日)

主な著作物・解説等

1. 瀧ノ上正浩, “自律性を備えた人工細胞を創出し、生命と物質の境界を探る”(インタビュー形式の解説記事), Nature Digest, vol.9, no.2, pp.26-27 (2012).
2. 瀧ノ上正浩, “細胞に見立てた水滴のふるまいから、生命の物理的な原理を探る”(生命の最先端研究・生命の物理学(1)), Newton 別冊「やさしくわかる 生命の科学」, pp.102-103 (2014).

主な国際招待講演

1. Masahiro Takinoue, “Microfluidic technologies toward the construction of nonequilibrium artificial cells and molecular robots”, Seminar of Division of Biomedical Engineering in MIT-Harvard Medical School, Invited Talk, Nov. 4, 2013, Boston, USA