戦略的創造研究推進事業
CREST・さきがけ複合領域
追跡評価用資料

さきがけ
「生命システムの動作原理と基盤技術」
(2006 年度～2012 年度)

研究総括:中西　重忠

2019 年 3 月

目次

要旨 1
第1章　追跡調査概要 2
1.1　研究領域概要 2
1.1.1　戦略目標 2
1.1.2　研究領域概要 2
1.1.3　研究総括 2
1.1.4　領域アドバイザー 2
1.1.5　研究課題及び研究者 3
1.2　研究領域終了後の発展と波及効果 7
1.2.1　研究成果の発展状況や活用状況 7
1.2.2　研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果 9
1.3　研究領域の展開状況(系譜図) 12
第2章　追跡調査(研究領域全体動向) 14
2.1　追跡調査について 14
2.1.1　調査の目的 14
2.1.2　調査の対象 14
2.1.3　調査方法 14
2.2　研究成果概要 16
2.2.1　研究助成金 16
2.2.2　論文 25
2.2.3　特許 27
2.3　科学技術や社会・経済への波及効果 28
2.3.1　科学技術への波及効果 28
2.3.2　社会・経済への波及効果 31
第3章　各研究課題の主な研究成果及び波及効果 33
3.1　2006年度採択研究課題 33
3.1.1　多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る(池谷裕二) 33
3.1.2　視覚情報の分解と統合の生体制御システム(河崎洋志) 39
3.1.3　脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して(木村幸太郎) 46
3.1.4　モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明(高坂智之) 51
3.1.5　神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析(眞田佳門) 56
3.1.6　RNAポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索(新矢恭子) 61
3.1.7　細胞膜形態決定の動作原理の解明(末次志郎) 64
3.1.8　味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤(杉田誠) 69
3.1.9　分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証(田中裕人) 72

3.1.10　タイミングの予測に関与する脳ネットワークの検証(田中真樹)..... 75
3.1.11　サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析(中原潔)..... 81
3.1.12　レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明(細川千絵)..... 85
3.1.13　相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い(堀川一樹)..... 90
3.1.14　真核細胞の in vivo ロバストネス解析(守屋央朗)..... 95
3.1.15　細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス(山本希美子)..... 100
3.2　2007 年度採択研究課題..... 105
3.2.1　胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発(秋山泰身)..... 105
3.2.2　環境適応に関わる時空間パターン形成現象の分子ネットワーク(岩崎秀雄) 110
3.2.3　リズミカルな連続運動の神経基盤の解析(木津川尚史)..... 115
3.2.4　匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明(小早川令子)..... 119
3.2.5　脳内を縦横に結ぶ意思決定リンク(小村豊)..... 124
3.2.6　小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御(田中敬子) 128
3.2.7　生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明(原田伊知郎)..... 132
3.2.8　花粉管ガイダンスの動的システムの解明(東山哲也)..... 136
3.2.9　シナプス強度を決定する基本原理の解明(深田優子)..... 142
3.2.10　脳細胞光制御を用いた神経グリア相互作用の解明(松井広)..... 148
3.3　2008 年度採択研究課題..... 154
3.3.1　植物分裂組織の再生システム(伊藤寿朗)..... 154
3.3.2　アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明(岩楯好昭).. 160
3.3.3　母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明(大杉美穂)..... 165
3.3.4　植物の概日振動子の観測と相互作用の検出(小山時隆)..... 171
3.3.5　網膜 ON・ OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析(小池千恵子) .. 175
3.3.6　核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明(佐藤政充).. 179
3.3.7　自然免疫反応におけるシェディングの役割と制御機構(白壁恭子)..... 184
3.3.8　１分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明(鈴木健一)..... 188
3.3.9　指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明(鈴木孝幸)..... 194
3.3.10　植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク(鳥居啓子). 199
3.3.11　可視化を通して解析する消化管粘膜免疫系の誘導維持機構(本田賢也)... 206
3.3.12　細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明(南野徹)..... 212
第 4 章　科学技術イノベーションの創出に資する研究成果..... 219
4.1　細胞膜形態決定の動作原理の解明(末次志郎)..... 219
4.1.1　研究の概要..... 219
4.1.2　研究成果の波及と展望..... 225

4.2　花粉管ガイダンスの動的システムの解明(東山哲也)..... 229
4.2.1　研究の概要..... 229
4.2.2　研究成果の波及と展望..... 238
4.3　可視化を通して解析する消化管粘膜免疫系の誘導維持機構(本田賢也)..... 242
4.3.1　研究の概要..... 242
4.3.2　研究成果の波及と展望..... 250

要旨

本資料は、戦略的創造研究推進事業のさきがけ(個人型研究)の研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」(2006 年度～2012 年度)において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況等を明らかにし、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)事業及び事業運営の改善等に資するために、実施した追跡調査の結果をまとめたものである。

第 1 章は、研究領域の追跡調査の概要で、研究終了後、37 研究課題のそれぞれの研究者を中心にどのように研究が発展したかについて調査した結果をまとめた。さらに、これらの研究からどのような新たな科学技術上の成果が生み出されたか、あるいは得られた成果が社会や経済にどのような影響を及ぼしたかについてまとめた。

第 2 章では、各研究者について研究期間中及び終了後の研究成果やその展開状況を調査した結果をまとめた。2.1 項では本調査の目的、対象、及び調査方法を記載した。2.2 項は研究成果の概要で、各研究者が本研究開始後に獲得した研究助成金、研究期間中及び終了後に発表された論文と総説の数、国内外での出願及び登録された特許の数を表にまとめた。2.3 項は科学技術や社会・経済への波及効果として、各研究者の受賞、学会・研究会などへの貢献、研究人材の広がりと共同研究、そのほかの社会活動の状況を調査した結果をまとめた。

第 3 章では、本研究領域の各研究課題について、研究終了後の発展状況の調査結果を研究期間中の達成状況とともにまとめた。本研究領域終了後の発展状況としては、まず、研究者による研究の全体像、さらに、科学技術の進歩に貢献した代表的な成果を取り上げた。その上で社会的、経済的な波及効果についてまとめた。

第 4 章では、本研究領域終了後、特徴ある成果を上げている研究者のうち、3 名の研究者にインタビューを行い、本研究領域開始以前も含め、研究課題に関わる国内の状況、海外での共同研究の状況、さらに、科学技術や社会・経済への波及効果と展望をまとめた。

このような追跡調査を通じて、本研究領域が目指した「複雑な生命システムの動作原理を検証可能な程度に理解し、検証過程で創出されるツールやソフトウエアなどが医療、バイオエンジニアリングなどの分野で活用される基盤技術となること」という目標は、本研究領域終了後、内閣府 NEXT「革新的技術を用いて脳疾患を理解する「システム薬理学」の創成」、「細胞膜メゾスケール構造構築とがん形成機構」、「腸内環境と免疫システム構築の統合的理解とその応用」、JST ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」、あるいは AMED-CREST 研究領域「腸内常在細菌特性理解に基づく難治性疾患新規治療法の開発」など、大型のプロジェクトに発展した。

本研究領域で得られた成果とそこから発展した基礎研究あるいは応用研究の成果や実用化を目指した研究への展開により、様々な形で科学技術上、あるいは社会・経済面での波及効果が得られている。

第 1 章　追跡調査概要

1.1　研究領域概要

1.1.1　戦略目標

「生命システムの動作原理の解明と活用のための基盤技術の創出」

1.1.2　研究領域概要

本研究領域は、生命システムの動作原理の解明を目指して、新しい視点に立った解析基盤技術を創出し、生体の多様な機能分子の相互作用と作用機序を統合的に解析して、動的な生体情報の発現における基本原理の理解を目指す研究を対象とした。

具体的には、近年の飛躍的に解析が進んだ遺伝情報や機能分子の集合体の理解を基に、細胞内、細胞間、個体レベルの情報ネットワークの機能発現の機構、例えば生体情報に特徴的な非線形で動的な反応機構などを、新しい視点に立って解析を進めることによって生命システムの統合的な理解を図る研究が進められた。生命システムを制御する動作原理を明らかにするためのモデル化、分子機構の動的特性を把握するためのイメージング、時空間動態のシミュレーション、網羅的解析などの研究アプローチが組み合わさった手法であり、生体機能を理解し、制御するための定量性と予測性を実現することを狙いとした研究領域である。このような研究領域は従来のライフサイエンス研究の手法に加えて、理論生物学、計算科学、物理学などの知識に加えて、新たな計測・測定技術、微細加工技術、コンピュータなどの新しいツールを必要とする。特に後者はライフサイエンスエンジニアリングのイノベーションにつながる技術やソフトウエアを創成し、生命現象の実験的解析と融合した研究手法を提供している。

1.1.3　研究総括

中西 重忠

研究領域開始時の所属・役職：大阪バイオサイエンス研究所・所長

追跡調査時の所属・役職：サントリー生命科学財団生物有機科学研究所・所長

1.1.4　領域アドバイザー

本研究領域は生命システムという多岐にわたる領域であるため、アドバイザーの選定にあたっては、専門分野が偏らない、生物系分野、理論生物学の各分野の第一線研究者であること、また、女性研究者、さきがけ研究の経験も考慮された。各分野で日本を代表する研究者延べ 11 人に領域アドバイザーを定め、研究者の指導にあたった。表 1-1 に領域アドバイザーを示す。

表 1-1　領域アドバイザー

領域アドバイザー	所属	役職	任期
岡田 清孝	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	所長	2006 年 6 月～2013 年 3 月
川人 光男	国際電気通信基礎技術研究所脳情報研究所	所長	2006 年 6 月～2010 年 3 月
郷 通子	情報・システム研究機構	理事	2006 年 6 月～2006 年 12 月
後藤 由季子	東京大学分子細胞生物学研究所	教授	2006 年 6 月～2013 年 3 月
近藤 滋	大阪大学大学院生命機能研究科	教授	2006 年 6 月～2013 年 3 月
榊 佳之	豊橋技術科学大学	学長	2006 年 6 月～2013 年 3 月
桜田 一洋	ソニーコンピュータサイエンス研究所	シニアリサーチャー	2006 年 6 月～2013 年 3 月
笹井 芳樹	理化学研究所発生・再生科学総合研究センター	グループディレクター	2006 年 6 月～2013 年 3 月
武藤 誠	京都大学大学院医学研究科	教授	2006 年 6 月～2013 年 3 月
垣生 園子	順天堂大学医学部	客員教授	2007 年 3 月～2013 年 3 月
平野 俊夫	大阪大学	総長	2006 年 6 月～2013 年 3 月

外部助言・評価委員

重定 南奈子	奈良女子大学/さきがけ「生命モデル」領域	名誉教授/研究総括	2011 年 9 月～2013 年 3 月

(注)所属と役職は本研究領域終了時

1.1.5　研究課題及び研究者

本研究領域はチーム型研究(CREST)と若手の個人型研究(さきがけ)を並行して実施する複合型研究領域である。さきがけ研究においては、研究提案における構想の改新性、独自性、論理性、及び研究実績における本人の貢献度を重視し、また若手研究者の育成を推進するために 40 才以下の研究者が採択された。

採択された 38 名の研究者のうち 2 名は内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)」に採択されたため、2 年経過後に研究を終了している。そのうち 1 名は本調査の対象外とした。

表 1-2　研究課題と研究者(第 1 期、第 2 期、第 3 期)

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第 1 期 (2006)	多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る	池谷 裕二	東京大学大学院薬学系研究科 講師	東京大学大学院薬学系研究科 准教授	東京大学大学院薬学系研究科 教授
第 1 期 (2006)	視覚情報の分解と統合の生体制御システム	河崎 洋志	東京大学医学部付属病院 特任助教授	東京大学医学部付属病院 特任准教授	金沢大学医薬保健研究域医学系 教授
第 1 期 (2006)	脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して	木村 幸太郎	情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 助手	大阪大学大学院理学研究科准教授	大阪大学大学院理学研究科 准教授
第 1 期 (2006)	モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明	高坂 智之	㈱海洋バイオテクノロジー研究所 研究員	山口大学農学部生物機能科学科 助教	山口大学農学部生物機能科学科 助教

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第1期 (2006)	神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析	眞田 佳門	東京大学大学院理学系研究科 助手	東京大学大学院理学系研究科 附属遺伝子実験施設 准教授	東京大学大学院理学系研究科 准教授
第1期 (2006)	RNA ポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索	新矢 恭子	鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症研究センター 助教授	神戸大学医学部附属医学医療国際交流センター 准教授	滋慶医療科学大学院大学医療管理学研究科 教授
第1期 (2006)	細胞膜形態決定の動作原理の解明	末次 志郎	東京大学医科学研究所 腫瘍分子医学 助手	東京大学分子細胞生物学研究所 准教授	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授
第1期 (2006)	味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤	杉田 誠	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助手	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授	広島大学大学院医歯薬保健学研究科 教授
第1期 (2006)	分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証	田中 裕人	(独)科学技術振興機構ソフトナノマシンプロジェクト 研究員	(独)情報通信研究機構 主任研究員	国立研究開発法人情報通信研究機構 NICT 未来 ICT 研究所 主任研究員
第1期 (2006)	タイミングの予測に関与する脳ネットワークの検証	田中 真樹	北海道大学大学院医学研究科 講師	北海道大学大学院医学研究科 准教授	北海道大学大学院医学研究院・医学院 教授
第1期 (2006)	サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析	中原 潔	東京大学大学院医学系研究科 講師	国立精神・神経センター 神経研究所 モデル動物開発部 室長	高知工科大学情報学群 総合研究所・脳コミュニケーション研究センター 教授
第1期 (2006)	レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明	細川 千絵	(独)産業技術総合研究所 健康工学研究部門 研究員	(独)産業技術総合研究所 健康工学研究部門 研究員	産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門主任研究員
第1期 (2006)	相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い	堀川 一樹	東京大学大学院理学系研究科 助手	北海道大学電子科学研究所ニコンバイオイメージングセンター 特任准教授	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
第1期 (2006)	真核細胞の in vivo ロバストネス解析	守屋 央朗	(独)科学技術振興機構北野共生システムプロジェクト 研究員	岡山大学異分野融合先端研究コア 特任助教	岡山大学大学院環境生命科学研究科 准教授
第1期 (2006)	細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス	山本 希美子	東京大学大学院医学系研究科 講師	東京大学大学院医学系研究科 講師	東京大学大学院医学系研究科 准教授
第2期 (2007)	胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発	秋山 泰身	東京大学医科学研究所 講師	東京大学医科学研究所 准教授	理化学研究所生命統合医科学研究センター チームリーダー

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第2期 (2007)	環境適応に関わる時空間パターン形成現象の分子ネットワーク	岩崎 秀雄	早稲田大学理工学術院 准教授	早稲田大学理工学術院 准教授	早稲田大学理工学術院電気･情報生命工学科 教授
第2期 (2007)	リズミカルな連続運動の神経基盤の解析	木津川 尚史	大阪大学大学院生命機能研究科 准教授	大阪大学大学院生命機能研究科 准教授	大阪大学大学院生命機能研究科 准教授
第2期 (2007)	匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明	小早川 令子	さきがけ 専任研究者	大阪バイオサイエンス研究所 室長	関西医科大学医学部 学長特命教授
第2期 (2007)	脳内を縦横に結ぶ意思決定リンク	小村 豊	(独)産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 主任研究員	(独)産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 主任研究員	京都大学こころの未来研究センター 教授
第2期 (2007)	小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御	田中 敬子	Duke University Medical Center Research Associate	韓国科学技術研究所機能コネクトミクスセンター 主任研究員	Korea Institute of Science and Technology Principal Research Scientist
第2期 (2007)	生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明	原田 伊知郎	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 助手	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 助教	社会医療法人社団蛍水会名戸ヶ谷病院(名戸ヶ谷研究所メカノメディスン部門) 主任研究員
第2期 (2007)	花粉管ガイダンスの動的システムの解明	東山 哲也	名古屋大学大学院理学研究科 教授	名古屋大学大学院理学研究科 教授	名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 生殖分子情報学研究室 教授
第2期 (2007)	シナプス強度を決定する基本原理の解明	深田 優子	自然科学研究機構 生理学研究所 研究員	自然科学研究機構 生理学研究所 准教授	自然科学研究機構 生理学研究所分子細胞生理研究領域 生体膜研究部門 准教授
第2期 (2007)	脳細胞光制御を用いた神経グリア相互作用の解明	松井 広	自然科学研究機構 生理学研究所 助教	自然科学研究機構 生理学研究所 助教	東北大学大学院生命科学研究科教授
第3期 (2008)	植物分裂組織の再生システム	伊藤 寿朗	テマセック生命科学研究所 主任研究員	テマセック生命科学研究所 主任研究員	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 教授
第3期 (2008)	アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明	岩楯 好昭	山口大学大学院医学系研究科 助教	山口大学大学院医学系研究科 准教授	山口大学大学院創成科学研究科 教授
第3期 (2008)	母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明	大杉 美穂	東京大学医科学研究所 准教授	東京大学医科学研究所 准教授	東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 教授
第3期 (2008)	植物の概日振動子の観測と相互作用の検出	小山 時隆	京都大学大学院理学研究科 准教授	京都大学大学院理学研究科 准教授	京都大学大学院理学研究科准教授

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第3期 (2008)	網膜ON・ OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析	小池 千恵子	大阪バイオサイエンス研究所 研究員	立命館大学薬学部 准教授	立命館大学大学院生命科学研究科 教授
第3期 (2008)	核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明	佐藤 政充	東京大学大学院理学系研究科 助教	東京大学大学院理学系研究科 助教	早稲田大学先進理工学部 生命医科学科 准教授
第3期 (2008)	自然免疫反応におけるシェディングの役割と制御機構	白壁 恭子	東京大学医科学研究所 日本学術振興会 特別研究員	慶応義塾大学 特任講師	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 特任准教授
第3期 (2008)	１分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明	鈴木 健一	JST さきがけ 研究者	京都大学物質細胞統合システム拠点 准教授	岐阜大学研究推進・社会連携機構 生命の鎖統合研究センター(G-CHAIN) 教授
第3期 (2008)	指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明	鈴木 孝幸	東北大学加齢医学研究所 助教	名古屋大学理学部 助教	名古屋大学大学院理学研究科講師
第3期 (2008)	植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク	鳥居 啓子	ワシントン大学生物学部 准教授	ワシントン大学生物学部 教授	ワシントン大学 生物学部　教授/ハワードヒューズ医学研究所　研究員/名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所客員教授
第3期 (2008)	可視化を通して解析する消化管粘膜免疫系の誘導維持機構	本田 賢也	大阪大学医学系研究科免疫制御学教室 准教授	東京大学大学院医学系研究科 准教授	慶應義塾大学医学部 教授
第3期 (2008)	細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明	南野 徹	大阪大学大学院生命機能研究科 助教	大阪大学大学院生命機能研究科 准教授	大阪大学大学院生命機能研究科 准教授
第3期 (2008)(*)	重力受容を可能にするオルガネラ動態制御の分子基盤	森田 美代	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス 准教授	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス 准教授	名古屋大学大学院生命農学研究科 教授

2018年2月20日調査

(*)第3期に2011年度、最先端・次世代プロジェクトに移行したため本追跡調査の対象外とした。

1.2　研究領域終了後の発展と波及効果

1.2.1　研究成果の発展状況や活用状況

本研究領域では生命システムの動作原理を理解することを目的としており、その研究対象は脳・神経システムや、様々な細胞、微生物や個体、あるいは植物であり、また、その研究分野も発生、分化、運動や行動や様々なレベルでのネットワークの形成などと広範囲にわたっている。これらについてそれぞれのレベルの動的な現象を分子レベルで時空間的に捉えることを目指して、広範な研究が展開された。そのために本研究領域では新たなイメージング手法、網羅的解析や計測法などの技術開発が積極的に進められ、その後の生命現象の動的理解を進めるための研究の基盤技術となった。これらの発展状況を以下に示す。

(ｉ)脳・神経系システムの動作原理

本研究領域の課題の約 1/3 が脳・神経系システムに関連した研究で占められ、発生段階からネットワーク形成、行動科学まで、また分子レベルから個体レベルまでの幅広い分野で研究が展開された。

脳の発生に関する研究では、フェレットを用いた実験系が開発され、脳回の形成メカニズムが明らかにされた(河崎)。また、大脳新皮質の発生期における神経細胞移動の機構や神経前駆細胞の分化における G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の関与が見いだされ、その役割も明らかになってきた(眞田)。

脳神経系のネットワークに関する研究では本研究領域の成果であるニューロンの大規模記録法をさらに発展させ、シナプス結合を効率良く探索するマッピング法が確立され、神経系の時空間的な解析による、神経回路作動の原理の解明が大きく進展した(池谷)。

神経ネットワークと行動をつなぐ研究では線虫の行動をモニターする、新たなシステムが開発され、線虫の匂いに対する忌避行動を引き起こす神経回路が明らかにされた(木村)。また、マウスに複雑な連続ステップを行わせる走行装置が開発されることにより、新しい運動への適応に関与する神経システムの研究が進められた(木津川)。マウスの匂いに対する忌避行動を規定する神経回路研究では、マウスの天敵の匂いに対する判断が先天的に決まることと、それに関与する脳部位が明らかになった(小早川)。霊長類を用いた高次機能の神経回路の研究では、行動解析により、意思決定において視床枕ニューロンの関与が明らかになった(小村)。また、サルを用いた行動解析の研究では、「状況に応じた行動選択」に大脳-基底核ループが関与することや、出来事を予測し、タイミングを得た意思決定を行うという神経機構に関与する部位を明らかにした(田中真樹)。また、脳波による行動解析を行うことにより、記憶の形成における脳の領野間のメゾスコピックな神経回路の再編の重要性が示された(中原)。

神経細胞の分子レベルの研究では、神経細胞表面に局在する接着分子 1 分子計測技術が確立された(細川)。脳の可塑性に関する長期抑制の分子メカニズム研究において、ポジティ

ブフィードバックループの存在とその意義が明らかになった(田中敬子)。また、シナプス強度を決定する分子基盤の研究を発展させ、てんかんの発症機構が示された(深田)。新たなオプトジェネティック技術を開発することにより神経制御に関与するグリア細胞の関与するメカニズムが明らかになった(松井)。また、網膜細胞の運命決定と成熟に関与する因子が明らかになった(小池)。

(ⅱ)細胞・微生物・器官における動作原理の解明

本研究領域及びその発展研究では、細胞・微生物・器官の動的現象に関する時空間的な観点から様々な研究が行われた。ここでは研究対象ごとに相互に関連した研究をまとめた。

細胞膜の形態変化の分子機構に関する研究では、細胞膜のエンドサイトーシスなど細胞膜の形態変化を引き起こす普遍的な分子機構が明らかにされ、この結果はがんの浸潤における細胞膜の形態変化の機構に関する研究に発展した(末次)。細胞膜でのシグナル伝達に関する研究では、脂質ラフトの形成における膜受容体タンパク質の多量体化の機構が調べられ、タンパク質相互作用とともに脂質相互作用の重要性が明らかになった(鈴木健一)。また、マクロファージの膜受容体タンパク質におけるシェディング(細胞膜タンパク質の膜外での切断)が選択的に起こることとその意義が明らかにされた(白壁)。動脈硬化の発症に関連し、血流による力学的刺激であるshear stressに起因する様々な血管内皮細胞の応答が見いだされ、内皮細胞の形質膜が血流センサーとして働くことが示された(山本)。

免疫系に関する研究では、本研究領域においてマウスの腸内細菌による消化管免疫系細胞の誘導が見いだされたが、さらにヒトの様々な腸内細菌による免疫誘導も明らかにされ、その後の成人病など、疾患と腸内細菌の関連性に関する広範な研究へのきっかけとなった(本田)。また、胸腺髄質上皮細胞の分化を制御する因子とそれによる自己免疫寛容を誘導する分子機構の研究が展開された(秋山)。

細胞運動に関連した研究では、細菌べん毛のタンパク質輸送装置を構成する多数の分子が同定され、その分子機構が明らかになった。また、べん毛運動がプロトン駆動によることが明らかにされた(南野)。アメーバ運動の研究では魚類表皮の遊走細胞の形を決定するモデルが構築され(岩楯)、また、田中裕人により分子モーターシステムのモデル構築が行われた。

発生に関する研究では、哺乳類の初期発生の細胞分裂期において染色体の運動に関与するキネシン様モーター分子(Kid)の機能解明が進んだ(大杉)。また、酵母を用いた系では、発生期の細胞分裂における微小管の変化についての研究が進められた(佐藤)。発生における体の形態形成の機構についてニワトリ後肢を用いて組織の動的な変形パターン解析が行われ、肢芽の伸長について研究が進められている(鈴木孝幸)。

その他、遺伝子解析による研究として、古細菌の共生を可能にする遺伝子群の研究(高坂)、シアノバクテリアを用いた概日時計における遺伝子群のパターンの研究が進められた(岩崎)。また、ヒトインフルエンザウイルスの研究では、遺伝子変異の起こりやすさにおける、

RNA ポリメラーゼ遺伝子の重要性が示された(新矢)。細胞が環境変化に耐える指標に関する研究において、酵母を用いた多様なタンパク質発現量を増減させる系が開発され、発現量に対する細胞の頑健性(ロバストネス)が調べられた(守屋)。細胞と細胞外マトリクスにおけるメカノトランスダクションに関する研究では、その研究のための基板が開発され、細胞の集団的挙動の研究が進められた(原田)。

(iii)植物の発生・分化の動的メカニズム

植物を対象とした研究において、本研究領域での東山による花粉管ガイダンス分子の発見は、さらに ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」に発展した。そこでは様々な化学や工学分野との共同研究を通じて、花粉管の伸長の機構や、重複受精などの動的なメカニズムが分子レベルで次々に明らかにされ、植物の受精機構の理解が大きく進展した。また、気孔の発生機構の研究では、気孔の数を制御するペプチドホルモンが見いだされ、その動的な制御機構が明らかになった(鳥居)。花発生と分化における制御メカニズム研究では伊藤により、ヒストン修飾による花発生の制御についての分子機構の研究が進められた。また、ウキクサの概日リズムの研究では小山により、その種ごとの多様性が示された。

1.2.2 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果

(1)研究成果の科学技術の進歩への貢献

本研究領域では生命システムの動作原理を明らかにするため、新たな基盤技術としてのツールやシステムが開発され、その成果はその後の科学技術に貢献している。

脳・神経系研究においては、池谷の「大規模ニューロン Ca^{2+}イメージング法」を始めとするイメージング技術の開発により海馬や大脳皮質の神経ネットワークの解明に大きく貢献し、その後の神経ネットワークの理解を大きく進展させ、日本学士院学術奨励賞など、多くの受賞につながった。また、松井による新しいオプトジェネティック手法の開発は脳の神経伝達における制御機構としてグリア細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにすると同時に、オプトジェネティック技術の普及にも貢献した。

細胞膜の形態に関する研究では、末次により細胞内タンパク質の立体構造に基づく、細胞の陥入構造や突出構造の形成といった形態変化のメカニズムが明らかにされるとともにその細胞膜形態のモデル構造は一般的に認められるようになった。

本田の腸内細菌の研究ではノトバイオート技術、次世代シーケンサーと腸内細菌の培養技術を組み合わせた腸内細菌カクテルの同定法が確立され、その後の腸内細菌による疾患治療法開発への道を開くと同時に、そのメカニズム研究の大きな基盤技術となった。

植物を対象とした研究では、東山による本研究領域での花粉管ガイダンス分子の発見の成果は ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」や「世界トップレベル研究拠点プログラム(WPI)」に引き継がれ、植物の受精の動的なメカニズム研究が大きく進展し、花粉管の

伸長から受精に至るメカニズムが次々に明らかにされた。被子植物に見られる重複受精では、一つの胚珠が 1 本の花粉管のみを誘引・受容するための花粉管誘引停止のメカニズムも解明され、重複受精の制御メカニズムが明らかになった。花粉管誘引物質、LURE についてはその受容体や花粉管に誘引物質への応答能を与える物質、AMOR の発見など、分子レベルでも植物の受精のメカニズムが明らかになった。また、花粉管誘引物質、LURE が強い種の選択性を示し、生殖隔離障壁となっていることも明らかにされ、植物の育種においても重要な知見が得られている。またこれらの成果を得るために重要な役割を果たした「ライブイメージング技術」は化学合成やナノ工学の技術を組み合わせることにより、さらに発展し、上記のような様々な科学上の発見に大きく貢献した。また、これらの技術と手法の開発は、植物研究に留まらず科学技術研究に大きな影響を与えている。

気孔の形成に関する研究では、鳥居により、形成される気孔の数が、拮抗する 2 種類のペプチドにより制御されるというユニークな現象が見いだされた。また、同時に気孔を増やす化合物も見いだされ、地球環境の観点からも科学技術のみならず応用の面でも大きな貢献をしている。

(2)研究成果の応用に向けた発展状況

本研究領域とその後の研究成果の多くは、創薬を含む医療分野や農業分野への応用などをターゲットとした研究や事業化に向けた技術開発の動きにつながっている。

脳神経系については多くの研究で治療法の開発等、医療分野への応用が期待される成果を生んでいる。内閣府 NEXT プログラムでは、幼児期の熱性けいれんによる海馬の発達障害がてんかんの発症を引き起こすことが動物実験で示され、その発症を抑制する物質を見いだすことにより、新たな抗てんかん薬の開発につながる結果が得られた(池谷)。また、後天的てんかんの発症に関わる遺伝子とともに、その発症を軽減あるいは抑制する分子が見いだされ、抗てんかん薬の開発に示唆を与える結果が得られた(深田)。フェレットを用いた脳回の研究に基づき脳異常疾患モデルが作製され、治療法の開発につながる知見が得られた(河崎)。小早川による匂いに対する忌避行動の研究では、先天的及び後天的恐怖を分離して計測・評価するための指標が開発され、また、強力な先天的恐怖を誘発する匂い分子が見いだされた。これは「動物用忌避剤」として、特許登録され、これに基づきベンチャー企業、脳科学香料株式会社が設立された。

血管のメカノバイオロジー研究では、培養内皮細胞に shear stress を作用させて細胞応答を定量的に観察する独自の実験法が開発された。これはさらに AMED-CREST の革新的先端研究開発支援事業に発展し、脳動脈瘤患者の増大や脳動脈瘤の破裂の危険性の診断へ向けた研究が進められている(山本)。本研究領域の膜形態形成に関する研究は、内閣府 NEXT プログラムにおいて、細胞膜形成とがん浸潤との関連に着目した研究が進められ、膜形態形成の阻害によりがんの形成が抑制されることが見いだされた(末次)。

本田により見いだされた制御性 T 細胞を誘導するヒトの腸内細菌株は、治療薬として既

に実用段階に入っており、そのライセンスを受けた米国のベンチャー企業において、バクテリアセラピーの開発が進められている。また、腸内細菌による免疫系細胞の誘導はその後も発展し、免疫系以外の糖尿病や動脈硬化など広範な疾患と腸内細菌についての研究に発展した。現在では AMED-CREST、PRIME、及び LEAP プログラム等において、本田のみならず、多くの研究者により、腸内細菌と様々な疾患との関連に関する研究や治療法開発や医薬品開発研究が進められている。

植物に関する研究では、ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」において、花粉管誘引物質が強い種選択性を持ち、生殖隔離障壁となっていることが明らかにされ、障壁を越える方法を開発すれば新たな交雑種を生み出すことが示唆された(東山)。科研費新学術領域研究「受精における種間障壁のメカニズム解明とその打破」ではこの考えに基づき、新たな交雑種の作出を目指した研究が行われている。また、東山により開発された植物透明化試薬 ClearSee®は富士フイルム和光純薬(株)から販売され、植物研究の新たな研究技術として利用されている。また、生理活性物質 AMOR とゲノム編集ベクター「KAMA-ITACHI」は特許出願され、国内メーカーから販売が計画されている。

1.3　研究領域の展開状況(系譜図)

本研究領域の戦略目標は、生命システムの動作原理を明らかにし、そこで開発された基盤技術を医療やバイオエンジニアリングなどのイノベーションの創出につなげることを狙いとしている。その目的は「生命システムを構成する分子の時空間動態を解析する」ことであるが、研究分野や技術は分子生物学、生体工学、電気生理学、行動科学、バイオイメージングなどと幅広く、また研究対象も遺伝子、分子から、細胞、微生物、器官、動物個体、植物等と多岐にわたっている。ここでは本研究領域での研究成果の展開状況を、その研究分野ごとに脳神経系、器官、細胞、植物などに分け、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)、日本学術振興会(JSPS)、科学研究費助成事業(科研費)、あるいは国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)などによる大型研究助成金を取り上げ、系譜図として図 1-1 にまとめた。

脳・神経系のプロジェクトでは、池谷による同時に多数のニューロンを大規模記録する「多ニューロン Ca^{2+}イメージング法」は、神経活動を動的に捉える技術として、本研究領域に引き続き、JST さきがけ、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)、科研費新学術領域研究、科研費基盤研究といった多くの大型助成金を得て、大脳皮質や海馬の神経ネットワークの基礎研究や、疾患の発症や治療法に関連した応用研究が展開されている。

脳・神経と関連して、動物の行動や運動の神経機構の解明が本研究領域から発展し、霊長類の行動科学における時間軸を含む研究が科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「計時と予測の神経機構の探究」で展開されている(田中真樹)。小早川の JST 産学連携・技術移転事業 A-STEP「害獣忌避剤のコントロールドリリース技術の開発」も嗅覚の研究から発展し実用化が期待されており、これら大型の助成金を得ているプロジェクトの多くは、疾患あるいは脳・神経系研究の応用展開が期待されている。

本研究領域で消化管粘膜免疫系の活性化機構の解明と可視化を目的として始まった本田の研究は、「腸内細菌による免疫細胞の誘導」という発見により、一気に応用研究へ舵を切った。そこで確立された疾患に関与する腸内細菌の同定技術を用い、腸内細菌と免疫系疾患、さらには糖尿病などの成人病の治療を目的としたプロジェクトに展開されている。本研究領域に続いて、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)、AMED-CREST、革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ(LEAP)といった大型助成金を得て、疾患治療法や医薬品の創製を目指した研究が展開されている。その他、細胞や組織に関連した研究では末次は細胞膜の形態変化に関する研究が NEXT プログラムで、また動脈硬化に関連して、血管内皮細胞の血流を感知する機構の解明といった研究が AMED-CREST で展開されている。

一方、植物の研究では、本研究領域でその有用性が示されたライブイメージング技術はそれに引き続く ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」でさらに発展し、多くの大型プロジェクトで展開されている。

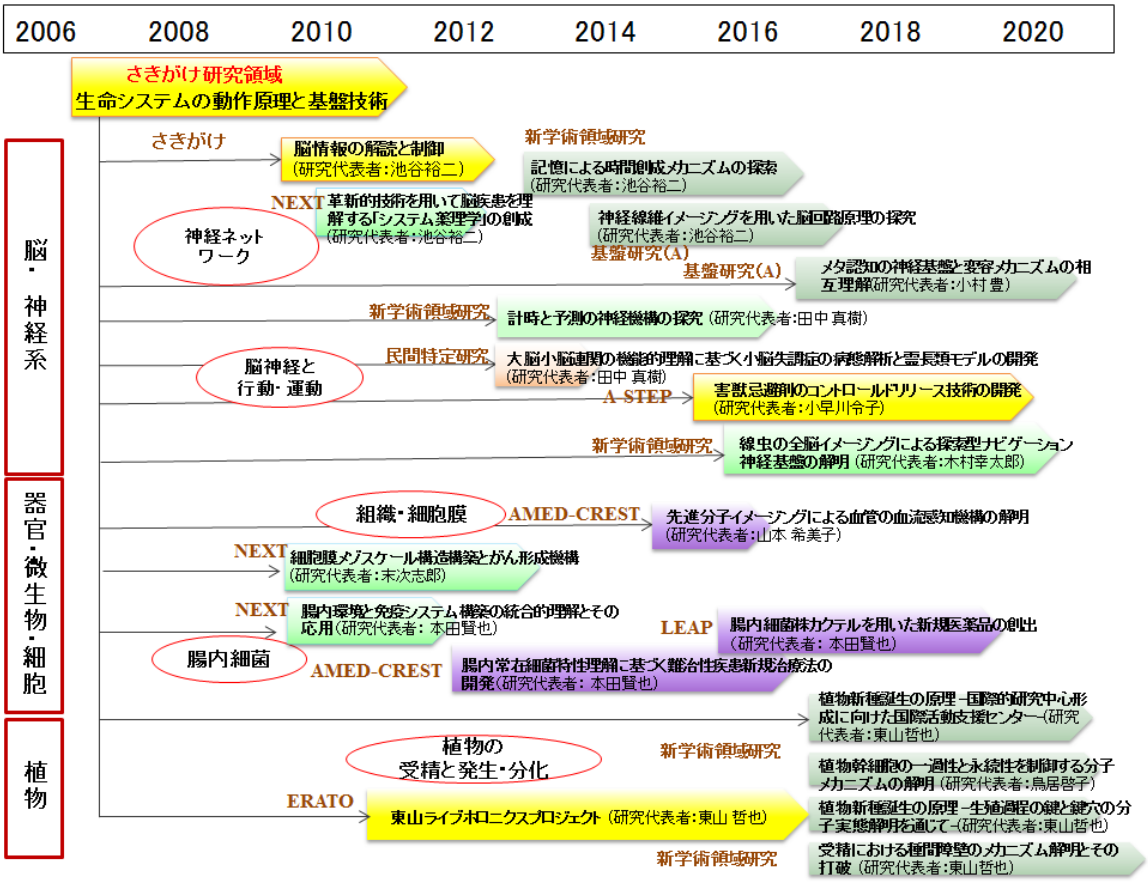


図 1-1 研究領域(さきがけ)の系譜図

第 2 章　追跡調査(研究領域全体動向)

2.1　追跡調査について

2.1.1　調査の目的

追跡調査は研究終了後、一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、科学技術振興機構(JST)の事業及び事業運営の改善に資するために行うもので、研究領域終了後の研究者の研究課題の発展状況等を調査した。

2.1.2　調査の対象

本追跡調査はさきがけ研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術(2006 年度～2012 年度)」の研究者のうち、「最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)」に採択された 1 名を除く 37 名を対象とした。表 2-1 に調査対象と調査対象期間を示す。

表 2-1　調査対象と調査対象期間

	さきがけ調査対象期間	さきがけ終了後の調査対象期間	研究課題数
第 1 期	2006 年 10 月～2010 年 3 月	2010 年 4 月～2017 年調査終了月	15
第 2 期	2007 年 10 月～2011 年 3 月	2011 年 4 月～2017 年調査終了月	10
第 3 期	2008 年 10 月～2012 年 3 月	2012 年 4 月～2017 年調査終了月	12

(注)各期の研究者のうちそれぞれ 1 名はライフイベントのため 1 年間延長され、第 3 期は 2012 年 9 月に終了した。また、第 3 期の調査対象研究者 1 名は、最先端・次世代プロジェクトに移行したため 1 年間短縮された。

2.1.3　調査方法

(1)研究助成金

本研究領域の研究者が研究代表者となっているプロジェクトを中心に調査した。その中から、助成金の総額が 1 千万円/件以上のものを抽出した。

研究助成金の獲得状況の調査については、主に下記の WEB サイトを利用した。

・研究者の研究室、若しくは所属している研究室の WEB サイト
・競争的研究資金の担当機関の WEB サイト
・競争的研究資金の担当機関データベース検索(科学研究費助成事業データベースなど)

次のとおりリスト作成の手順を記載する。

手順 1：JST 戦略的創造研究推進事業、JST 研究成果展開事業、科研費(新学術領域研究、基盤研究、若手研究で 1 千万円/件以上)、最先端・次世代研究開発支援プログラム、AMED プロジェクトなど比較的大型の外部研究資金の獲得状況を調査。

手順 2：さらに研究代表者となっているもののみを抽出。

手順 3：データベース等で内容を確認。

手順 4：一覧表を作成。

(2)論文

論文の抽出は、文献データベース Scopus(エルゼビア社)を用い、研究者の著者名検索により論文リストを出力し、article と review に絞り込み、①さきがけの研究成果、②さきがけの研究成果の継続と発展に関するもの、③さきがけと無関係と思われるものに分類し、①及び②の論文数を求めた。この分類に関しては研究者が確認し、決定した。また、さきがけの研究成果の継続と発展に関する論文については、責任著者として研究者が First 又は Last Author、あるいは連絡先著者となっている論文数を調べた。また、各論文の書誌 ID を入手し、調査時点での被引用数、被引用数の当該分野における Top1%、Top10%、10%圏外のランクに分類した。

表 2-2　論文検索対象期間

採択年	研究期間	検索対象期間	
		期間中	終了から調査時点
第 1 期(2006)	2006 年 10 月～2010 年 3 月	2007 年 1 月～2010 年 12 月	2011 年 1 月以降
第 2 期(2007)	2007 年 10 月～2011 年 3 月	2008 年 1 月～2011 年 12 月	2012 年 1 月以降
第 3 期(2008)	2008 年 10 月～2012 年 3 月	2009 年 1 月～2012 年 12 月	2013 年 1 月以降

調査時期 2018 年 2 月 20 日

(3)特許

特許出願及び登録状況は、特許データベース Shareresearch(株式会社日立製作所)を用い、本研究領域から研究者が発明者となり出願し登録された特許を表 2-5 にまとめた。その発明の名称からそれぞれの研究課題と関連していないと思われるものを上記と同様に除いた。

2.2　研究成果概要

2.2.1　研究助成金

本研究領域が開始されて以降、各研究者が研究代表者として獲得した助成金のリストを表 2-3 に示す。ここでは、助成金額が 1 千万円/件以上のものだけを取り上げた。研究者は、これらのほかにも助成金(研究分担者として、あるいは研究代表者であるが比較的少額(1 千万円/件未満))を獲得して研究を進めている。

表 2-3　研究者の研究助成金獲得状況

JST　科研費　文部科学省　内閣府　AMED　その他民間財団等

本研究領域開始以降に開始されたプロジェクトで助成金総額が 1 千万円/件以上のもののみを抽出した。

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額(百万円)
池谷 裕二	2006～2009	さきがけ	多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る	JST	JST	JST	JST													42.0
	2009～2012	さきがけ	神経回路網が示す自発的可塑性のルール抽出と制御				JST	JST	JST	JST										40.0
	2010～2013	科研費 若手研究(A)	脳回路のセルフリライト性の探求					科研費	科研費	科研費	科研費									15.7
	2010～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	メゾ回路のグラフ依存的な演算特性の解析					科研費	科研費	科研費	科研費	科研費								19.1
	2010～2013	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	革新的技術を用いて脳疾患を理解する「システム薬理学」の創成					内閣府	内閣府	内閣府	内閣府									159.0
	2013～2017	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	記憶による時間創成メカニズムの探索								科研費	科研費	科研費	科研費	科研費					85.7
	2014～2017	科研費 基盤研究(A)	神経線維イメージングを用いた脳回路原理の探究									科研費	科研費	科研費	科研費					39.9
河崎 洋志	2006～2009	さきがけ	視覚情報の分解と統合の生体制御システム	JST	JST	JST	JST													43.0
	2013～2016	科研費 基盤研究(B)	高等哺乳動物を用いた脳神経系形成メカニズムの解明								科研費	科研費	科研費	科研費						17.4
	2016	生命科学研究助成	脳神経系の形成制御機構とその異常による疾患病態の解明											その他民間財団等						10.0
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	高等哺乳動物を用いた脳神経系形成メカニズムの解明												科研費	科研費	科研費			17.4
木村幸太郎	2006～2009	さきがけ	脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して	JST	JST	JST	JST													41.0

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額(百万円)
	2011～2012	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	線虫C.elegansの匂い応答行動を制御する神経ネットワークの統合的機能解析						■	■										11.6
	2016～2020	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	線虫の全脳イメージングによる探索型ナビゲーション神経基盤の解明											■	■	■	■	■		87.8
高坂 智之	2006～2009	さきがけ	モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明	■	■	■	■													36.0
眞田 佳門	2006～2009	さきがけ	神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析	■	■	■	■													40.0
	2006～2008	科研費 若手研究(A)	大脳新皮質の神経前駆細胞におけるG蛋白質シグナリングの役割	■	■	■														21.7
	2009～2012	科研費 基盤研究(B)	大脳新皮質における神経細胞の発生および維持に関与する分子機構の解析				■	■	■	■										19.0
	2011～2012	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	大脳新皮質における神経細胞の極性化を司る分子基盤の解析						■	■										10.3
新矢 恭子	2006～2009	さきがけ	RNAポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索	■	■	■	■													38.0
	2013～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	ウイルス感染時の細胞・個体レベルでの網羅的状態把握法の確立とその応用								■	■								23.4
末次 志郎	2006～2009	さきがけ	細胞膜形態決定の動作原理の解明	■	■	■	■													41.0
	2008～2010	科研費 若手研究(A)	細胞移動先端における重層的アクチン細胞骨格制御の研究			■	■	■												26.4
	2010～2013	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	細胞膜メゾスケール構造構築とがん形成機構					■	■	■	■									162.5
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	細胞膜突出構造の膜形態制御機構と生理機能									■	■	■						16.6
	2015～2016	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	タンパク質ポリマー形成による動的膜形態形成の直接可視化による解明										■	■						11.7
	2017～2018	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	数理解析を目指した超解像顕微鏡によるシグナル伝達タンパク質の実濃度測定												■	■				11.4
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	細胞膜突出構造におけるBARタンパク質の集合機構とその生理機能												■	■	■			17.4
杉田 誠	2006～2009	さきがけ	味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤	■	■	■	■													35.0
田中 裕人	2006～2009	さきがけ	分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証	■	■	■	■													29.0

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額(百万円)
田中 真樹	2006～2009	さきがけ	タイミングの予測に関与する脳ネットワークの検証	■	■	■	■													40.0
	2008～2010	科研費 基盤研究(B)	ルールに基づいた行動選択における大脳皮質・基底核ループの役割			■	■	■												19.6
	2011～2014	科研費 基盤研究(B)	小脳と基底核による時間情報の処理機構						■	■	■	■								20.2
	2012～2013	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	タイミング予測と意思決定に関わる皮質下信号の解析							■	■									24.2
	2013	特定研究助成	大脳小脳連関の機能的理解に基づく小脳失調症の病態解析と霊長類モデルの開発								■									48.0
	2013～2017	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	計時と予測の神経機構の探究								■	■	■	■	■					85.7
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	霊長類における皮質線条体経路の動的制御機構												■	■	■			17.2
中原 潔	2006～2009	さきがけ	サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析	■	■	■	■													38.0
	2013～2016	科研費 基盤研究(B)	多点皮質電極記録による霊長類内側側頭葉における記憶想起機構の研究								■	■	■	■						19.8
	2017～2020	科研費 基盤研究(A)	脳の通奏低音―認知・意識における自発的脳活動の機能解明												■	■	■	■		43.4
	2017～2019	科研費 挑戦的研究(開拓)	脳の時空間パターン刺激で記憶を再生する												■	■	■			26.0
細川 千絵	2006～2010	さきがけ	レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明	■	■	■	■	■												41.0
	2013～2016	科研費 若手研究(A)	集光レーザー摂動による神経細胞ネットワークダイナミクスの解明								■	■	■	■						23.9
	2017～2020	科研費 基盤研究(B)	レーザー誘起細胞内分子秩序化による神経活動ダイナミクスの制御												■	■	■	■		16.3
堀川 一樹	2006～2009	さきがけ	相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い	■	■	■	■													39.0
	2013～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	マクロファージの異常な活性化に起因する慢性炎症発症機序の解明								■	■								10.7
守屋 央朗	2006～2009	さきがけ	真核細胞の in vivo ロバストネス解析	■	■	■	■													43.0
	2009～2010	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	遺伝情報場へのフィードバックの同定				■	■												10.4
	2011～2012	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	情報場への摂動を緩衝するメカニズムの解明						■	■										10.1

研究者	研究期間（年度）	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額（百万円）
	2011～2013	科研費 基盤研究(B)	酵母の量的均衡遺伝子が作るネットワークの全容解明						■	■	■									20.2
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	化学量不均衡を避けるメカニズムの解明									■	■	■						17.4
	2016～2018	科研費 国際共同研究強化	化学量不均衡を避けるメカニズムの解明（国際共同研究強化）											■	■	■				14.4
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	過剰発現により輸送リソースの過負荷を引き起こすタンパク質の体系的解析												■	■	■			17.2
山本 希美子	2006～2009	さきがけ	細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス	■	■	■	■													41.0
	2007～2009	科研費 基盤研究(B)	流れ剪断応力下における内皮細胞膜分子の動態挙動		■	■	■													19.0
	2010～2012	科研費 基盤研究(B)	血管内皮細胞における血流刺激のメカノトランスダクション機構の解明					■	■	■										18.3
	2013～2015	「産業基盤の創生」研究助成	先進分子イメージングによる血管の血流感知機構の解明								■	■	■							20.0
	2013～2015	科研費 基盤研究(B)	流れずり応力に対する内皮細胞形質膜の力学応答								■	■	■							19.0
	2013～2017	動脈硬化研究奨励会研究助成	アテローム形成に関わる血流依存性内皮下 LDL 蓄積の分子機構の解明								■	■	■	■	■					13.0
	2015～2020	AMED-CREST	血管のメカノバイオロジー：血流センシングと脳動脈瘤形成の分子機構										■	■	■	■	■			500.0
秋山 泰身	2007～2010	さきがけ	胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発		■	■	■	■												41.0
	2009～2011	科研費 基盤研究(B)	自己免疫寛容に必須な微小環境を形成する遺伝子発現制御機構の解析				■	■	■											18.6
	2012～2014	科研費 基盤研究(B)	自己免疫を抑制するリンパ組織微小環境成立の分子機構							■	■	■								18.7
	2015～2016	科研費 新学術領域研究（研究領域提案型）	自己免疫寛容に必要な胸腺上皮細胞の特性を決定する分子機構の解明										■	■						11.7
	2016～2017	科研費 新学術領域研究（研究領域提案型）	重力依存的な胸腺組織微小環境の機能制御											■	■					10.4
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	自己免疫疾患発症を抑制する胸腺上皮細胞の機能を制御する新規転写因子の解析												■	■	■			17.4
岩崎 秀雄	2007～2010	さきがけ	環境適応に関わる時空間パターン形成現象の分子ネットワーク		■	■	■	■												41.0
	2008～2010	科研費 基盤研究(B)	シアノバクテリアゲノムの日周適応ダイナミクス			■	■	■												20.7

研究者	研究期間（年度）	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額（百万円）
	2011～2012	科研費 若手研究(A)	概日時計を介するシアノバクテリアの動的環境適応ダイナミクス						■	■										28.3
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	概日時計を介する明暗サイクル下でのシアノバクテリアの生存戦略										■	■	■					16.3
木津川 尚史	2007～2010	さきがけ	リズミカルな連続運動の神経基盤の解析		■	■	■	■												40.0
小早川 令子	2007～2011	さきがけ	匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明		■	■	■	■	■											42.0
	2011～2013	科研費 基盤研究(B)	先天的と後天的な恐怖反応を特異的に制御する神経回路の解明						■	■	■									20.4
	2016	武田報彰医学研究助成	先天的と後天的な情動行動の制御機構の解明											■						30.0
	2017～2018	科研費 新学術領域研究（研究領域提案型）	先天的と後天的な恐怖と食欲情動の統合処理メカニズムの解明												■	■				18.9
	2015～2020	A-STEP	害獣忌避剤のコントロールドリリース技術の開発										■	■	■	■	■	■		498.0
小村 豊	2007～2010	さきがけ	脳内を縦横に結ぶ意思決定リンク		■	■	■	■												40.0
	2009～2012	科研費 若手研究(A)	視知覚の「まとまり」を支える脳内ダイナミクス				■	■	■	■										25.6
	2012～2014	科研費 新学術領域研究（研究領域提案型）	意思決定における「迷い」の検知・制御メカニズム							■	■	■								21.5
	2014～2015	科研費 新学術領域研究（研究領域提案型）	意思決定の基準をセット・利用する脳内機構									■	■							14.7
	2014～2017	科研費 基盤研究(B)	メタ認知を支える神経基盤と多重モデルの解明									■	■	■	■					13.5
	2015	科研費 国際共同研究強化	メタ認知を支える神経基盤と多重モデルの解明（国際共同研究強化）										■							14.2
	2017～2018	科研費 新学術領域研究（研究領域提案型）	予測符合化モデルと、自律推論する脳機構との照合												■	■				20.3
	2017～2020	科研費 基盤研究(A)	メタ認知の神経基盤と変容メカニズムの相互理解												■	■	■	■		45.0
田中 敬子	2007～2010	さきがけ	小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御		■	■	■	■												40.0
	2016～2019	韓国研究財団 (National Research Foundation) 中堅研究者支援事業研究費	Cerebellar networks integrating multi brain functions through convergence and divergence of input information											■	■	■	■			約60.0

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額(百万円)
原田 伊知郎	2007～2010	さきがけ	生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明																	40.0
東山 哲也	2007～2010	さきがけ	花粉管ガイダンスの動的システムの解明																	40.0
	2007～2010	科研費 基盤研究(B)	レーザーインジェクションによる標的真核細胞およびオルガネラの遺伝子発現制御																	17.7
	2010～2016	ERATO	東山ライブホロニクスプロジェクト																	1,200.0
	2016～2020	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	植物新種誕生の原理 -国際的研究中心形成に向けた国際活動支援センター-																	58.4
	2016～2020	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	受精における種間障壁のメカニズム解明とその打破																	128.4
	2016～2020	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	植物新種誕生の原理 -生殖過程の鍵と鍵穴の分子実態解明を通じて-																	305.2
深田 優子	2007～2010	さきがけ	シナプス強度を決定する基本原理の解明																	40.0
	2009～2011	科研費 若手研究(A)	新規シナプス修飾分子 LGI ファミリーの生理機能の解明																	27.3
	2011～2012	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	遺伝性側頭葉てんかんのシナプス病態、神経回路病態の解明																	13.0
	2013～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	遺伝性側頭葉てんかんのシナプスおよび神経回路病態の解明																	15.1
	2015～2016	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	超解像で可視化するシナプスナノドメインに着目した精神病態表現型解析																	13.5
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス捕捉機構の解明																	18.3
松井 広	2007～2010	さきがけ	脳細胞光制御を用いた神経グリア相互作用の解明																	40.0
	2011～2012	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	光操作法による初期視覚回路特性の抽出と書き換えに伴う構造変化の解析																	10.4
	2013～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	低侵襲生体内グリア活動の可視化による神経からグリアへの信号伝達経路の解析																	10.1
	2013～2016	科研費 若手研究(A)	グリアの発する信号が神経活動・行動に及ぼす影響を探る																	24.6
	2016	科学技術研究助成	刺激惹起性抗てんかん回路の獲得と制御																	10.0

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額(百万円)
伊藤 寿朗	2008～2011	さきがけ	植物分裂組織の再生システム			■	■	■	■											40.0
	2015	自然科学助成	植物の環境記憶メカニズムの解明										■							10.0
	2015～2016	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	細胞周期の進行に伴うヒストン修飾による転写制御										■	■						11.7
	2015～2019	科研費 基盤研究(A)	花幹細胞におけるポリコム因子の導入、排除およびリン酸化シグナルによる活性調節										■	■	■	■	■			32.4
	2017～2018	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	花幹細胞の時空間性を司る複合鍵の解析												■	■				15.6
岩楯 好昭	2008～2011	さきがけ	アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明			■	■	■	■											40.0
	2015～2016	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	細胞弾性で伝わる繊毛メタクロナールウェーブの分子メカニズムと普遍性										■	■						11.8
大杉 美穂	2008～2011	さきがけ	母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明			■	■	■	■											39.0
	2013～2015	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	分裂期紡錘体極としての中心体機能・制御解析								■	■	■							12.2
	2014～2015	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	マウス卵割期胚における NC 比制御と核形態・クロマチン状態変化の解析									■	■							10.1
小山 時隆	2008～2011	さきがけ	植物の概日振動子の観測と相互作用の検出			■	■	■	■											40.0
	2012～2014	科研費 基盤研究(B)	シアノバクテリア概日時計転写出力系の多様性形成過程の実験的検証							■	■	■								17.7
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	植物の時間秩序形成過程の観測と理論												■	■	■			16.8
小池 千恵子	2008～2011	さきがけ	網膜 ON・OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析			■	■	■	■											40.0
	2012～2016	科研費 基盤研究(B)	コントラストを検出する初期視覚系の階層横断的解析と再生医療への戦略的展開							■	■	■	■	■						18.7
佐藤 政充	2008～2011	さきがけ	核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明			■	■	■	■											40.0
	2009～2011	科研費 若手研究(A)	減数分裂組み換えと染色体分配を連携させる微小管新規機能の研究				■	■	■											24.4
	2013～2016	科研費 基盤研究(B)	微小管の形成メカニズムと細胞内新機能の発見								■	■	■	■						17.9
	2015～2016	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	シングルセル発現解析と核膜変異体ライブラリーを用いた転写サイクル始動機構の解明										■	■						11.7

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額(百万円)
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	微小管の機能発見および人工制御：細胞から組織まで																	17.4
白壁恭子	2008～2012	さきがけ	自然免疫反応におけるシェディングの役割と制御機構																	40.0
	2013～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	蛍光シグナルを用いた膜タンパク質シェディングのイメージング																	10.5
鈴木健一	2008～2011	さきがけ	1分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明																	39.0
	2012～2014	科研費 基盤研究(B)	高精度1分子観察によるラフトシグナル機構の解明																	19.1
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	高精度1分子観察による基本ユニットラフト仮説の検証																	16.6
鈴木孝幸	2008～2011	さきがけ	指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明																	41.0
	2013～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	細胞動態と生化学場との統合による Anisotropy を生み出す力学場の解明																	18.7
	2013～2015	科研費 基盤研究(B)	チューリングではなく一方向阻害モデルによる指の個性と本数の決定原理の解明																	18.2
	2016～2017	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	モルフォゲンに依存しない上皮の配向した力学的拘束による肢芽の伸長機構の解明																	11.7
鳥居啓子	2008～2011	さきがけ	植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク																	40.0
	2014～2015	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	植物表皮の幹細胞維持と分化の制御ロジックに関わる内的因子と新奇化合物の探索																	11.4
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	植物の背丈伸長を制御するペプチドリガンドー受容体ペアのシグナル伝達と特異性の解析																	15.9
	2016～2017	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	新奇化合物を用いた植物気孔の発生ロジックの理解と操作																	10.1
	2017～2021	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	植物幹細胞の一過性と永続性を制御する分子メカニズムの解明																	110.5
本田賢也	2008～2010	さきがけ	可視化を通して解析する消化管粘膜免疫系の誘導維持機構																	40.0
	2009～2011	科研費 基盤研究(B)	消化管免疫系の状態を決定する腸内細菌の探索																	18.5
	2010～2012	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	腸内環境と免疫システム構築の統合的理解とその応用																	184.6

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	金額(百万円)
	2012～2016	AMED-CREST	腸内常在細菌特性理解に基づく難治性疾患新規治療法の開発							■	■	■	■	■						498.0
	2016～2020	革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ(LEAP)	腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出											■	■	■	■	■		1,500.0
南野徹	2008～2011	さきがけ	細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明			■	■	■	■											43.0
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	バクテリアべん毛輸送装置のエネルギー変換システムの分子基盤									■	■	■						16.5
	2015～2016	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	べん毛タンパク輸送システムの動的機能構造解析										■	■						11.2

2017年9月8日調査

2.2.2 論文

研究分野により多少傾向は異なるが、一般的に研究者は研究成果が得られると、学会誌等へ論文を投稿し、それを公表する。そこで、論文数は研究者の研究活動状況を示す一つの指標と考えられる。

本研究領域の全ての研究者が研究期間中及び研究終了後に発表した本研究領域に関連する原著論文を①さきがけの研究成果の論文と②さきがけの研究成果の継続と発展に関する論文に分け、その数を表 2-4 にまとめた。ここで①と②の分類は調査担当者が論文の内容に基づき行った分類結果について、それぞれの研究者が確認することにより決定した。また、その中で②さきがけの研究成果の継続と発展に関する論文については、責任著者となった論文数も示している。ここで責任著者とは、First 又は Last Author、あるいは連絡先著者を指している。

表 2-4　研究者の論文(原著論文)数

期(採択年度)	研究課題	研究者	①さきがけの研究成果の論文数	②さきがけの研究成果の継続と発展に関する論文数	左記②の論文のうち責任著者の論文数
第 1 期(2006)	多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る	池谷 裕二	26	69	56
	視覚情報の分解と統合の生体制御システム	河崎 洋志	6	24	22
	脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して	木村 幸太郎	3	7	5
	モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明	高坂 智之	4	2	0
	神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析	眞田 佳門	7	9	7
	RNA ポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索	新矢 恭子	13	12	6
	細胞膜形態決定の動作原理の解明	末次 志郎	18	19	15
	味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤	杉田 誠	1	1	1
	分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証	田中 裕人	2	3	1
	タイミングの予測に関与する脳ネットワークの検証	田中 真樹	5	21	21
	サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析	中原 潔	4	2	1
	レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明	細川 千絵	6	12	5
	相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い	堀川 一樹	5	12	4
	真核細胞の in vivo ロバストネス解析	守屋 央朗	3	13	9

期 (採択年度)	研究課題	研究者	①さきがけの研究成果の論文数	②さきがけの研究成果の継続と発展に関する論文数	左記②の論文のうち責任著者の論文数
	細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス	山本 希美子	11	16	8
第2期 (2007)	胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発	秋山 泰身	11	9	7
	環境適応に関わる時空間パターン形成現象の分子ネットワーク	岩崎 秀雄	5	8	4
	リズミカルな連続運動の神経基盤の解析	木津川 尚史	1	3	1
	匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明	小早川 令子	7	3	2
	脳内を縦横に結ぶ意思決定リンク	小村 豊	1	1	1
	小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御	田中 敬子	4	8	5
	生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明	原田 伊知郎	5	9	2
	花粉管ガイダンスの動的システムの解明	東山 哲也	13	46	26
	シナプス強度を決定する基本原理の解明	深田 優子	9	14	8
	脳細胞光制御を用いた神経グリア相互作用の解明	松井 広	5	15	6
第3期 (2008)	植物分裂組織の再生システム	伊藤 寿朗	8	15	13
	アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明	岩楯 好昭	4	8	8
	母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明	大杉 美穂	0	7	4
	植物の概日振動子の観測と相互作用の検出	小山 時隆	2	8	7
	網膜ON・OFF回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析	小池 千恵子	7	4	2
	核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明	佐藤 政充	10	13	6
	自然免疫反応におけるシェディングの役割と制御機構	白壁 恭子	2	2	1
	1分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明	鈴木 健一	9	11	5
	指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明	鈴木 孝幸	5	8	6
	植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク	鳥居 啓子	14	15	13
	可視化を通して解析する消化管粘膜免疫系の誘導維持機構	本田 賢也	11	40	12
	細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明	南野 徹	20	35	25
領域全体			267	502[a]	325

2018年2月20日調査

【備考】研究者同士の共著論文について

当該研究領域内の研究者 2 名以上が共同で論文を発表した場合は、各研究者の論文数はそれぞれ 1 件とカウントし、領域全体の論文数は共著論文数を差し引いた値とした。

a：研究終了後に堀川と松井、及び山本と末次の間に各 1 件の共著論文有り(2 件重複)。

2.2.3 特許

特許出願及び登録は、研究目的と段階によりその数は異なるが、当該研究が最終的に一定の成果を収め、実用化による社会貢献につながる段階に達したことを示す重要な指標でもある。本研究領域終了後に出願された特許について、特許データベース Shareresearch(株式会社日立製作所)を用いて、研究者が発明者となっている特許を検索し、本研究課題に関係ないと考えられるものを除いている。登録については、研究領域期間中、あるいは研究領域終了後に出願したものがその後登録されたかという観点でまとめた。

本研究領域の研究代表者による特許出願数及び登録数の結果を表 2-5 に示す。

表 2-5　研究領域期間中・終了後の特許の出願と成立状況

		研究領域期間中				研究領域終了後			
		出願件数		登録件数		出願件数		登録件数	
採択年度	研究者	国内	海外	国内	海外	国内	海外	国内	海外
2006 年度	池谷 裕二	2	0	1	0	2	0	2	0
	河崎 洋志	4	0	2	0	1	0	0	0
	木村 幸太郎	1	0	1	0	0	0	0	0
	高坂 智之	0	0	0	0	1	0	0	0
	田中 裕人	0	0	0	0	2	1	0	0
	細川 千絵	1	0	1	0	0	0	0	0
	守屋 央朗	2	0	0	0	1	1	0	1
	山本 希美子	1	0	0	0	0	0	0	0
2007 年度	秋山 泰身	0	0	0	0	1	1	0	1
	木津川 尚史	1	1	1	0	0	0	0	0
	小早川 令子	3	1	1	1	2	2	0	0
2008 年度	岩楯 好昭	1	0	1	0	0	0	0	0
	大杉 美穂	0	0	0	0	1	1	0	0
	小池 千恵子	0	0	0	0	2	0	0	0
	本田 賢也	5	2	3	2	2	2	0	1
	領域全体	21	4	11	3	15	8	2	3

2018 年 2 月 20 日調査

研究領域期間中あるいは終了後における PCT 出願された特許は、出願件数は PCT 出願の 1 件のみを計上し、各国展開分は含めない。海外の登録件数は、いずれかの国で登録されていれば 1 件とする。

2.3　科学技術や社会・経済への波及効果

助成金、論文、特許以外での特徴的な研究成果を、科学技術への波及効果及び社会・経済への波及効果の観点から以下にまとめた。

2.3.1　科学技術への波及効果

(1)受賞

科学技術の進歩への貢献や研究成果に関する評価を示す指標の一つとして、受賞が挙げられる。表 2-6 に、研究領域終了後の研究者の受賞を示す。

本研究領域終了後に複数の授与機関から高く評価された研究者として池谷、末次、東山、本田の 4 名が挙げられる。池谷は、本研究領域期間中に開発したイメージング技術を発展させた脳回路機能研究が評価され、日本学術振興会賞、日本学士院学術奨励賞をはじめとして塚原仲晃記念賞、江橋節郎賞を受賞した。末次は、細胞膜の形態に関する研究が評価され文部科学省 若手科学者賞や風戸賞を受賞した。また、FEBS Letters Young Group Leader Award を受賞し、国際的にも研究が評価された。東山は、植物の受精メカニズムの解明に関する研究でゴールド･メダル賞、木原記念財団学術賞、ナイスステップな研究者などを受賞し、また、海外でも受賞している。本田はゴットフリート・ワグネル賞、ベルツ賞を始めとして多数の賞を受賞した。また、鳥居は気孔の発生メカニズム等の研究に対し、第一線で活躍する女性科学者を表彰する猿橋賞を受賞した。

上記以外にも、岩楯、大杉、河崎、細川、田中真樹、守屋、南野らが受賞した

表 2-6　受賞リスト

No	受賞者	賞の名称	授与機関	受賞年	受賞理由
1	池谷 裕二	第 9 回日本学術振興会賞	日本学術振興会	2013	機能的画像法を用いた脳回路システムの作動原理の解明
2		日本学士院学術奨励賞	日本学士院	2013	機能的画像法を用いた脳回路システムの作動原理の解明
3		塚原仲晃記念賞	日本神経科学学会	2015	脳回路活動の構造解析
4		江橋節郎賞	日本薬理学会	2017	脳回路機能の可塑性と病態に関する研究
5	河崎 洋志	アステラス病態代謝研究会 最優秀理事長賞	アステラス	2012	感覚神経系を用いた選択的神経回路の形成メカニズム解析
6	末次 志郎	2011 FEBS Letters Young Group Leader Award	欧州生化学会連合	2011	Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of Pacsin2/Syndapin II
7		平成 24 年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞	文部科学省	2012	細胞膜形態形成に関わるタンパク質と細胞骨格制御の研究
8		日本生化学会奨励賞	日本生化学会	2013	細胞膜形態形成に関わるタンパク質と細胞骨格制御の研究
9		平成 26 年度風戸賞	風戸研究奨励会	2014	細胞膜の形態を制御するタンパク質ドメインの研究

No	受賞者	賞の名称	授与機関	受賞年	受賞理由
10	田中 真樹	北海道大学 医学研究科 優秀研究賞	北海道大学医学研究科	2014	－
11		北海道大学 教育総長賞 奨励賞	北海道大学	2016	－
12	細川 千絵	計測自動制御学会 生体・生理工学部会 研究奨励賞	計測自動制御学会	2011	Optical Perturbation of Neuronal Network by a focused Laser Beam
13		第6回資生堂女性研究者サイエンスグラント	資生堂	2013	集光レーザービームを用いた神経細胞の局所機能操作（レーザー光で神経回路の仕組みを明らかにする研究）
14		日本生物物理学会 第9回第51回年会 歴代若手招待講演者	日本生物物理学会	2013	集光レーザービームの光摂動による神経細胞内分子動態の集合操作
15	守屋 央朗	平成27年度岡山大学ティーチング・アワード表彰 先進教育賞	岡山大学	2015	生命の基本原理と生活の中の生物学
16	田中 敬子	KIST賞(Employee of the month)	Korea Institute of Science and Technology	2017	論文、“Timely regulated sorting from early to late endosomes is required to maintain cerebellar long-term depression”をNature Cmmunicationsからpublishしたため。
17	東山 哲也	読売テクノフォーラム第20回ゴールド･メダル賞	読売テクノフォーラム	2014	被子植物の受精メカニズムの解明
18		ナイスステップな研究者	科学技術・学術政策研究所	2014	被子植物の受精メカニズムの解明
19		President of the International Association of Sexual Plant Reproduction Research	名古屋大学	2014	ホロニックコミュニケーションの真の理解
20		第25回(平成28年度)木原記念財団学術賞	木原記念横浜生命科学振興財団	2017	植物受精において花粉管誘引を司る分子群の発見
21	岩楯 好昭	平成25～29年度科研費 新学術領域「ゆらぎと構造の協奏」 第1回領域賞	日本学術振興会	2016	遊走細胞のかたちを決める分子ダイナミクス
22	大杉 美穂	成茂動物科学振興基金	成茂動物科学振興基金	2015	哺乳動物特異的な遅延した前核形成タイミング制御
23	佐藤 政充	平成24年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞	文部科学省	2012	細胞分裂における微小管の制御メカニズムの研究
24		早稲田大学リサーチアワード	早稲田大学	2017	第一減数分裂における染色体の分配様式、及び真核生物での減数分裂における細胞周期の研究
25	鳥居 啓子	第31回(2014年)井上学術賞	井上科学振興財団	2014	植物の細胞間コミュニケーションと気孔の発生メカニズム
26		第35回(2015年)猿橋賞	女性科学者に明るい未来をの会	2015	植物の細胞間コミュニケーションと気孔の発生メカニズムの研究
27		2015 Fellows Award フェロー賞	米国植物生物学会(American Society of Plant Biologists)	2015	Contribution to Plant Cell-Cell signaling and Stomatal Development
28		サイエンス･レクチャーシップ アワード	千葉大学	2015	気孔の発生メカニズムの解明

No	受賞者	賞の名称	授与機関	受賞年	受賞理由
29	本田 賢也	ゴットフリート・ワグネル賞 2014 優秀賞	German Innovation Award	2014	免疫系に強く影響を与える腸内細菌株の単離
30		第 1 回 野村達次賞	慶應医学会	2014	Identification and isolation of potent immune modulatory bacteria from the gut microbiota
31		第 18 回(平成 27 年)日本免疫学会賞	日本免疫学会	2015	腸内細菌による免疫系制御機構の解明
32		第 32 回井上学術賞	井上科学振興財団	2016	臨床応用可能な腸内細菌種の同定と単離に関する研究
33		平成 28 年度持田記念学術賞	持田記念医学薬学振興財団	2016	本質的に重要な腸内細菌株コンソーシアムの同定単離とその臨床応用に関する研究
34		第 53 回(2016 年度)ベルツ賞	ベーリンガーインゲルハイム ジャパン	2016	腸内細菌叢と宿主免疫相互作用インターフェースの理解と臨床応用
35	南野徹	第 3 回大阪大学総長顕彰・総長奨励 総長奨励賞	大阪大学	2014	教育及び研究の業績があると認められるなど、同分野で将来活躍することが期待される
36		第 4 回大阪大学総長顕彰・総長奨励 総長奨励賞	大阪大学	2015	教育及び研究の業績があると認められるなど、同分野で将来活躍することが期待される

2018 年 2 月 20 日調査

(2)共同研究、技術指導、学会への貢献等

東山は、トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM)で多様な分野の研究者との共同研究を行い、植物の研究を中心に化学合成技術やナノ工学技術と融合した研究へと発展し、異分野融合を実現させるとともに研究を加速させ、短期間に多くの重要な成果を生み出した。

木村は、東北大学との共同研究により、線虫の自動追跡を行うロボット顕微鏡システムを開発した。

守屋は、英国、オックスフォード大学との共同研究を行い、細胞周期のロバストネスについての新たな数理モデルの構築に成功した。

本田は、国内外の各分野の専門家と共同研究を行うことにより、幅広いヒトの疾患領域で腸内細菌と発症の関連性を調べ、免疫系疾患、動脈硬化、移植片対宿主病における腸内細菌の関与について発表した。また、バクテリアセラピーの設計アルゴリズムを共同研究を通じて提案した。

技術指導について、松井は、東京大学、京都大学を始めとする多数の大学、研究所の公開セミナーで、二光子イメージング法やオプトジェネティクス(光遺伝学)に関する技術指導を行い、その技術の普及と後進の育成に積極的に貢献した。

鈴木孝幸は、鳥類リソース事業のための人材育成、生命科学分野における国際イニシアチブの確保を目標として、リソースの凍結保存を担当した。

2.3.2　社会・経済への波及効果

(1)研究人材の育成

本事業の重要な目的の一つは次世代の日本の研究を担う国際的な研究人材を育成することであった。そのため、研究分野を限定せず、国際的に先進的な研究を発展させる特徴ある研究テーマが選ばれた。また、領域アドバイザーには国際的な研究成果を挙げてきた延べ 11 名の第一線の実験生物学や理論生物学の研究者から助言を受けてきた。若手研究者の育成のため、37 名の研究者のほとんどが 40 才以下であり、また、そのうち 10 名は女性研究者が採用された。

人材育成の結果、事業終了後新たに 18 名の教授が創出され、またそのほかの研究者の多くもより上位の役職を得て(表 1-2)、それぞれの研究分野で活躍している。

(2)報道及び招待講演等

報道に関しては、池谷は、脳科学に関する専門書とともに、最新のこの分野の知見を平易に解説する一般向けの書籍についても 100 を超える多数の書籍の執筆、あるいは監修を行っている。また、テレビやラジオへの出演や講演など、社会的活動にも積極的に取り組んでいる。これらの社会的活動が研究成果と合せて多数の新聞報道につながっている。東山は、植物の受精の仕組みに関する研究成果が多数あり、その多くが新聞や WEB ニュースで報道された。また、そのほか、本田、鳥居、河崎、木村、新矢、守屋、岩崎、小早川、松井、鈴木孝幸などについては、それぞれの研究成果が報道されている。

国際学会での招待講演では、山本は、血流のせん断応力が血管内皮細胞に与える影響の研究について、海外の学会等で多くの招待講演を行っている。また、本田も腸内細菌の免疫細胞の誘導などに関する招待講演が多い。そのほか、鳥居、川崎、田中真樹、東山、伊藤が多数の招待講演を行っている。

(3)その他

本田の腸内細菌研究は疾患治療へ応用され、米国ベンチャー企業、Vedanta Biosciences において開発が進められている。本田はその Scientific cofounder となっている。小早川の「匂いに対する忌避行動の神経回路」に関する研究を通じて有害獣を遠ざける忌避剤が開発され、ベンチャー企業「脳科学香料株式会社」の設立につながった。東山が開発した植物透明化試薬 ClearSee®は富士フイルム和光純薬株式会社から、生理活性物質 AMOR は東京化成工業株式会社から販売され、ゲノム編集ベクター「KAMA-ITACHI」は国内メーカーからの販売が計画されている。また、池谷はオンライン資格試験予備校「資格スクエア」を運営する株式会社サイトビジットの“人工知能を活用した脳科学ラーニング(問題演習機能)”を監修した。

また、多くの研究者が教育活動やそれぞれの分野の啓発活動に取り組んでいる。末次、小村、小早川、岩楯、原田、大杉、小池、佐藤、東山、鈴木健一、鈴木孝幸、鳥居、南野は高校等でそれぞれの分野に関する講義や一般向けの講演会で講演を行うなどのアウトリーチ活動を行った。

第 3 章　各研究課題の主な研究成果及び波及効果

3.1　2006 年度採択研究課題

3.1.1　多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る(池谷裕二)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

ニューロンは回路システムの機能素子であり、脳を理解するためには同時に多数のニューロンの大規模記録が必須である。本研究では、(1)多ニューロン Ca^{2+}イメージング法(fMCI)を用いて数百のニューロン活動を高空間分解能で一斉に可視化することにより、大規模なスパイク列データを再構築する方法を提供し、さらに(2)得られたスパイク列のデータマイニングにより神経回路作動の原理を解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)fMCI 法の改良と応用

ニポウ式共焦点ユニットと高速背面照射型 CCD カメラにより 2,000Hz の超高速での画像を取得し、10,000 個以上のニューロンの大規模記録を可能にした[1]。その結果、この高速 functional multineuron calcium imaging(fMCI)は、従来の約 10 倍の S-N 比を達成した(図 3-1)[2,[1]]。その撮影速度とニューロン数は現時点 (2009 年当時) で世界最高である。

また、fMCI で得られる大規模データは、カルシウム変動からスパイクタイミングを逆推定するアルゴリズムを考案し、サポートベクトルマシンによる自動化により、高精度の検出が可能となった[1]。さらに fMCI の特長を活かし、シナプス結合を効率良く探索できるマッピング技法(Reverse Optical Trawling: ROTing)を考案した。この方法により自発的な細胞活動を大幅に抑制し、シナプス伝達効率とシグナル-ノイズ比が向上した結果、平均偽陰性率は 4%以下、偽陽性率は 1%と高い確度でシナプス結合を同定することが可能になった[2]。

---

[1] Takahashi N., Sasaki T., Usami A., Matsuki N., Ikegaya Y. “Watching neuronal circuit dynamics through functional multineuron calcium imaging (fMCI)”, Neuroscience Research, 58(3), 2007, 219-225.

[2] Namiki S., Matsuki N., lkegaya Y. “Large-scale imaging of brain network activity from >10,000 neocortical cells”, Nature Precedings, 2009, 2893, 1.

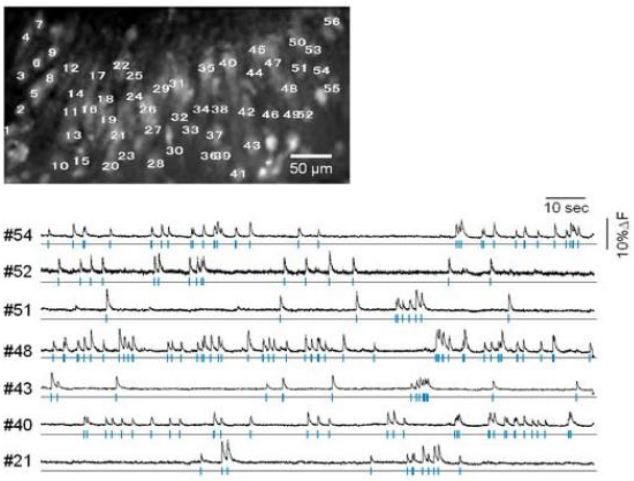


図 3-1　高速 fMCI によるニューロンの大規模記録[3]

上図：海馬スライス培養標本をレーザー顕微鏡で撮影。下図：代表的な 7 個のニューロンについて生トレース。各トレースから検出されたスパイク列をラスタープロットに示した。

(ⅱ)神経スパイク同期のメカニズム

海馬 CA3 野回路の自発活動を高速 fMCI で撮影し、ニューロンの同期スパイクがポアソン発火よりも 10 倍程度の高頻度で観察され、シナプス結合したニューロンペアは高頻度で同期スパイクを示し、親ニューロンの共有率も高かった。また、回路全体として同期の大きさがベキ分布していることが見いだされた。2 階層ニューラルネットワークで第一層がベキ発火した時、下層の相関 excitatory postsynaptic potential(EPSP 興奮性シナプス後電位)は高い出力相関が得られ、スパイク同期が海馬 CA3 野回路における再帰性に依存していることが示された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Sasaki T., Takahashi N., Matsuki N., Ikegaya Y. “Fast and accurate detection of action potentials from somatic calcium fluctuations”, Journal of Neurophysiology, 2008, 100(3), 1668-1676.

[2] Sasaki T., Minamisawa G., Takahashi N., Matsuki N., Ikegaya Y. “Reverse optical trawling for synaptic connections in situ”, Journal of Neurophysiology, 2009, 102(1), 636-643.

[3] Tsukamoto-Yasui M., Sasaki T., Matsumoto W., Hasegawa A., Toyoda T., Usami A., Kubota Y., Ochiai T., Hori T., Matsuki N., Ikegaya Y. “Active Hippocampal Networks Undergo Spontaneous Synaptic Modification”, PLoS ONE, 2007, 2(11),

[3] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 21 年度終了研究課題「多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る」

e0001250.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、さきがけ研究領域「脳情報の解読と制御」において本研究領域で開発した技術を活かし、神経回路の自己発火に関する研究が行われた。また、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「メゾ回路のグラフ依存的な演算特性の解析」(2010 年度～2011 年度)では細胞の発火タイミングと脳波との関連の研究に、科研費若手研究(A)「脳回路のセルフリライト性の探求」(2010 年度～2011 年度)ではニューロン活動大規模記録法の成果を活かし、神経回路の制御におけるアストロサイトの機能の研究に展開された。

上記のさきがけ研究領域「脳情報の解読と制御」等の成果は、更なる大型ファンドの最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「革新的技術を用いて脳疾患を理解する「システム薬理学」の創成」(2010 年度～2013 年度)に展開し、それまでの神経機能を中心とした基礎研究から、脳機能と神経疾患の原因を探索し治療に結び付ける応用研究が行われた。

その後、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「記憶による時間創成メカニズムの探索」(2013 年度～2017 年度)では PTSD の発症メカニズム及び視覚経路のメカニズム、科研費基盤研究(A)「神経線維イメージングを用いた脳回路原理の探究」(2014 年度～2017 年度)では、磁気により脳へシグナルを送るセンサーの開発など脳回路の新たな応用領域への展開を図っている。

そのほかにも、分担研究を含め、多くの助成金を得て、脳・神経回路の基礎及び応用研究を幅広く展開している。

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、新たなさきがけ研究領域[4]で、本研究領域期間中に開発したカルシウムイメージング技術及び新たな装置の開発・改良を通し、神経機能に関する新たな知見が得られた。

(ⅰ)軸索伝導中の活動電位の制御

大脳皮質の神経細胞の軸索は非常に細く詳細な電気生理学的特性を知ることは困難であることから新たな蛍光ガラス電極を開発し、ラット海馬スライス標本の C3A 野錐体細胞の軸索のパッチクランプ記録に成功した[1]。神経シグナルの伝搬に関して、従来、軸索起始部で発生した活動電位は、軸索の終末まで減衰することなくデジタル的に伝播し、シナプス出力されると考えられていたが、伝導中の活動電位がアストログリアによりアナログ的に変調され、従来考えられていた以上に、高精度な情報処理が脳細胞で行われている可能性があ

[4] 「脳情報の解読と制御」、研究課題「神経回路網が示す自発的可塑性のルール抽出と制御」(2009 年度～2010 年度)

ることが明らかになった[1],[2]。

(ⅱ)軸索伝導中の活動電位の制御

大規模カルシウムイメージング技術を神経回路の自発発火とシナプス可塑性の研究に展開した。脳のスライス培養標本のニューロン内にカルシウム蛍光指示薬を注入し、多くのスパインからの蛍光変化を同時に記録することで、「どのスパインが、いつ、どんな入力を受けたのか」を観察することができる、「大規模スパインイメージング法」が開発された(図 3-2)[5]。

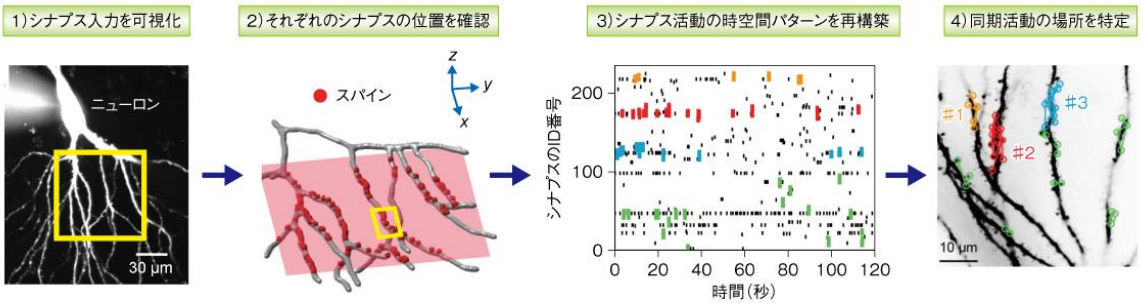


図 3-2　大規模スパインイメージング法[5]

1)シナプス入力をスパインの Ca^{2+}活動として撮影。2)撮影後にスパインの位置を三次元的に再構築して、各シナプスの距離を測定。3)活動パターンを図に表して、時空構造(特に同期活動)を解析。4)同期活動したシナプスを空間プロットすることにより近傍のシナプスが同時に活動することが判明。

その結果、海馬スライス培養標本を用いた実験で、シナプス活動では近傍のスパインが同期活動しやすいこと(クラスター入力)を見いだした(図 3-2)[3]。この現象は、生体内の大脳皮質でも確認され[6]、脳部位を超えて広く観察される現象であることが示された。また、そうでないスパインに比べて大きく、その大きさは、long-term potentiation(LTP:長期増強)に関連し、シナプス結合の強さと相関することを見いだした。このことからクラスター入力は LTP の結果として生じていることが示唆された[3]。

(ⅲ)海馬神経回路の形成機構

脳機能と疾患の原因となる構造的・生理的メカニズム上の破綻のメカニズムを解明し、予防(又は回復)のための方策を追求することを目指し、てんかん発症モデルの研究が行われ

[5] ライフサイエンス統合データベースセンター「新着論文レビュー」
http://first.lifesciencedb.jp/archives/4263

[6] Kobayashi C., Ohkura M., Nakai J., Matsuki N., Ikegaya Y., Sasaki T. “Large-scale imaging of subcellular calcium dynamics of cortical neurons with G-CaMP6-actin”, NeuroReport, 2014, 25(7), 501-506.

た[7]。熱性けいれんのラットモデルを用いた研究において、幼若時に熱性けいれんを生じたラットは成長後にてんかんを発症すること、また、その原因が「未熟な海馬に発作が生じると神経回路の発達が障害され、この異常が成人まで残る」ためであることを見いだした[4]。熱性けいれんの原因として興奮性 GABA A 受容体の過活性化が関与することが明らかになり、gamma-amino butyric acid(GABA)の興奮作用を調節する NKCC1(Na^+-K^+-2Cl^-共輸送体 1)の阻害薬(ブメタニド)を投与することにより海馬の発達障害が軽減されることから、てんかんを予防する新たな治療法となる可能性が示された[4]。

②社会・経済への波及効果

本研究領域の研究は神経回路の基礎的な研究であったが、本研究領域終了後は PTSD、てんかんなど神経回路と脳疾患の関連に関する研究も行われ、てんかんではブメタニドの投与による治療を提案するなど、医療と密接に関連した分野へも研究の対象が広がっている。

特許については、ニューロン電気生理及びイメージングのために開発した装置が出願されている。具体的には「脳観察用カッタおよび観察用カッタの製造法」、「観察面用カッタとその製造方法および観察用穴開け具」、「対物光学系の観察補助装置」、「蛍光マイクロピペット」の 4 件が出願され、そのうち 3 件は企業との共同出願であり、登録されている[8]。

池谷は、脳科学に関する一般向けの書籍あるいは専門書の執筆や監修を積極的に行い、関与する書籍や報道へのインタビュー記事など広範な活動を行っている[9]。また、研究室の公式サイトで本研究課題において開発したカルシウムシグナルの大規模撮影技術を用いた海馬の研究など、脳神経の機能に関する研究の解説[10]、また一般向けに研究やアウトリーチ活動に関する考え方を個人ホームページ[11]で公開し、脳研究について積極的な普及を図っている。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Sasaki T., Matsuki N., Ikegaya Y. “Targeted axon-attached recording with fluorescent patch-clamp pipettes in brain slices”, Nature Protocols, 2012, 7(6), 1228-1234.

[2] Sasaki T., Matsuki N., Ikegaya Y. “Action-potential modulation during axonal conduction” Science, 2011, 331(6017), 599-601.

[7] 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「革新的技術を用いて脳疾患を理解する「システム薬理学」の創成」(2010 年度～2013 年度)
[8] 観察用穴開け具(特許 05139007)、対物光学系の観察補助装置(特許 05706762)、観察用カッタおよび観察用カッタの製造方法(特許 05783509)
[9] 池谷裕二、メディア活動 http://www.gaya.jp/media/index.html
[10] 東京大学大学院薬学系研究科ホームページ http://www.yakusaku.jp/
[11] 池谷裕二、個人ホームページ http://www.gaya.jp/ikegaya.htm

[3] Takahashi N., Kitamura K., Matsuo N., Mayford M., Kano M., Matsuki N., Ikegaya Y. “Locally synchronized synaptic inputs”, Science, 2012, 335(6066), 353-356.

[4] Koyama R., Tao K., Sasaki T., Ichikawa J., Miyamoto D., Muramatsu R., Matsuki N., Ikegaya Y. “GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy”, Nature Medicine, 2012, 18(8), 1271-1278.

④その他

池谷は、平成 24 年度日本学術振興会賞と日本学士院学術奨励賞、さらに平成 26 年度塚原仲晃記念賞を受賞した。

3.1.2　視覚情報の分解と統合の生体制御システム(河崎洋志)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

視覚情報は、網膜の段階で動作・空間情報や色彩・形態情報などの異なる特性の視覚情報に分離され、それぞれ異なる神経経路を経て大脳へと伝達される。同様に体性感覚系でも異なる経路で大脳皮質に伝達されている。本研究では、このように一旦分離された異なる情報特性に対応する神経回路の相互作用の解析を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)視覚系神経回路のM細胞への遺伝子発現

視覚情報は、M(magnocellular)細胞経路と P(parvocellular)細胞経路とに分離され、大脳皮質へと伝達される。フェレットにはM/P経路が存在することから、そのcDNAマイクロアレイを用いて視床のM細胞に発現する遺伝子が単離された。その結果、三つの遺伝子が同定され、これらはM細胞にのみ発現することが見いだされた。また、これらの遺伝子は出生後数日に発現し、発生早期にM/P細胞への分化が決定されていることが示唆された[1]。

(ⅱ)マウス触覚神経回路における情報の分解と統合

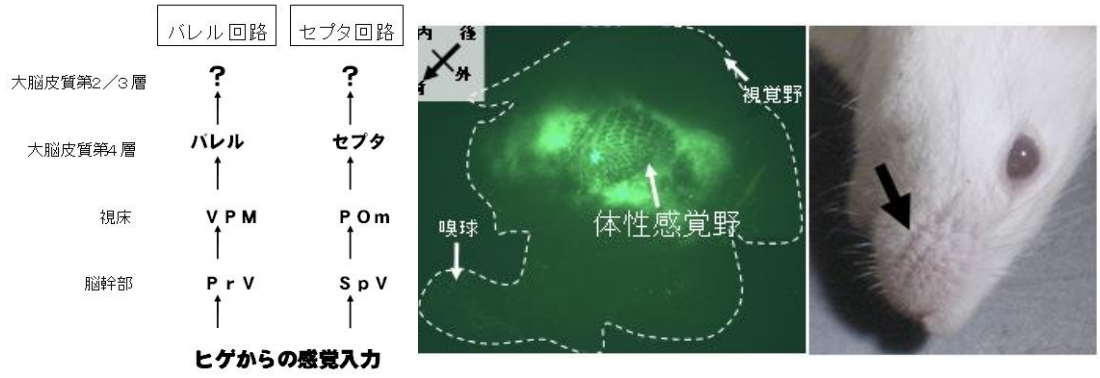


図3-3　マウス大脳皮質第4層の横断面に見られるバレルネット[12]

(左図)ヒゲからの入力はバレル回路とセプタ回路によって大脳まで伝達。(中写真)破線は大脳皮質第4層の横断面図で、中央はバレルネット(蜂の巣状構造)。大脳皮質2/3層の神経細胞から伸びる軸索の分布は、第4層では蜂の巣状(白矢印)に見える。(右写真)バレルネットはヒゲと同様の分布パターンをしている(黒矢印)。

マウスの感覚入力であるヒゲからの体性感覚は、二つの並列な神経回路であるバレル回

[12] JST プレス一覧　共同発表　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20100224-2/index.html

路とセプタ回路によって担われている(図 3-3)。マウス大脳皮質 2/3 層神経細胞の軸索投射経路の解析が行われた結果、体性感覚野 2/3 層の神経細胞軸索は特にセプタ領域に集中して投射することが明らかになった(図 3-3 右)[2]。さらに、バレルネット内の 2/3 層神経細胞軸索はバレルネットに集積してシナプスを形成していたことから、バレルネット部分で情報が統合されていることが示唆された[2]。

(ⅲ)神経回路解析のための基盤技術開発

神経回路の解析には脂溶性神経軸索トレーサーである 1,1′-dilinoleyl-3,3,3′,3′-tetramethylindocarbocynanine perchlorate(DiI)が用いられるが、これは脂溶性のために免疫組織染色ができなかった。そこで新たな界面活性剤としてジギトニン[13]が用いられた結果、DiI シグナルを維持するとともに抗体の組織浸透度を十分に上げ得うることが明らかになり、神経回路投射パターンとその免疫組織学的特徴の解析への有用性が確認された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Iwai L., Kawasaki H. “Molecular development of the lateral geniculate nucleus in the absence of retinal waves during the time of retinal axon eye-specific segregation”, Neuroscience, 2009, 159(4), 1326-1337.

[2] Sehara K., Toda T., Iwai L., Wakimoto M., Tanno K., Matsubayashi Y., Kawasaki H. “Whisker-related axonal patterns and plasticity of layer 2/3 neurons in the mouse barrel cortex”, Journal of Neuroscience, 2010, 30(8), 3082-3092.

[3] Matsubayashi Y., Iwai L., Kawasaki H. “Fluorescent double-labeling with carbocyanine neuronal tracing and immunohistochemistry using a cholesterol-specific detergent digitonin”, Journal of Neuroscience Methods, 2008, 174(1), 71-81.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後もフェレットを用いた脳神経回路形成とマウスの触覚神経回路形成に関する研究が継続された。また、フェレットの疾患モデルの作成も行われた。

科研費基盤研究(B)「高等哺乳動物を用いた脳神経系形成メカニズムの解明」(2013 年度～2015 年度)では、フェレットを用いた脳神経系の形成制御メカニズムの解明が行われ、科研費基盤研究(B)「高等哺乳動物を用いた脳神経系形成メカニズムの解明」(2017 年度～2019 年度)は現在継続中である。

また、科研費挑戦的萌芽研究「出生により制御される遺伝子カスケードの解明」(2013 年

[13] 脂溶性部位のステロイド構造と親水性部位の糖部位を合わせ持つことから、界面活性剤として脂質を効果的に水に溶かすことができる。

度～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「神経回路形成の時空間制御メカニズムの解明」(2013 年度～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「脳神経系の形成と発達を制御する脳内環境の解明」(2014 年度～2015 年度)では、マウスの出生時のバレル形成に着目した発達初期の神経回路形成機構の解明が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)P 細胞に選択的に発現する転写因子 FoxP2 の発見

視覚神経系の三つの神経細胞(Magnocellular cells:M 細胞、parvocellular cells:P 細胞、Koniocellular cells: K 細胞)のうち、P 細胞は色覚や形態覚といった視覚認知に必須な視覚情報特性を伝達する神経細胞であるが(図 3-4)、マウスでは P 細胞の存在が不明確なため、P 細胞に相当する X 細胞を持つフェレットで解析が行われた。その結果、ヒトの言語能力と関連する転写因子 forkhead box P2(FoxP2)が X 細胞で選択的に発現することが明らかになった。さらに、サルの視覚神経系においても FoxP2 が P 細胞に選択的に発現することが明らかになった(図 3-4)[1]。

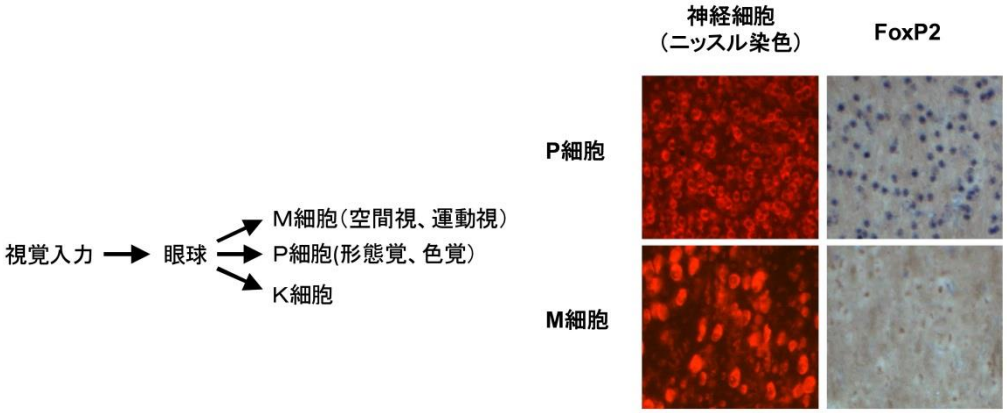


図 3-4　視覚神経系における視覚情報の流れと FoxP2 遺伝子の発現分布[14]

(左図)視覚情報の流れ。(右図)サルの P/M 細胞。左上下は神経細胞全体、右上下は FoxP2 の免疫染色で濃青は FoxP2 を示す。P 細胞(右上写真)だけで FoxP2 遺伝子が発現している。

(ⅱ)カドヘリンによるバレルネット形成の制御

マウスの体性感覚野 2/3 層の神経細胞軸索がヒゲ分布パターンを反映するバレルネット構造を形成するという上記の発見に基づき、その形成を制御する遺伝子が探索された。これまで、細胞接着分子のカドヘリンが主としてバレルネット領域に発現することが報告されているため、カドヘリンに着目した研究が行われた。ドミナントネガティブ型[15]のカドヘリンをマウス子宮内胎児脳に導入して、内在性のカドヘリンの機能を抑制した結果、バレルネ

[14] 東京大学　記者発表一覧　http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_240712_j.html
[15] 遺伝子に変異が起こった際に、変異型の遺伝子産物（タンパク質など）が正常型の遺伝子産物よりも量が多い、又は正常型を阻害する働きを持つなどの理由で、変異型の遺伝子産物の働きが優性になること。

ットは顕著に崩壊し、バレル皮質の軸索密度が減少することが明らかになった[2]。これにより、カドヘリンはバレルネットの形成に重要な役割を担うことが示された[2]。

(iii)出生におけるセロトニン濃度低下を介したバレル形成開始の制御

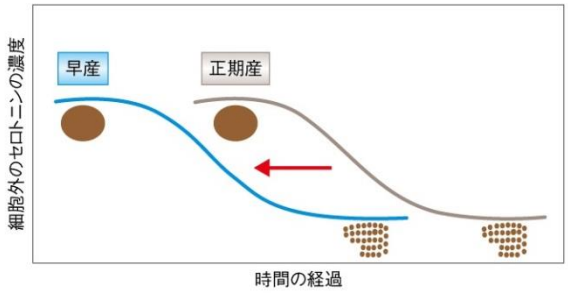


図 3-5　セロトニン濃度とバレル形成の関係[16]

茶色：バレル形成領域。茶の点はバレル形成開始を示す。早産の場合はバレル形成開始の日齢が早まる。

出生自体がバレルの形成開始のスイッチかどうかマウスへの薬物投与や帝王切開での早産誘導により検討された結果、正期産のマウスよりバレルが有意に早期に形成された(図 3-5)[3]。これにより出生がバレルの形成を開始させることが示唆された[3]。また、出生時に変化する分子について検討された結果、新生仔の脳脊髄液のセロトニンの濃度が、出生後に著しく低下したが(図 3-5)[3]、この低下は早産により早まった[3]。これにより出生がセロトニン濃度を低下させることが示唆された(図 3-5)[3]。さらに、セロトニン濃度の低下を薬物で阻害すると早産マウスではバレル形成が遅れ、セロトニン濃度を人為的に早く低下させると正期産マウスでは、バレル形成が早まった[3]。これらの結果より、出生によるセロトニン濃度の低下はバレルの形成開始に必要であること、セロトニン濃度の低下だけでバレルの形成は開始することが明らかになった[3]。

(iv)脳の発達のブレーキ遺伝子の発見

発達期の樹状突起形成を抑制する転写因子を探索するために、自閉症関連疾患や精神発達遅滞の患者で異常が報告されている転写因子 SRY-related HMG-box11(Sox11)遺伝子が解析された。免疫組織染色により、樹状突起形成中には Sox11 の発現量は顕著に減少することが明らかになった[4]。さらに、出生前/後の Sox11 の機能獲得・欠失実験により、Sox11 は発達中のマウス大脳皮質の樹状突起形成を抑制するために必要かつ十分であることが明らかになった(図 3-6)[4]。また、Sox11 発現を早期に抑制すると、皮質表面側への放射状神経移動に欠陥を引き起こすことから、Sox11 による樹状突起形成の抑制は、大脳皮質の形成に重要であることが示された[4]。

[16] ライフサイエンス　領域融合レビュー　http://leading.lifesciencedb.jp/3-e010/

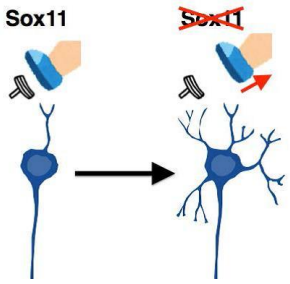


図 3-6　Sox11 による樹状突起の発達停止[17]

幼い赤ちゃんの頃は Sox11 が樹状突起の形成が抑制され突起が少ない(左)。Sox11 が失われることで樹状突起の発達が始まる(右)。

(ｖ)フェレットの脳回形成における Cdk5 の働き

マウスの脳には存在しない脳表面のシワ(脳回)の形成機構(図 3-7)を解明するため、フェレットを用い、ゲノム編集技術(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /CRISPR-Associated Proteins 9(CRISPR/Cas9))と従来のフェレット大脳皮質への遺伝子導入技術とを組み合わせ、大脳皮質において任意の遺伝子を破壊する技術が開発された[18]。

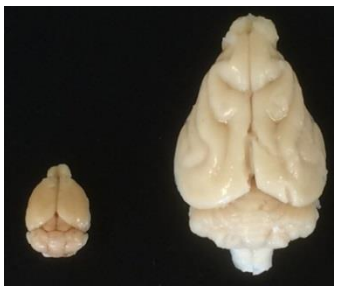


図 3-7　マウス脳とフェレット脳[19]

左がマウス脳でシワがない。右がフェレット脳でシワがある。

皮質の折り畳みに関与する可能性が指摘されている cyclin-dependent kinase 5(Cdk5)遺伝子が破壊された結果、脳回が異常になったことから、Cdk5 が脳回を作るために重要な遺伝子であることが明らかになった(図 3-8)[18]。さらに、大脳皮質の表面側の神経細胞が脳回を作るために重要であることが示された[18]。これらの結果より、大脳皮質の表面側の神経細胞で Cdk5 が働くことが脳回を作るために重要であることが明らかになった。

[17] 金沢大学　研究トピック　http://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/37257
[18] Shinmyo Y., Terashita Y., Duong T. A. D., Horiike T., Kawasumi M., Hosomichi K., Tajima A., Kawasaki H. “Folding of the Cerebral Cortex Requires Cdk5 in Upper-Layer Neurons in Gyrencephalic Mammals”, Cell Reports, 2017, 20, 2131-2143.
[19] academist ジャーナル　研究コラム　https://academist-cf.com/journal/?p=1361

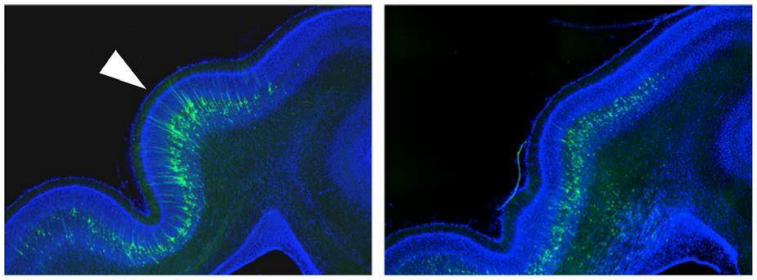


図 3-8　フェレットの脳回[20]

図は脳回の組織切片。左は正常な脳回断面で突出している(矢印)。右は Cdk5 を破壊した脳回断面で、脳回の突出がほとんど消失している。

(vi)フェレットのタナトフォリック骨異形成症の脳異常疾患モデル作成

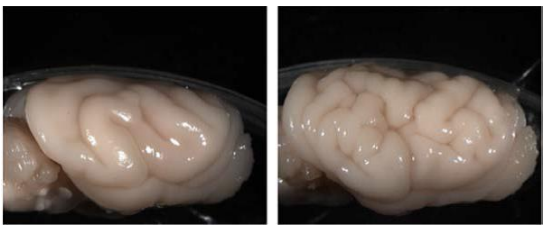


図 3-9　多小脳回症フェレットの脳[21]

フェレットの脳の外観。左が正常な脳で表面に脳回が見える。右が多小脳回症の脳で表面のシワが乱れている。

タナトフォリック骨異形成症は骨格異常と多小脳回症と呼ばれる脳の異常を持ち、有効な治療法のない難病である。このような大脳皮質に異常を持つ希少難病の疾患モデルがフェレットを用いて作製された。多小脳回症を持つ患者では fibroblast growth factor receptor 3(FGFR 3)という遺伝子の働きが過剰になっているという知見に基づき、FGFR3 を活性化する fibroblast growth factor 8(FGF8)遺伝子がフェレットの大脳に導入された結果、フェレットの大脳のシワが増えて多小脳回症を再現でき(図 3-9)、大脳皮質に特殊な神経幹細胞、神経細胞やグリア細胞などが増えていることが明らかになった[22]。

②社会・経済への波及効果

高等哺乳動物であるフェレットとサルを用いることにより、マウスでは解析が困難だっ

[20] 金沢大学　研究トピック　https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/50373
[21] 金沢大学　研究トピック　https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/30927
[22] Matsumoto N., Hoshiba Y., Morita K., Uda N., Hirota M., Minamikawa M., Ebisu H., Shinmyo Y., Kawasaki H. “Pathophysiological analyses of periventricular nodular heterotopia using gyrencephalic mammals”, Human Molecular Genetics, 2017, 26(6), 1173-1181.

たP細胞に選択的に発現する遺伝子が発見された。P細胞の異常は失読症に関連する可能性があり、失読症の病態生理の解明や視覚神経系の回路形成機構・疾患の病態解明につながることが期待される。

また河崎は、脳難病のタナトフォリック骨異形成症の脳異常を持つ疾患の動物モデルを作製することに世界で初めて成功した。これにより、解析が困難であったタナトフォリック骨異形成症の脳病変の仕組みの解明や治療法開発が飛躍的に進むことが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Iwai L., Ohashi Y., Van Der List D., Usrey W.M., Miyashita Y., Kawasaki H. “FoxP2 is a parvocellular-specific transcription factor in the visual thalamus of monkeys and ferrets”, Cerebral Cortex, 2013, 23(9), 2204-2212.

[2] Wakimoto M., Sehara K., Ebisu H., Hoshiba Y., Tsunoda S., Ichikawa Y., Kawasaki H. “Classic cadherins mediate selective intracortical circuit formation in the mouse neocortex”, Cerebral Cortex, 2015, 25(10), 3535-3546.

[3] Toda T., Homma D., Tokuoka H., Hayakawa I., Sugimoto Y., Ichinose H., Kawasaki H. “Birth Regulates the Initiation of Sensory Map Formation through Serotonin Signaling”, Developmental Cell, 2013, 27(1), 32-46.

[4] Hoshiba Y., Toda T., Ebisu H., Wakimoto M., Yanagi S., Kawasaki H. “Sox11 balances dendritic morphogenesis with neuronal migration in the developing cerebral cortex”, Journal of Neuroscience, 2016, 36(21), 5775-5784.

④その他

河崎は、「感覚神経系を用いた選択的神経回路の形成メカニズム解析」でアステラス病態代謝研究会 平成23年度最優秀理事長賞を受賞した。

3.1.3　脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して（木村幸太郎）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

脳・神経系ネットワークの情報処理システムにおける入力（刺激）と出力（行動）のルールを解明するため、本研究では、線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動をモデルにして、脳・神経ネットワークの動作原理を明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

（ｉ）事前刺激による忌避行動の増強に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析

C. elegans に忌避匂い物質、2-nonanone（以下、ノナノン）を事前に経験させることによりノナノンへの忌避行動が増強され、*C. elegans* が遠くまで逃げるようになるという現象が観察された[1],[2]。この結果に基づいて、学習により変化する匂い忌避行動の遺伝子ネットワーク上での働きを明らかにするために、神経機能に関与すると思われる遺伝子異常を持つ 50-60 系統の突然変異株の遺伝学的解析が行われた。

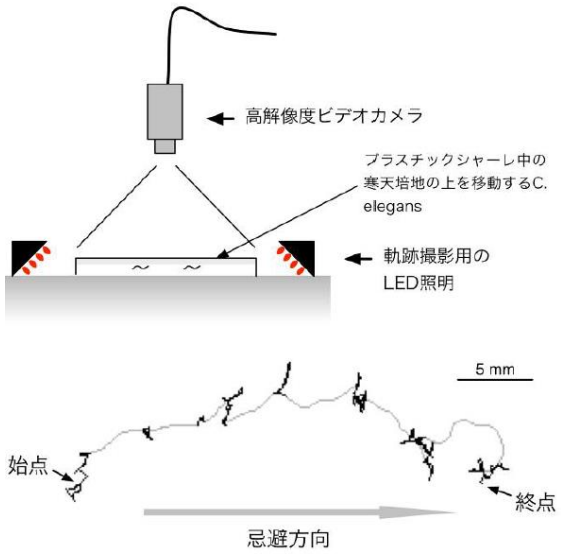


図 3-10　匂い忌避行動とその測定[23]

（上）*C. elegans* の軌跡行動記録システム。（下）*C. elegans* のノナノン忌避行動の軌跡の例。灰色の部分が直進期、黒色部分が方向転換期。

[23] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 21 年度終了研究課題「脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して」

その過程において、チロシン水酸化酵素 *cat-2* を含むドーパミン生合成に必要な複数の遺伝子の点突然変異体および欠失型変異体の表現型を解析したところ、いずれもノナノン忌避行動の学習に顕著な異常を示すことから、神経修飾物質ドーパミンが忌避匂い学習に必要であることが明らかになった[1]。

(ⅱ)行動の原理の解明のための、匂い忌避行動の数理解析

画像取得用の LED リング照明とハイビジョンを超える高解像度カメラを組み合わせた *C. elegans* 行動記録システムが開発された。この装置を利用して匂い勾配を測定し、ノナノン忌避行動のパターンとの関連を解析したところ、ノナノン忌避は空間勾配を認識した行動("taxis")である可能性が示唆された(図 3-10)。

(ⅲ)匂い刺激の定量的測定系

線虫の行動の経時変化を定量的に解析するために、プラスチックシャーレ内の微量ノナノンの濃度変化を測定するための水晶振動子センサーを最適化した。その結果、プレートの位置によるノナノンの濃度差は、拡散だけを考慮したシミュレーションモデルよりも大きいことが見いだされた。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Kimura K.D., Fujita K., Katsura I. "Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in Caenorhabditis elegans", Journal of Neuroscience, 2010, 30(48), 16365-16375.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、脳の神経細胞のネットワークで「意思」「感情」「記憶」が生ずる基本的ルールを理解することを目指し、モデル動物として線虫 *C. elegans* を使用した研究を継続・発展させている。

科研費基盤研究(C)「線虫 *C. elegans* の忌避行動を制御するドーパミンシグナル伝達の逆遺伝学的解析」(2009 年度～2011 年度)では本研究課題の遺伝学的研究を発展させた研究が行われた。また、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「線虫 *C. elegans* 行動制御・解析システムの開発」(2009 年度～2010 年度)では光遺伝学的神経活動操作のための新たな実験系が開発され、線虫の神経細胞の活動制御がその行動へ及ぼす影響の解明を、また科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「線虫 *C. elegans* の匂い応答行動を制御する神経ネットワークの統合的機能解析」(2011 年度～2012 年度)では、古典的なプラスチックシャーレ内での匂い勾配の測定が行われ、さらに任意の匂い刺激に対する神経細胞活動と行動を同時に計測できる世界初のロボット顕微鏡が開発された。また、科研費基盤研究(A)「光刺激

ビジュアルサーボ顕微鏡の開発」(2013 年度～2016 年度；東北大学・橋本浩一研究代表)では、上記ロボット顕微鏡にプロジェクションマッピング機能が搭載され、光刺激によって自由行動する線虫の特定神経細胞活動を制御することが可能となった。

現在、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「線虫の全脳イメージングによる探索型ナビゲーション神経基盤の解明」(2016 年度～2020 年度)では、共同研究を通して行動中の全神経活動を同時に測定するためのイメージング技術や、脳機能を反映する行動の様々な特徴を発見するための人工知能技術が開発され、脳機能メカニズム研究の新たな展開が進められている。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)*C. elegans* の神経ペプチド及びドーパミンシグナルによる行動調節

本研究領域において *C. elegans* が嫌な匂い 2-ノナノンを避けること、及びドーパミンシグナルがこの忌避匂い学習に関与することが示されたが、本研究ではさらに神経ペプチドも忌避匂い学習に関与することが明らかになった。詳細な行動解析により、神経ペプチドは、忌避匂いの記憶の「獲得」に、ドーパミンは忌避匂い記憶に基づいた学習の「実行」に関与していることが明らかになった。この結果より *C. elegans* の非連合学習においても、複数の行動要素が異なる神経調節物質によって制御されていることが示唆された[1]。

(ⅱ)*C. elegans* の匂い応答行動を制御する神経ネットワークの統合的機能解析

光刺激用に強力な環状 LED 照明を作成し、LED 照明と同期を取りながら画像を取得するシステムが開発され、これまでの *C. elegans* 行動解析システムと組み合わせ、新たな「行動制御・解析システム」が開発された。その結果、channelrhodopsin(ChR)を体壁筋や特定の感覚ニューロンで発現させ、光刺激によるカルシウムイメージングやニューロンの制御による行動変化を引き起こすことが可能となった。これにより、*C. elegans* のみならず、ショウジョウバエ幼虫、ゼブラフィッシュといった小型動物の神経機能を光遺伝学的手法によって解析する簡便なシステムが確立された[2]。

(ⅲ)自動顕微鏡ロボットシステムの開発と脳活動の新たな解析

C. elegans を自動的に追跡し、高速パターンマッチングによって神経細胞のカルシウムイメージングを行うロボット顕微鏡システム、「オーサカベン OSACaBeN(Optogenetic Stimulation Associated with Calcium imaging of Behaving Nematode)」が東北大学大学院情報科学研究科橋本浩一らと共同で開発された。本ロボットシステムは移動する特定の神経細胞だけを「狙い撃ち」で光遺伝学的に活性化するシステムであり、この装置を用いた *C. elegans* のドーパミン細胞の解析により、背側及び腹側ドーパミンニューロンのうち、背側ドーパミンニューロンだけが餌による行動変化に関連していることが明らかになった[3]。

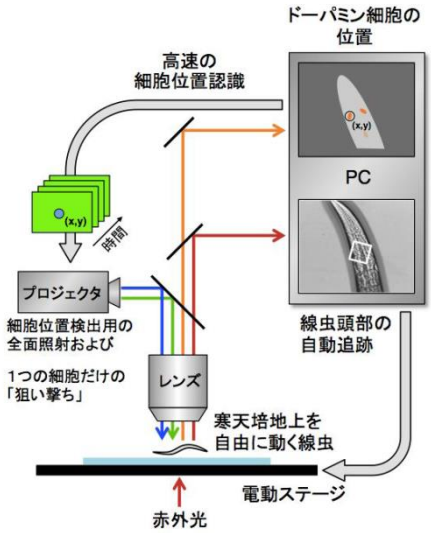


図 3-11　ロボット顕微鏡「オーサカベン」(神経活動制御用)の模式図[24]

線虫頭部は、顕微鏡下からの赤外光で画像化される。この画像は高速画像認識され、*C. elegans* 頭部の同じ場所に維持するよう制御する。同時に、ドーパミン細胞では、位置確認のための赤色蛍光タンパク質と、光によって細胞を活動化させるタンパク質が遺伝子から読み出されている。この赤色蛍光タンパク質の位置を別のプログラムが認識し、液晶プロジェクターからその位置に対して細胞活動化のための青色光を照射する。

(iv)*C. elegans* の「意思決定」

上記で開発された、*C. elegans* の行動と神経細胞のカルシウム濃度を同時に測定できるロボット顕微鏡「オーサカベン 2」を用い、*C. elegans* の忌避匂い濃度に対する行動の意思決定のメカニズムが検討された。その結果、嫌な匂い濃度の上昇を感ずる神経細胞は、僅かな匂い濃度上昇を「微分」によって大きく検出し、逆走や方向転換を引き起こすこと、及び、匂い濃度の減少を感ずる神経細胞は、匂い濃度の減少を一定時間積み重ねる「積分」が行われ、この値が一定に達した時にその方向に移動するという「意思決定」が行われることが明らかになった。また、匂い勾配下での神経活動の光生理学的、数理学的及び遺伝学的解析により、この濃度勾配の匂い濃度情報は、嗅覚ニューロンのＬ型電位依存性カルシウムチャネルにより生じる細胞内カルシウム濃度([Ca^{2+}] i)により決定されることが明らかになった[4]。

②社会・経済への波及効果

本研究で明らかにされた意思決定のための積分的神経活動は哺乳類でも知られており、人間にも共通していると考えられているが、これに関与する遺伝子はいかなる生物でも全く明らかになっていなかった。今後、ヒトにおける遺伝子と意思決定能力との関連を明らか

[24] 大阪大学理学研究科 HP、研究トピックス　http://navi-science.org/project/　線虫の全脳イメージングによる探索型ナビゲーション神経基盤の解明

にすることが期待される。

東北大学の橋本らと共同開発した自動顕微鏡ロボットシステム「オーサカベン」は様々な小型動物を用いた「脳活動と行動の関係」の解明に寄与できるとして、読売新聞[25]、朝日新聞[26]やその他の報道でも取り上げられた。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Yamazoe-Umemoto A., Fujita K., Iino Y., Iwasaki Y., Kimura K.D. “Modulation of different behavioral components by neuropeptide and dopamine signalings in non-associative odor learning of Caenorhabditis elegans”, Neuroscience Research, 2015, 99, 22-33.

[2] Kawazoe Y., Yawo H., Kimura K.D. “A simple optogenetic system for behavioral analysis of freely moving small animals”, Neuroscience Research, 2013, 75(1), 65-68.

[3] Tanimoto Y., Zheng Y.G., Fei X., Fujie Y., Hashimoto K., Kimura K.D. “In actio optophysiological analyses reveal functional diversification of dopaminergic neurons in the nematode *C. elegans*”, Scientific Reports, 2016, 6, 26297.

[4] Tanimoto Y., Yamazoe-Umemoto A., Fujita K., Kawazoe Y., Miyanishi Y., Yamazaki S.J., Fei X., Busch K.E., Gengyo-Ando K., Nakai J., Iino Y., Iwasaki Y., Hashimoto K., Kimura K.D. “Calcium dynamics regulating the timing of decision-making in *C. elegans*”, eLife, 2017, 6, e21629.

[25] 2016年5月20日
[26] 2016年5月23日

3.1.4　モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明(高坂智之)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

自然界の共生のモデルとなり得る嫌気的なプロピオン酸酸化共生系に着目し、この共生に関わる二つの微生物、プロピオン酸酸化共生細菌及び水素資化性メタン生成アーキアがどのように共生を構築していくのかを分析することにより、異なる二つの生命システムが一つのシステムを作り上げ、新しい機能を獲得していく過程を明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)プロピオン酸酸化共生系[27]の解析

本研究では、単独微生物が共生していく過程を解析するため、まずプロピオン酸酸化細菌である *Pelotomaculum thermopropionicum* SI 株(SI 株)と水素資化性メタン生成アーキア *Methanothermobacter thermautotrophicus* delta H 株(delta H 株)をそれぞれ単独培養から混合することにより再共生させる系の構築が試みられた。しかし、この再共生系ではプロピオン酸を基質とした増殖が観察されず、現存のプロピオン酸酸化共生系は凝集を形成するのに対し、単独から共生させた系では凝集しないことが明らかとなった(図 3-12)[3]。

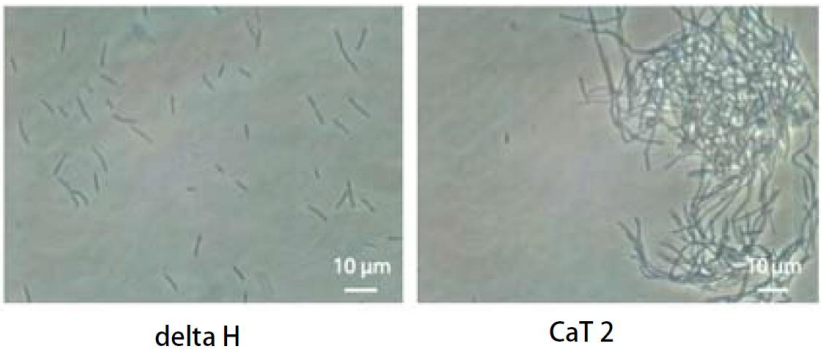


図 3-12　メタン菌の光学顕微鏡写真[28]

共生系から分離されたメタン菌、CaT2 株は delta H 株と比べ凝集しやすい。

[27] プロピオン酸酸化共生系：プロピオン酸酸化細菌により生成した水素を、メタン菌が資化しメタンを生成する共生系。二つの菌の共生によりプロピオン酸を基質としてメタンを生成する。
[28] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 21 年度終了研究課題「モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明」

そこで現存する共生系と単独培養を混合した系の違いを明らかにするため、共生系中のプロピオン酸酸化細菌及び水素資化性メタン生成菌のゲノム配列を SI 株のゲノム配列[1]及び delta H 株のゲノム配列[29]と比較した。その結果、共生系のプロピオン酸酸化細菌は SI 株とほぼ同一のゲノム配列を持つ一方、共生系と delta H 株との比較では、一定の配列の一致が見られたものの、ゲノムの複製に関わると考えられる ori 領域付近の配列ではほとんど塩基配列の一致が見られなかった[28,[2]]。つまり、凝集の形成の違いは、共生条件によらず存在する微生物によることが示唆された。この共生系からメタン生成菌が分離され *Methanothermobacter thermautotrophicus* CaT2 株(CaT2 株)と名付けられた。この株は凝集性を示し、さらにはギ酸の資化能を有していた。

一方、培養法をさらに検討することにより、SI 株と CaT2 株、あるいは SI 株と delta H 株のそれぞれからプロピオン酸を基質に共生させることに成功した[3]。

これらの結果から二つのことが明らかとなった。それは、この共生系の凝集はメタン生成菌の性質により起こっていること。そして、プロピオン酸からのメタン生成にはプロピオン酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌の存在が必要でそれには凝集能は特に必要ないことであった[3]。

(ⅱ)CaT2 株の全ゲノム解析

プロピオン酸酸化共生細菌との共生過程を解析するために、CaT2 株の全ゲノム解析を行い delta H 株のゲノム情報と比較した。その結果、CaT2 株には 88 個の特異な遺伝子が存在し、その中には CaT2 株の特徴であるギ酸資化に関わるギ酸デヒドロゲナーゼの一群の遺伝子が含まれており、CaT2 株の有するギ酸資化能が裏付けられた。また、特異的遺伝子の中には糖転移酵素が存在し、CaT2 株の凝集能への関与が示唆された[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Kosaka T., Kato S., Shimoyama T., Ishii S., Abe T., Watanabe K. “The genome of Pelotomaculum thermopropionicum reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota”, Genome Research, 2008, 18(3), 442-448.

[2] Kosaka T., Toh H., Toyoda A. “Complete genome sequence of a thermophilic hydrogenotrophic methanogen, Methanothermobacter sp. strain CaT2”, Genome

[29] Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrokovski S., Church G.M., Daniels C.J., Mao J-I., Rice P., Nölling J., Reeve J.N. “Complete genome sequence of methanobacterium thermoautotrophicum ΔH: Functional analysis and comparative genomics”, Journal of Bacteriology, 1997, 179(22), 7135-7155.

Announcements, 2013, 1(4), e00672-13.

[3] Kosaka T., Toh H., Fujiyama A., Sakaki Y., Watanabe K., Meng X.Y., Hanada S., Toyoda A. “Physiological and genetic basis for self-aggregation of a thermophilic hydrogenotrophic methanogen, *Methanothermobacter* strain CaT2”, Environmental Microbiology Reports, 2014, 6(3), 268-277.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、①プロピオン酸酸化共生菌のプロピオン酸代謝機構、②ゲノム情報を基にしたメタン発酵系微生物の共生機構、③エタノール生産性微生物の耐熱性及び耐熱化機構、に関する研究が行われている。このうち、プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸代謝に関する研究は、科学研究費基盤研究(C)「高温性プロピオン酸酸化細菌におけるコハク酸酸化からの水素生成機構の生化学的解明」(2016 年度～2019 年度)として進められている。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)凝集能を有するメタン生成菌 CaT2 株の性質

本研究課題で発見された、水素及びギ酸の利用により自己凝集が可能なメタン生成菌、CaT2 株はプロピオン酸酸化細菌 SI 株と協働し、他のメタン菌株(*Methanothermobacter thermautotrophicus* ΔH and *Methanothermobacter thermautotrophicus* Z-245)に比べ速やかにメタンを生成することが示された(図 3-13)[30]。

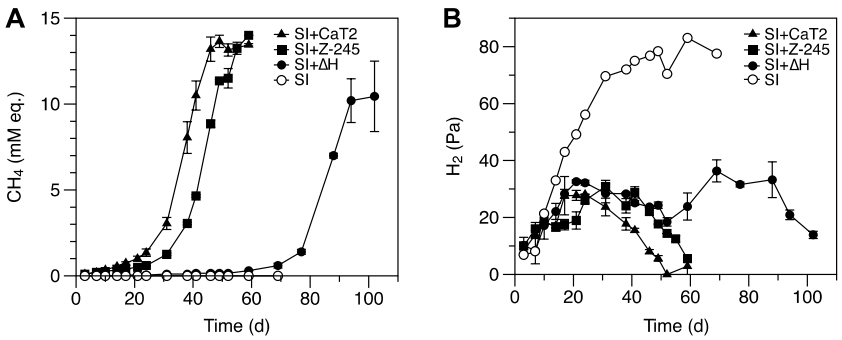


図 3-13　SI 株と異なるメタン菌とのプロピオン酸を基質とした共生によるメタン生成の比較
(A) メタン量、(B) 水素量[30]

また、CaT2 株は培養期間を通して凝集し、細胞表層に糖の層が存在すること、さらには

[30] Kosaka T., Toh H., Fujiyama A., Sakaki Y., Watanabe K., Meng X.Y., Hanada S., Toyoda A. “Physiological and genetic basis for self-aggregation of a thermophilic hydrogenotrophic methanogen, Methanothermobacter strain CaT2”, Environmental Microbiology Reports, 2014, 6(3), 268-277.

糖含量が高いことが示された。また、CaT2 の比較ゲノム解析及び転写解析によって、あるグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子は正常な増殖条件下で比較的高レベルで発現されることが明らかになった(図 3-14)。これらのことから CaT2 細胞表面上の多糖層は、細胞凝集に関与している可能性があり、その形成にグリコシルトランスフェラーゼの関与が示唆された[30]。CaT2 株の凝集形成能に関わる遺伝子は現在も解析が継続されている。

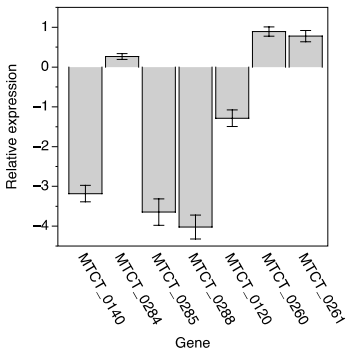


図 3-14　CaT2 株に特有のグリコシルトランスフェラーゼ
(MTCT_0284)が他のグリコシルトランスフェラーゼ(MTCT_0140,0285,0288)より高発現[30]

(ⅱ)耐熱性及び耐熱化微生物の遺伝子解析：ゲノム配列とトランスクリプトーム解析

プロピオン酸酸化細菌や水素資化性メタン生成菌のゲノム解析やトランスクリプトーム解析により得た技術を用い、耐熱性酵母やエタノール生産性微生物のゲノム解析が行われた。同種のもので最も耐熱性が高い酵母菌株、*Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 の全ゲノム配列を決定し、そのゲノム情報を他の酵母と比較することにより、耐熱性や様々な生物変換能及び組換えタンパク質産生に有用な性質が明らかになった。トランスクリプトーム解析により、30℃の振とう条件下でのグルコース培地の対照条件と比較して、静置培養、45℃の高温及びキシロース培地の三つの異なる増殖条件下で転写誘導あるいは抑制される遺伝子群を明らかにすることで生産菌の形質の分子的基礎が形成された[1]。また、エタノール発酵性微生物の耐熱化株の遺伝的変異がゲノム解析により明らかになるとともに、異なる微生物間での耐熱化に寄与する遺伝的変異を比較し、共通性が明らかになった[2]。

②社会・経済への波及効果

微生物による発酵技術の発展が、セルロース系のバイオマス燃料あるいは化学物質への生物変換のコスト低減につながることが期待されている。本研究領域で実施しているような、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析などコンピュータを利用したバイオデータ解析により、微生物代謝メカニズムを応用した発酵反応の安定化や情報を基にした物質生産菌の創成による未利用バイオマスの利用促進や物質生産の効率化が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト４報以内

[1] Lertwattanasakul N., Kosaka T., Hosoyama A., Suzuki Y., Rodrussamee N., Matsutani M., Murata M., Fujimoto N., Suprayogi, Tsuchikane K., Limtong S., Fujita N., Yamada M. “Genetic basis of the highly efficient yeast Kluyveromyces marxianus: Complete genome sequence and transcriptome analyses”, Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1), 47.

[2] Matsushita K., Azuma Y., Kosaka T., Yakushi T., Hoshida H., Akada R., Yamada M. “Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations”, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2016, 80(4), 655-668.

3.1.5　神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析(眞田佳門)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

大脳新皮質の神経細胞の発生において、神経細胞は神経前駆細胞の非対称分裂により生み出され、さらに脳表層側に移動して成熟する。本研究ではこの過程におけるシグナリングにおいて、極性化に関与する liver kinase B1(LKB1)に着目し、その役割を解析することを目指した。さらに、神経発生過程における G 蛋白質共役受容体(GPCR)を介したシグナリングの生理的役割の解明を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)大脳新皮質の発生における LKB1 の役割解析

LKB1 は細胞における極性形成に重要な役割を果たすが、大脳新皮質の発生期におけるその発現を調べた結果、神経前駆細胞が存在する脳室帯、移動中の細胞が局在する中間帯、及び成熟中の神経細胞が存在する皮質板に LKB1 遺伝子の発現が認められた[1]。

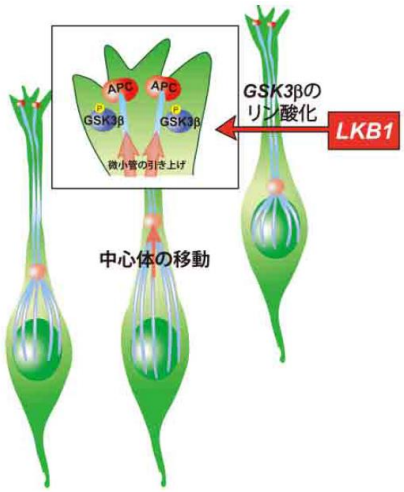


図 3-15　LKB1 シグナリングの役割モデル[31]

神経細胞が移動する際は先導突起が伸長し、中心体が前方に移動し、さらに核が中心体の方向に移動する。

そこで、神経前駆細胞の LKB1 をノックダウンすると、多くの細胞は中間体に蓄積しており、LKB1 は神経細胞移動に必須であることが明らかになった。神経細胞の移動の際は、先導突起が進行方向に伸長し中心体が前方に移動し、さらに核が中心体方向に移動するが、LKB1 の発現を抑制すると、中心体の配置が異常を示したことから LKB1 は、中心体の配置を

[31] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 21 年度終了研究課題「神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析」

制御することによって、神経細胞移動に関与することが推察された(図 3-15)[1]。

LKB1 は Glycogen synthase kinase 3β(GSK3β)のリン酸化を担い、GSK3β の不活性化に寄与することが示された。また、(1)GSK3β が LKB1 によってリン酸化されて不活性化し、(2)その結果として APC（がん抑制遺伝子産物 adenomatous polyposis coli）が微小管プラス端に結合でき、さらに(3)APC を介して微小管が膜にアンカーして安定化する、というモデルが得られ、中心体の移動及び神経細胞の移動に GSK3β が重要であることが示唆された[2]。

(ⅱ)神経前駆細胞の運命決定における orphan G protein-coupled receptor(オーファン GPCR)の役割解析

マウス胎児脳において、脳神経前駆細胞に発現し発生制御に関与する GPCR を探索したところ、神経前駆細胞に特異的に発現するオーファン GPCR である GPRC5B が発見された[3]。GPRC5B をノックダウンしたところ、神経前駆細胞とともに神経細胞が減少し、アストロサイト及びその前駆細胞のマーカーが発現するようになり、神経前駆細胞において、GPCR を介したシグナリングが神経細胞への分化に重要な役割を果たしていることが示された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Asada N., Sanada K. “LKB1-Mediated spatial control of GSK3β and adenomatous polyposis coli contributes to centrosomal forward movement and neuronal migration in the developing neocortex”, Journal of Neuroscience, 2010, 30(26), 8852-8864.

[2] Asada N., Sanada K., Fukada Y. “LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning” Journal of Neuroscience, 27(43), 2007, 11769-11775.

[3] Kurabayashi N., Nguyen M.D., Sanada K. “The G protein-coupled receptor GPRC5B contributes to neurogenesis in the developing mouse neocortex“, Development (Cambridge), 2013, 140(21), 4335-4346.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後はその研究を発展させるとともに、概日時計システムや情動との関連についても研究を展開した。科研費基盤研究(B)「大脳新皮質における神経細胞の発生および維持に関与する分子機構の解析」(2009 年度～2012 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「大脳新皮質における神経細胞の極性化を司る分子基盤の解析」(2011 年度～2012 年度)において、神経新生でシグナル伝達を担う G 蛋白質共役受容体やタンパク質キナーゼ

のメカニズムの解明を進め、また現在も科研費基盤研究(C)「神経前駆細胞の細胞運命を制御するG蛋白質共役受容体シグナルの役割解析」(2017年度～2019年度)及び科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「脳発生をコントロールする細胞環境としてのリゾフォスファチジン酸シグナルの役割解析」(2017年度～2018年度)で神経発生に関するG蛋白質共役受容体シグナルの意義について研究を行っている。

また、科研費挑戦的萌芽研究「概日時計が情動をコントロールする作用基盤の解析」(2012年度～2013年度)、科研費挑戦的萌芽研究「概日時計システムの神経保護機構における役割解析」(2014年度～2015年度)において神経発生における概日リズムと情動との関連など生理的役割の解析を進めた。

①科学技術の進歩への貢献

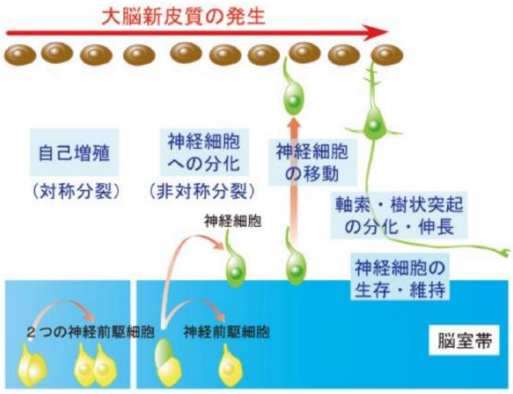


図3-16　神経細胞の発生、分化と移動の分子機構[32]

神経前駆細胞は非対称分裂し、増殖、分化し、移動する。

(ⅰ)神経細胞移動と分化・成熟

本研究領域で見いだされたGPRC5Bの下流経路が解析され、その結果、マウス胎仔脳においてGPRC5Bは3量体Gタンパク質G12と共役すること、さらにカテニンを介したシグナリングを調節することが明らかになった[33]。GPRC5Bに加えて、神経前駆細胞に特異的に発現するGPCRであるGPR157を同定した。さらに、GPR157が神経前駆細胞の一次繊毛に発現しており、脳脊髄液からのシグナルによって活性化して、神経前駆細胞の神経分化を促すことが明らかになった[1]。

[32] 眞田研究室ホームページ　http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/mgrl/sanada/research.html

[33] Kurabayashi N., Nguyen M.D., Sanada K. “The G protein-coupled receptor GPRC5B contributes to neurogenesis in the developing mouse neocortex”, Development(Cambridge), 2013, 140(21), 4335-4346.

(ⅱ)神経細胞の保護・維持機構

ストレス刺激を受けた神経細胞自身の防御・維持の分子メカニズムの解明のために、培養神経細胞を種々の神経毒に暴露するとNuclear factor, interleukin 3 regulated(Nfil3)の発現量が増加することが見いだされた。さらに、培養神経細胞に Nfil3 を強制発現すると、神経毒依存的な神経変性が顕著に抑制され、逆に発現抑制すると、神経毒に対する脆弱性が亢進することが見いだされ、Nfil3 が神経保護を担うことが明らかになった[3]。

そこで、Nfil3 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、さらに、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis(ALS))のモデルマウスと交配させて二重変異マウスを作製すると、この二重変異マウスはALSモデルマウスと比較して、運動神経の変性が緩和され、症状の発症が顕著に遅延することが見いだされ[2]、Nfil3 の発現が神経変性の抑止に寄与するという知見が得られた。

(ⅲ)成体ニューロン新生の日内リズムとその生理的役割の解析

本研究期間中にマウスの海馬歯状回において、神経細胞の産生が夜に活発に起こるという日内リズムを示すことが見いだされた[34]。

さらに日内リズムがマウスの養育行動に及ぼす影響が検討された。すなわち、Clock 遺伝子変異マウスは、その養育活動の日内パターンが変化すること、さらに、Clock 変異マウスに養育された野生型マウスは、脳内セロトニン量が減少し、不安レベルが亢進することが見いだされた[35]。

(iv)ダウン症モデルマウスにおける神経発生異常の分子基盤の解析

ダウン症は21番染色体が三倍体化して生じる遺伝子疾患であり、神経発生に異常を呈する。マウス胎仔脳においてヒト 21 番染色体にある二つの遺伝子、dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A(DYRK1A)と Down syndrome critical region gene 1(DSCR1)の発現量を同時に増加させると、神経前駆細胞からの神経細胞の産生が抑制されることが見いだされた。そこでこのダウン症モデルマウスの神経幹細胞のDYRK1AとDSCR1遺伝子の発現量を減少させると神経細胞の産生抑制が緩和された。さらに、これらの遺伝子の過剰発現は転写因子NFATcの働きを抑制し、その結果、神経細胞の産生が抑えられることが明らかになった[3]。また、脳発生の後期において、DYRK1A の過剰発現が神経前駆細胞のグリア細胞への分化を促進することが明らかになった[4]。

---

[34] Tamai S.I., Sanada K., Fukada Y. “Time-of-day dependent enhancement of adult neurogenesus in the hippocampus”, PLos One, 2008, 3(12), e3835.

[35] Koizumi H., Kurabayashi N., Watanabe Y., Sanada K. “Increased Anxiety in Offspring Reared by Circadian Clock Mutant Mice”, PLoS ONE, 2013, 8(6), e66021.

②社会・経済への波及効果

近年、アルツハイマー病、うつ病、統合失調症などの患者の脳内で、海馬新生ニューロンの数が増加若しくは減少している可能性が示唆されるなど、正常な脳機能と海馬ニューロン新生との連関が指摘されている。本研究では、本事象に概日時計が深く関与していることを示唆しており、概日時計機能の正常化が疾患の緩和に有用である可能性がある。筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスにおける Nfil3 の発現が神経変性の抑止に寄与するという発見は、神経変性疾患を緩和する方策の開発の礎になる可能性がある。また、ダウン症の脳発生異常メカニズムの理解は、ダウン症に対する治療法の開発に寄与することが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Takeo Y., Kurabayashi N., Nguyen M.D., Sanada K. “The G protein-coupled receptor GPR157 regulates neuronal differentiation of radial glial progenitors through the Gq-IP3 pathway”, Scientific Reports, 2016, 6, 25180.

[2] Tamai S.I., Imaizumi K., Kurabayashi N., Nguyen M.D., Abe T., Inoue M., Fukada Y., Sanada K. “Neuroprotective role of the basic leucine zipper transcription factor NFIL3 in models of amyotrophic lateral sclerosis”, Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(3), 1629-1638.

[3] Kurabayashi N., Sanada K. “Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells”, Genes and Development, 2013, 27(24), 2708-2721.

[4] Kurabayashi N., Nguyen M.D., Sanada K. “DYRK1A overexpression enhances STAT activity and astrogliogenesis in a Down syndrome mouse model”, EMBO Reports, 2015, 16, 548-562.

3.1.6 RNA ポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索(新矢恭子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

インフルエンザウイルスの 8 本の遺伝子は、水禽類の体内では、あまり遺伝子変異が起こらず、比較的安定に保たれているが、人で流行しているインフルエンザウイルスの遺伝子配列には、多くの変異が観察される。本研究ではヒトインフルエンザウイルスが遺伝子変異を起こしやすい原因をそのウイルスタンパク質構造の比較により解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)ヒトと水禽間のインフルエンザウイルスの RNA 複製時のエラー率の比較

ヒトの A 型インフルエンザウイルスには、ワクチンの効力が早期に減弱する、変異速度が速い、分離されるウイルスの多くは変異ウイルスである、などの特徴があることから、ヒトインフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、RNA 複製時のエラー率が高いと考えられてきた。そこで、ヒト由来ウイルスと水禽由来ウイルスの RNA ポリメラーゼのエラー率を計算した結果、ヒト由来ウイルスの RNA ポリメラーゼは、水禽由来ウイルスのポリメラーゼよりも、RNA 複製時のエラー率が高く、かつ、RNA 複製の活性も高いことが明らかになった[1]。

(ⅱ)ポリメラーゼにヒト型変異が起こる動物モデルの探索

インフルエンザウイルスのヒト型変異では、ポリメラーゼ遺伝子そのものに、幾つかのヒト型変異が知られている。そこで、A 型インフルエンザウイルスが感染すると、ウイルスのポリメラーゼにヒト型変異が起こる動物モデルの探索が行われた[2]。2 種類のトリ由来ウイルスをダチョウに感染させて、呼吸器組織(気管・肺)、脳、肝臓、腎臓、脾臓からウイルスを分離し、その分離ウイルス集団内の個々のウイルスの遺伝子配列が調べられた。その結果、肺以外のほとんどの臓器のウイルス集団に多くの割合でヒト型変異ウイルスが含まれていたことから、 ダチョウが A 型インフルエンザウイルスにヒト型変異が入るモデル動物になり得ることが明らかになった[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Shinya K., Watanabe S., Ito T., Kasai N., Kawaoka Y. “Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice”, Journal of General Virology, 2007, 88(2), 547-553.

[2] Shinya K., Makino A., Ozawa M., Kim J.H., Sakai-Tagawa Y., Ito M., Le Q.M., Kawaoka Y. “Ostrich involvement in the selection of H5N1 influenza virus

possessing mammalian-type amino acids in the PB2 protein”, Journal of Virology, 2009, 83(24), 13015-13018.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も A 型インフルエンザウイルス由来の RNA ポリメラーゼに関する研究が継続された。科研費基盤研究(C)「ウイルスの変異率を下げるための研究」(2012 年度～2014 年度)では、RNA ポリメラーゼ関連タンパク質 PB1-F2 に関する研究が行われた。

科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「ウイルス感染時の細胞・個体レベルでの網羅的状態把握法の確立とその応用」(2013 年度～2014 年度)では、ウイルス感染時の細胞及び生体の恒常性破綻の機序を解明し、その修復点を探索することを目的とした研究が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)PB1-F2 による A 型インフルエンザウイルス由来の RNA ポリメラーゼ活性の制御

A 型インフルエンザウイルス由来の RNA ポリメラーゼ複合体は polymerase basic protein 1(PB1)、polymerase basic protein 2(PB2)、polymerase acidic protein(PA)、nucleoprotein(NP)から成り、2001 年に 11 番目のウイルスタンパク質として検出された PB1-F2(PB1 遺伝子の 5’末端近くの代替オープンリーディングフレーム)が PB1 を介してウイルスポリメラーゼ活性の調節に関わることが報告された。そこで、PB1-F2 のアミノ酸変異が RNA ポリメラーゼ活性に与える影響を調べるため、PB1-F2 を加えたウイルス RNA ポリメラーゼ複合体の in vitro 発現と活性測定のためのミニゲノムシステム[36]が構築された[1]。このシステムにより、PB1-F2 の 29 番目のアルギニン残基がトリ由来インフルエンザウイルスで高度に保存されていることが明らかになった。そこで、ヒトインフルエンザ H1N1[37]種にこのアルギニン残基の変異を導入し、ヒト胎児腎細胞(human embryonic kidny cells 293: HEC293)に感染させた結果、ポリメラーゼ活性が顕著に増加した[1]。以上により、PB1-F2 遺伝子における変異が宿主の RNA ポリメラーゼ活性を上昇させ、H1N1 ウイルスの増殖性や病原性に寄与する可能性が示された[1]。

②社会・経済への波及効果

PB1-F2 遺伝子がポリメラーゼ活性に影響を与え、H1N1 ウイルスの増殖性や病原性に寄与する可能性が示されたことから、今後 PB1-F2 遺伝子をターゲットとした新規抗インフルエンザ薬開発の可能性が考えられる。

---

[36] 危険なウイルスを研究する安全な方法である。ミニゲノムは、ウイルスゲノムの短縮版で、複製及び転写に必要なゲノムの 3’及び 5’末端を含むが、感染に必要なウイルスタンパク質をコードする配列がレポーター遺伝子と置換されている。

[37] スペインかぜと呼ばれるパンデミックを起こす新型 A 型インフルエンザウイルス

中学生以上の一般人を対象に、第6回サイエンス・カフェ高槻(2013年「鳥インフルエンザのヒト感染の仕組みと気をつけること」)で、鳥インフルエンザの変異の仕組みとワクチンに関する講演が行われた[38]。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Ueda Y., Tanaka M., Kyan Y., Yoshida M., Sasahara K., Shinya K. “PB1-F2 Amino Acids Regulate Influenza A Viral Polymerase Activity”, Journal of Basic & Applied Sciences, 2014, 10, 1-6.

[38] http://www.sky.sannet.ne.jp/gryds573/diary1.html

3.1.7　細胞膜形態決定の動作原理の解明(末次志郎)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

細胞は機能に合わせた特定の形態を持つが、細胞外層を構成する脂質二重膜は他のものにより支えられてその形態を保っている。本研究では、細胞の骨組みである細胞骨格と細胞膜をつなぐインターフェースとなる分子群を同定し、機能解析を行うことにより、特定の細胞が特定の形態を形成するための分子基盤を解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)Bin-Amphiphysin-Rvs167(F-BAR)ドメインの構造と膜変形機能

BAR ドメインは amphiphysin などのタンパク質の N 末端に多く見いだされる脂質結合ドメインで、バナナ型の構造をとるダイマーである。本研究では、BAR と同様に膜結合活性や膜変形(tubule 形成)活性を持つ F-BAR ドメインが発見された[1]。F-BAR も BAR と同様なαヘリックスから成る二量体のバナナ型構造だが、バナナの内側の凹面は負に帯電していたことから、凹面で膜に結合することが示唆された[1]。

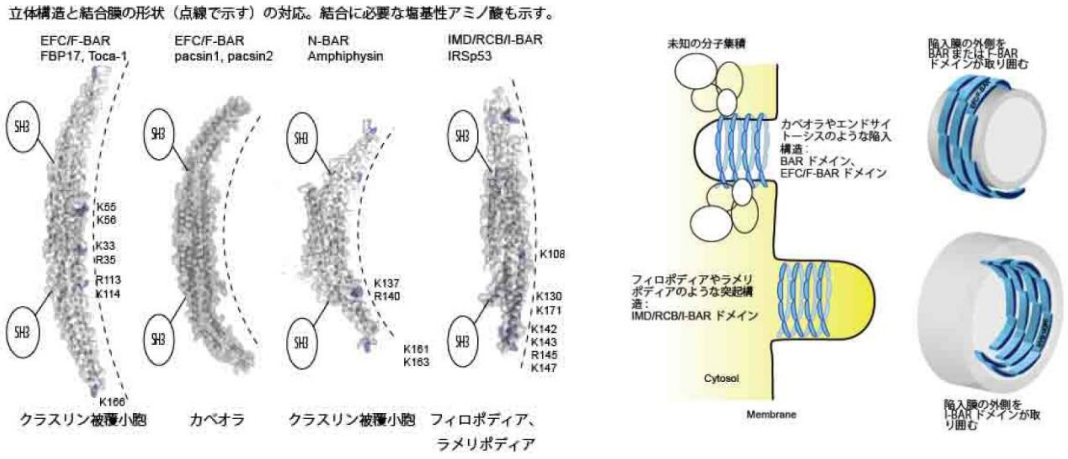


図 3-17　BAR ドメインの構造と機能[39]

左図は各 BAR の立体構造を示す。左側から順に formin-binding protein 17(FBP17)と transducer of Cdc42-dependent actin assembly 1 (Toca-1)の F-BAR、PACSIN1 と PACSIN2 の F-BAR、Amphiphysin の N-BAR、RSp53 の I-BAR である。点線は膜接合面を示す。右図は BAR のポリマーの膜への結合状態を示す模式図で、上段は N-BAR と F-BAR の結合、下段は I-BAR の結合状態を示す。

[39] Suetsugu S., Toyooka K., Senju Y. “Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins”, Seminars in Cell and Developmental Biology, 2010, 21(4), 340-349.

さらに、F-BAR ドメインは結晶中で、鎖を形成し、鎖の部分の結合を担うアミノ酸に変異が導入されると膜変形能が消失することから、F-BAR ドメインはポリマーを形成し、ポリマーが膜を取り囲むようにして、膜の陥入を誘導することが示唆された[1]。

(ⅱ)F-BAR ドメインのアクチン重合調節機能

BAR ドメインを持つタンパク質のうち FBP17、Toca-1 は、アクチン重合を制御するタンパク質の Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)と結合することが知られている。そこで、膜の曲率によるアクチン重合の制御機構を明らかにするため、FBP17 又は Toca-1 と N-WASP の混合液にリポソームを添加し、actin polymerization assay を行った。その結果、直径が比較的大きなリポソームだけでアクチン重合の速度が大きく増加し、F-BAR タンパク質は細胞膜の形態に応じてアクチン重合を調節している可能性が示唆された[2]。

(ⅲ)IMD ドメイン(I-BAR ドメイン)の構造と膜変形機能

insulin receptor substrate p53(IRSp53)や Missing in metastasis(MIM)タンパク質の N 末にある IRSp53-Mim-homology domain(IMD)ドメインを解析した。IMD ドメインは、BAR や F-BAR と同様αヘリックスのダイマーだが、形はバナナ型でなく、緩い逆曲率を持った直線状であった。また、凸型の膜結合面を介して膜に結合し、細胞における突起構造を形成することが分かった[3]。この結果より、タンパク質の脂質結合面が凸型か凹型によって膜の変形の向きが決定されることが示唆された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Shimada A., Niwa H., Tsujita K., Suetsugu S., Nitta K., Hanawa-Suetsugu K., Akasaka R., Nishino Y., Toyama M., Chen L., Liu Z.J., Wang B.C., Yamamoto M., Terada T., Miyazawa A., Tanaka A., Sugano S., Shirouzu M., Nagayama K., Takenawa T., Yokoyama S. “Curved EFC/F-BAR-Domain PDimers are Joined End to End into a Filament for Membrane Invagination in Endocytosis”, Cell, 2007, 129(4), 761-772.

[2] Takano K., Toyooka K., Suetsugu S. “EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization”, EMBO Journal, 2008, 27(21), 2817-2828.

[3] Scita G., Confalonieri S., Lappalainen P., Suetsugu S. “IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions”, Trends in Cell Biology, 2008, 18(2), 52-60.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域期間中からBARドメインの分子機構の更なる解明を、科研費若手研究(A)「細胞移動先端における重層的アクチン細胞骨格制御の研究」(2008年度～2010年度)、終了後も科研費若手研究(A)「浸潤突起における膜構造構築とシグナル分子の集積機構」(2011年度)、科研費基盤研究(B)「細胞膜突出構造の膜形態制御機構と生理機能」(2014年度～2016年度)で膜形態の制御機構の研究を継続、発展させている。

一方、本研究領域に引き続き大型の助成プログラム、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「細胞膜メゾスケール構造構築とがん形成機構」(2010年度～2013年度)を獲得し、膜構造の制御機構に関する研究をがん浸潤機構解明へと展開した。また、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「タンパク質ポリマー形成による動的膜形態形成の直接可視化による解明」(2015年度～2016年度)では上記の研究を行うためのイメージング技術の開発が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

本研究課題に続いてNEXTプログラムで、がん浸潤と関連するBARタンパク質の細胞膜構築機構について研究が展開された。

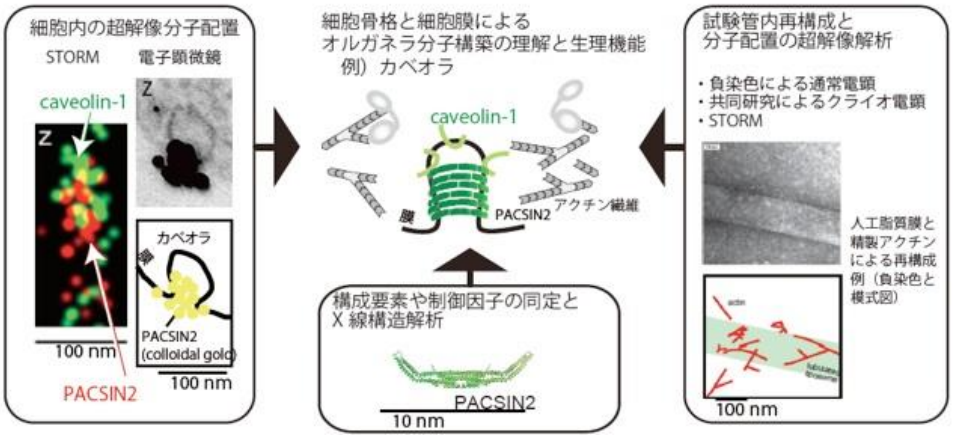


図3-18　PACSIN2の構造解析と機能解析[40]

図中央は膜に結合するPACSIN2ポリマーとcaveolin-1の状態を示す模式図で、左枠内は免疫染色や電気顕微鏡によるPACSIN2分子の局在、右枠内は負染色によるアクチンの局在、中央下枠内はPACSIN2の立体構造を示す。

がんの形成に重要な細胞小器官、カベオラの生理機能について、BARタンパク質であるPACSIN2の分子機構及び突起形成を行うBARタンパク質であるIRSp53とそのがん化における役割が調べられた。

[40] 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科　分子医学細胞生物学　末次研究室ホームページ http://bsw3.naist.jp/suetsugu/?cate=273

(ⅰ)PACSIN2 の構造と機能

アクチン重合に働く新たなタンパク質として PACSIN2 が発見された[1]。また、PACSIN2 の X 線構造解析により、PACSIN2 は F-BAR ドメインを持ち、凹面で脂質膜に結合することが明らかになった[1](図 3-18)。caveolin-1 が PACSIN2 に直接結合し、PACSIN2 は caveolin-1 を介してカベオラ形成に関与することが示された[2](図 3-18)。

(ⅱ)PACSIN2 のリン酸化による制御とカベオラのエンドサイトーシス

PACSIN2 は protein kinase C(PKC)の活性化によってリン酸化され、dynamin との結合を変化させ、PACSIN2 によって形成される膜のチューブ構造の切断を誘導する。すなわち、PKC が活性化し PACSIN2 がリン酸化されることによって、カベオラのエンドサイトーシスが誘導されると考えられた[3]。

(ⅲ)insulin receptor substrate p53(IRSp53)と vasodilator-stimulated phosphor protein (VASP)のポドソーム形成への関与

I-BAR ドメインを持つ IRSp53 のノックダウンにより、がん細胞の転移を担う浸潤突起の一つであるポドソームの形成と浸潤が阻害されたことから、IRSp53 のポドソーム形成への関与が明らかになった[41]。また、VASP は IRSp53 と相互作用し、両者がポドソーム形成に必要であることが明らかになった[41]。

(ⅳ)脂質とタンパク質の相互作用

Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)分子の「アンキリンリピートドメイン」が細胞膜リン脂質「Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PI(4,5)P2)」と結合することが明らかになった。さらにその結合状態の共結晶を作成し、X 線結晶解析と分子動力学計算により PI(4,5)P2 結合サイトの候補が同定された。この結合部位の変異実験により TRPV4 と PI(4,5)P2 の結合がイオンチャネルの活性制御に関連し、筋萎縮症等においてはこの制御が失われていることが示唆された[4]。

②社会・経済への波及効果

タンパク質が、脂質膜に対する鋳型となり、細胞の形態を決めるという普遍的な原理を証明したことに加え、NEXT プログラムでは形態形成に関わるタンパク質の阻害によりがんの形成を抑制することを見出しており、新たながん治療薬の開発に展開されることが期待される。

[41] Oikawa T., Okamura H., Dietrich F., Senju Y., Takenawa T., Suetsugu S. “IRSp53 Mediates Podosome Formation via VASP in NIH-Src Cells”, PLoS ONE, 2013, 8(3), e60528.

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Shimada A., Takano K., Shirouzu M., Hanawa-Suetsugu K., Terada T., Toyooka K., Umehara T., Yamamoto M., Yokoyama S., Suetsugu S. “Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of PACSIN2/Syndapin II FEBS Letters”, 2010, 584(6), 1111-1118.

[2] Senju Y., Itoh Y., Takano K., Hamada S., Suetsugu S. “Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting”, Journal of Cell Science, 2011, 124(12), 2032-2040.

[3] Senju Y., Rosenbaum E., Shah C., Hamada-Nakahara S., Itoh Y., Yamamoto K., Hanawa-Suetsugu K., Daumke O., Suetsugu S. “Phosphorylation of PACSIN2 by protein kinase C triggers the removal of caveolae from the plasma membrane”, Journal of Cell Science, 2015, 128(15), 2766-2780.

[4] Takahashi N., Hamada-Nakahara S., Itoh Y., Takemura K., Shimada A., Ueda Y., Kitamata M., Matsuoka R., Hanawa-Suetsugu K., Senju Y., Mori M.X., Kiyonaka S., Kohda D., Kitao A., Mori Y., Suetsugu S. “TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P2”, Nature Communications, 2014, 5, 4994.

④その他

末次は、2011年9月にFEBS letters young group leader award、2012年4月に文部科学大臣表彰科学技術賞・若手科学者賞、2014年に日本生化学会奨励賞、2015年に風戸研究奨励会 風戸賞を受賞した。

3.1.8　味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤(杉田誠)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

苦味感覚は、嫌悪性の行動的反応と不快感を、甘味/うま味感覚は、嗜好性の行動的反応と快的情動を惹起する。本研究ではそれらの対照的な行動と情動の惹起を可能にする脳内ニューロンの動作原理を明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの細胞体の局在

苦味伝導路と甘味伝導路を可視化するため、苦味受容体(taste receptor type-2:T2R)若しくは甘味/うま味受容体(taste receptor type-1-3:T1R3)を発現する味細胞に、それぞれ選択的に経シナプス性トレーサー(Wheat Germ Agglutinin Discosoma-Red:WGA-DsRed)を発現する 2 系統のトランスジェニックマウスが作製され、味細胞から移行した WGA-DsRed で蛍光標識されるニューロン細胞体の脳内局在が調べられた(図 3-19)[1]。その結果、全ての味覚情報を末梢から受け取る最初の脳部位である延髄孤束核内において、WGA-DsRed を保有する苦味伝導路構成ニューロンの細胞体は、甘味伝導路構成ニューロンの細胞体より後方に分離して集積することが示された(図 3-19) [1]。

(ⅱ)延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの樹状突起構造

味覚伝導路構成ニューロンの樹状突起構造・スパイン構造を可視化するために、ニューロン内に蛍光色素を注入した結果、延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロン 185 例中で 150 例は、樹状突起を 1 方向若しくは 2 方向に伸長する単純な形態を示すことが明らかになった[1]。

(ⅲ)延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの電気生理学的性質・薬理学的特性

延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンのシナプス伝達においては alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid(AMPA)受容体を介しグルタミン酸作働性のシグナルが伝達入力され、また Cholecystokinin(CCK)による増強が示された(図 3-19)[1]。CCK は摂食後満腹時に、小腸から分泌されることから、満腹時には、延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンに作用し、苦味応答の一端を促進することが示唆された[1]。

(ⅳ)延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種の同定

苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種・発現分子が免疫組織化学的に解析された[1]。その結果、延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンの多くはチロシン水酸化酵素を発現す

る Catecholaminergic(カテコールアミン作動性)ニューロン[42]であることが示唆された(図 3-19)[1]。

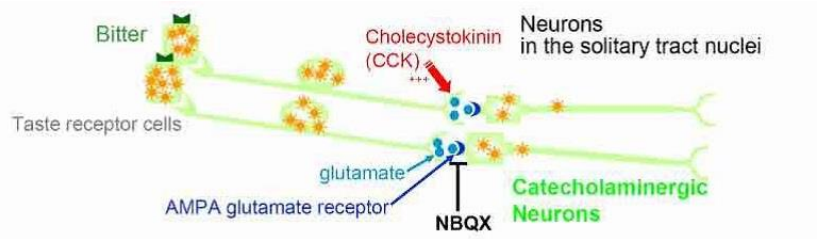


図 3-19　WGA-DsRed 標識された延髄孤束核内ニューロンの模式図[1]

延髄孤束核内の WGA-DsRed 標識(オレンジ)苦味伝導路構成ニューロンは、グルタミン酸作動性入力を AMPA 受容体[43]により受け取り、このシナプス伝達は CCK により増強される。苦味伝導路ニューロンの多くは Catecholaminergic ニューロンである。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Sugita M., Yamamoto K., Hirono C., Shiba Y. “Information processing in brainstem bitter taste-relaying neurons defined by genetic tracing”, Neuroscience, 2013, 250, 166-180.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も味覚伝導路構成ニューロンに関する研究が継続された。科研費基盤研究(C)「大脳皮質の味覚伝導路構成ニューロンの発生工学的トレーシングと味覚識別様式の解明」(2009 年度～2011 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「味覚誘発情動の神経回路基盤の解明と心の科学への展開」(2012 年度～2014 年度)では、苦味処理に関する研究が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ｉ)橋結合腕傍核領域の苦味伝導路構成ニューロンの配置と特性

苦味受容味細胞から移行した経 WGA-DsRed により標識される延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの細胞機能・ニューロン種を解析した本研究課題の結果を受けて、次の移行先である橋での、苦味伝導路構成ニューロンの三次元的空間配置が調べられた(図 3-20)。橋結合腕傍核領域の脳の連続切片から WGA-DsRed で標識されるニューロンの局在を DsRed 蛍光により検出した結果、苦味情報を伝導するニューロンは橋結合腕傍核領域で後方の

[42] ドーパミン、アドレナリン、ノルアドレナリンなどのカテコールアミンを合成、分泌するニューロンの総称

[43] グルタミン酸受容体の一種で、リガンド結合に対してミリ秒相当の速い応答を示し、速い神経伝達を担う。

medial(中心)側と前方の external lateral(外部側方)側の各々に分布することが明らかになった。さらに、これらニューロンの活性制御機構をホールセルパッチクランプ法で解析した結果、後方の medial 側の苦味伝導路構成ニューロンはグルタミン酸とノルアドレナリンによる入力を AMPA 受容体とα1 受容体を介して受け取り、それぞれ減衰速度の速い興奮性シナプス後電流と遅い興奮性シナプス後電流が誘発されることが示唆された。また、前方の external lateral 側の苦味伝導路構成ニューロンはαメラニン細胞刺激ホルモンにより活性化されることが明らかになった。

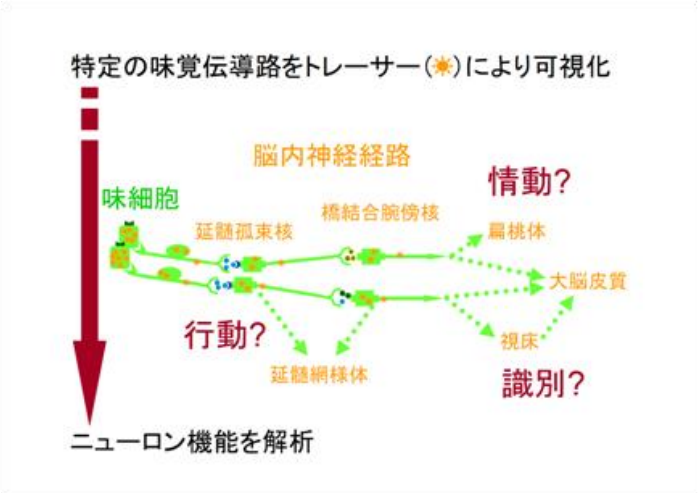


図 3-20　トレーサーによる苦味伝導路の追跡[44]

苦味受容味細胞に発現させた経シナプス性トレーサー(オレンジ点)は延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンを経て橋結合腕傍核領域の苦味伝導路構成ニューロンに移行する。

②社会・経済への波及効果

特定味覚を伝導する神経経路の理解により、食物の味の美味しさ・不味さ、好き・嫌いをいかに感じるか、嚥下や嘔吐などの味覚誘発行動がいかに惹起されるかなど、味覚により引き起こされる行動のメカニズムが明らかになることが期待される。さらに味覚障害、摂食障害、拒食・過食の治療等への医学的応用や、食育への教育的応用、糖分の取り過ぎを制限する方法の開発や苦い薬を飲みやすくする方法の開発の創薬等、様々な応用が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Sugita M., Yamamoto K., Hirono C., Shiba Y. “Functional dissection of sweet and bitter taste pathways”, Journal of Oral Biosciences, 2013, 55, 67-72.

[44] 広島大学統合技術情報発信システムひまわり　https://hutdb.hiroshima-u.ac.jp/seeds/view/546/ja

3.1.9　分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証(田中裕人)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

分子モーターは、熱ノイズを利用して前後に“揺らぎ”ながら、確率的に前方向に動いて行く。本研究では、分子モーター1 個を動作ユニットと捉え、筋肉(サルコメア)をシステム(分子モーターの非線形結合システム)として捉えることで、素子レベルの“揺らぐ”運動処理が、生命システムのダイナミックな反応機構を実現する設計アルゴリズムの解明・創出を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)結合された測定プローブの分子モーターの運動への影響

1 個のミオシンを分子モーターユニット、10 個までの分子モーターから構成される構造を分子モーターシステムとし、分子運動の観察法が検討された。実験的検証の道具として、光ピンセット分子マニピュレーション法が用いられた。分子モーターは光学顕微鏡で直接観測することができないため、マイクロビーズの測定プローブを分子モーターユニットに結合させて分子の動きが観測された(図 3-21)[1]。分子モーターユニットとシステムの運動が測定プローブによりどのような変調を受けるかを調べるため、ランジュバン方程式を用いたシミュレーションが行われた結果、測定プローブにより、分子モーターの運動が変調されていることが示された。これにより、要求される実験デザインに応じて測定プローブ特性を設計することで、分子モーターの運動を変調させ、その運動を高空間分解能で検出できる可能性が示唆された[1]。

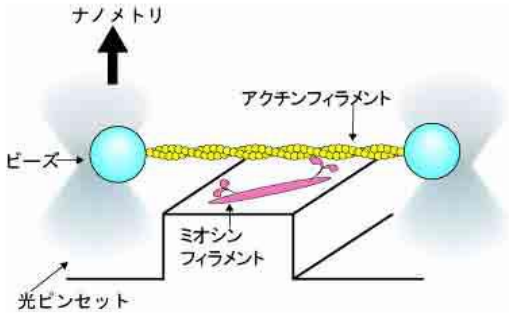


図 3-21　測定プローブを用いた一分子運動計測[1]

光ピンセットで捕捉したマイクロビーズをプローブとして分子モニターユニットの運動を計測する。

(ⅱ)分子モーターユニットをベースとした分子モーターシステムのモデル構築

骨格筋を最も大きな分子モーターシステムとし、骨格筋を構成する最小ユニットである

ミオシン分子を分子モーターユニットとみなしたモデル構築が行われた。1 分子測定により、1 個で働く場合の分子モーターユニットのステップサイズ(1 個の ATP を加水分解する間に動く距離)が直接測定され、～15nm と示された[1]。また、分子モーターシステム中で分子モーターユニットが働く場合のステップサイズはバネを介した相互作用により、分子モーターが 1 個だけで働く場合と異なり、10 個までのユニットのシステムでは、ステップサイズが 60nm 以上にもなると見積もられた[1]。これにより、この分子モーターユニットは構成数に応じて自律的に調節する機能を有することが示唆された[1]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Tanaka H., Homma K., White H.D., Yanagida T., Ikebe M. “Smooth muscle myosin phosphorylated at single head shows sustained mechanical activity”, Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(23), 15611-15618.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、ナノマシン設計を目指して分子モーターの運動の研究は継続された。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)生体分子メカニズムから学ぶノイズ整流による動作アルゴリズム

生体分子が働くナノスケールの世界では、粘性や熱揺らぎの効果が大きくなることから、大きなノイズの中でも機能できるアルゴリズムの解明を目指す研究が行われた。まず、タンパク質モーターを参考にして、熱ノイズ中で働くナノマシンの簡単なモデルが設計された[1]。熱ノイズ中でレールに沿った一次元周期リニア運動を行う機能粒子(直径 30nm)がレールとの相互作用による駆動力(ポテンシャル)で粒子運動を行うモデルが構築され、リガンド(エネルギー供給分子)の結合・乖離での機能粒子の運動がシミュレーションされた[1]。その結果、機能分子の運動では、本質的に方向性がランダムな熱ノイズから一方向の熱ノイズを選択し、トータルとして一方向の運動が発生している(熱ノイズの整流)ことが明らかになった[1]。すなわち、外部環境に応じて自律的に運動速度を調節し、運動方向をスイッチする機構はノイズ整流により実現していることが示唆された[1]。

②社会・経済への波及効果

本研究では、熱ノイズ中で働くナノマシンのモデルが設計された。タンパク質モーターをモデルにしたノイズ整流による動作の解析は、様々な環境下で自律的に機能制御するような分子マシン設計に利用されることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト４報以内

[1] Tanaka H. “Functional algorithm based on noise rectifying, inspired by Bio Molecular Mechanism”, Journal of the National Institute of Information and Communications Technology, 2013, 60(2), 51-56.

3.1.10　タイミングの予測に関与する脳ネットワークの検証(田中真樹)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

次に起こる出来事のタイミングの予測は、生活する上でなくてはならない能力の一つであり、大脳-基底核ループと小脳が関与する二つの機構によると考えられている。本研究では、主に小脳が関与すると期待される数百 msec 間隔の「リズム」の生成に関係した神経機構の解明を目的とし、行動課題を訓練したサルや健常人の神経活動を測定し、そのメカニズムを明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)小脳によるリズムの学習

小脳外側核の情報処理の神経機構を明らかにするため、一定周期で視聴覚刺激を提示し、その逸脱(色・形や音程の変化)又は欠落を検出すると眼球運動で答えるようにサルを訓練し(オドボール検出課題)、神経活動が調べられた(図 3-22)[1]。その結果、小脳核の一群のニューロンが、刺激を繰り返し提示することで感覚応答を増大させることが明らかになった[1]。また、抑制性伝達物質 GABA の作動薬(ムシモール)で小脳核を不活化する実験により、小脳核の信号が刺激欠落の検出に関与することが明らかになった[1]。

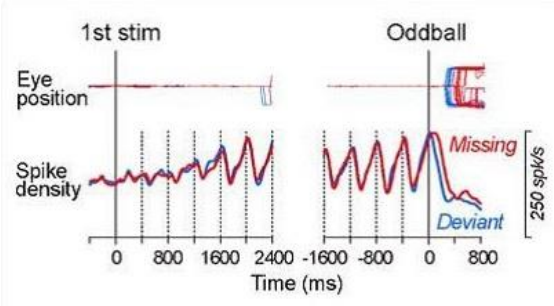


図 3-22　オドボール検出課題の小脳核ニューロンの活動[1]

縦線は 400 ミリ秒ごとの刺激、上段(Eye position)は眼球運動、下段(Spike density)は神経活動、赤線は刺激欠落時、青線は刺激逸脱時の結果を示す。

(ⅱ)刺激欠落に特異的な大脳皮質活動

小脳からのどのような情報が大脳に送られるのかを調べるため、前頭葉の様々な場所の集合電位(LFP)が測定された。その結果、前頭葉外側部に周期的な刺激の欠落を特異的に検出するシステムがあることが示唆された[1]。

(iii)欠落オドボール課題を用いた心理物理実験

周期的な刺激の欠落を検出する際に、刺激間隔の長短によって異なった神経機構が関与している可能性を検証するため、健常成人で欠落オドボール課題での反応時間を調べた[2]。その結果、周期的な音列を時間的に統合し、連続音として扱うための200～300msecの時間窓があることが示唆された[2]。

(iv)運動タイミングの調節機構

手掛かり刺激から一定時間経過した後に自発的に眼球運動を開始するように訓練されたサル(時間生成課題)では、課題遂行中に前頭葉内側部から強い運動準備電位が記録される。この神経活動による眼球運動開始のタイミング調節への関与を検証するため、同部へ電気刺激を与え自発運動のタイミングを人為的に操作した。その結果、前頭葉内側部の準備期間活動は自ら運動を開始する際にそのタイミングを制御していることが示された[3]。

(v)皮質下信号による眼球運動の随意性調節

運動性視床とそこに信号を送る大脳基底核による眼球運動の随意性制御機構を解明するため、anti-saccade(視覚刺激から目をそらす課題)とsmooth pursuit(ゆっくり動く光点を追視する眼球運動)について、その神経機構を運動性視床と大脳基底核(淡蒼球)で調べた。その結果、淡蒼球を介する経路がsmooth pursuitを制御していることが示唆された[45]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内

[1] Ohmae S., Uematsu A., Tanaka M. “Temporally specific sensory signals for the detection of stimulus omission in the primate deep cerebellar nuclei”, Journal of Neuroscience, 2013, 33(39), 15432-15441.

[2] Ohmae S., Tanaka M. “Two different mechanisms for the detection of stimulus omission”, Scientific Reports, 2016, 6, 20615.

[3] Tanaka M. “Cognitive signals in the primate motor thalamus predict saccade timing”, Journal of Neuroscience, 2007, 27(44), 12109-12118.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、サルの眼球運動系モデルを用いた小脳における時間処理の神経機構を中心とした本研究課題の継続に加え、眼球運動系による「空間的注意の制御」の神経機構

[45] Yoshida A., Tanaka M. “Neuronal activity in the primate globus pallidus during smooth pursuit eye movements”, NeuroReport, 2009, 20(2), 121-125.

に関する研究が実施された。また、行動選択に困難を来す種々の精神神経疾患の病態を理解することを目的として「ルールに基づく行動選択」の神経機構の研究が科研費基盤研究(B)「ルールに基づいた行動選択における大脳皮質・基底核ループの役割」(2008 年度～2010 年度)で行われた。科研費基盤研究(B)「小脳と基底核による時間情報の処理機構」(2011 年度～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「タイミング予測と意思決定に関わる皮質下信号の解析」(2012 年度～2013 年度)では、時間処理の神経機構の研究を行い、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「計時と予測の神経機構の探究」(2013 年度～2017 年度)において、「時間生成課題」と「欠落オドボール課題」の研究が継続されている。科研費挑戦的萌芽研究「放射線定位照射を利用した脳疾患モデル作成の基盤技術」(2012 年度～2013 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「放射線定位照射による脳疾患モデルを用いた脳機能解析」(2014 年度～2016 年度)では、脳疾患モデル作成の研究が実施され、眼球運動課題を用いた行動評価が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、本研究課題である 1)時間知覚の脳内機構解明研究のほか、2)状況に応じた行動選択、3)注意のトップダウン制御、を主なテーマとして研究が発展している。

(ｉ)時間知覚の脳内機構

本研究課題で解明した運動タイミングの調節機構について、小脳核や大脳基底核で比較・検討を加えた。手掛かり刺激からの一定時間後に眼球を動かすように訓練した「時間生成課題」で、サルの線条体のドーパミン D2 受容体を拮抗薬で抑制すると自発的な眼球運動が起こるタイミングが短縮することが明らかになった。また、自発的眼球運動はニコチン性アセチルコリン受容体経路にも影響されることが明らかにされ、自発運動開始時間は大脳基底核神経経路間のシグナルのバランスによって調節されることが示唆された(図 3-23)[1]。

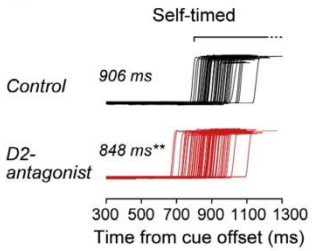


図 3-23　線条体でのドーパミン D2 拮抗薬の自発眼球運動への影響[1]

上段は D2 拮抗薬の注入前、下段は注入後の神経活動。手掛かり刺激消失後 300～1300msec 後の自発的眼球運動を測定。D2 拮抗薬の投与により眼球運動のタイミングが短縮した。

(ⅱ)注意のトップダウン制御

これまでの研究により“どこに注意を向けるか”という指令が前頭眼野から出ていることが明らかにされていた。本研究では、さらに前頭眼野が物体選択に及ぼす影響について調べるため、サルで「内的追跡課題」を用いた実験が行われた。これは正方形の四隅に配置した複数の白丸の一つを赤色であらかじめターゲット提示した後、色表示無しで追跡させ、白丸が静止後、視点をターゲットに向ける行動課題で、課題遂行中の前頭連合野の神経活動を解析するとともに[46,47]、様々な時間に微小電気刺激を与えて物体選択に与える影響が調べられた(図 3-24 A、B)[48]。その結果、電気刺激を与えないコントロール(B.上)では、最初に選択したターゲットがあった領域を選ぶ傾向がある一方、動き始めに電気刺激をした場合(C.左下)は、最終的に選ぶ物体の分布を変化させるが、動き終わり(B.右下)や追跡中に電気刺激を行った場合は影響がなかった(図 3-24 B)。このことから、前頭眼野の神経活動が、眼球運動の制御とは独立して自発的な物体選択を制御していることが示された[2]。本研究はさらに複数のターゲットを内的に追跡する課題にも発展している[49]。

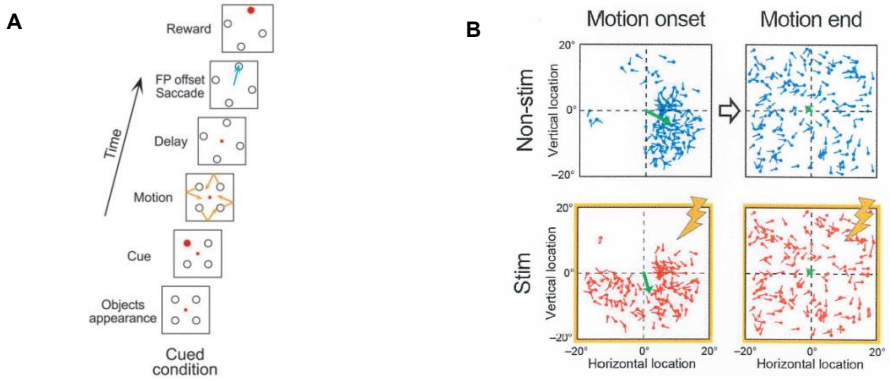


図 3-24　内的追跡課題と電気刺激による影響[2]

A はあらかじめ赤色による手掛かりを与えた内的追跡課題の例；中心の赤点はサルの視点の固定点、青矢印は最終的な視点の移動方向を示す。B 左は動き始め、右は動き終わりでサルが最終的に選択した物体の位置。上は電気刺激なし、下はそれぞれ電気刺激をした場合。

[46] Matsushima A., Tanaka M. “Alteration of the timing of self-initiated but not reactive saccades by electrical stimulation in the supplementary eye field”, Journal of Cognitive Neuroscience, 2012, 36(9), 3258-3268.

[47] Matsushima A., Tanaka M. “Different neuronal computations of spatial working memory for multiple locations within versus across visual hemifields”, Journal of Neuroscience, 2014, 13(16), 5621-5626.

[48] Matsushima A., Tanaka M. “Manipulation of object choice by electrical microstimulation in macaque frontal eye fields”, Cerebral Cortex, 2014, 24(6), 1493-1501.

[49] Matsushima A., Tanaka M. “Differential neuronal representation of spatial attention dependent on relative target locations during multiple object tracking”, Journal of Neuroscience, 2014, 34(30), 9963-9969.

(iii)状況に応じた行動選択

本研究では「ルールに応じて視覚刺激に対する応答を選択する」ときの神経活動が基底核と視床で調べられた。この研究では、最初に中央の点に視点を固定し、点が消失しターゲットが表示された後、ルールとして pro-saccade 課題ではターゲットを追跡し、anti-saccade 課題ではターゲットから眼をそらすという課題についてその成功率を比較した。その結果、anti-saccade 課題では視床 VL 核の活動増強が見られ、anti-saccade 課題遂行中に視床 VL 核を GABA 作動薬で不活化すると、課題の成功率が著しく低下した(図 3-25)。このことから VL 視床の信号が anti-saccade の生成に関与することが明らかになった[3]。この研究はその後、基底核淡蒼球[50]、小脳歯状核[51]などの研究に発展している。

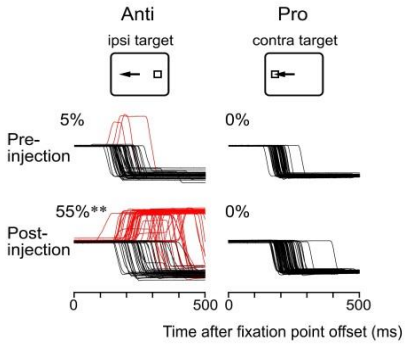


図 3-25　VL 視床ニューロンの不活化による眼球運動と神経活動への影響[3]

右側が pro-saccade 課題、左側が anti-saccade 課題の眼球運動、上段が GABA 作動薬注入前、下段が注入後、グラフの黒線は成功、赤線は失敗を示す。

以上の研究のほか、外科手術や薬物局所注入に代わる脳深部破壊術の開発のため、放射線定位照射による脳疾患動物モデルが開発された[4]。さらに、現在は共同研究を通じてサルへの遺伝子導入による新たな研究を進めている。

②社会・経済への波及効果

上記「状況に応じた行動選択」に関する研究では大脳-基底核ループの関与が示され、その障害により衝動的な行動が増加することが明らかになった。この機能の障害は、統合失調症や注意欠陥多動性障害、パーキンソン病などの精神神経疾患・発達障害と関連すると思われ、毎日新聞の「目標物と逆向く眼球動作-視床の関与解明」及び読売新聞の「指と反対向

[50] Yoshida A., Tanaka M. “Two Types of Neurons in the Primate Globus Pallidus External Segment Play Distinct Roles in Antisaccade Generation”, Cerebral Cortex, 2016, 26(3), 1187-1199.
[51] Kunimatsu J., Suzuki T.W., Tanaka M. “Implications of lateral cerebellum in proactive control of saccades”, Journal of Neuroscience, 2016, 36(26), 7066-7074.

く「あっちむいてホイ」脳の働き解明」でその研究内容が紹介された[52]。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Kunimatsu J., Tanaka M. “Striatal dopamine modulates timing of self-initiated saccades”, Neuroscience, 2016, 337, 131-142.

[2] Matsushima A., Tanaka M. “Manipulation of object choice by electrical microstimulation in macaque frontal eye fields”, Cerebral Cortex, 2014, 24(6), 1493-1501.

[3] Kunimatsu J., Tanaka M. “Roles of the primate motor thalamus in the generation of antisaccades”, Journal of Neuroscience, 2010, 30(14), 5108-5117.

[4] Kunimatsu J., Miyamoto N., Ishikawa M., Shirato H., Tanaka M. “Application of radiosurgical techniques to produce a primate model of brain lesions”, Frontiers in Systems Neuroscience, 2015, 9, 67.

④その他

田中は、2016 年 2 月に北海道大学教育総長賞(奨励賞)を受賞した[53]。

[52] 北海道大学医学研究院・医学部 神経生理学教室ホームページ　研究内容
ttp://niseiri.med.hokudai.ac.jp/naiyou/
[53] 北海道大学医学研究院・医学部 神経生理学教室ホームページ 教室近況
http://niseiri.med.hokudai.ac.jp/kyoushitsu/

3.1.11　サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析(中原潔)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

脳では認知課題を遂行しない休止状態においても同期した活動を示すネットワークを形成しており、default-mode network(DMN)と呼ばれている。本研究では DMN の機能を探るため、マカクサルをモデルとして、functional MRI(fMRI)[54]を用いて DMN を同定し DMN を阻害した時、どのような認知的変化が生じるかを明らかにすること、また、脳ネットワーク機能の解析のために霊長類脳への効率的な遺伝子導入法を開発することを目指した。

②期間中の研究成果

(ｉ)fMRI によるマカクサルの DMN 領域の同定

マカクサルの DMN 領域を同定するため、Echo Planar Imaging(EPI)[55]撮像が行われ、得られた時系列データの独立成分分析により、ヒトの default-mode network(DMN)と類似した脳領域群があることが認められたことから、サルにおいてもヒトと同様の意識基底状態が存在する可能性が示された。さらに、DMN の時間成分に対して負の相関を示す脳領域を探索したところ、注意に関わる領域として知られる前頭眼野及び頭頂間溝が有意な領域として検出され、意識の基底状態をつかさどる脳活動と注意をつかさどる脳活動とは互いに拮抗している可能性が示唆された。さらに、小型のコモンマーモセットにおいても DMN が存在する可能性が示された[1],[56]。

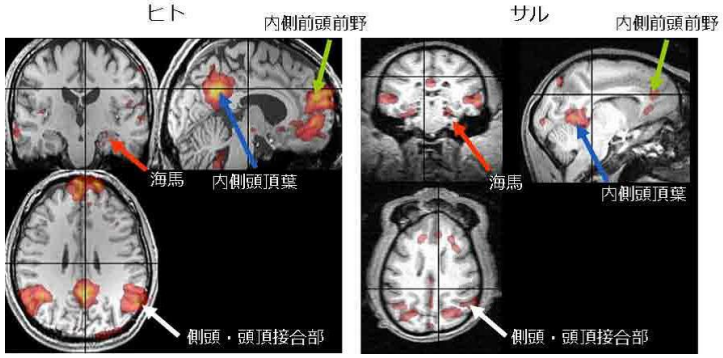


図 3-26　ヒトとサルの default-mode network[56]

DMN をサルにおいて同定した(右図)。ヒトにおける DMN(左図)との比較。

---

[54] 核磁気共鳴を利用して、ヒト及び動物の脳や脊髄の活動に関連した血流動態反応を視覚化する方法の一つ

[55] 超高速核磁気共鳴画像法(MRI)の一つ。90° パルスの後、x-y 平面内の磁化は横緩和により減衰するが、磁化が消滅しないうちに位相エンコードのステップにより連続的なグラジエントエコーを発生させ、画像再構成に必要な全てのデータを集めてしまう方法。

[56] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 21 年度終了研究課題「サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析」

(ⅱ)霊長類脳への効率的な遺伝子導入法の開発

神経活動と認知機能の因果関係解明に用いられるチャネル・ロドプシンなどの機能分子の導入を霊長類脳研究に適用するため、ウイルスベクターによる遺伝子導入が試みられた。アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus:AAV)ベクターのマーモセットの線条体[57]への注射で、霊長類において高効率かつ神経細胞特異的に遺伝子導入できることが明らかになった[2]。さらに、AAV は神経細胞体や樹状突起から順向性に感染するだけでなく、軸索終末より逆行性に感染することも明らかになった[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Nakahara K., Adachi Y., Osada T., Miyashita Y. “Exploring the neural basis of cognition: multi-modal links between human fMRI and macaque neurophysiology”, Trends in Cognitive Sciences, 2007, 11(2), 84-92.

[2] Masamizu Y., Okada T., Kawasaki K., Ishibashi H., Yuasa S., Takeda S., Hasegawa I., Nakahara K. “Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9”, Neuroscience, 2011, 193, 249-258.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は DMN に焦点を当てた研究は継続されていないが、マカクサルの脳を用いた研究は継続され、記憶想起機能解析のための低侵襲な手法開発とそれを用いた詳細な解析が行われた。科研費基盤研究(C)「光による霊長類側頭葉記憶ニューロンのリアルタイム操作」(2010 年度～2012 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「側頭葉ガンマ波増強操作による記憶想起機能向上への可能性」(2013 年度～2014 年度)、科研費基盤研究(B)「多点皮質電極記録による霊長類内側側頭葉における記憶想起機構の研究」(2013 年度～2016 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「脳活動パターン類似度解析による、ヒト全脳における記憶痕跡の探索」(2015 年度～2016 年度)ではいずれも記憶想起機能に関する研究が行われ、科研費挑戦的研究(開拓)「脳の時空間パターン刺激で記憶を再生する」(2017 年度～2019 年度)は現在も継続中である。また、科研費基盤研究(A)「脳の通奏低音―認知・意識における自発的脳活動の機能解明」(2017 年度～2020 年度)は現在継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)多点皮質電極記録による霊長類内側側頭葉における記憶想起機構の解析

これまでの研究から、側頭葉に局在する比較的少数の記憶ニューロンが記憶をコードす

[57] 終脳の皮質下構造であり、大脳基底核の主要な構成要素の一つで、運動機能への関与が最もよく知られている。

ることが知られているが、従来の手法では個々の記憶ニューロンの活動を調べることしかできなかった。そこで、脳外科の手術検査に用いられ、侵襲性が低く、長期の慢性記録が可能である、多点電極高密度皮質脳波(Electrocorticography:ECoG)法[58]を用いて、記憶を想起する際の皮質神経間ネットワークの神経活動が網羅的に調べられた。

まず、マカクサルの側頭葉のうち記憶ニューロンが局在することが判明している 36 野を中心として、TE 野、海馬傍皮質、及び嗅内皮質の一部を含むように 128 チャネルの ECoG 電極が設置された(図 3-27)[1]。

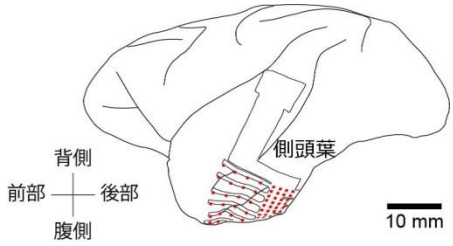


図 3-27　サルの左側頭葉に設置された 128 チャネル ECoG 電極[59]

上図はマカクサルの脳で、赤い点が左側頭葉に設置された ECoG 電極を表す。

このサルに図形のペアを学習させ、ペアの片方を手掛かりとして見せた時、もう片方の図形を想起する対連合記憶課題について、課題実行時の側頭葉に生じる脳活動のパターンが調べられた(図 3-28)[2]。

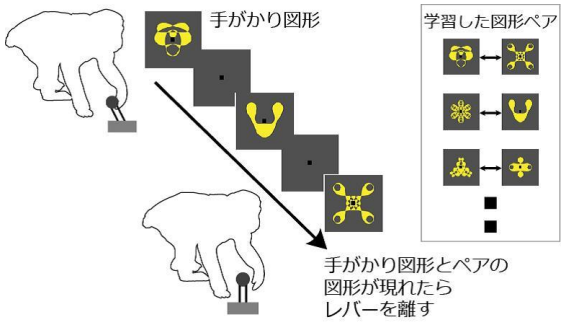


図 3-28　サルが行う対連合記憶課題[59]

異なる図形を 2 個ずつペアとして組み合わせ(対連合)(右枠内)、これらをサルに学習させ、手掛かり図形を一つずつ提示しペアの図形を選択させる。成功するとジュースの報酬がもらえる。

解析の結果、サルにペアとして記憶した図形を見せた時、互いに類似した脳活動のパターンが生じることが明らかになった[2]。この結果から脳活動の空間パターンが図形の連合記憶をコードし、この空間パターンは 36 野から TE 野、海馬傍皮質の一部にまで広がっていた

[58] 脳皮質の露出した表面からシナプス後電位を直接記録する方法
[59] 新潟大学　研究成果　https://www.niigata-u.ac.jp/news/2016/19646/

ことから、脳の領野間に広がるメゾスコピック[60]な神経回路の再編が記憶痕跡の形成に重要であることが示唆された[2]。また、この脳活動のパターンは、シータ帯域(4–8Hz)[61]の活動において見られた[2]。シータ帯域の脳活動は脳の情報伝達に関わるとされることから、今回みつかった脳活動パターンは、記憶をコードする神経回路における情報の流れのパターンを示している可能性が示唆された[2]。

② 社会・経済への波及効果

高密度 ECoG 法は、広い範囲の大脳皮質の脳活動の高精度の計測を可能とするもので、記憶や認知などの高次機能を産み出す脳の機構を神経回路のレベルで明らかにすることができる。したがって、高次脳機能を担う神経回路の動作原理の解明や、アルツハイマー病などを含む認知症の病態解明に向けて基礎的な知見を提供するものと期待される。また、ECoG 法は Brain-machine Interface(BMI)[62]技術への応用が考えられており、BMI 技術開発促進にも大きく貢献するものと期待される。

ECoG 法の開発に関連し、「これまでは神経細胞の働きを個別にしか把握できなかったが、広い脳の領域で観察でき、複数の神経細胞が長期記憶の「想起(思い出すこと)」に関わることが明らかになった」として毎日新聞に報道された。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Matsuo T., Kawasaki K., Osada T., Sawahata H., Suzuki T., Shibata M., Miyakawa N., Nakahara K., Iijima A., Sato N., Kawai K., Saito N., Hasegawa I. “Intrasulcal electrocorticography in macaque monkeys with minimally invasive neurosurgical protocols”, Frontiers in Systems Neuroscience, 2011, 5(1), 34.

[2] Nakahara K., Adachi K., Kawasaki K., Matsuo T., Sawahata H., Majima K., Takeda M., Sugiyama S., Nakata R., Iijima A., Tanigawa H., Suzuki T., Kamitani Y., Hasegawa I. “Associative-memory representations emerge as shared spatial patterns of theta activity spanning the primate temporal cortex”, Nature Communications, 2016, 7, 11827.

④ その他

中原は、日本学術振興会の平成 27 年度特別研究員等審査会専門委員(書面担当)及び国際事業委員会書面審査員表彰を受賞した。

---

[60] 巨視的/マクロ(macroscopic)な領域と微視的マイクロ(microscopic)な領域の中間に位置づけられる領域

[61] 脳波など、ニューロンの集団によって生じる電気活動は特定の周波数を持った律動を示すことが多い。このうち、およそ 4-8Hz の周波数帯域の律動を示すものをシータ波と呼ぶ。

[62] 脳波等の検出・あるいは逆に脳への刺激などといった手法により、脳とコンピュータなどとのインターフェースをとる機器等の総称

3.1.12　レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明（細川千絵）

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

脳の神経ネットワークにおける細胞内の個々の分子の時間的、空間的挙動を明らかにするために、光ピンセット技術を分子系に展開し、集光レーザービームにより誘起される光集合を神経細胞の局所機能操作に応用し、細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)光ピンセットを用いた神経細胞内単一シナプスの操作

神経回路網の操作を、単一シナプスで可逆的に行う手法の光ピンセットに着目し、ラット胎児の海馬神経細胞のシナプス小胞群を蛍光色素 FM1-43 で染色し、近赤外レーザー光を集光した結果、シナプス小胞群が光捕捉され、集合することが明らかになった(図 3-29)[1]。また、照射レーザー光強度が高いほど、光放射圧により神経細胞内のシナプス小胞群がより多く捕捉され、集合することが明らかになった[1]。

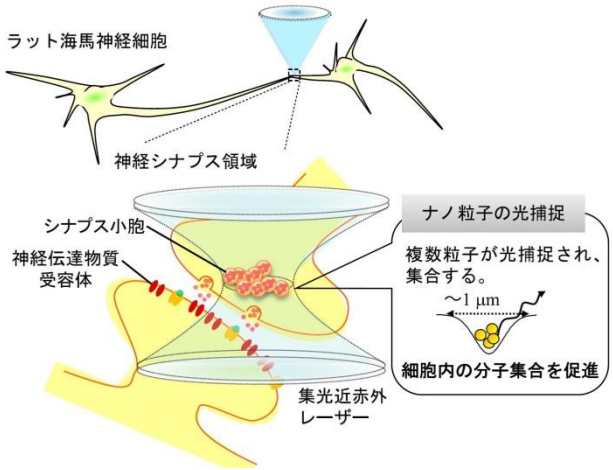


図 3-29　集光レーザーピンセットによる神経細胞内分子集合操作[63]

集光レーザー(水色)によりシナプス小胞(赤)が捕捉・集合することを示す模式図。

(ⅱ)光捕捉された神経細胞シナプス領域の蛍光相関分光測定と捕捉、集合機構の検討

[63] 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門　研究紹介　https://unit.aist.go.jp/bmd/gr/cms-4/

光捕捉された細胞内シナプス小胞群の運動特性が、蛍光相関分光測定[64]を用いて解析された結果、シナプス領域内の粒子運動は、レーザー照射により約 1.5 倍遅くなることが明らかになった[65]。また、シナプス小胞群を捕捉可能な条件を数値計算により求めた結果、10 個、及び 20 個のシナプス小胞クラスターの光捕捉ポテンシャルエネルギーは粒子の熱運動エネルギーよりも大きくなり、20 個の小胞クラスターでは安定に光捕捉されることが見出された[1]。

(iii)光ピンセットによる神経細胞単一シナプスの放出制御

神経細胞にレーザー光を照射した状態で、高濃度 KCl 添加によるシナプス小胞の放出を刺激した結果、光捕捉力の強い高レーザー光強度条件においてのみ、光ピンセットによる細胞内操作がシナプス小胞の放出を抑制できることが示された[1]。

(iv)神経細胞ネットワークの時空間ダイナミクス解明のための基盤技術開発

神経細胞ネットワーク内の特定の細胞を操作する基盤技術開発のため、集光フェムト秒レーザー[66]を用いて二次元多点電極皿上で培養した神経回路網の局所領域を、電極を損傷することなく分断する手法が確立された[2]。さらに、フェムトレーザーで分断した神経回路網のそれぞれのエリアでは独立した活動リズムが発現し、分断した神経回路網の機能が再生することが明らかになった[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Hosokawa C., Kudoh S.N., Kiyohara A., Taguchi T. “Optical trapping of synaptic vesicles in neurons”, Applied Physics Letters, 2011, 98(16), 163705.

[2] Hosokawa C., Kudoh S.N., Kiyohara A., Taguchi T. “Resynchronization in neuronal network divided by femtosecond laser processing”, NeuroReport, 2008, 19(7), 771-775.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も、脳・神経疾患の新たな光治療法研究を目指して、集光レーザーを用いた非接触細胞操作技術の開発と神経細胞ネットワークの時空間ダイナミクスに関する研

[64] サンプルの微小範囲に光を当て、分子からの蛍光強度の揺らぎを測定する。蛍光強度の時間変化から時間的自己相関値を計算し、集光スポット部における分子の滞在時間を推定する。
[65] Hosokawa C., Ueda Y., Takeda N., Kudoh S. N., Taguch T. “Laser manipulation of intracellular molecular dynamics in hippocampal neurons”, Proceeding of CLEO-PR, 2013, WJ3-5.
[66] 微小空間にフェムト秒オーダーのパルス化されたレーザービームを集光し、集光スポット部においてのみ強い光吸収を生じさせ、熱が周囲に伝わるよりも短い時間での光反応を可能とする。

究が継続された。

科研費若手研究(B)「共鳴レーザー光を利用した細胞内ナノマニピュレーション」(2009 年度～2011 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「表面プラズモン増強効果を利用した細胞内分子マニピュレーション手法の開発」(2013 年度～2015 年度)では、表面プラズモン共鳴効果を利用した細胞内分子の操作を目指す研究が行われた。

JST 産学連携・技術移転事業 A-STEP FS ステージ探索タイプ「レーザー細胞操作による神経回路再生機能の解析技術の開発」(2011 年度)、科研費若手研究(A)「集光レーザー摂動による神経細胞ネットワークダイナミクスの解明」(2013 年度～2016 年度)でも、同様な目的で研究が行われ、科研費基盤研究(B)「レーザー誘起細胞内分子秩序化による神経活動ダイナミクスの制御」(2017 年度～2020 年度)は継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)集光レーザー摂動による神経細胞接着分子の捕捉

従来の近赤外レーザー光を用いる光ピンセット技術に、共鳴レーザー光を組み合わせることにより光捕捉力を増大させ、細胞表面や細胞内の特定分子のみを局所的に操作するナノマニピュレーション技術の開発研究が行われ、これまで、1 分子の光捕捉が困難とされていた神経細胞表面に局在するタンパク質分子である神経細胞接着分子(Neural Cell Adhesion Molecule:NCAM)の分子動態を操作する手法が検討された。まず、細胞内の局所領域に光ピンセット用非共鳴レーザー光と共鳴レーザー光の 2 波長を同時かつ高精度に集光するための顕微分光システムが作製された[1]。次に、分散培養された神経細胞の NCAM が共鳴レーザー光とカップリング可能な量子ドット(Q-dot)[67]により抗体染色で標識された[68]。この量子ドット標識された NCAM 分子に光ピンセット用レーザー光と共鳴レーザー光を同時に照射し、共鳴レーザーの効果を調べたところ、量子ドット標識 NCAM 分子の分子運動がより強く束縛され、共鳴レーザー照射効果に基づく光捕捉力の増大が実証された[1]。

(ⅱ)プラズモニックチップ上で培養した神経細胞接着分子の光捕捉

光捕捉力を増大し、細胞表面に局在する分子群を高効率に捕捉する新たな手法として、プラズモニックチップの表面プラズモン共鳴[69]効果を利用した光ピンセット技術が検討された。プラズモニックチップとして、カバーガラス上にピッチ 500nm の二次元周期構造を光ナ

[67] 量子ドットは、蛍光色素分子と比べて発光強度が高く、光褪性の高いナノスケールの半導体結晶である。通常 2-10nm の直径で、10-50 個ほどの原子により構成される。

[68] Hosokawa C., Takeda N., Kudoh S.N., Taguchi T. “Laser-induced perturbation into molecular dynamics localized in neuronal cell”, Proceeding of SPIE, 2015, 9305, 93052N-1-5.

[69] プラズモンは、金属中の自由電子が集団的に振動して擬似的な粒子として振る舞う現象を表す。金属ナノ粒子ではプラズモンが表面に局在し、表面プラズモンと呼ばれる。表面プラズモン共鳴は、可視-近赤外域の光電場とプラズモンがカップリングして光吸収が起こる現象である。

ノインプリント法[70]により作製し、silicon dioxide(SiO_2)を成膜したものが用いられた[2]。プラズモニックチップ､又はカバーガラス上で培養したラット海馬の NCAM に Q-dot 標識し、レーザーを照射して集光領域における Q-dot 標識 NCAM の分子運動特性が検証された。プラズモニックチップ上で培養された神経細胞ではカバーガラスで培養した細胞の結果と比較して、分子運動がより強く束縛され、表面プラズモン共鳴に基づく光捕捉力の増大が確認された(図 3-30)[3]。

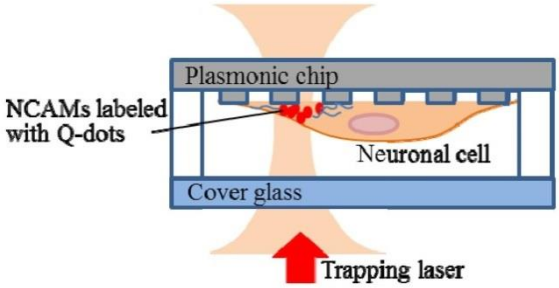


図 3-30　プラズモニックチップ上で培養した Q-dot 標識 NCAM の光捕捉[71]

プラズモニックチップ上(灰色)で培養した Q-dot 標識神経細胞接着分子(赤丸)がレーザー(ピンク)で捕捉される様子を示す模式図。

②社会・経済への波及効果

集光レーザー摂動による神経細胞表面分子の捕捉によって、従来、1 分子の光捕捉が困難とされていた神経細胞表面に局在するタンパク質分子を Q-dot により標識して神経細胞接着分子の分子動態を能動的かつ非侵襲に操作することができる。したがって、この手法は、神経シナプス伝達過程をシナプスレベルで非接触に制御する手法として、従来の遺伝子操作を代替あるいは補完する細胞機能操作技術への応用や、脳・神経疾患関連分子に注目した新たな光診断・治療研究への応用が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Takeda N., Kudoh S.N., Taguchi T., Hosokawa C. “Trapping of neural cell adhesion molecules in neurons with resonant optical tweezers”, IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems, 2014, 134(8), 1071-1077.

[2] Tawa K., Yasui C., Hosokawa C., Aota H., Nishii J. “In situ sensitive fluorescence imaging of neurons cultured on a plasmonic dish using fluorescence

[70] 金型に刻み込んだ寸法が数十 nm～数百 nm の凹凸を基板上に塗布した光硬化樹脂に押し付けて形状を転写する技術

[71] 第 62 回応用物理学会春季学術講演会講演予稿集 https://confit.atlas.jp/guide/event-img/jsap2015s/13p-D6-10/public/pdf?type=in

microscopy”, ACS Applied Materials and Interfaces, 2014, 6(22), 20010-20015.

[3] Miyauch K., Tawa K., Kudoh S.N., Taguchi T., Hosokawa C. “Surface plasmon-enhanced optical trapping of quantum-dot-conjugated surface molecules on neurons cultured on a plasmonic chip”, Japanese Journal of Applied Physics, 2016, 55, 06GN04-1-6.

④その他

細川は、2011 年 9 月に第 28 回計測自動制御学会 生体・生理工学部会 研究奨励賞、2013 年 6 月に第 6 回資生堂女性研究者サイエンスグラントの各賞を受賞した。

3.1.13　相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い(堀川一樹)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

細胞社会における高次生命機能の仕組みの理解のためには、ネットワーク全体の活動パターンを細胞レベルで計測し、その生成・維持の原理を抽出することが重要である。本研究では、1)多細胞システムのネットワーク活動を大規模に計測するためのイメージングツールの開発、及び 2)自己組織化する多細胞ネットワークの秩序化過程にシグナル伝達のノイズが果たす積極的な役割を明らかにするためのモデル構築と検証を行うことを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)超高感度 Ca^{2+}指示薬の開発

多細胞ネットワーク活動のシグナルの変化量は数百 nM 程度と非常に小さいことからcameleon[72]の感度特性の改良を試みた。cameleon は、カルシウム結合タンパク質カルモジュリン(CaM)とその標的タンパク質(M13)との融合ペプチド(CaM-M13)であり、CaM-M13 間のリンカー部分を改良することにより、Ca^{2+}との解離定数の最小値が従来の 100nM(yellow cameleon 2.60)から、60、40、20nM と段階的に減少させた指示薬(yellow cameleon Nano60、Nano40、Naon20)を開発した(図 3-31)[1]。

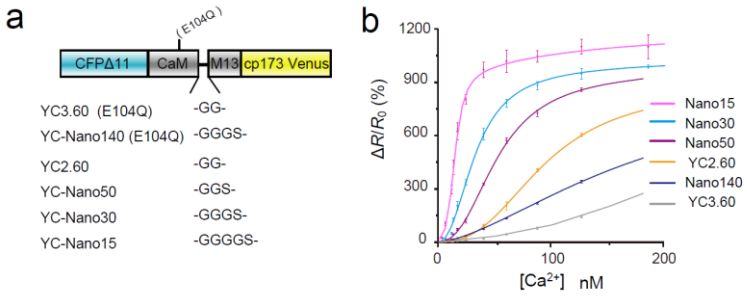


図 3-31　Cameleon Nano の構造と機能[1]

a：YC-Nano のリンカーの構造　b： FRET シグナルの変化量をカルシウム濃度に対してプロット。(FRET：2 つの蛍光分子間でエネルギーが移動する現象)

(ⅱ)自発的ネットワーク活動の検出

得られた高感度指示薬の性能を評価するために、社会性アメーバを材料に用い、自らが細胞外に放出する cAMP の濃度勾配に対する Ca^{2+}濃度変化を調べた。社会性アメーバに yellow

[72] cameleon：蛍光性のカルモジュリン融合タンパク質でカルシウムセンサーとして細胞内カルシウムの濃度変化のモニターなどに使用される。

cameleon Nano20 (Kd=20nM)を遺伝子導入し、走化的集合流に対応する周期的な細胞内カルシウム変動を調べたところ、YCNano20 のシグナル変化は最大 10 万個の細胞が回転螺旋波状に自発的に集合する過程を詳細に観察できることが明らかになった[1]。

次に、YCNano20 を導入した大脳皮質第 4 層のスライス標本で、活動電位にトリガーされる細胞内カルシウム上昇の検出を試み、神経細胞のネットワークにおいても微少なカルシウムスパイクが検出された[3]。

また、ゼブラフィッシュ胚においても 1000 個の神経細胞で自発的なネットワーク活動をモニターできることが示された[2]。

以上の検出実験により、生体内での自発活動に伴うカルシウム濃度の変動は nM レンジの僅かな変化であり、その検出には開発した高感度カルシウム指示薬が有用であることが示された。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Horikawa K., Yamada Y., Matsuda T., Kobayashi K., Hashimoto M., Matsu-Ura T., Miyawaki A., Michikawa T., Mikoshiba K., Nagai T. “Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca^{2+} indicators, yellow Cameleon-Nano”, Nature Methods, 2010, 7(9), 729-732.

[2] Satou C., Kimura Y., Kohashi T., Horikawa K., Takeda H., Oda Y., Higashijima S.I. “Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish”, Journal of Neuroscience, 2009, 29(2), 6780-6793.

[3] Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K., Nagai T. “An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity”, Nature Methods, 2009, 6(5), 351-353.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、科研費若手研究(B)「多細胞ネットワークの動作揺らぎを検出する階層横断的・多機能イメージング技術の開発」(2010 年度～2011 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「多細胞社会の秩序形成を司る細胞個性のマルチスケール定量と操作」(2011 年度～2012 年度)においてイメージング技術の開発、さらに科研費若手研究(B)「In vivo イメージング解析による血管平滑筋の収縮機構の解明」(2013 年度～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「マクロファージの異常な活性化に起因する慢性炎症発症機序の解明」(2013 年度～2014 年度)において、開発したイメージング技術の医学への応用研究が行われた。さらに、科研費挑戦的萌芽研究「一分子計測・操作による cAMP 発振回路の構築機構の解明」(2015 年度～2016 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案

型)「パルス回数を時間情報に変換する機構の解明」(2017 年度～2018 年度)において基礎科学研究から応用研究へと発展し、現在も継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)細胞間シグナル(cAMP、cGMP)測定のための FRET プローブの開発

細胞間シグナルのうち入力シグナルの細胞外 cAMP 濃度変化を定量計測するため、乖離定数が 50nM という極めて感度の高い蛍光型 FRET プローブが開発された[73,74]。

cGMP は、血管収縮などを制御する重要なセカンドメッセンジャー分子であり、その調節機構を理解するためのライブイメージングによる時空間動態解析を可能にする基盤技術の整備を目的として、高性能な cGMP 指示薬の開発が行われた[1],[2],[75]。シグナル変化率向上と親和性変異体のスクリーニングの結果、従来の指示薬に比べシグナル変化率が最大 5 倍に向上した複数の親和性変異体の開発に成功した。これらの指示薬は、人為的な NO 刺激に伴うヒト培養細胞の cGMP 応答だけでなく、既存の指示薬では検出が困難であった自発的走化性運動に伴う微弱な cGMP 濃度変動も検出できることが明らかになった[75]。

(ⅱ)マクロファージ活性化をモニターする FRET 型指示薬の開発

マクロファージの炎症応答を可視化することを目的に、インフラマソームを介した caspase-1 プロテアーゼ活性をモニターできる FRET 型指示薬が開発された[2],[4],[76]。分子設計として、caspase-1 が認識・切断するタンデムペプチドモチーフの両端に蛍光タンパク質 ECFP と cp173Venus を有する FRET 解消型指示薬を構築し、単球系細胞 THP-1 に導入したところ、ATP 添加によるプリン受容体刺激、シリカビーズ、若しくは細菌の貪食のいずれにおいても、細胞質分布型の指示薬の FRET シグナルが解消されることが単一細胞レベルで確認された。さらに刺激応答後の細胞も検出できるよう指示薬を細胞内に滞留させる方法を検討し、指示薬を細胞膜に局在させることで刺激応答後の細胞も検出できることが明らかにされた[76]。

(ⅲ)一分子計測・操作による cAMP 発振回路の構築

細胞内シグナル伝達経路のモデル系である cAMP 発振回路の動作原理の解明を目的とし、

---

[73] 科研費若手研究(B)「多細胞ネットワークの動作揺らぎを検出する階層横断的・多機能イメージング技術の開発」(2010 年度～2011 年度)

[74] Horikawa K., Yamada Y., Matsuda T., Kobayashi K., Hashimoto M., Matsu-Ura T., Miyawaki A., Michikawa T., Mikoshiba K., Nagai T. “Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca^{2+} indicators, yellow Cameleon-Nano”, Nature Methods, 2010, 7(9), 729-732.

[75] 科研費若手研究(B)「In vivo イメージング解析による血管平滑筋の収縮機構の解明」(2013 年度～2014 年度)

[76] 科研費科学研究新学術領域研究(研究領域提案型)「マクロファージの異常な活性化に起因する慢性炎症発症機序の解明」(2013 年度～2014 年度)

発振回路を構成する必須タンパク質量の変化を解析するため、これらの蛍光標識を目的とした GFP ノックイン株を樹立し、初期状態(振動無し)から最終状態(安定発振)に至る各遷移過程における、構成タンパク質の一分子計測と生化学的検討が行われた[77]。これにより、リミットサイクル振動時(最終段階)の細胞においては受容体(50 万分子/cell)を筆頭に、正 or 負の制御因子(10 万分子/cell)が豊富に存在する一方で、最終エフェクターである cAMP 合成酵素は最大でも 2.5 万分子/cell と、受容体に比べると 1/20 程度しか存在しないことが明らかになった[77]。

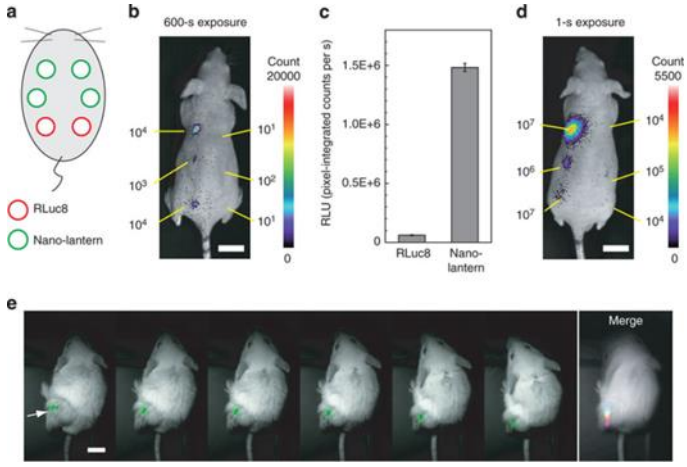


図 3-32　化学発光タンパク質、Nano-lantern 発現腫瘍によるマウスの発光イメージング[3]
高輝度発行タンパク質、Nano-lantern 発現腫瘍によるマウスの発光イメージング例。移植されたマウスに Nano-lantern(緑色の円)又は RLuc8(赤色の円)を発現する腫瘍細胞の位置。

喘息、リウマチ、動脈硬化に代表される「慢性炎症」に関して有効な治療や予防のためには、病態を早期に検出し、発症の初期過程についての理解を深めることが必須である。本研究課題は生体内ライブイメージング研究へと継続され、指示薬を様々なターゲット細胞で発現するトランスジェニックマウスを用い、各病態モデルでのマクロファージ活性化パターンを生体内ライブイメージングで明らかにすることにより、初期炎症応答で最も重要な「マクロファージ活性化」の時空間ダイナミクスを可視化できる高性能指示薬の開発が現在行われている(図 3-32)[3]。

② 社会・経済への波及効果

(ⅱ)項で示された「マクロファージ活性化」をモニターする指示薬の開発は、炎症・免疫応答の可視化を目的としており、喘息、リウマチ、動脈硬化などの炎症反応の機構を解明す

[77] 科研費挑戦的萌芽研究「一分子計測・操作による cAMP 発振回路の構築機構の解明」(2015 年度)

る手段として、将来の治療法/予防法開発の基盤となることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Horikawa K., Nagai T. “Spatiotemporal regulation of Ca^{2+} dynamics in live cells revealed by Ca^{2+} imaging”, Clinical calcium, 2013, 23(4), 527-533.

[2] Horikawa K. “Recent progress in the development of genetically encoded Ca^{2+} indicators”, Journal of Medical Investigation, 2015, 62, 24-28.

[3] Saito K., Chang Y.F., Horikawa K., Hatsugai N., Higuchi Y., Hashida M., Yoshida Y., Matsuda T., Arai Y., Nagai T. “Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging”, Nature Communications, 2012, 3, 1262.

[4] Kanemaru K., Sekiya H., Xu M., Satoh K., Kitajima N., Yoshida K., Okubo Y., Sasaki T., Moritoh S., Hasuwa H., Mimura M., Horikawa K., Matsui K., Nagai T., Iino M., Tanaka K.F. “In Vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca^{2+} indicator”, Cell Reports, 2014, 8(1), 311-318.

3.1.14　真核細胞の in vivo ロバストネス解析(守屋央朗)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

ロバストネスは、生命現象に普遍的に見られるシステムの基本特性である。本研究では、出芽酵母を主要なモデル系として、標的遺伝子のコピー数を指標とした遺伝子網引き genetic Tug-Of-War(gTOW)法(図 3-1)を用いて、細胞のロバストネスの基本原理を解明し、さらに高性能な細胞周期のコンピュータモデルの開発及び gTOW を細胞システムレベルの解析の一般的な枠組みとして確立することを目的とした。

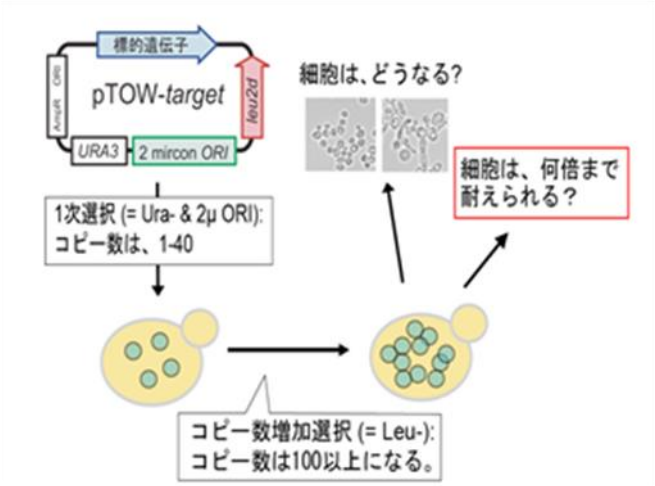


図 3-33　遺伝子網引き(gTOW)法[78]

遺伝学的手法を用いコピー数を指標として「遺伝子発現をどこまで上げたら細胞は死ぬのか？」により遺伝子のロバストネスを調べる方法。

②期間中の研究成果

(ｉ)gTOW 法による出芽酵母細胞周期の解析とコンピュータモデルの改良

本研究では、細胞周期システムにおいて cell division cycle 14(CDC14、M 期フォスファターゼ遺伝子)の過剰発現に対し脆弱である理由が、阻害因子(neuroepithelial cell transforming 1(NET1))との「遺伝子量の不均衡」から生じることを、コンピュータモデル(Chen2004 モデル)との比較により検証した。一方、予想と異なる結果が得られた exocrine gland secreted peptide 1(ESP1)については、その理由を ESP1 と阻害因子の量的不均衡を避ける機構が細胞内に存在していると考え、この機構を組み込んで Chen らのモデルを改良

[78] http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/~hisaom/HMwiki/index.php?%E9%81%BA%E4%BC%9D%E5%AD%90%E3%81%A4%E3%81%AA%E3%81%B2%E3%81%8D%E6%B3%95

した[1]。

(ⅱ)分裂酵母での gTOW 法の開発、細胞周期関連遺伝子の解析とコンピュータモデルの改良

真核細胞間のロバストネスの共通性を調べるために、分裂酵母での gTOW 法を開発し、分裂酵母の細胞周期で働く約 30 の遺伝子について上限コピー数を出芽酵母のそれと比較した結果、両酵母に共通した「脆弱なコア」が見いだされ、分裂酵母細胞周期のコンピュータモデルが開発された[79]。また、出芽酵母で遺伝子の大規模な機能解析に利用されている遺伝子クローニング法(Gap-Rpair 法)が分裂酵母でも有効に機能することが明らかにされた[2]。

(ⅲ)出芽酵母の全遺伝子の gTOW による解析(gTOW6000)

ERATO-SORST 北野共生システムプロジェクトと共同で、出芽酵母の約 6,000 から成る全遺伝子を PCR により増幅し、細胞が持つプラスミドのコピー数上限が測定、解析(gTOW6000)された。gTOW6000 の解析により、遺伝子が僅か 2 コピー程度になっただけで細胞システムが破綻(細胞死や形態異常)してしまう遺伝子が 20 以上あることが明らかになった[80]。なお、gTOW6000 で作られたプラスミドコレクションは、他のスクリーニング系にも広く利用で可能である National Bio-Resource Project(NBRP)に寄託された。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Kaizu K., Moriya H., Kitano H. “Fragilities caused by dosage imbalance in regulation of the budding yeast cell cycle”, PLoS Genetics, 2010, 6(4), e10009..

[2] Chino A., Watanabe K., Moriya H. “Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe”, PLoS ONE, 2010, 5(3), e9652.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科研費基盤研究(B)「酵母の量的均衡遺伝子が作るネットワークの全容解明」(2011 年度～2013 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「情報場への摂動を緩衝するメカニズムの解明」(2011 年度～2012 年度)、国立研究開発法人科学技術振興機構国際連携活動・戦略的国際科学技術協力推進事業(SICP)「生命のネットワークのダイナミクスとロバストネス」(2010 年度～2012 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「酵母におけるプ

[79] Moriya H., Chino A., Kapuy O., Csikász-Nagy A., Novák B. “Overexpression limits of fission yeast cell-cycle regulators in vivo and in silico”, Molecular Systems Biology, 2011, 7, 556.
[80] http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/~hisaom/HMwiki/index.php?%E6%88%90%E6%9E%9C%E7%99%BA%E8%A1%A8/%E8%AB%96%E6%96%87%E7%99%BA%E8%A1%A8/gTOW6000%E8%AB%96%E6%96%87%E7%AC%AC2%E7%AB%A0

ロセス負荷の原理の解明」(2013 年度～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「酵母の生合成キャパシティーの拡大」(2013 年度～2014 年度)、科研費基盤研究(B)「化学量不均衡を避けるメカニズムの解明」(2014 年度～2016 年度)において研究が継続されている。

さらに、国際共同研究加速基金(国際共同研究強化)「化学量不均衡を避けるメカニズムの解明(国際共同研究強化)」(2016 年度～2018 年度)、科研費基盤研究(B)「過剰発現により輸送リソースの過負荷を引き起こすタンパク質の体系的解析」(2017 年度～2019 年度)において国内外で研究が進行中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)分裂酵母と出芽酵母での Gap-Repair の開発

分裂酵母内でも効率良く遺伝子の改変を行うことができる Gap-Repair 法が開発された(図 3-34)[81]。

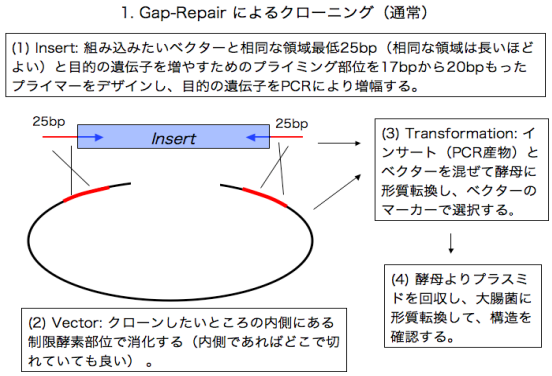


図 3-34　Gap-Repair クローニング[82]

出芽酵母では、25bp 程度の相同領域があれば組換え修復機構により DNA 断片が連結される。この活性を利用して、酵母細胞内で様々なプラスミドのコンストラクトを構築する。

これにより約 30 の分裂酵母の細胞周期関連遺伝子を gTOW 用プラスミドにクローニングし、コピー数の上限を測定するとともに、このデータを用いた数理モデルの評価と改良が行われた。さらに、出芽酵母の 115 個の量感受性遺伝子を同定するとともに、これらのうち、13 の量的均衡関係が見出された[83,[1]]。ゲノム上の量感受性遺伝子の組織的同定は、あらゆる生物で初めてのことであり、複数の量的均衡遺伝子を一度に同定した初めての例である。

---

[81] 科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「遺伝情報場へのフィードバックの同定」(2009 年度～2010 年度)

[82] http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/~hisaom/HMwiki/index.php?Gap-Repair%20cloning%E3%82%92%E4%BD%BF%E3%81%8A%E3%81%86%21

[83] 科研費基盤研究(B)「酵母の量的均衡遺伝子が作るネットワークの全容解明」(2011 年度～2013 年度)

(ⅱ)ターミネーター領域の発現量への影響

酵母タンパク質の発現においてターミネーター領域の影響を調べるため、出芽酵母の5,302 個のターミネーター領域を導入した蛍光タンパク質の発現量を評価した。その結果、ターミネーターの種類により 70 倍の差があることが明らかになった。また、このタンパク質発現量は mRNA 存在量と正の相関を示し、ターミネーター領域が mRNA 存在量の決定因子であることが示された[2]。

(ⅲ)酵母における局在化したタンパク質の発現量の限界[84,85]

細胞内でタンパク質を大量に発現すると、細胞の機能に様々な悪影響があることが知られている。そこで種々の局在化シグナル配列を導入した蛍光タンパク質を発現させ、細胞増殖が阻害される発現量を gTOW 法によって調べた。その結果、局在化タンパク質の過剰発現が輸送先のオルガネラを傷害することが明らかになった。また、発現タンパク質のミスフォールディングも細胞の障害原因になることが示された[3]。

(ⅳ)過剰発現データに基づいた細胞周期のロバストネスの数理解析

英国、オックスフォード大学・統合システムバイオロジー部門、J. Armitage と共同研究を行い、日本の酵母細胞周期制御因子の過剰発現データを基に、英国で開発された酵母細胞周期の統合的数理モデルを評価、改良し、細胞周期のロバストネスについての新たな数理モデルの構築に成功した。この結果は、システム生物学のトップジャーナルに共著論文として発表した[86,[4]]。

② 社会・経済への波及効果

がんやダウン症候群などの染色体異常を伴う疾患では、特定の遺伝子のコピー数が増えることによりタンパク質の化学量不均衡が起こる一方、進行がん細胞では、化学量不均衡による不具合が何らかの方法により回避されることが報告されている。今後、がん細胞が獲得した化学量不均衡を回避する機構の解明にもつながることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Sasabe M., Shintani S., Kintaka R., Kaizu K., makanae K., Moriya H. “Evaluation of the lower protein limit in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae using TIPI-gTOW”, BMC Systems Biology, 2014, 8(1), 2.

[84] 科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「酵母の生合成キャパシティーの拡大」(2013 年度～2014 年度)
[85] 科研費挑戦的萌芽研究「酵母におけるプロセス負荷の原理の解明」(2013 年度～2014 年度)
[86] 国立研究開発法人科学技術振興機構国際連携活動・戦略的国際科学技術協力推進事業(SICP)「生命のネットワークのダイナミクスとロバストネス」(2010 年度～2012 年度)

[2] Yamanishi M., Ito Y., Kintaka R., Imamura C., Katahira S., Ikeuchi A., Moriya H., Matsuyama T. “A genome-wide activity assessment of terminator regions in saccharomyces cerevisiae provides a ″terminatome″ toolbox”, ACS Synthetic Biology, 2013, 2(6), 337-347.

[3] Kintaka R., Makanae K., Moriya H. “Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes”, Scientific Reports, 2016, 6, 31774.

[4] Moriya H., Chino A., Kapuy O., Csikász-Nagy A., Novák B. “Overexpression limits of fission yeast cell-cycle regulators in vivo and in silico”, Molecular Systems Biology, 2011, 7, 556.

3.1.15　細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス(山本希美子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

血管内皮細胞には、血流に起因する流れずり応力が作用している。本研究課題では、血流刺激の感知機能の原理を解明するため、血管で生じる力学現象の解析及び流体力学的に設計した装置を用いて血管細胞の画像解析を行い、流れずり応力の大きさに依存して細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させるATP作動性カチオンチャネルP2X4に焦点を当て、その分子機構の解明を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)流れずり応力依存的なATP放出へのATP合成酵素の関与

ヒト肺動脈内皮細胞に流れ刺激を与えると細胞内 ATP 濃度は変化しなかったが、流れずり応力の大きさに依存してATPが放出された。この際、ATP合成酵素の阻害剤(angiostatin等)で処理すると、ATP放出が顕著に抑制され、膜表面のATP合成酵素が、流れ誘発性のATP放出に働くことが示唆された(図3-35)[1],[2]。

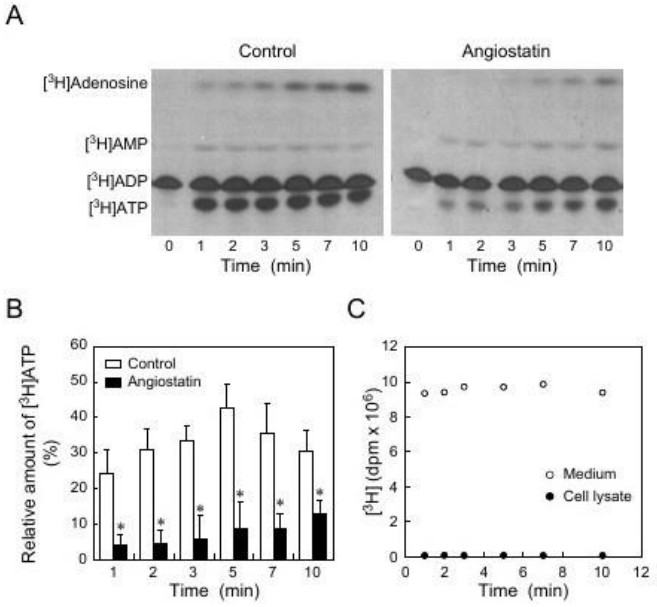


図3-35　細胞膜ATP合成酵素によるATP産生[1]

A: TLC法による[3H]ADPから[3H]ATPへの変換。B：ATP産生に及ぼすangiostatinの効果。C:細胞内(Cellysate)の[3H]濃度変化。

(ⅱ)内皮細胞膜のカベオラにATP合成酵素は存在する

Human Pulmonary Artery Endothelial Cells (HPAECs:ヒト肺動脈内皮細胞)の細胞膜に

おけるATP合成酵素の局在を免疫蛍光染色により調べたところ、ATP合成酵素は細胞表面の一部の辺縁部分に集中し、また、ATP合成酵素は細胞膜の脂質ラフトにcaveolin-1と共存することが分かった。さらに免疫染色により、ATP合成酵素は細胞膜のcaveolae rich fractionに特異的に分布することが示された[2]。

(iii)細胞膜ATP合成酵素のATP産生能

ヒト肺動脈内皮細胞に^{3}H-labeled ADPを作用させると、上清中に^{3}H-labeled ATPが出現したが、細胞内には^{3}Hの放射活性はほとんど検出されず、^{3}H-labeled ADPは細胞表面で反応していると考えられた。すなわち、細胞膜のATP合成酵素がADPからATPを合成することが明らかになった[1]。

(iv)カベオラ・ラフトの破壊による流れ誘発性ATP放出反応の消失

ヒト肺動脈内皮細胞の細胞膜のコレステロールを除去したところ、脂質ラフトが消失し、ATP合成酵素は細胞膜全体に広く分布するようになり流れ誘発性のATP合成酵素によるATP放出にはラフトの存在が必須であることが示された。さらに、HPAECsのcaveolin-1発現をsiRNAにより抑制すると流れ誘発性のATP放出が抑制され、細胞膜ATP合成酵素とcaveolin-1との関係が重要であることが示された[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内

[1] Yamamoto K., Shimizu N., Obi S., Kumagaya S., Taketani Y., Kamiya A., Ando J. “Involvement of cell surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells”, American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2007, 293(3), 1646-1653.

[2] Ando J., Yamamoto K. “Vascular mechanobiology: Endothelial cell responses to fluid shear stress”, Circulation Journal, 2009, 73(11), 1983-1992.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は科研費基盤研究(B)「血管内皮細胞における血流刺激のメカノトランスダクション機構の解明」(2010年度～2012年度)ではイメージング技術を用いた内因性ATPの放出の分子メカニズムについて、科研費挑戦的萌芽研究「流れ剪断応力に応答するLDL受容体の探索」(2012年度～2013年度)では、粥状動脈硬化症の発症に関わる分子の探索とその研究を発展させた。キヤノンの創生研究助成「先進分子イメージングによる血管の血流感知機構の解明」(2012年度～2015年度)、科研費基盤研究(B)「流れずり応力に対する内皮細胞形質膜の力学応答」(2013年度～2015年度)において、本研究課題で開発した装置を用いて血管内皮膜の脂質の流動性等、血流刺激の感知機能の原理に関する分子レベルでの研究

を発展させた。また、AMED-CREST「血管のメカノバイオロジー：血流センシングと脳動脈瘤形成の分子機構」(2015 年度～2020 年度)において、血流依存性に発生する脳動脈瘤の形成機序の分子機構を明らかにするとともに、脳動脈瘤の破裂や再発の予測に使うことができる診断ツールの開発を目指した研究を行っており、現在も継続中である。

① 科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、その成果を活かし生体の力学的現象を扱うバイオメカニクス、特に細胞に加わる力学的刺激とその刺激に対する細胞の感知・応答機構に焦点を当てた研究が行われ、基礎研究、医学への応用及びツールの開発の三つの側面から発展している。

基礎研究としては、血流に起因する力学的刺激である shear stress とそれが作用する血管内皮細胞の関係を探ることを目指した。独自に開発したイメージング法により、shear stress に対する内皮細胞応答である内因性 ATP の放出が細胞膜カベオラから起こり、P2X4 受容体を介してカルシウム・シグナリングを引き起こすことが明らかになった(図 3-36)[1]。図では剪断応力が細胞内 Ca^{2+}濃度の増加を誘発することを示している。

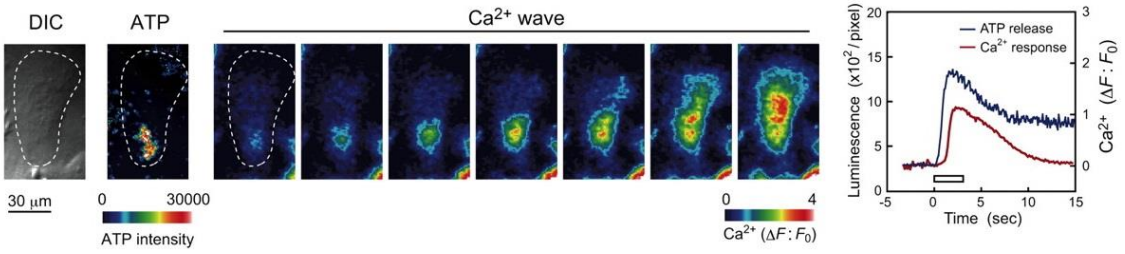


図 3-36　ATP 放出と Ca^{2+}波のイメージング [1]

流れずり応力により内皮細胞から ATP 放出がカベオラから起こり、同じ局所で Ca^{2+}シグナリングが発火する。

さらに、細胞膜カベオラは shear stress により lipid order(脂質配向性)を変化させ、膜の流動性を高めることにより、内皮細胞機能を調節し[2],[3]、内皮細胞形質膜の血流センサーとしての機能が明らかになった。すなわち、形質膜の脂質分子の配向性は流れずり応力により減少し、伸展張力では増大するが、この変化は人工脂質膜にも見られる物理現象であることが証明された[4]。さらに、流れずり応力は血管内皮細胞増殖因子受容体を、伸展張力は血小板由来増殖因子受容体を活性化するが、形質膜分子の配向変化を除くと、それぞれの受容体の活性化が抑制され、形質膜の物理的性質が細胞応答に重要であることが示された。

一方、血流依存性に起こる血管の新生、成長やリモデリングあるいは臨床医学的に重要な問題の解明を目指し、心筋梗塞や脳梗塞等の血管病の原因となる粥状動脈硬化症の発症に関わる分子が探索された[87]。粥状動脈硬化症は、内皮細胞が乱流性の流れ剪断応力にさらさ

[87] 科研費挑戦的萌芽研究「流れ剪断応力に応答する LDL 受容体の探索」(2012 年度～2013 年度)

れる血管の分岐部で好発する。そこでその分子機構を明らかにするため、完全長 cDNA ライブラリーを用いて乱流の剪断応力に応答する LDL 受容体を発現クローニングした。ヒト血管内皮細胞において、遺伝子及びタンパク質発現が層流の剪断応力により減少し、乱流の剪断応力により増大する 2 種類のクローンが特定され、ヒト動脈硬化病変に発現することが免疫染色により確認された。この結果より、この LDL 受容体遺伝子が粥状動脈硬化症の発生機序に関与する可能性が示された[88]。

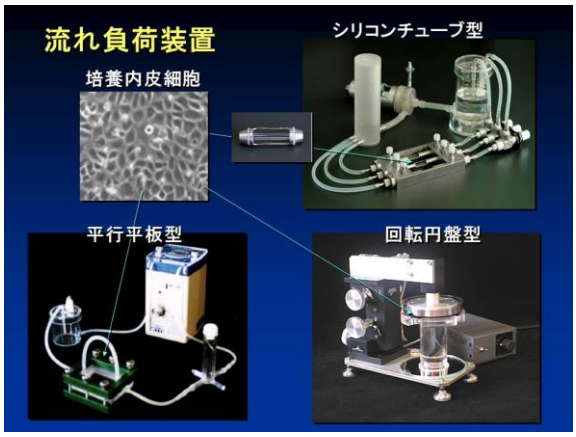


図 3-37　流れ負荷装置 [88]

培養内皮細胞に定量的な shear stress を作用させて細胞応答を観察する独自に設計した流れ負荷装置

上記の一連の研究における研究手法として、本研究期間中から継続してツールの開発が行われ、培養した内皮細胞に流体力学的に設計した流れ負荷装置で定量的な shear stress を作用させて細胞応答を観察する独自の生体工学的実験装置を開発した(図 3-37)[89]。物理的刺激の生体における感知・伝達・応答機構を解明し、医療応用につながる基盤技術を創出することを主要な目的とし、そこでメカノセンシングを介して起こる細胞機能の変化が血流因子の関与する血管病である粥状動脈硬化症や脳動脈瘤の発生・進展に果たす役割を明らかにするとともに、臨床例を対象に計算流体力学解析を行うことで脳動脈瘤の破裂予測やコイル塞栓術後の再発予測に使える診断ツールの開発を目指しており、研究は現在も継続中である[90]。

[88] Suzuki Y., Yamamoto K., Ando J., Matsumoto K., Matsuda T. “Arterial shear stress augments the differentiation of endothelial progenitor cells adhered to VEGF-bound surfaces”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 423(1), 91-97.
[89] http://square.umin.ac.jp/bme/research.html
[90] AMED-CREST、-血管のメカノバイオロジー:血流センシングと脳動脈瘤形成の分子機構」(2015 年度～2020 年度)

② 社会・経済への波及効果

山本らは高血圧症、脳梗塞、動脈硬化症といった現代人が抱える血管系の疾患を研究対象としており、社会の関心度が高いことから、メディアを通じて一般人向けに内容を広める機会が多く、テレビ番組ではNHKためしてガッテン「脳血管が突然詰まる！あなたを狙う巨大血栓」(2011年8月24日)に取り上げられた(図3-38)[91]。また、NHKテキスト『きょうの健康』や朝日新聞にも血圧や動脈硬化に関する記事が掲載された。

図3-38　2011年8月24日NHKためしてガッテンで紹介された装置[91]

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Yamamoto K., Furuya K., Nakamura M., Kobatake E., Sokabe M., Ando J. “Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca^{2+} waves at caveolae in vascular endothelial cells”, Journal of Cell Science, 2011, 124(20), 3477-3483.

[2] Yamamoto K., Ando J. “Endothelial cell and model membranes respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases”, Journal of Cell Science, 2013, 126(5), 1227-1234.

[3] Ando J., Yamamoto K. “Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells”, Cardiovascular Research, 2013, 99(2), 260-268.

[4] Yamamoto K., Ando J. “Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases”, American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2015, 309(7), H1178-H1185.

[91]東京大学大学院医学系研究科システム生理学ホームページ
http://square.umin.ac.jp/bme/Achievement/etc.html

3.2　2007 年度採択研究課題

3.2.1　胸腺依存的な免疫寛容を制御する基盤技術の開発(秋山泰身)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

胸腺髄質上皮細胞は、様々な自己由来タンパク質を極微量であるが異所的に発現し、転写因子、Autoimmune regulator(AIRE)がそれを制御している[92]。本研究では、胸腺髄質上皮細胞の分化、組織特異的抗原の発現、及び自己免疫寛容機構を分子レベルで解明し、さらに免疫寛容機構を制御する技術の開発を目指した。

②期間中の研究成果

(ｉ)胸腺髄質上皮細胞の分化を制御するサイトカインレセプターの同定

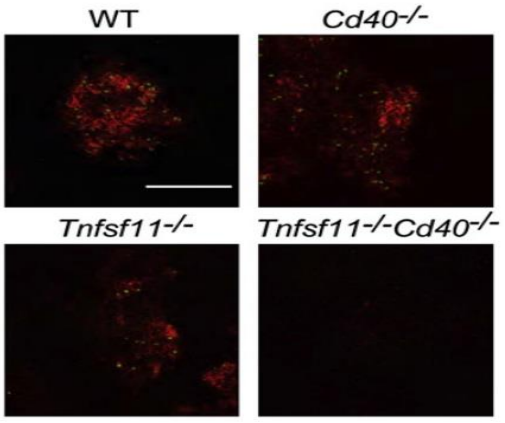


図 3-39　RANK と CD40 の欠失変異マウスの胸腺髄質上皮細胞[1]

左上が野生型、右上が CD40 欠失、左下が RANK 欠失、右下が RANK と CD40 の二重欠失マウスの胸腺髄質上皮細胞の免疫染色で、赤が膜タンパク質 Epithelial cell adhesion molecule(EpCAM)である。

胸腺髄質上皮細胞の分化を制御する因子のファミリーである Receptor Activator of nuclear factor kappa B(RANK)と CD40 が胸腺髄質上皮細胞の分化に関与するかどうかが探索された。RANK と CD40 の二重欠失変異マウスの免疫染色では成熟した胸腺髄質上皮細胞がほぼ完全に欠損し[1](図 3-39)、自己臓器に応答するリンパ球の産生が見られた[1]。また、RANK と CD40 リガンドの組換えタンパク質は、胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導したことから RANK と CD40 が協調して働き胸腺髄質上皮細胞を分化増殖させ、自己免疫寛容を誘導していることが示唆された[1],[2]。

---

[92] Wu G., Hirabayashi K., Sato S., Akiyama N., Akiyama T., Shiota K., Yagi S. “DNA methylation profile of Aire-deficient mouse medullary thymic epithelial cells”, BMC Immunology, 2012, 13,58.

(ⅱ)胸腺髄質上皮細胞の遺伝子発現を制御する転写因子候補の探索

RANK リガンドで処理した胎仔胸腺ストローマでは、signal transducer and activator of transcription 1(STAT1)の転写活性化が誘導され、STAT1 結合配列をプロモーター領域に持つインターフェロン誘導遺伝子が多種類発現したことから、RANK シグナルは胸腺髄質上皮細胞において、STAT1 の活性化を介してインターフェロン誘導遺伝子の発現を制御していることが示唆され[3]、RNAK による免疫寛容の誘導の分子機構の一端が明らかなった。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Akiyama T., Shimo Y., Yanai H., Qin J., Ohshima D., Maruyama Y., Asaumi Y., Kitazawa J., Takayanagi H., Penninger J.M., Matsumoto M., Nitta T., Takahama Y., Inoue J.I. “The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance”, Immunity, 2008, 29(3), 423-437.

[2] Hikosaka Y., Nitta T., Ohigashi I., Yano K., Ishimaru N., Hayashi Y., Matsumoto M., Matsuo K., Penninger J.M., Takayanagi H., Yokota Y., Yamada H., Yoshikai Y., Inoue J.I., Akiyama T., Takahama Y. “The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator”, Immunity, 2008, 29(3), 438-450.

[3] Ohshima D., Qin J., Konno H., Hirosawa A., Shiraishi T., Yanai H., Shimo Y., Shinzawa M., Akiyama N., Yamashita R., Nakai K., Akiyama T., Inoue J.I. “RANK signaling induces interferon-stimulated genes in the fetal thymic stroma”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 408(4), 530-536.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も一貫して胸腺における免疫寛容と自己免疫疾患に関する研究が継続され、科研費挑戦的萌芽研究「自己免疫を抑制するリンパ組織微小環境成立の分子機構」(2012 年度～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「自己免疫寛容に必要な胸腺上皮細胞の特性を決定する分子機構の解明」(2015 年度～2016 年度)では、個々の研究課題で自己免疫寛容に関係する各分子に焦点を当て、それらの発現・機能・相互作用等が詳細に解析され、科研費基盤研究(B)「自己免疫疾患発症を抑制する胸腺上皮細胞の機能を制御する新規転写因子の解析」(2017 年度～2019 年度)において同様の研究を現在継続中である。

また、科研費挑戦的萌芽研究「自己応答性 T 細胞を除去する機構の不完全性による癌免疫監視の強化」(2014 年度～2015 年度)ではマウス作成技術を用いてがん研究への応用研究が

行われた。科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「重力依存的な胸腺組織微小環境の機能制御」(2016 年度～2017 年度)では異分野と融合した研究が行われ、現在も継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

本研究課題終了後も自己寛容成立の分子基盤解明とツールの開発が行われた。

(ⅰ)RANK シグナルの分子機構解明

制御性 T 細胞に必要な環境形成における RANK シグナルの全容解明を目的とした研究が行われた。まず、胸腺髄質上皮前駆細胞[93]から髄質上皮細胞への分化過程依存的に発現する転写因子 Spi-B transcription factor(SpiB)が同定され、SpiB 欠損マウスが作製された[1]。このマウスでの解析で、RANK のリガンド(RANKL)が胸腺髄質上皮前駆細胞の SpiB の発現を誘導し、次に SpiB が RANKL のデコイレセプターである osteoprotegerin(OPG)の発現を増強し、OPG が RANKL に結合して別の胸腺髄質上皮前駆細胞上の RANK への結合を阻害することで、胸腺髄質上皮細胞の分化が負に制御されることが明らかになった(図 3-40)[1]。さらに RANK シグナルを阻害するデコイレセプターOPG を欠損するマウスの胸腺細胞のフローサイトメトリー解析により、OPG が制御性 T 細胞の分化を制御していることが明らかになった[1](図 3-40)。

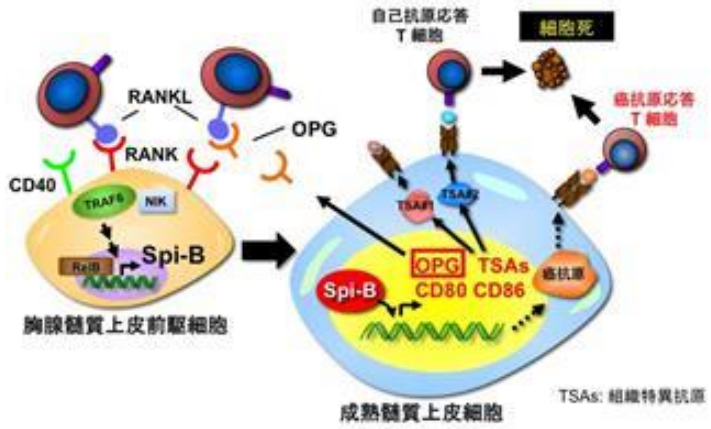


図 3-40　RANK シグナルのネガティブフィードバック[94]

図は、RANK リガンドにより駆動される RANK シグナル中の動きを示す。RANKL が胸腺髄質上皮前駆細胞の RANK に結合すると、転写因子 SpiB が発現し(左側)、次いで SpiB が受容体 OPG の発現を促進する(右側)。次に OPG が RANKL に結合して別の胸腺髄質上皮前駆細胞の RANK への結合を阻害することで、制御性 T 細胞の分化を負に制御する。

[93] 髄質上皮細胞を産生し、胸腺に髄質上皮細胞を供給する細胞。
[94] 東京大学医学研究所　発表論文解説
http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/post_59.php

(ⅱ)インターフェロンの自己寛容成立への関与

RANK リガンド刺激依存的に誘導される遺伝子の網羅的解析により、I 型インターフェロンにより誘導される抗ウイルスタンパク質が多数得られたことから、インターフェロンに着目した研究が行われた。解析の結果、胎仔胸腺ストローマではウイルス感染が起きていないにもかかわらず、RANK リガンドによりインターフェロンベータ(I 型インターフェロンの一つ)やその誘導遺伝子群が発現し、ウイルス感染擬態が起こることが明らかになった[95]。

(ⅲ)RelB 解析のための蛍光遺伝子導入マウスの作成

Transcription factor avian reticuloendotheliosis viral(v-rel) oncogene related B(RelB[96])が NF-kB 経路により活性化され、これがリンパ組織の形成に必要であるというこれまでの知見から、胸腺髄質上皮細胞における RelB の機能解析を目指し、解析に用いるツールの開発が行われた。その結果、RelB を可視化するため蛍光タンパク質がマウスに導入され、RelB-Venus マウスが作成された[2]。これにより、胸腺髄質上皮細胞の細胞レベルでの RelB の発現や活性化が可視化できるようになった[2]。

(ⅳ)AIRE 発現胸腺髄質上皮前駆細胞の同定

自己免疫調節因子(AIRE)を発現する胸腺髄質上皮細胞(AIRE+ medullary thymic epithelial cell：AIRE+ mTEC)が、自己免疫の発症の予防に働くというこれまでの知見から、AIRE 発現胸腺髄質上皮前駆細胞に着目した研究が行われた。RANK の発現をモニターすることにより、AIRE+ mTEC の前駆細胞が同定され、precursor cells of AIRE+ mTECs(pMECs)と命名された。胸腺へ導入された pMEC は長期間維持され、AIRE+ mTEC 欠損によって誘発される自己免疫の発症を十分抑制できることが明らかになった[3]。

②社会・経済への波及効果

免疫応答を抑制する制御性 T 細胞は、自己免疫疾患の治療などへ応用が期待されている。制御性 T 細胞の胸腺内のシグナル伝達については多くの研究がなされ T 細胞抗原受容体やその他のシグナルが重要なことが明らかになりつつある。一方、制御性 T 細胞の産生には、胸腺の様々な細胞が形成する細胞外環境が必要で、その解明は制御性 T 細胞を分化誘導する方法を開発する上で不可欠な課題であり、治療薬開発へつながることが期待される。

秋山は、がん免疫療法剤として「RANKL アンタゴニストを含む癌免疫増強」を特許出願し

[95] Ohshima D., Qin J., Konno H., Hirosawa A., Shiraishi T., Yanai H., Shimo Y., Shinzawa M., Akiyama N., Yamashita R., Nakai K., Akiyama T., Inoue J.I. “RANK signaling induces interferon-stimulated genes in the fetal thymic stroma”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 408(4), 530-536.

[96] nuclear factor kappa B(NF-kB)ファミリーの一員

ている[97]。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Akiyama N., Shinzawa M., Miyauchi M., Yanai H., Tateishi R., Shimo Y., Ohshima D., Matsuo K., Sasaki I., Hoshino K., Wu G., Yagi S., Inoue J.I., Kaisho T., Akiyama T. “Limitation of immune tolerance-inducing thymic epithelial cell development by Spi-B-mediated negative feedback regulation”, Journal of Experimental Medicine, 2014, 211(12), 2425-2438.

[2] Seki T., Yamamoto M., Taguchi Y., Miyauchi M., Akiyama N., Yamaguchi N., Gohda J., Akiyama T., Inoue J.I. “Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in Relb-Venus knock-in mice”, Journal of Biochemistry, 2015, 158(6), 485-495.

[3] Akiyama N., Takizawa N., Miyauchi M., Yanai H., Tateishi R., Shinzawa M., Yoshinaga R., Kurihara M., Demizu Y., Yasuda H., Yagi S., Wu G., Matsumoto M., Sakamoto R., Yoshida N., Penninger J.M., Kobayashi Y., Inoue J.I., Akiyama T. “Identification of embryonic precursor cells that differentiate into thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator”, Journal of Experimental Medicine, 2016, 213(8), 1441-1458.

[97] 特願2013-507847「RANKLアンタゴニストを含む癌免疫増強」(2013年3月13日出願)、欧州では成立している(EP2692359B)。

3.2.2　環境適応に関わる時空間パターン形成現象の分子ネットワーク(岩崎秀雄)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

生物は、外環境の情報を感知し、環境に応じて自己の内部環境を調節して生き延びる。本研究では、こうした生物のありように着目し、シンプルさと多様性を備えたシアノバクテリアを用いて、主に一細胞レベルで起こる時間的プログラム、一個体の内部の細胞間相互作用を含む細胞分化・パターン形成プログラムとその外環境との関係の解析を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)時計遺伝子の転写翻訳フィードバックを欠く条件での概日転写リズムの発見

単細胞性シアノバクテリア *Synechococcus* をモデルに時計蛋白質 KaiABC 複合体による概日時計が外界の明暗サイクルに応じてゲノムワイドな転写をどのように調節するかが調べられた[1]。さらに、暗期中では時計遺伝子を含むほとんどの遺伝子の発現が停止し、一見休眠状態になる一方、KaiC リン酸化リズムは持続し、一部の遺伝子発現に時計遺伝子の影響が及んでいることが明らかになった。その過程で、暗条件下、時計遺伝子の転写を欠く条件でも概日時計が転写リズムを駆動できることも初めて示された[2]。

(ⅱ)バクテリアの細胞分化パターニングの解析

多細胞性シアノバクテリアの *Anabaena* が、窒素欠乏条件下で約 10 細胞に 1 つの割合で窒素固定に特化する細胞(ヘテロシスト)に分化する空間パターン形成に着目し、一個体レベルで形態変化や分化制御遺伝子、光合成活性をリアルタイムモニターする観測系が構築され、初めてバクテリアの細胞系譜が作成された[3]。これにより、分化細胞の位置が初期値に依存することなく、細胞間相互作用を介して動的に決定されていく過程が明らかになった[3]。さらに、細胞分裂を阻害剤で停止させた状態でも細胞分化が起こることや、その状態ではヘテロシスト間の栄養細胞数は激減するものの物理的な距離はそれほど変化しないことが見出された[3]。

(ⅲ)運動性シアノバクテリアのコロニーパターン形成

運動性多細胞シアノバクテリアの個体群の動的なパターン形成過程が観察され、環境・栄養依存性や細胞間協調作用などが解析された。バクテリアのリング状のコロニーパターン形成と運動軌道構造安定化には、個体レベルの振動運動、粘液を介した協調的並進運動、できるだけ交差を避ける性質が関与することが示唆された。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内

[1] Ito H., Mutsuda M., Murayama Y., Tomita J., Hosokawa N., Terauchi K., Sugita C., Sugita M., Kondo T., Iwasaki H. “Cyanobacterial daily life with Kai-based circadian and diurnal genome-wide transcriptional control in *Synechococcus elongatus*”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(33), 14168-14173.

[2] Hosokawa N., Hatakeyama T.S., Kojima T., Kikuchi Y., Ito H., Iwasaki H. “Circadian transcriptional regulation by the posttranslational oscillator without de novo clock gene expression in *Synechococcus*”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(37), 15396-15401.

[3] Asai H., Iwamori S., Kawai K., Ehira S., Ishihara J.I., Aihara K., Shoji S., Iwasaki H. “Cyanobacterial cell lineage analysis of the spatiotemporal *hetR* expression profile during heterocyst pattern formation in *Anabaena* sp. PCC 7120”, PLoS ONE, 2009, 4(10), e7371.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後もシアノバクテリアを用いて概日時計とコロニーパターン形成について研究が行われた。科研費挑戦的萌芽研究「Kai時計遺伝子に依存しないバクテリアの新規転写振動の発生機構と生理機能」(2011年度～2012年度)、科研費若手研究(A)「概日時計を介するシアノバクテリアの動的環境適応ダイナミクス」(2011 年度～2012 年度)が行われ、科研費基盤研究(B)「概日時計を介する明暗サイクル下でのシアノバクテリアの生存戦略」(2015 年度～2017 年度)は現在も継続中である。また、コロニーパターン形成の研究では、科研費挑戦的萌芽研究「シアノバクテリアのマクロなコロニーパターンの構築原理」(2013年度～2014年度)が行われた。さらに、生命科学と芸術・美学に関する研究活動も世界的な拠点の一つとして活発に行われており、基盤研究(C)「ポスト・ゲノム時代のバイオメディア・アートに関する調査研究」(2010年度～2012年度)が行われ、基盤研究(B)「アウタースペース/インナースペース/インタースペース・アートの美学」(2017年度～2019年度)は現在も継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ｉ)概日時計の研究

1.時計の明暗サイクルへの同調が行われる際の新しい分子メカニズムの提案と実証[1]:シアノバクテリアの蛋白質振動子の状態が明暗サイクル下で異なること(明期中では転写・翻訳フィードバックループによって時計蛋白質の量が増減を繰り返しているのに対し、暗期に移すとその増減が止まる)が、明暗同調に大きく影響することを見出した。これは、

暗期に移した時刻に応じて暗期中の時計蛋白質の量が一定になり、その量と時計の状態に応じて光を再びつけた際の応答性が変化することに起因するという新たな知見が示された。

2. 減衰振動子が時計として機能し得るメカニズムの提案と実証[2]：従来、時間生物学では高い振幅を維持する持続的振動のみに注目が集まっていた。しかし、シアノバクテリアの時計を詳細に解析すると、低温になるほど振幅が低下するが周期は安定に保たれる Hopf 分岐を示すことを見いだした。減衰振動子は、固有振動子数の周期外力に同調して発振できることを試験管内再構成系で実験的に証明し、減衰振動子であっても概日時計として機能し得る(シアノバクテリアに関わらず全ての生物に適応可能な)新たな可能性が提示された。

3. 単細胞性シアノバクテリアを明期から暗期に移すとバクテリア内の転写は激減し、10 時間以内に総 mRNA 量は 10%以下にまで減少する。この劇的な転写の暗抑制は、光合成の停止に伴う受動的な応答ではなく、積極的に ATP 消費を伴って素早く行われる能動的なフィードフォワード制御に基づくことが明らかになった[3]。

4. 多細胞性シアノバクテリア Anabaena PCC 7120 でもゲノムワイドな発現プロファイリングが行われ、発光レポーターの開発などを通じ、その概日特性や分化細胞特異的な概日転写制御が初めて明らかになった[4]。

5. 概日転写翻訳リズムの新たな制御因子の発見：二成分制御系のレスポンスレギュレーターRpaB が、岩崎が先に発見していた *kai* 遺伝子発現の正の制御因子 RpaA とヘテロダイマーを形成して KaiBC オペロンや rpoD6 などの高振幅遺伝子群の発現を調整することが明らかにされた[98]。

6. 時計遺伝子 *kaiA* を過剰発現すると、ゲノムワイドに転写が活性化すること、さらに外来性の遺伝子発現誘導も効率化できることから、合成生物学的な代謝産物収量の増加が見込めることが明らかになった[99]。

7. Anabaena のヘテロシスト分化に関して、実際に観測される細胞運命の統計的なばらつきを踏まえた新たな数理モデルが提案された[100]。

8. 生命を美学的見地から再定義・再評価する生命美学の構築を試み、国際的なバイオアートのパイオニアとして活動が展開された(岩崎『＜生命＞とは何だろうか：表現する生物学、

---

[98] Hanaoka M., Takai N., Hosokawa N., Fujiwara M., Akimoto Y., Kobori N., Iwasaki H., Kondo T., Tanaka K., “RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in Synechococcus elongatus PCC 7942”, Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(31), 26321-26327.

[99] Xu Y., Weyman P.D., Umetani M., Xiong J., Qin X., Xu Q., Iwasaki H., Johnson C.H., “Circadian yin-yang regulation and its manipulation to globally reprogram gene expression”, Current Biology, 2013, 23(23), 2365-2374.

[100] Ishihara J.I., Tachikawa M., Iwasaki H., Mochizuki A., “Mathematical study of pattern formation accompanied by heterocyst differentiation in multicellular cyanobacterium”, Journal of Theoretical Biology, 2015, 371, 9-23.

思考する芸術』講談社現代新書、ほか国内外で招待講演・招待展示多数)。

② 社会・経済への波及効果

2017 年のノーベル生理学・医学賞は、真核生物の概日リズムの分子機構の解明に対して授与された。そこで解明されたのは、転写翻訳フィードバックループによる振動発生機構であった。これに対して、岩崎らは転写翻訳フィードバックループに依存しない概日時計機構を初めて実証し、その分子メカニズムの解明で世界をリードする研究を行ってきた。それは科学史的に重要な意義があり、岩波科学 2017 年 12 月号に総説が掲載された。

また、生命美学のプロジェクトは、単なる生物学のアウトリーチではなく、生命を生物学及び美学・芸術の両面から相互批判的に検討する視座を提供し、多くのアーティストやデザイナーに研究室を開放して共同プロジェクトを展開する metaPhorest を立ち上げ、特に美学芸術学の領域から大きく注目されるとともに、生命科学の新たなタイプの社会文化との接点を提供している(国内外の芸術祭で多く招聘されるとともに、『美術手帖』2018 年 1 月号で特集されるなどしている)。

生命美学の立場から岩崎が創立に関与してきた「細胞を創る」研究会(国内唯一の合成生物学の研究会)では、社会と合成生物学の関係に関して人文・社会の立場を重視する活動を先導し(社会・文化ユニット世話人)、岩崎は 2016 年度には会長も務めた。また、合成生物学の文化的・社会的可能性を美学的に検討する Synthetic Aesthetics(米国 NSF-英国 ESPRC)のメンバーに、400 名近い応募の中から 6 組の中に選出され、国際的な枠組みで制作・発表に携わった[101]。さらに、岩崎は、一般の人々が生命科学に関与し得る可能性を検討し、渋谷のものつくり工房(渋谷 FabCafe)内に P1 認可を得たバイオラボ BioClub の設置を監修し、多くのイベントに関わっている(2017 年グッドデザイン賞)。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Hosokawa N., Kushige H., Iwasaki H. “Attenuation of the posttranslational oscillator via transcription-translation feedback enhances circadian-phase shifts in *Synechococcus*”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(35), 14486-14491.

[2] Murayama Y., Kori H., Oshima C., Kondo T., Iwasaki H., Ito H. “Low temperature nullifies the circadian clock in cyanobacteria through Hopf bifurcation”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(22), 5641-5646.

[3] Takano S., Tomita J., Sonoike K., Iwasaki H. “The initiation of nocturnal dormancy in Synechococcus as an active process”, BMC Bioloy, 2015, 13(1),

[101] Iwasaki & Catts, in “Synthetic Aesthetics” MIT Press, 2012

36.

[4] Kushige H., Kugenuma H., Matsuoka M., Ehira S., Ohmori M., Iwasaki H. “Genome-wide and heterocyst-specific circadian gene expression in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120”, Journal of Bacteriology, 2013, 195(6), 1276-1284.

④その他

岩崎は、2011 年日本ゲノム微生物学会研究奨励賞[102]を受賞した。また、監修に携わった一般の参加者を想定したバイオラボ BioClub(渋谷 FabCafe 内)は、2017 年のグッドデザイン賞を受賞した。

[102] 2011 年日本ゲノム微生物学会研究奨励賞受賞者について
http://www.sgmj.org/index.php/2011%E5%B9%B4%E6%97%A5%E6%9C%AC%E3%82%B2%E3%83%8E%E3%83%A0%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AD%A6%E4%BC%9A%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%A5%A8%E5%8A%B1%E8%B3%9E%E5%8F%97%E8%B3%9E%E8%80%85%E3%81%AB%E3%81%A4%E3%81%84%E3%81%A6

3.2.3　リズミカルな連続運動の神経基盤の解析(木津川尚史)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

連続運動の多くは周期性を持ち、遂行時にリズムが生まれる。しかし、リズミカルな運動を作り出す神経機構は明らかになっていない。本研究では、マウスに複雑な連続ステップを行わせるホイール走行装置を開発し、走行するマウスの足の運び(運足)と神経活動を計測し、走行中のリズムの生成とその神経活動を解析して、連続運動の制御機構を解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)ホイール走行装置を用いたマウスの連続運動タイミング測定

マウスに複雑な連続ステップを遂行させるホイール走行装置ステップホイールが作製された。ステップホイールでは、一定のスピードで回転するホイール中を、マウスは報酬となる水を摂取しながら一定のスピードで走行する。マウスの足場になるのはホイールに取り付けられているペグで、マウスはペグの配列に従って運足し、ペグのタイミングに合わせて走るように訓練された(図 3-41)。タッチセンサーをペグに取り付けてマウスの足がペグに接触したタイミングを測定した結果、マウスが複雑なペグパターンを記憶していること、ペグの配置は複雑であるにもかかわらず運足が周期的になる部分があること、その部分ではマウスの左右の足の位置関係(位相)が比較的保存されることが明らかになり、複雑な連続運動の遂行の中でリズムが生まれていることが確認された[1]。

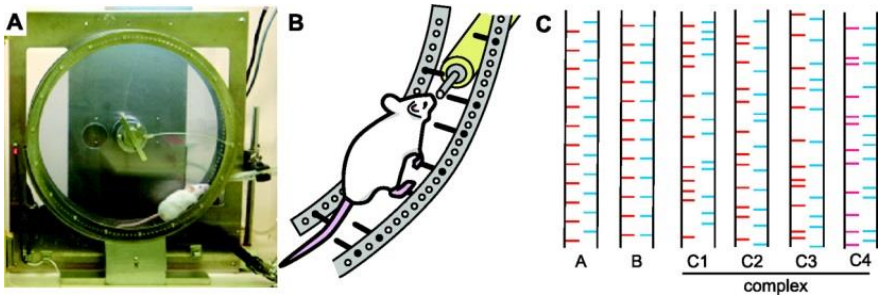


図 3-41　ホイール走行装置とペグ配列[1]

A はホイール走行装置、B はペグを伝ったマウスの運足、C は代表的なペグパターンを示す。

(ⅱ)周期性を検知・構築する神経機構

走行時に大脳皮質などから計測した神経細胞の中には、運足が周期的になっているときに活動が亢進する細胞が観察され、周期性を検知、構築する神経機構の存在が示唆された[1]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Kitsukawa T., Nagata M., Yanagihara D., Tomioka R., Utsumi H., Kubota Y., Yagi T., Graybiel A.M., Yamamori T. “A novel instrumented multipeg running wheel system, Step-Wheel, for monitoring and controlling complex sequential stepping in mice”, Journal of Neurophysiology, 2011, 106(1), 479-487.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、連続する複雑な運動を動物が学習するメカニズムについて、脳レベルの解析へと発展させた。科研費挑戦的萌芽研究「リズミカルな連続運動を生成するリズミカルな神経活動」(2011 年度～2012 年度)、科研費基盤研究(C)「運動のバランスを司る神経回路の解明と新規運動サポート技術の開発」(2013 年度～2016 年度)では、連続運動時に働く脳の領域や神経を特定し、そのための実験装置の開発が行われた。科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「リズム間引き込み協調の神経回路基盤」(2016 年度～2017 年度)は継続中である。

① 科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)c-Fos 免疫組織染色を用いたステップホイール走行に関与するマウスの脳領域の特定

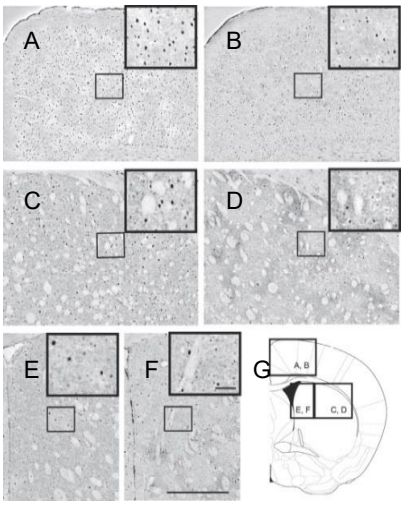


図 3-42　ステップ運動時のマウス脳の c-fos の発現領域[1]

A、C、E は新規ペグパターン走行初日のマウス、B、D、F は 7 日目のマウスで、A、B は運動皮質領域、C、D は背外側線条体、E、F は背内側線条体を示す。G は各領域の位置を示す模式図である。A～F の右上の四角は中央の四角の拡大写真である。

新規ステップ学習時に活動する脳部位を同定するために、ステップホイールを走行した

マウスの脳切片が神経活動依存的に発現するタンパク質 c-Fos に対する抗体で染色された。マウスは、単純なペグパターン A で十分訓練した後に新規なペグパターンを走行させ、その際に活動した脳部位が同定された。その結果、新規なペグパターン走行初日の大脳皮質運動野と線条体背外側部で c-fos の発現亢進が検出され、これらの領域がステップホイールでの複雑なパターン走行に関与している可能性が示された[1](図 3-42)。

(ⅱ)新規運動パターンへの適応メカニズム

ステップホイール走行においてペグパターンが変化した時には、報酬である水を走行しながら飲み続けるために新しい運動パターンを習得する必要がある。新規ペグパターン走行時に、線条体で c-fos を発現する神経細胞が増加したことは、新規パターン学習時に線条体神経細胞においてシナプス可塑性が起きている可能性を示している。これを検証するため、マウス線条体に N-methyl D-aspartate 型グルタミン酸受容体(NMDA 受容体)のアンタゴニスト AP5 を注入し、新規ペグパターン走行時の成績が解析された。報酬である水を得るためには、ホイールの回転スピードに遅れずに走行する必要がある。そこで、走行中にマウスが給水口付近に位置している時間が運動達成度の指標とされた。その結果、生理的食塩水を投与されたコントロールマウスと比較して AP5 投与群マウスでは、パターン変更後の初期において、成績が低下していることが見いだされた。この結果は、新規ペグパターン走行時のマウス線条体において、NMDA 受容体を介したシナプス可塑性が起きていることを示している[1]。

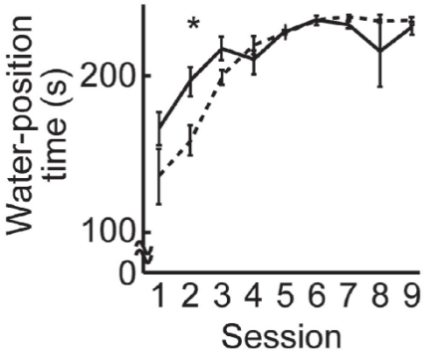


図 3-43　NMDA 受容体遮断薬 AP5 の新規運動パターン習得への影響[1]

縦軸はマウスが飲水可能な位置を走行していた時間。横軸は新規ペグパターン変更後のセッション数。実線：生理食塩水投与群、破線：AP5 投与群。

②社会・経済への波及効果

我々が行う連続運動がどのような神経活動によって生まれ、制御されているか、運動の学習と活動の神経基盤を理解することは、運動障害の病因解明につながることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Nakamura T., Nagata M., Yagi T., Graybiel A.M., Yamamori T., Kitsukawa T. “Learning new sequential stepping patterns requires striatal plasticity during the earliest phase of acquisition”, European Journal of Neuroscience, 2017, 45(7), 901-911.

3.2.4　匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明(小早川令子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

情動とは嫌悪、恐怖、食欲、母性などの生存に欠かせない多様な本能を呼び起こす脳の働きであり、適切な情動は、ヒトや動物の行動を生存に有利な方向へ動機付けるという役に立つ側面を持つ。本研究では、脳が外界の情報の価値を判断して、適切な情動や行動を誘発するメカニズムの解明を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)マウスの鼻腔内背側ゾーンの役割

マウスの鼻腔内にはゾーン構造[103]が存在し、匂い情報が初めに伝達される脳の領域である嗅球にはドメイン構造が存在する。これらの構造の生物学的な機能を解明するために、ジフテリア毒素遺伝子により、鼻腔内の背側ゾーンと腹側ゾーンの各々の嗅細胞を選択的に除去したマウスが作製された(図 3-44)。

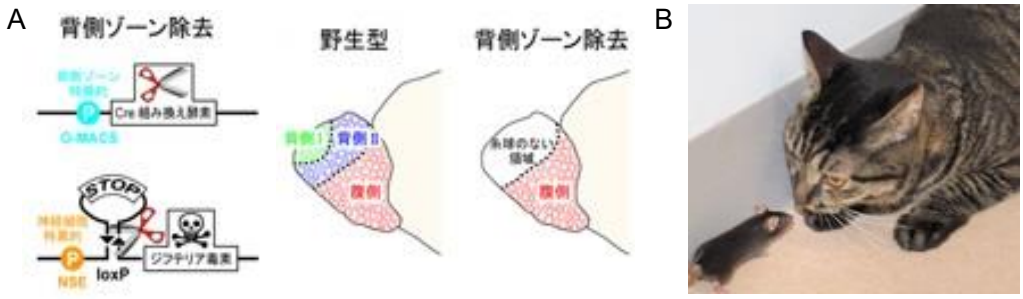


図 3-44　ジフテリア毒素遺伝子による鼻腔内背側ゾーン除去と効果[104,105]

A の左図は Cre 組換え酵素が STOP 配列を切り、ジフテリア毒素が活性化されて、背側ゾーンの嗅細胞だけが選択的に除去されることを示す。右図はマウス鼻腔内の背側ゾーンを示す。B は A の遺伝子操作の結果、猫を恐れないネズミの写真を示す。

背側除去マウスでは、第一に腹側ゾーンの嗅細胞を用いて腐敗臭や天敵臭を正常に感知できるものの、これらの匂い分子に対する忌避行動を全く示さないこと、第二に野生型マウスに見られる天敵臭を嗅いだ時の血液中のストレスホルモン分泌が起こらないこと、第三

[103] 類似した神経連絡/機能を持つ神経細胞が帯状(ゾーン状)に分布し、神経領域全体を横断し、隣接して複数ある時、その構造をゾーン構造と呼ぶ。嗅覚系では嗅球を帯状に取り巻くように分布している。
[104] 東京大学プレリリース　https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2007/24.html
[105] JST ニュースリリース　ようこそ私の研究室へ　小早川令子
http://www.jst.go.jp/pr/jst-news/2008/2008-06/page08.html

に天敵臭や腐敗臭を嗅がせた後に痛み刺激を与えると後天的に匂いに対する忌避行動を学習できることが明らかになった[106]。一方、腹側除去マウスでは、腐敗物の匂いに対する先天的な忌避行動を示した。これらの結果から、背側ゾーンの嗅細胞によって腐敗臭が“嫌だ”や、天敵臭が“怖い”という情動判断が先天的に決まることが明らかになった[106,107]。

(ⅱ)恐怖レベルの定量化

恐怖応答の一種に「竦(すく)み行動」があり、匂い分子を嗅いだ時にすくんでいる時間の割合を計測することで、恐怖レベルが定量化された。トリメチルチアゾリンは天敵臭として知られ、この分子によって先天的に誘発できるすくみ行動のレベルは、電気ショックとの関連学習によって後天的に獲得した恐怖に比較すると低かった[1]。そこで、先天的な恐怖応答を誘発し嗅覚神経回路を活性化する匂い分子を人工物匂い分子ライブラリーの中から探索し、これまでに知られていた天敵臭に比較して最大で10倍以上も高いすくみ行動の誘発活性を持つ一連の匂い分子群「恐怖臭」が発見された[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内

[1] Sato T., Kobayakawa R., Kobayakawa K., Emura M., Itohara S., Kizumi M., Hamana H., Tsuboi A., Hirono J. “Supersensitive detection and discrimination of enantiomers by dorsal olfactory receptors: Evidence for hierarchical odour coding”, Scientific Reports, 2015, 5, 14073.

[2] Matsumoto H., Kobayakawa K., Kobayakawa R., Tashiro T., Mori K., Sakano H., Mori K. “Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor class domains of the mouse olfactory bulb”, Journal of Neurophysiology, 2010, 103(6), 3490-3500.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、嗅覚刺激による情動制御の分子機構解明と恐怖臭を応用した害獣忌避剤開発の研究が行われた。

NEDO分野横断的公募事業若手研究グラント4年型「嗅覚神経回路の機能に基づいて食欲や母性の情動を制御する新技術の開発」(2009年度～2012年度)、科研費基盤研究(B)「先天的と後天的な恐怖反応を特異的に制御する神経回路の解明」(2011年度～2013年度)、公益財団法人 武田科学振興財団・武田報彰医学研究助成「先天的と後天的な情動行動の制御機構の解明」(2016 年度)では、マウスを用いた嗅覚刺激による情動制御の分子機構解明が行

[106] Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Mori, K., Sakano, H. “Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb, Nature 450(7169), 2007, 503-508

[107] さきがけ研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」研究課題「匂いに対する忌避行動を規定する神経回路の解明」研究領域事後評価報告書

われ、科研費挑戦的萌芽研究「情動と体温を結ぶ分子メカニズムの解明」(2016 年度～2017 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「行動適応を担う脳神経回路の機能シフト機構」「先天的と後天的な恐怖と食欲情動の統合処理メカニズムの解明」(2017 年度～2018 年度)は継続中である。

また、害獣忌避剤開発研究として、科研費挑戦的萌芽研究「野生動物に対して先天的な恐怖や誘引行動を誘発する匂い分子の開発理論」(2011 年度)が行われ、JST 産学連携・技術移転事業 A-STEP ステージⅡシーズ育成タイプ第 4 分野「害獣忌避剤のコントロールドリリース技術の開発」(2015 年度～2020 年度)は継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)先天的及び後天的な恐怖情動の評価指標の確立

これまで多くの研究者により恐怖情動の研究が行われているが、その多くが後天的恐怖に関する研究であった。これに対して、先天的恐怖に関しては、先天的恐怖を誘発する有効な手段がなかったことから技術的に困難だった。小早川らは、強力な先天的恐怖を誘発する化合物(匂い分子)を発見することで、先天的恐怖を研究する道筋をつけた。また、この技術を用いることで、先天的及び後天的恐怖の両者を分離して計測・評価するための多次元の指標を開発することに成功した[1]。

(ⅱ)先天的と後天的な恐怖情動の統合処理メカニズムの解明

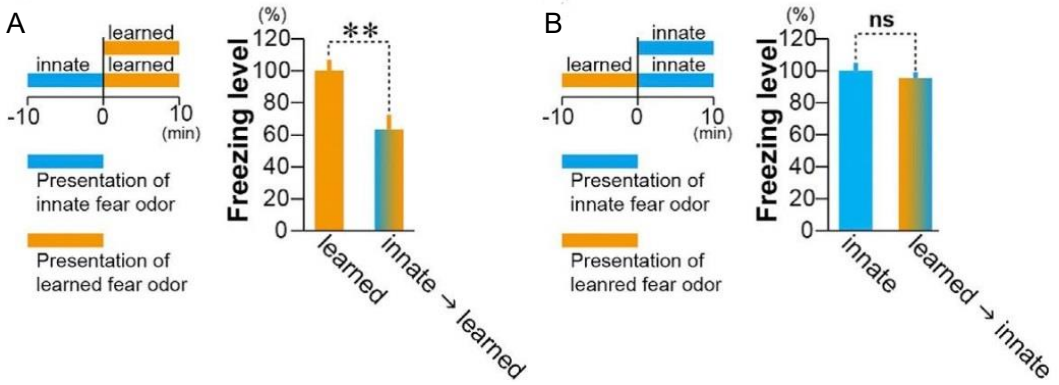


図 3-45　すくみにおける先天的と後天的な恐怖情動の関係[1]

A の左図は先天的恐怖刺激(青)後に後天的恐怖刺激(黄)を与える実験手順で、右図はその時のすくみ率を、後天的恐怖時のすくみ(黄)に対して示したグラフである。B の左図は後天的恐怖刺激(黄)後に先天的恐怖刺激(青)を与えた実験手順で、右図はその時のすくみ率を、先天的恐怖時(青)のすくみに対して示したグラフである。

(ⅰ)で開発した先天的恐怖誘発技術を用いて、先天的及び後天的恐怖情動が脳内でどのように統合処理されるのかという神経メカニズムの解明が行われた。先天的及び後天的恐

怖刺激をマウスに同時に提示すると、マウスは先天的恐怖を優先させた。また、先天的及び後天的恐怖刺激を連続して提示すると、先天的恐怖は後天的恐怖のレベルを低下させる働きを持つことが明らかになった(図 3-45)。先天性及び後天性の恐怖のすくみに関与する脳部位を調べるため、神経活動依存的に発現する遺伝子 c-fos の mRNA 発現レベルを全脳でマッピングしたところ、扁桃体中心核が関与する可能性が示唆された[1]。次に、先天的と後天的な恐怖情動を起こす神経細胞を調べるため、多様な向精神薬を投与して、先天性恐怖と後天性恐怖のすくみ率を調べるスクリーニングが行われ、セロトニン 2A 受容体発現細胞が先天的・後天的両方のすくみを逆方向に制御することが明らかになった。これらの結果から、扁桃体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞が先天的と後天的恐怖の統合処理に関わると考えられた。そこで、遺伝子改変マウスとウイルスを用いることで扁桃体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞の自由行動下でのイメージングや、同細胞を光遺伝学・DREADD[108]を用いた活動操作をした際の行動への影響を解析した。その結果、先天的恐怖刺激は扁桃体中心核のセロトニン 2A 受容体発現細胞の神経活動を低下させ、この活動低下が後天的恐怖反応を減弱させることで、先天的恐怖が後天的恐怖に優先されるという階層性を形成しているということが示された[1]。

(iii)社会性情動を制御する神経メカニズムの解明

マウスの嗅覚系には、主に主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系の二つのサブシステムが存在するが、このうち鋤鼻嗅覚系はヒトではその機能は失われていると考えられている。これまで、マウスの社会性情動は鋤鼻嗅覚系によって制御されると考えられてきた。小早川らは、主嗅覚の背側ゾーンでのみ嗅覚情報処理に必須の Cyclic nucleotide-gated channel alpha 2(CNGA2 チャネル)をコンディショナルノックアウトしたマウス、及び背側ゾーンの嗅細胞のみを遺伝的に除去したマウスの行動や脳の神経活動パターンを解析した。その結果、性行動・攻撃行動・母性行動などのマウスの社会性情動の制御に主嗅覚系が重要な役割を果たすこと、また、ヒトにも存在する主嗅覚―前嗅核経路が社会性情動の制御に重要な役割を果たすことが明らかにされた[2]。

②社会・経済への波及効果

哺乳類の嗅覚に先天性があるという発見により、ネズミなど害獣が感じる先天的な恐怖臭を開発することが可能となることが示された。これにより、近年大きな問題となってきた農地や線路での害獣の駆除効果が期待される。また、恐怖はうつ、強迫性障害、恐怖症、心的外傷後ストレス障害(PTSD)などの精神疾患の発症や症状にも影響を与えると考えられている。脳が恐怖情報を処理するメカニズムの解明は、人や動物の行動原理の理解に加え、精

[108] DREADD(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug):デザイナー薬剤により活性化するデザイナー受容体。遺伝子変異を加えた GPCR のことで、デザイナー合成リガンドのみに特異的に活性化され、内在的リガンドには反応しない。

神疾患の診断や治療法を開発する上でも重要な意義がある。

小早川らは、本研究領域の研究成果に基づき、「動物用忌避剤」として「先天的に動物に恐怖を引き起こす匂を有する化合物」の特許を出願し、登録した(特許 05350496)。また、この特許に基づきベンチャー企業、脳科学香料株式会社(代表取締役：小早川高)が設立(2010 年)された。その後も忌避剤のスクリーニング法や情動の計測方法に関する特許が出願されている[109]。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Isosaka T., Matsuo T., Yamaguchi T., Funabiki K., Nakanishi S., Kobayakawa R., Kobayakawa K. “Htr2a-Expressing Cells in the Central Amygdala Control the Hierarchy between Innate and Learned Fear”, Cell, 2015, 163(5), 1153-1164.

[2] Matsuo T., Hattori T., Asaba A., Inoue N., Kanomata N., Kikusui T., Kobayakawa R., Kobayakawa K. “Genetic dissection of pheromone processing reveals main olfactory system-mediated social behaviors in mice”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(3), E311-320.

④その他

小早川は、2010 年 9 月に第 10 回バイオビジネスコンペで最優秀賞を受賞した。

[109] 特願 2012-11682「CartptmRNA 発現細胞標識動物及びそれを用いたスクリーニング方法」及び特願 2015-513851「情動の計測方法」

3.2.5　脳内を縦横に結ぶ意思決定リンク(小村豊)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

意思決定とは、複数の選択肢からある一つのものを決定する高次脳機能である。いわゆる反射とは対照的に、同一の感覚入力に対しても臨機応変に解釈し、その解釈に基づいて行動が変化し得ることが、最大の特徴である。本研究では、霊長類の動物モデルを用いて、意思決定の神経機構を明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)意思決定の霊長類モデル作成

複合的な視覚刺激を用いて、内容判別課題と判別回避課題から成る複数の解釈が可能な行動課題が開発され、これをサルに習得させた。

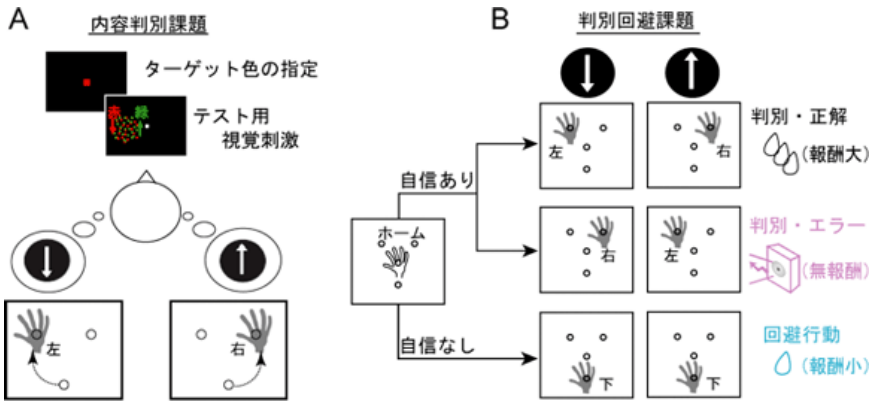


図 3-46　サルに課した 2 種類の行動課題[110]

A は、内容判別課題を示し、最初にターゲットの色(最上部黒パネル内中央に赤か緑のいずれかの点)が示され、次のパネル(二段目黒パネル)でターゲット色の集団が上下いずれかに移動し、上に動いている時は右のバー(最下段右枠)、下に動いている時は左のバーを選択させ(最下段左枠)、正解なら報酬を与える。B は判別回避課題を示し、A の内容判別課題を行う時、自信がない場合は判別行動を忌避し第三の選択肢(下のバー)(最下段枠)を押させ、少量の報酬を与える。自身がある場合は A と同様の動作を行う。

この複合的課題では、内容判別課題は指定された色(赤 or 緑)の集団が、上下、どちらに動いているか左右のバーを選択させて知覚判断を見る課題である(図 3-46　A)。判別回避課題は左右のバーに加え、“判別行動をしない”という第三の選択肢(下のバー)を用意し、正

[110] 産総研ホームページ 知覚意識を支える神経メカニズムを解明
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2013/pr20130513/pr20130513.html

解すれば報酬(ジュース)を与え、不正解ならブザーが鳴り報酬無し、回避行動なら常に少量の報酬を与えるという、自信がないときの行動を見る課題である(図 3-46 B)。実際に、複数のサルに、これらの課題を習得させ、同一の視覚入力に対して、異なる情報の読み出しを行っていることを行動学的に担保できる実験系が確立された[111]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

無し

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も、霊長類モデルを用いた意思決定に関する研究が、科研費若手研究(A)「視知覚の「まとまり」を支える脳内ダイナミクス」(2009 年度～2012 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「意思決定における「迷い」の検知・制御メカニズム」(2012 年度～2014 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「意思決定の基準をセット・利用する脳内機構」(2014 年度～2015 年度)で行われた。

さらに、この霊長類モデルと蓄積したデータを応用し、科研費挑戦的萌芽研究「セルフの表象破綻から探る、新たな統合失調症モデル」(2015 年度～2017 年度)、科研費基盤研究(B)「メタ認知を支える神経基盤と多重モデルの解明」(2014 年度～2017 年度)、科研費基盤研究(A)「メタ認知の神経基盤と変容メカニズムの相互理解」(2017 年度～2020 年度)は現在も継続中である。

また、上記の行動科学的手法に、脳をミクロからマクロまで階層的に捉えるシステム神経科学の手法、計算論的な視点に立った数理モデリングの手法を組み合わせた研究が、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「人工知能と脳科学の対照と融合」「予測符合化モデルと、自律推論する脳機構との照合」(2017 年度～2018 年度)で行われ、現在も継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)視床枕の視知覚における役割

視床枕(脳深部に左右一対ずつある領域。一般的に右(左)の視床枕には、左(右)視野からの視覚情報が入力される。)が視知覚で果たす役割を神経生理学的に明らかにするため、サルに正しいバーを押すと大きな報酬、間違っていれば報酬無しというリスキーな選択肢と、下のバーを触ればいつでも少量の報酬がもらえるという安全な選択肢を与え、視床枕の神経活動を記録した[1]。その結果、刺激の曖昧さの増加に伴い安全バーに触れる頻度が増加し(図 3-47 A)、リスキーな選択肢を選ぶ時には、視床枕ニューロンが強く応答することが明らかになった(図 3-47 B)。この時、視床枕の神経活動は、一過性に応答する早期成分に

[111] Komura Y., Nikkuni A., Hirashima N., Uetake T., Miyamoto A. “Responses of pulvinar neurons reflect a subject's confidence in visual categorization”, Nature Neuroscience, 2013, 16(6), 749-755.

は差がないが、後期成分では回避行動時には弱く(図 3-47 B 青)、判別行動時には強い反応を示した(図 3-12 B 黒・紫)。また、右側の視床枕の神経活動を薬物で抑制すると、左視野に視覚刺激を提示した判別回避課題のみで、判別回避行動が増加した[1](図 3-48)。以上の結果から、視床枕は視覚意識を支える確信度に寄与することが示唆された[1]。

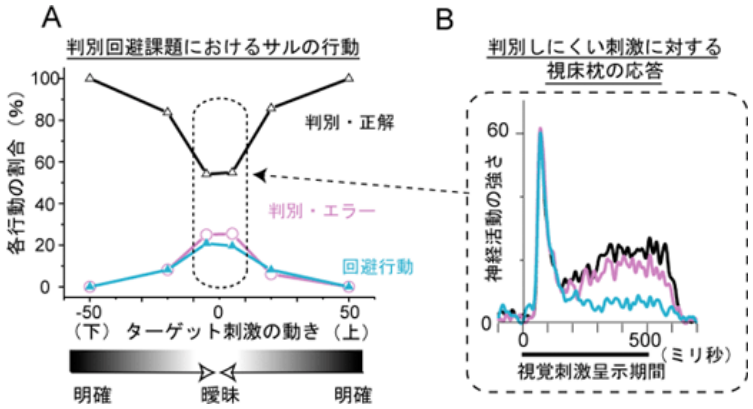


図 3-47　判別回避課題における行動パターンと視床枕の活動[112]

A は、ターゲットの視覚刺激の曖昧さと行動との関係を示す。黒線が判別行動を取り正解した割合、紫線が判別行動を取り失敗した割合、青線が判別行動を回避した割合を示す。B は、視覚刺激が曖昧な時の視床枕の神経活動を示す。

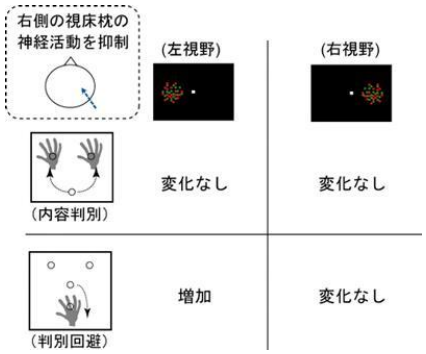


図 3-48　視床枕抑制の判別回避課題への影響[112]

右側の視床枕を抑制した時の判別回避課題の結果。左視野に視覚を提示した時のみ、判別回避行動が増加した。

②社会・経済への波及効果

本研究は、脳や神経から心が生まれる過程をミクロからマクロまで階層的に捉え、霊長類をモデルとした研究を通じて、人の「意識」「社会性」のメカニズムを解明しようとするものである。脳に関するこのような知見は、医療のみならず、教育・経営・人工知能など、社

[112] 産総研ホームページ 知覚意識を支える神経メカニズムを解明
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2013/pr20130513/pr20130513.html

会の多くの場面で利用されることが期待される。

小村は、高校生や一般向けの講演を行い、Newton 誌など、一般向け科学雑誌に執筆し、脳とこころの問題に関する教育あるいは研究成果の普及活動を行っている。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Komura Y., Nikkuni A., Hirashima N., Uetake T., Miyamoto A. “Responses of pulvinar neurons reflect a subject’s confidence in visual categorization”, Nature Neuroscience, 2013, 16(6), 749-755.

3.2.6　小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御(田中敬子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

神経細胞のシナプスにおいて、特定の刺激後に神経伝達効率が長期にわたって増強(Long-term potentiation(LTP))、あるいは抑制(Long-term depression(LTD))される現象が見られ、シナプス可塑性と呼ばれ、記憶や学習との関連が報告されている。本研究では、小脳 LTD において神経の誘発刺激後にどのような分子がどのように働くことにより特異的な LTD が引き起こされるかという時空間的疑問を解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)小脳 LTD におけるポジティブフィードバック機構

小脳において LTD を誘導した後、プルキンエ細胞の mitogen-activated protein kinase(MAPK:MAP キナーゼ)活性化は、protein kinase C(PKC)抑制剤(bisindolylmaleimide I)によって抑えられ、また、PKC 活性化物質である tissue polypeptide antigen(TPA)の投与により引き起こされた LTD は、MAPK 経路抑制剤によって抑制された。すなわち、PKC が MAPK の上流で働く一方、MAPK も PKC の上流で働くというポジティブフィードバック機構が働いていることが明らかになった[1]。

(ⅱ)ポジティブフィードバック機構の LTD 誘導・維持への必要性

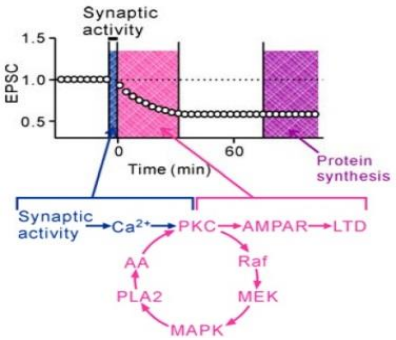


図 3-49　LTD の経過に沿って変化するシグナル経路[1]

LTD を誘導するシグナル刺激により、一過性の[Ca^{2+}]上昇で PKC 活性が誘導され、ポジティブフィードバック機構が開始する。

ポジティブフィードバック機構が LTD 誘導や維持に必要か否かを検討するため、LTD 誘導直後、10 分後、30 分後に PKC 抑制剤あるいは phospholipase A2(PLA2)抑制剤による神経伝達効率の影響を調べた結果、LTD 誘導刺激後、ポジティブフィードバック機構が働くことにより PKC 活性は 20～30 分間維持し、これにより LTD が成立することが明らかになった[1]。

(iii)ポジティブフィードバック機構における Raf kinase inhibitor protein(RKIP)の役割

ポジティブフィードバック機構の全容を明らかにするため、PKC と MAPK をつなぐ分子として Raf 抑制タンパク質 RKIP に着目し、RKIP の変異体(RKIP-TV、常時 Raf 抑制型)を用いて検討した結果、RKIP は上記のポジティブフィードバック機構のメンバーであり、RKIP のリン酸化による Raf の活性化が LTD に必要であることが明らかになった[2](図 3-49)。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Tanaka K., Augustine G.J. “A Positive Feedback Signal Transduction Loop Determines Timing of Cerebellar Long-Term Depression”, Neuron, 2008, 59(4), 608-620.

[2] Yamamoto Y., Lee D., Kim Y., Lee B., Seo C., Kawasaki H., Kuroda S., Tanaka-Yamamoto K. “Raf kinase inhibitory protein is required for cerebellar long-term synaptic depression by mediating PKC-dependent MAPK activation” Journal of Neuroscience, 2012, 32, 14254-14264.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、東京大学理学系研究科から Korea Institute of Science and Technology[113]へと拠点を移し、本研究課題の小脳 LTD のポジティブフィードバック機構に関連する研究を継続しており、ポジティブフィードバック機構内の各分子機能に焦点を当てた詳細な解析と、脳の in vivo 解析に必要なベクターの開発が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)小脳 LTD のポジティブフィードバックループの機構解明とモデルの更新

小脳 LTD でフィードバックループに関与する extracellular signal-regulated kinase(ERK:分子細胞外シグナル制御キナーゼ)(図 3-50 ①)との相互作用が知られているチロシン特異的 mitogen-activated protein kinase phosphatase(MKP)の受容体 protein tyrosine phosphatase receptor-type R(PTPRR)(図 3-50 ②)に着目し、その欠失マウスを用いた実験により、PTPRR は ERK のリン酸化を低レベルで維持することによって、ポジティブフィードバックループの機能を最適化することが明らかになった(図 3-50 ①②)[1]。

さらに、MAP kinase kinase kinase(Raf)(図 3-50 ③)、MAPK-ERK kinase(MEK)(図 3-50 ④)、Raf kinase inhibitor protein(RKIP)(図 3-50 ⑤)、リン酸化、脱リン酸、あるいはカルシウムイオンなどが関与する相互作用が詳細に調べられ、これまでのポジティブフィードバックループ分子モデルに追加された[2](図 3-50)。

[113] Tanaka-Yamamoto Lab https://sites.google.com/site/tanakayamamotolab/

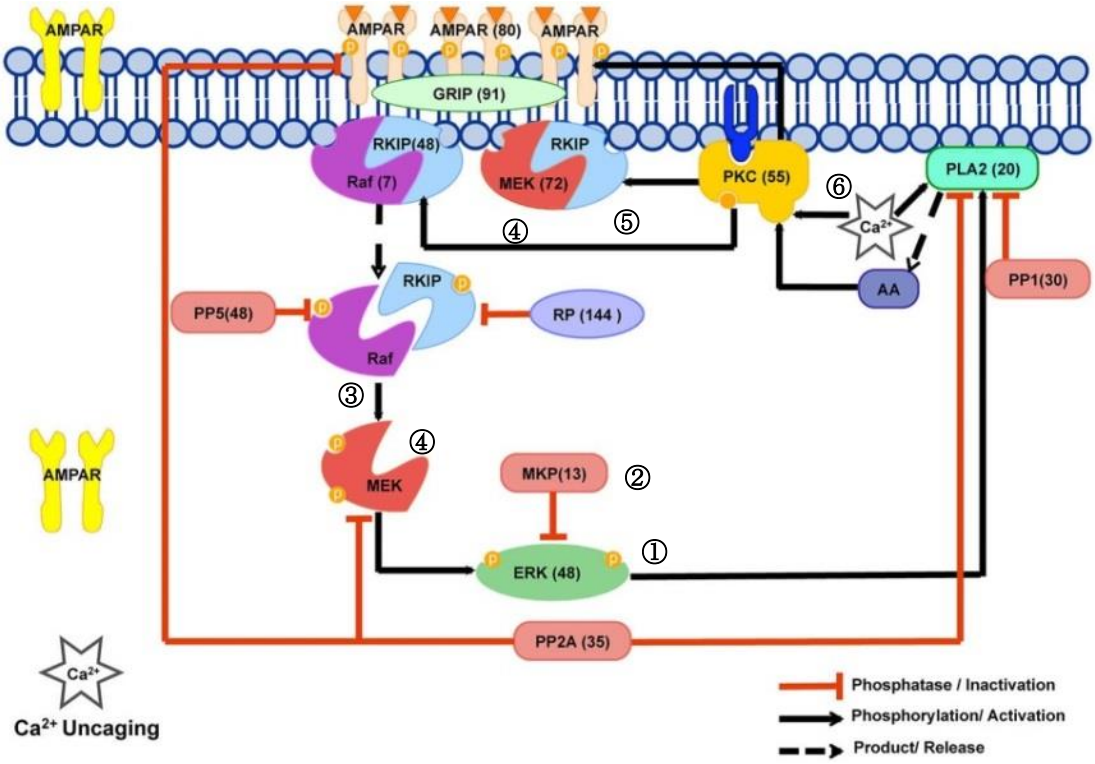


図 3-50　LTD ポジティブフィードバックループ[2]

各分子の右側( )内の数字はプルキンエ細胞のデンドライトに存在する分子の数、オレンジ色の丸はリン酸化を示す。

さらに、protein kinase C(PKC:プロテインキナーゼ C)(図 3-50 ⑥)の制御機構に着目し、diacylglycerol kinase ζ(DGKζ:ジアシルグリセロールキナーゼζ)や postsynaptic density protein 95(PSD-95)との相互作用について調べた結果、DGKζは PSD-95 との相互作用を介してシナプスに局在し、PKC のシナプス局在を促進する一方、LTD の間、局所的に diacylglycerol(DAG:ジアシルグリセロール)の代謝を抑制することによって、PKC の活性化を最低レベルにすることが明らかになった[3]。このような正と負の調節因子の関与により、シナプスのシグナル伝達が微調整されていることが明らかになった。

上述のようにポジティブフィードバック機構は、LTD 誘導後 20～30 分間働くが、その後どのように LTD が維持されるかが次の疑問である。そこで、新しい光遺伝物質(PS-Rab7TN)が作成され、これを用いた電気生理学的実験と、コンピュータモデルにより、初期エンドソームから後期エンドソームへの膜輸送が LTD 維持のためのスイッチとして働くことが明らかになった[114]。

[114] Kim T., Yamamoto Y., Tanaka-Yamamoto K. “Timely regulated sorting from early to late endosomes is required to maintain cerebellar long-term depression”, Nat. Commun., 2017, 8(1), 401.

(ⅱ)プルキンエ細胞特異的な導入遺伝子発現のためのベクター作成

プルキンエ細胞特異的な導入遺伝子発現のための Adeno-associated virus(AAV)ベクターが作成された。特定のプロモーターを有する二つの AAV1 を使用し、これらの AAV の全てが小脳皮質細胞に導入され、AAV1-calcium-calmodulin-dependent protein kinase II(CaMKIIα)及び AAV1- GABAA receptor alpha 6(GABRα6)が、それぞれプルキンエ細胞及び顆粒細胞に選択的に導入された[4]。この方法によりマウス小脳スライスを用い、パッチクランプ記録、光発生イメージングや生理学的実験に利用できるようになった。

②社会・経済への波及効果

運動学習では、小脳の顆粒細胞とプルキンエ細胞間のシナプスの可塑性が重要である。LTD におけるポジティブフィードバック機構の関与を明らかにし、シナプス可塑性のメカニズムの理解を進めた結果は、今後、脊髄小脳変性症などの神経疾患への治療法開発や、より効率的な運動学習方法の開発に寄与すると期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Erkens M., Tanaka-Yamamoto K., Cheron G., Márquez-Ruiz J., Prigogine C., Schepens J.T., Nadif Kasri N., Augustine G.J., Hendriks W.J. “Protein tyrosine phosphatase receptor type R is required for Purkinje cell responsiveness in cerebellar long-term depression”, Molecular brain, 2015, 8, 1.

[2] Hepburn I., Jain A., Gangal H., Yamamoto Y., Tanaka-Yamamoto K., De Schutter E. “A model of induction of cerebellar long-term depression including rkip inactivation of raf and MEK”, Frontiers in Molecular Neuroscience, 2017, 10, 19.

[3] Lee D., Yamamoto Y., Kim E., Tanaka-Yamamoto K. “Functional and physical interaction of diacylglycerol kinase ζ with protein kinase Cα is required for cerebellar long-term depression”, Journal of Neuroscience, 2015, 35(46), 15453-15465.

[4] Kim Y., Kim T., Rhee J.K., Lee D., Tanaka-Yamamoto K., Yamamoto Y. “Selective transgene expression in cerebellar Purkinje cells and granule cells using adeno-associated viruses together with specific promoters”, Brain Research, 2015, 1620, 44263, 1-16.

3.2.7　生体内細胞の周辺環境物性認識システムの解明(原田伊知郎)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

細胞は、細胞外マトリクスと呼ばれる足場に接着し、その足場の固さを認識して、増殖・分化・移動などの機能を調整しているが、その固さを認識する機構は明らかになっていない。本研究では、光ファイバをアレイ化したマイクロ加工培養基板を創製することにより、細胞が接着点にかける力の大きさとシグナル分子との相関から、細胞が足場の物性をどのように検出・認識しているかを明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)新しい微細加工培養基板の開発

細胞が接着点にかける力の大きさと、そこに集結するシグナル分子局在の時間変化との相関関係を検出するため、新しいタイプの微細加工培養基板を開発した[1]。2 光子励起重合法を用いて、屈折率の高いハイドロゲルを、直接基板となるカバーガラスから林立させた新規培養基板は、塩濃度の培養液中でも透明で、高い屈折率を有していた(図 3-51)。また、この培養基板上において細胞の培養も可能であり、ポスト先端に細胞が接着することが分かった[1]。

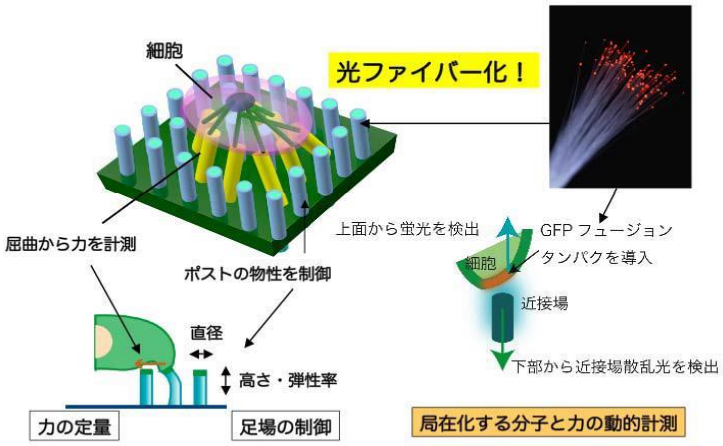


図 3-51　新規ハイドロゲル基板の作成[1]

(左)ハイドロゲルを光ファイバのように直接ガラス板に林立させた基板の形状。(右)ポスト一つ一つを光源とした、接着点のみの蛍光分子局在を示す。

(ⅱ)微細加工培養基板を用いた細胞の力計測と局在分子の観察

作製したポストの形状と弾性率を原子間力顕微鏡にて計測し、理論値による力を算出した[2]。ポスト先端の変位について画像解析により力を計測し、自動処理するプログラムを作

製し、リアルタイムの細胞の力の動的変動を計測することが可能になった。また、この培養基板を光ファイバのような光源として使用できることも確認された。

(iii)蛍光タンパク質導入の検討

イメージングのための蛍光タンパク質付加分子を細胞に導入し、過剰発現させることにより分子複合体の形成・解離のキネチクスへの影響を検討した。その結果、接着点局在分子であるvinculine、focal adhesion kinase、talinは分子複合体形成のキネチクスに影響を与えた[3]。また、paxillin、zyxinのように発現量の大小に対して、キネチクスに大きな影響を与えないアダプタータンパク質が存在することも明らかになった。このような分子を複合体マーカーとして力の同時計測が可能であると考えられた[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内

[1] Yamaki K., Harada I., Goto M., Cho C.S., Akaike T. “Regulation of cellular morphology using temperature-responsive hydrogel for integrin-mediated mechanical force stimulation”, Biomaterials, 2009, 30(7), 1421-1427.

[2] Watanabe-Nakayama T., Machida S.I., Harada I., Sekiguchi H., Afrin R., Ikai A. “Direct detection of cellular adaptation to local cyclic stretching at the single cell level by atomic force microscopy”, Biophysical Journal, 2011, 100(3), 564-572.

[3] Yamashita H., Ichikawa T., Matsuyama D., Kimura Y., Ueda K., Craig S.W., Harada I., Kioka N. “The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin α in sensing the stiffness of the extracellular matrix”, Journal of Cell Science, 2014, 127(9), 1875-1886.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も、引き続き細胞の挙動解析を目的とした実験に用いる培養基板等の開発に重点を置いた研究が行われた。科研費挑戦的萌芽研究「細胞認識性マイクロ粒子を用いた局所刺激法による細胞間情報伝達機構の動的挙動解析」(2010年度～2011年度)では細胞の集団的挙動を扱い、科研費基盤研究(C)「細胞と細胞外マトリクスとの動的な力学相互作モデルと組織硬化を伴う疾患のメカニズム」(2012年度～2014年度)では、組織硬化に伴うメカノトランスダクション等の疾患メカニズム解明に向けた研究が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)細胞の集団的挙動解析法の確立と評価

細胞集団中に生じた局所的な刺激に対する細胞の集団的挙動を解析する方法が検討され

た。固化により膨潤するコラーゲン固定化 poly-N-isopropylacrylamide(PNIPAAm)を刺激側とし、膨潤しないコラーゲン固定化 polyacrylamide(PAAm)を非刺激側として、細胞シートに局部的な機械的伸長を引き起こすことができる複合ハイドロゲル基質が作成された(図3-52)[1]。これに Mardin-Darby イヌ腎臓(MDCK)細胞を付着させると、PNIPAAm 側の細胞シートだけが機械的に伸長し、付着した細胞の面積が増加し、高さが平らになり、細胞-細胞接着間の E-カドヘリンの局在化が不均質になった[1]。また、細胞シートへの機械的刺激における extracellular signal-regulated kinase(ERK:細胞外シグナル制御キナーゼ)のリン酸化を測定したところ、PNIPAAm 側の細胞における ERK リン酸化は、機械的刺激が存在しない PAAm ゲル側の細胞に伝播することが確認された[1]。以上の結果から、細胞シートの部分的な伸長による機械的張力が、細胞シグナル伝達の活性化をもたらすことが示された[1]。

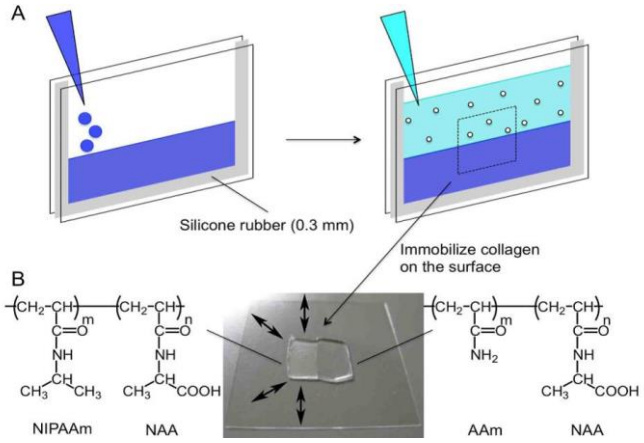


図 3-52　複合ハイドロゲル基質の作成[1]

A：複合ハイドロゲル基質の作成方法。2 枚のガラス板間隙に PAAm(青)を流し込み、その上部に PNIPAAm(水色)を流し込み、固化後に切り取って表面にコラーゲンを固定化させる。B：切り取ったゲルで、PNIPAAm 側(左側)が膨潤する様子を示している。

(ⅱ)長期的な培養に耐える培養基板の作成・評価と用途

がんなどの組織硬化を伴う疾患で見られる周辺環境の物質変化に対する細胞の長期にわたる機能変化(メカノトランスダクション)を解析するために、長期的な培養に耐え得る新しい培養基板ゲル N-acryloyl-6-aminocaproic acid(ACA)が開発された。その結果、従来品[115]と比較して、表面に固定化された細胞外マトリックスは安定的かつ均一で、より柔らかいことから細胞の力による細胞外マトリックスの引きはがれもないことが分かった[2]。

②社会・経済への波及効果

細胞に加わる伸展や圧迫などのメカニカルストレスが生化学的、遺伝学的反応へと変換

[115] sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate (sulfo-SAMPAH)

されるメカノトランスダクションのメカニズムを解明することにより、発生学や幹細胞からの特定組織の構築などを目指した再生医療、細胞治療などの医療分野、また、スポーツ科学における効果的なリハビリテーションなど、幅広い領域での応用が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Harada I., Yanagisawa S., Iwasaki K., Cho C.S., Akaike T. “Local mechanical stimulation of mardin-darby canine kidney cell sheets on temperature-responsive hydrogel”, International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(1), 1095-1108.

[2] Yip A.K., Iwasaki K., Ursekar C., MacHiyama H., Saxena M., Chen H., Harada I., Chiam K.-H., Sawada Y. “Cellular response to substrate rigidity is governed by either stress or strain”, Biophysical Journal, 2013, 104(1), 19-29.

3.2.8　花粉管ガイダンスの動的システムの解明(東山哲也)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

花粉管ガイダンスは、植物の生殖や穀物生産を支える重要な機構である(図 3-53)。そのシステムの理解は、植物の生殖機能のデザインのみならず、化学屈性の理解や、ナノマシンへの応用など、様々な貢献が期待できる。本研究では、これまで世界をリードして進めてきた花粉管ガイダンスの研究、花粉管誘引物質の同定を基盤に、花粉管ガイダンスを生命システムとして解明することを目指した。

②期間中の研究成果

本研究領域では、長年の謎とされてきた花粉管誘引シグナルの実態が解明され、複数のペプチドがカクテルとなって花粉管に位置情報を与えているという仕組みが明らかにされた。さらに、その誘引物質の挙動を直接可視化することが可能となり、花粉管ガイダンスの動的システムとしての理解が大きく進展した。

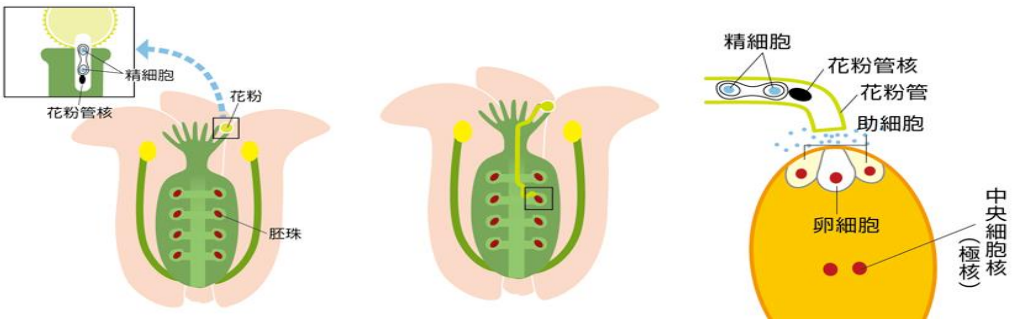


図 3-53　植物の生殖と花粉管ガイダンス[116]

(左)花粉が柱頭に付着すると、花粉管が胚珠の方に伸びていく。雄原細胞が分裂して 2 個になった精細胞が胚珠に向かって移動する。

(中央)花粉管核は卵装置に到達し消滅する。花柱を通った花粉管のみ、卵装置に入る。

(右)精細胞の一つは卵細胞と、一つは中央細胞と受精し胚乳になる(重複受精)。

(ⅰ)花粉管ガイダンス分子の発見

本研究では、これまで不明だった花粉管の誘引物質が確かに存在すると同時に、助細胞[117]で特異的かつ多量に作られ分泌される小ペプチドであることが見いだされた[1]。また、卵細

[116] at home 教授対談シリーズ　こだわりアカデミー
https://www.athome-academy.jp/archive/biology/0000001045_all.html
[117] 植物の卵細胞の脇にある二つの細胞。誘引物質を分泌し花粉管を胚珠へ導く。

胞の隣にある二つの助細胞から分泌されていることが突き止められ、トレニアの助細胞の expressed sequence tag(EST)解析では、全体の EST の 24%を、分泌性でシステインに富む低分子量ペプチド(cysteine-rich peptides:CRPs)が占めることが明らかになった。さらにその構造を調べた結果、アミノ酸残基 48 個から成る 2 種のペプチドが見出され、LURE1 と LURE2 と名付けられた[1]。これは diffensin というヒトや昆虫にも存在する抗菌ペプチドと類似するペプチドであった。LURE は、一つの植物に多数の種類が存在し、そのカクテルが正確に同種の花粉管をガイドすることが明らかになった[1]。また、培養実験系では、僅か 1000 個程度の LURE 分子を置くだけで、花粉管を誘引できることも明らかになり、花粉管の精密な応答能力が示唆された[1]。

(ⅱ)花粉管誘引ペプチド、LURE の視覚化

Alexa Fluor488 蛍光色素と結合させることによって、LURE ペプチドの誘引活性を阻害することなく、直接視覚化を可能にする方法が開発された[2]。これにより誘引物質が正確な誘引シグナルを形成する仕組みの研究を可能にする基盤が作られた[2]。

(ⅲ)受精における精子細胞の動態と機能

トレニアでの LURE の発見を基盤に、シロイヌナズナや近縁種などで誘引物質が同定され、普遍的に LURE に類似したペプチドが誘引物質として働いていることが示された[3]。以上の成果から、卵装置への花粉管ガイダンスにおける誘引シグナルの実態が解明された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Okuda S., Tsutsui H., Shiina K., Sprunck S., Takeuchi H., Yui R., Kasahara R.D., Hamamura Y., Mizukami A., Susaki D., Kawano N., Sakakibara T., Namiki S., Itoh K., Otsuka K., Matsuzaki M., Nozaki H., Kuroiwa T., Nakano A., Kanaoka M.M., Dresselhaus T., Sasaki N., Higashiyama T. “Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells”, Nature, 2009, 458(7236), 357-361.

[2] Goto H., Okuda S., Mizukami A., Mori H., Sasaki N., Kurihara D., Higashiyama T. “Chemical visualization of an attractant peptide, LURE”, Plant and Cell Physiology, 2011, 52(1), 49-58.

[3] Hamamura Y., Saito C., Awai C., Kurihara D., Miyawaki A., Nakagawa T., Kanaoka M.M., Sasaki N., Nakano A., Berger F., Higashiyama T. “Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in Arabidopsis thaliana”, Current Biology, 2011, 21(6), 497-502.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域と並行して科研費特定領域研究「花粉管ガイダンスと重複受精におけるゲノム障壁の鍵因子」(2006 年度～2010 年度)、科研費基盤研究(B)「レーザーインジェクションによる標的真核細胞およびオルガネラの遺伝子発現制御」(2007 年度～2010 年度)及び国際交流事業「植物生殖隔離のライブセル解析」(2009 年度～2010 年度)では花粉管誘引物質の同定を中心に受精の動的解明についての研究や研究手法の開発が行われた。

本研究領域終了後は、戦略的創造研究推進事業(ERATO)「東山ライブホロニクスプロジェクト」(2010 年度～2016 年度)では、植物をモデルとした配偶体形成や初期発生等の様々な発生現象や、受粉時の動的で複雑な細胞間シグナリングなど、ホロニックコミュニケーションが関わる現象の解明を目指し、光技術、工学技術、及びシングルセルオミクスの 3 グループが設置され、技術を重視した研究が展開された。

科研費特別研究員奨励費「新規生理活性糖 AMOR の受容体同定による植物糖鎖シグナリング研究の展開」(2015 年度～2017 年度)では、植物の受精を促進する生理活性物質に関する研究が行われた。

科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「植物新種誕生の原理-生殖過程の鍵と鍵穴の分子実態解明を通じて-」(2016 年度～2020 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「植物新種誕生の原理 -国際的研究中心形成に向けた国際活動支援センター-」(2016 年度～2020 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「受精における種間障壁のメカニズム解明とその打破」(2016 年度～2020 年度)では、異種植物種の交雑と誕生した新植物の存続に関する研究が行われ、これらは現在も継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)シロイヌナズナの花粉管ガイダンス分子 AtLURE1 の発見

モデル植物のシロイヌナズナ(A.Thaliana)とその近縁種 A.lyrata との間で、複数の重複 DEFL 遺伝子群の比較が行われた結果、これらの diffensin 様ペプチド DEFL(cysteine-rich peptide [CRP810_1])がシロイヌナズナの花粉管誘引性ペプチドとして同定され、AtLURE1 と命名された[1]。AtLURE1 ペプチドは、助細胞で特異的に発現され、花粉管が伸長して雌性配偶体に達し分泌される。その発現を低下させると花粉管誘導が損なわれることが明らかになった[1]。また、単一の AtLURE1 遺伝子を別の植物トレニアへ導入して異種発現させると、誘引された花粉管の全てが、正常な受精時と同様にトレニアの胚嚢に達したことから、AtLURE1 は、生物間の大きな進化距離にもかかわらず、花粉管の誘導における生殖隔離障壁を打破できることが明らかとなった[1]。

(ⅱ)花粉管に受精能獲得を促す母体因子 AMOR の同定

花粉管の誘引シグナルに対する応答能力が、胚珠から誘導された拡散性因子により花粉管に付与されることを発見し、この胚珠由来分子をアラビノガラクタン多糖類と同定した

[2]。この分子の 4-O メチルグルクロノシル残基が活性に必要であり、化学合成により 2 糖構造のメチルグルクロノシルガラクトース(4-Me-GlcA-β-(1→6)-Gal)が AMOR 活性を示すことが示された[2]。植物の細胞間の情報伝達における特異性を持った 2 糖構造の関与はこれまで知られていない発見であった。

(iii)ライブイメージングによる重複受精機構の解明

重複受精による素早い種子形成は、乾燥条件下に短時間で子孫を種子として残す仕組みだが、そのメカニズムは明らかになっていなかった。そこで、ライブイメージング手法を用いてシロイヌナズナの重複受精機構の解析が行われた結果、二つの精細胞が花粉管から放出され、受精のポイントに運ばれ、卵細胞と中央細胞と重複受精していくことが明らかになった(図 3-54)[3]。さらに、いずれの精細胞も卵細胞と中央細胞に同等に受精することが明らかになり、花粉管内での前後の位置によって受精の相手が決まるわけではないことが示唆された[3]。

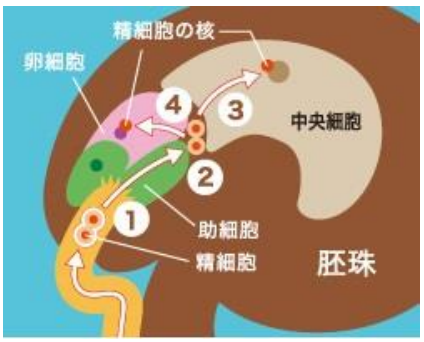


図 3-54　重複受精[118]

①花粉管が破裂し精細胞が放出。②9 秒後、精細胞が細胞の隙間にとどまる。③7 分後、一方の精細胞が中央細胞と受精。④10 分後、残された精細胞が卵細胞と受精する。③と④の順序は入れ替わることがある。

(iv)細胞融合による残存助細胞の排除機構

植物の受精において卵細胞と中央細胞がそれぞれ受精する重複受精の詳細なメカニズムはこれまで明らかではなかったが、花粉管が一つの助細胞に到達し、二つの精細胞が放出されると、一つの精細胞は卵細胞と受精して胚を作り、もう一つは中央細胞と受精して胚乳を作り始める。この時、助細胞と胚乳が融合して互いの中身が混じり合う様子がレーザー顕微鏡で観察された。また、胚乳の核分裂増殖していく過程で、残ったもう一方の助細胞の核が分解していく様子が観察された。これらの発見により、受精の過程とそれに伴う細胞融合により助細胞が機能を失う詳細なメカニズムが明らかになった[4]。

[118] 生命誌ジャーナル 被子植物の繁栄を支える重複受精の瞬間を見る
http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/071/research_2.html

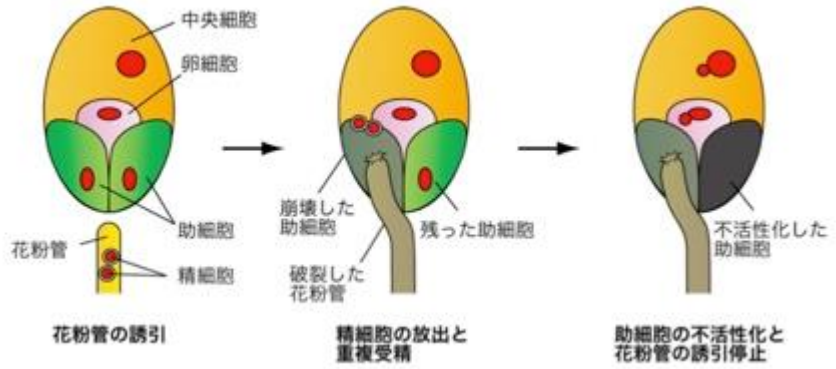


図 3-55　細胞融合による残存助細胞の排除機構[119]

花粉管が胚珠にたどり着くと(左)、一方の助細胞が破壊され、同時に内部の二つの精細胞を放出する(中央)。精細胞の一つは卵細胞と受精して「胚」を作り、他方は中央細胞と受精し、「胚乳」を作る。この重複受精後、生き残った方の助細胞は素早く不活性化される(右)。

②社会・経済への波及効果

植物の生殖に関する研究は、激変する地球環境の下で、安定的で持続可能な食糧供給という観点から極めて重要であり、基礎研究でありながら、その成果は様々な研究開発に波及する可能性を持っている。本研究課題や ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」では、イメージング技術の開発により顕微鏡下で重複受精の様子を観察し、解析する技術が開発された。これらの技術については植物透明化試薬 ClearSee®が富士フイルム和光純薬(株)から販売され、生理活性物質 AMOR が東京化成工業(株)から販売されている。また、ゲノム編集ベクター「KAMA-ITACHI」が米国の AddGene から、アカデミックユースに配布されている。

アウトリーチ活動としては、International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium、テクニカルワークショップが開催され、日本の植物研究が世界の研究者に向け発信された。また東山は International Association of Sexual Plant Reproduction Research の President に選出された。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Takeuchi H., Higashiyama T. “A Species-Specific Cluster of Defensin-Like Genes Encodes Diffusible Pollen Tube Attractants in Arabidopsis”, PLoS Biology, 2012, 10(12), e1001449.

[2] Mizukami A.G., Inatsugi R., Jiao J., Kotake T., Kuwata K., Ootani K., Okuda S., Sankaranarayanan S., Sato Y., Maruyama D., Iwai H., Garénaux E., Sato C., Kitajima K., Tsumuraya Y., Mori H., Yamaguchi J., Itami K., Sasaki N., Higashiyama T. “The AMOR Arabinogalactan Sugar Chain Induces Pollen-Tube

[119] http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/2015/04/Maruyama-CellFusion.php

Competency to Respond to Ovular Guidance”, Current Biology, 2016, 26(8), 1091-1097.

[3] Hamamura Y., Nagahara S., Higashiyama T. “Double fertilization on the move”, Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15(1), 70-77.

[4] Maruyama D., Völz R., Takeuchi H., Mori T., Igawa T., Kurihara D., Kawashima T., Ueda M., Ito M., Umeda M., Nishikawa S.I., Groß-Hardt R., Higashiyama T. “Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism”, Cell, 2015, 161(4), 907-918.

④その他

東山は井上学術賞(2018 年)、木原記念財団学術賞(2017 年)、文部科学省科学技術・学術政策研究所の「科学技術への顕著な貢献 2014(ナイスステップな研究者)」(2014 年)及び「読売テクノ・フォーラム第 20 回ゴールドメダル賞」(2014 年)を受賞した。

3.2.9　シナプス強度を決定する基本原理の解明(深田優子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

脳が高次脳機能を発揮するためには、シナプスが刺激に応答し変化する柔軟性が重要である。脳内の AMPA 型グルタミン酸受容体は、その活性(質)とシナプス発現(量)の制御によりシナプス強度[120]を規定している。本研究では、AMPA 受容体機能を特異的に促進するリガンド LGI1 と受容体 ADAM22 に焦点を当て、AMPA 受容体の制御機構を明らかにすることにより、シナプス強度を決定する基本原理を解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)LGI1 遺伝子欠損マウスの表現型解析

leucine-rich glioma-inactivated 1(LGI1)の作用機構を解明するため、LGI1 遺伝子欠損マウスが作成された[1]。その結果、ホモ接合型マウスでは生後 2〜3 週間に致死性のてんかん発作を呈し、このてんかん表現型は LGI1 遺伝子の神経細胞特異的発現により完全にレスキューされた[1]。一方、disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22(ADAM22)への結合活性がない LGI3(LGI1 ファミリー)遺伝子の発現では、レスキューされなかったことから、このてんかん表現型が LGI1 単一遺伝子の欠失によることが示唆された[1]。

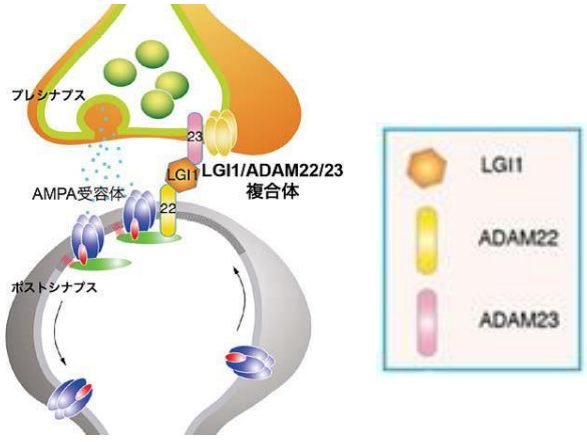


図 3-56　LGI1/ADAM22/ADAM23 複合体[121]

LGI1 はシナプスにおいて ADAM22、ADAM23 と複合体を形成し、シナプス伝達を制御する。この複合体が形成されないと、てんかんが発症する。

---

[120] シナプスにおける情報伝達の効率

[121] 生理学研究所　プレスリリース
http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2010/01/mdashmdash.html

(ⅱ)LGI1 の作用機構と個体レベルでの生理機能

LGI1 の脳内での生理機能を解析するため、LGI1 の脳内作用点が探索された[1]。その結果、ADAM22 とその類縁タンパク質 ADAM23 が LGI1 の脳内の主要な作用点(受容体)であり、ADAM22 と ADAM23 は LGI1 を介して一つの複合体として存在することが明らかになった(図 3-56)[1]。さらに、電気生理学実験で LGI1 欠失マウスでは AMPA 受容体を介したシナプス伝達の低下が認められたことから、LGI1、ADAM22、ADAM23 複合体は脳の興奮性を制御し、正常脳ではてんかん発生を抑制する「抗てんかん原性」複合体として機能していることが示唆された[1]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Fukata Y., Lovero K.L., Iwanaga T., Watanabe A., Yokoi N., Tabuchi K., Shigemoto R., Nicoll R.A., Fukata M. “Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(8), 3799-3804.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後もてんかんに関与するシナプス分子の解析が行われた。科研費若手研究(A)「新規シナプス修飾分子 LGI ファミリーの生理機能の解明」(2009 年度～2011 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「遺伝性側頭葉てんかんのシナプス病態、神経回路病態の解明」(2011 年度～2012 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「遺伝性側頭葉てんかんのシナプスおよび神経回路病態の解明」(2013 年度～2014 年度)では、LGI の詳細な機能解析が行われた。

武田科学振興財団医学系研究奨励「てんかん病態の解明と新たな治療戦略の開発」(2014 年度)では、てんかんの創薬を目指す研究が行われた。

科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「超解像で可視化するシナプスナノドメインに着目した精神病態表現型解析」(2015 年度～2016 年度)では、免疫介在性脳炎におけるシナプス変容の新しい評価法確立と創薬を目指す研究が行われた。科研費基盤研究(B)「AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス捕捉機構の解明」(2015 年度～2017 年度)では、AMPA 型グルタミン酸受容体や LGI 複合体の足場となる PSD-95 の制御機構に関する研究が現在も継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)LGI1 に対する自己抗体による後天的な辺縁系脳炎性てんかんの発症

記憶障害やけいれんを起こす辺縁系脳炎の患者血清中に抗 LGI1 自己抗体が存在する[122]という報告に基づき、国内の 145 名の辺縁系脳炎を含む自己免疫性神経疾患の患者血清が網羅的に解析された[1]。その結果、抗 LGI1 自己抗体を高値かつ単独で有するほぼ全ての患者が辺縁系脳炎と診断されていたことが明らかになった[1]。さらに、抗 LGI1 自己抗体が LGI1 と受容体 ADAM22 との結合を阻害することにより、脳内の興奮性シナプス伝達の大部分を担う AMPA 受容体機能が低下することが明らかになった(図 3-57)[1]。以上により、抗 LGI1 自己抗体による後天的な AMPA 受容体機能制御の破綻は、辺縁系脳炎の記憶障害やてんかん症状を引き起こすことが示唆された[1]。

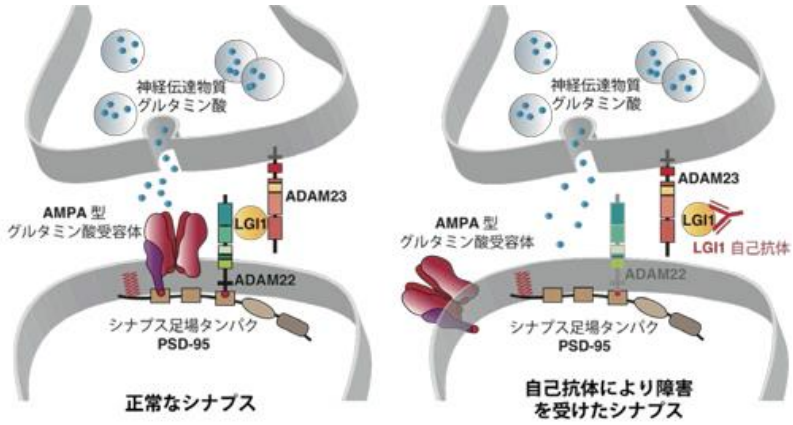


図 3-57　LGI1 自己抗体は LGI1 と ADAM22/23 との結合を阻害する[123]

LGI1 の機能が自己抗体により後天的に阻害されると、シナプスの AMPA 型グルタミン酸受容体機能が低下し無秩序なシナプス伝達が生じ、けいれん発作を伴うてんかん病態や記憶障害が生じると考えられる。

(ⅱ)ケミカルシャペロンによる分泌不全型 LGI1 異常構造の修復

報告されている家族性の LGI1 遺伝子変異のうち、22 種類がミスセンス変異であり、そのうち幾つかの変異は LGI1 の分泌を阻害することが知られていることから、22 種類のミスセンス変異体を細胞に発現させ、細胞からの分泌の有無を評価した。その結果、19 種類が分泌不全型、3 種類が分泌型であることが明らかになった[2]。2 種類の変異マウスを解析した結果、グルタミン酸 383 が変異した分泌不全型 LGI1 変異体は、構造異常のため小胞体にとどまり、最終的には分解されることが明らかになった(図 3-58)[2]。一方、セリン 473 が変異した分泌型 LGI1 変異体は分泌されるものの、異常な二量体を形成し、ADAM22 との結合能を欠損していることが明らかになった(図 3-58)[2]。これらの結果より、シナプスにおける

[122] Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J. “Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series”, Lancet Neurol., 2010, Aug;9(8), 776-85.
[123] 生理学研究所　プレスリリース　http://www.nips.ac.jp/release/2013/11/_lgi1.html

LGI1-ADAM22 複合体の減少が、てんかんを引き起こすことが示唆された[2]。

一方、タンパク質の構造異常を原因とする疾患の一つである嚢胞性線維症の治療戦略として着目されているケミカルシャペロン[124]、4-フェニル酪酸についてその作用が検討された[2]。その結果、in vitro で 4-フェニル酪酸により分泌不全型 LGI1 の分泌が誘導され、分泌された分泌不全型 LGI1 は、ADAM22 との結合能を持つことも確認された(図 3-58)[2]。さらに、てんかんモデルマウスでは、4-フェニル酪酸により自発的なけいれんの発症時期が遅れ、寿命が有意に延長したことから、その有効性が確認された(図 3-58)[2]。

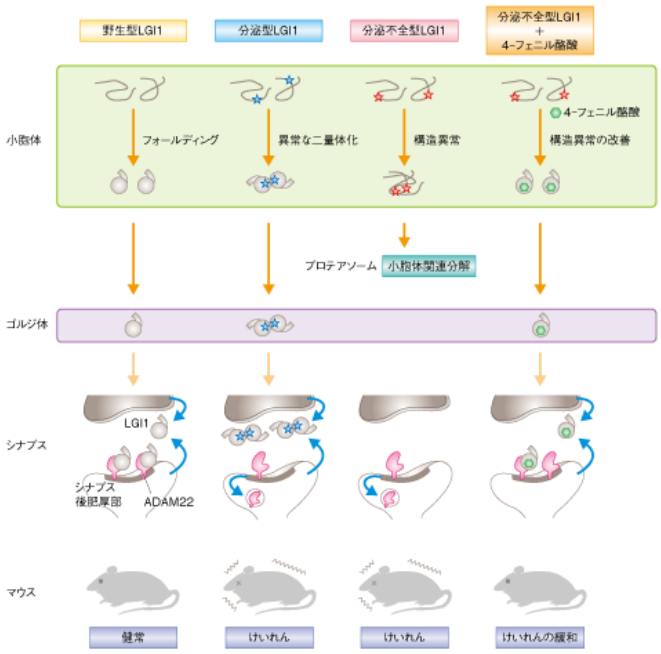


図 3-58　LGI1 変異体を発現するてんかんモデルマウスにおける表現型[125]

LGI1 の分泌型変異体は受容体 ADAM22 への結合能が低下する。分泌不全型変異体は構造異常を起こすが、4-フェニル酪酸はその構造異常を修復する。

(iii)ポストシナプスナノドメインの発見と脱パルミトイル化酵素 ABHD17 の同定

LGI1-ADAM22 複合体や AMPA 型受容体は、Postsynaptic density-95(PSD-95)を足場として形成される。これまでに、PSD-95 がシナプス膜に局在するためには、パルミチン酸が PSD-95 に付加される必要があることが明らかになっている(図 3-59)。超解像顕微鏡観察により、パルミトイル化 PSD-95 はシナプスにおいて、ナノドメイン構造を形成しており、これがポストシナプスの特殊膜領域 PSD(後シナプス肥厚部)の構成単位であることが明らかにされた[3]。ナノドメイン局所でパルミトイル化サイクルが持続的に回転することが、ナノドメイン形成に必須であることが示された[3]。PSD-95 パルミトイル化酵素は DHHC(Asp-His-His-

[124] タンパク質高次構造の形成や安定化にかかわる低分子化合物の総称
[125] ライフサイエンス 新着論文レビュー　http://archive.fo/yxiHk

Cys ドメインから命名)であることが知られていたが、一方、同定されていなかった脱パルミトイル化酵素を探索した結果、PSD-95 を脱パルミトイル化する活性を持つα/β-hydrolase domain-containing proteins17(ABHD17)酵素が見出された[4]。ABHD17 を海馬培養神経細胞に過剰発現させると、パルミトイル化された PSD-95 の量が大幅に減少し、AMPA 受容体のシナプス局在が激減したことから、ABHD17 が PSD-95 脱パルミトイル化酵素であることが明らかになった(図 3-59)[4]。

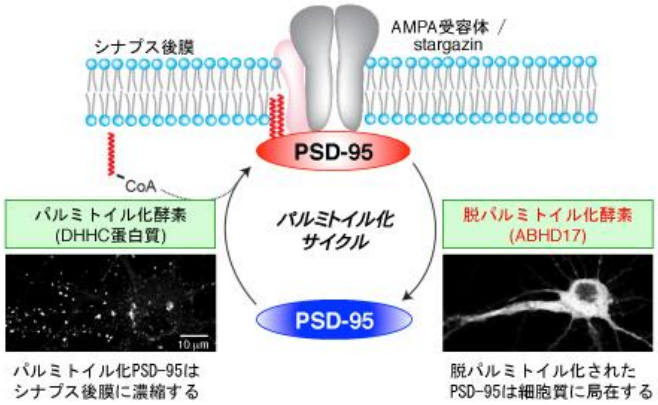


図 3-59　パルミトイル化サイクル[126]

PSD-95 は DHHC 酵素でパルミトイル化されると細胞膜に結合し、ABHD17 酵素で脱パルミトイル化されると細胞膜から解離する。

②社会・経済への波及効果

脳炎･脳症では、後遺症を防ぐためには早期の診断と治療が重要であるが、本研究において LGI1 に対する自己抗体は、後天的に辺縁系脳炎性のてんかんを引き起こすことが明らかになったことや、LGI1 の欠損による作用などは、脳炎･脳症あるいはてんかんの病態の理解を進めたと同時に治療・診断手法の開発への応用が期待される。また、ケミカルシャペロンによる分泌不全型 LGI1 異常構造の修復の研究は、LGI1 とその受容体 ADAM22 を標的とする新規の抗てんかん薬の開発につながることが期待される。

この成果は、2013 年に QLifePro 医療ニュース「生理学研究所　自己免疫性辺縁系脳炎の病態を解明　LGI1 自己抗体が辺縁系脳炎を引き起こす可能性」で報道された。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Ohkawa T., Fukata Y., Yamasaki M., Miyazaki T., Yokoi N., Takashima H., Watanabe M., Watanabe O., Fukata M. “Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors”, Journal of Neuroscience, 2013, 33(46), 18161-18174.

[126] 生理学研究所　研究報告　http://www.nips.ac.jp/release/2016/06/psd-95.html

[2] Yokoi N., Fukata Y., Kase D., Miyazaki T., Jaegle M., Ohkawa T., Takahashi N., Iwanari H., Mochizuki Y., Hamakubo T., Imoto K., Meijer D., Watanabe M., Fukata M. “Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy”, Nature Medicine, 2015, 21(1), 19-26.

[3] Fukata Y., Dimitrov A., Boncompain G., Vielemeyer O., Perez F., Fukata M. “Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains”, J Cell Biol, 2013, 202(1), 145-161.

[4] Yokoi N., Fukata Y., Sekiya A., Murakami T., Kobayashi K., Fukata M. “Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes”, Journal of Neuroscience, 2016, 36(24), 6431-6444.

3.2.10　脳細胞光制御を用いた神経グリア相互作用の解明(松井広)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

脳には、神経細胞間の情報伝達とともに、グリア細胞が関与する複雑なネットワークがあることが明らかになってきた。本研究では、神経細胞及びグリア細胞の活動を光で選択的に制御する方法を開発し、両細胞間の相互作用のメカニズム及びグリア細胞の役割を解明することを目指した。

②期間中の研究成果

これまでに神経組織のグリア細胞の突起を二光子イメージング法で観察することにより、その形態が変化し、神経細胞からのグルタミン酸放出によりグリア細胞が活性化されることが見出されており、また、このグルタミン酸を介したグリア細胞の形態の制御が、電気生理学的実験で示されていた[127]。一方、グリア細胞から神経細胞へ向かう信号伝達については適当な手段がなく、そのメカニズムを明らかにするための新たな手法が開発された。

(ⅰ)細胞種特異的な光受容体チャネルロドプシン-2(ChR2)の大量発現法の開発

神経細胞やグリア細胞を選択的に活性化する手段として、オプトジェネティクス技術を用い、細胞種特異的に光受容体 ChR2 を大量発現する方法が開発された(KENGE-tet system)。

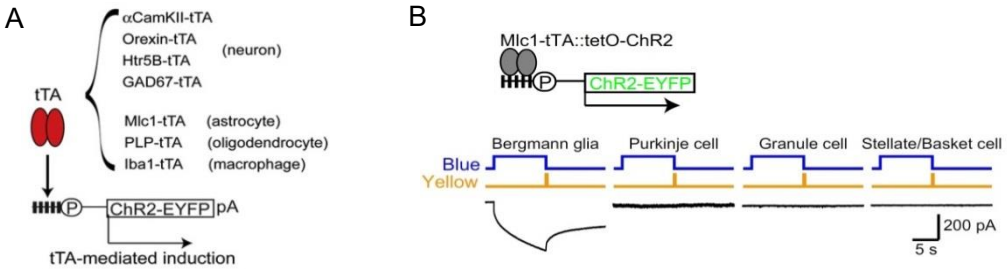


図 3-60　KENGE-tet system による ChR2 発現機構と光刺激時の膜電流[1],[2]

A は、転写因子 tTA (テトラサイクリン制御転写活性化因子) が ChR2 と EYFP の融合タンパク質を発現する機構の模式図である。αCamKⅡ、Orexin、Htr5B、GAD67 は神経特異的プロモーター、Mlc1、PLP、Iba1 はグリア特異的プロモーターで、これらが tTA の発現を駆動する。B は、バーグマングリア細胞(アストロサイト)特異的プロモーター(Mlc1)の駆動で ChR2 を発現させたマウスの膜電流で、青線が青色光、黄色線が黄色光の刺激を示す。黒線は膜電流で、Bergmann グリアのみでシグナルが検出され、Purkinje 細胞(神経)、

[127] 深澤有吾, 足澤悦子, 松井 広, 重本隆一 (2008) グルタミン酸受容体のシナプス内分布とその生理的意義. 蛋白質核酸酵素, 53, 435-441.

granule 細胞(神経)、Satellate 細胞(グリア)では検出されないことを示している。

まず、神経細胞特異的プロモーター下に tetracycline transactivatort(tTA:テトラサイクリン制御転写活性化因子)を発現するマウスと、tTA で活性化される tTA 依存性プロモーターTetracycline operator(tetO)下に Channel rhodopsin 2(ChR2:チャネルロドプシン-2)と enhanced yellow fluorescent protein(EYFP:黄色蛍光タンパク質)の融合たんぱく質を発現するマウスを交配して目的のマウスを得て、これに光刺激を行った(図 3-60 A)[1]。その結果、シナプスにおける神経細胞間の信号伝達効率が変化し、数時間後にはグリア細胞を含むシナプス構造全体が変化し、シナプス伝達の長期可塑性が誘導されることが判明した[1]。

(ⅱ)グリア細胞の選択的な制御法の開発

次に、グリア細胞を選択的に制御するため、アストロサイト特異的に ChR2 を発現するマウスを作製した(図 3-60 A)[1]。このマウスの小脳切片に神経活動を抑制する薬剤を処理して光刺激を与え、神経細胞及びグリア細胞の膜電流を観察したところ(図 3-60 B)[2]アストロサイトだけで青色刺激時に膜電流が確認されたことから、この方法によって神経細胞は刺激されず、直接グリア細胞が光刺激されることが示された[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Tanaka K.F., Matsui K., Sasaki T., Sano H., Sugio S., Fan K., Hen R., Nakai J., Yanagawa Y., Hasuwa H., Okabe M., Deisseroth K., Ikenaka K., Yamanaka A. “Expanding the Repertoire of Optogenetically Targeted Cells with an Enhanced Gene Expression System”, Cell Reports, 2012, 2(2), 397-406.

[2] Sasaki T., Beppu K., Tanaka K.F., Fukazawa Y., Shigemoto R., Matsui K. “Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(50), 20720-20725.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域では、光感受性分子 ChR2 を用いた光操作によりグリア細胞特異的に刺激を与える手法が開発され、本研究領域終了後は、この技術を利用した神経・グリアの分子基盤研究や新たな光操作マウス系統が確立され、脳虚血等の脳障害の医学研究に展開している。

光操作法を用いた研究には、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「光操作法による初期視覚回路特性の抽出と書き換えに伴う構造変化の解析」(2011 年度～2012 年度)、科研費若手研究(A)「グリアの発する信号が神経活動・行動に及ぼす影響を探る」(2013 年度～2016

年度)が挙げられ、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「光操作技術を用いた記憶定着におけるアストロサイトの役割の解明」(2016 年度～2017 年度)は現在継続中である。

また、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「低侵襲生体内グリア活動の可視化による神経からグリアへの信号伝達経路の解析」(2013 年度～2014 年度)では、イメージングが可能な新規のマウス系統の確立とそれを用いた研究が行われた。

さらに、東レ科学振興会東レ科学技術研究助成「刺激惹起性抗てんかん回路の獲得と制御」(2016 年度)を始めとして、武田科学振興財団、内藤記念科学振興財団、光科学技術研究振興財団、上原記念生命科学財団、興和生命科学振興財団等、多数の民間団体からの助成金を受けている。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)光操作マウスにおける in vivo でのグリア細胞からのグルタミン酸放出

本研究領域期間中に開発した光操作マウスを用い、in vivo で、グリア細胞の活性化が神経に与える影響が調べられた。グリア細胞特異的に ChR2 を発現するマウスの頭蓋骨越しに光で刺激し、神経活動依存的に発現上昇する c-fos の in situ ハイブリダイゼーションと膜電流測定によりグルタミン酸受容体阻害剤処理後の神経活動を観察した。その結果、グリア細胞の刺激による神経活動の上昇と、グルタミン酸のグリア細胞からの放出が確認された[128]。

さらに、グリア細胞からのグルタミン酸放出がシナプス伝達に与える影響を調べるため、プルキニエ細胞で興奮性シナプス後電流が測定された。その結果、小脳平行線維-プルキニエ細胞間のシナプス伝達が長期的に抑制されたことから、グリア細胞への光刺激でシナプス可塑性が誘導されることが明らかになった[1]。

次にグリア細胞への光刺激が生体マウスの行動や学習に影響を与えるがどうかを検討するため、水平視眼球運動(horizontal optokinetic response:HOKR)学習課題遂行中の ChR2 導入マウスに、頭蓋骨越しに小脳グリア光刺激を送り、眼の動きや瞳孔サイズを赤外線カメラで測定した(図 3-61 A)[128]。

水平視機性眼球運動(HOKR)学習は、眼前のチェッカースクリーンを左右に振り、スクリーンを追って眼球を左右に動かす課題を繰り返すことで眼球運動の振幅が増大する現象である。測定の結果、刺激前よりスクリーンをよく追随できるようになったことから、グリア光刺激によって学習を効果的に加速させることができることが示された(図 3-61 B)[128]。今回の実験を通して、光刺激によりグリア細胞の活動を上げると、グルタミン酸が放出され、シナプス可塑性等が誘導されること、さらにマウスの行動や学習に影響することが明らかになった[128]。

---

[128] Sasaki T., Beppu K., Tanaka K.F., Fukazawa Y., Shigemoto R., Matsui K. “Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(50), 20720-20725.

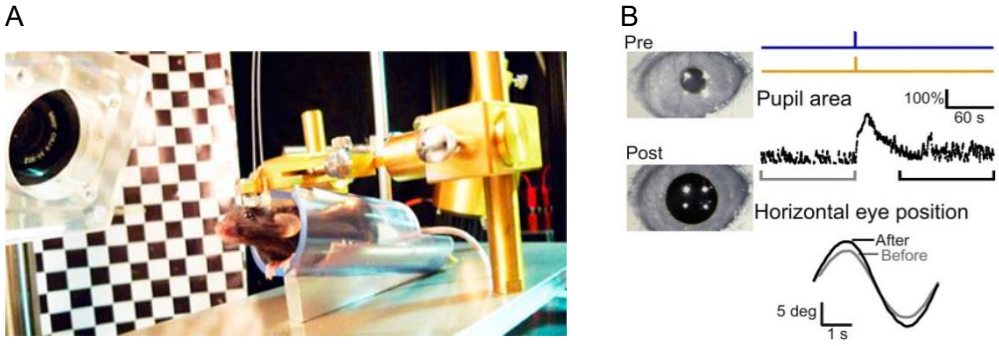


図 3-61　グリア光刺激の HOKR 学習課題への影響 [128]

A は、HOKR 学習課題の写真。B は、HOKR 学習課題の結果で、左側の上の写真はグリア光刺激前、下は刺激後の瞳孔の様子を示す。右側の青線は青色光、黄線は黄色光の照射、右側の中央の線は瞳孔の大きさ、下の曲線は水平方向の眼の位置で黒線は光刺激後、灰色線は刺激前を示す。

(ⅱ)脳虚血時の細胞死誘導メカニズムの解明

脳虚血時には細胞内アシドーシスやグルタミン酸過剰放出により細胞死が誘導されることから、グルタミン酸放出メカニズムや酸性化とグルタミン酸放出の間の因果関係を光操作により調べた。アストロサイト特異的 ChR2 発現マウスで光刺激時の pH とグルタミン酸放出を測定した結果、ChR2 が開くとグリア細胞内に水素イオンが流入し、それが陰イオンチャネルを開く引き金となり、陰イオンのグルタミン酸がイオンチャネルを介して放出されることが示唆された[1]。

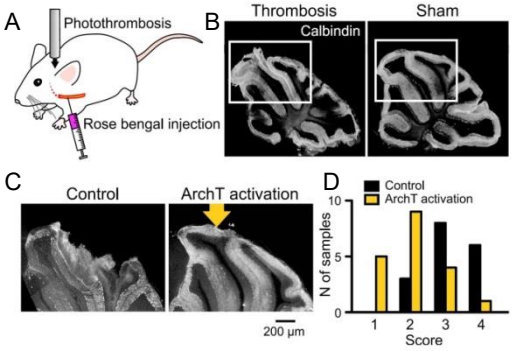


図 3-62　ArchT マウスにおける光刺激の脳虚血への効果[2]

A は、人工的なマウス脳虚血モデル作成を示す。B は、人工的虚血脳の Calbindin 抗体染色で、左は脳虚血マウス、右はコントロールで、四角枠は A の光照射位置を示す。C は、脳虚血マウスに黄色光照射で ArchT 活性化した脳で、左が照射無し、右が照射有りを示す。D は、障害の程度別にサンプルの数を計数したグラフで、横軸は障害の程度(数値が大きいほど重度)、黄色は ArchT 活性化ありで、黒は活性化無しを示す。

次に、黄色光に反応して細胞外へのプロトンをくみ出す Archaeo-rhodopsin-T(ArchT:アーキオロドプシン T)をグリア細胞特異的に発現するマウスが作製され、脳虚血時に細胞内アシドーシスを止めることで脳組織の破壊を止めることができるかが調べられ、光刺激に伴いグルタミン酸の放出が止まることが明らかになった[1]。

次に、このマウスにローズベンガルが投与され、光反応による虚血のモデルが作成された。これに黄色光刺激を与え、グリア細胞の酸性化を抑制した(図 3-62 A)[1]結果、脳組織の破壊が食い止められたことから、脳虚血時にはグリア細胞からの過剰なグルタミン酸放出が脳破壊を起こすことが示された(図 3-62 B～C)[1]。

(ⅲ)アストロサイトの低侵襲 Ca^{2+}イメージングのための遺伝子導入マウスの作製

アストロサイトは、その機能を制御するために局所的な Ca^{2+}シグナルを生成すると考えられている。脳におけるこれらの信号の低侵襲的視覚化は、高い時空間分解能の in vivo イメージングに必要であるため超高感度 Ca^{2+}指示薬 yellow Cameleon-Nano 50 (YC-Nano50)をアストロサイト特異的に発現する遺伝子導入マウスを作製した。その結果、アストロサイトは僅かな Ca^{2+}シグナルに応答し、その信号は神経細胞に伝搬することが示された。このことから、この方法はアストロサイトと神経細胞の活動の高感度検出装置として有用であることが示された[2]。

②社会・経済への波及効果

従来は、神経細胞の働きを調べることが脳研究の中心であった。松井らは、これまで脇役であったグリア細胞に焦点を当て、KENGEtet システムという新しいオプトジェネティックの方法を開発した。これにより、生きたままの状態で細胞の活動を変えることができ、脳科学以外の様々な他の生物学領域や医学分野で広く応用可能で、新薬候補の効果を試す際の網羅的なスクリーニングなどにも利用できると考えられる。また、この光操作法を用い、グリア細胞の酸性化がグルタミン酸の放出と脳虚血に関連し、また、アルカリ性化することにより、グルタミン酸放出が抑制され、虚血時における脳細胞死の進行を緩和するという新たな知見は、脳梗塞などの新たな治療につながるものと期待される。

これらの発見は朝日新聞や日経産業新聞で報道された[129]。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Beppu K., Sasaki T., Tanaka K.F., Yamanaka A., Fukazawa Y., Shigemoto R., Matsui K. “Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage”, Neuron, 2014, 81(2), 314-320.

[129] 東北大学松井広研究室ホームページ、プレスリリース・一般記事等
http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/press.html

[2] Kanemaru K., Sekiya H., Xu M., Satoh K., Kitajima N., Yoshida K., Okubo Y., Sasaki T., Moritoh S., Hasuwa H., Mimura M., Horikawa K., Matsui K., Nagai T., Iino M., Tanaka K.F. “In Vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca^{2+} indicator”, Cell Reports, 2014, 8(1), 311-318.

④その他

松井は、第45回公益財団法人アステラス病態代謝研究会(2014年10月18日)で優秀発表賞を受賞した[130]。

[130] 東北大学松井広研究室ホームページ、業績リスト
http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/papers.html

3.3　2008 年度採択研究課題

3.3.1　植物分裂組織の再生システム(伊藤寿朗)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

植物は、常に幹細胞を維持しており、その成長は幹細胞の増殖と分化のバランスに支えられている。しかし、単一細胞からの再生、分化の制御や細胞間の情報伝達の機構はほとんど明らかにされていない。本研究は、モデル植物シロイヌナズナに関する遺伝学的解析情報、複数の花が同調した発生過程を示すトランスジェニック植物体の生化学的解析及び数理生物学的な手法により、植物分裂組織の維持・再生システムを解明することを目指した。

②期間中の研究成果

植物の幹細胞活性は常に維持されているが、ある一定数の花器官が作られた後、幹細胞活性は抑制される。花のマスター制御因子である AGAMOUS(AG)タンパク質は、生殖器官の分化方向の決定と幹細胞活性の抑制に関わっており、その突然変異体は雄しべ、雌しべが多数のガク片、花弁に置き換えられるというホメオティックな変異を示す[1],[131]。

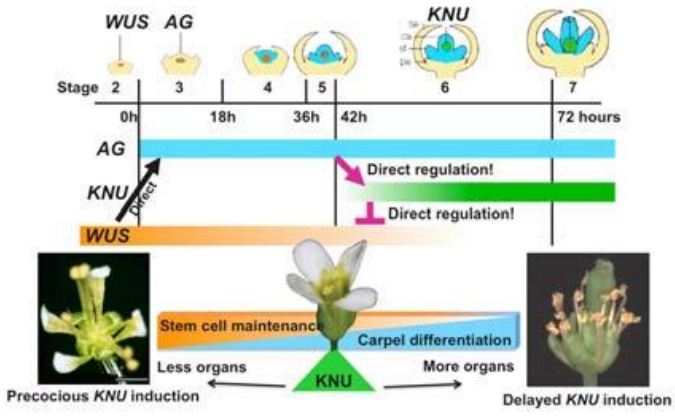


図 3-63　花発生過程での幹細胞の増殖制御に関わる AG, KNU, WUS による転写カスケード[132]
花幹細胞においては、WUS(オレンジ)が AG(水色)を誘導し、今度は AG が KNU(緑)を誘導し、そして KNU が WUS を抑制する一回限りの転写抑制フィードバックループを形成している。KNU 遺伝子が早期に発現すると、幹細胞活性が早期に停止してしまうために花器官の数が減少する(左写真)。逆に KNU 遺伝子の発現のタイミングが遅れるとメリステム(頂端分裂組織)の異常増殖の結果として、花器官の数が増える(右写真)。

---

[131] Ito T. “Coordination of flower development by homeotic master regulators”, Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(1), 53-59.
[132] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 23 年度終了研究課題「植物分裂組織の再生システム」

(ⅰ)AGAMOUS による花幹細胞の制御

AGAMOUS(AG)による幹細胞の増殖と分化のバランスは、花器官の数や大きさに影響を及ぼす[1]が、その下流のカスケードについては明らかになっていなかった。遺伝学的、逆遺伝学的及び生化学的手法により、核タンパク質 NUCKLES(KNU)は AG のターゲット遺伝子であり、幹細胞の決定因子であるホメオボックスタンパク質である WUSCHEL(WUS)の上流の抑制因子として機能し、KNU の発現のタイミングは、幹細胞の増殖と分化のバランスの維持に重要であることが明らかになった(図 3-63)[2]。

(ⅱ)AG による下流遺伝子の時期特異的な制御機構

同時期に誘導される AG の二つのターゲット遺伝子、SPOROCYTELESS(SPL)/(NOZZLE(NZZ)と KNU を見出した。SPL/NZZ は、AG 誘導と同時に転写が始まったが、KNU では 2 日間のタイムラグを必要とし、これらが異なった制御を受けていることが判明した。また、KNU の転写誘導タイミングの制御には、AG 依存的に起きるヒストンのエピジェネティックな変化が重要であることが明らかになった[2],[3]。さらに、ヒストンの修飾変化には細胞周期の進行が必要であり、KNU 発現の誘導は、ヒストン修飾の確立と維持に関わる Polycomb repressive complex(PRC)の因子と AG との KNU プロモーターへの競合的な結合により制御されているという知見を得た[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Das P., Ito T., Wellmer F., Vernoux T., Dedieu A., Traas J., Meyerowitz E.M. “Floral stem cell termination involves the direct regulation of AGAMOUS by PERIANTHIA”, Development, 2009, 136(10), 1605-1611.

[2] Sun B., Xu Y., Ng K.H., Ito T. “A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem”, Genes and Development, 2009, 23(15), 1791-1804.

[3] Ito T., Sun B. “Epigenetic regulation of developmental timing in floral stem cells”, Epigenetics, 2009, 4(8), 564-567.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

伊藤は、本研究領域期間中、シンガポール国立大学テマセックライフサイエンス研究所に在籍しており、そこで研究を進めてきた。2015 年には奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授に就任した。さきがけ研究を除けば 2015 年以降に国内の助成金を受けるようになり、花発生の研究を継続している。

本研究領域終了後は、花発生の分子機構について時空間の観点から研究を展開しており、

科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「細胞周期の進行に伴うヒストン修飾による転写制御」(2015 年度～2016 年度)、及び科研費基盤研究(A)「花幹細胞におけるポリコム因子の導入、排除及びリン酸化シグナルによる活性調節」(2015 年度～2019 年度)は現在継続中である。また、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「花幹細胞における細胞壁の制御と機能」(2015 年度～2016 年度)では、花幹細胞周辺の細胞に着目した研究が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)ポリコムタンパク質による KNU 遺伝子発現の抑制

ポリコムタンパク質は、発生過程で時間的及び空間的に特異的な遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。KNU 遺伝子の発現はポリコムタンパク質により抑制されることから(図 3-64)[133]、KNU 遺伝子上流のポリコム応答配列(Polycomb response elements:PRE)の機能を調べた。KNU 遺伝子上流に PRE 様配列(PRE-like)を挿入し、その下流に遍在性の F3H プロモーターと蛍光蛋白質遺伝子 yellow fluorescent protein-myc(YFP-myc)を植物細胞に導入したモデル系を作成し、PRE へのポリコムタンパク質の結合性を調べた。その結果、YFP の発現は抑制され、ポリコムタンパク質が PRE-like へ結合することが示された。また、PRE-like を破壊すると、YFP-myc が発現したことから、ポリコムタンパク質の PRE への結合が KNU 遺伝子の発現を抑制していることが明らかになった(図 3-65)[1]。

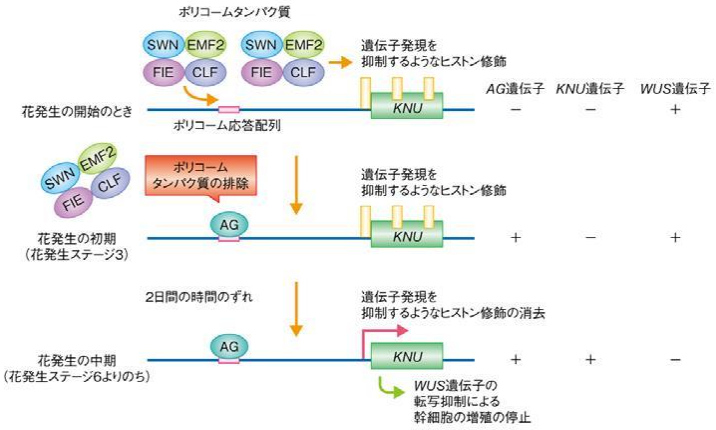


図 3-64　KNU の発現制御機構[134]

KNU がポリコムタンパク質とヒストンの結合・乖離により発現制御されるモデル。KNU 遺伝子の早期の発現は、ポリコムタンパク質により抑制されている。AG の発現が誘導されると、ポリコムタンパク質のリクルートに必要なポリコム応答配列に競合的に結合しその活性を阻害する。これにより、細胞周期による時間のずれを伴う遺伝子発現の抑制状態の希釈を経て、KNU 遺伝子の発現が誘導される。

---

[133] Sun B., Xu Y., Ng K.H., Ito T. “A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem”, Genes and Development, 2009, 23(15), 1791-1804.

[134] ライフサイエンス 領域融合レビュー　花の発生における幹細胞の増殖および分化の制御 http://leading.lifesciencedb.jp/3-e014/

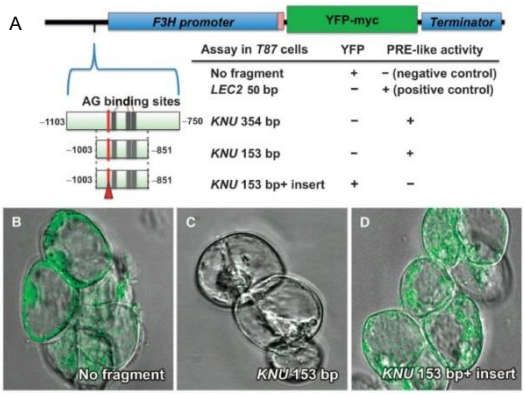


図 3-65　PRE の機能解析モデル[1]

A は、人工 DNA の構成で、F3H プロモーター上流に 3 種の AG 結合領域が結合したことを示す。赤は PRE-like の挿入位置で、最下は PRE-like の塩基挿入破壊を示す。B は、AG 結合領域無し、C は、PRE-like による YFP 発現の阻害、D は、PRE-like 機能喪失による YFP 発現を示す。緑色は YFP。

(ⅱ)ヒストン修飾による花発生の制御

次に、ヒストンが KNU 遺伝子へ結合することにより KNU 遺伝子の発現が抑制されているという知見から[133](図 3-64)、ヒストンの修飾機構に着目した研究を行った。動物では MORF[135]-Related Gene On Chromosome 15(MRG15[136])ファミリー蛋白質が、トリメチル化ヒストン H3K36(H3K36me3)に結合・修飾して多様な制御を行うという知見[137]に基づき、植物においても MRG15 ホモログがメチル化ヒストンを制御するかどうかを検証した。In vitro binding assay を用いて、シロイヌナズナの MRG15 ホモログ MRG1 及び MRG2 のメチル化ヒストン(H3)への結合性を、多様なメチル化ヒストン H3 分子で検出し、MRG1 と MRG2 のヒストン修飾への関与を調べた(図 3-66 A)[2]。その結果、MRG1 と MRG2 は H3K4me3、H3K36me2、H3K36me3H と結合したことから、植物細胞では MRG1 と MRG2 が特定のリジンがメチル化したヒストン H3 を選択的に修飾することが示唆された(図 3-66)[2]。

[135] monocytic leukemia zinc finger protein-related factor
[136] クロマチン制御因子の 1 つ
[137] Berger, S. L. “The complex language of chromatin regulation during transcription”, Nature, 2007, 447, 407-412.

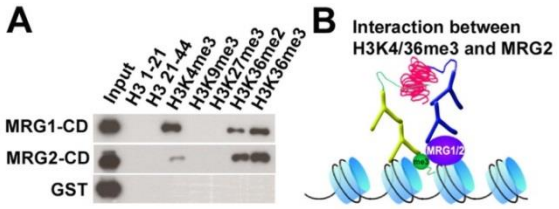


図 3-66　MRG1/2 のヒストン結合性とヒストン修飾モデル[2]

A は、MRG1、MRG2 のヒストンへの結合性試験。GST と融合させた MRG1 と MRG2 クロモドメイン[138](MRG1-CD、MRG2-CD)をビオチン化したヒストン H3k(1-21 アミノ酸、21-44 アミノ酸)又はメチル化ヒストン H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3、H3K36me2、H3K36me3 に結合させ、これをストレプトアビジン-アガロース上に固定化した。MRG1/2-CD は、H3K4me3 及び H3K36me2/3 へ結合していた。左下の GST は、ネガティブコントロール。B は、MRG1/2 が H3K4/36me3 を修飾するモデル図である。

また、KNU 遺伝子の発現には KNU 遺伝子からのヒストンの解離が必要であるという知見に基づき(図 3-64)[1]、ヒストンの脱修飾に関する研究を行った。ヒストンの脱メチル化には JMJ-ドメインを持つヒストン脱メチル化酵素が機能しており、環境温度に応じた花成誘導の調節に作用していることを示した[3]。また、脱アセチル化には DNA 結合モチーフの Transposable Element Silencing via AT-HOOK(TEK)が働き、これにより転移因子 transposable elements(TEs)がジーンサイレンシングを受けることも示してきた[139]。そこで、花成を抑制する転移因子の Mads Affecting Flowering(MAF)が TEK によるジーンサイレンシングを受けるかどうかを、TEK をノックダウンして MAF1～MAF5 の発現量を測定する実験で検証した。その結果、Mads Affecting Flowering 4(MAF4)と Mads Affecting Flowering 5(MAF5)で有意な発現上昇が見られたことから、TEK は MAF4・MAF5 のジーンサイレンシングに関与し、花発生を制御することが示唆された[4]。

遺伝学的解析により上記の花成機構の研究を進めているが、それに加え、花が咲く時に起きるメリステム（頂端分裂組織）間のシグナル伝達を明らかにするために、カルシウム、ATP のバイオセンサーを作出するなど、新たな研究手法の開発も行っている[140]。

②社会・経済への波及効果

植物は、環境変動に対して非常に柔軟に応答し、その環境に適応する。高温条件下で活性の高まるヒストン修飾酵素の作用機構の研究は、植物が環境変化に対応して、メリステムの

[138] クロマチンの構造変換に関わる因子に見いだされる、進化的によく保存されたドメイン
[139] Xu Y., Wang Y., Stroud H., Gu X., Sun B., Gan E.S., Ng K.H., Jacobsen S.E., He Y., Ito T. “A matrix protein silences transposons and repeats through interaction with retinoblastoma-associated proteins”, Current Biology, 2013, 23(4), 345-350.
[140] 科研費挑戦的萌芽研究「花が咲く時に植物体で起きることーDeath ホルモンはあるのか？」(2015 年度～2017 年度)　https://library.naist.jp/mylimedio/dllimedio/showpdf2.cgi/DLPDFR014136_P1-4

挙動や分化の様式を変換する機構の解明につながり、農業的な視点から、農作物の開花、結実時期の調節が可能になることが期待される。

読売新聞寄稿連載「ドキ★ワク先端科学」(2017 年 4 月 19 日)において「はかなくて強い幹細胞」という題で研究内容も交え、花の幹細胞について解説が行われた[141]。また、奈良先端科学技術大学院大学広報誌「せんたん」vol.24(2015 年 9 月号)に「神秘的な花の形づくりの謎に挑む」が掲載された[142]。また、同大学公開講座で「花の命はどうして、はかないのか？」(2017 年 10 月 7 日)の講演が行われた[143]。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Sun B., Looi L.S., Guo S., He Z., Gan E.S., Huang J., Xu Y., Wee W.Y., Ito T. “Timing mechanism dependent on cell division is invoked by Polycomb eviction in plant stem cells”, Science, 2014, 343(6170), 1248559,

[2] Xu Y., Gan E.S., Zhou J., Wee W.Y., Zhang X., Ito T. “Arabidopsis MRG domain proteins bridge two histone modifications to elevate expression of flowering genes”, Nucleic Acids Research, 2014, 42(17), 10960-10974.

[3] Gan E.S., Xu Y., Wong J.Y., Geraldine Goh J., Sun B., Wee W.Y., Huang J., Ito T. “ Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of FLC in Arabidopsis”, Nature Communications, 2014, 5, 5098.

[4] Xu Y., Gan E.S., Ito T. “The AT-hook/PPC domain protein TEK negatively regulates floral repressors including MAF4 and MAF5”, Plant Signaling and Behavior, 2013, 8(8), e25006.

[141] 奈良先端科学技術大学院大学ホームページ　NAIST の活動
http://www.naist.jp/activity/education/dokiwaku/

[142] http://www.naist.jp/activity/education/public_relations/vol24/biological1509.html

[143] http://www.naist.jp/activity/regional/open_lectures/detail2017.html

3.3.2　アメーバ運動の伸長収縮システムを用いた生物リズムの解明(岩楯好昭)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

アメーバ運動は、神経ネットワークの形成や白血球の遊走など生命活動に不可欠であり、また自律的な細胞機能である。運動方向を決めるためには、前後の極性や前端の伸長と後端の収縮の協調など、秩序を自ら生み出している。本研究では、(A)細胞の前後極性はどのように決まるのか、(B)前端の伸長と後端の収縮の周期性はどのように決まるのか、という疑問の解明を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)牽引力と前後極性形成の関係

牽引力とアメーバ運動の前後極性形成との関係を調べるため、細胞性粘菌アメーバの牽引力と動力源の一つであるミオシンⅡの細胞内動態を同時に観察した[1]。その結果、細胞が牽引力の小さい方向を前とした前後極性を形成すること、及び牽引力の大きな箇所にミオシンⅡを集積させることが明らかになった[1]。

(ⅱ)細胞の牽引力と仮足[144]伸長方向

細胞が牽引力の小さい方向を前にすることから、基質に向かって突出させた糸状突起の牽引力と、仮足の伸長の関係を定量的に検討した。その結果、牽引力が小さな箇所での仮足の伸長の頻度は、大きな箇所よりも有意に高いことが明らかになった[1](図 3-67)。

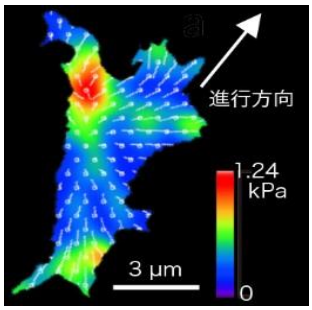


図 3-67　粘液アメーバの仮足と牽引力[145]

牽引力の空間的分布を色で表した。赤い所は大きな牽引力の発生箇所を示す。

---

[144] 鞭毛や繊毛と並ぶ、原生生物の移動様式の一つで細胞などの捕食、移動のための細胞器官。仮足による運動をアメーバ運動という。

[145] 山口大学理学部　ホームページ　教員紹介
http://www.sci.yamaguchi-u.ac.jp/sci/stafflist/iwadate

(iii)ミオシンⅡの前後極性形成への役割

硬さに方向性のある基質では、粘菌アメーバは柔らかな方向に運動するが、ミオシンⅡをノックアウトした粘菌アメーバでは、運動の方向性は見られない。そこでこの運動にアクトミオシンとしての収縮が必要なのかを調べるために、ATPase のない改変ミオシンⅡを導入した粘菌アメーバを、硬さに方向性のある基質上で運動させると、細胞は基質の柔らかい方向に運動したことから、ミオシンⅡのアクトミオシンとしての収縮は極性形成に必要ないことが示唆された[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Uyeda T.Q.P., Iwadate Y., Umeki N., Nagasaki A., Yumura S. “Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin ii motor domain”, PLoS ONE, 2011, 6(10), e26200.

[2] Iwadate Y., Okimura C., Sato K., Nakashima Y., Tsujioka M., Minami K. “Myosin-II-mediated directional migration of dictyostelium cells in response to cyclic stretching of substratum”, Biophysical Journal, 2013, 104(4), 748-758.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、引き続き細胞や単細胞微生物の運動に関する研究が行われた。科研費新学術領域「動く細胞と秩序」「アメーバ運動の“力”による細胞の自律的な前後極性形成メカニズム」(2011 年度～2012 年度)では、細胞のアメーバ運動のより詳細な研究が行われた。科研費新学術領域「運動マシナリー」「繊毛群のメタクロナールウェーブ伝達機構」(2013 年度～2014 年度)、科研費新学術領域「運動マシナリー」「細胞弾性で伝わる繊毛メタクロナールウェーブの分子メカニズムと普遍性」(2015 年度～2016 年度)では、単細胞微生物の繊毛群運動の研究を行い、科研費新学術領域「ゆらぎと構造」「遊走細胞のかたちを決める分子ダイナミクス」(2014 年度～2015 年度)、科研費挑戦的萌芽研究「細胞を遊走させる回転するストレスファイバ」(2014 年度～2016 年度)では、魚類の遊走細胞の運動に関する研究が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)細胞のアメーバ運動におけるミオシンⅡとアクチンフィラメントの関係

これまでの研究では、ミオシンがアクチンフィラメントの構造変化を誘導すると言われてきた。そこで、細胞のアメーバ運動における、ミオシンⅡとアクチンフィラメントの関係を調べるため、ATP の存在下でアクチンフィラメントの特異的領域への親和性を増す GFP 融合アミノ酸をミオシンⅡモータードメインに導入し、アクチンとミオシンⅡの親和性の可

視化を試みた[146]。その結果、GFP 融合ミオシンⅡがアクチンフィラメントの機械的に引き伸ばされた領域へ結合することが確認されたことから、アクチンフィラメントの形状変化がミオシンⅡとの親和性を変化させることが明らかになった[146,147,]。

(ⅱ)繊毛のメタクローナルウェーブシステムの伝達機構

ゾウリムシなどの単細胞生物は、多数の繊毛を持ち、繊毛一本一本が独立して運動しているにもかかわらず、全繊毛が集団として秩序を保ちながら同じ方向に動くという現象が見られ、これをメタクロナールウェーブという(図 3-68)。このメタクロナールウェーブが形成されるメカニズムをゾウリムシを用いて検討した。

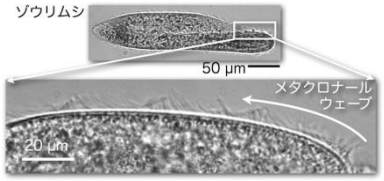


図 3-68　ゾウリムシ繊毛のメタクロナールウェーブ[148]

上図はゾウリムシの全体像の写真、下図はその拡大写真で繊毛群のウェーブを示す。

まず、ケイジドカルシウムを用い、人為的に一部の繊毛運動を逆転させ、繊毛同士の力学的作用を遮断すると、一部の逆転箇所を超えてメタクロナールウェーブが伝播することが示された[2]。次に、細胞の弾性を使ってメタクロナールウェーブが伝播するかを検討するため、ウェーブより遅い周波数で細胞を伸縮させたところ、ウェーブの周波数は伸縮の周波数に近づいて行ったものの、伸縮させなかったものとの有意差はなかった。さらに、細胞を振盪する実験でも変化がなかったことから、細胞の伸縮・振盪下でもメタクロナールウェーブは維持されることが示唆された(図 3-69)[1]。

[146] Iwadate Y., Okimura C., Sato K., Nakashima Y., Tsujioka M., Minami K. “Myosin-II-mediated directional migration of dictyostelium cells in response to cyclic stretching of substratum”, Biophysical Journal, 2013, 104(4), 748-758.
[147] Uyeda T.Q.P., Iwadate Y., Umeki N., Nagasaki A., Yumura S. “Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin ii motor domain”, PLoS ONE, 2011, 6(10), e26200.
[148] 山口大学理学部　岩楯研究室ホームページ　http://biophysics.sci.yamaguchi-u.ac.jp/naiyou.html

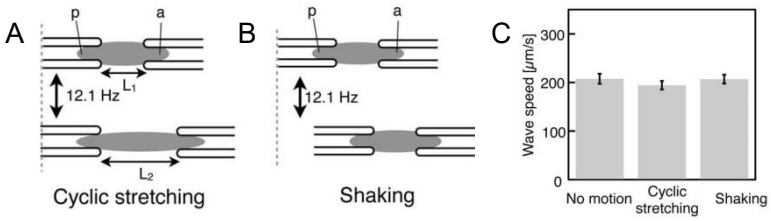


図 3-69　細胞伸縮のメタクロナールウェーブへの影響[1]

A は、ゾウリムシを周期的に伸縮させる実験の模式図である。B は、振盪する実験の模式図である。C は、実験時の繊毛ウェーブ速度のグラフで、左から無刺激、伸縮、振盪時の速度を示す。

(iii)ケラトサイト細胞前端の伸長速度勾配形成におけるストレスファイバの役割

アメーバ運動を行う遊走細胞は、一般的に不定形であるが、魚類表皮の遊走細胞ケラトサイトは、常におうぎ型を維持したまま基質上を這い、細胞内後方にストレスファイバと呼ばれる収縮性のアクトミオシン線維を持つことが知られている。このおうぎ型は、細胞前端における中央部の早い伸長速度と側部の遅い伸長速度との伸長速度勾配により維持されると言われるが、ストレスファイバがどのようにこの細胞前端の伸長速度勾配を形成しているのか不明である。

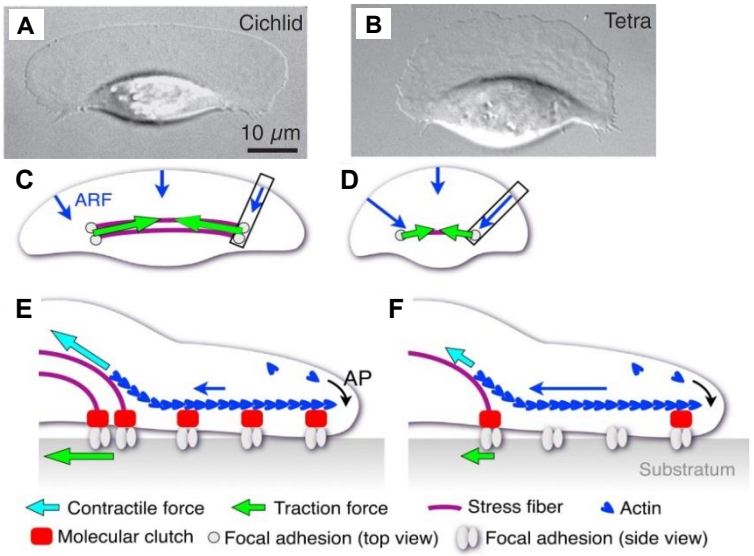


図 3-70　ケラトサイトの形を決定するストレスファイバの役割モデル[2]

A はシクリッド、B はブラックテトラのケラトサイトの写真。C と E は、横長のケラトサイトでは ARF 速度勾配(青矢印)が小さく、ストレスファイバの両端に大きな牽引力(緑矢印)を与えることを示す。D と F は、丸いケラトサイトでは ARF 速度勾配が大きく、ストレスファイバの両端に小さい牽引力を与えることを示す。C と D は上から、E と F は横から見た図である。

そこで、このストレスファイバの細胞前端の伸長速度勾配形成における役割を調べるため、2種の魚類(シクリッドとブラックテトラ)からケラトサイトを採取し、形状及び運動の分子メカニズムが比較された[2]。その結果、シクリッドの横長のケラトサイトは、伸長速度勾配とアクチンレトログレードフロー(ARF、細胞周辺アクチン線維の絶え間ない中心に向かう流動)が小さく、ストレスファイバの収縮による基質牽引力が大きかった(図 3-70 A、C、E)[2]。一方、ブラックテトラの丸いケラトサイトは、伸長速度勾配と ARF 速度勾配が大きく、ストレスファイバの収縮による基質牽引力が小さかった(図 3-70 B、D、F)[2]。さらに、シクリッドのケラトサイトのストレスファイバをレーザーで切断すると、切断部で ARF 速度が上昇し、形もブラックテトラのように丸くなった[2]。これらの結果からケラトサイトのかたち形成において、ストレスファイバが牽引力を介して ARF 速度を調節することにより、伸長速度勾配を生み出していることが示唆された[2]。

(ⅳ)マイクロポレーションの開発

顕微鏡下で細胞を観察しつつ薬剤を簡便に導入できる方法が、エレクトロポレーションの方法を応用して開発され、マイクロポレーションと命名された[3]。この装置は特許出願され、登録されている[149]。

②社会・経済への波及効果

生物には自律的に“秩序”を作り出す能力があるが、秩序形成のようなマクロな生命現象は一つの分子ではなく多くの分子・小器官の相互作用によって成り立つ。本研究でのアメーバ運動を始めとする細胞運動における秩序形成の原理の理解は将来テクノロジーへ応用されることにより大きな技術革新をもたらすことが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Narematsu N., Quek R., Chiam K.-H., Iwadate Y. “Ciliary metachronal wave propagation on the compliant surface of Paramecium cells”, Cytoskeleton, 2015, 72(12), 633-646.

[2] Nakata T., Okimura C., Mizuno T., Iwadate Y. “The Role of Stress Fibers in the Shape Determination Mechanism of Fish Keratocytes”, Biophysical Journal, 2016, 110(2), 481-492.

[3] Tsugiyama H., Okimura C., Mizuno T., Iwadate Y. “Electroporation of adherent cells with low sample volumes on a microscope stage”, Journal of Experimental Biology, 2013, 216(19), 3591-3598.

[149] 特許 5896376「マイクロポレーション装置」(2016 年 3 月 30 日登録)。

3.3.3　母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明(大杉美穂)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

哺乳動物の発生において、減数分裂から体細胞分裂への転換期には、そのどちらとも異なる“母性因子依存的分裂”と呼ぶべき染色体分配・核形成機構が存在することが見いだされた[151]。本研究では、哺乳動物の母性因子依存的分裂期の特異性と分子基盤を明らかにし、その特異性が体細胞分裂への転換と個体発生に果たす意義を解明し、さらに母性因子依存的分裂の種を超えた普遍性を明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)母性因子依存的分裂期のライブイメージング観察

母性因子の影響を最も強く受ける受精直後の前核形成期に着目し、微小管や染色体などの分裂装置や核膜を可視化したマウス卵、初期胚のライブイメージングなどの手法により、分裂後期/終期に起こるイベントのタイミングについての詳細な解析が行われた。

その結果、卵の染色体は減数第 2 分裂後期における分配運動終了後、染色体は約 1 時間もの間、核膜に覆われることなく細胞質に存在し続けていた。さらに、同時に排卵された卵であっても前核形成のタイミングには大きなばらつきがあることが示唆された。このことから、マウス卵には母性因子として、染色体分配後に起こる核膜再形成の開始タイミングを遅延させる機構が存在することが示唆された[150]。

(ⅱ)染色体結合 Kinesin、Kid の雌性前核形成過程における役割

これまでにマウス初期胚における核形成に関して、Kinesin-10 サブファミリーに属する Kid/Kif22 (キネシン様モーター分子) による分裂後期染色体の一塊化(分裂後期染色体コンパクション)活性が重要であることが見出されていることから[151]、Kid 欠損マウス卵の単為発生誘導系を用いて雌性前核形成過程の Kid の役割が解析された。その結果、Kid 欠損マウス卵では、長く続く減数第二分裂後期の間に染色体がまとまりきれず離散し、その後に核膜が形成されるため重度の多核となる胚が高頻度に出現した(図 3-71)[151]。さらに、Kid 欠損マウス卵であっても、前核形成までのタイミングが比較的早い卵では、多核化が抑制されている傾向が示された。これにより他の分裂期に比較して長い雌性前核形成前の分裂後期/終期には、分配後の染色体が散逸しないようにする Kid の染色体コンパクション活性が重要で

---

[150] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 21 年度終了研究課題「母性因子依存的初期胚分裂の特異性と個体発生の保証機構の解明」

[151] Ohsugi M., Adachi K., Horai R., Kakuta S., Sudo K., Kotaki H., Tokai-Nishizumi N., Sagara H., Iwakura Y., Yamamoto T. “Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelope formation”, Cell, 2008, 132:771-782.

あることが明らかにされた。さらに、前核形成タイミングが非常に遅いというマウス卵の特徴は、受精後卵染色体の分配と同時に進行する精子クロマチンの変化を保証するという意義がある可能性が示唆された。

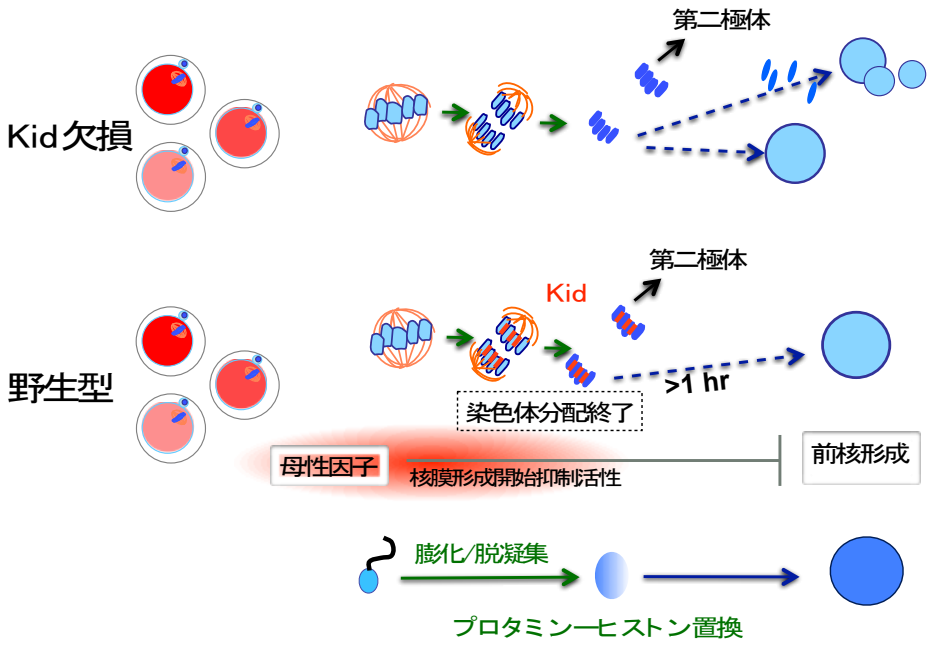


図 3-71　マウス母性因子依存的分裂期の特性と Kid[152]欠損による雌性前核多核化 [151]

野生型と Kid 欠損マウス卵での雌雄前核形成過程を示す。個々の受精卵の核形成タイミングは異なっており、遅いものほど Kid 欠損による雌性前核の多核化傾向が高い。赤色の濃淡は核膜形成開始抑制活性の違いを示す。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

無し

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も哺乳動物の卵減数分裂、受精卵の卵割分裂の特異性に着目した細胞分裂の分子機構解明が行われた。科研費挑戦的萌芽研究「マウス卵を用いた中心体非依存的微小管重合核の解析」(2011 年度～2012 年度)、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「分裂期紡錘体極としての中心体機能・制御解析」(2013 年度～2015 年度)では、紡錘体形成に関与する個々の分子の機能解析が行われた。さらに、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「マウス卵割期胚における NC 比制御と核形態・クロマチン状態変化の解析」(2014 年度～2015 年度)では細胞と核相の関係に関する研究が行われた。

[152] キネシン様モーター分子 4

①科学技術の進歩への貢献

（ｉ）哺乳動物特異的な雌性減数第二分裂での前核形成タイミング制御機構の研究

体細胞分裂では、染色体分配運動が終了すると直ちに前核形成が起こるが、哺乳類の卵減数第二分裂後の核（雌性前核）形成は、染色体分配運動が終了してから約 1 時間経った後に開始されるという特徴的な核膜形成タイミングを示す。前核の形成開始制御機構として、受精開始後も数時間活性が残る MAP キナーゼの関与が示唆されており、MAP キナーゼの不活性化により前核形成が引き起こされると考えられていた。そこで、核膜形成と MAP キナーゼの不活性化のタイミングについて詳細な比較解析を行ったところ、MAP キナーゼの活性化や抑制は、確かに前核形成タイミングの遅延や早期化を引き起こすが、その不活性化は前核形成開始には必要ではないことが見出された（図 3-72）。さらに、阻害剤を用いた実験から、MAP キナーゼの下流では、マウス卵中での役割が不明であった p90 Ribosoml S6 kinase（RSK）が、核膜形成の抑制に寄与していることが示唆された。以上の結果から、未受精卵の細胞周期を制御する経路（Mos-MAPK 経路）は、RSK を介して前核形成を負に制御していること、しかし、その制御は部分的であり、前核形成タイミングの決定はさらに別の経路が関与することが明らかになった（図 3-72）[1]。

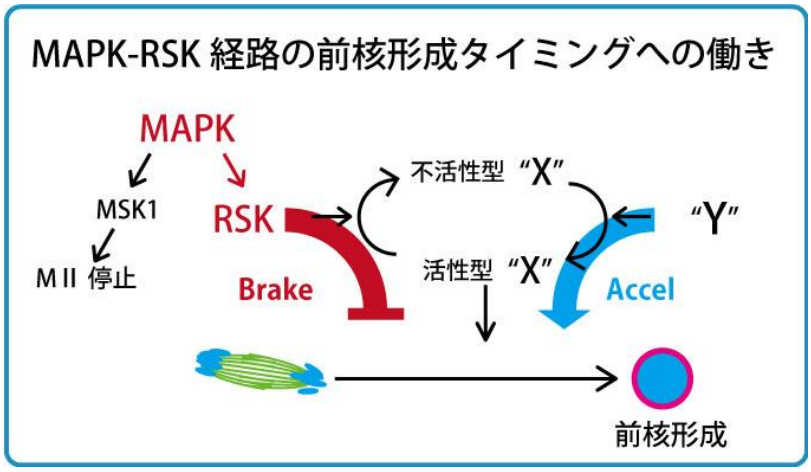


図 3-72　マウス卵における核形成タイミング決定機構[153]

Mos-MAPK 経路は、RSK を介して前核形成を負に制御しているが（図中の MAPK-RSK-X 経路）、その制御は部分的であり前核形成タイミングの決定は、さらに別の経路が関与する（図中の Y-X 経路）。

（ⅱ）哺乳動物特異的な雌性減数第二分裂での前核形成タイミング制御機構の研究

[153] 東京大学総合文化研究科広域科学専攻　大杉研究室ホームページ
http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ohsugilab2013/earlyembryo.html

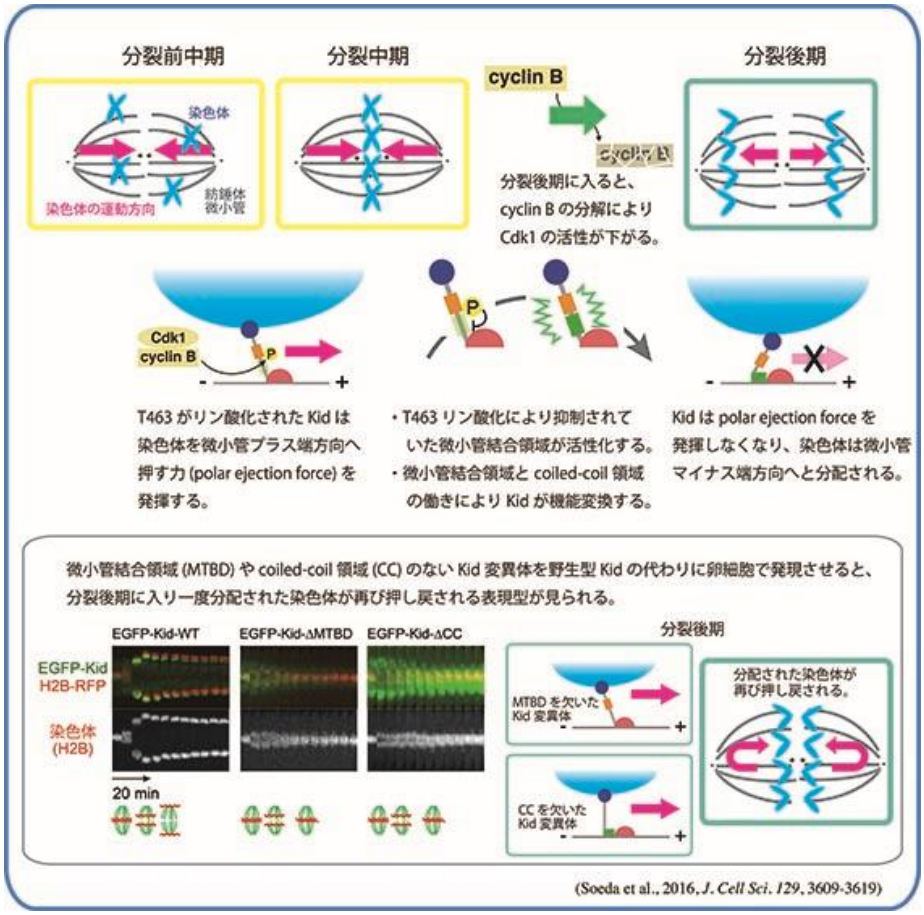


図 3-73　分裂期前半・後半における Kid の機能切替え機構と染色体運動方向の転換[154]

(上図) Cdk1 により Kid の 463 番目のスレオニン(T463)がリン酸化されて Kid の微小管結合領域が抑制されることが、前中期～中期において Kid が polar ejection force を発揮するのに必要である。分裂後期に入ると、T463 が脱リン酸化されることにより微小管結合領域が活性化され、さらに Coiled-coil 領域が働くことによって、Kid は polar ejection force を発揮しなくなる。

(下図) 微小管結合領域(中写真)や Coiled-coil 領域(右写真)を欠失した Kid 変異体では、分裂後期で一旦は両極へと分配運動を開始した染色体が再び紡錘体中央部に押し戻されてしまう(右図)。

Kid は、分裂中期までは染色体を紡錘体中央部へと押す力(polar ejection force；PEF)を生み出して染色体整列を助け、後期～終期には染色体をひとまとめにするという、全く異なる役割を担う。そこで、これらの異なる役割の切替えはどのように制御されているかについて、Kid ノックアウト細胞やノックアウト卵に、野生型又は各種変異体型 Kid を発現させることによって解析された。Kid は、Cdk1 により 463 番目のスレオニン(T463)がリン酸化されて Kid の微小管結合領域(microtubule binding domain；MTBD)が抑制されるが、このこと

[154] 東京大学総合文化研究科広域科学専攻　大杉研究室ホームページ
http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ohsugilab2013/kif18a.html

が、前中期～中期においてKidがPEFを発揮するのに必要であることが明らかになった(図3-73 上)。また、分裂後期に入ると、T463が脱リン酸化されることによりMTBDが活性化され、さらにCoiled-coil領域が働くことによって、KidはPEFを発揮しなくなり、代わりに染色体の一塊化を担うことが示された(図3-73 上)。興味深いことに、MTBDやCCを欠失したKid変異体、あるいはT463をアスパラギン酸置換して恒常リン酸化型模倣型にしたKid変異体を発現させた卵細胞では、分裂後期で一旦は両極へと分配運動を開始した染色体が再び紡錘体中央部に押し戻された(図 3-73　下)。つまり、T463 のリン酸化－脱リン酸化を引き金としたKidのPEF-ONモードからPEF-OFFモードへの機能転換は、分裂期染色体の運動方向(分裂前中期、中期には紡錘体中央部へ、後期には紡錘体極方向へ)の切替えに重要であることが明らかとなった[2]。

カエルの卵抽出液を使って再構築された分裂期では、カエルのKidであるXkidタンパク質は、後期が開始されると全て分解されることが知られている。つまり、同じ卵細胞でも、マウスとカエルではKidが発揮するPEFを止めるメカニズムが異なっていることも明らかになり、哺乳動物の卵・初期胚の分裂期の特異性の解明にも結び付く研究結果となった。

(ⅲ)TUBG1とTUBG2の検出方法開発と解析

微小管は、チューブリンダイマーが次々と重合することにより形成され、その開始には重合核となるγチューブリンを含む複合体が必要とされる。哺乳類のγチューブリンにはTubulin Gamma 1(TUBG1)とTubulin Gamma 2(TUBG2)が存在し、マウスではTUBG1はユビキタスに発現するが、TUBG2は着床前までの初期胚と脳に特異的に発現し、他の組織では発現しないことが報告されている。両者のアミノ酸レベルでの類似性は非常に高く、特異的な抗体が存在しないため、特にヒトのTUBG1とTUBG2は区別して検出することが困難であった。そこで、SDS-PAGE用のゲル組成を検討することで両者を区別して検出する手法が確立され、発現量の定量が可能となった[3]。さらに、多様ながん細胞株で発現量を測定した結果、一部のがん細胞株で生殖細胞や神経細胞由来ではないにもかかわらず、TUBG2の発現が認められ、その発現が細胞の増殖に寄与していることが示唆された[3]。

②社会・経済への波及効果

脊椎動物の受精・初期胚発生において、母性因子に依存した細胞周期や分裂期進行についての知見は、カエルなど非哺乳類モデル生物を用いた基礎研究の成果に基づくものがほとんどである。しかし、本研究とその継続研究から哺乳類と両生類の母性因子依存的な細胞周期・分裂期が持つ特徴は大きく異なる点が多く見出されてきた[1],[2]。このような基礎的な知見は、不妊治療などの医療や家畜の繁殖・種の維持といった幅広い分野に寄与することが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Soeda S., Yamada K., Ohsugi M. “Inactivation of mitogen-activated protein kinase is neither necessary nor sufficient for the onset of pronuclear formation in mouse oocytes”, Genes Cells, 2013, 18, 850-858.

[2] Soeda S., Yamada-Nomoto K., Ohsugi M. “The microtubule-binding and coiled-coil domains of Kid are required for turning off the polar ejection force at anaphase” Journal of Cell Science, 2016, 129, 3609-3619.

[3] Ohashi T., Yamamoto T., Yamanashi Y., Ohsugi M. “Human TUBG2 gene is expressed as two splice variant mRNA and involved in cell growth”, FEBS Letters, 2016, 590(8), 1053-1063.

④その他

大杉は、2015 年度には「哺乳動物特異的な遅延した前核形成タイミング制御」で成茂動物科学振興基金を受賞した。

3.3.4　植物の概日振動子の観測と相互作用の検出(小山時隆)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①　研究のねらい

個々の細胞は、自律的な概日振動子を持っており、その相互作用は個体等の高次の階層での概日リズムに関与していると考えられる。本研究課題では、高等植物の個々の振動子を細胞単位で解析し、同一個体内で複数の細胞の概日リズムを同時に測定する系を開発し、概日振動子の特性、振動子間の同期・外部環境への応答の解明と個別の概日振動現象と分子機構の階層性を明確化し、概日振動システムを有機的に捉える手法の開発を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)生物発光細胞を発光スポット(輝点)として細胞ごとに観測する手法の開発

生物発光細胞を発光スポット(輝点)として細胞ごとに観測するため、まずレポーター遺伝子を付着させた金粒子をウキクサ個体表面の細胞へ遺伝子導入し(図 3-74)[1]、次に、明確な発光スポットを検出するため、発光基質であるルシフェリンを植物培地に添加した。超高感度 Electron Multiplying Charged-Coupled Devices(EM-CCD)カメラを取り付けた微弱発光検出装置の下に、光ファイバで導かれた植物育成用光照射装置を置いたセットを暗箱中に構築することにより、上記のウキクサの発光が観察された。その結果、一つのスポットが一つの細胞に対応し、また導入遺伝子の発現量の分布が確認された(図 3-74)[1]。

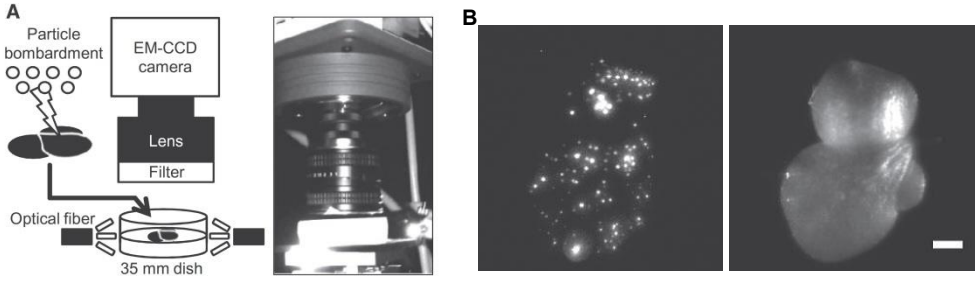


図 3-74　生物発光細胞を発光スポットとして細胞ごとに観測する手法[1]

A は、パーティクルボンバードメント法 [155] での発光レポーター導入植物の観察方法の模式図。B の左はイボウキクサの発光画像、右は明視野画像。

(ⅱ)発光スポットの時系列データ取得法の確立

ウキクサの垂直方向の運動や成長を行わない特性を活かして、撮影レンズの焦点位置を変えることなく、同一個体を長期間測定することが可能となった。また、時系列データとして取得した連続的なイメージ(群)の位置補正及び発光スポットの発光量定量を ImageJ ソフトを用いて効率的に行う自動化スキームが構築された[1]。

(iii)細胞概日振動子の観測

発光スポットの光量が極大になる時点を朝とみなせる発光概日リズムを観測するため、生物発光レポーターとして朝に発現する時計遺伝子 Circadian Clock Associated 1/Late Elongated Hypocotyl(CCA1/LHY)のプロモーター下で発現するホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入し、個体レベルの概日リズムを測定したところ、連続明条件・連続暗条件共に概日リズムが減衰する傾向が示された[1]。一方、この発光レポーター遺伝子をパーティクルボンバードメント法[155]で細胞に導入し、細胞ごとの概日リズムを測定した結果、連続明条件では個々の細胞概日リズムは持続するが、周期が安定せず、全体として脱同期状態に陥り、連続暗条件では細胞概日リズムが減衰することが明らかになった[1]。これにより、個体レベルの概日リズムは必ずしも細胞レベルの概日振動子の性質を表現しないことが示された[1]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Muranaka T., Kubota S., Oyama T. “A single-cell bioluminescence imaging system for monitoring cellular gene expression in a plant body”, Plant and Cell Physiology, 2013, 54(12), 2085-2093.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も植物の概日時計の研究が継続され、ウキクサに加え、シロイヌナズナとシアノバクテリアも研究材料として取り上げられた。科研費挑戦的萌芽研究「概日リズム消失植物培養細胞を土台にした概日時計再構成系構築」(2011 年度～2012 年度)では、シロイヌナズナを用いた概日時計の分子機構研究が行われた。科研費基盤研究(B)「シアノバクテリア概日時計転写出力系の多様性形成過程の実験的検証」(2012 年度～2014 年度)では、シアノバクテリアの概日時計の分子機構多様性の研究が行われた。科研費挑戦的萌芽研究「植物体微小領域への簡便で長期的操作可能な光照射法の開発と応用」(2013 年度～2014 年度)では、ウキクサを用いた概日時計の新たな研究手法が開発された。科研費基盤研究(B)「植物の時間秩序形成過程の観測と理論」(2017 年度～2019 年度)は現在進行中である。また、ウキクサをバイオマス生産など環境浄化の材料に用いる応用研究として JST ALCA の「C1 微生物-植物共生系による光エネルギー利用型 CO_2/C_1 炭素固定」(2012 年度～2015 年度)で微生物との共生のモデル材料化がなされた。さらに、JST ALCA の「根圏微生物共生系を活用した高次植生バイオプロセスの開発」(2016 年度～2019 年度)が進行中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)シロイヌナズナの根の伸長時の概日リズム動態解析

[155] 金やタングステンなどの金属の微粒子に DNA をコーティングしたものを弾丸として、高速で射出して細胞内に DNA を導入する方法

植物で細胞増殖・分化が連続的に起こる根の伸長時の概日リズムの動態が検討された。シロイヌナズナの芽生えにおける根の生物発光を連続的にモニターし、発光リズムの空間パターン解析が行われた[1]。その結果、分裂組織においても概日リズムは維持されているものの、細胞が増殖能を失い伸長する段階で概日時計が一度リセットされ、伸長が終わり、分化する段階で再び概日時計が同じ位相で動き始めることが明らかになった[1]。植物同一器官内での時計の脱同期を明確に実証した最初の例である。

(ⅱ)多様なウキクサにおける概日時計の多様性

ウキクサの仲間は属ごとに多様な形態を示し、これらは概日時計に関する細胞間光情報伝達の多様性を引き起こしていることが示唆されている。そこで、4 属 5 種 9 株のウキクサについて解析が行われた。まず、遺伝子導入による発光リズム測定が可能かどうか調べた結果、基本的にいずれも同じ方法で概日リズムを測定できることが明らかになった[2]。さらにこの方法を用いた解析の結果、同じ発光概日レポーター遺伝子を導入しても、種ごとに発光概日リズムの性質が異なったことから、ウキクサにおける時計システムそのものの多様性が示唆された[2]。

(ⅲ)植物の細胞時計の性質と異質性の定量的解析

ウキクサ個体(フロンド；葉状体が数個連なった形状)内の個々の細胞概日リズムを発光レポーターで観測する技術を用いて、連続明、連続暗、明暗などの光条件下での細胞時計の性質が明らかにされた[3]。連続明期においては、個々の細胞時計は、同一個体内でも細胞間で固有周期がバラつくほか、サイクルごとにその針の進み方が大きく揺らぐことが明らかになった。そのバラツキや揺らぎを定量的に解析した結果、既に報告のある哺乳類の培養細胞の細胞時計よりやや不安定であることが明らかとなった。これらのバラツキや揺らぎの結果、植物個体内で細胞時計の位相は互いにバラバラになっていき、全体としては振幅が低下することが実証された。これらのバラバラになった細胞時計群は、2 回の夜を経験することで全体として完全に調和するが、その同調作用は細胞ごとに独立に起こることを示した。一方で、明暗条件下では、細胞時計の位相はフロンド中心から周辺部へと移動するパターンを示し、通常環境である昼夜環境下では、全体として調和的な時計の挙動を示すことが明らかになった。このことは、細胞間で時刻情報をやり取りしている可能性を示唆している。概日時計に関する細胞間の相互作用は、連続明条件下で全体としてバラバラな位相になっている細胞時計も、0.5 ㎜以下の範囲にある細胞群は位相のバラツキが小さいことからも示唆された。連続暗条件下では、ウキクサの細胞時計の多くが不安定化し、リズムの振幅がなくなり、植物個体全体としても周期性を失うことが明らかとなった。これらの研究成果は、植物の細胞時計の直接的観測によって、その性質を定量的に示した最初の例となった[3]。

(iv)細胞時計の明暗周期への同調性

細胞時計の性質は、同一個体、同一組織でもバラつくものの、通常の昼夜サイクル(24 時間周期)では、個体全体として調和的に作動していることが示されたが[3]、それらのバラツキが 1 日の時間を短くすることで、質的な差となって顕在化することが明らかになった[4]。1 日の長さを 20 時間まで短くしても細胞時計は調和的に作動するが、16 時間まで短くすると、短い 1 日に時計を完全に同調できる細胞と同調できない細胞が同一個体内に生じることが実証された。細胞時計の固有周期が平均より長い細胞が同調しにくい傾向を示したことから、細胞間に見られた固有周期のバラツキは 16 時間の明暗周期で顕在化することが明らかとなった。これらの結果は、24 時間程度の周期的な外部環境変動に均質に同調できることが、細胞時計の性質がバラツキの許容条件になることを示唆している[4]。さらに、明暗同調に働く *ELF3* 遺伝子を細胞レベルで破壊し、その細胞が正常な細胞に周囲を囲まれている状態を作っても、同調に異常を来すことが示された[4]。この結果は、細胞時計の同調機構が細胞自律的であることを示唆している。

②社会・経済への波及効果

概日リズムはほぼ全ての生物に備わっている。本研究は、ウキクサなどの植物における概日振動システムについて、その細胞内・近接細胞間・個体内のそれぞれのレベルでの基盤構造を明らかにすることを目的とし、また概日リズムを測定する手法を提供するものである。植物において人工の光環境が植物に与える影響のメカニズムを解明し、制御法を開発することは植物工場などの新たな育種へとつながると期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Fukuda H., Ukai K., Oyama T. “Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase-resetting in plant roots”, Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics, 2012, 86(4), 41917.

[2] Muranaka T., Okada M., Yomo J., Kubota S., Oyama T. “Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds”, Plant Biology, 2015, 17(s1), 66-74.

[3] Muranaka, T., Oyama, T. “Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles”, Science Advances, 2016, 2(7), e1600500.

[4] Okada M., Muranaka T., Ito S., Oyama T. “Synchrony of plant cellular circadian clocks with heterogeneous properties under light/dark cycles”, Scientific Reports, 2017, 7(1), 317.

3.3.5 網膜 ON・ OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析(小池千恵子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

脊椎動物の網膜では、視覚情報は双極細胞において ON 型・OFF 型経路に分解される。ON・OFF 回路は、昆虫や線虫などの嗅覚、味覚、視覚などにも存在し、一つの刺激に対し二つの情報経路が正反対に応答する。本研究では、コントラストの強調に関わる網膜 ON 型・OFF 型情報経路と視覚応答との関係を明らかにし、さらにその情報を基に、網膜 ON・OFF 回路と視覚応答のシミュレーションモデルを作製することで網膜機能再構築の基盤情報とすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルの同定

双極細胞[156]の ON 型経路は、光刺激の増加に対して作動し、OFF 型経路は、光刺激の減少に対して作動するが、この ON 型・OFF 型経路の分解は、双極細胞におけるグルタミン酸応答の違いにより引き起こされる。ON 型双極細胞は、代謝型グルタミン酸受容体である Metabotropic glutamate receptor 6 (mGluR6)を活性化した結果、視覚伝達チャネルが閉じて過分極応答する。この視覚伝達チャネルはこれまで同定されていなかったが、分子スクリーニングとヒトやショウジョウバエとの比較解析により、感覚受容器に広く発現するカチオンチャネル遺伝子の Melastatin related transient receptor potential 1 (TRPM1)が ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルであることが明らかになった[1]。また、TRPM1 には、イオンチャネル型の long form (TRPM1-L)と N 末のみから成る short form が存在するが、マウスの ON 型双極細胞にはイオンチャネル型 TRPM1 のみ存在することが明らかにされた[1]。

(ⅱ)TRPM1-L の機能解析

TRPM1-L の双極細胞の局在を解析したところ、TRPM1-L は ON 型双極細胞の樹状先端に mGluR6 と共局在することが明らかになった(図 3-75)[1],[2]。TRPM1-L ノックアウトマウスによる解析から、TRPM1 チャネルは mGluR6 におけるグルタミン酸刺激により抑制されること、mGluR6 と共役する三量体 G タンパク質 G protein alpha o subunit(Goα)により抑制制御されることが明らかになった[1],[2]。

[156] 眼球の網膜や嗅粘膜などに見られる神経細胞で、太い突起が 2 本あり、その一方から刺激が細胞体に伝えられ、もう一方の突起からその先端へ向けて興奮が伝えられるので、双極細胞と呼ばれる。

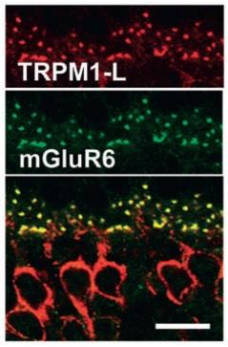


図 3-75　TRPM1-L と mGluR6 の ON 型双極細胞における共局在[1]

ON 型双極細胞の樹状先端における TRPM1-L と mGluR6 の免疫染色。上段の赤が TRPM1-L、中段の緑が mGluR6、下段は複合写真で、黄色が共局在を示す。

(iii)ヒト TRPM1 の夜盲症への関与

TRPM1 が夜盲症の原因かどうか調べるため、4 人の非近親者の夜盲症患者から TRPM1 を単離し変異の有無が調査された[3]。その結果、3 人の患者の TRPM1 で 5 種の異なる変異が同定されたことから、ヒト TRPM1 はマウス同様、ON 型双極細胞で光感受性の仲介に重要な役割を果たすことが示唆された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Koike C., Obara T., Uriu Y., Numata T., Sanuki R., Miyata K., Koyasu T., Ueno S., Funabiki K., Tani A., Ueda H., Kondo M., Mori Y., Tachibana M., Furukawa T. “TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(1), 332-337.

[2] Koike C., Numata T., Ueda H., Mori Y., Furukawa T. “TRPM1: A vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function”, Cell Calcium, 2010, 48, 95-101.

[3] Nakamura M., Sanuki R., Yasuma T.R., Onishi A., Nishiguchi K.M., Koike C., Kadowaki M., Kondo M., Miyake Y., Furukawa T. “TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness”, Molecular Vision, 2010, 16, 425-437.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、手法の開発と視覚応答解析メカニズムに関する研究が行われた。文科省私立大学戦略的研究基盤形成事業「網膜回路と視覚応答のシステムダイナミクス解明プロジェクト」(2010 年度～2014 年度)および武田科学振興財団　薬学系研究奨励「網膜

ONOFF 回路と視覚応答制御メカニズム及び視覚伝達経路の解明」(2010 年度)では、人工膜作成や膜再生による視覚再構築を目的とした研究が行われた。科研費挑戦的萌芽研究「神経シグナルを洗練する網膜回路リファインメント機構の解明」(2012 年度～2014 年度)では、マウス網膜視覚情報シグナルの検出方法について検討され、科研費基盤研究(B)「コントラストを検出する初期視覚系の階層横断的解析と再生医療への戦略的展開」(2012 年度～2016 年度)では、コントラストの形成に関わる初期視覚系のメカニズムの解明が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)QKI の網膜における役割

Quaking(QKI)は、K homology(KH)ドメイン含有 RNA 結合タンパク質の steroidogenic acute regulatory protein(STAR)ファミリーに属し、mRNA 前駆体のスプライシングや、中枢神経系・末梢神経系のミエリン形成に重要な役割を果たすことが知られている。一方、神経網膜における QKI の発現や機能は解明されていない。そこで、発生中及び成体マウスの網膜における QKI の役割が解析された。免疫組織染色の結果、胚期全体にわたって QKI は網膜の増殖細胞で発現し(図 3-76)、出生後発生段階では QKI は分化する網膜ニューロンで発現し(図 3-77)、成体では QKI は網膜 Muller グリア細胞で強く発現し、水平細胞[157]及びアマクリン細胞[158]において弱く発現することが明らかになった[1]。

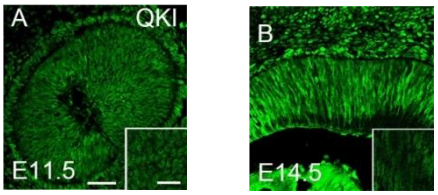


図 3-76　胚期マウス網膜の QKI 発現部位[1]

A は 11.5 日目、B は 14.5 日目のマウス胎児の網膜の免疫染色で、緑は QKI を示す。

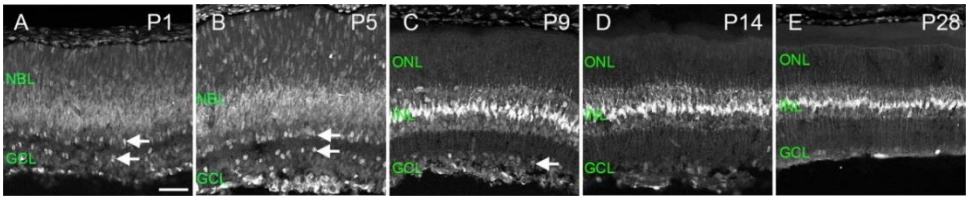


図 3-77　出生後マウス網膜の QKI 発現部位[1]

A は出生後 1 日目、B は 5 日目(網膜層特異化前)、C は 9 日目(網膜層特異化後)、D は 14 日目、E は 2 日目のマウスの網膜の免疫染色で、白は QKI を示す。NBL は神経芽細胞層、GCL は神経節細胞層、INL は内核層である。

[157] 視細胞とシナプス結合をする神経細胞で、網膜に水平に軸策が伸び、広い受容野を持つ。
[158] 網膜第二シナプス層(内顆粒層)に細胞体を持ち、層内で樹状突起を伸ばし、双極細胞や神経節とシナプスを形成するが、軸索を持たない介在神経。

また、ウェスタンブロットによる解析の結果、マウス QKI には三つのアイソフォームがあるが、成体マウス網膜では、そのうち QKI-5 が主として発現することが明らかになった[1]。以上の結果から QKI がグリア細胞及びニューロンの両方において網膜細胞の運命決定及び成熟において機能することが示唆された[1]。

② 社会・経済への波及効果

網膜は、入力系(光入力)と出力系(視覚応答)からなる中枢神経系であり、網膜において視細胞で変換された視覚情報は、双極細胞等の中間ニューロンにより調節を受け、脳へと伝達される。本研究では、TRPM1 の変異が夜盲症の原因であることが示唆されるなど、視神経経路の調節メカニズムの解明は、様々な視神経症の理解と治療法につながることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Suiko T., Kobayashi K., Aono K., Kawashima T., Inoue K., Ku L., Feng Y., Koike C. “Expression of quaking RNA-binding protein in the adult and developing mouse retina”, PLoS ONE, 2016, 11(5), e0156033.

3.3.6　核・細胞質間コミュニケーションと微小管の連携機構の解明(佐藤政充)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

分裂中の細胞では、微小管と呼ばれる繊維状の構造体が染色体を正確に 2 個の細胞に分配している。細胞が分裂しない時期(間期)には、微小管は細胞質に網目状に形成されて、物質の運搬や細胞極性の確立に不可欠な役割を担う。これに対して分裂期に入る時には、微小管は紡錘体微小管へその形態を変化させる。本研究では、この形態変化の分子メカニズムを解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)微小管構造の再構成を起こす因子の探索

微小管関連因子は、現在 30 種類以上知られているが、どの因子が微小管構造の劇的な再構成を起こしているのかは不明であった。酵母では分裂期に核が消失せず、紡錘体が核内に形成されるという特性に着目し(図 3-78)、酵母の核内に任意の微小管結合タンパク質を強制局在させることにより、微小管の形成を誘導するタンパク質がスクリーニングされた。その結果、特定の微小管結合タンパク質複合体を 2 種類発現させることで微小管形成を誘導できることが明らかになった[1]。それらを相互作用した状態で核内に蓄積させると、高頻度で核内に微小管が形成誘導されたことから、これらが微小管形成のための最小限の因子であることが示唆された[1]。

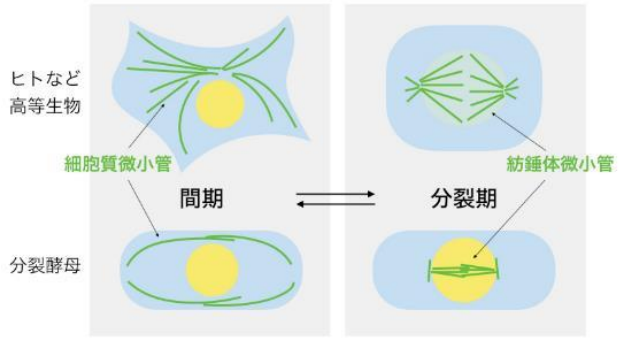


図 3-78　微小管構造の再構成[159]

図は間期から分裂期への微小管構造の再構成を示す模式図。上はヒトなどの高等生物で、分裂期には核(黄色)が消失して、微小管(緑)は紡錘体へと再編成される。下は分裂酵母で、核が消失せず、微小管は核内で紡錘体へと再編成される。

[159] 早稲田大学 先進理工学部 生命医科学科 佐藤研究室ホームページ
http://www.sato.biomed.sci.waseda.ac.jp/Research/pj3.html

(ⅱ)中心体分離における極間微小管の必要性

減数第二分裂時に中心体と中心体をつなぐ極間微小管(interpolar microtubules)を薬剤で破壊しても、中心体と動原体[160]をつなぐ動原体微小管が残存していれば、中心体は分離して染色体分配がある程度の正確さで起きることが明らかになった[2]。これにより染色体分配を行う本体としての微小管は不可欠であるが、中心体を分離したり、核を分裂したりするための極間微小管は必ずしも必要ではないことが示唆された[2]。

(ⅲ)中心体の分離における前胞子膜の役割

上記の結果を受けて、分裂酵母の減数第 2 分裂における前胞子膜[161]と呼ばれる構造に注目し、極間微小管と前胞子膜の両方の形成を阻害したところ、減数第 2 分裂でも中心体の分離は起きなくなったことから、極間微小管が阻害された状況下で中心体を分離しているのは前胞子膜であることが示された[3]。これにより、分裂酵母の減数第 2 分裂において紡錘体微小管をサポートする新しい構造として前胞子膜が同定された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Sato M., Toya M., Toda T. “Visualization of fluorescence-tagged proteins in fission yeast: The analysis of mitotic spindle dynamics using GFP-tubulin under the native promoter”, Methods in Molecular Biology, 2009, 545, 185-203.

[2] Akera T., Sato M., Yamamoto M. “Interpolar microtubules are dispensable in fission yeast meiosis II”, Nature Communications, 2012, 3, 695.

[3] Arai K., Sato M., Tanaka K., Yamamoto M. “Nuclear compartmentalization is abolished during fission yeast meiosis”, Current Biology, 2010, 20(21), 1913-1918.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、酵母を用いた研究基盤構築として、科研費基盤研究(B)「微小管の形成メカニズムと細胞内新機能の発見」(2013 年度～2015 年度)では、新規手法の開発、さらに科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「高精細アプローチで迫る転写サイクル機構の統一的理解」「シングルセル発現解析と核膜変異体ライブラリーを用いた転写サイクル始動機構の解明」(2015 年度～2016 年度)では、1 細胞からのトランスクリプトームの作製が行われた。科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「分裂酵母 CENP-A ヌクレオソームと動原体の再構築」(2016 年度～2017 年度)では、動原体に着目した研究が行われた。また、哺乳

[160] 動原体：細胞分裂時に染色体に動原体微小管が結合する部位。
[161] 核膜のまわりに形成される膜で、将来胞子の細胞膜となる。

類へ研究対象を展開し、科研費基盤研究(B)「微小管の機能発見及び人工制御：細胞から組織まで」(2016 年度～2018 年度)では、マウスの上皮細胞における微小管編成についての研究が現在も進行中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ｉ)減数分裂の微小管形成に働く因子の探索

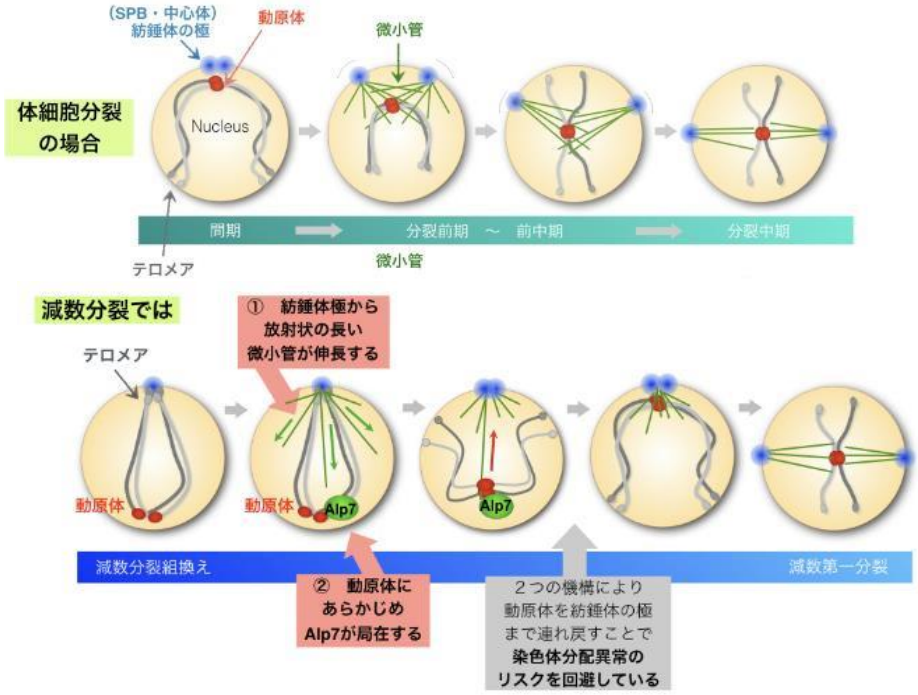


図 3-79　分裂酵母における体細胞分裂と減数分裂の核内染色体配置の違い[162]

図の上側は体細胞分裂の間期から中期、下側は減数分裂における組換え期から減数第一分裂の核内染色体(灰色)と動原体(赤)、紡錘体極(青)の位置関係を示す。

分裂酵母が増殖する細胞周期(体細胞分裂終期)では、間期において染色体の動原体(キネトコア)部位は、紡錘体の極(中心体又は、分裂酵母では Spindle Pole Body(SPB:スピンドル極体))の近くに集まって存在している(図 3-79)。一方、減数分裂の前段階では、染色体の末端であるテロメアが紡錘体の極の近くに集められ、動原体は極から離れた位置に置かれ、これは減数分裂組換えを促進するために必須の染色体位置(ブーケ配向)であることが知られる(図 3-79)。しかし、この染色体分配に不利なブーケ配向を克服して減数分裂が遂行される仕組みは未解明である。そこで、減数分裂特異的な微小管制御に関わるタンパク質を同定するため、まず 3 色蛍光タンパク質ライブイメージングシステムを用いて、減数分裂組換えから減数第一分裂期の細胞が観察された。その結果、微小管結合タンパク質 Altered

[162] 早稲田大学・先進理工学部・生命医科学科・佐藤研究室ホームページ
http://www.sato.biomed.sci.waseda.ac.jp/Research/pj4.html

polarity protein 7(Alp7)が動原体に局在すること、紡錘体極から伸長した放射状の微小管が動原体に結合し、これを Alp7 が促進すること、これにより染色体は紡錘体極の近くまで戻されること等が明らかになった[1](図 3-79)。次に Alp7 と同様に動原体に局在することが知られる分裂期リン酸化酵素のポロキナーゼが Alp7 をリン酸化するかどうか調べるため、リン酸化ができない Alp7 変異体を作成し、その表現型が解析された。その結果、Alp7 変異体では微小管の動原体への結合が阻害されたことから、ポロキナーゼによる Alp7 のリン酸化が微小管の動原体への結合に必要であることが明らかになった[2]。

(ⅱ)動原体の形成に働く因子の探索

動原体の正しい位置決定は、体細胞分裂と減数分裂の両方で正常な紡錘体形成に必要である。動原体の形成位置は、ヒストン H3 バリアントである Centromere protein A(CENP-A)がセントロメア領域に結合することによって決定されることが知られているが、CENP-A の結合機構は不明であった。そこで、大規模なビジュアルスクリーニングが行われ、CENP-A のセントロメア領域への結合が著しく低下し、紡錘体が維持できない変異体から動原体タンパク質 kis1[163]遺伝子が同定・命名され、これが CENP-A の局在に必須の kinetochore protein Mis18 複合体[164]の構成因子であることが明らかにされた[3](図 3-80)。

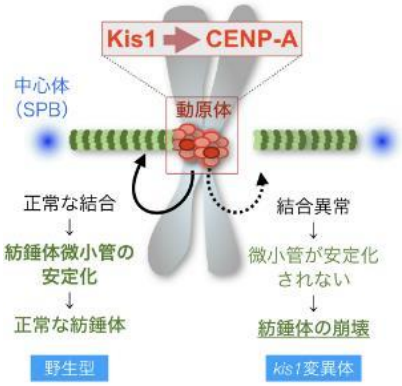


図 3-80　紡錘体が安定化するメカニズムモデル[165]

Kis1 を含む Mis18 複合体の働きで CENP-A を含むヌクレオソームがセントロメア領域に局在化でき、その結果、動原体と微小管の結合が促進される。kis1 変異体でこの結合に異常が生じると微小管は安定化されない。

また、kis1 変異体では、CENP-A が速やかに消失するにもかかわらず動原体タンパク質が動原体に存続し続けることと、CENP-A 消失後は微小管が動原体に正しく結合できないこと

[163] Kaplan integration site 1
[164] セントロメア領域のヒストン及び DNA のエピゲノム修飾を制御するタンパク質複合体
[165] 早稲田大学・先進理工学部・生命医科学科・佐藤研究室ホームページ
http://www.sato.biomed.sci.waseda.ac.jp/Research/pj4.html

から、CENP-A が微小管の捕捉に働くことが示唆された[3]。

(iii)外来遺伝子の分裂酵母染色体への導入手法開発

外来遺伝子の分裂酵母への導入及び発現を容易にすることを目的として、プラスミドからの過剰発現ではなく、染色体上に 1 コピーだけ挿入して発現させ、安定した観察結果が出る手法の確立が試みられた。その結果、染色体へノックインできるインテグレーションプラスミドが作製された[4]。

②社会・経済への波及効果

減数分裂における微小管形成に関する研究[2]では、ライブイメージング技術を開発し、減数分裂特異的な微小管制御に関わるタンパク質を同定し、減数分裂において正常に染色体分配が行われるメカニズムを解明した。この発見は日経産業新聞、朝日新聞等によっても紹介された。また、このような微小管や染色体分配の機構の解明はダウン症の疾患や不妊治療などを含めた、疾患の治療あるいは診断につながることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Okada N., Toda T., Yamamoto M., Sato M. “CDK-dependent phosphorylation of Alp7-Alp14 (TACC-TOG) promotes its nuclear accumulation and spindle microtubule assembly”, Molecular Biology of the Cell, 2014, 25(13), 1969-1982.

[2] Kakui Y., Sato M., Okada N., Toda T., Yamamoto M. “Microtubules and Alp7-Alp14 (TACC-TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation”, Nature Cell Biology, 2013, 15(7), 786-796.

[3] Hirai H., Arai K., Kariyazono R., Yamamoto M., Sato M. “The kinetochore protein Kis1/Eic1/Mis19 ensures the integrity of mitotic spindles through maintenance of kinetochore factors Mis6/CENP-I and CENP-A”, PLoS ONE, 2014, 9(11), e111905.

[4] Kakui Y., Sunaga T., Arai K., Dodgson J., Ji L., Csikász-Nagy A., Carazo-Salas R., Sato M. “Module-based construction of plasmids for chromosomal integration of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe”, Open Biology, 2015, 5(6), 50054.

④その他

佐藤は、2012 年 4 月に文部科学大臣表彰・若手科学者賞を受賞した。

3.3.7　自然免疫反応におけるシェディングの役割と制御機構(白壁恭子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

シェディングは、膜貫通型タンパク質を細胞外の膜近傍で特異的に切断し、可溶化するプロセシング機構である。しかし、シェディングターゲットの生理的な役割は明らかではなくシェディングを担うプロテアーゼの A disintegrin and metalloproteinase(ADAM)ファミリーの基質選択性や制御機構も不明な点が多い。本研究では、プロテオミクス解析という新しいアプローチを採ることにより、自然免疫反応におけるシェディングの役割と制御機構の解明を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)シェディングターゲット VIP36 の同定

マクロファージ培養細胞株を lipopolysaccharide(LPS、グラム陰性菌の細胞壁成分)で刺激すると、シェディング[166]が亢進するという知見により、LPS で刺激したマクロファージ培養上清のプロテオミクス解析が行われた[1]。その結果、vesicular integral membrane protein 36 kDa(VIP36)という膜タンパク質がシェディングターゲット候補として同定された(図 3-81)[2]。VIP36 のシェディングの結果生じる切り株タンパク質[167]の量の変化をウエスタンブロッティングで検討した結果、LPS 刺激によって切り株タンパク質が増え、VIP36 のシェディングが LPS 刺激によって亢進することが示された[2]。

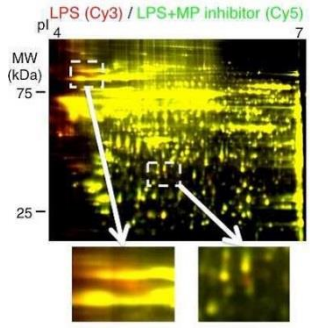


図 3-81　シェディングターゲットスクリーニング[168,[2]]

プロテオミクス解析の結果を示す。Cy3、Cy5 は蛍光色素で、赤はシェディングターゲット。左下スポットからは macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)受容体、右下スポットからは VIP36 が同定された。

---

[166] 膜蛋白質を細胞膜上で切断しその細胞外領域を放出する機構
[167] 切り株タンパク質：膜貫通型タンパク質の細胞外領域が切断された後に残るタンパク質
[168] さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 平成 23 年度終了研究課題「自然免疫反応におけるシェディングの役割と制御機構」

(ⅱ)VIP36 のシェディングの特徴

VIP36 は、高分子量型と低分子量型の 2 種が存在するが、高分子量型の VIP36 だけがシェディングされることから、糖鎖の構造に着目して両者の比較が行われた。その結果、高分子量の VIP36 が成熟した糖鎖を持ち、後期 Golgi 以降に局在することが明らかになった[1]。また、シェディングの阻害によって VIP36 が細胞表面に蓄積したことから、VIP36 のシェディングが細胞表面で起こることが示された[2]。

(ⅲ)VIP36 のシェディングの有無を決定する分子機構

VIP36 のホモログ VIPL がシェディングを受けるか検討したところ、シェディングを受けないことが明らかになった[2]。そこで、シェディングの有無を決定する分子機構を明らかにするため、これらのタンパク質のキメラを作製したところ、VIP36 の細胞膜近傍の四つのアミノ酸配列を VIPL のそれに変更するとシェディングがほとんど起こらなくなった[2]。これにより、この四つのアミノ酸配列がシェディングに関与することが明らかになった[2]。

(ⅳ)VIP36 シェディングの役割

マクロファージ細胞による病原菌の取り込みが VIP36 によって制御されている可能性が調べられた[2]。酸性環境で蛍光を発する色素を付加した大腸菌をマクロファージに取り込ませ、貪食活性を測定したところ、内在性の VIP36 の発現を抑制することで貪食も抑制され、この抑制の度合いは、VIP36 の発現抑制の度合いと対応したことから、VIP36 のタンパク質量が貪食の度合いを巧妙に制御していることが明らかになった[2]。さらに、シェディング耐性 VIP36 を強制発現しても貪食は亢進しなかったことから、細胞表面での VIP36 のシェディングが貪食の活性化に必要であることが示唆された[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Shirakabe K., Shibagaki Y., Yoshimura A., Koyasu S., Hattori S. “A proteomic approach for the elucidation of the specificity of ectodomain shedding”, Journal of Proteomics, 2014, 98, 233-243.

[2] Shirakabe K., Hattori S., Seiki M., Koyasu S., Okada Y. “VIP36 protein is a target of ectodomain shedding and regulates phagocytosis in macrophage raw 264.7 cells”, Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(50), 43154-43163.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後もマクロファージでシェディングされるタンパク質の解析が継続された。科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「蛍光シグナルを用いた膜タンパク質シェディングのイメージング」(2013 年度～2014 年度)では、シェディングをリアルタイムイメージ

ングする手法の研究が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)CADM1 のシェディング

活性化したマクロファージでシェディングされるタンパク質がプロテオミクスにより選別され、そのうち、がんを抑制する働きがある Cell Adhesion Molecule 1(CADM1:細胞間接着分子 1)について詳細な解析が行われた。その結果、mRNA 前駆体の選択的スプライシングにより複数種類の CADM1 タンパク質が作り出されること、その中でも特定のアミノ酸配列を持つ CADM1 だけがシェディングされることが明らかになった[1]。次に CADM1 のアミノ酸配列がどのようにしてシェディングされるか調べたところ、CADM1 タンパク質には切断を邪魔する糖鎖が多数付いていること、このアミノ酸配列は糖鎖が付加する部位と細胞膜表面との間に存在し、切断のハサミとなるシェディング酵素が接近するスペースを生み出していることが明らかになった(図 3-82)[1]。これにより RNA のレベルで起こる「選択的スプライシング[169]」とタンパク質のレベルで起こる「糖鎖修飾」という異なる二つの修飾機構により、作られたタンパク質がシェディングされるかどうかが厳密に決められていることが示唆された[1]。

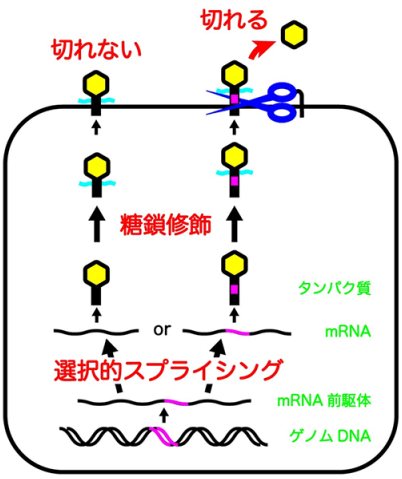


図 3-82　シェディングを決定する仕組み[170]

図はスプライシングと糖鎖修飾(水色)により、シェディングの可・不可が決定されることを示す。右側の mRNA は特定のアミノ酸配列(ピンク)を持ち、シェディング酵素が作用できる空間を持つことを示す。左側の mRNA はスプライシングにより特定のアミノ酸配列が切り取られ、糖鎖(水色)によりシェディングが阻害されることを示す。

[169] DNA からの転写過程において特定のエクソンを飛ばしてスプライシングを行うこと
[170] 国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)　プレスリリース
https://www.amed.go.jp/news/release_20170410.html

(ⅱ)ニューロン分化中の糖タンパク質のメタロプロテアーゼ依存性細胞外ドメインシェディングの解明

ニューロン分化の際に起こる細胞外ドメインシェディング事象を解明するために、広範囲のメタロプロテアーゼ[171]阻害剤である GM6001 を用いて、分化する神経芽腫細胞から放出される糖タンパク質を定量するセクレトミクス[172]が行われた[2]。高分解能質量分析装置を用いた解析結果では、分化する N1E-115 ニューロンは、メタロプロテアーゼ依存性様式で細胞接着分子に由来する多数のグリコシル化ポリペプチドを分泌することが明らかになった[2]。

②社会・経済への波及効果

選択的スプライシングや糖鎖修飾は、多くのタンパク質で普遍的に見られる修飾機構である。シェディングを受けるタンパク質が厳密に決められているという発見[1]により、これらのタンパク質の放出を選択的スプライシングや糖鎖修飾によって制御する新しい治療戦略の開発が期待される。この発見は日本経済新聞等で報道された。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Shirakabe K., Omura T., Shibagaki Y., Mihara E., Homma K., Kato Y., Yoshimura A., Murakami Y., Takagi J., Hattori S., Ogawa Y. “Mechanistic insights into ectodomain shedding: Susceptibility of CADM1 adhesion molecule is determined by alternative splicing and O-glycosylation”, Scientific Reports, 2017, 7, 46174.

[2] Tsumagari K., Shirakabe K., Ogura M., Sato F., Ishihama Y., Sehara-Fujisawa A. “Secretome analysis to elucidate metalloprotease-dependent ectodomain shedding of glycoproteins during neuronal differentiation”, Genes to Cells, 2017, 22(2), 237-244.

[171] 活性中心に金属イオンが配座しているタンパク質分解酵素の総称
[172] 分泌タンパク質の全てが分析されるプロテオミクスの一つ

3.3.8　１分子追跡によるラフト量子化信号システムの解明(鈴木健一)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

ラフトは、脂質相互作用による細胞膜上のシグナル伝達のプラットホームとして提唱されているが、ラフトの存在自体やシグナル伝達機構は未解明の課題であった。本研究課題では、細胞膜上で 2 種類の分子を同時に 1 分子ずつ観察する技術を用いて、その課題を解明し、さらにパルス的に起きる短寿命のラフト経由のシグナル伝達が、アナログ的に続く細胞のシグナルを生み出す機構を解明することを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)細胞膜上の受容体の 2 量体、多量体形成観察のための基盤技術の開発

細胞膜上でラフトの 1 分子ずつが、結合(2 量体化)しては離れる様子を全反射顕微鏡で観察するため、対象タンパク質の C 末端あるいは N 末端側に蛍光ラベルし、発現した膜分子を 95%以上の高効率でラベル化する方法が開発された[1]。

(ⅱ)定常状態の細胞膜上での glycosylphosphatidylinositol(GPI)アンカー型タンパク質の 2 量体形成機構

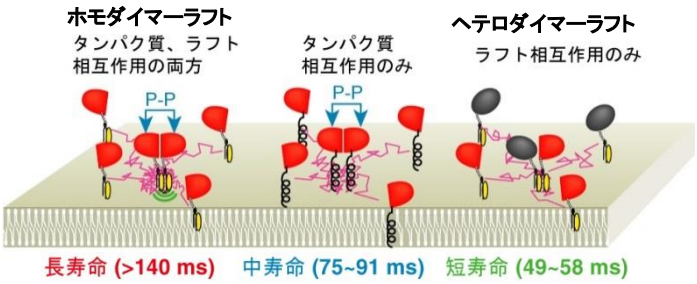


図 3-83　GPI アンカー型タンパク質 CD59 の 2 量体を安定化させる要因[173]

GPI アンカー型タンパク質 CD59 同士は、タンパク質(赤)間相互作用によるホモ 2 量体形成と脂質相互作用(黄色)により安定化される(左)。タンパク質部分(赤+コイル)だけで、ラフト相互作用部分がない変異体では、タンパク質相互作用で 2 量体は誘起されるが安定性が低い(中央)。他の GPI アンカー型タンパク質(右の黒丸)と、CD59 とのヘテロ 2 量体では、タンパク質相互作用がないため、ラフト相互作用のみでは、安定で寿命の長い 2 量体は形成されない(右)。

[173] 岐阜大学　細胞生物物理学研究室ホームページ　https://www1.gifu-u.ac.jp/~single/Research.html

CD59 というラフト親和性の GPI アンカー型受容体補体制御タンパク質のホモ 2 量体形成時間は、平均 160msec 間と長く、比較的長寿命の 2 量体を形成するが(図 3-83 左)、細胞膜からコレステロールを除去すると CD59 の 2 量体の寿命は半分になった(図 3-83 中央)。このことは、コレステロールと GPI アンカー鎖との脂質相互作用が CD59 の 2 量体を安定化させることを示唆している[2]。一方、CD59 の脂質部分との相互作用がない LDL 受容体の膜貫通ドメインの融合タンパク質のホモ 2 量体の寿命は、CD59 の半分程度と短く、脂質相互作用が CD59 の 2 量体を安定化させることが裏付けられた。CD59 と他の GPI アンカー型タンパク質とのヘテロ 2 量体の寿命は、49～58msec と短くなった[2](図 3-83 右)。以上より、GPI アンカー型タンパク質の 2 量体形成は、タンパク質相互作用によって誘起され、脂質相互作用がそれを安定化していることが示唆された[2]。

(iii)定常状態及びリガンド刺激後の細胞膜上での CD59 の多量体形成

CD59 は、補体のコンプレックス(membrane attack complex(MAC))の自己攻撃から形質膜を守る機能を持つ。リガンドである MAC が結合すると CD59 は安定な 4 量体を形成するが、これはコレステロールの除去により阻害されたことから、ラフト相互作用がリガンド刺激による安定的な CD59 ホモ 4 量体の形成に必須であることが示唆された[2]。また、MAC により誘起される CD59 ホモ 4 量体は、他のラフト分子、GM3 や GM1 などのガングリオシドをリクルートして安定したクラスターラフトを形成し、これが運動しては一時停留する挙動を示し、細胞内カルシウム応答を誘起していることが明らかになった[2]。

(iv)ラフト研究における細胞膜化学固定法の考案

ラフト親和性分子の細胞膜上での分布を研究する上で、しばしば細胞膜の化学固定が行われている。しかし、固定が不十分であるために、その後の免疫染色時に使用する抗体で膜分子が架橋されてしまい、今までのほとんどの報告では本来の分布を調べることができていなかった。この問題を解決するために、様々な方法での化学固定の後に、GPI アンカー型タンパク質、細胞膜内層の脂質アンカー型シグナル分子など、多くのラフト親和性分子の拡散挙動を 1 分子イメージングで追跡した[3]。その結果、脂質アンカーされた分子のどれもが、グルタルアルデヒド固定後でさえも運動を止めることはなく、これらの分子の分布は、生細胞膜上で観察するしかないことが明らかとなった[3]。一方、膜貫通型タンパク質で脂肪酸修飾されたラフト親和性分子の場合には、パラホルムアルデヒド＋グルタルアルデヒドの固定後にほぼ運動を停止していたため、化学固定法が有効であることが明らかとなった[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Suzuki K.G.N., Kasai R.S., Fujiwara T.K., Kusumi A. “Single-Molecule Imaging

of Receptor-Receptor Interactions”, Methods in Cell Biology, 2013, 117, 373-390.

[2] Suzuki K.G.N., Kasai R.S., Hirosawa K.M., Nemoto Y.L., Ishibashi M., Miwa Y., Fujiwara T.K., Kusumi A. “Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function”, Nature Chemical Biology, 2012, 8(9), 774-783.

[3] Tanaka K.A.K., Suzuki K.G., Shirai Y.M., Shibutani S.T., Miyahara M.S., Tsuboi H., Yahara M., Yoshimura A., Mayor S., Fujiwara T.K., Kusumi A. “Membrane molecules mobile even after chemical fixation”, Nature Methods, 2010, 7(11), 865-866.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科研費基盤研究(B)「高精度1分子観察によるラフトシグナル機構の解明」(2012年度～2014年度)では、GPIアンカー型タンパク質と糖脂質(ガングリオシド)の挙動に着目した研究が行われた。また、科研費挑戦的萌芽研究「細胞膜上のデジタル式シグナル変換システムの解明(2015年度～2016年度)では、細胞全体のシグナルと1分子レベルのパルスとの関係について研究が行われた。科研費基盤研究(B)「高精度1分子観察による基本ユニットラフト仮説の検証」(2015年度～2017年度)では、ガングリオシド蛍光プローブの開発と、それを用いた糖脂質ラフトユニットの解析が行われ、現在も継続中である。

科研費新学術領域研究(研究領域提案型)解き明かす生命現象「リポクオリティとラフト構造・機能の相関の高精度1分子観察による解明」(2016年度～2017年度)および科研費「膜微小ドメインによるAMPA受容体チャネル活性制御：超高精度1分子法による解明」(2017年度～2018年度)は、現在継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)CD59ホモ4量体の一時停留機構と生理的意義

CD59ホモ4量体は、平均0.6秒間ずつ一時停留を繰り返しながら、細胞膜上を拡散していたが、ホモ4量体が形成されないと一時停留は見られず、シグナル伝達も観察されなかった。また、アクチン線維を破壊すると、一時停留が劇的に減少した[174]。さらに、CD59ホモ4量体がアクチン線維上で一時停留し、下流分子へとシグナルを伝え、細胞質内のIP3(イノシトール三リン酸)の濃度を上昇させ、その後、細胞内カルシウム応答が誘導されることが明らかになった。これらの結果に基づき、一時停留がシグナル伝達のプラットホームとして働くモデルが提案された(図3-84)[174]。

[174] Suzuki K.G.N., Ando H., Komura N., Konishi M., Imamura A., Ishida H., Kiso M., Kusumi A. “Revealing the raft domain organization in the plasma membrane by single-molecule imaging of fluorescent ganglioside analogs”, Methods in Enzymology, 2018, 598, 267-282.

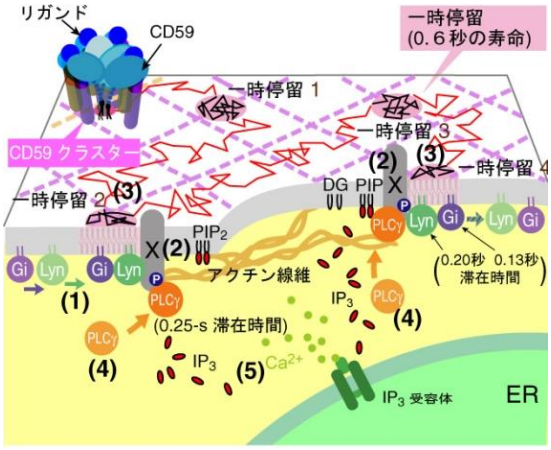


図 3-84　一時停留部位で、シグナル分子が集まり下流にシグナルが伝わるモデル図[175]
リガンド結合により受容体 CD59 のホモ 4 量体が形成されると、安定なラフトができる。このホモ 4 量体ラフトは膜上を動き回り、アクチン線維上での一時停留時に下流のシグナル伝達のプラットホームとして働く。赤線は CD59 ホモ 4 量体の軌跡、ピンクは一時停留位置を示す。

(ⅱ)ラフトマーカー、ガングリオシド蛍光プローブの作成

GPI アンカー型タンパク質以外に、代表的なラフト分子として知られる糖脂質(ガングリオシド)の動態解明を目指した。ガングリオシドの局在を調べるため、モノシアルガングリオシド(GM)の GM1、GM2、GM3、及びジシアルガングリオシド(GD)の GD1b に、親水性蛍光色素を結合させた誘導体が合成され、顕微鏡観察の結果、いずれの誘導体もラフトマーカーとして働くことが確認された 174.[1-3]。

(ⅲ)シグナル伝達における脂質ラフトの挙動

CD59 がホモ 2 量体を形成し安定化する時、他のラフト分子をリクルートするかどうかが調べられた。CD59 を抗体で架橋し、1μm^{2}以上の大きさのパッチ(ラフト様の膜領域)を形成させ、そのパッチ内外で GM1 や GM3 の蛍光プローブの分子密度を定量した[3]。その結果、GM1、GM3 共に CD59 パッチの内外で拡散していたが、パッチ内での滞在時間がやや長かった(図 3-85)。また、GM1、GM3 プローブが CD59 パッチの内外の境界線に近づくと跳ね返されて、パッチ内に戻る様子もしばしば観察された[3]。これにより、CD59 は大パッチを形成すると GM1、GM3 のような他のラフト分子を一時的に呼び寄せ、大きなラフトドメインを形成することが明らかになった[3]。

[175] 生物物理学会　http://www.biophys.jp/highschool/A-23.html

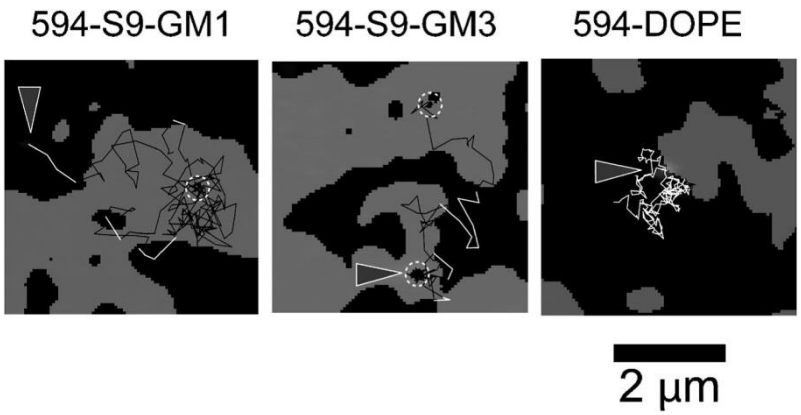


図 3-85　CD59 の大パッチと GM1、GM3、DOPE 1 分子との 2 色同時観察[176]

灰色の面は CD59 の大パッチで、GM1 誘導体(左)と GM3 誘導体(中)の動きを、CD59 パッチ内は黒い軌跡、外は白の軌跡で示す。点線の円は一時停留領域を示す。矢じりは、軌跡の終わりの位置。GM1(左)、GM3(中央)共に CD59 パッチ内外の両方で拡散していた。右はコントロールで、非ラフトで不飽和リン脂質の DOPE(dioleoylphosphatidylethanolamine)の軌跡。CD59 パッチ外(黒い面)で拡散していることが圧倒的に多く、CD59 パッチの境界線に近づいても、パッチ外へ跳ね返される様子が頻繁に見られた。

次に、生理条件に近い系で調べるため、刺激前後の CD59 へのガングリオシド蛍光プローブのリクルート時間を測定した。その結果、刺激後の CD59 ホモ多量体では 48msec、刺激前の CD59 ホモ 2 量体では 40msec、CD59 単量体では 12msec の間、GM1・GM3 ガングリオシド蛍光プローブとの共局在が観察された(図 3-86)[3]。これにより、CD59 が単量体、2 量体、安定な多量体へと会合度を上げて行くにつれ、ガングリオシドの CD59 への共局在時間が長くなることが明らかになった[3]。さらに最近、他の代表的ラフト脂質分子であるスフィンゴミエリン蛍光プローブの開発にも成功し、CD59 の会合度が上がるにつれて、スフィンゴミエリン蛍光プローブの共局在時間が長くなることが明らかになった[2]。すなわち、CD59 は刺激依存的に 4 量体を形成し、他のラフト脂質分子をリクルートすることにより、安定なラフトを形成していることが明らかとなった。

[176] 公益社団法人日本生化学会
https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2017.890121/data/index.html

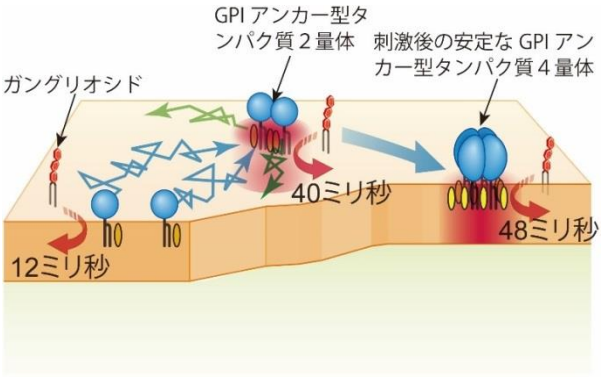


図 3-86　ガングリオシドの CD59 へのリクルート[177]

ガングリオシドは、CD59 単量体では 12msec、2 量体では 40msec、安定化された 4 量体では 48msec 間リクルートされた。青は CD59(GPI アンカー型タンパク質)、赤はガングリオシド。

②社会・経済への波及効果

脂質ラフトは、アルツハイマー病、HIV、C 型肝炎ウイルス、プリオン病などの感染症の発症にラフト経由で関与するといわれており、ラフトを介したシグナル機構の解明は、これらの疾病の研究に貢献することが期待される。

上記のシグナル伝達における脂質ラフトの安定化の発見[3]は、日経バイオテク、産経新聞、や日刊工業新聞などでも報じられた。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Suzuki K.G.N., Ando H., Komura N., Fujiwara T.K., Kiso M., Kusumi A. “Development of new ganglioside probes and unraveling of raft domain structure by single-molecule imaging”, Biochimica et Biophysica Acta, 2017, 1861(10), 2494-2506.

[2] Kinoshita M., Suzuki K.G.N., Matsumori N., Takada M., Ano H., Morigaki K., Abe M., Makino A., Kobayashi T., Hirosawa K.M. “Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluoresscent sphingomyelin analogs”, J. Cell Biol., 2017, 216, 1183-1204.

[3] Komura N., Suzuki K.G.N., Ando H., Konishi M., Koikeda M., Imamura A., Chadda R., Fujiwara T.K., Tsuboi H., Sheng R., Cho W., Furukawa K., Furukawa K., Yamauchi Y., Ishida H., Kusumi A., Kiso M. “Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor”, Nature Chemical Biology, 2016, 12(6), 402-410.

[177] 岐阜大学　細胞生物物理学研究室　https://www1.gifu-u.ac.jp/~single/research.html

3.3.9　指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明(鈴木孝幸)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

胎児期において、モルフォゲンとしての分泌因子の濃度勾配が、どのように時空間的に組織に作用し、似て非なる組織や器官ができるのかという動的な知見はこれまでほとんど報告されていない。本研究では、ニワトリ胚後肢の発生をモデルシステムとして、動的な形態変化の定量化、特徴的な形態変化を誘導するシグナルの解析、発光 in vivo イメージング法の確立と形の変化との関係を調べる新しい解析方法の樹立を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)ニワトリ胚後肢の発生における形態変化の定量的解析

肢芽の遠近軸の長さが 12 時間おきに測定され、各大きさにおけるニワトリ胚後肢肢芽の数十個単位の細胞集団が蛍光ラベルされ、次に行き先が説明できる肢芽の組織の 2 次元変形パターンが推定された(図 3-87)[1],[2],[3]。さらに、背腹軸に沿った肢芽の厚み成分の情報と 2 次元における肢芽の変形パターンのデータを合わせることにより、組織の三次元における変形パターンが定量的に解析され、これまでは見ることのできなかった超多細胞集団の組織の動的な変形パターンの解析が可能になった。その結果、時空間的に肢芽の伸長には三つの特徴的領域があり(後述)、特に小指の部分を形成する肢芽の後側の領域は、sonic hedgehog(SHH)のシグナルが最も強く活性化する時期と領域で変形が大きく見られることが明らかになった[1],[2]。

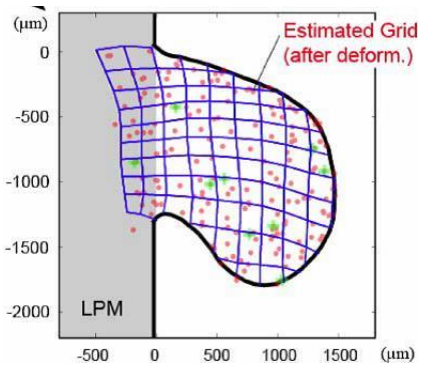


図 3-87　肢芽の変形パターン[178]

変形後に推定される肢芽のパターンを示す。点は蛍光色素。

[178] 文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究」平成 22 年度～26 年度
http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/d_biosci/cross-talk/jpn/selected/201330.html

（ⅱ）肢芽の変形に関わるシグナル

それぞれの肢芽の変形時にどのようなシグナルが必要であるかを調べるため、肢芽の発生に関与するとされる fibroblast growth factor(FGF)と SHH について、阻害剤をアクリルビーズに吸着させ、肢芽に移植した結果、FGF シグナルは、肢芽の先端部分と後側の部分の増殖に、SHH シグナルは、肢芽の後側の部分の増殖にのみ必須であることが明らかになった[1]。

(ⅲ)FGF シグナルと SHH シグナルが働く領域

FGF シグナルが活性化すると Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2(Erk1/2[179])が活性化することから、リン酸化 Erk1/2 の活性化を認識する抗体の染色で調べた結果、肢芽の先端部分の領域の変形が大きいタイミングで FGF シグナルの活性化状態が強いことが明らかになった[1]。

また、SHH の転写因子の結合配列を標識し、SHH シグナルが活性化された細胞だけを発光させた結果、SHH シグナルは肢芽が伸長するに従って細胞内での活性化量が大きくなり、小指ができる肢芽の後側領域の成長率が大きい時にシグナルの活性化量も大きいことが明らかになった[1]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Morishita Y., Kuroiwa A., Suzuki T. “Quantitative analysis of tissue deformation dynamics reveals three characteristic growth modes and globally aligned anisotropic tissue deformation during chick limb development”, Development (Cambridge), 2015, 142(9), 1672-1683.

[2] Suzuki T., Morishita Y. “A quantitative approach to understanding vertebrate limb morphogenesis at the macroscopic tissue level”, Current Opinion in Genetics and Development, 2017, 45, 108-114.

[3] Morishita Y., Suzuki T. “Bayesian inference of whole-organ deformation dynamics from limited space-time point data”, Journal of Theoretical Biology, 2014, 357, 74-85.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後もニワトリを用いた肢芽の組織レベルの変形パターン解析と手法の開発に関連した研究が行われた：科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「肢芽をモデルとした細胞集団から形態形成をつなぐロジックの解明」(2011 年度～2012 年度)および科研費新

[179] 細胞外シグナル調節キナーゼ

学術領域研究(研究領域提案型)「細胞動態と生化学場との統合による Anisotropy を生み出す力学場の解明」(2013 年度～2014 年度)。また、若手研究(B)「指の発生における PFR の細胞群の動的な作用機序の解明」(2011 年度～2012 年度)では、指間部の SHH シグナルに関する研究、科研費基盤研究(B)「チューリングではなく一方向阻害モデルによる指の個性と本数の決定原理の解明」(2013 年度～2015 年度)では、指の軟骨原器発生に関する研究が行われた。科研費基盤研究(C)「マクロからミクロへ：トップダウンアプローチによる階層を超える形態形成の理解」(2015 年度～2017 年度)では、上記の研究を行うための新規機器の開発が行われた。

科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「モルフォゲンに依存しない上皮の配向した力学的拘束による肢芽の伸長機構の解明」(2016 年度～2017 年度)および科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「特定の体節数で後肢形成が開始される機構の解明」(2017 年度～2018 年度)は現在継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ｉ)ニワトリ肢芽のマクロな形態変化

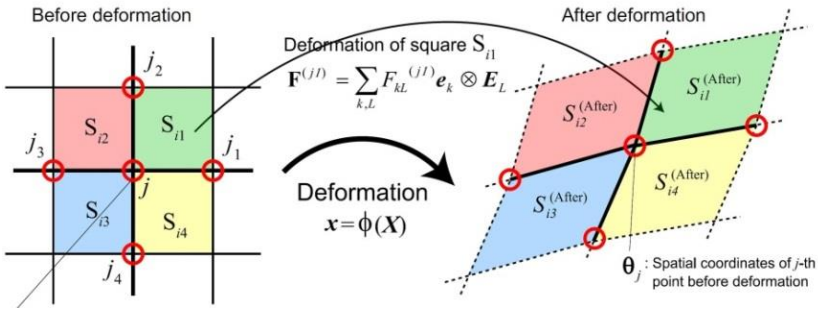


図 3-88　細胞集団の変形パターン[180]

左は、肢芽の変形前の細胞集団が格子で区切られた正方形の形状を示す。右は、変形後の細胞集団のひし形へのバイアス伸長を示す。

本研究領域で開発された細胞群の変形を解析する手法を用いて、ニワトリの肢芽全体がどのように形態変化していくのかマクロな形態変化が解析された。その結果、組織全体にわたって、正方形に区切られた細胞集団は、ひし形へと滑らかにバイアス伸長することが明らかになった(図 3-88)。FGF や SHH の発現パターンと組織の増殖パターンが比較された[181,182]

[180] 科研費報告書　https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25291050/

[181] Morishita Y., Kuroiwa A., Suzuki T. “Quantitative analysis of tissue deformation dynamics reveals three characteristic growth modes and globally aligned anisotropic tissue deformation during chick limb development”, Development (Cambridge), 2015, 142(9), 1672-1683.

[182] Morishita Y., Suzuki T. “Bayesian inference of whole-organ deformation dynamics from limited space-time point data”, Journal of Theoretical Biology, 2014, 357, 74-85.

[1],[2]。また、FGF や SHH の発現領域と増殖パターンの比較により、FGF や SHH などのモルフォゲンが作用していない領域においても肢芽全体の組織が遠近両方向にバイアスしてストレッチしていることが明らかになった。これにより、これまでの肢芽の伸長過程では遠位側の増殖率が高いという見解と異なり、肢芽全体の組織が遠近方向に沿ってバイアスして伸長するということが明らかになった[181,182]。

(ⅱ)GDF11 によって調整される四足動物での後肢の位置の変化

四肢の進化において、後肢の位置は脊椎の形成に伴って多様化しているが、この調整に関与する機構は十分に理解されていない。そこで、この調節に関与する分子の候補として TGFβ スーパーファミリーのメンバーである Growth differentiation factor 11(GDF11)に焦点を当てた解析が行われた。その結果、軸索中胚葉から分泌された GDF11 が、軸索中胚葉及び側板中胚葉の両方で Hox 遺伝子発現を誘導することによって、仙骨椎骨の統合及び後肢の位置決めが行われることが明らかになった[1]。また、後肢のポジショニングの進化的多様性は、GDF11 発現の時間的ずれが前後軸に沿った仙骨-後肢ユニットの調整のずれにつながったことに起因すると示唆された[1]。

(ⅲ)ウズラ多肢症の分子プロファイル

遺伝性多発奇形(HMM)は、日本のウズラに見られる自然発生の単一の常染色体劣性致死遺伝子(hmm)の突然変異により起こる。その多肢症を引き起こす細胞機構を同定するため、hmm ホモ接合性変異体(hmm -/-)の分子プロファイルが行われた。hmm -/-では、SHH シグナリングが欠失しており、The Zone of Polarizing Activity(ZPA)[183]が分極活性を示さないことが明らかになった[2]。また、hmm -/-では、大量の GLI3A タンパク質(抑制型の Gli 転写因子)が発現され、核に局在することから、GLI3 の調節機構に欠陥があることが示唆された[2]。

②社会・経済への波及効果

SHH シグナルが正常に機能しないと、多指症などの新生児の奇形につながることが知られている。本研究における胎児期における発生のメカニズムの研究は、親指を 2 本持って生まれる多指症の遺伝子検査などヒトへの応用も期待される。この成果の内容は 2011 年 4 月 30 日の四国新聞で報道された。

また、サリドマイド催奇性における主要な標的因子である cereblon (CRBN:セレブロン)が単離・同定され、その分子機構が解明され、四肢の構造が哺乳類により近いニワトリについても、セレブロンがサリドマイドの催奇性の鍵を握ることが明らかになった[184]。現在、サ

[183] 四肢の発生を制御する重要部分で、SHH が ZPA で産生されることで四肢に小指の側から親指側の極性が作られることが知られている。

[184] Ito T., Ando H., Suzuki T., Ogura T., Hotta K., Imamura Y., Yamaguchi Y., Handa H. “Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity”, Science, 2010, 327(5971), 1345-1350.

リドマイド誘導体のレナリドマイド及びポマリドマイドサリドマイドが抗炎症剤や抗がん剤として再び米国 Celgene 社から販売されており、CRBN をコアにした下流因子や関連因子などから成るネットワークやその制御機構を解明し、薬剤による治療メカニズムの理解を深めることで、CRBN ネットワークの中から疾患の予防・診断・治療に最適な創薬ターゲットが発掘され、副作用がなく、優れた治療効果を発揮する次世代薬剤が開発されることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Matsubara Y., Hirasawa T., Egawa S., Hattori A., Suganuma T., Kohara Y., Nagai T., Tamura K., Kuratani S., Kuroiwa A., Suzuki T. “Anatomical integration of the sacral-hindlimb unit coordinated by GDF11 underlies variation in hindlimb positioning in tetrapods”, Nature Ecology and Evolution, 2017, 9, 1392-1399.

[2] Matsubara Y., Nakano M., Kawamura K., Tsudzuki M., Funahashi JI., Agata K., Matsuda Y., Kuroiwa A., Suzuki T. “Inactivation of Sonic Hedgehog Signaling and Polydactyly in Limbs of Hereditary Multiple Malformation, a Novel Type of Talpid Mutant”, Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2016, 4, 149.

3.3.10　植物表皮組織における気孔パターン形成の動的ネットワーク(鳥居啓子)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

植物の表皮に散在する気孔は、水や二酸化炭素の通気口として光合成や呼吸を制御している。本研究では、葉の発生過程において未分化細胞のシートから自律的に気孔系譜となる細胞が決定され、パターン形成が起こる分子基盤と制御ネットワークの動態を、シロイヌナズナをモデル植物としてナノ材料工学・数理モデルなど異分野融合型研究により明らかにすることを目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)気孔の初期パターン形成における細胞間相互作用のダイナミクスの可視化

・気孔系譜[185]の最初の決定プロセスと側方阻害[186]

未分化な原表皮細胞から気孔系譜が発生するには、basic helix-loop-helix(bHLH)型転写因子 SPEECHLESS(SPCH)及び転写因子 SCREAM(SCRM と SCRM2)が必要である。また、初期気孔系譜細胞(メリステモイド母細胞)は、非対称分裂を阻害するペプチドシグナル遺伝子 epidermal patterning factor 2(EPF2)を発現する。本研究では遺伝子発現とタンパク質蓄積の時空間制御が解析された。その結果、均一な未分化細胞から、SPCH、次いで SCRM が発現する。SPCH-SCRM 転写因子 2 量体をより多く蓄積した細胞は、分泌ペプチドシグナル EPF2 を誘導・分泌する。次いで EPF2 は隣接細胞へと移動し、受容体シグナル伝達を介して SPCH-SCRM 2 量体を分解し、隣接細胞が気孔系譜の細胞集団に入らないよう阻害するという Activator-Inhibitor モデルが示された[1]。

・芽生え表皮のライブイメージング法の開発と気孔を作る転写因子の時空間動態

共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用い、発芽過程における表皮組織の分化をリアルタイムに観察する長期間ライブイメージング法が開発され、気孔系譜の形成過程でのマスター転写因子の時空間動態が観察された。側方阻害 [186] が起こる以前に、隣接表皮細胞の核に SCRM-GFP タンパク質が蓄積することから、隣接表皮細胞は、気孔系譜のバックアップである可能性が示唆された[3]。

(ⅱ)気孔の数と分布を制御するペプチドシグナルの受容メカニズムと作用機作の解明

気孔の前駆体細胞において、隣接表皮細胞の受容体キナーゼ(ERECTA:ER、ER-LIKE1:ERL1)

[185] 孔辺母細胞となり、最終的に孔辺細胞へと分化する細胞系譜
[186] 側方抑制(lateral inhibition)ともいう。発生過程で細胞の運命決定が行われる際、細胞間シグナル伝達経路を介して隣接する細胞が特定の運命をたどることを抑制する現象

及び TOO MANY MOUTH(TMM)受容体に結合し、気孔の数と分布を調節すると考えられているペプチド epidermal patterning factor 1/2(EPF1/2)の相互作用について調べた結果、EPF ペプチドは、ERECTA ファミリーに直接結合することと同時に、EPF2-ERECTA と EPF1-ERL1 という二つのリガンド-受容体のペアが、気孔形成の開始と気孔前駆体細胞の分化という二つの重要なステップをそれぞれ制御していることが明らかになった(図 3-89)[2]。

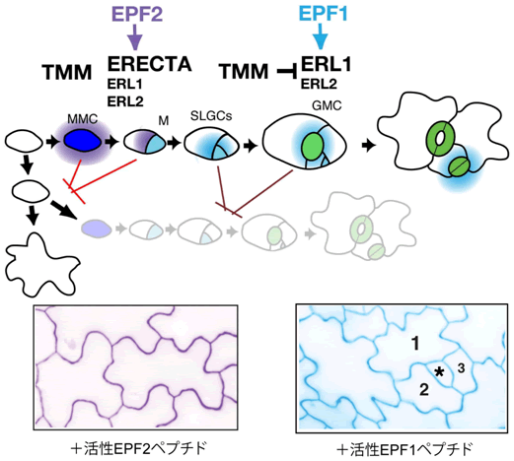


図 3-89　EPF ペプチドと受容体による気孔の発生と分布の制御[187]

上図は気孔の発生を示す。EPF2(紫)は、気孔へと分化し始めた初期の細胞(Meristemoid mother cell:MMC)(青)から分泌され、ERECTA 受容体を介して隣接する細胞が気孔を形成し始めないように制御する(赤線)。一方、EPF1(水色)は気孔後期の前駆体細胞(Guard mother cell:GMC)から分泌され、ERL1 受容体を介して気孔が隣接してできないよう、分布を制御する(赤紫線)。下図は気孔の分布を示す。活性 EPF2 で処理した植物では、気孔への分化が始まらない(下左)。活性 EPF1 で処理した植物では、非対称分裂(順番に 1-3)を行うが、その後、分化を停止する(★印)(下右)。

(iii)植物の幹細胞：気孔の幹細胞を特徴付ける遺伝子群の発見

メリステモイド細胞[188]は、低頻度で一過的に存在するため、その単離と特徴づけは困難であったが、新たに転写遺伝子の突然変異体の組合せにより、表皮のほぼ全てがメリステモイド細胞になる植物が作出された。それら遺伝子産物の解析から、新奇タンパク質 POLAR が発見された。このタンパク質は、メリステモイドの細胞表層に均一に存在しており、非対称分裂直前(1～2 時間前)に分裂面から遠心端へと移動することが見出され、気孔系譜の極性に深く関わっていることが示唆された[189]。

[187] 科学技術振興機構報　第 856 号　http://www.jst.go.jp/pr/info/info856/index.html
[188] 孔辺母細胞となり、最終的に孔辺細胞へと分化する初期気孔系譜細胞
[189] Pillitteri L.J., Peterson K.M., Horst R.J., Torii K.U. “Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and commonalities among stem cell populations in Arabidopsis”, Plant Cell, 2011, 23(9), 3260-3275.

③研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内

[1] Hara K., Yokoo T., Kajita R., Onishi T., Yahata S., Peterson K.M., Torii K.U., Kakimoto T. “Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in arabidopsis leaves”, Plant and Cell Physiology, 2009, 50(6), 1019-1031.

[2] Lee J.S., Kuroha T., Hnilova M., Khatayevich D., Kanaoka M.M., Mcabee J.M., Sarikaya M., Tamerler C., Torii K.U. “Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning”, Genes and Development, 2012, 26(2), 126-136.

[3] Guseman J.M., Lee J.S., Bogenschutz N.L., Peterson K.M., Virata R.E., Xie B., Kanaoka M.M., Hong Z., Torii K.U. “Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis chorus (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8)”, Development, 2010, 137(10), 1731-1741.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も植物の気孔形成とペプチドホルモンに関する研究が継続して行われた。科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「植物表皮の幹細胞維持と分化の制御ロジックに関わる内的因子と新奇化合物の探索」(2014年度～2015年度)では、気孔形成を促進させる新規化合物の探索が行われた。

科研費基盤研究(B)「植物の背丈伸長を制御するペプチドリガンドー受容体ペアのシグナル伝達と特異性の解析」(2014年度～2016年度)では、気孔形成に働くEPFペプチドの植物の背丈伸長における機能解析が行われた。

科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「新奇化合物を用いた植物気孔の発生ロジックの理解と操作」(2016年度～2017年度)と科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「植物幹細胞の一過性と永続性を制御する分子メカニズムの解明」(2017年度～2021年度)は、現在継続中である。

①科学技術の進歩への貢献

(ｉ)二つの相反するペプチドホルモンの競合による気孔数の分布の制御

EPF2ペプチドと類似したペプチドとしてストマジェン(EPF-LIKE9)が知られている。ストマジェンは、EPF2 とは逆に気孔を作ることが知られているが、その気孔分化促進への作用は不明であることから、このメカニズムの解明に向けた研究が行われた。まず、ストマジェンとERECTAファミリーとの遺伝学的相互作用と免疫沈降、EPF2とのペプチド競合アッセイによる解析が行われた。その結果、ストマジェンの気孔形成効果は、ERECTA 受容体の存在に依存すること、ストマジェンはERECTA受容体に直接結合すること、ERECTAへの結合に関

してストマジェンと EPF2 は競合し(図 3-90 a)、EPF2 濃度に対するスマトジェン濃度の増加に伴い、気孔の数も増加傾向を示すことが明らかになった(図 3-90 b)[1]。その結果、ERECTA 受容体を EPF2 が ON にし、逆にストマジェンが OFF にすることが示唆された[1]。これをさらに検証するため、シロイヌナズナ芽生えに EPF2 とストマジェンペプチドを添加し、ERECTA 受容体シグナルの下流で働く mitogen-activated protein kinase(MAP kinase)の活性化が調べられた[1]。その結果、EPF2 添加後には MAP kinase が活性化したが、ストマジェン添加では活性化しなかったことから、EPF2 は ERECTA 受容体シグナル伝達のアゴニストとして、一方、ストマジェンはアンタゴニストとして働き、これら 2 種類の相反するペプチドの競合作用により、適切な気孔の数と分布が決まることが示唆された[1]。

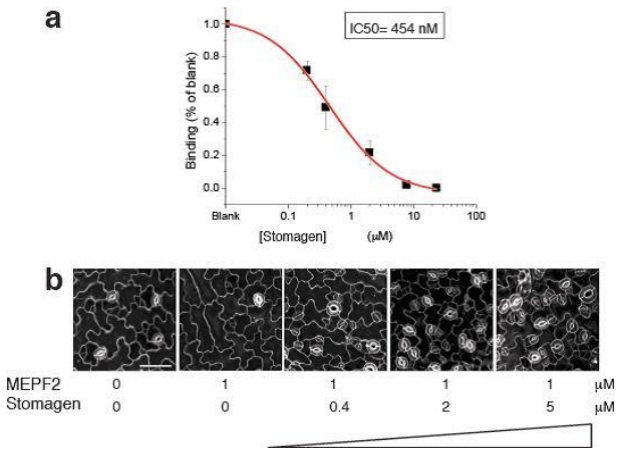


図 3-90　ストマジェンの EPF2 に対する競合的な ERECTA 受容体への結合[190]

a は、ストマジェン添加量を増加させると ERECTA 受容体に結合する EPF2 の量が減少することを示すグラフで、縦軸は ERECTA 受容体に結合する EPF2 の割合、横軸はストマジェン添加量を示す。b は、ERECTA 受容体に対し一定濃度の MEPF2(活性型 EPF2)を添加し、そこに添加するストマジェンの濃度を増加させた時の気孔の分布と数を示した写真で、左端はコントロールである。MEPF2 添加で気孔の数は減少し、ストマジェンの濃度増加で気孔の数は増加した。

(ⅱ)気孔を増やす化合物の合成

植物の気孔の増加は、二酸化炭素削減やバイオマス生産といった地球環境に大きな影響を及ぼすという観点から、これまでに気孔を増やすペプチドや化合物が合成されたが、ペプチド合成にはコストがかかり、化合物は植物の成長を阻害する作用を有する等の問題点があった。そこで、気孔を増やし、植物に害のない化合物の合成が試みられた。

シロイヌナズナを用いて、トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM)の所有する化合物ライブラリー中から気孔を増やす作用のある化合物を新たに同定し(図 3-91 中央)、こ

[190] 名古屋大学　研究教育成果情報　プレスリリース　2015/06/18
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/index.html

の化合物から毒性を除去するために分子同士を簡便に連結させる C-H 活性化反応を駆使して多数の類縁体を合成し、その中から成長阻害の副作用無しに気孔を増加させる化合物が合成された(図 3-91 右)[2]。

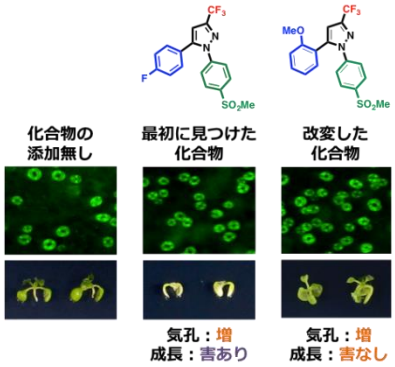


図 3-91　気孔を増やし植物に害のない化合物の合成[191]

中央が ITbM 化合物ライブラリーから同定した化合物で、気孔を増やすが成長阻害がある。右はそれを改変した化合物で気孔を増やし成長阻害がない。

(iii)植物の葉をギザギザにする物質の発見

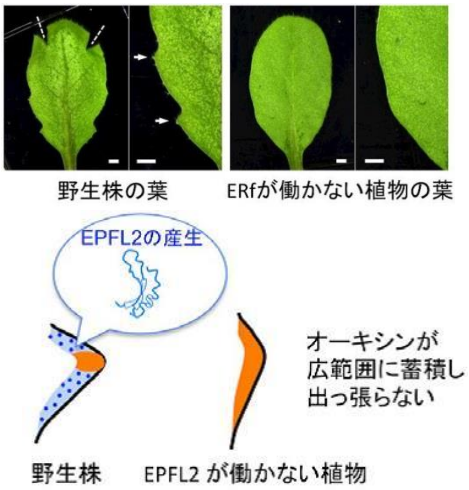


図 3-92　EPFL2 とオーキシンのフィードバック制御[192]

上の写真は、EPFL2 欠失変異体(右)では野生型で見られる鋸歯(左)が形成されないことを示す。下図の左は EPFL2 が作られる鋸歯裾野部分(水色)ではオーキシン(オレンジ)が蓄積せず、オーキシンが蓄積する先端部では EPFL2 が生成しないことを示す。下図の右は EPFL2 欠失変異ではオーキシン(オレンジ)が裾野まで広がるため鋸歯の突起ができないことを示す。

[191] 名古屋大学　トランスフォーマティブ生命分子研究所　研究ハイライト
http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/2017/09/CC-Plantpores.php
[192] 名古屋大学　トランスフォーマティブ生命分子研究所　研究ハイライト
http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/2016/09/Leaf-Teeth.php

EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE(EPFL)ファミリーのペプチドは、植物の気孔形成に働くことが知られている。そのうちEPFL2は近年発見されたペプチドで、その機能は不明であったことから、シロイヌナズナを用いてEPFL2の機能解析が行われた。EPFL2欠失変異体では、葉の鋸歯が形成されないことから、EPFL2は鋸歯の形成に働く物質であることが明らかになった(図3-92上)[3]。次にEPFL2の受容体を探すため、鋸歯が無い変異体の遺伝学的解析と免疫沈降法により、ERECTAファミリー受容体がEPFL2の受容体であることが明らかになった[3]。これまで、植物ホルモンのオーキシンは成長している葉の突起の先端部に蓄積し、周辺の裾野部分には蓄積しないことが知られていたが、その仕組みは不明であったことから、EPFL2とオーキシンの関係について検討された。その結果、EPFL2はオーキシンの蓄積を抑える働きがあることが明らかになった(図3-92下左)[3]。さらに、オーキシンが蓄積すると、そこではEPFL2が作られず、結果としてEPFL2は鋸歯の先端部では作られず、裾野部分でのみ作られることが明らかになった(図3-92下左)[3]。以上の結果から、EPFL2がオーキシンの蓄積場所を決め、オーキシンがEPFL2の生成場所を決めるというフィードバック制御が葉の鋸歯形成に働くことが示された[3]。

②社会・経済への波及効果

植物の気孔の研究は、二酸化炭素削減やバイオマス生産の観点から、地球環境の維持にとって極めて重要である。

また、2種類の分泌性ペプチドホルモンが一つの受容体を奪い合い、それぞれ気孔の形成と抑制の反対の作用を有するという発見[2]は、科学上の重要な発見というにとどまらず植物の生長と生存の制御を可能にする可能性があり、農業上での利用も期待される。この発見は日本経済新聞や科学新聞でも報じられた。

また、EPFL2ペプチドが鋸歯のある葉を作る仕組みの解明[3]は、他の植物の葉の形状にも発展する可能性があり、レタスや水菜など葉野菜の形状を変える付加価値として、あるいは盆栽や観葉植物などの改良につながる可能性がある。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

[1] Lee J.S., Hnilova M., Maes M., Lin Y.C.L., Putarjunan A., Han S.K., Avila J., Torii K.U. “Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning”, Nature, 2015, 522(7557), 439-443.

[2] Ziadi A., Uchida N., Kato H., Hisamatsu R., Sato A., Hagihara S., Itami K., Torii K.U. “Discovery of synthetic small molecules that enhance the number of stomata: C-H functionalization chemistry for plant biology”, Chemical Communications, 2017, 53(69), 9632-9635.

[3] Tameshige T., Okamoto S., Lee J.S., Aida M., Tasaka M., Torii K.U., Uchida N.

“A Secreted Peptide and Its Receptors Shape the Auxin Response Pattern and Leaf Margin Morphogenesis”, Current Biology, 2016, 26(18), 2478-2485.

④その他

鳥居は、第31回(2014年)井上学術賞、2015年米国植物生理学会フェローアワード、2015年国際学術講演賞、2015 年千葉大学サイエンスレクチャーシップアワードの各賞を受賞した。また、「自然科学分野で優れた業績を上げた女性研究者」として第35回(2015年)猿橋賞を受賞した。

3.3.11　可視化を通して解析する消化管粘膜免疫系の誘導維持機構(本田賢也)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

宿主の消化管では腸内細菌(常在細菌)によって、消化管特異的なリンパ球の分化が促進されている。本研究では、生体イメージング技術・ノトバイオート[193]技術を取り入れた解析法を確立し、細菌と宿主細胞の動態を解明するとともに、宿主免疫系を構成する個々の細胞の特性や相互作用を明らかにし、最終的には炎症性腸疾患を始めとする免疫難病への新たな治療法の創出を目指した。

②期間中の研究成果

(ⅰ)腸内細菌による Th17 細胞の誘導

消化管リンパ球が蛍光標識された無菌レポーターマウスから、ある種の腸内細菌だけが生着した“ノトバイオート (Gnotobiotes)”マウスを作製した。インターロイキン-17(IL-17)を高産生する CD4 陽性 T 細胞の一亜群の Th17 細胞は、細胞外寄生微生物の感染防御に必須であるが、その応答の行き過ぎにより自己免疫疾患の原因となる。Th17 細胞は、消化管粘膜固有層に多く存在し、腸内細菌によってその分化が誘導される。そこでノトバイオートマウスを用いて Th17 細胞を特異的に誘導する腸内細菌の同定を試みた結果、セグメント細菌と呼ばれる消化管常在菌が、強力に Th17 細胞を誘導することが明らかになった。さらに、セグメント細菌を消化管に有し、Th17 細胞が消化管に多く存在するマウスにおいては、病原性細菌である Citrobacter rodentium 感染に対して抵抗性を持つことが明らかとなった[1]。

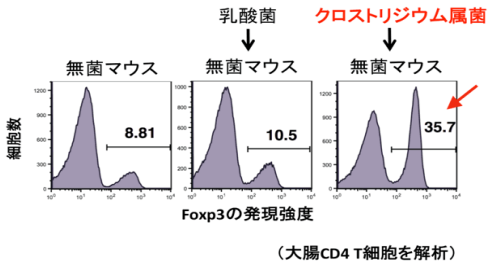


図 3-93　Clostridium 属細菌による Treg 細胞の誘導[194]

無菌マウスにおいては、大腸 CD4 陽性 T 細胞の 8.81%が Foxp を発現する Treg 細胞であるが、無菌マウスに Clostridium 属菌を投与すると、その比率は 35.7%まで上昇した。一方、乳酸菌を投与しても Treg 細胞は増加しなかった。

---

[193] ノトバイオート:持っている微生物叢が全て知られている動物であり、無菌動物に既知の微生物を投与、定着させることにより作製される。

[194] JST プレスレリース (H22.12.24)　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20101224-2/

（ⅱ）腸内細菌による制御性 T 細胞(Treg 細胞)の誘導

Treg 細胞は、転写因子 Foxp の発現を特徴とする CD4 陽性 T 細胞の一種であり、免疫細胞の過剰活性化を抑制し、自己免疫性炎症やアレルギーを抑制する。無菌マウスには Treg 細胞が全く存在しなかったことから、腸内細菌が Treg 細胞誘導に必須であることが明らかになった。ノトバイオートマウスの作製により、Treg 細胞を特異的に誘導する腸内細菌種として、Clostridium 属の細菌が同定された(図 3-93)[2],[3]。消化管の Treg 細胞は、炎症抑制性のインターロイキン-10(IL-10)を産生し、消化管ホメオスターシスを保つ役割を果たすことが知られている。そこで IL-10 領域に蛍光タンパク質をノックインしたレポーターマウスを無菌化し、Clostridium 属菌のみを定着させたノトバイオートマウスを作製した。その結果、Clostridium 属菌の定着により、大腸 Treg 細胞における IL-10 産生が強力に誘導され、Clostridium 属菌は Treg 細胞の数を増加させると同時に、その IL-10 産生にも影響を与えることが明らかになった[3]。

また、Clostridium 属菌を新生仔期に投与したマウスは、腸炎(DSS 腸炎と Oxazolone 腸炎)の発症やアレルギー反応誘導(OVA+Alum 投与による IgE 応答)に対する感受性が抑制され、Clostridium 属菌の経口投与が、炎症性疾患やアレルギー性疾患に対する治療法となる可能性が示された[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D.R. “Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria”, Cell, 2009, 139(3), 485-498.

[2] Atarashi K., Umesaki Y., Honda K. “Microbiotal influence on T cell subset development”, Seminars in Immunology, 2011, 23(2), 146-153.

[3] Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., Cheng G., Yamasaki S., Saito T., Ohba Y., Taniguchi T., Takeda K., Hori S., Ivanov I.I., Umesaki Y., Itoh K., Honda K. “Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species”, Science, 2011, 331(6015), 337-341.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究と並行して科研費基盤研究(B)「消化管免疫系の状態を決定する腸内細菌の探索」(2009 年度～2011 年度)を通して、腸内細菌であるセグメント細菌と、Clostridium 属の細菌による、消化管の免疫獲得における Treg 細胞と Th17 細胞の分化誘導を見いだした。

さきがけ研究は、その期間途中でもう一つの大型助成である科研費、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「腸内環境と免疫システム構築の統合的理解とその応用」(2010

年度～2012 年度)に移行し、腸内細菌の免疫制御機構の研究をさらに発展させた。

次いで、AMED-CREST(生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出)「腸内常在細菌特性理解に基づく難治性疾患新規治療法の開発」(2012 年度～2016 年度)及び AMED 革新的先端研究開発支援事業(インキュベートタイプ)LEAP「腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出」(2016 年度～2020 年度)において、腸内細菌の免疫制御機構の研究とともに、多様な疾患との関連及び治療応用の研究に関する幅広い展開をしている。

そのほかにも民間の武田科学振興財団、井上科学振興財団、上原記念生命科学財団、鈴木謙三記念医科学応用研究財団から助成を受けている。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)ヒト由来 Clostridium 属細菌による Treg 細胞の分化誘導

日本人成人男性の便を無菌マウスに投与すると、Treg 細胞の分化が誘導されたことから、マウス細菌と同等な Treg 細胞分化誘導能を有する細菌は、ヒトの消化管にも存在することが示された[1]。また、この便から Treg 細胞の分化誘導能をもつ細菌を分離培養等で単離したところ、17 株の Clostridium 属細菌に、Treg 細胞の分化誘導能があることが見いだされた[1]。

マウス由来の Clostridium 属細菌 46 株とヒトの便から単離された Clostridium 属細菌 17 株は、クロストリジアクラスターのクラスターXIVa、クラスターIV、クラスターXVIII に属している。ヒトの常在細菌でクロストリジアクラスターIV に属する Faecalibacterium prausnitzii は、in vitro 培養系でヒトの末梢血単核球からの IL-10 の産生を促進することが示されており、また、炎症性腸疾患患者やアトピー性皮膚炎患者では、腸内細菌叢におけるクロストリジアクラスターIV とクロストリジアクラスターXIVa の割合が減少していることが示されたことから、Clostridium 属細菌を補充することがアレルギー疾患や自己免疫疾患の治療法となり得ることがヒト由来の Clostridium 属細菌についても示された[2]。

(ⅱ)腸内細菌の腸管上皮細胞への接着と Th17 細胞誘導との関連

本研究課題ではマウスにおいて、セグメント細菌(SFB)によって Th17 細胞が特異的に誘導されることが明らかになった(3-3-11(1)②(ⅰ)項)。げっ歯類に感染する病原性大腸菌 Citrobacter rodentium 菌やヒトにも感染する腸管出血性大腸菌 O157 は Th17 細胞を誘導すると考えられている[3]。これらの病原性細菌は、腸管上皮細胞に接着し、Th17 細胞を誘導するが、上皮細胞への接着に関わる遺伝子を欠損させると、上皮細胞への接着は失われ、Th17 細胞の誘導がほとんど見られなくなった。このことから、細菌の上皮細胞への接着が Th17 細胞の誘導に関係することが強く示唆された[3]。

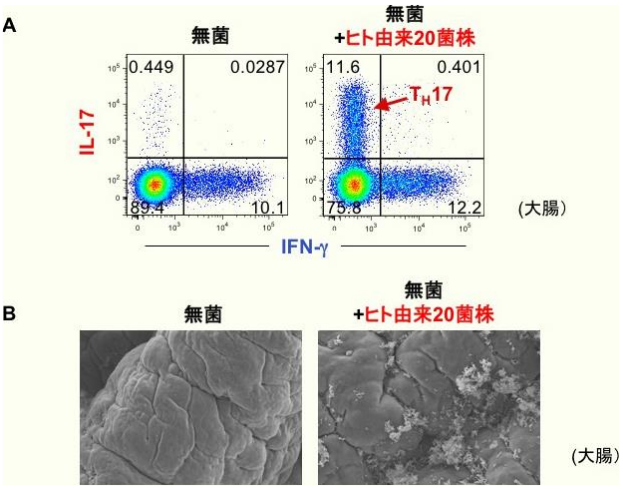


図 3-94　潰瘍性大腸炎患者便サンプルから単離された 20 菌株による Th17 細胞誘導[195]

A：潰瘍性大腸炎患者便サンプルから単離された 20 菌株を無菌マウスに投与し、FACS で解析した。20 菌株投与ノトバイオートマウス大腸粘膜固有層において、CD4 陽性 IL17 陽性の Th17 細胞の顕著な増加が観察された。

B：上記マウスの大腸粘膜を透過電子顕微鏡観察した。20 菌株投与ノトバイオートマウス大腸に多数の細菌の接着が観察された。

さらに、ヒトの便から Th17 細胞を誘導する腸内細菌の同定・分離を試み、Th17 誘導細菌を 20 菌株特定し、単離培養に成功した。この 20 菌株をマウスに投与したところ、Th17 細胞を誘導しない細菌に比べて腸管上皮細胞に強く接着していることが明らかになった(図 3-94)[3]。

(iii)口腔常在菌の腸管への異所性定着

口腔細菌が炎症性腸疾患患者や大腸がん患者の便中に検出されることに着目し、口腔細菌が腸管内に定着することによる腸管免疫系への影響と、それに関連する疾患について調べられた。クローン病患者の唾液を無菌マウスに経口投与し、マウス腸管に存在する免疫細胞を解析した結果、マウス大腸でインターフェロンガンマ(IFN-γ)を産生する CD4 陽性ヘルパーT 細胞(TH1 細胞)が増加していることが見出された。さらに、腸に定着した細菌 DNA の網羅的配列解析により選択された約 30 種類の細菌を単離・培養し、無菌マウスへ定着させることにより、クレブシエラ属のクレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)が TH1 細胞を誘導することが見出された[4]。

また、通常のマウスにこの口腔細菌を経口投与しても腸管内では定着・増殖しなかったが、抗生物質を投与した SPF マウスでは腸管内に定着し、TH1 細胞を強く誘導することが明らか

[195] 上原記念生命科学財団研究報告集，30（2016）

になった。このことから、抗生物質の投与により腸内細菌叢の定着阻害効果が弱まり、クレブシエラ・ニューモニエが腸管内へ定着することが示唆された[4]。このことから過度の抗生物質の投与により、健常者においても腸管へのクレブシエラ属菌の定着が起こる可能性が示唆された。

②社会・経済への波及効果

さきがけ研究によって始められた消化管局所の免疫機構と腸内細菌の関与に関する研究は、当初より疾患との関連という治療応用も視野に入れた研究展開がなされてきた。腸内細菌による Treg 細胞と Th17 細胞の誘導の発見と、それに関与する消化管由来の細菌の特定により、腸内細菌による免疫細胞の誘導と様々な消化管の免疫性疾患が関連付けられた。

クロストリジア属細菌と炎症性腸疾患やアトピー性皮膚炎との関連、セグメント細菌による Th17 細胞の分化誘導に基づいた感染防御、口腔細菌と炎症性腸疾患や大腸がんとの関連などにより、具体的な疾患治療の方向性が示された。これらは先に述べた AMED-CREST「腸内常在細菌特性理解に基づく難治性疾患新規治療法の開発」や、AMED、LEAP「腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出」の成果であるとともに、現在も実際の創薬を目指した研究が続けられている。

その波及効果は特許としても表れ、本研究期間中に出願された「制御性 T 細胞の増殖又は集積を誘導する作用を有する組成物」(2010 年 6 月 4 日出願)が登録され、その後も「制御性 T 細胞の増殖又は集積を誘導するヒト由来細菌」(2012 年 11 月 29 日出願)、「微生物叢由来生物活性分子の組み合わせを含む疾患治療用組成物」(2014 年 7 月 8 日出願)、「TH17 細胞の誘導のための組成物及び方法」(2015 年 4 月 10 日出願)など、研究の進展とともに新たな出願がなされている。

腸内細菌による Treg 細胞の誘導に関するさきがけ研究の成果技術は、そのライセンスを受けた医薬品製剤開発を行う米国のベンチャー企業、Vedanta Biosciences 社の設立につながり、2018 年には臨床試験が開始される予定である[196]。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K., Kim S., Fritz J.V., Wilmes P., Ueha S., Matsushima K., Ohno H., Olle B., Sakaguchi S., Taniguchi T., Morita H., Hattori M., Honda K. “Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota”, Nature, 2013, 500(7461), 232-236.

[2] Ivanov I.I., Honda K. “Intestinal commensal microbes as immune modulators”,

[196] https://www.vedantabio.com/news-media/press-releases/detail/2292/vedanta-biosciences-to-advance-cancer-immunotherapy

Cell Host and Microbe, 2012, 12(4), 496-508.

[3] Atarashi K., Tanoue T., Ando M., Kamada N., Nagano Y., Narushima S., Suda W., Imaoka A., Setoyama H., Nagamori T., Ishikawa E., Shima T., Hara T., Kado S., Jinnohara T., Ohno H., Kondo T., Toyooka K., Watanabe E., Yokoyama S.I., Tokoro S., Mori H., Noguchi Y., Morita H., Ivanov I.I., Sugiyama T., Nuñez G., Camp J.G., Hattori M., Umesaki Y., Honda K. “Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells”, Cell, 2015, 163(2), 367-380.

[4] Watanabe E., Tanoue T., Thaiss C.A., Sato M., Toyooka K., Said H.S., Yamagami H., Rice S.A., Gevers D., Johnson R.C., Segre J.A., Chen., Kolls J.K., Elinav E., Morita H., Xavier R.J., Hattori M., Honda K. “Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation”, Science, 2017, 358(636), 359-365.

④その他

本田は、「ゴットフリート・ワグネル賞 2014 優秀賞」、「第 1 回 野村達次賞」、「第 18 回(平成 27 年)日本免疫学会賞」、「第 32 回 井上学術賞」、「平成 28 年度 持田記念学術賞」、「第 53 回(2016 年度)ベルツ賞」を受賞した。

3.3.12　細菌べん毛蛋白質輸送装置の動作機構の解明(南野徹)

(1)研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

タンパク質の局在化に関わる生体膜を越える輸送には、ATP やプロトン駆動力等のエネルギーが使われるが、輸送装置がどのようにエネルギーを使うかは不明である。本研究では、バクテリアべん毛のタンパク質輸送系において、光学顕微ナノ計測装置の開発と遺伝学的機能解析法により、生体膜におけるタンパク質輸送装置の仕組みの解明を目指した。

②期間中の研究成果

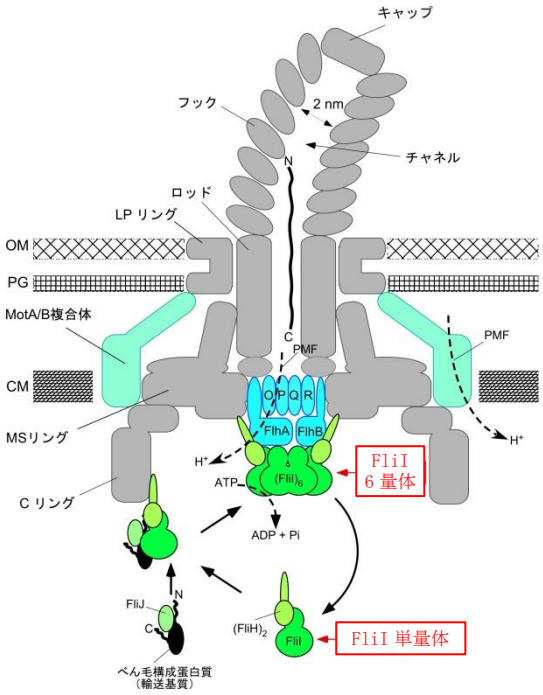


図 3-95　べん毛基部体とタンパク質輸送装置の模式図[197]

水色は膜タンパク質(FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR)、緑が ATPase 複合体(FliH, FliI, FliJ)[198]。

(ⅰ)輸送装置構成膜タンパク質[198]FliI ATPase の局在化と自己集合の解析

細菌のべん毛の伸長の際には、基部の輸送装置からタンパク質がべん毛先端のキャップ直下へ運ばれて結合する。輸送装置は、6 種類の膜タンパク質と 3 種類の可溶性タンパク質

[197] 大阪大学大学院生命機能研究科　研究成果
http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/minamino-namba-20160315/

[198] 輸送装置は 6 種類の膜タンパク質(FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR)と 3 種類の可溶性蛋白質(FliH, FliI, FliJ)で構成される。

で構成され、ATPase 複合体を形成する(図 3-95)が、そのタンパク質輸送装置の詳細な分子機構が検討された。まず、FliI は 6 量体リングを形成し、輸送ゲートへ挿入されることが必須であること[1]、さらに FliI のべん毛基部への局在には FliH 及びべん毛基部体 C リングが必要であることやその相互作用様式が明らかにされた[2]。その結果に基づき、ATP の加水分解反応に共役して起こる FliI ATPase の離合集散サイクルがべん毛蛋白質輸送過程を促進するというモデルが示された(図 3-95)。

(ⅱ)輸送装置の基質認識機構

FliT は、べん毛繊維キャップタンパク質 FliD の分子シャペロンとして働き、FliI との相互作用により FliD の細胞外への輸送を促進する。FliT の結晶構造解析と遺伝学的機能解析により、FliI と FliT-FliD 複合体との相互作用機構が明らかにされた[199,[3]]。

(ⅲ)輸送ゲート複合体のエネルギー共役機構

輸送装置は、プロトン駆動力をタンパク質輸送に変換するが、輸送ゲート複合体自体は、プロトン駆動力を構成する二つの成分、細胞膜を隔てた電位差(Δφ)と細胞膜内外のプロトン濃度差(ΔpH)を明確に区別して利用しており、輸送ゲートは Δφ だけで駆動される高効率な輸送エンジンとして働くことが明らかになった[200]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Kazetani K.i., Minamino T., Miyata T., Kato T., Namba K. “ATP-induced FliI hexamerization facilitates bacterial flagellar protein export”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 388(2), 323-327.

[2] Minamino T., Yoshimura S.D.J., Morimoto Y.V., González-Pedrajo B., Kami-Ike N., Namba K. “Roles of the extreme N-terminal region of FliH for efficient localization of the FliH-FliI complex to the bacterial flagellar type III export apparatus”, Molecular Microbiology, 2009, 74(6), 1471-1483.

[3] Imada K., Minamino T., Kinoshita M., Furukawa Y., Namba K. “Structural insight into the regulatory mechanisms of interactions of the flagellar type III chaperone FliT with its binding partners”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(19), 8812-8817.

[199] Minamino T., Kinoshita M., Hara N., Takeuchi S., Hida A., Koya S., Glenwright H., Imada K., Aldridge P.D., Namba K. “Interaction of a bacterial flagellar chaperone FlgN with FlhA is required for efficient export of its cognate substrates”, Molecular Microbiology, 2012, 83(4), 775-788.

[200] Minamino T., Morimoto Y.V., Hara N., Namba K. “An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export”, Nature Communications, 2011, 2(1), 475.

(2)研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「べん毛タンパク質輸送システムの動的機能構造解析」(2015 年度～2016 年度)で、細菌べん毛のタンパク質輸送装置形成に関する研究が行われた。また、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「バクテリアべん毛タンパク質輸送スイッチの分子基盤」(2013 年度～2014 年度)では、べん毛のタンパク質輸送装置の基質認識モード切替え機構に関する研究が行われた。

さらに、科研費基盤研究(B)「バクテリアべん毛輸送装置のエネルギー変換システムの分子基盤」(2014 年度～2016 年度)では、べん毛伸長における輸送装置エネルギーの入出力に関する研究が行われた。

①科学技術の進歩への貢献

(ⅰ)輸送タンパク質間の相互作用

べん毛タンパク質輸送装置における各タンパク間の相互作用が詳細に検討された。

・FliI-FliJ の相互作用

輸送基質タンパク質である細胞質シャペロンの FliJ は FliI に結合し、FliI は 6 量体リングを形成してタンパク質輸送を促進する。そこで、$FliI_6$-FliJ リング複合体を in vitro 再構成し、その分子機構を調べたところ、FliJ は FliI に結合して、FliI リング複合体の形成を促進し、その結果、FliI の ATPase 活性が上昇することが明らかになった[1]。さらに、FliJ は FliI リングの中央の穴に突き刺さり、安定な $FliI_6$-FliJ リング複合体を形成していることが明らかになった(図 3-96)[201]。

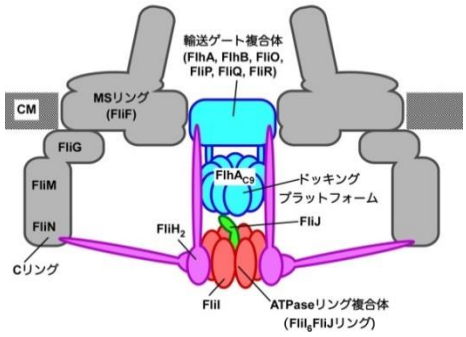


図 3-96　$FliI_6$-FliJ リング複合体の輸送ゲートへの結合 [201]

輸送装置は、べん毛基部に存在する MC(細胞膜)-C リング複合体の内部に存在する。$FliI_6$ 量体リング(赤)中央に FliJ(緑)が突き刺さっている。FliI リングは FliH(紫)- FliA(水色)相互作用を介して輸送ゲートに結合する。

[201] Ibuki T., Imada K., Minamino T., Kato T., Miyata T., Namba K. “Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases”, Nature Structural and Molecular Biology, 2011, 18(3), 277-282.

・FliJ-FliA の相互作用

FliJ が FlhA と結合することにより、輸送ゲートは電位差(Δφ)だけで駆動される高効率な輸送エンジンに変化することから、FliJ で保存されている分子表面の 8 種のアミノ酸残基について遺伝子学的機能解析が行われた[1]。その結果、FliJ の Phe72 と Leu76 が FliA との相互作用に重要であることが示唆された[1]。

・FliI-FliT の相互作用

FliI-FliT の相互作用を検討した結果、FliT94 は FliI の N 末近傍領域に強く相互作用し、C 末端側の α-ヘリックスが N 末近傍領域への強い相互作用を抑制していることが明らかになった[2]。

・FliH-FliA の相互作用

FliH-FliA の相互作用を検討した結果、FliH の保存された二つのトリプトファン残基が輸送ゲート構成タンパク質 FliA の近傍に位置し、FliH-FliA 相互作用により FliI が効率良く輸送機能を発揮できることが示唆された[3]。以上により、FliH-FliA 相互作用を介して FliI リングが輸送ゲートに結合するモデルが提案された[3](図 3-96)。

(ⅱ)FliP-FliO の相互作用と輸送装置モデル

大型放射光施設 SPring-8 を用いた X 線結晶構造解析や電子顕微鏡による構造解析によりこの FliP-FliO 複合体の立体構造が詳細に解析され、2 分子 FliP でできたユニットが三つ集まり、リング構造を形成すること(図 3-97 左、中央)、FliO 複合体が FliP に直接結合して FliP のリング形成を助けること(図 3-97 右)、FliO 複合体は出来上がった輸送ゲートには存在しないことが明らかになった[4]。

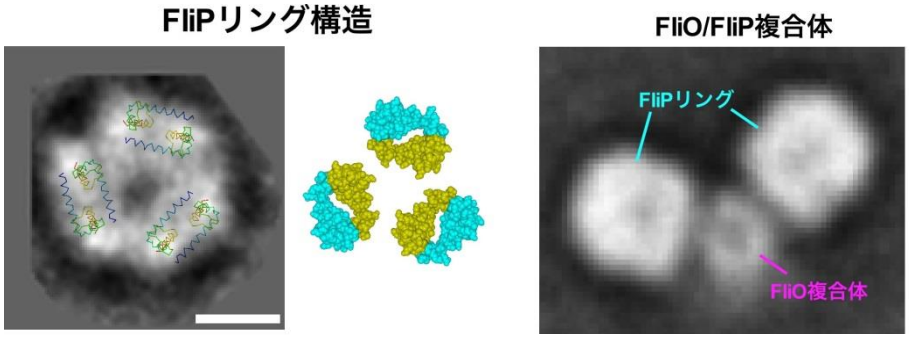


図 3-97　FliP リングの構造と FliO/FliP 複合体[202]

(中央)X 線結晶構造解析による FliP の 2 量体部分構造。(左)FliP リング複合体の電子顕微鏡像。(右)FliO/FliP 複合体、2 分子の FliP リングが FliO 複合体に結合している。

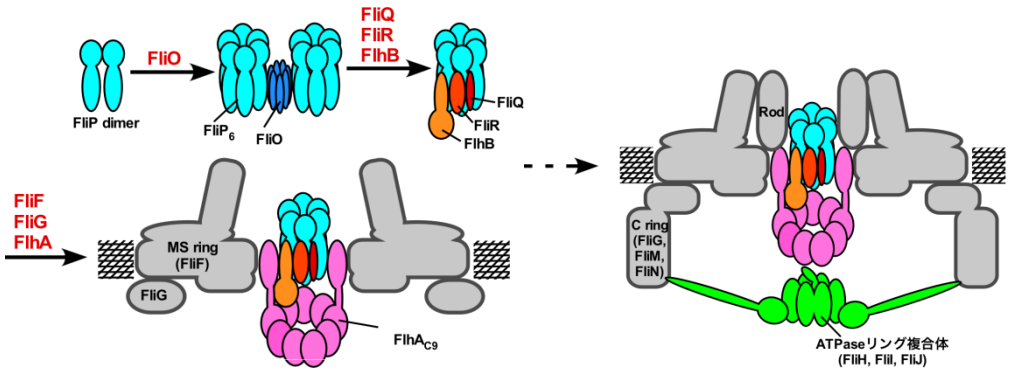


図 3-98　輸送ゲート複合体の形成メカニズム[202]

FliO 複合体(青)により FliP リング(水色)が形成。次いで FliO 複合体が外れて FliQ(濃赤)、FliR(赤)、FlhB(橙)が FliP リングの周りに集合。MS リング(灰)の形成と並行しながら、FlhA(ピンク)が FliP/FliQ/FliR/FlhB 複合体を取り囲むように集合することで、MS リング内部に輸送ゲートが組み上がり、そこに $FliI_6$-FliJ リング複合体(緑)が結合する。

残りの 4 種類の輸送ゲートタンパク質(FliQ、FliR、FlhB、FlhA)が FliP リングに直接結合すること、FlhA がべん毛基部のリングに直接結合することも明らかになった[202]。以上の結果から、輸送ゲートが MS(細胞膜)リング部に形成される仕組みが明らかになり、そのモデルが示された(図 3-98)[4],[202]。

(iii)高分解能 pH イメージングによる局所 pH の検出

べん毛タンパク質輸送装置は、プロトン駆動力をエネルギー源としているが、高い感度で pH 測定を行うため、安定な pH 感受性蛍光タンパク質を用いた高感度 pH イメージング技術が開発された。べん毛タンパク質輸送装置近傍の局所的な水素イオン濃度が計測された結果、細胞膜直下の pH は 7.5 で、細胞質の 7.3 に比べて 0.2 ユニットほど高く、pH の勾配が形成されていた(図 3-99)[203]。さらに、べん毛タンパク質輸送装置内の ATP 加水分解酵素を持たない FliI-ATPase 変異体では、野生型より輸送装置近傍の局所 pH が 0.1 ユニットほど高く、これにより、ATP 加水分解酵素が働く状態においてのみ水素イオン濃度の勾配が生じることが明らかになった。以上の結果から、べん毛タンパク質輸送装置は、ATP 加水分解とプロトン駆動力をカップルさせて効率的なタンパク質輸送を行っていることが明らかになった(図 3-99)[203]。

[202] 大阪大学大学院生命機能研究科　研究成果
http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/namba-20170804/
[203] Morimoto Y.V., Kami-Ike N., Miyata T., Kawamoto A., Kato T., Namba K., Minamino T. “High-resolution pH imaging of living bacterial cells to detect local pH differences”, mBio, 2016, 7(6), e01911-16.

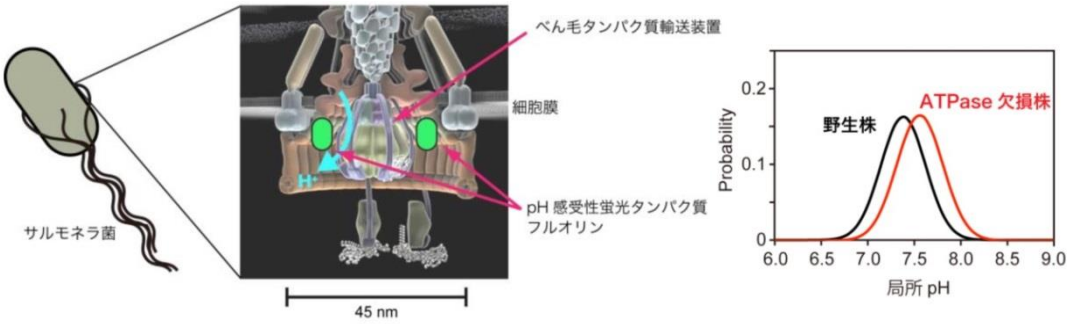


図 3-99　べん毛タンパク質輸送装置の局所 pH 差測定法[204]

(左)サルモネラ菌べん毛の根本にある回転モーターの模式図。(中央)モーター内の輸送装置近くに pH 感受性蛍光タンパク質(緑)を導入し、プロトン流に依存した局所 pH 差を測定可能にした。(右)輸送装置内で働く ATP 加水分解酵素を欠く細胞株では、輸送装置近傍の局所 pH が高くなっている。

②社会・経済への波及効果

細菌べん毛モーターは、30 種類のタンパク質から成る分子複合体であり、その運動のメカニズムの研究は、ナノマシンのモデルとして機械工学や医療での利用につながることが期待されている。

また、輸送ゲートタンパク質の構造や輸送ゲート複合体ができる仕組みが明らかにされた[4]ことにより、べん毛タンパク質輸送装置と同様な構造を持つ病原細菌のⅢ型分泌装置の膜タンパク質複合体をターゲットにした創薬スクリーニングが可能になるものと期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Ibuki T., Uchida Y., Hironaka Y., Namba K., Imada K., Minamino T. “Interaction between FliJ and FlhA, components of the bacterial flagellar type iii export apparatus”, Journal of Bacteriology, 2013, 195(3), 466-473.

[2] Minamino T., Kinoshita M., Imada K., Namba K. “Interaction between FliI ATPase and a flagellar chaperone FliT during bacterial flagellar protein export”, Molecular Microbiology, 2012, 83(1), 168-178.

[3] Hara N., Morimoto Y.V., Kawamoto A., Namba K., Minamino T. “Interaction of the extreme N-terminal region of flih with FlhA is required for efficient bacterial flagellar protein export”, Journal of Bacteriology, 2012, 194(19), 5353-5360.

[204] 大阪大学大学院生命機能研究科　研究成果
http://resou.osakau.ac.jp/ja/research/2016/20161206_2

[4] Fukumura T., Makino F., Dietsche T., Kinoshita M., Kato T., Wagner S., Namba1 K., Imada K., Minamino T. “Assembly and stoichiometry of the core structure of the bacterial flagellar type III export gate complex”, PLoS Biol, 2017, 15(8), e2002281.

第 4 章　科学技術イノベーションの創出に資する研究成果

4.1　細胞膜形態決定の動作原理の解明(末次志郎)

4.1.1　研究の概要

(1)研究テーマの状況(国内)

細胞移動やがん細胞の浸潤転移に関わる浸潤突起の先端におけるラメリポディア(葉状仮足)、フィロポディア(葉状仮足)やポドソームの形成、あるいはエンドサイトーシスによる膜小胞の取り込みにおいては、細胞膜のダイナミックな変形が伴う。

本研究領域において、細胞膜蛋白質の立体構造解析に基づき、細胞膜の陥入構造と突出構造を担う二種類の細胞膜ドメイン F-BAR と I-BAR の構造が見出され、細胞膜タンパク質が細胞膜の構造を決めるという原理が明らかになるとともに、その具体的な細胞膜モデルが提示された。現在ではこのモデルは細胞膜の陥入構造や突出構造として一般的に認められている。本研究領域終了後は、これらの BAR ドメインが形成する陥入構造や突出構造としてカベオラやポドソーム形成についての詳細な研究が行われた。さらに、細胞膜タンパク質と脂質の関連について研究を展開し、細胞膜のイオンチャネルにおけるアンキリンリピートドメインとリン脂質 PI(4,5)P2 の相互作用が見出され、細胞膜機能における個々の脂質構成成分の重要性が示された。以下、主な研究成果を示す。

(ⅰ)F-BAR ドメインタンパク質 PACSIN2 の構造

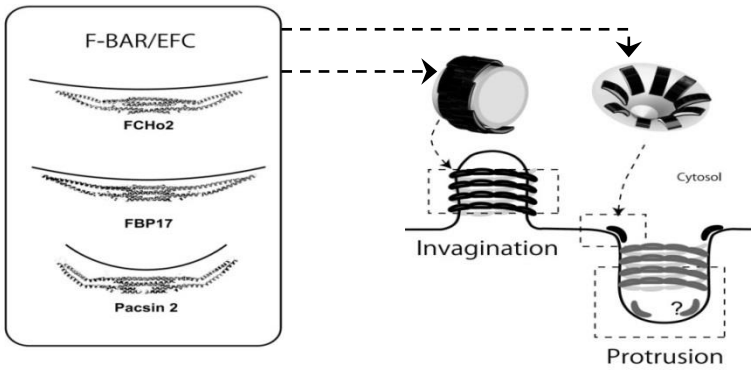


図 4-1　F-BAR の立体構造[205]

左枠内は F-BAR タンパク質の立体構造で、最下部が PACSIN2。右図の上側が細胞質側。右図の左側は陥入構造で、凹面による膜との相互作用はエンドサイトーシスなどで見られる膜の陥入構造に対応する。右側は突出構造を示し、凹面による相互作用は突起形成の根元の部分で見られる。

[205] 生化学　第 84 巻　第 1 号　みにれびゅう

本研究領域において見出されたF-BARドメインが、アクチン重合を調節し、膜の曲率の決定に関与するという発見に基づき、アクチン重合に働く新たな分子を探索し、PACSIN2が見いだされた。そこで、このPACSIN2の役割と分子基盤の解明に重点を置いてF-BARドメインの研究が行われた。

まず、X線構造解析でPACSIN2のF-BARドメインの立体構造が決定された結果、長いヘリックスが途中で折れており、本研究領域で見いだされたformin-binding protein 17(FBP17)等の別のF-BARドメインタンパク質に比べ、脂質結合面の凹面カーブの半径が小さいことが明らかになった[1],[2],[3]。また、PACSIN2は凹面で脂質膜に結合することが明らかになった(図4-1)[1],[3]。これにより、PACSIN2は細胞内では他のF-BARドメインタンパク質よりも強い曲率の陥入膜に結合し、細胞突起の根元に存在する凹の曲率の膜を誘導することにより、突起構造の誘導にも関与していることが示唆された(図4-1右)[1],[2]。

また、PACSIN2のF-BARドメインは、αヘリックス束の外に突き出した両親媒性ヘリックスや、疎水性アミノ酸を含む突起(くさび:wedge)を持ち、それらの脂質膜への挿入が膜結合及びその変形に寄与することが明らかになった(図4-2)[1],[2],[3]。

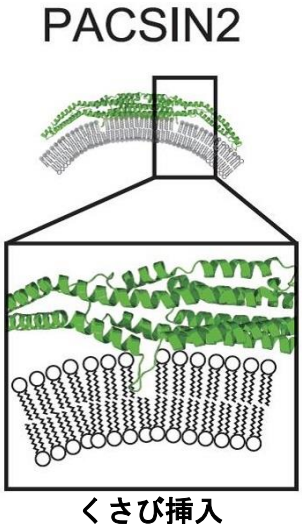


図4-2　PACSIN2のF-BARドメインのくさび構造による膜変形[206]

上部は膜に結合したPACSIN2の全体図で、下部は疎水性アミノ酸突起の膜への挿入部を拡大した図。

(ⅱ)カベオラ[207]形成におけるPACSIN2のF-BARドメインの役割

カベオラは、直径が50nmから100nm程度の陥入構造で、陥入して小胞となり細胞外の液体を細胞内に輸送する役割を持つ。小胞になる時にはdynamin[208]により切断される(図4-3

[206] 生化学　第86巻　第5号

[207] 細胞膜に存在する直径50～100 nmの陥入構造で脂質取り込みやシグナル伝達に関与する。

[208] ダイナミンは真核細胞におけるエンドサイトーシスの原因となるGTPase。細胞膜から形成された小胞の切断や細胞表面、ゴルジ体への標的化と融合を担う。

右上下)。一方、caveolin-1 はこの小胞の主要な構成タンパク質で、脂質膜挿入ドメインを持ち、膜小胞として細胞膜に運ばれ、細胞膜上で集合することでカベオラを形成すると考えられている。まず、カベオラ形成における PACSIN2 の局在が調べられた結果、PACSIN2 はカベオラの首部分に局在し(図 4-3 左上)[3],[4],[5]、caveolin-1 と共局在することが明らかになった[5]。さらに、PACSIN2 F-BAR ドメインは細胞膜の陥入構造に局在し[4],[5]、PACSIN2 の発現強度が高い場合には、caveolin-1 は PACSIN2 F-BAR による陥入構造に凝集して観察された[5]。

以上の結果から、caveolin-1 の N 末端側と PACSIN2 F-BAR 領域間で直接結合し[2],[4],[5]、PACSIN2 の分子内相互作用による膜チューブ形成機能の抑制が caveolin-1 との結合によって解除されることが明らかになった[5]。また、PACSIN2 SH3 ドメインは dynamin にも結合することから、PACSIN2 の分子内相互作用は dynamin との結合によっても解除されることが明らかになった[5]。また、PACSIN2 のノックダウンでは、フラスコ型の形状が失われ、dynamin のカベオラにおける局在が減弱していた[4],[5]。

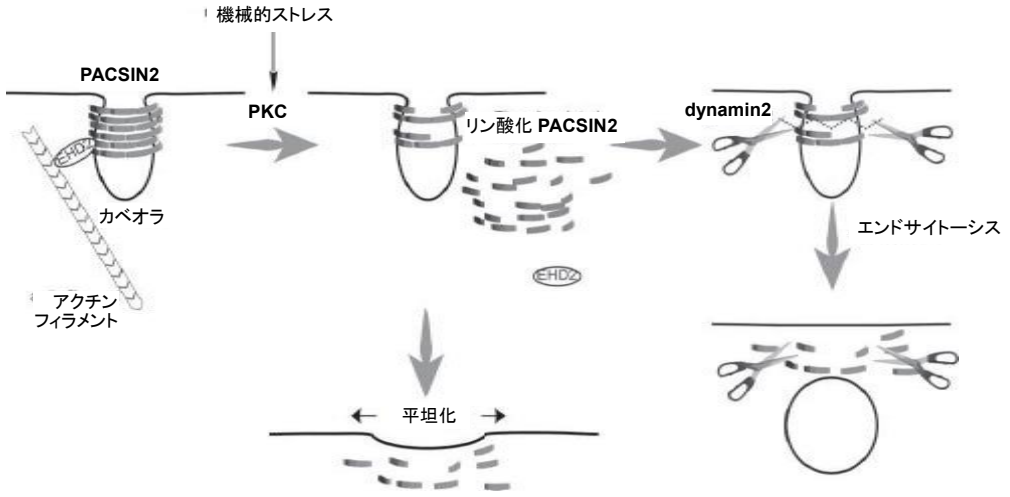


図 4-3　リン酸化を介した PACSIN2 によるカベオラのエンドサイトーシス[209]

機械的ストレスで PACSIN2 はリン酸化し、膜から解離し、陥入構造は平坦化するか(中央下)、あるいは dynamin2 の動員によって膜を切断し、小胞となる(右上下)。

以上の結果より、F-BAR ドメインタンパク質である PACSIN2 は、caveolin-1 との相互作用を介してカベオラの形態形成や dynamin カベオラの局在化とカベオラのエンドサイトーシスに関与することが示された[5]。

[209] Senju Y., Suetsugu S. “Possible regulation of caveolar endocytosis and flattening by phosphorylation of F-BAR domain protein PACSIN2/ Syndapin II”, BioArchitecture, 2015, 5(42861), 70-77.

(iii)カベオラのエンドサイトーシスと PACSIN2 のリン酸化による制御

カベオラへの局在時における PACSIN2 のリン酸化が検討された結果、低張性の刺激や剪断ストレス(図 4-3 ストレス)によって、PACSIN2 のセリン 313 が protein kinase C(PKC)によりリン酸化されることが明らかになった(図 4-3)[3],[6],[7]。リン酸化により PACSIN2 の膜結合親和性が低下してカベオラから除去され[6],[7]、dynamin2 の膜上の濃度が上昇し、小胞が切断・放出されることが明らかになった(図 4-3)。すなわち、リン酸化により PACSIN2 が除去され、dynamin2 が小胞を切断するための空間が提供されることが示唆された[6],[7]。

(iv)I-BAR ドメインタンパク質 IRSp53 を介したポドソーム形成

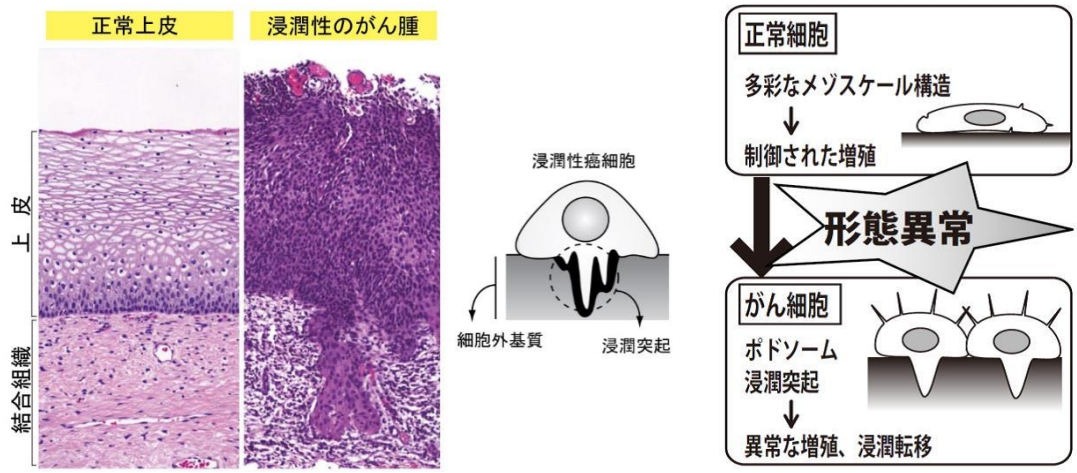


図 4-4　がん細胞のメゾスケール構造異常[210,211]

左の写真は、正常な上皮(左)と浸潤性がん腫の上皮(右)。がん腫では結合組織に浸潤突起が形成されている。中央はがん細胞の浸潤突起の模式図で、点線丸枠内が浸潤突起。右は、がん細胞ではメゾスケール構造の形態異常によりポドソームが形成されることを示す模式図。

がん細胞の転移を担う浸潤突起(図 4-4 左・中央)の一つにポドソームがあり(図 4-4 右)、それが集まってリング状の特徴的な形態を表す。BAR ドメインタンパク質のうち、立体構造が明らかになっている insulin receptor substrate p53(IRSp53)のポドソーム形成における役割が検討された。IRSp53 は、バナナ型の構造を持つ I-BAR ドメインで、カーブの外側に正電荷のアミノ酸残基を持つ。正電荷のアミノ酸残基と負電荷を持つ細胞膜が相互作用することにより細胞の突起構造を形成する。IRSp53 をノックダウンした結果、ポドソームを有する細胞の割合が低下すると同時に、がん細胞浸潤・増殖のシグナル伝達に関与するリン酸化チロシン量や sarcoma(Src)活性も低下することが判明した[8]。このことから、IRSp53

[210] 生化学　第 84 巻　第 1 号　みにれびゅう
[211] 日本学術振興会・最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)
https://www.jsps.go.jp/j-jisedai/data/life/LS031_outline.pdf

は、Src を活性化してポドソームの形成とがん浸潤に関与することが示唆された[8]。

また、I-BAR ドメインを欠失した IRSp53 の変異体ではポドソーム形成は抑制された[8]。さらに、IRSp53 の I-BAR ドメインはアクチン骨格を制御する Small GTPases である Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate(RAC)と結合することが明らかになった[8]。これらの結果と RAC がポドソーム形成に関与するという知見から、ポドソームにおけるアクチンフィラメントの再構成に RAC と IRSp53 I-BAR ドメインとの相互作用が関与することが示唆された[8]。

さらに、ポドソーム形成に関与し、IRSp53 の下流で働く分子として vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP:アクチン骨格制御因子)が、がん浸潤モデルである NIH-Src 細胞で VASP をノックダウンしたところ、ポドソーム形成が顕著に抑制された 。これにより IRSp53 と VASP は共同してポドソーム形成に働くことが明らかになった[8]。

以上の一連の結果により、ポドソーム形成における、IRSp53 の I-BAR ドメインとアクチンフィラメントの重要性が示され、細胞内シグナルに関する分子基盤が明らかにされた。

(ｖ)酵母の I-BAR ドメインタンパク質 Ivy1p

カビ属の I-BAR ドメインタンパク質の同定を目指す研究が行われた。配列データベースの検索により、I-BAR タンパク質と類似したタンパク質が出芽酵母の液胞に局在し、リン脂質に結合する Ivy1p というタンパク質であることが明らかになった[9]。Ivy1p の機能解析のために Ivy1p の多量体形成能について検討したところ、in vitro で直径 20nm の糸状ポリマーが､pH が中性の時に形成され､アルカリ性で解体することが明らかになった[9]。また Ivy1p の局在を HeLa 細胞で調べたところ、液胞様構造に局在することが明らかになった。このことより、カビ属の I-BAR ドメインタンパク質、Ivy1p は pH 依存的にポリマーを形成し、このドメインが真核生物で保存されていることが明らかになった[9]。

(vi)TRPV4 アンキリンリピートドメイン[212]と PI(4,5)P2 の相互作用

細胞膜メゾスケール構造の構築を制御する新規脂質結合ドメインとして Transient Receptor Potential Vanilloid 4(TRPV4)のアンキリンリピートが見出された[213, 10]。TRPV4 は、低浸透圧や温度によって活性化されるイオンチャネルで、その一部を構成するアンキリンリピートドメインは、タンパク質-タンパク質相互作用を担うとされてきたが、脂質膜との結合は明らかではなかった。そこで、アンキリンリピートドメインと細胞内シグナル伝達に重要なリン脂質である phosphoinositide の結合が調べられた。その結果、TRPV4 は、

[212] 多種多様なタンパク質に共通して見られる 33 アミノ酸残基の反復配列でありタンパク質-タンパク質間相互作用を媒介するといわれている。

[213] 本研究は、京都大学大学院工学研究科の森泰生、高橋重成、東京大学分子細胞生物学研究所の北尾彰朗、九州大学生体防御医学研究所の嶋田睦、神田大輔との共同研究により行われた。

PI(4,5)P2 に比較的強く結合することが見出された[10]。また、この結合は、筋肉萎縮症[214]や Charcot-Marie-Tooth(CMT)病[215]で見られるアミノ酸残基の変異によって減弱することが明らかになった[10]。

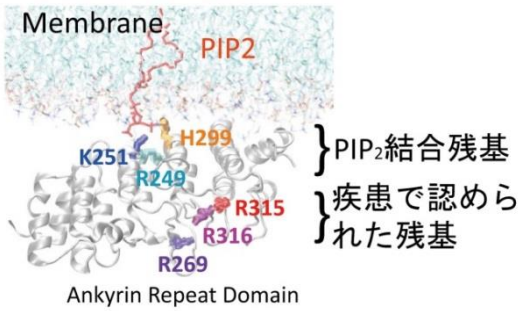


図 4-5　TRPV4 と PI(4,5)P2 の結合様式[216]

膜(上部の水色)に結合した PI(4,5)P2 とそれに結合した TRPV4 アンキリンリピートドメインのモデル図。疾患で認められた残基(R269、R315、R316)の位置は、結晶モデルによる PIP2 結合残基(R249、K251、H299)の位置と大きく異なる。

さらに、PI(4,5)P2 と TRPV4 アンキリンリピートドメインの X 線結晶構造解析[217]と分子動力学計算[218]が行われた。その結果、PI(4,5)P2 の親水性頭部であるイノシトール 3 リン酸化(IP3)とアンキリンリピートが結合した結晶構造が決定され、IP3 との結合に重要なアンキリンリピートドメイン内アミノ酸残基が同定された(図 4-5)[10]。また、筋肉萎縮症や CMT 病で見られる変異を持つタンパク質では立体構造の異常により、PI(4,5)P2 とアンキリンリピートドメインの結合が弱いことが示唆された[10]。

一方、TRPV4 チャネル活性について、アンキリンリピートドメインと PI(4,5)P2 の相互作用が及ぼす影響をパッチクランプ法で調べた結果、TRPV4 と PI(4,5)P2 の結合は、チャネル活性を負(チャネルを閉じる)に制御することが明らかになった(図 4-6)[10]。

---

[214] 筋肉が萎縮し、運動機能が失われる病気の総称。筋肉の障害により起こる進行性筋ジストロフィーや、神経の障害による筋萎縮性側索硬化症などがある。

[215] 1886 年に Charcot、Marie、Tooth の 3 人によって報告された主に遺伝子異常による末梢神経疾患の総称

[216] 東京大学　プレスリリース　http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_260926_02_j.html

[217] タンパク質に X 線を当てると、結晶中の繰り返し構造を反映した回折像が得られる。これを基に、タンパク質の中の原子の三次元配置つまり、分子の三次元構造を決定することができる。

[218] コンピュータを用いて、分子運動の模擬実験を行い、分子の性質や会合を推定する方法。X 線結晶構造解析法などで得られたタンパク質を構成する原子の位置を用いて、タンパク質の振る舞いを予測することができる。

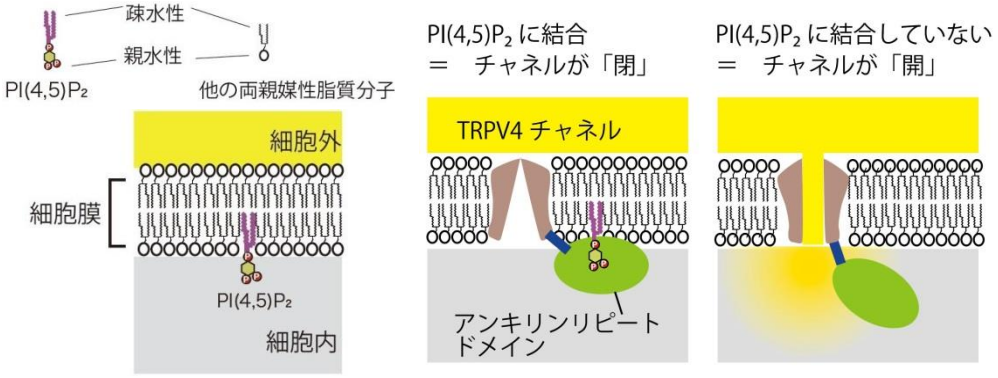


図 4-6　TRPV4 の PI(4,5)P2 による制御[219]

左は脂質膜模式図で、PI(4,5)P2 は、生体膜を構成する両親媒性脂質のうちフォスファチジルイノシトール(PI)がリン酸を付加されて形成される。アンキリンリピートドメインが PI(4,5)P2 に相互作用した状態では、チャネル領域のイオン透過性が低く(閉じた状態)(中央図)、結合していない状態では、イオン透過性が高い(開いた状態)(右図)。

(2)海外での共同研究の状況

末次は、ヘルシンキ大学の病理学科のグループ(Sanna　Lehtonen)と糖尿病性腎症における PACSIN2 の制御機構についての共同研究を行った。

この共同研究により、PACSIN2 は腎臓の糸球体上皮細胞で発現し、ネフリン[220]と相互作用してネフリンのエンドサイトーシスを高めることで、ネフリンの原形質膜への再循環に働くことや、糖尿病性腎症では、PACSIN2 の発現が上昇し、ネフリンの原形質膜へ局在に異常を来すことが明らかになった。さらに、PACSIN2 とネフリンの相互作用を助ける PACSIN2 の新規相互作用パートナーとして、rabenosyn-5(ラビノシン-5)が同定され、糖尿病性腎症では、ラビノシン-5 の発現が上昇し、ネフリンと PACSIN2 との会合を増加させることが明らかになった。以上の成果は、2017 年、論文[221]で発表された。また、総説の共著などがあるが、多くの研究は末次が主体のものである。

4.1.2　研究成果の波及と展望

(1)科学技術への波及と展望

本研究課題において、X 線構造解析に基づき 3 種ある BAR ドメイン構造のうち、F-BAR、I-BAR の構造が発見され、BAR ドメイン構造が細胞膜の構造を決めることが明らかになった。

---

[219] 東京大学　プレスリリース　http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_260926_02_j.html
[220] 糸球体上皮細胞の構成要素であり、腎臓限外濾過の濾過障壁として働き、蛋白尿を防ぐ機能を持つ。
[221] Dumont V., Tolvanen T., Kuusela S., Wang H., Nyman T., Lindfors S., Tienari J., Nisen H., Suetsugu S., Plomann M., Kawachi H., Lehtonen S. “PACSIN2 accelerates nephrin trafficking and is up-regulated in diabetic kidney disease”, The FASEB Journal, 2017, 31(9), 3978-3990.

さらに、BAR ドメインの立体構造の違いによって結合する膜の曲率が異なることが示された。これらの成果は、細胞のエンドサイトーシスやがんが細胞浸潤する時の細胞膜の形態変化である陥入構造あるいは突出構造モデルとして広く認められており、その後の細胞膜の研究に大きな影響を与えた。

また、細胞骨格の形成に関わる分子として細胞膜の直下に存在するアクチン線維の WASP ファミリータンパク質との関連が同定され、その機能が解析された結果、それら一群のタンパク質が細胞膜の突起構造形成を介して、神経細胞などの移動、がん細胞の浸潤や転移に関わることが明らかにされた。

BAR ドメインやアクチン繊維の膜形態変化の研究が行われてきたが、近年は細胞膜の脂質に光を当て、細胞膜タンパク質との相互作用についての研究が展開されている。特に、TRPV4 アンキリンリピートドメインと脂質の相互作用に関する研究では、結晶構造解析により脂質((4,5)P2/IP3)の結合サイトが見出された。イオンチャネルにおいて、膜貫通領域ではなく、細胞質側のタンパク質ドメインが脂質結合ドメインとして同定された例は珍しく、この成果は、脂質結合部位の同定におけるタンパク質の立体構造に基づく評価の重要性を改めて認識させるものである。また、X 線構造解析や電子顕微鏡による形態学的解析や生化学的、細胞生物学的方法に加えて、質量分析計による細胞膜の脂質構成成分の詳細な解析が研究の幅を広げつつある。これまで、BAR ドメインの研究では脂質の部分はそれほど重視されてこなかったが、質量分析計による脂質成分の同定が簡便化したことで、脂質により BAR ドメインの活性が大きく変わることが徐々に解明されつつあり、新たな脂質-タンパク質相互作用の発見が期待される。

末次は、海外・国内合わせて、さきがけ研究以降、10 編以上の総説を執筆しており、特に、2013 年度 公益社団法人 日本生化学会 奨励賞に関連し、生化学第 86 巻第 5 号「細胞膜形態形成に関わるタンパク質と細胞骨格制御の研究」を執筆している。生物の最小単位である細胞の研究において、小胞形成やガン細胞浸潤の仕組みの理解は、最も重要で普遍的な課題であり、多数の総説が執筆され被引用数も多い。

(2)社会・経済への波及と展望

重要な疾患であるがん形成や様々な疾患においては、細胞の形態変化を伴う。細胞の分化、初期化においても同様である。また、近年では様々な薬剤を細胞内に送り込むドラッグデリバリーの観点からも細胞膜の形態変化は興味が持たれており、脂肪酸がどのように膜結合性タンパク質と結合し、がん化やその他の細胞内シグナリングにどのように関わっているかについて研究が行われ、がん浸潤機構に関与する分子の同定とポドソーム形成機構が明らかになった。これにより医薬の開発や疾患治療のターゲットの提供等、がん治療への道程を進めた。I-BAR のがん浸潤機構に関連して企業との共同研究も行っている。

教育活動として、高校生向けに細胞膜に関連した講演や出張授業が行われた。また、読売新聞のドキ★ワク先端科学「細胞を包むシャボン玉」で細胞膜に関して寄稿、連載された。

(3)その他特筆すべき事項

末次は、2011年6月にFEBS letters young investigator award を受賞しFEBS meeting (イタリア、トリノ)において受賞講演を行った。

また、平成24年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞、平成25年度生化学会奨励賞の各賞を受賞した。

引用文献

[1] Shimada A., Takano K., Shirouzu M., Hanawa-Suetsugu K., Terada T., Toyooka K., Umehara T., Yamamoto M., Yokoyama S., Suetsugu S. “Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of PACSIN2/Syndapin II”, FEBS Letters, 2010, 584(6), 1111-1118.

[2] Safari F., Suetsugu S. “The BAR domain superfamily proteins from subcellular structures to human diseases”, Membranes, 2012, 2(1), 91-117.

[3] Suetsugu S., Kurisu S., Takenawa T. “Dynamic Shaping of cellular membranes by phospholipids And membrane deforming proteins”, Physiological Reviews, 2014, 94, 1219-1248.

[4] Suetsugu S., Gautreau A. “Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling”, Trends in Cell Biology, 2012, 22(3), 141-150.

[5] Senju Y., Itoh Y., Takano K., Hamada S., Suetsugu S. “Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting”, Journal of Cell Science, 2011, 124(12), 2032-2040.

[6] Senju Y., Rosenbaum E., Shah C., Hamada-Nakahara S., Itoh Y., Yamamoto K., Hanawa-Suetsugu K., Daumke O., Suetsugu S. “Phosphorylation of PACSIN2 by protein kinase C triggers the removal of caveolae from the plasma membrane”, Journal of Cell Science, 2015, 128(15), 2766-2780.

[7] Senju Y., Suetsugu S. “Possible regulation of caveolar endocytosis and flattening by phosphorylation of F-BAR domain protein PACSIN2/ Syndapin II”, BioArchitecture, 2015, 5(42861), 70-77.

[8] Oikawa T., Okamura H., Dietrich F., Senju Y., Takenawa T., Suetsugu S. “IRSp53 mediates podosome formation via VASP in NIH-Src Cells”, PLoS ONE, 2013, 8(3), e60528.

[9] Itoh Y., Kida K., Hanawa-Suetsugu K., Suetsugu S. “Yeast Ivy1p Is a Putative I-BAR-domain Protein with pH-sensitive Filament Forming Ability in vitro”,

Cell Structure and Function, 2015, 41(1), 1-11.

[10]Takahashi N., Hamada-Nakahara S., Itoh Y., Takemura K., Shimada A., Ueda Y., Kitamata M., Matsuoka R., Hanawa-Suetsugu K., Senju Y., Mori M.X., Kiyonaka S., Kohda D., Kitao A., Mori Y., Suetsugu S. “TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P2”, Nature Communications, 2014, 5, 4994.

4.2　花粉管ガイダンスの動的システムの解明(東山哲也)

4.2.1　研究の概要

(1)研究テーマの状況(国内)

2001 年に東山により、卵細胞の隣にある二つの「助細胞[222]」が誘引物質を分泌することが発見された[1]。その後、世界的に花粉管誘引物質の探索が行われてきたが、標的である卵子が胚珠の組織に覆われているという難しい面もあり、その同定は難航した。2009 年、さきがけ研究において、卵子が母体組織から突き出したユニークな植物「トレニア」を用いることにより、初めて誘引物質が捉えられ、1824 年に花粉管が発見されて以来、140 年ぶりに、花粉管誘引物質の実態が明らかにされた[2]。

この発見を契機として、ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」や「世界トップレベル研究開発拠点プログラム(WPI)」では、多様な分野の研究者との共同研究により研究が加速・発展し、植物の生殖に関する数多くの発見がなされた。

まず、花粉管誘引物質 LURE に関して、トレニアに続きモデル植物のシロイヌナズナの LURE が同定され[3]、これが種間の生殖隔離障壁の鍵分子であることが明らかにされ、交雑による新品種育種への可能性が示された。さらに、LURE の受容体が同定され[4]、リガンドと受容体の結合状態の立体構造が明らかにされた[5]。

一方、植物の生殖に特有な重複受精のメカニズムに関する研究も大きく進展した。花粉管で運ばれてきた 2 個の精細胞が卵細胞と中央細胞とそれぞれ受精する様子がライブイメージングにより示され、その後もこの技術を利用し、様々な受精のメカニズムが解明された[7]。重複受精の研究では、植物が受精後に花粉管誘引を停止するメカニズムが明らかにされた[8]。

これらの発見は、様々な技術開発を結集して達成されたものである。その中心はライブイメージング技術であり、花粉管伸長あるいは重複受精に関する研究の多くはこの技術による観察が基礎となっている。また、さきがけ研究を含め、その後の研究で化学に関連した技術が利用され、LURE の発見や花粉管に誘引物質への応答を与える化合物 AMOR の発見につながった[6]。ゲノム編集やアンチセンス技術も単に利用するだけでなく、植物独自の新たな技術開発が行われた。また、近年は、新たな技術としてマイクロ流体デバイスの開発が行われており、ライブイメージング技術と合わせて、植物の生殖研究のための装置の開発が行われてきた。以下、花粉管、重複受精を中心に、その研究に用いられた技術を含め、代表的な研究成果を(ⅰ)～(ⅲ)にまとめた。

[222] 花粉管の誘引に関わっており、花粉管誘引物質を分泌する細胞。

(ｉ)花粉管誘引物質 LURE の発見と分子機構

(a)花粉管誘引物質 LURE の発見

2009 年、さきがけ研究において、東山により初めて、シソ目アゼトウガラシ科のトレニアの花粉管誘引物質が捉えられた。この物質は、動物に見られる抗微生物タンパク質 Diffensin に似た小分子ペプチドであることが見出され、LURE と名付けられた[2]。トレニアに引き続き、モデル植物として植物研究でしばしば使われるシロイヌナズナでも花粉管誘引物質が同定され、Arabidopsis thaliana LURE1(AtLURE1)と命名された[3]。

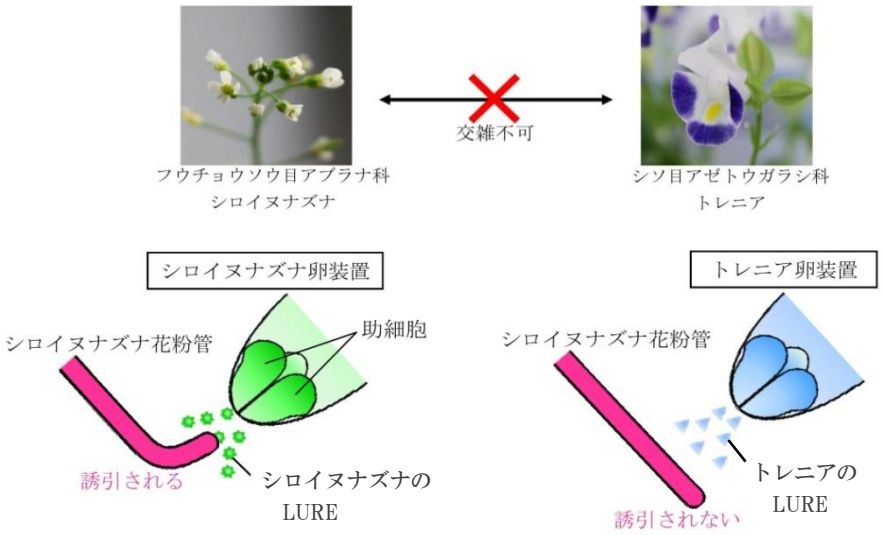


図 4-7　シロイヌナズナとトレニアの種間交雑の壁[223]

シロイヌナズナとトレニアは遠縁であるため、交雑はできない(上写真)。シロイヌナズナの花粉管(濃ピンク)は、シロイヌナズナの LURE(緑)には誘引されるが(下左)、トレニアの LURE(青)には誘引されない(下右)。

(b)植物交雑の鍵分子 LURE

シロイヌナズナの花粉管は種特異性があるため、トレニアの卵装置[224]には全く誘引されない(図 4-7)。しかし、シロイヌナズナの AtLURE1 遺伝子を導入したトレニアの助細胞は、シロイヌナズナの LURE (ルアー) を分泌し、シロイヌナズナの花粉管がトレニアの卵装置に誘引され、花粉管が卵装置内部へと進入する様子が観察された(図 4-8)[3]。このことから、花粉管誘引物質は、種の認識に極めて重要であり、この分子を操作することで任意の植物同士を交雑させる技術の開発につながる可能性が示された[3]。

[223] 名古屋大学 WPI プレスリリース
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20121219_wpi.pdf

[224] 受精後に種子となる組織である胚珠の内部にあり、卵細胞と二つの助細胞からなる。

図 4-8　トレニアへのシロイヌナズナ LURE 導入[225]

左はトレニアの卵装置(緑)から遺伝子導入したシロイヌナズナの LURE(緑粒)の分泌を示し、右では LURE 遺伝子導入トレニアの卵装置(緑)にシロイヌナズナの花粉管(赤)が誘引されている。

(c)花粉管誘引物質の受容体 PRK6 の発見

花粉管誘引物質 LURE の発見を受けて、花粉管の膜表面に局在する受容体キナーゼを調べた結果、Pollen-specific Receptor-like Kinase 6(PRK6)が LURE を認識する受容体であることが明らかになった[4]。また、花粉管先端に PRK6 が集積し、その伸長方向を変えることにより LURE に向かって伸長する仕組みが明らかにされた[4]。さらに、LURE と PRK6 の結合状態における結晶構造解析が行われ、結合部位と関与するアミノ酸残基が特定された(図 4-9)[5]。

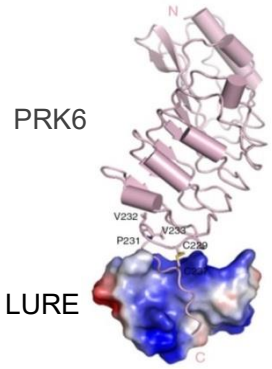


図 4-9　LURE と PRK6 の共結晶構造[226]

下方の C 末側は膜結合領域である。ロイシンリッチリピート(ピンクの筒)と下方の C 末側間にあるループ領域に LURE がはまり込んでいる。LURE 表層の赤は負、青は正に帯電した領域。

[225] 名古屋大学 WPI プレスリリース
www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/.../20121219_wpi.pdf
[226] 名古屋大学 WPI プレスリリース
www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/.../20171110_itbm_1.pdf

(d)花粉管に誘引物質への応答能を与える物質 AMOR の発見

花粉管が、誘引物質に応答する能力を獲得する現象が報告されてきたが、そのメカニズムを明らかにするため、トレニアを用いて花粉管の誘引物質応答能の獲得が定量的に調べられた(図 4-10)。

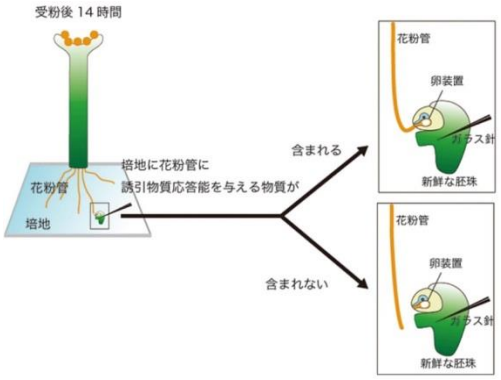


図 4-10　花粉管への誘引物質応答能を与える物質の探索[227]

活性候補物質を含む培地上で、受粉後 14 時間後に花粉管に胚珠をガラス針で近づけ、誘引物質応答能を与えるかどうか検定した。

その結果、花粉管に誘引物質への応答能を与える因子が見いだされ、AMOR(アモール)と命名された[6]。AMOR は、植物に特有の糖鎖アラビノガラクタンを持ち、この糖鎖の末端の 2 糖構造(メチルグルクロノシルガラクトース)が AMOR の活性に必須であり、化学合成された化合物を培地に加えると花粉管が誘引されたことから、この 2 糖が AMOR の活性の中心を担うことが示された(図 4-11)[6]。

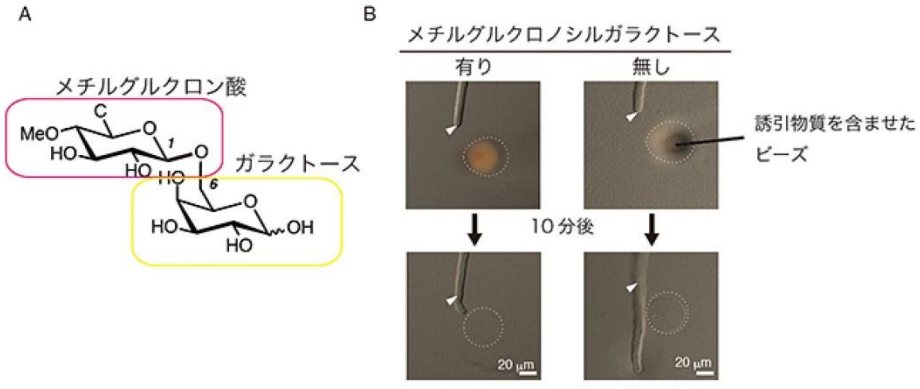


図 4-11　AMOR 活性を担う 2 糖構造[227]

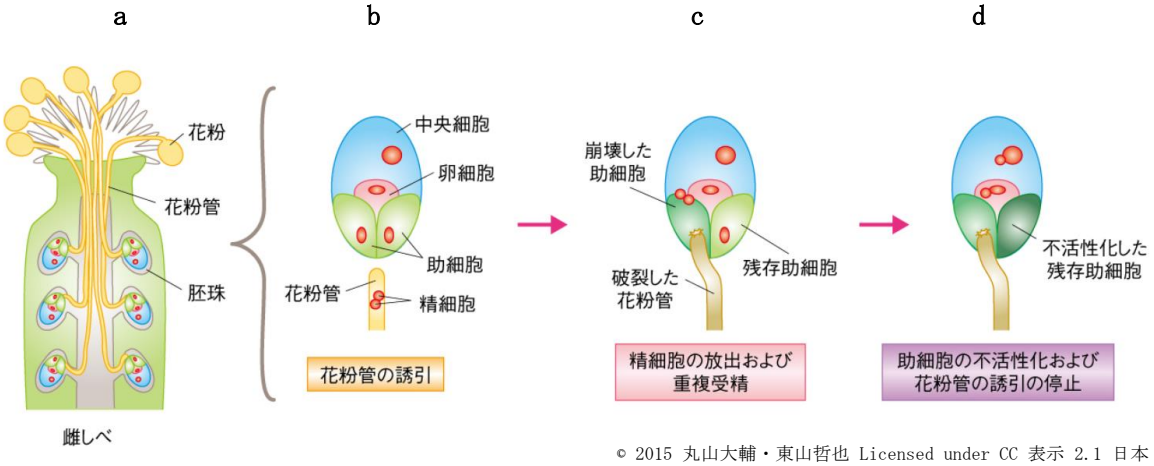
A は、AMOR の末端の 2 糖構造。B は、培地にメチルグルクロノシルガラクトースを添加して、花粉管への誘引物質応答能の付与を調べた実験。2 糖が存在すると、花粉管はビーズへと伸びる。

[227] 名古屋大学 WPI プレスリリース　https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160408/index.html

(ⅱ)重複受精機構の解明

(a)ライブイメージングによる重複受精機構の解明

被子植物では、花粉管によって運ばれる二つの精細胞がそれぞれ卵細胞と中央細胞と受精して胚と胚乳を作る「重複受精」を行い、これは乾燥条件下に短時間で子孫を種子として残す仕組みであるといわれている。シロイヌナズナにおいて、ライブイメージング技術を用いてそのメカニズムが調べられた結果、二つの精細胞が花粉管から放出される勢いにより受精のポイントに運ばれ、卵細胞と中央細胞にとどまって重複受精していくことが明らかになった(図 4-12)[7]。



© 2015 丸山大輔・東山哲也 Licensed under CC 表示 2.1 日本

図 4-12　重複受精と花粉管誘引停止のメカニズム[228]

左から(a)雌しべの模式図、(b)花粉管が誘引され、2 個の精細胞が運ばれ、(c)精細胞は胚のうに放出され重複受精が起こる。(d)残存した助細胞は不活性化され花粉管の誘引が停止する。

さらに、二つの精細胞の位置が、花粉管内で入れ替わらないことや、いずれの精細胞も卵細胞と中央細胞に同等に受精することが明らかになった[7]。

(b)重複受精後の花粉管誘引停止のメカニズム

重複受精では、一つの胚珠は 1 本の花粉管のみを誘引・受容し、受精後はそのほかの花粉管は誘引しない(図 4-13　A、B　下段のピンク)。そのメカニズムを調べるため、精細胞が一つしか作られない変異体を受粉させると、卵細胞と中央細胞のどちらかが受精し、胚又は胚乳のどちらかが発達した種子が作られた。これらの種子のどちらも花粉管の誘引は完全には停止せず、約 30%の割合で複数の花粉管を誘引していることが明らかになった[8]。

そこで、卵細胞あるいは中央細胞の一方だけ受精するシロイヌナズナの変異体を、細胞核が赤く、あるいは緑に光るよう改変した変異体の花粉で受粉させた結果、胚と胚乳の細胞核の色が異なる種子が得られたことから(図 4-13　C)、ヘテロ受精を人為的に引き起こすこと

[228] ライフサイエンス 新着論文レビュー　http://first.lifesciencedb.jp/archives/10061

ができることが明らかになった。これにより、ヘテロ受精には、卵細胞と中央細胞の受精による協調的な花粉管誘引停止の仕組みが背景にあることが示された[9]。

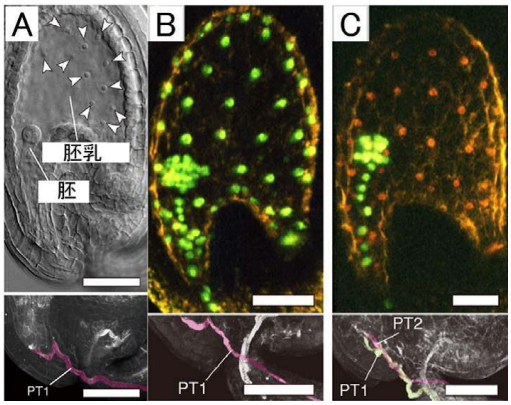


図 4-13　重複受精とヘテロ受精[229]

A：胚のう内部、重複受精により胚と胚乳(矢印)が形成。B：緑色蛍光ラベル精細胞を重複受精させると、卵細胞と中央細胞に同じ色の精細胞が受精する。C：1 個の精細胞の変異体を用いてヘテロ受精すると、緑色ラベル精細胞が卵細胞と受精すると緑色の胚が、赤色ラベル精細胞が中央細胞と受精すると赤色の胚乳が形成される。下段では、上段と同じ組織における花粉管(PT)(ピンク)を可視している。C では、花粉管が 2 本到達している(ピンクと緑)。

(c)受精後の助細胞の不活性化

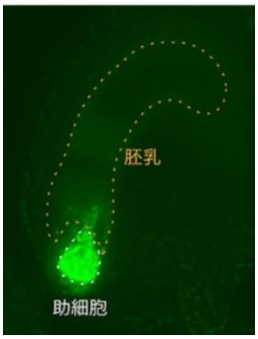


図 4-14　胚乳と融合する助細胞[230]

助細胞のミトコンドリアを緑色蛍光ラベルした受精後の胚珠。助細胞(白破線内)から、胚乳(オレンジ破線内)へと粒状構造を持つミトコンドリア(緑)が移動する。

重複受精で生き残った助細胞は、余分な花粉管の誘引を防ぐために素早く不活性化され、花粉管の誘引停止が起こる。シロイヌナズナでは、助細胞のミトコンドリアは隣に位置する胚乳へと移動することが明らかになった[9]。また、助細胞と胚乳の間を隔てる細胞壁が一部で壊れ、助細胞と胚乳が融合し(図 4-14)[9]、助細胞の核は胚乳の核と共存することが明ら

[229] 名古屋大学 WPI プレスリリース http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130514/index.html
[230] 名古屋大学 WPI プレスリリース　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150424/index.html

かになった。また、助細胞からの花粉管誘引ペプチドの分泌が停止し、花粉管の誘引停止が起きることが示唆された[9]。

(d)受精におけるカルシウムシグナル変動

動物では受精時の受精卵でのカルシウム変動が詳しく解析されてきたが、被子植物の重複受精における卵細胞や中央細胞のカルシウム変動は明らかになっていなかったため、胚珠を用いた体外重複受精によるカルシウム濃度観察法を開発し、受精に伴うカルシウム濃度変化が観察された。その結果、花粉管の精細胞放出に伴って1回目のカルシウム濃度上昇が起き、卵細胞と精細胞の膜融合時に 2 回目のカルシウム濃度上昇が起きることが明らかになった。また、中央細胞においては、カルシウム濃度上昇が見られなかった[10]。中央細胞は卵細胞より複数の精細胞との受精が起こりやすいことが分かっており、2回目のカルシウム濃度上昇が中央細胞の多精拒否に関わっている可能性が示唆された[10]。

このように、植物の生殖においても受精の各ステップに対応した細胞内カルシウム濃度変動が起こることが示され、受精の機構解明に有用な手段となることが示された。

(iii)研究技術の開発

(a)イメージング技術

近年の動物研究では、脳を丸ごと観察するために、透明化し蛍光観察する手法が国内外の多くの研究グループにより開発され、改良が進められている。しかし、植物では葉緑体のクロロフィルを始めとし、強い蛍光物質の存在のためにその直接的な応用はできなかった。そこで、理化学研究所 脳科学総合研究センター 先端基盤技術研究コア 細胞機能探索技術開発チーム(チームリーダー:宮脇敦史)で開発された透明化解析技術を植物に応用して、植物組織からクロロフィル(葉緑素)を取り除く、最適な試薬の組合せが探索された。その結果、植物を透明化する試薬「ClearSee®」が開発され[11]、植物の葉、根、茎、花などをホルマリン固定後、ClearSee®溶液に4日間浸すと、共焦点顕微鏡により、丸ごと観察できることが明らかになった(図 4-15 左)。また、シロイヌナズナ以外の園芸植物や作物、ヒメツリガネゴケ(コケ植物)でもClearSee®が効果的であることが明らかになった[11]。

本ライブイメージング技術は世界をリードし続けており、さきがけ研究以降、LURE 分子による花粉管の誘引[231]、重複受精の瞬間[232]の撮影など、様々な植物の生殖研究で利用されてきた。その動画[233]は、実際に発見した現象を明確に示すと同時にその理解に大きく役立っている。

[231] http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/071/research_2.html
[232] http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/071/research_2.html
[233] https://www.youtube.com/playlist?list=PLS8ZAvRp7kYurk7ZPmcoIX7v0mb-7Znpe

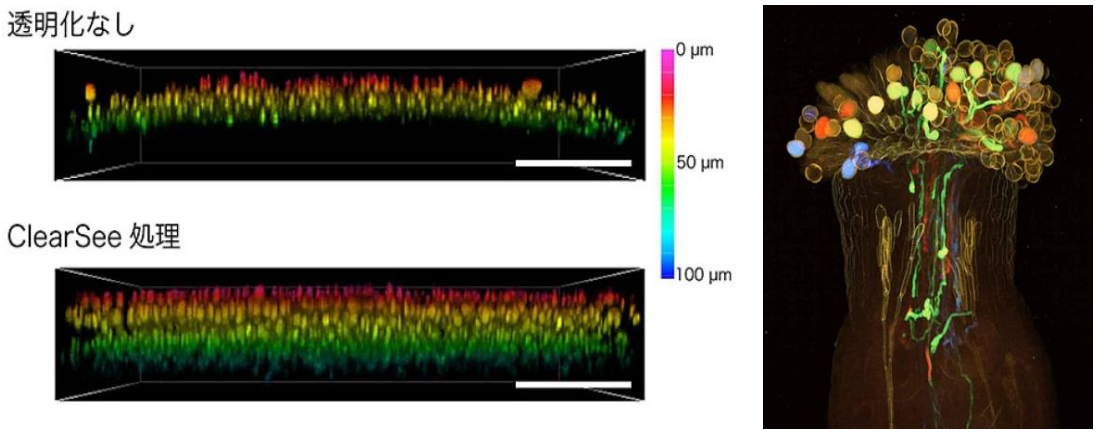


図 4-15　ClearSee の効果[234]

左：葉の共焦点顕微鏡画像。上は ClearSee®処理無し、下は処理有り。画像上側は葉の表面、下側は葉の裏側。ClearSee®処理した葉は裏側まで観察できる。右：各色の蛍光タンパク質で花粉管を標識し、ClearSee®液内に 5 か月間保存したシロイヌナズナの雌しべの 2 光子励起顕微鏡画像。

最近ではさらにイメージング技術の高度化を図っている。超解像顕微鏡(Stimulated Emission Depletion(STED)顕微鏡)は、従来の蛍光顕微鏡の限界を大きく超え、電子顕微鏡に近い分解能で生命現象を可視化する技術である。しかし、超解像顕微鏡には強いレーザー光照射が必要であり、蛍光色素の分解による褪色が起こるという問題があったため、強いレーザー光でも安定な超耐光性蛍光標識剤「PhoxBright 430 (PB430)」が開発された。これにより三次元超解像イメージング画像を STED 顕微鏡観察下においても繰り返して撮像することが可能になり、解像度の高い画像の取得が可能になった[12]

(b)遺伝子改変技術、ゲノム編集とアンチセンス核酸の利用

近年、ゲノム編集により遺伝子操作する技術が注目され、その利用が広まっている。特に、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-Associated Proteins 9(Cas9)は手順が簡単であり、ここ数年で急速に利用が広まっている。植物でもこの技術は利用されているが、モデル植物であるシロイヌナズナでは、個体発生が進んでから Cas9 タンパク質が発現するため、組織ごとでノックアウトの度合いが異なり、編集効率が低かった。そこで、卵細胞時点からその後の発生過程まで連続して Cas9 タンパク質を発現させ、強い活性を維持できる Ribosomal Protein S5A(RPS5A)遺伝子プロモーターを用いてクロロフィル合成遺伝子 Phytoene Desaturase 3 (PDS3)のノックアウトが試みられた結果、多くの個体で PDS3 遺伝子が欠失し、RPS5A プロモーターが植物のゲノム編集を効率化できることが明らかになった[13]。また、CRISPR/Cas9 により遺伝子導入した個体を

[234] 名古屋大学 JST プレス一覧　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20151028-2/index.html

簡便に判別するために、導入個体の種子で赤色蛍光タンパク質を発現させた(図 4-16)。このRPS5Aプロモーター下でCas9を発現させる分子ツールはpKAMA-ITACHI Red(pKIR)と命名された(図4-16)[13]。

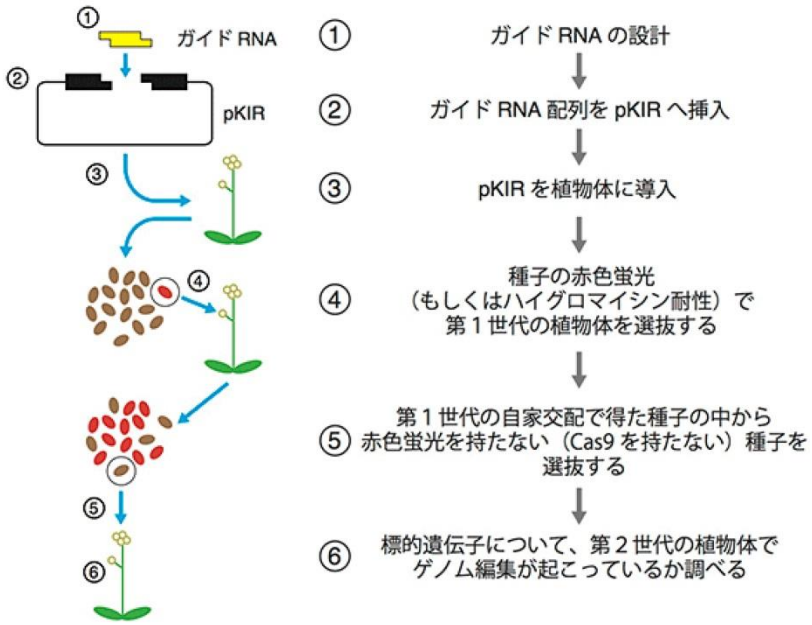


図 4-16　pKIR を用いたシロイヌナズナのゲノム編集法[235]

pKIR を用いた遺伝子ノックアウト株作出の手順。Cas9 を持つ植物の種子が赤色蛍光タンパク質で標識されているため(④)、Cas9 の有無の判断が容易になっている。

また、植物の遺伝子発現を抑制する手法としてホスホロチオエート化(S 化)[236]されたアンチセンスオリゴ核酸を利用することにより、細胞内で分解されにくく、遺伝子を継続的に阻害できるようになり簡単に様々な植物への応用が可能になった。

この方法をシロイヌナズナの花粉管の研究に適用したところ、S 化アンチセンスオリゴ核酸は、花粉に自然に取り込まれ、その結果、狙った遺伝子の働きを抑え、実際に花粉管の伸長を制御できることが確認された[14]。

(c)マイクロ流体デバイスの開発

花粉管細胞、根毛細胞、原糸体細胞のいずれも、最小 1μm の隙間を持つマイクロ流体デバイスの狭い隙間をすり抜けられることが明らかになり、マイクロ流体デバイスを用いることで、先端成長をする植物細胞に対して狭小空間での伸長能力を試験できるようになっ

[235] 名古屋大学 JST プレス一覧　http://www.jst.go.jp/pr/announce/20161117-2/index.html
[236] 通常、人工合成した DNA では、塩基間のリン酸基がホスホジエステル結合されているのに対し、ホスホロチオエートで結合されているものを S 化オリゴ DNA という。

た[12]。

(2)海外での共同研究の状況

最近では、中国・精華大学の Jijie Chai らとの共同研究で、LURE とその受容体 PRK6 の結合状態での共結晶構造が明らかになった[5]。その他、ドイツ・Humberg 大学の A Schnittger らとシロイヌナズナの減数分裂を制御する調節メカニズムに関する研究が行われ、網膜芽細胞腫のシロイヌナズナの相同遺伝子産物 Retinoblastoma related1(RBR1)が植物の幹細胞運命決定に働くホメオドメイン転写因子 WUSCHE(WUS)を抑制して減数分裂の開始を調節することが明らかになった[15]。また、ドイツ・フライブルグ大学の T. Laux とのシロイヌナズナ受精卵の非対称な分裂における雌雄の因子の関与に関する研究で、受精の際に父親の精細胞から受精卵に持ち込まれた因子が、特定のタンパク質の働きを活性化し、このタンパク質が母親の卵細胞から受け継いだ因子と協力することで、子供を適切な形に成長させることが明らかになった[16]。さらに、英国・Leicester 大学の D. Twell との精細胞形成と増殖に関する遺伝子制御の機構の研究で、Duo1-activated Zinc finger1/2(DAZ1/DAZ2)の二つの Ethylene response factor-associated amphiphilic repression(EAR)モチーフが雄性生殖細胞の分裂や、有糸分裂の調節因子であるサイクリンの適切な蓄積に必要であることが明らかになった[17]。

4.2.2 研究成果の波及と展望

(1)科学技術への波及と展望

さきがけ研究の中心課題である植物の生殖に関する研究では、花粉管誘引物質 LURE の発見を契機として、花粉管の伸長と受精に至るメカニズムが次々に明らかにされた。また LURE 分子が強い種の選択性を示し、生殖隔離障壁となっていることが明らかにされたことから、今後、この障壁を超えることにより、交雑種を生み出すことが期待される。

一方、重複受精のメカニズムについては、残存助細胞の不活性化過程の分子機構を示し、受精の制御機構が明らかにされた。受精以外の細胞融合を引き起こすプログラムの存在が示されたことから、植物における新たな細胞融合技術の開発にもつながることが期待される。また、重複受精技術と突然変異体を用いた重複受精の解析により、2 個の精細胞、卵細胞と中央細胞を中心とした重複受精の過程が明らかになり、ヘテロ受精も人為的に制御できるようになったことで、胚と胚乳の相互作用による種子形成の仕組みの解明が期待される。

一連の研究で中心にあったのがライブセルイメージング技術である。さきがけ研究での花粉管誘引物質の発見では、誘引物質により花粉管の伸長方向が変わる動画や重複受精の瞬間の動画はインパクトが強く、その後の多くの研究でもイメージングやそのほかの技術は植物研究に対応した開発・改良が加えられ、重要技術として多くの成果が生まれた。透明

化技術は、その代表的な技術として、商品化もされ利用されている。そのほかの遺伝子改変を利用する技術も植物の特徴に応じた改良により、研究手法の幅を広げている。

東山による植物受精に関する研究は、さきがけ研究終了後、ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」や「世界トップレベル研究開発拠点プログラム(WPI)」で、植物の研究を中心に化学合成技術やナノ工学技術と融合した研究へと発展し、異分野融合の成功例を内外に示した。花粉管誘引ペプチド、LURE や花粉管誘引物質への応答能を与えるなど、AMOR の発見は化学との連携の成果であり、種々のイメージングにおいて開発された装置、技術はナノ工学との連携の有用性を示している。

(2)社会・経済への波及と展望

遠縁な被子植物であるシロイヌナズナとトレニア間で、LURE が種特異性を決めていたという発見は、他の被子植物においても LURE を操作することで種間交雑の壁を打ち破ることが可能であることを示唆している。その受容体 PRK6 の遺伝子導入により異種植物の花粉管を誘引できることが分かり、遺伝子操作による新たな育種につながる可能性が示された。また、このメカニズムを活かし、受精効率を操作して種子生産の効率を高め、異種間受精を容易にする薬剤が開発され、その結果、食糧増産やバイオマス向上につながる新しい植物が作出できることが期待される。

研究ツールとして開発された植物透明化試薬 ClearSee®は富士フイルム和光純薬(株)から、生理活性物質 AMOR は東京化成工業(株)から販売されている。ゲノム編集ベクター「KAMA-ITACHI」は特許出願され、国内メーカーから販売される計画である。ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」では、ほかにも多くの特許出願がなされている。

また、ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」では異科接木と接木マイクロデバイスを組み合わせた技術が開発され、その技術をコアとしたベンチャー企業が設立され、東山もその設立メンバーの一人となっている。

引用文献

[1] Higashiyama T. Yabe S., Sasaki N., Nishimura Y., Miyagishima S., Kuroiwa H., & Kuroiwa T. “Pollen tube attraction by the synergid cell”, Science, 2001, 293(5534), 1480-1483.

[2] Okuda S., Tsutsui H., Shiina K., Sprunck S., Takeuchi H., Yui R., Kasahara R.D., Hamamura Y., Mizukami A., Susaki D., Kawano N., Sakakibara T., Namiki S., Itoh K., Otsuka K., Matsuzaki M., Nozaki H., Kuroiwa T., Nakano A., Kanaoka M.M., Dresselhaus T., Sasaki N., Higashiyama T. “Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells”, Nature, 2009, 458(7236), 357-361.

[3] Takeuchi H., Higashiyama T. “A Species-Specific Cluster of Defensin-Like Genes Encodes Diffusible Pollen Tube Attractants in Arabidopsis”, PLoS Biology, 2012, 10(12), e1001449.

[4] Takeuchi H., Higashiyama T. “Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in Arabidopsis”, Nature, 2016, 531(7593), 245-248.

[5] Zhang X., Liu W., Nagae T., Takeuchi H., Zhang H., Han Z., Higashiyama T., Chai J. “Structural basis for receptor recognition of pollen tube attraction peptides”, Nature Communications, 2017, 8, 1331.

[6] Mizukami A.G., Inatsugi R., Jiao J., Kotake T., Kuwata K., Ootani K., Okuda S., Sankaranarayanan S., Sato Y., Maruyama D., Iwai H., Garénaux E., Sato C., Kitajima K., Tsumuraya Y., Mori H., Yamaguchi J., Itami K., Sasaki N., Higashiyama T. “The AMOR Arabinogalactan Sugar Chain Induces Pollen-Tube Competency to Respond to Ovular Guidance”, Current Biology, 2016, 26(8), 1091-1097.

[7] Hamamura Y., Saito C., Awai C., Kurihara D., Miyawaki A., Nakagawa T., Kanaoka M.M., Sasaki N., Nakano A., Berger F., Higashiyama T. “Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in Arabidopsis thaliana”, Current Biology, 2011, 21(6), 497-502.

[8] Maruyama D., Hamamura Y., Takeuchi H., Susaki D., Nishimaki M., Kurihara D., Kasahara R., Higashiyama T. “Independent Control by Each Female Gamete Prevents the Attraction of Multiple Pollen Tubes”, Developmental Cell, 2013, 25(3), 317-323.

[9] Maruyama D., Völz R., Takeuchi H., Mori T., Igawa T., Kurihara D., Kawashima T., Ueda M., Ito M., Umeda M., Nishikawa S.-I. Groß-Hardt R., Higashiyama T. “Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism”, Cell, 2015, 161(4), 907-918.

[10]Hamamura Y., Nishimaki M., Takeuchi H., Geitmann A., Kurihara D., Higashiyama T. “Live imaging of calcium spikes during double fertilization in Arabidopsis”, Nature Communications, 2014, 5, 4722.

[11]Kurihara D., Mizuta Y., Sato Y., Higashiyama T. “ClearSee: A rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging”, Development (Cambridge), 2015, 142(23), 4168-4179.

[12]Yanagisawa N., Sugimoto N., Arata, H., Higashiyama T., & Sato Y. “Capability of tip-growing plant cells to penetrate into extremely narrow gaps”, Scientific Reports, 2017, 7(1), 1403.

[13]Tsutsui H., Higashiyama T. “pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in Arabidopsis thaliana”, Plant and Cell Physiology, 2017, 58(1), 46-56.

[14]Mizuta Y., Higashiyama T. “Antisense gene inhibition by phosphorothioate antisense oligonucleotide in Arabidopsis pollen tubes”, Plant Journal, 2014, 78(3), 516-526.

[15]Zhao X., Bramsiepe J., Van Durme M., Komaki S., Prusicki M.A., Maruyama D., Forner J., Medzihradszky A., Wijnker E., Harashima H., Lu Y., Schmidt A., Guthörl D., Logroño R.S., Guan Y., Pochon G., Grossniklaus U., Laux T., Higashiyama T., Lohmann J.U., Nowack M.K., Schnittger A. “RETINOBLASTOMA RELATED1 mediates germline entry in Arabidopsis”, Science, 2017, 356(6336), eaaf653.

[16]Ueda M., Aichinger E., Gong W., Groot E., Verstraeten I., Vu L., Smet I., Higashiyama T., Umeda M., Laux T. “Transcriptional integration of paternal and maternal factors in the Arabidopsis zygote”, Genes & Development, 2017, 31, 617-627.

[17]Borg M., Rutley N., Kagale S., Hamamura Y., Gherghinoiu M., Kumar S., Sari U., Esparza-Franco M.A., Sakamoto W., Rozwadowski K., Higashiyama T., Twell D. “An EAR-dependent regulatory module promotes male germ cell division and sperm fertility in Arabidopsis”, Plant Cell, 2014, 26(5), 2098-2113.

4.3　可視化を通して解析する消化管粘膜免疫系の誘導維持機構(本田賢也)

4.3.1　研究の概要

(1)研究テーマの状況(国内)

本研究領域において、本田が腸内細菌の研究を始めた2009年頃は、腸内細菌の機能の研究がようやく盛んになり出した頃であり、それまではビフィズス菌などの乳酸菌を中心とした腸内細菌の培養や単離方法の研究が進んでいた。一方、腸内の共生細菌が、免疫系に影響を及ぼすことは知られていたもののその詳細は明らかではなかった。

本田は本研究課題において、腸内細菌が腸内局所の消化管特異的な免疫系に及ぼす影響を研究し、それに基づいた自己免疫疾患やアレルギーの治療法の創出を目指した。

本研究課題で構築した研究手法は、消化管リンパ球を蛍光タンパク質でマーキングすることにより無菌化レポーターマウスを作製し、さらに、ある種の腸内細菌だけを生着させた“ノトバイオート”マウス[237]を作製することにより、マウス腸管における免疫細胞の分化状態を調べるというものであった。さらに、これらのマウスに影響を与える腸内細菌を探索・抽出することにより菌株の特定が試みられた。この手法は、その後現在に至るまでの研究の基礎となっている。菌株の特定では、2010 年代に入り次世代シーケンサーが普及し始め、研究が加速されると同時に、メタゲノムというアプローチにより腸内細菌叢の全体像が明らかになってきた。当初は、難培養性と考えられていた腸内細菌も次世代シーケンサーを使うことにより、その同定が進み、現在ではヒトの腸内細菌の多くは培養可能であると考えられるようになった。

本研究課題では、まず消化管に多く存在する主要な免疫細胞である T helper 17 cell(Th17)細胞の誘導に焦点が当てられた。まず、Th17 細胞を特異的に誘導する腸内細菌の同定を試みた結果、セグメント細菌(Segmented filamentous bacteria:SFB)と呼ばれる消化管常在菌が強力に Th17 細胞を誘導することが明らかになった。また、この細胞が多いマウスは、病原性細菌感染に対して抵抗性を持つことが示された[1]。この発見は、その後の腸内細菌研究の契機となり、制御性 T 細胞(regulatory T cell:Treg 細胞)が腸内細菌により誘導されることが明らかにされ[2]、これらの誘導に関与する菌株の種類も特定されてきた[3],[4]。近年では、腸内培養技術、ノトバイオートの作製技術及び次世代シーケンサーによる細菌の同定技術を基礎として、様々な疾患分野における腸内細菌の影響に関する研究や治療法の開発が行われている。以下、本研究課題以降に行われた腸内細菌に関する本田の研究を(ⅰ)Th17 細胞、(ⅱ)Treg 細胞、及び(ⅲ)疾患と腸内細菌との関連、に分けてまとめた。

---

[237] ノトバイオート:持っている微生物叢が全て知られている動物であり、無菌動物に既知の微生物を投与、定着させることにより作製される。

（ｉ）セグメント細菌等による Th17 細胞の誘導

・腸内細菌による免疫細胞誘導の発見

Th17 細胞は、哺乳動物の免疫システムにおいて中心的な T 細胞であり、細菌や真菌に対する感染防御に重要である一方、過剰な応答が自己免疫疾患を引き起こすことが知られていた。腸管の免疫システムに影響を与える腸内細菌に関する過去の知見[238]から、ノトバイオートマウスを作製し、腸内細菌による免疫細胞の誘導を調べた結果、セグメント細菌が消化管の免疫細胞、Th17 細胞を特異的にかつ強力に誘導することが見いだされた[1]。

・Th17 細胞の誘導における腸内細菌の腸管上皮細胞への接着の重要性

Th17 細胞が腸内常在細菌のセグメント細菌(SFB)によって誘導されることから、マウス由来 SFB(M-SFB)とラット由来 SFB(R-SFB)を用い、Th17 細胞の上皮細胞への接着性が比較された。その結果、M-SFB は、マウス小腸上皮のみに強く接着するのに対し、R-SFB は、ラット小腸上皮にのみ強く接着すると同時に、M-SFB はマウスにおいてのみ、また、R-SFB はラットにおいてのみ Th17 細胞を誘導することが明らかになった。この結果より、SFB の上皮接着は、宿主特異的であり、Th17 細胞誘導能力と強く相関していることが示唆された[3](図 4-17)。

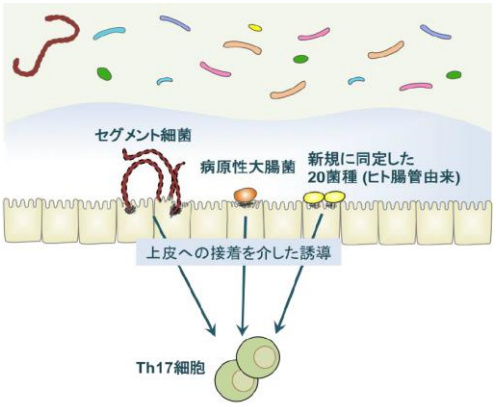


図 4-17　Th17 細胞を誘導する種々の細菌と上皮細胞への接着[239]

Th17 細胞を誘導する種々の細菌(セグメント細菌、病原性大腸菌、20 種の同定された腸内細菌)は、腸管上皮細胞の接着能を有していた。

また、他の細菌について調べたところ、げっ歯類に感染する病原性大腸菌 Citrobacter rodentium 菌やヒトにも感染する腸管出血性大腸菌 O157 は、腸管上皮に接着し(図 4-17)、Th17 細胞を誘導することが知られていたが、上皮接着に関わる遺伝子を変異させたところ、

[238] 共同研究者であるヤクルト中央研究所において多くの知見が蓄積されていた。
http://www.yakult.co.jp/news/article.php?num=428

[239] https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2015/osa3qr0000013pum-att/20150925_01.pdf

これらの細菌は上皮に接着せず、Th17 細胞の誘導もほとんど見られなくなったことより、腸内細菌による上皮接着が Th17 細胞の誘導に重要であることが示された[3]。

Th17 細胞を誘導する腸内細菌としてマウス由来の SFB が最初に見いだされたが、ヒトにはセグメント細菌の存在は知られていなかった。そこで、Th17 細胞を誘導するヒトの腸内細菌の同定・分離が試みられ、ヒトの糞便に由来する 20 種の菌株が Th17 細胞を誘導することが見出され、単離培養された。この 20 菌株をマウスに投与したところ、Th17 細胞を誘導しない細菌に比べ、上皮により強く接着していることが明らかになり(図 4-17)、上皮細胞への接着能と Th17 誘導の関連が確認された[3]。

(ⅱ)Clostridium 属細菌による Treg 細胞の誘導

・ヒト由来 Clostridium 属細菌による Treg 細胞への分化誘導

本研究課題のマウスの実験により、腸内細菌のうち、グラム陽性菌で芽胞を形成する Clostridium 属菌が Treg 細胞の誘導に必須であることが明らかにされ[2]、また、マウス由来 Clostridium 属菌の単離した 46 株のカクテルにより、forkhead box P3(Foxp3)[240]陽性 Treg 細胞が誘導されることが示された[4]。これらの Clostridium 属菌カクテルは、マウス由来であったため、ノトバイオートマウスを用いてヒトの腸内細菌の特定が試みられた(図 4-18)。

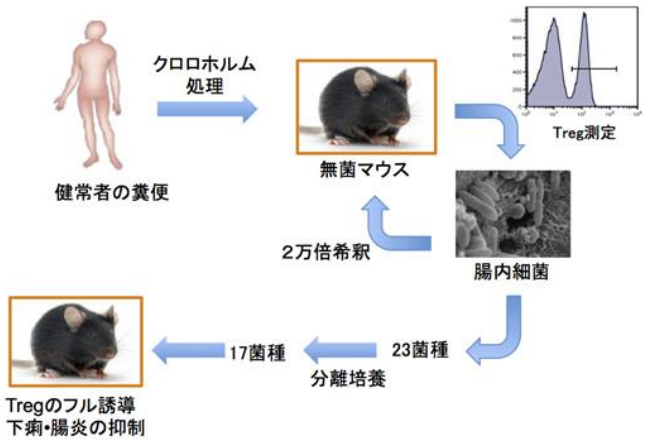


図 4-18　腸内細菌研究の概要[241]

健常人の糞便に含まれる腸内細菌から、minimal essential の細菌カクテルを探索するプロセス。

[240] 制御性 T 細胞(Treg)のマスター転写因子

[241] 東京大学大学院　ホームページ　http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/22_entry236

まず、健常成人の糞便を無菌に投与すると強力な Treg 細胞の誘導が観察された。そこでヒトの糞便をクロロホルム処理[242]し、無菌マウスに投与することにより、Treg 細胞をマウス腸管で誘導したマウスを作製した(図 4-18)。菌種を絞り込むため、Treg 細胞を誘導したマウス盲腸の腸内細菌を 2 万倍に希釈して無菌マウスに投与するという操作を繰り返すことにより、23 種類から成る Treg 細胞誘導能を持つ細菌混合物を分離することに成功した(図 4-18)。さらに、細菌混合物から個々の菌を分離培養し、再混合するという過程を経て、Treg 細胞誘導に必要とされる最小数の菌株カクテルを探索し、最終的に 17 菌種の培養に成功した。17 菌種のカクテルを無菌マウスに投与したところ、その Treg 細胞誘導能は、23 菌種の混合物とほぼ同様の誘導能が得られたが、さらに少数の菌種のカクテルでは、Treg 細胞誘導能は低下することが示された[4]。

17 菌種の全ゲノム配列を解析したところ、17 菌種は全てが Clostridium 属菌であり、サブグループ XIV、XVIII、IV に属していた。これらのサブグループのヒト由来菌種の幾つかは、炎症性腸疾患患者で減少していることが知られており、17 菌種の多くが、健常者群に比べて炎症性腸疾患患者群の糞便で減少していることが確認された。また、17 菌種を投与したマウスは、腸炎や下痢が有意に抑制されることが明らかになった[4]。

・Clostridium 属細菌による Treg 細胞誘導における酪酸の関与

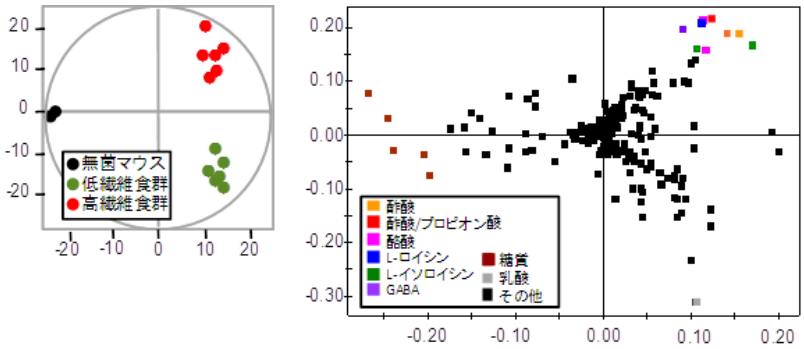


図 4-19　盲腸内容物に含まれる代謝産物のメタボローム解析[243]

左図：低、及び高繊維食の無菌マウス盲腸内代謝産物のメタボローム解析の結果。個々のマウスの代謝産物の特徴を二次元プロット。試験群ごとに代謝産物の特徴が類似していた。右図：マウス盲腸内代謝物の二次元プロット図(左図と位置関係が対応)。無菌マウスには糖質が多く、高繊維食群では糖質代謝産物である酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸やアミノ酸量が多い。

[242] ある種の細菌で悪い生息環境では、生存のため耐久性の高い皮膜に包まれた細胞構造である芽胞を形成する。芽胞は、通常では致死性であるエタノールやクロロホルムや高温処理に耐えられるようになる。
[243] 理化学研究所ホームページ　http://www.riken.jp/pr/press/2013/20131114_1/

ヒトの腸管には 500～1,000 種類の腸内細菌が生息し、食物繊維などを代謝して有用な低分子代謝産物を産生している。Clostridium 属細菌のノトバイオートマウスを作製し、腸内細菌が Treg 細胞を誘導する盲腸内の代謝産物を調べた結果、高繊維食群でのみ Treg 細胞が増加し、産生される代謝産物が Treg 細胞への分化誘導に重要であることが明らかになった。さらに、それに必要とされる代謝産物をメタボローム解析により網羅的に調べた結果、酪酸に顕著な誘導活性が認められた[5](図 4-19)。

さらに、酪酸化でんぷん[244]を離乳直後のマウスに食べさせ、大腸の酪酸濃度を高めたところ、Treg 細胞の割合が約 2 倍に増加した。また、大腸炎モデルマウスに酪酸化でんぷんを投与したところ、制御性 T 細胞の数が 1.5～2 倍に増加し、大腸炎が抑制された[5]。

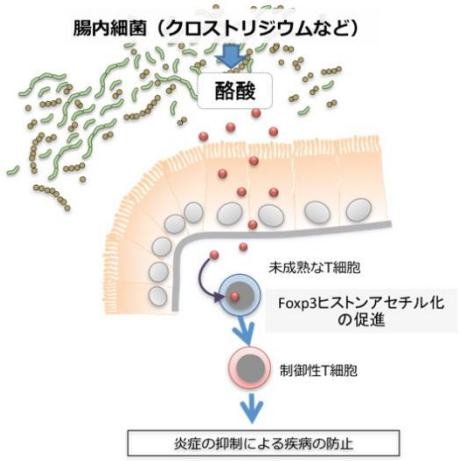


図 4-20　腸内細菌が生産する酪酸による制御性 T 細胞誘導メカニズム [243]

酪酸は Foxp3 遺伝子のヒストンアセチル化を促進し、Treg 細胞が誘導され、腸管の炎症が抑制される。

次に、酪酸が Treg 細胞を誘導する分化のメカニズムを検討したところ、酪酸のヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用により Foxp3 遺伝子領域のヒストンのアセチル化が促進されていることが明らかになった。すなわち、腸内細菌が産生した酪酸が、T 細胞のエピジェネティクス制御を介して Treg 細胞への分化を誘導することが明らかになった[5](図 4-20)。

(iii)腸内細菌による様々な疾患との関連研究

正常な腸内細菌叢では、Bacteroides 属細菌や Clostridium 属細菌が多く存在し、細菌の多様性も高い。先に述べたように腸内細菌により免疫系細胞が誘導され、腸の上皮粘膜のバリアが保たれている。しかし、偏食、感染や遺伝的要因による炎症や抗生物質の過剰な使用など様々な原因により、Bacteroides 属細菌や Clostridium 属細菌が減り、病原性のある細菌を含め、通常は僅かしか存在しない菌種が増加し(dysbiosis)、様々な疾患の原因となる[245](図 4-21)。

[244] でんぷん粉は酪酸化すると酵素加水分解されにくくなり、でんぷんよりも大腸の酪酸を増加させる。
[245] 本田 賢也 ″領域融合レビュー″, 2013, 2, e011.

これまで Treg 細胞や Th17 細胞の異常が、ある種の疾患と関連することが示されてきたが、さらに本田は様々な腸内細菌の異常と免疫系疾患との関連について、多くの共同研究を通して研究を展開してきた。また、代謝性疾患や神経系疾患についても検討を行っている。以下、最近報告された腸内細菌の異常と疾患との関連に関する代表的研究についてその概要を説明する。

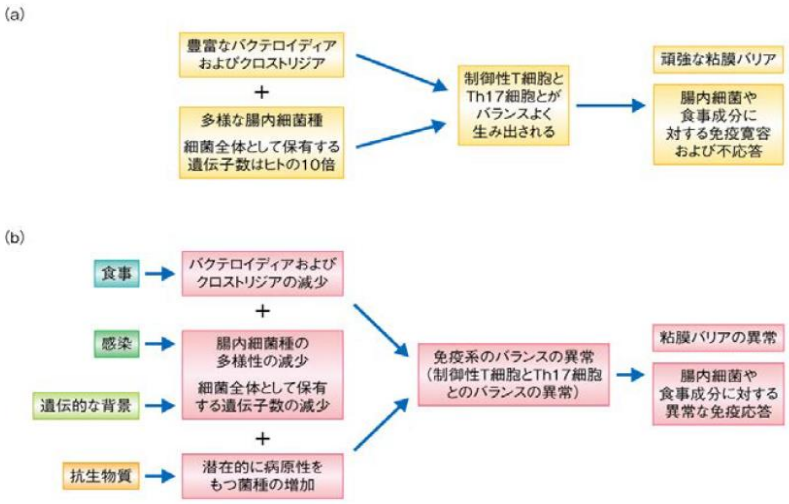


図 4-21　dysbiosis と炎症[245]

(a)正常な腸内細菌叢　(b)dysbiosis；偏食、感染や遺伝的要因による炎症や抗生物質の利用により免疫系のバランスが崩れ、粘膜のバリアの破壊、あるいは腸内細菌や食事成分への異常な免疫応答が生じる。

・口腔常在菌の腸管への異所性定着

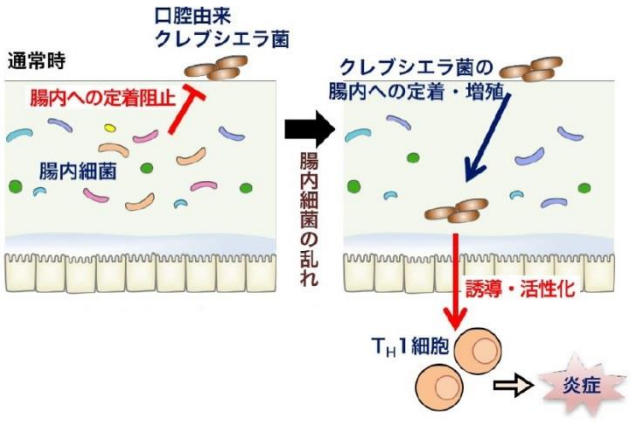


図 4-22　口腔常在菌の腸管への異所性定着と免疫細胞の活性化[246]

腸内細菌叢が乱れ、口腔常在菌のクレブシエラ菌が腸管内に定着すると、免疫細胞が過剰に活性化され、炎症性疾患の原因となる。

[246] 慶應義塾大学医学部プレスリリース https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2017/10/20/171020-1.pdf

口腔細菌が炎症性腸疾患患者や大腸がん患者の便中に検出されることに着目し、口腔細菌が腸管内に定着することによる腸管免疫系への影響と、それに関連する疾患について調べられた。クローン病[247]患者の唾液を無菌マウスに経口投与し、マウス腸管に存在する免疫細胞を解析した結果、マウス大腸で、免疫系と炎症作用の制御に関連する Interferon-γ(IFN-γ)を産生する CD4 陽性ヘルパーT 細胞(TH1 細胞)が増加していることが見出された。さらに、腸に定着した細菌の網羅的遺伝子解析により選択された約 30 種類の細菌を単離・培養し、無菌マウスへ定着させることにより、クレブシエラ属のクレブシエラ・ニューモニエ菌(Klebsiella pneumoniae)が TH1 細胞を誘導することが明らかになった[6]。

また、通常のマウスにこの口腔細菌を経口投与しても腸管内では定着・増殖しなかったが、抗生物質を投与した SPF マウス[248]では腸管内に定着し、TH1 細胞を強く誘導することが明らかになった。このことから、抗生物質の投与により腸内細菌叢の定着阻害効果が弱められ、クレブシエラ・ニューモニエ菌が腸管内へ定着することが示唆された[6]。健常者においても過度の抗生物質の投与により、腸管へのクレブシエラ属菌の定着が起こり、炎症性疾患の原因となる可能性があることが示された[6]。

・網膜ブドウ膜炎の発症原因となる腸内細菌

ヒトの失明の主な原因の一つであるブドウ膜炎は、活性化 T 細胞によって誘発される自己免疫性疾患と考えられていたが、抗原となる網膜タンパク質は、血液-網膜バリアにより T 細胞を活性化できないため、その活性化のメカニズムは不明であった。そこで、ブドウ膜炎の自然発症マウスモデルの腸内免疫細胞を調べると、ブドウ膜炎の発症前に腸内の活性化 T 細胞の数が多いこと、抗生物質の投与によりこれらの活性化 T 細胞数が減少することが見出された。さらに、その腸内容物のタンパク質抽出物により網膜特異的 T 細胞が活性化され、ブドウ膜炎が引き起こされることが明らかになった。これらの結果により、腸内細菌が産生する網膜タンパク質の模倣分子によって、網膜特異的 T 細胞が活性化されブドウ膜炎が引き起こされていることが示唆された[7],[249]。

・腸内細菌の移植片対宿主病に対する効果

腸内微生物叢変化と移植片対宿主病(graft-versus-host disease:GVHD)の関連が調べられた。同種異系骨髄移植後では、消化管の微生物由来短鎖脂肪酸量のうちの酪酸のみに変化が見られた。移植後の腸管上皮細胞における酪酸の減少は、ヒストンアセチル化を減少させたが、酪酸の局所投与により回復し、移植後の細胞間の接合性を改善し、アポトーシスを減

[247] 口から肛門までの消化管に非連続的に炎症や潰瘍ができる疾患
[248] マウス飼育施設の基準を満たした清潔な環境で飼育され、病原菌がいないマウス。腸内や皮膚には常在細菌が存在する。(specific pathogen free mouse)
[249] 本研究は米国国立衛生研究所 眼科研究所の Caspi, R.R らとの共同研究により行われた。

少させ、GVHD を軽減した。また、酪酸を高産生する Clostridium17 菌株の投与によってもGVHD は減少し、腸内細菌の GVHD に対する効果が明らかになった[8],[250]。

・Treg 細胞のサブポピュレーションと大腸直腸がんの予後

これまで述べてきた CD4 陽性 FOXP3 陽性 Treg 細胞には 3 種のサブポピュレーションが存在する。それぞれについて腸内細菌の腫瘍への浸潤を 16SDNA シーケンシング法[251]で検討したところ、FOXP3 低発現 T 細胞のサブポピュレーションを多く持つ大腸直腸がんにおいて、腸内細菌 Fusobacterium nucleatum が検出され、腸内細菌の腫瘍への浸潤が炎症反応を惹起し、それに伴い、産生されたサイトカインが腫瘍の局所において FOXP3 低発現 T 細胞の分化に関与することが示唆された[9],[252]。

・腸内細菌による動脈硬化層の形成

腸内微生物叢は、アテローム性動脈硬化症の発症において重要な役割を果たすことが知られており、脂質代謝と全身性炎症を介したアテローム[253]形成における腸内微生物叢の影響が調べられた。動脈硬化モデルマウスである Apolipoprotein E(ApoE)欠損マウスを無菌化したところ、普通食の ApoE 欠損マウスと比較して、血漿と肝臓コレステロールレベルが増加していることが見いだされた。また、無菌化により回腸の胆汁酸組成が変化し、これにより腸肝線維芽細胞増殖因子と受容体が活性化され、肝臓胆汁酸合成の減少による肝臓のコレステロールの蓄積と関連していることが示唆された[10]。一方、無菌化により、動脈硬化モデルマウスでは、アテローム形成が減少しており、これはリポ多糖類媒介性炎症の減弱によることが示唆された[10],[254]。

(2)海外での共同研究の状況

本田は、国内外の各分野の専門家と共同研究を行うことにより、幅広いヒトの疾患領域で腸内細菌との関連性を調べてきた。海外との共同研究では、フランス パスツール研究所 Eberl G.らとは、腸内細菌に誘導される Treg 細胞がある核内受容体の発現を介して分化し、

[250] 本研究は米国ミシガン大学内科の Reddy, P.らとの共同研究により行われた。
[251] リボソームの小サブユニット 16S rDNA 配列中にほぼ全てのバクテリアに共通な塩基配列が存在していることを利用して、RNA 塩基配列を基にして採取したサンプル中に存在する細菌を同定および比較する手法。
[252] 本研究は大阪大学免疫学フロンティア研究センター西川博嘉、坂口志文らとの共同研究で行われた。
[253] 脂質（コレステロールや中性脂肪)、カルシウムや様々な線維性結合組織を含んだ細胞や細胞の死骸から構成された動脈血管内での蓄積物であり固まりである。
[254] 本研究は神戸大学大学院医学系研究科内科との共同研究で行われた。

アレルギーの制御に関与することが示された[255]。また、米国 NIH の Caspi R.R.らとは、腸内細菌による網膜の自己免疫誘導についての上述の共同研究が行われた[7]。一方、米国 マサチューセッツ大学の Bucci V.らとは、微生物の動態の予測によるバクテリアセラピー設計に関する共同研究が行われ、その設計アルゴリズムが提示された[256]。

4.3.2 研究成果の波及と展望

(1)科学技術への波及と展望

腸内細菌による Treg 細胞あるいは Th17 細胞の誘導の発見を基盤として、共同研究を通じて、様々な免疫系疾患における腸内細菌の関与が明らかにされてきた。また、近年は免疫系疾患以外の疾患についても、腸内細菌との関連が見出されている。本田は、その研究目標を「疾患治療に結び付く腸内細菌のカクテルを見いだすこと」としており、作用を示す腸内細菌の“minimal essential”を見出すことにより直接的な疾患治療に結びつけることを中心に研究が進められている。Clostridium 細菌やセグメント細菌による免疫細胞の誘導や疾患への影響に関する発見は、腸内細菌に関する様々な研究プロジェクトにつながり[257]、科学技術の進展に大きなインパクトを与えてきた。これらの研究によって様々な腸内細菌の生体における役割や疾患の発症への関与が次第に明らかになってきたが、腸内細菌叢が引き起こす様々な現象の分子基盤は今後の課題である。今後さらに現象が次々に明らかにされると同時に、生体制御システムの理解が大きく進むことが期待される。本田により行われた腸内細菌の研究は、その多くが国内外の各専門分野の研究者との共同研究によって進められており、腸内細菌と多様な生体システムとの関連についての研究が広がっていくことが期待される。

(2)社会・経済への波及と展望

腸内細菌の免疫機構との関連に関する本研究課題が開始された当初より、その最終目標として「炎症性腸疾患を始めとする免疫難病への新たな治療法の創出」が挙げられており、常に社会的な波及効果を意識した研究が進められた。直接治療につながるものも含め、全て

---

[255] Ohnmacht C., Park J.-H., Cording S., Wing J.B., Atarashi K., Obata Y., Gaboriau-Routhiau V., Marques R., Dulauroy S., Fedoseeva M., Busslinger M., Cerf-Bensussan N., Boneca I.G., Voehringer D., Hase K., Honda K., Sakaguchi S., Eberl G. “The microbiota regulates type 2 immunity through RORγt+ T cells”, Science, 2015, 349(6251), 989-993.

[256] Bucci V., Tzen B., Li N., Simmons M., Tanoue T., Bogart E., Deng L., Yeliseyev V., Delaney M.L., Liu Q., Olle B., Stein R.R., Honda K., Bry L., Gerber G.K. “MDSINE: Microbial Dynamical Systems INference Engine for microbiome time-series analyses”, Genome Biology, 2016, 17(1), 121.

[257] AMED-CREST(生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出)「腸内常在細菌特性理解に基づく難治性疾患新規治療法の開発」(2012 年度～2016 年度)、AMED 革新的先端研究開発支援事業(インキュベートタイプ)LEAP「腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出」(2016 年度～2020 年度)

の発表論文で、疾患との関連性について述べられている。最近では、対象となる疾患の分野は、免疫の関与する腸疾患から、研究開始当初の目標を超えて糖尿病、動脈硬化などの代謝、心血管系疾患、あるいは神経系疾患にまで広がっており、新たな治療法の開発が期待される。

本研究課題の成果である腸内細菌による Treg 細胞と Th17 細胞の誘導の発見は、関与する腸内細菌の特定により、ヒトの腸内細菌による免疫細胞の誘導と様々な消化管の免疫性疾患が関連付けられた。Clostridium 属細菌と炎症性腸疾患やアトピー性皮膚炎との関連、セグメント細菌による Th17 細胞の分化誘導に基づいた感染防御、口腔細菌と炎症性腸疾患や大腸がんとの関連などにより、具体的な疾患治療の方向性が示された。これらは、様々な研究プロジェクトの成果となってきたとともに、現在も実際の創薬を目指した研究で継続し、発展している。

本田の所属する慶應義塾大学医学部では、2017 年 10 月、JSR 株式会社の支援により「JSR・慶應義塾大学医学化学イノベーションセンター(JKiC)」を開所したが、その注力領域に「マイクロバイオーム(微生物叢)」が取り上げられ、そこでは腸内細菌の培養、ノトバイオートマウスの作製やメタボローム解析を進める高度なシステムが整備され、疾患治療を目標とした研究が行われている。また、同社も参加する国内の製薬企業等 19 社から成る一般社団法人日本マイクロバイオームコンソーシアムが 2017 年に設立されるなど、国内の腸内細菌研究の活用体制も急速に拡大し整備されつつある。

また、本研究領域期間中から米国の腸内細菌を扱うベンチャー企業 Vedanta Biosciences 社が、本田の Clostridium 属 17 菌株による Treg 細胞の誘導に関する研究に興味を持ち、独占ライセンスの供与を受け、治療薬としての開発が進められている[258] 。本田もその Scientific cofounder となっている。

特許としては、本研究期間中に出願された「制御性 T 細胞の増殖又は集積を誘導する作用を有する組成物」(2010 年 6 月 4 日出願)が登録され、その後も「制御性 T 細胞の増殖又は集積を誘導するヒト由来細菌」(2012 年 11 月 29 日出願)、「微生物叢由来生物活性分子の組み合わせを含む疾患治療用組成物」(2014 年 7 月 8 日出願)が出願されている。

また、TH17 細胞の誘導については「TH17 細胞の誘導のための組成物及び方法」(2015 年 4 月 10 日出願)があり、研究の進展とともに新たな出願がなされている。

引用文献

[1] Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D.R. “Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria”, Cell, 2009, 139(3), 485-498.

[258] https://www.vedantabio.com/pipeline/ip

[2] Atarashi K., Umesaki Y., Honda K. “Microbiotal influence on T cell subset development”, Seminars in Immunology, 2011, 23(2), 146-153.

[3] Atarashi K., Tanoue T., Ando M., Kamada N., Nagano Y., Narushima S., Suda W., Imaoka A., Setoyama H., Nagamori T., Ishikawa E., Shima T., Hara T., Kado S., Jinnohara T., Ohno H., Kondo T., Toyooka K., Watanabe E., Yokoyama S.-I., Tokoro S., Mori H., Noguchi Y., Morita H., Ivanov I.I., Sugiyama T., Nuñez G., Camp J.G., Hattori M., Umesaki Y., Honda K. “Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells”, Cell, 2015, 163(2), 367-380.

[4] Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K., Kim S., Fritz J.V., Wilmes P., Ueha S., Matsushima K., Ohno H., Olle B., Sakaguchi S., Taniguchi T., Morita H., Hattori M., Honda K. “Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota”, Nature, 2013, 500(7461), 232-236.

[5] Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S., Endo T.A., Nakato G., Takahashi D., Nakanishi Y., Uetake C., Kato K., Kato T., Takahashi M., Fukuda N.N., Murakami S., Miyauchi E., Hino S., Atarashi K., Onawa S., Fujimura Y., Lockett T., Clarke J.M., Topping D.L., Tomita M., Hori S., Ohara O., Morita T., Koseki H., Kikuchi J., Honda K., Hase K., Ohno H. “Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells”, Nature, 2013, 504(7480), 446-450.

[6] Watanabe E., Tanoue T., Thaiss CA., Sato M., Toyooka K. Said HS.., Yamagami H., Rice SA., Gevers D., Johnson RC., Segre JA., Chen K., Kolls JK.,Elinav E., Morita H., Xavier RJ., Hattori M., Honda K. “Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation”, Science, 2017, 358(636), 359-365.

[7] Horai R., Zárate-Bladés C.R., Dillenburg-Pilla P., Chen J., Kielczewski J.L., Silver P.B., Jittayasothorn Y., Chan C.-C., Yamane H., Honda K., Caspi R.R. “Microbiota-Dependent Activation of an Autoreactive T Cell Receptor Provokes Autoimmunity in an Immunologically Privileged Site”, Immunity, 2015, 43(2), 343-353.

[8] Mathewson N.D., Jenq R., Mathew A.V., Koenigsknecht M., Hanash A., Toubai T., Oravecz-Wilson K., Wu S.-R., Sun Y., Rossi C., Fujiwara H., Byun J., Shono Y., Lindemans C., Calafiore M., Schmidt T.C., Honda K., Young V.B., Pennathur S., Van Den Brink M., Reddy P. “Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease” Nature Immunology, 2016, 17(5), 505-513.

[9] Saito T., Nishikawa H., Wada H., Nagano Y., Sugiyama D., Atarashi K., Maeda Y., Hamaguchi M., Ohkura N., Sato E., Nagase H., Nishimura J., Yamamoto H.,

Takiguchi S., Tanoue T., Suda W., Morita H., Hattori M., Honda K., Mori M., Doki Y., Sakaguchi S. “Two FOXP3 + CD4 + T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers”, Nature Medicine, 2016, 22(6), 679-684.

[10]Kasahara K., Tanoue T., Yamashita T., Yodoi K., Matsumoto T., Emoto T., Mizoguchi T., Hayashi T., Kitano N., Sasaki N., Atarashi K., Honda K., Hirata K.-I. “Commensal bacteria at the crossroad between cholesterol homeostasis and chronic inflammation in atherosclerosis”, Journal of lipid research, 2017, 58(3), 519-528.