

「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

－平成28年度終了研究課題－

研究総括 上田 泰己

1. 研究領域の概要

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

具体的には、

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

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 20件（内、5年型3件、大挑戦型2件）

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「細胞機能の構成的な理解と制御」領域に設けた選考委員 20 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 先行方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 先行に当たっては、さがかけ共通の選考基準（URL：<http://www.jst.go.jp/pr/info/info986/sankou2.html>）の他、以下の点を重視した。

①生命システムの設計・制御を通じてアドレスしようとする科学的な疑問の面白さ、②生命システムの設計・制御を実現・促進するような基盤的な技術（や枠組み）の重要性、の2点（いずれかで構いません）を重視します。これらの基準を満たすさがかけ個人研究の提案であれば、生命科学のみならず、物理学・化学・工学・情報科学・社会科学など、どのような分野からの提案も歓迎いたします。とりわけ、これまでの研究の単なる延長ではなく、世界的にみても実現されていない科学的、技術的な困難に果敢に挑戦する提案を待ち望んでいます。

4. 事前評価の選考の経緯

平成25年度採択

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			15件	内 訳	3年型	15件(0件)
対象数	230件	26件			※5年型	0件(0件)

()内は大挑戦型としての採択数。

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:

加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。

- ・澤井 哲研究者（平成 23 年度採択）
研究期間が 5 年で、今年度終了するため。
- ・船山 典子研究者（平成 23 年度採択）
研究期間が 5 年で、今年度終了するため。
- ・持田 悟研究者（平成 23 年度採択）
研究期間が 5 年で、今年度終了するため。
- ・田端 和仁研究者（平成 23 年度採択）
大挑戦の延長期間が、今年度終了するため。
- ・前多 裕介研究者（平成 23 年度採択）
大挑戦の延長期間が、今年度終了するため。

5. 研究実施期間

平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月(3 年型)

平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月(5 年型、大挑戦型)

6. 領域の活動状況

領域会議:10 回(5 年型、大挑戦型)

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

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

第 3 回領域会議平成 25 年 4 月 17 日(水)～19 日(金)理化学研究所、有馬グランドホテル
7 回(三期生以降参画)

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

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

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

第 7 回領域会議平成 27 年 7 月 14 日(火)～15 日(水)静岡県伊豆市 IBM 天城ホームステッド

第 8 回領域会議平成 27 年 11 月 26 日(木)～27 日(金)東京都港区白金台 八芳園

第 9 回領域会議平成 28 年 6 月 21 日(火)～22 日(水)福岡県福岡市 ザ・ルイガンス

第 10 回領域会議平成 29 年 2 月 21 日(火)～23 日(木)兵庫県淡路市 淡路夢舞台

・IBM 技術セミナー:1 回

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

・新学術合同シンポジウム:1 回

平成 27 年 2 月 1 日(日) 北海道虻田郡留寿都村 ルスツホテル

・生命動態合同シンポジウム:2 回

平成 27 年 3 月 16 日(月)～17 日(火)京都大学 稲盛ホール

平成 28 年 3 月 25 日(金)～26 日(土)広島 シェラトンホテル広島

・IBM、さががけ合同企画「生命科学を創る」パネラーによる討論会

平成 27 年 7 月 14 日(火)静岡県伊豆市 IBM 天城ホームステッド

・H27 年度 国際強化支援シンポジウム(米国)

平成 27 年 9 月 19－26 日 総括、研究者他 15 名がハーバード大、ジョンホプキンス大の研究者とワークショップを開催

・JST4 領域合同国際シンポジウム

平成 27 年 11 月 5, 6 日 東京大 伊藤国際ホール

・SciFoS 活動展開型活動

平成 28 年 5 月 25 日キックオフ。5 参加者、4 名(小柳 光正、神谷 厚輝、田端 和仁、岡部 弘基)

・国際シンポジウム「QBiC Symposium 2016 “Decoding Organisms by Quantitative Cell Profiling”」

平成 28 年 9 月 5－7 日 千里 LS で理研と共催。

・その他

CREST「生命動態」で行う「数理デザイン道場」に、さががけ研究者も自主参加

さががけ研究者交流会(2016/2/27, 2015/11/17, 2015/8/1, 2014/3/14, 2013/10/23 など)に、参加

研究者だけ参加の自主勉強会を年2回程度各地で実施。

新技術説明会に、山西 陽子研究者(H27/2/5,6)、鐘巻 将人研究者(H29/2/9)が参画

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

- (1) 京都大学サイトビジット H24/6/1
 - ・船山 典子研究室
- (2) 京都大学サイトビジット H24/6/1、H25/10/30
 - ・前多 裕介研究室
- (3) 熊本大学サイトビジット H24/9/29
 - ・持田 悟研究室
- (4) 東京大学本郷サイトビジット H24/8/29、H25/10/17、H27/5/12
 - ・田端 和仁研究室
- (5) 東京大学駒場 サイトビジット H24/8/30
 - ・澤井 哲研究室
- (6) 福井サイトビジット H25/10/22
 - ・竹内 春樹研究室
- (7) 大阪市立大サイトビジット H25/11/17
 - ・小柳光正研究室
- (8) 大阪大学サイトビジット H26/4/18、H28/6/6、H28/11/28
 - ・揚妻 正和研究室
- (9) 神奈川「科学技術アカデミー」サイトビジット H26/6/24
 - ・神谷 厚輝研究室
- (10) 筑波大学大サイトビジット H26/4/22
 - ・林 悠研究室
- (11) 芝浦工大サイトビジット H26/6/24
 - ・山西 陽子研究室
- (12) ベルン大サイトビジット H26/5/18
 - ・森島 陽介研究室
- (13) 遺伝研サイトビジット H26/5/13
 - ・鐘巻 将人研究室
- (14) 京都大学サイトビジット H26/7/9
 - ・杉村 薫研究室
 - ・篠原 美都研究室
- (15) 名古屋大学サイトビジット H26/7/17
 - ・清光 智美研究室
- (16) 遺伝研サイトビジット H26/7/17
 - ・古賀 信康研究室
- (17) 北海道大学サイトビジット H26/10/23
 - ・榎木 亮介研究室
- (18) 東京大学サイトビジット H26/11/20
 - ・竹内 春樹研究室
- (19) 九州大学箱崎、病院サイトビジット H27/5/12
 - ・前多 裕介研究室
 - ・佐藤 有紀研究室

その他、福岡市での領域会議に合わせ、九州大学伊都キャンパスのラボツアーを実施、移転した前多 裕介研究室、山西 陽子研究室、池ノ内 順一研究室をサイトビジットした。

7. 事後評価の手続き

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

(事後評価の流れ)

平成 28 年 11 月 評価会開催
平成 28 年 12 月 研究総括による事後評価
平成 29 年 1 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) ・・領域ごとの評価基準があれば、(4)以降に記載(複数可)

(5) 大挑戦型についてはさらに、大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展についても評価項目とした。(該当ない場合は削除)

※該当する成果がある場合には「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

9. 評価結果

細胞機能の再構成・設計と制御を試みることを通じて生命の本質に迫ろうとする研究課題を推進する新しい試みの領域であるが、細胞から組織、動物、植物など様々な生物を対象とした広い領域で、専門外への強い好奇心を持つ全メンバーの間での熱い議論を交わし、5 年型と大挑戦の一期生5名が、最終年度まで、当領域の中核となり、活動をけん引して来たことから、結果的に全体的に、当初の想定以上に、大きな進展が図られた。その一つの効果に、領域内外での活発な共同研究が挙げられる。領域内26件、領域外26件。その成果は、すでに、論文や特許出願に結びついている。

外部発表では、論文数 45 件(国際 45 件、国内 0 件)、口頭発表 354 件(海外 130 件、国内 224 件)、その内、国内招待講演 94 件、海外招待講演 48 件と、国際的にも積極的に活動した結果である。また、基礎研究に重点をおく当領域であるが、創薬やバイオ研究支援関連の特許出願件数33件(国内23件、国際10件)あった。

三期生から清光智美研究者、武部貴則研究者の2名が、一期生から澤井哲研究者が文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞しており、その他の研究者含め各団体からの受賞も多く、高い評価の証と言える。

この領域を運営している中で特出すべきは、毎回の領域会議などで見られる活発なコミュニケーションである。それぞれが自らのフォーカスした技術、あるいは、日ごろから疑問を持っている事象であることからこそ、理解を深めることが出来たと言え、人と人とのつながりの中で共同研究に発展し、様々なブレイクスルーも生まれた。こういう新しい研究分野では、ジェネレーションとして、分野全体を伸ばしていく必要があり、本領域の研究者(39 名)の団結した牽引力を高く評価したい。もちろん、メンターの役割を果たして頂いたアドバイザーの先生方のご尽力にも感謝したい。

いずれの研究課題も、領域にふさわしい成果を挙げたが、その内から特に選ぶとすれば、武部 貴則研究者の「多細胞系からなる複雑なヒト臓器の人為的構成」であろう。この短い期間に、この領域の趣旨に合致した合成生物学の素晴らしい成果が得られた。加えて、林 悠研究者の「なぜ夢を見るのか 〜トランスジェニックマウスによるレム睡眠の操作と解析〜」では、長年謎であったレム睡眠の生理的意義の一端を新しいアプローチで解明し、睡眠科学の発展に貢献した。

(三期生 3年間)

1. 揚妻 正和研究者「高次脳機能情報処理の再構成に向けた恐怖記憶の読み取りと操作」

評価結果 レゾナントスキャナー搭載型の顕微鏡の導入により、高速な計測を実現し、低倍率・高 NA の対物レンズの導入により、広視野からの観察とそれによるより多くの神経細胞からの同時観察に成功した。また、遺伝子コード型のセンサーを用いることで、同一の神経細胞からの長期的な観察が可能となり、従来の電気生理学的手法では困難だった時間経過を追った詳細な観察による「記憶の成立過程」および「時空間的な記憶の形の変遷」の同定を可能にした。このような成果から、条件刺激により誘発される神経群の活動性・情報処理様式について様々な興味深い変化の観察ができるようにしたことは、高く評価できる。恐怖だけではなく様々な高次脳機能へとアプローチするチャンスが拡大したことは大きな成果である。なお、さがけ個人研究を文字通り一人で取り組み、着実に進めたことを特記しておきたい。

2. 榎木 亮介研究者「生物時計中枢における細胞ネットワークの計測・制御と再構成」

評価結果 視交叉上核の神経細胞に細胞種選択的に様々な遺伝子コード型機能プローブを発現させて、長期間光計測することで、細胞ネットワークレベルで、細胞内カルシウム濃度、膜電位、神経発射活動などの概日リズムを同時計測することに成功した。一連の実験により、概日カルシウムリズム、時計遺伝子発現と細胞間連絡の2つの機構により制御されること、また細胞ネットワーク全体で同期する概日膜電位リズムの存在を見出したことを高く評価したい。

3. 鐘巻 将人研究者「デグロン変異細胞創出のための基盤技術開発」

評価結果 ヒト HCT116 細胞を材料として、内在性遺伝子に対する効率的なデグロンタグ付加技術を開発し、デグロン変異細胞作出に成功した。実際に 1.5 ヶ月で変異細胞を作成できるようになった成果は大きい。そして、共同研究など多くの使用例が増えて、このシステムの有効性・独自性が認められるようになったことは大きな成果である。その成果をすでに論文にして、公表し、着実に実績としていることも評価できる。オーキシシアナログを開発する上で、新たに光制御が可能なケージドオーキシシンを用いる光操作も興味深く、その成果を期待したい。

4. 神谷 厚輝研究者「細胞膜模倣リン脂質非対称膜による自己再生産可能な人工細胞モデルの創成」

評価結果 ジェット水流を印加することにより、1つのデバイスチップで多種類のリン脂質非対称膜リポソームの作製に成功し、独自の製法を開発した。この製法では、脂質膜の間に有機溶媒層がないことをラマン顕微鏡により確認している。そして、小さなリポソームが細胞サイズリポソームに内包された自己再生産できる小胞モデルリポソームの作製に成功している。このように、当課題であった膜タンパク質が再構成可能なリン脂質組成非対称膜リポソームを作製できることを実証したことから、創薬スクリーニング、ドラッグデリバリーなどの多方面の研究者との連携で、その応用分野が広がることを期待したい。

5. 清光 智美研究者「分裂様式の操作による細胞運命の制御と個体構築原理の追究」

評価結果 光照射依存的なタンパク-タンパク相互作用の誘導系 iLID を改良することによって、分裂期の細胞皮層で自在な局在操作を可能にした。また iLID と CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を融合し、ダイニン制御因子の細胞皮層局在を光操作することで、分裂期の細胞で紡錘体の向きや位置を操作することに成功した。さらにダイニンのみならず細胞皮層ミオシンの制御因子の局在操作にも成功し、紡錘体配置制御に間接的に関与する細胞膜の収縮力を一部操作できるようになった。このように周辺技術を駆使して、細胞の局在操作を着実に実証してきた功績は、大いに評価される。予定外の成果として、同領域の鐘巻将人研究者との共同研究により、効率的なゲノム編集技術やダイニン複合体のオーキシシン誘導デグロンヒト細胞株を確立することができたことは、さきがけ研究ならではの大きな成果と注目したい。今回開発した技術を使って、さらに何を解析していくのか、興味が尽きない。今後の展開に期待したい。

6. 古賀 信康研究者「細胞機能の制御・設計に向けたアロステリックタンパク質の人工設計」

評価結果 タンパク質の主鎖二面角を5つの領域に分割し、タンパク質の3次元立体構造を主鎖二面角パターンとして捉えることで、タンパク質の二次構造をつなぐループの形状に、いくつかのパターンがあることを発見した。さらに、局所および非局所構造に関するルールを用いることで様々な形状や大きさを持つ $\alpha\beta$ 型タンパク質構造の様々なデザインに成功した。このルールと ATP 結合・加水分解に関わる P-loop モチーフを組み合わせることで、リン酸に結合するタンパク質のデザインに成功したことは高く評価できる。タンパク質分子を自在にデザインする手法を広めて、細胞の制御・設計の基礎分野から、新規素材の開発、新規医薬品など広い産業分野で貢献すること期待したい。

7. 小柳 光正研究者「光の色を使った細胞内情報伝達因子の時空間的に精密な制御」

評価結果 タンパク質の主鎖二面角を5つの領域に分割し、タンパク質の3次元立体構造を主鎖二面角パターンとして捉えることで、タンパク質の二次構造をつなぐループの形状に、いくつかのパターンがあることを発見した。さらに、局所および非局所構造に関するルールを用いることで様々な形状や大きさを持つ $\alpha\beta$ 型タンパク質構造の様々なデザインに成功した。このルールと ATP 結合・加水分解に関わる P-loop モチーフを組み合わせることで、リン酸に結合するタンパク質のデザインに成功したことは高く評価できる。タンパク質分子を自在にデザインする手法を広めて、細胞の制御・設計の基礎分野から、新規素材の開発、新規医薬品など広い産業分野で貢献すること期待したい。

8. 佐藤 有紀研究者「血流による血管ネットワークの制御と再現」

評価結果 PGK:H2B-mCherryトランスジェニックウズラと Tie1:H2B-EYFPトランスジェニックウズラとの掛け合わせによって、血管内皮細胞と血球細胞の同時可視化に成功し、これを用いて、血球の流れと血管内皮細胞挙動を解析することが可能になった。このユニークな実験系を確立したことは高く評価できる。さらに、培養条件下での再建組織内への血管誘導技術の開発や、血管腫の発症メカニズム解明への応用を目指し、血管ネットワークの再構築と精密な制御の実現を期待したい。

9. 篠原 美都研究者「精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態解明」

評価結果 クローナルマーキングした精子幹細胞を、内因性の精子形成のない不妊マウス精巣に移植して精子形成を再構成し、レシピエントから生まれる仔を生誕にわたってサンプリングし、幹細胞の由来を同定した。そして、数理モデルの構築に挑戦し、独自のモデル系を構築できたことは大きな財産である。このような地道な辛抱強い研究から、精子幹細胞の機能的寿命と、全部の幹細胞が均一に精子形成に寄与するのではなく偏りがあること、さらに各幹細胞の活性には周期的変動があること、を次々に明らかにした。また、精子形成活性に休止期があることを発見するなど、予想外の成果も得られた。

精巣内で移植した標識幹細胞からの分化を再構成するというユニークなアプローチと、領域内共同研究によってそのモデル化を成功させたことは大きな成果である。アポトーシスの関与という新たな視点からの研究の展開も期待したい。

10. 杉村 薫研究者「力のベイズ推定から解き明かす組織の変形と力」

評価結果 ショウジョウバエの翅全体の発生過程を長時間に渡り、タイムラプス観察したデータから、細胞形態を抽出する画像処理プロトコルを開発し、世界で初めて組織全体で応力の時空間マップを定量することに成功した。さらに、組織応力と組織変形、細胞レベルの形態形成プロセスを統合的に解析する強力なパイプラインを開発した。こうしたハード・ソフト両面の手法開発によって、当初の目的に沿った研究成果を出したことを評価したい。

11. 竹内 春樹研究者「神経スパイク列の再構成から迫る神経活動依存的な神経回路形成機構の解明」

評価結果 特定の嗅覚受容体を発現する神経細胞を遺伝子改変技術によって蛍光標識し、電気生理学的手法によって神経活動の記録に成功し、その結果、発現する嗅覚受容体ごとに神経発火のパターンが異なっていることが判明した。神経細胞の発火パターンを得意とする池谷研究室との連携が功を奏したと言える。さらに、カルシウムインディケーターである GCaMP6f を用いたカルシウムイメージングによって一度に多数の神経細胞の活動パターンを記録することに成功し、細胞間の同期的活動性の有無などを検証することが出来たことは、今後の発展につながる大きな成果と評価できる。

12. 武部 貴則研究者「多細胞系からなる複雑なヒト臓器の人為的構成」

評価結果 iPS 細胞由来肝芽の自己組織化現象を肝臓原基形成のメカニズムの解明にとどまらず、肝臓以外のさまざまな臓器における器官原基を人為的に創出するための培養法および移植操作技術の確立に成功した功績は、すでに、国際的に高く評価されている。さらに、隣接臓器を含めた臓器系統（例えば、肝胆膵）を連続的に誘導するという新たな革新概念へ転換するための基盤技術開発に着手しており、その意欲的な展開は称賛に価する。再生医療分野の様々な研究者や臨床医と共同研究を行い、基礎研究と臨床研究の両輪で、着実に進めていただきたい。

13. 林 悠研究者「なぜ夢を見るのか ～トランスジェニックマウスによるレム睡眠の操作と解析～」

評価結果 レム睡眠を遮断できるトランスジェニックマウスを 2 系統、独自開発し、いずれの系統においても、共通して、レム睡眠の一時的な遮断が、記憶学習や神経可塑性に重要な徐波と呼ばれる脳活動の低下へつながることを解明した。このことにより長年謎であったレム睡眠の生理的意義の一端が初めて明らかとなり、国内外で、その発表は大きく取り上げられた。さらにレム睡眠操作による鬱病・記憶学習・脳の老化への影響を調べるための系に取り組み、その成果が待たれる。このさきがけ期間中に、レム睡眠の研究分野で大きく飛躍した研究者の一人である。

14. 森島 陽介研究者「非侵襲脳刺激による脳領域間の情報伝達効率の制御」

評価結果 経頭蓋電流刺激を用いて、同期的な脳活動を創出し、これに伴う脳領域間の情報伝達効率を測定し、脳領域間の機能的結合を制御する手法を確立した。また、機能的 MRI のデータに構造方程式ベース

の脳のネットワーク解析手法である Dynamic causal modelling を用いて脳のネットワークのどのような流れが行動・疾患と関連が起こるのかを解明した。このようにヒトの脳のネットワークを非侵襲的に操作する技術を、1つ1つ積み上げていることを高く評価する。この基盤技術により、将来の非侵襲での脳の解析、治療への期待は大きい。用いる技術において、他のさきがけ研究者との共通点が少なく、領域活動の効果が十分でなかったのではないかとと思われるが、今後も、他分野の研究者への説明や理解を求めていっていただきたい。

15. 山西 陽子 研究者「電界誘起気泡インジェクションメスによる分子操作と再構成」

評価結果 ガラス毛細管内のマイクロ空間内に放電を発生させ、その爆発的なパワーによって液中に指向性を有する高速気泡列を発射する現象を利用して、高精度に遺伝子を導入するインジェクション技術を確立した。動物細胞から植物細胞まで固さなどが異なる細胞に対して遺伝子導入できるプラットフォームを開発した。生物学者のニーズを積極的に汲み取ろうとする姿勢も成果に繋がっており、領域内外で7件の共同研究を行うとともに、国内外に多くの特許を出願し、社会への貢献を視野に活動していることも評価できる。今後は、成果の原著論文としての発表も重要である。

(一期生 5 年間)

16. 澤井 哲 研究者「細胞形状と運動の自己組織的挙動の理解と操作」(5 年型)

評価結果 マイクロ流体デバイスを用いて、アクチン/PIP3 波の動態と走化性運動との関係を解析し、走化性誘引分子である cAMP 刺激によって、アクチン/PIP3 波が消失すること、cAMP 投与から解放後1分以内に波が発生しやすいことを発見した。また、マクロ流体デバイスを応用する中で、層流の向きを360度自在に変化させられるデバイスを開発している。このように、現象の発見にとどまらず、意図的に操作することに取り組み、成果を挙げており、この領域の構成的なアプローチに合致した研究の進め方を評価したい。

17. 田端 和仁 研究者「バクテリア再構成法の開発」(大挑戦型)

評価結果 バクテリア再構成のためのデバイス開発に取り組み、微小容器に脂質二重膜でフタをする独自の技術を開発した。さらに、この微小容器を用いて、巨大化大腸菌の融合に成功していることは評価できる。合成生物学のゴードンリサーチ会議において、本成果の発表を行っている。今後は、脂質二重膜については、脂質の組成と膜の安定性、また、ATP 合成酵素など活性の関係を調べる、巨大化大腸菌の融合のメカニズムの解明など、現象の背景となる原理への展開も望まれる。

大挑戦型の研究者として、5 年間、この領域の活動に積極的にかかわり、この領域のムードメーカーとなり、領域をリードしたことの貢献は大きい。また、この人となりは、国内で唯一の「細胞を創る」研究会の設立、運営に奔走し、活躍の幅を広げていることでも、伺える。

18. 船山 典子 研究者「カイメンが工学的に優れた骨格構造を自律的に構築するメカニズムの解明」(5 年型)

評価結果 最も外側の上皮を蛍光可視化し、ezDSLM で長時間撮影に成功し、骨片運搬細胞が刺さった骨片を運搬している可能性を示した。また、側面からのカイメン蛍光像を撮影する倒立顕微鏡システムの構築に成功して、長時間タイムラプス解析により、additional spicules は ENCM 上を運搬され、1 段目の骨片と同様の5つの連続したステップにより、骨片に結合し組み上がることを解明した。このように、長い努力が実って、運搬細胞の可視化と横方向からの撮影技術の開発に成功したことによって、全く研究されてこなかった現象の理解が大きく進展したことを、高く評価したい。

ストカスティックな骨片運搬と置き位置決定の仕組みは、結果的に、カイメンの体内空間を最大化することになるのか、構造体の強化と空間最大化の両者を追求することになるのか、などのカイメンの形態形成戦略解明が課題である。この点に関して、緩急水流中での培養や、斜めまたは凹凸のある底面上で育てるなどの工夫によって、興味深い結果が得られる可能性も有り、今後の研究の進展が期待される。

19. 前多 裕介 研究者「分子輸送から解く生命の起源: 構造、情報、輸送の動的結合の解明と新たな分子操作技術の確立」(大挑戦型)

評価結果 温度勾配濃度勾配の共存下で、DNA や RNA が二重らせん構造をもつことで輸送される新たな分子輸送現象を発見した。さらに、動く温度勾配下では、周囲の高分子濃度が一定であっても、温度勾配の動く速度というダイナミクスによって、分子が局在するパターンが変化する特性を発見した。温度勾配下での DNA 分子輸送によって、DNA ライゲーションによる重合が長い分子ほど選択的に進むという特性を見だし、これらのパターンのもとで DNA 重合反応を進めると、長い DNA が選択的に合成されることを示した。このよう

な論証を集めて、「生命の起源を理解する前多理論」を提唱していることは高く評価できる。今後、ブレイクスルーする研究者の一人として、期待したい。

20. 持田 悟 研究者「細胞分裂周期の in vitro 再構成への挑戦」(5年型)

評価結果 細胞分裂周期の再構成という挑戦的な課題に対して着実に成果を出している。再構成系の CDK 基質のリン酸化を定量的、かつリアルタイムに検出できる光プローブの開発と改良を行い、リン酸化によって3倍に光量が増加するという実用的なプローブを完成させた。さらに in vitro 系での発光量を安定させるためバッファー系の改良を行い、半減期を約 10 分から 200 分以上に延長させ、間期→分裂期に見られる急激な CDK 基質のリン酸化レベルの上昇を精製タンパク質だけで部分的に再構成することに成功したことは、高く評価したい。本成果は、永井 健治アドバイザーとの共著で、論文、Current Biology, (2016)として、着実に結実した。

10. 評価者

研究総括 上田 泰己 東京大学 大学院医学系研究科・教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 29 年 3 月末現在)

上田 卓也 東京大学 大学院新領域創成科学研究科・教授/研究科長
 岡田 清孝 龍谷大学 農学部・教授
 影山 龍一郎 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所・教授
 菅 裕明 東京大学 大学院理学系研究科・教授
 杉本 亜砂子 東北大学 大学院生命科学研究科・教授
 竹内 昌治 東京大学 生産技術研究所・教授
 永井 健治 大阪大学 産業科学研究所・教授
 西田 栄介 京都大学 大学院生命科学研究科・教授
 野地 博行 東京大学 大学院工学系研究科・教授
 水島 昇 東京大学 大学院医学系研究科・教授

(参考)

件数はいずれも、平成28年12月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	0	45	45
口 頭	224	130	354
その他	23	4	27
合 計	247	179	426

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
13(7)	6(2)	19(9)

カッコ内は、JST より出願された件数。

(3)受賞等

- ・澤井 哲 研究者
文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H24.4)
- ・持田 悟 研究者
平成23年度日本プロテインファスファターゼ研究会賞(H24.6)
- ・前多 裕介 研究者
第 30 回とやま賞理工学部門 基礎ゲノム科学(H25.5)
H26 年度日本物理学会若手奨励賞(領域11)(H26.10)
- ・榎木 亮介

平成 25 年度環境生理学久野寧賞 (H26.3)
第 15 回日本生理学会奨励賞受賞 (H26.3)
・清光 智美 研究者
平成 28 年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H28.4)
・杉村 薫 研究者
日本生物物理学会 若手奨励賞(H26.9)
・武部 貴則 研究者
Science, 10 breakthrough of the year, 2013.(H26.1)
日本臓器保存生物医学会 研究奨励賞(H26.1)
横浜市立大学医学会 平成 25 年度医学会賞(H26.5)
第 51 回ベルツ賞(H26.11)
平成 28 年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H28.4)
The 2016 NYSCF – Robertson Stem Cell Investigators 賞(H28.10)
WIRED Audi INNOVATION AWARD (H28.10)
Best of Cell Stem Cell に選出 (2016.10)
科学技術・学術政策研究所「ナイスステップな研究者」(H28.12)
・林 悠 研究者
第 1 回 アステラス病態代謝研究会優秀発表賞 受賞(2014.10)
平成 26 年度・筑波大学若手教員奨励賞受賞(2014.12)
第 21 回 日本睡眠学会研究奨励賞 受賞(2016.5)
第 26 回 つくば奨励賞(若手研究者部門) 受賞(2016.11)
・山西 陽子 研究者
2014 年度日本ロボット学会学会誌論文賞(H26.9)
2013 年度計測自動制御学会論文賞(蓮沼賞)(H27.9)
科学技術・学術政策研究所「ナイスステップな研究者」(H27.12)
電気学会優秀論文発表 A 賞(H28.2)

(4)招待講演

国際 48件

国内 94件

別紙

「細胞構成」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
揚妻 正和 (専任)	高次脳機能情報処理の再構成に向けた恐怖記憶の読み取りと操作 (大阪大学産業科学研究所)	さがけ研究者 (コロンビア大学生物科学科 博士研究員)	44
榎木 亮介 (兼任)	生物時計中枢における細胞ネットワークの計測・制御と再構成 (北海道大学大学院医学研究科)	北海道大学大学院医学研究科光バイオイメージング部門 助教 (同上)	45
鐘巻 将人 (兼任)	デグロン変異細胞創出のための基盤技術開発 (遺伝研 分子細胞工学研究部門)	遺伝研 分子細胞工学研究部門 教授 (同研究所 新分野創造センター准教授)	44
神谷 厚輝 (兼任)	細胞膜模倣リン脂質非対称膜による自己再生産可能な人工細胞モデルの創成(神奈川科学技術アカデミー)	神奈川科学技術アカデミー 人工細胞膜システムグループ 研究員 (同上)	44
清光 智美 (兼任)	分裂様式の操作による細胞運命の制御と個体構築原理の追究 (名古屋大学大学院理学研究科)	名古屋大学大学院理学研究科 助教 (同上)	43
古賀 信康 (兼任)	細胞機能の制御・設計に向けたアロステリックタンパク質の人工設計 (分子科学研究所)	分子科学研究所 准教授 (ワシントン大学 生化学博士研究員)	49
小柳 光正 (兼任)	光の色を使った細胞内情報伝達因子の時空間的に精密な制御 (大阪市立大学 大学院理学研究科)	大阪市立大学 大学院理学研究科 准教授 (同上)	39
佐藤 有紀 (兼任)	血流による血管ネットワークの制御と再現 (九州大学 大学院医学研究院)	九州大学 大学院医学研究院 講師 (熊本大学 大学院先端機構 特任助教)	40
篠原 美都 (兼任)	精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態解明 (京都大学 大学院医学研究科)	京都大学 大学院医学研究科 助教 (同上)	40
杉村 薫 (兼任)	力のベイズ推定から解き明かす組織の変形と力 (京都大学 物質－細胞統合システム拠点)	京都大学 物質－細胞統合システム拠点 特定助教 (同大学物質－細胞統合システム拠点 助教)	41
竹内 春樹 (専任)	神経スパイク列の再構成から迫る神経活動依存的な神経回路形成機構の解明 (東京大学大学院薬学研究科)	さがけ研究者 (福井大学医学部高次脳機能領域 特命准教授)	45
武部 貴則 (兼任)	多細胞系からなる複雑なヒト臓器の人為的構成 (シンシナティ大学 小児科)	シンシナティ大学 小児科 准教授 (横浜市立大学大学院医学研究科 助手)	44
林 悠 (兼任)	なぜ夢を見るのか ～トランスジェニックマウスによるレム睡眠の操作と解析～ (筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構)	筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 准教授 (同 助教)	39

森島 陽介 (兼任)	非侵襲脳刺激による脳領域間の情報 伝達効率の制御 (ヘルン大学 精神科病院 トランスレーショ ナルリサーチセンター)	ヘルン大学 精神科病院 トランスレーショ ナルリサーチセンター グループリーダー (同病院 精神神経生理学部門 シ ニアリサーチアソシエイト)	43
山西 陽子 (兼任)	電界誘起気泡インジェクションメスによ る分子操作と再構成 (九州大学 大学院工学研究院)	九州大学 大学院工学研究院 教授 (芝浦工業大学機械工学科 准教 授)	41

(5年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
澤井 哲 (兼任)	細胞形状と運動の自己組織的挙動の 理解と操作 (東京大学 大学院総合文化研究科)	東京大学 大学院総合文化研究科 准教授 (同上)	96
船山 典子 (兼任)	カイメンが工学的に優れた骨格構造を 自律的に構築するメカニズムの解明 (京都大学 大学院理学研究科)	京都大学 大学院理学研究科 准教 授 (同上)	97
持田 悟 (兼任)	細胞分裂周期の invitro 再構成への挑 戦 (熊本大学 大学院先端機構)	熊本大学 大学院先端機構准教授 (同大学 大学院先端機構 特任助 教)	100

(大挑戦型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
田端 和仁 (兼任)	バクテリア再構成法の開発 (東京大学 大学院工学系研究科)	東京大学 大学院工学系研究科 講 師 (同大学大学院工学系研究科 助教)	64
前多 裕介 (兼任)	分子輸送から解く生命の起源:構造、情 報、輸送の動的結合の解明と新たな分 子操作技術の確立 (九州大学 大学院理学研究科)	九州大学 大学院理学研究科 准教 授 (京都大学白眉センター 特定助教)	65

研究報告書

「細胞形状と運動の自己組織的挙動の理解と操作」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 澤井 哲

1. 研究のねらい

真核細胞の多くにみられるアメーバ状の細胞変形は、膜の裏打ちにおけるアクチンの重合と、アクチンフィラメントの編成・解体、それによって細胞膜が伸展したり、収縮する過程からなっている。これらの過程は、柔軟なテンポとタイミングでおこなわれ、物体への接触、誘因物質が引き起こす反応などの外部からの刺激と、細胞内の自律的なダイナミクスとが、ときにははせめぎ合い、ときには調和しながら進行する。細胞内部のフィードバックから生み出される自律的な動態には、パターン形成として大きく分けて主に二つの側面があると考えられる。一つは、細胞外リガンドからの入力がなくとも、細胞膜上のシグナル因子が、自律的に増幅と抑制を繰り返しながら、時間と空間的な対称性を破る現象、もう一つは、細胞骨格系のフィラメントの自己駆動性と配向・架橋により、マクロレベルのメッシュワークが自発的な対称性の破れをともなって形成・解体する現象である。膜上の脂質シグナルは反応拡散系、細胞骨格系は内部駆動的な非平衡ソフトマターであり、それぞれが非平衡・非線形系に固有の自己組織的な動力学を示し、細胞の形状と運動の理解と操作にとって極めて重要な視点である。歴史的にこれらはそれぞれ独自の学問的背景から派生している経緯もあり、両者が組合わさった系の理解は発展途上にある。細胞に目を向けると、両者は極めて密接な相互依存的関係にあると考えられる。膜上のリン脂質シグナルは膜の裏打ちのアクチンフィラメントの構築と解体を調節しており、微弱な信号が増幅されることで、ランダム性の高い細胞遊走や食作用に伴う膜変形を駆動している。一方で、アクチンフィラメントの形成は細胞膜の伸長や、曲げを生み出し、膜の局所的な物性の変化によってリン脂質シグナルも調節されていると予想される。こうしたダイナミクスがいかに影響しあっているか、さらには外部からの摂動によってどのように変調されるかを理解することは、走化性や地形依存的な遊走、さらには食作用などのダイナミクスの基礎づけにとって重要な課題である。そこで、本研究では、これらの豊かな動態を詳細に解析できる実験対象に、細胞運動のモデル生物、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を選び、系に内在する自己組織的なダイナミクスの非線形動力学的特徴付けと、動態特性の理解に基づいた細胞操作を目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の形質膜の裏打ちでは、数マイクロメートルのスケールで生じる樹状アクチンフィラメントの構築と脱構築が、ホスファチジルイノシトール3リン酸 (PI(3,4,5)P3) の産生を伴って空間的に伝播する現象 (以下 F-アクチン/PIP3 波と呼ぶ) が知られている。同様の現象は、免疫細胞、上皮細胞、神経細胞、ガン細胞など多岐にわたって見られ、食作用、マクロピノサイトーシス、細胞遊走などの背後にある共通の素過程、すなわち樹状

アクチンフィラメントの基本動態と考えられる。本研究課題では、形質膜上のホスファティジルイノシトールリン酸の産生、その上流の PI3 キナーゼ及び低分子 G タンパク Ras 活性の動態、下流のアクチンの動態を生細胞イメージングを中心に定量的に解析し、F-アクチン/PIP3 波の周期性と位相抽出から、波の起点の位置、波の形状、位相の空間的な配置を定量し、反応拡散ダイナミクスにおいて典型的に見られる興奮性の波の性質を明らかにした。これと並行し、PI3 キナーゼの活性化制御についての数理モデルの定式化と、これに基づいた動態予測を行い、アクチン重合に依存する正のフィードバックを仮定することによって、様々な測定結果が説明できることを示した。また、細胞外からの摂動として、走化性誘引物質として働く細胞外 cAMP の影響を調べたところ、F-アクチン/PIP3 波は cAMP 投与によって直ちに消失することが明らかになった。さらに、基質の接着性、形状について波の成立条件を明らかにし、走化性遊走とは独立に方向的な運動が駆動されることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「知覚・制御系の自己組織化ダイナミクスの解析」

PIP3/F-actin 波の時空間パターンの特徴について、位相ダイナミクスを抽出し、平面波、回転波の形状がいかに生み出されているかを明らかにすることを目的とした。F-アクチンやイノシトールリン脂質(PI(3,4,5)P3, PI(4,5)P2)などを標識する融合蛍光タンパク発現株を作出し、コンフォーカル顕微鏡による生細胞タイムラプス画像を取得し、詳細かつ定量的な画像解析を行った。その結果、PIP3/F-actin の波は、基質側の形質膜のランダムな場所で生成され、回転波の中心には位相の特異点が存在していることが明らかになった。特異点は、自己充足的に興奮をくりかえすラセン波の中心(端)で、一対となっているものはその間で維持される波面が比較的平面的に膜を押し出していること、単独に隔離された特異点で維持されるらせん波は、一方向的に回転することで膜を回転させながら押し出していた。波は、同心円状やらせん状の形状をとって伝播しており、波と波が正面衝突すると波は互いに消滅する(原著論文[4])。周期性は、約 5-6 分程度で、細胞端で波が反射する場合と、消失する場合の二通りが観察された。特異点の生成の詳細な解析によると、新しい波が古い波の後方に衝突する際に特異点が生じていた。一方、波のフロント同士の衝突では特異点の生成・消滅は起こらず、パターン遷移を引き起こさないが、発火した波が、前にある波の後方にある場合には正負の特異点が対生成し、パターンの変化を引き起こしていた。これらの性質はゲル内のペルーゾフジャボティンスキー反応(BZ 反応)や、固体表面での触媒反応など、代表的な非平衡系でこれまでに知られている波の性質と一致している(著作物[1,2])。これらの解析から、細胞性粘菌で見られる大規模な膜変形の少なくとも一部は、興奮性のらせん波の振動と位相、幾何学的な特徴から理解できること、またこれらを操作する方法として、BZ 反応などの非平衡系のパターン形成において開発

されてきた摂動法の応用可能性が示唆された。

図 1 PIP3/F-actin 波の空間的位相特異点の変遷

(上段) PIP3 を可視化する PHcrac-RFP の共焦点顕微鏡像から得た位相マップ(基底面側;左から右に



○ clockwise 特異点

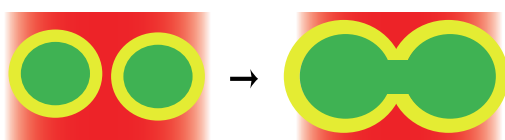
● anti-clockwise 特異点

➡ 並進的膜変形

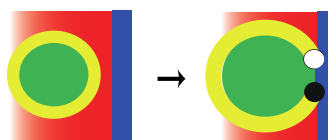
↻ 回転的膜変形

○ フロントとバックの衝突

▶ フロント同士の衝突



フロント同士の衝突



フロントとバックの衝突

およそ数分の時間経過を示す;色は PIP3 の周期的変動の位相を表す)。波の背面における新規波の生成によって、位相特異点が対生成する(点線部分)。特異点の周りでは時計回り(白丸)と反時計回り(黒丸)に波が回転し、進行波が回転をともなった膜の伸張を引き起こす。(下段)位相の特異点の交代の様子。

研究テーマ B 「デカップルした固有運動系の構成と解析」

アクチン骨格系自身がもつ不安定性から出現する膜変形と、PIP3 依存の膜変形成分を切り分けることを目的とした。薬剤処理と遺伝学的操作を併用することで、これらの径路の一部もしくは全て抑制した細胞を解析した。PI3 キナーゼを阻害する LY294002 処理した細胞や PI3K の欠損株においては、アクチン/PIP3 波の発生が顕著に抑えられた。また、この研究を進める中で、思いがけずカテキンが同様の薬理的作用があることを見出した(原著論文[5])。アクチンの重合を抑え、波の発生を押させた細胞では、新規発生の波同士の衝突が減少するため、波の形状と性質を捉えるのに適していることがわかった。樹状のアクチンフィラメント形成には、枝分かれの核形成を担う Arp2/3 複合体の活性化が必須であり、これは WASP や Scar/WAVE 複合体の調整下にある。Scar/WAVE 複合体の活性化を HSPC300 によって可視化したところ、波の先端において顕著な活性化が認められた。Scar/WAVE 複合体の一因子である PIR121 は、アクチンの樹状フィラメント生成を抑制し、欠損株 *pirA⁻*は、アクチンフィラメントが過剰に生じることが知られている。PirA⁻株において同様の生細胞画像解析を行ったところ、PIP3 の局所的なパルスの発生頻度が増加したが、持続的な波の生成はむしろ観察されなくなった。これらの解析から、PIP3 の調節機構はランダム性、興奮性の起源に近く、アクチンフィラメントがある中間的な濃度レンジで揺らぐことができることが、空間的に興奮が伝播するために重要である

ことが示唆された(原著論文[4])。ホスファターゼ PTEN の欠損株においては、波の形状に特徴的な変化が見られたが、波そのものは維持されたため、PI3K の役割が大きいと考えられる。また、活性型 Ras を Raf1 の RBD ドメインで、活性型 Rac を Pak の CRIB ドメインによって可視化したところ、両者とも PIP3/F-actin 波との顕著な共局在が確認された。PIR121 は Rac との相互作用が先行研究で指摘されていることから、活性型 Rac と SCAR/WAVE による樹状フィラメント形成が波の持続的な伝搬にとって必須であること、これと共に活性型 Ras と PI3 キナーゼの活性化による波の核形成の重要性が示唆された。また、PI3K を阻害した細胞においても、Rac や Scar/WAVE 複合体の活性化やランダムな膜変形は見られるため、PI3K 非依存の膜変形と、PI3K 依存の波上の膜変形が通常の細胞では重なりあっていることが示された。得られた知見は、研究テーマ A の解析、研究テーマ D の数理モデル解析へと繋げた。また、全く思いがけない発見として、アクチン重合を阻害した細胞を解析から、走化性誘引物質として働く cAMP の産生と、細胞外 cAMP の波の発生もアクチンに依存することも明らかになった(原著論文[2])。

研究テーマ C 「自己組織化ダイナミクスの摂動と操作」

アクチン/PIP3 波の動態と走化性運動との関係を解析した。特に、時空間的に変調された刺激に対する応答に着目し、それを実現するためにマイクロ流体デバイスを用いた解析を行った(原著論文[2])。その結果、走化性誘引分子である cAMP 刺激によって、アクチン/PIP3 波が消失すること、cAMP 投与から解放後1分以内に波が発生しやすいことを突き止めた。これらの結果から、アクチン/PIP3 波の動態は cAMP への走化性とは排他的であることが示された。また、こうしたマクロ流体デバイスを応用する中で、層流の向きを360度自在に変化させられるデバイスの着想を得て、これを新たに開発した(原著論文[1] 特許出願)。また、アクチン/PIP3 波の物理的環境への依存性を解析し、接着性の違う表面によって波の生成頻度、さらに基質の凹凸による波への摂動と運動を解析した(投稿論文準備中)。

研究テーマ D 「自己組織化ダイナミクスの理論・数値解析」

解析結果は、PIP3/F-アクチンの波が興奮性の波であることを強く示唆する。興奮系としての振る舞いが、どのような分子機構から現れるのか、先行研究の知見に基づいて、PIP2 から PIP3 へのリン酸化反応がアクチン重合によって促進されること、また、PIP3 から PIP2 への脱リン酸化反応は PIP2 によって促進されるという二つの正のフィードバックループを考え、2 変数方程式を導出した。相空間解析をおこなった結果、興奮系の出現が確認され、フィードバックが強くなると、サドルノード分岐を起こして新しい固定点が現れ、興奮性が失われることが予想された。これらのモデル予想は *pirA* 欠損株を用いた検証実験からも支持された。

PIP3/F-アクチン波と細胞膜の形態との関係をより理解するため、界面の形態変化を表現する数値シミュレーションを、フェーズフィールド法を用いて行った。シミュレーションの結果、膜上の離れた二点の位置から新に発火し伝播する同心円状の進行波によって生じる膜変形では、はじめに境界方向へ伝播した波面によって、発火点を結ぶ直線上の細胞膜が伸張すること、ほぼ同時に内側へ伝播する側の波面は、発火点を結ぶ直線上では波面が互いに衝突して消滅し、その後、それとは垂直方向への伝播は続くため、膜の伸張は発火点を結ぶ直線とは直交した方向に生じることがわかった。この発火のタイミングのずれで形態が楕円形か扇状になるかが決まる事が実際の細胞の観察との比較検討からあきらかになった。また、細胞端で波が反射する条件を探索した結果、膜の伸長のしやすさに強く依存することが示された。これらの結果を、テーマCの波を操作して仮説検証を行う実験へと繋げた。

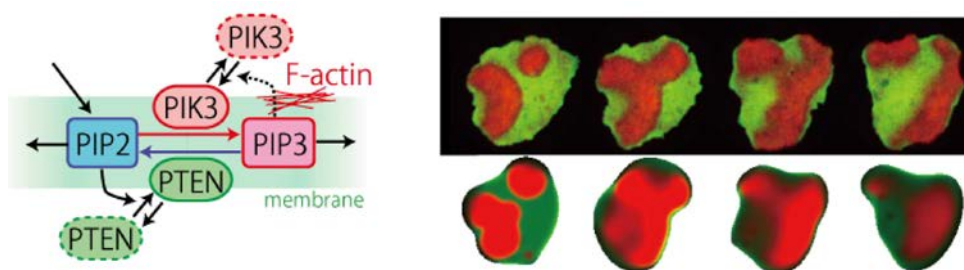


図2 数値モデル解析による波と膜変形の関係の理解

(左) PIP3 産生に関わる反応の模式図(右上)PHcracRFP/PTEN-GFP のスナップショット。(右下)フェーズフィールドモデルによる膜変形解析。発生タイミングがずれた二つの波面が衝突すると、おうぎ形の膜変形が実現される。

3. 今後の展開

F-アクチン／PIP3 波のダイナミクスの発生は、この数年間に粘菌以外に、神経細胞、マクロファージ、マスト細胞などの細胞において報告が相次いでいる。本研究で得られた描像や現象、操作方法が、細胞性粘菌以外の細胞にどこまで適用できるか、今後の課題である。現象の一般性が強く意識される学術的状況にある一方で、波ダイナミクスの細胞機能は依然として不確かである。細胞性粘菌においては、通常、膜状受容体の制御下にあるエンドサイトーシスが、過剰な Ras 活性によって、恒常的になっているとする見方があり、このことは、波のダイナミクスが必ずしも細胞遊走とは連動していないと言う本研究の知見と整合している。がん細胞に見られる過剰な栄養の取り込みの背景には、マクロピノサイトーシスなどの過剰な膜変形ダイナミクスが考えられ、波ダイナミクスとの関連が注目される。また、細胞基質依存的な細胞遊走は、免疫細胞や、がん細胞で報告が増えており、同様のアクチン構造との関連が示唆されている。複雑な組織内で細胞が這いまわれる足場の地形をいかに知覚しているか、今後の展開にとって重要な視点で

ある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

[研究目的の達成状況]

テーマA,Bの波の基本的なダイナミクスの抽出、アクチンとPI3キナーゼとの運動の解析、テーマCの数値モデル検証については、概ね実現することができた。テーマCについては、基質依存性な性質を明らかにしたことで、波と運動操作を実現することに成功した。これらの成果は、これまで記載的な描像にとどまっていたアクチン波の動態について、定量的なデータからその実態に近づくもので、走化性(chemotaxis)や地形依存的な遊走(topotaxis)、さらには食作用(phagocytosis)と行った、現象の背後にある基礎的ダイナミクスの理解が大きく前進したと考えている。一方、当初の目的であった光遺伝学を用いた、状態操作については、操作系を細胞性粘菌で確立するに至ったものの、波の操作までには至らなかった。このことは、この現象の分子描像の不足を示しており、今後の課題である。また、当初想定していた走化性との運動は、むしろそれを否定する結果となり、それを明らかにする過程で、新たなマイクロ流体デバイスや走化性に関する知見を得るという、予想外の成果があった。

[研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)]

研究費執行は計画通りに進め、開始時計画より消耗品などのランニングコストをなるべく削減し、その代りに細胞の構成的理解と操作に欠かせない、各種顕微鏡類、分子生物実験用装置の整備できたことで、実験が飛躍的に進んだ。本研究には、間接的に協力いただいた方を含めると、スタッフに加えて、実施場所を大学に選んだという地の利を生かし、生物学、物理学、薬学、化学と多様な学問的背景を持つ学生からの協力にも恵まれた。

[研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)]

本研究課題を通して、当初の研究計画では予想していなかった方向での技術的发展があった。一つは、共焦点顕微鏡やライトシート顕微鏡を利用して、研究開始当初は2次元で考えてばかりいた問題に対して、高い精度と分解能で3次元動態の時系列データが導入されたことである。組織内の免疫細胞やがん細胞の運動特性には、地形依存的な3次元膜変形の動態の理解と操作が重要であり、また、器官創生、損傷治癒など3次元組織のパターン形成への理論的な枠組み、解析手法などの技術応用を含めて、今後の研究展開が楽しみである。二つ目は、細胞外の誘引物質勾配の時空間的制御について、世界で唯一とも言える精度を実現するようになった点である。新規開発のデバイスについては特許出現を行っており、極めて汎用性の高いデバイスであることから、応用開発への波及が期待される。デバイスをを用いた細胞運動解析については、免疫細胞の特性の解析へと

発展しており、さきがけ研究者がこれまで粘菌で培ってきた手法が、より波及する方向性として期待できる。また、研究当初は馴染みのなかった微細加工が、研究手法の標準レパトリーとして確立できたことも、今後の研究展開にとって重要な点と考えている。

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

(研究総括)

マイクロ流体デバイスを用いて、アクチン／PIP3 波の動態と走化性運動との関係を解析し、走化性誘引分子である cAMP 刺激によって、アクチン／PIP3 波が消失すること、cAMP 投与から解放後1分以内に波が発生しやすいことを発見した。また、マクロ流体デバイスを応用する中で、層流の向きを360度自在に変化させられるデバイスを開発している。このように、現象の発見にとどまらず、意図的に操作することに取り組み、成果を挙げており、この領域の構成的なアプローチに合致した研究の進め方を評価したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nakajima, M. Ishida, T. Fujimori, Y. Wakamoto, S. Sawai, The Microfluidic lighthouse: an omnidirectional gradient generator. Lab on Chip 15, pp. 4382–4394, Oct, 2016.
2. F. Fukujin, A. Nakajima, N. Shimada and S. Sawai, Self-organization of chemoattractant waves in Dictyostelium depends on F-actin and cell-substrate adhesion. J. Roy. Soc. Interface 13, 20160233, June, 2016.
3. A. Nakajima, S. Ishihara, D. Imoto and S. Sawai, Rectified directional sensing in long-range cell migration. Nature Communications, Vol.5, Article number 5367, Nov, 2014
4. D. Taniguchi[†], S. Ishihara[†], T. Oonuki, M. Honda-Kitahara, K. Kaneko and S. Sawai, Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 110, No. 13, pp. 5016–5021, March, 2013
5. K. J. McQuade, A. Nakajima, A. N. Ilacqua, N. Shimada and S. Sawai, The green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) blocks cell motility, chemotaxis and development in *Dictyostelium discoideum*. PLoS ONE 8(3): e59275, Mar, 2013.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

平成24年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

受賞内容:「細胞集団の自己組織化についての研究」

主要な招待講演

1. Satoshi Sawai, "Integration of space and time information in long-range cell migration" The 59th Annual Biophysical Society Meeting Symposium "Emergent Properties and Collective Behaviors of Complex Systems" (2015 年 2 月 8 日) (米国 Maryland, Baltimore Convention Center)
2. 澤井哲 「細胞運動にみる興奮性の時空間ダイナミクス」国際高等研究所 研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」 2014 年度第 1 回研究会 (2014 年 12 月 14 日) 国際高等研究所
3. Satoshi Sawai, Wave geometries and cell shape dynamics, The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 on Quantitative Bioimaging 2013 年 3 月 17 日 岡崎基礎生物学研究所 日本(愛知県)
4. Satoshi Sawai, "Geometries of phosphatidylinositol waves and large-scale membrane deformation during spreading and random movement of *Dictyostelium*." International workshop on "Active Dynamics on Microscales: Molecular Motors and Self-Propelling Particles" (オランダ、ライデン Lorentz Center)(2012 年 9 月 19 日)

著作物

1. 石原秀至 澤井哲 「反応-拡散-駆動系として理解する細胞の形態変化」
日本物理学会誌 70(1) p.25-30 (2015)
2. 澤井哲 石原秀至 中島昭彦 「興奮系の自己組織化現象からみる細胞動態」
実験医学 Vol 31(8) 羊土社 2013 年 4 月号 p. 1217-1223.

プレスリリース

1. 中島昭彦 澤井哲 「粘菌の「集まれ！」の合図への応答にはダイオードのような整流作用が働いている。」(東京大学プレスリリース 2014/11/6)
2. 石原秀至 澤井哲 「アメーバ細胞の自由自在な形状を決定する仕組みを解明 - アメーバ内で自己組織化する波動と特異点 -」(東京大学プレスリリース 2013/3/8)

研究報告書

「バクテリア再構成法の開発」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有/増額有)

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 田端 和仁

1. 研究のねらい

本研究はマイクロデバイス中でバクテリアを再構成する技術開発を行う。

バクテリアを自由に再構成できるようになれば、バクテリアと言う生命システムが、個々の細胞機能を統合し、どのように生物と呼べる状態を作り上げているかを理解できるかもしれない。そこで私は、マイクロデバイス中でバクテリアを再構成する方法を開発する。バクテリアを再構成するにあたり、バクテリアそのものを一度破壊し、その破碎液を用いてバクテリアを再生させることを試みる。この方法だと、直前まで生きていたバクテリアの構成成分が全て残っているという利点がある。しかしながら、この破碎液をリボソームなどに閉じこめたとしても、そこからバクテリアが再生することはない。この原因として、細胞質タンパク質濃度の低下と細胞膜状態の喪失という2つの状態変化が原因ではないかと考えた。そこで、これら2つの状態を保ちつつ、バクテリアを破碎する方法を考案した。すなわち、バクテリアの中身を微小な容器の中に放出させ、その容器内でゲノムなどの分子と混合し、再び脂質二重膜(細胞膜)に覆われた状態の細胞を生み出す方法である。そこで、その容器をマイクロ加工によって作成する。その形状は、マイクロ流路内に設置された数マイクロメートルの大きさの容器で、脂質二重膜によってフタができるようになっている。この脂質二重膜にバクテリアプロトプラストを融合させ、バクテリアの細胞質成分を容器内へ放出させる。また、同時にバクテリア膜成分も脂質二重膜に導入される。こうすると、バクテリアの構成成分すべてが容器内に保持されることになる。この状態で、容器内の酵素活性や、ATP の生産レベル、脂質二重膜を介した物質取り込み活性を指標にして、容器内での生命活動がどの程度安定であるかを調べる。さらに、GFP を発現するプラスミドと一緒に容器内に閉じ込め、容器内での遺伝子発現についても検討する。また、容器や流路の形状に関しても検討を行う。ここでできあがったチャンバーとバクテリアプロトプラストの融合物(Hybrid cell)はバクテリアの構成成分をすべて内包している。つまり、細胞の条件をすべて備えたチャンバーである。このチャンバーが培養によって、分裂し増殖するかを確認する。

2. 研究成果

(1)概要

研究の結果、微小チャンバーアレイに脂質二重膜を作成する方法の開発に成功した(ALBiC)。さらに、大腸菌のプロトプラストと、ALBiC の融合にも成功した。また、この状態で培養を継続すると融合細胞が成長して体積を増加させ、分裂するような現象も確認できた。このことから、微小チャンバー内でのバクテリアの再成が可能であることを強く示唆している。また、チャンバー内にあらかじめ β -galactosidase をコードしたプラスミドを導入し、大腸菌を融合させたところ、プラスミドからのタンパク質発現が確認できた。また、その酵素活性から合成された酵素分子の数を見積もったところ、数十分子の酵素が合成されていることが分かった。こ

これらの結果は、バクテリアがマイクロデバイスと融合しているという状態においても、生合成活性を維持できることを示している。

(2) 詳細

① バクテリア再構成のためのデバイス開発(達成)(増額あり)

デバイスの形状や材質に関して検討を行った。デバイス上面を覆うフッ素樹脂の材質に関して、検討を行ったところ、488nm の励起光で自家蛍光が発生することが分かった。そのため、本樹脂の開発企業と自家蛍光に関して検討を行ったところ、樹脂に含まれるシラノール基が原因であることが分かった。そのため、それを含まないフッ素樹脂に変えたところ、自家蛍光が大幅に減少し、解析をより精度高く行うことができるようになった。一方、デバイスの形状に関しては、直径 $5\mu\text{m}$ 以下のチャンバーで、直径が安定しないという問題点があった。これは、フォトマスクにパターンされた円形が光の干渉パターンを生むため、パターンの大きさより大きく露光され、形状が安定しないことが原因であった。そこで、露光機に水銀用の g 線フィルターを導入し、露光時間 7 秒で直径 $3\mu\text{m}$ や $4\mu\text{m}$ のデバイスを安定して作成できるようになった。また、微小容器に脂質二重膜でフタをする方法の開発に取り組んだ。微小容器上に脂質二重膜を作成する方法は、従来より知られている張り合わせ法を転用し、微小容器デバイス上を buffer、脂質を溶かした溶媒、培地の順に流すことで作成した。この作成された脂質膜でフタをされた微小容器を ALBiC (Arrayed Lipid Bilayer Chamber) と名付けた(図 1)。さらに、本チャンバーの脂質膜が膜タンパク質を再構成して機能するかを確認した。具体的には、 α ヘモリシンを ALBiC 上に再構成し、ポア形成がおきればチャンバー内部の蛍光色素が漏出して蛍光強度の減少が生じる。その結果、全てのチャンバーにおいて蛍光強度の減少が確認できたため、ALBiC の脂質二重膜は膜タンパク質を再構成して機能を発揮できることが分かった。(論文 1 参照)

② 融合のためのバクテリア調製と ALBiC との融合(達成)

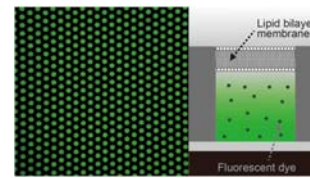


図 1 ALBiC 概略

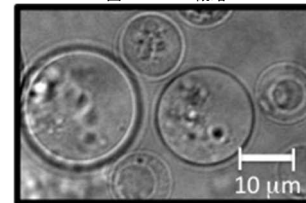


図 2 巨大化大腸菌

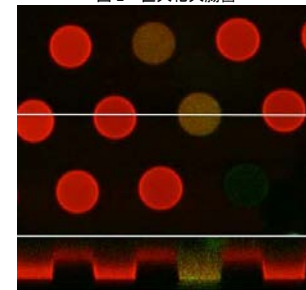


図 3 ALBiC と巨大化大腸菌の融合
巨大化大腸菌は GFP を発現しており、ALBiC 中には、蛍光色素（赤）を封入している。下段の図は上段の白線部分での Z セクション。融合によって、緑と赤が混ざり、黄色に変化している。

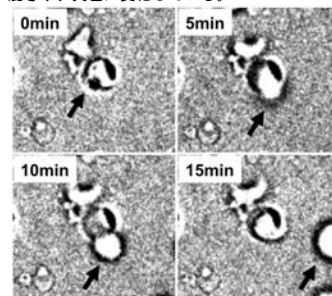


図 4 融合したチャンバーからのリボソーム様細胞の出芽
矢印部分が出芽してくるリボソーム様細胞。

ALBiC に融合させる大腸菌の調製を行った。大腸菌は、グラムネガティブ細菌であるため、ALBiC の脂質二重膜と融合させるためには、外膜とペプチドグリカン層を取り除く必要がある。また、ALBiC の容量も 20fL と大腸菌 1 匹の容量 (0.6fL) と比較しても 40 倍程度大きく、大腸菌細胞質のタンパク質濃度低下が起きてしまう。そこで、細胞壁合成阻害剤 (アンピシリン) 存在下で大腸菌を培養し、巨大化させることで、この問題を解決することとした。リゾチーム処理により、細胞壁を取り除いた大腸菌をアンピシリン存在下で培養すると、容易に直径 10 μm 程度に巨大化する (図 2)。一方この巨大化大腸菌は通常の大腸菌と同様に分裂・増殖が可能か分からない。そこでこの巨大化大腸菌が元の大腸菌に戻れるのかを顕微鏡下で、観察を行い検証を行った。すると、球形の巨大が大腸菌から角状の菌が生えて大腸菌のような桿菌に戻るということが分かった。さらにこの菌を回収し、プレート上でコロニー形成を行ったところ、コロニーを観察することができた。このことから、巨大化大腸菌は元の大腸菌に戻り分裂増殖ができる生きたシステムであることが分かった。次に ALBiC と巨大化大腸菌を融合させる実験を行った。図 3 は実際の実験の顕微鏡画像である。巨大化大腸菌は、GFP を発現させているため、緑色の蛍光を発している。また、ALBiC 内部には、赤色の蛍光色素を導入している。このため、融合が生じると、その 2 色がマージされ黄色に見える。黄色に見える容器が見られることや、Z 方向の断面図でも容器内に 2 色が均一に分布していることから、ALBiC と巨大化大腸菌の融合が生じていることが分かる。

③融合細胞からの再生と分裂 (ほぼ達成)

大腸菌と融合した ALBiC (融合細胞) の観察を継続すると、多くはないが図 4 に示すような、容器から飛び出して分裂するような現象が見られた。これは、融合細胞が大腸菌へ再生することを強く示唆している。

④融合細胞の状態計測 (ほぼ達成)

融合細胞のタンパク質合成を GFP の蛍光強度を指標にして計測し、ATP のような化合物を ALBiC 内にあらかじめ導入することや、初期タンパク質濃度が高いほど、よりタンパク質合成能が高くなることを見出した (図 5)。また、融合細胞内の ATP 濃度状態やタンパク質濃度 (論文 2)、膜電位などを計測するシステムの立ち上げに取り組み、ATP 濃度状態や膜電位の計測はほぼ可能となった。

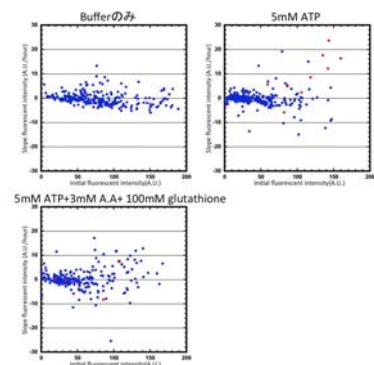


図 5 ALBiC 内の buffer 条件変化による、GFP 合成速度分布の変化
横軸は融合直後のチャンパー蛍光強度、縦軸は蛍光強度変化の傾き。各点は融合したチャンパー1つに対応する。ATP の添加によって、GFP 合成速度が増加するチャンパーが増える。

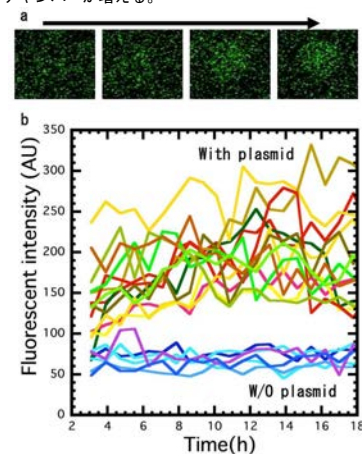


図 6 ALBiC 内に閉じこめた DNA から GFP 発現
a: ALBiC 蛍光画像。時間とともに蛍光が増加する。b: 各チャンパーの蛍光強度変化。プラスミドを入れたもののみの融合後に蛍光強度が上昇する。

⑤ALBiC 内への遺伝子導入(延長課題)(ほぼ達成)

ALBiC 内にあらかじめ GFP をコードするプラスミドを導入し、融合細胞化すると、プラスミドからの GFP 発現が起こることを見いだした。(図 6)。また、 β galactosidase をコードしたプラスミドにおいても同様の実験を行ったところ、その発現が確認された。また、融合細胞内で合成された酵素分子数を見積もったところ、平均で 25 分子の酵素が合成されていることが分かった。本酵素は 4 量体のタンパク質であるためモノマー換算では 100 分子が合成されたことになる。これ以外にも、プラスチックビーズ(300nm)を融合させることに成功している。今後は、ゲノムレベルの大型 DNA の導入を行うが、現在では 200kb のプラスミド調整に成功しており、今後どの導入実験に取り組む予定である。

3. 今後の展開

本研究により、人工物であるマイクロチャンバーから、バクテリアを再生できる可能性があることを示すことができた。このことは、マイクロチャンバー内にあらかじめ物を仕込んでおけばそれをバクテリア内に取り込ませることが可能であるということを示唆している。実際に、プラスミド DNA を閉じこめておけばそこからタンパク質を発現させることができることも示している。そうすると、バクテリアのゲノム DNA をチャンバー内に導入することで、元々持っていたゲノムと交換することができるゲノム入れ替え法への発展が期待される。そのためには、現在再生頻度が極端に低いため、これを向上させるための改善が必要となる。また、融合細胞内の状態をモニターして再生頻度との相関を調べる必要があると考えられる。さらには再生してきたバクテリアを解析し、コロニー形成能やゲノムシーケンスを行う必要もある。このように、バクテリアを再構成すると言う全く成功するかどうか分からない状態から可能性があることを示すことができた。よって、今後もさらなる研究を行う必要がある。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

本課題は、大挑戦型として実施された。研究テーマとしても、誰もが不可能であると考えたバクテリアの再構成を掲げ、萌芽的要素を強く含んだ大挑戦らしいテーマであったと考える。また、本提案が成功すれば、教科書に載るような研究になるばかりでなく、望みの機能を持ったバクテリアを自在に創る研究への発展が見込まれ、世界の産業構造を大きく書き換える研究の基礎となることが期待される。延長期間を含め、6 年度にわたる研究において、デバイスの開発からバクテリアの再生までの研究に取り組み、おおむね当初の目的は達成できたと考えている。しかしながら、未だバクテリア再生に関わる論文発表には至っておらず、早急に論文発表を行う必要がある。また、研究開発開始後、デバイス開発に関わる内容にて、研究費の増額を受けた。これにより、現在利用している形のデバイス開発に成功したが、その過程において、デバイス材料開発企業との協力関係構築にも成功し、現在においてもその関係は継続されている。研究費の増額によって、研究の進展のみならず産業界との結びつきができたことが非常に助かっている。これらデバイスを利用してバクテリアの再生に道筋を付けることが

できた。この結果によって、研究期間の延長と増額が認められた。延長期間においては融合細胞内への巨大分子導入法の開発に取り組み、通常ではバクテリア内に入れることができない 300nm のビーズの導入や、プラスミド DNA を導入してそこからのタンパク質発現にも成功した。これは、今後行うゲノム DNA 導入につながる成果である。現在でも引き続き研究を行っており、導入するゲノムの調整やどのように導入するかの研究を進めている。このように、全く何もなかったところから 6 年度の間にバクテリアの再生ができる可能性を示すことができた。これは新しい研究分野の創成に関わる成果であると考え、大挑戦らしい研究成果であるとする。

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

(研究総括)

バクテリア再構成のためのデバイス開発に取り組み、微小容器に脂質二重膜でフタをする独自の技術を開発した。さらに、この微小容器を用いて、巨大化大腸菌の融合に成功していることは評価できる。合成生物学のゴードンリサーチ会議において、本成果の発表を行っている。今後は、脂質二重膜については、脂質の組成と膜の安定性、また、ATP 合成酵素など活性の関係を調べる、巨大化大腸菌の融合のメカニズムの解明など、現象の背景となる原理への展開も望まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. R. Watanabe, N. Soga, D. Fujita, **K.V. Tabata**, L. Yamauchi, S.H. Kim, D. Asanuma, M. Kamiya, Y. Urano, H. Suga, H. Noji., Arrayed Lipid Bilayer Chambers Allow Single Molecule Analysis of Membrane Transporter Activity. *Nature Communications*. 2014 Jul 24;5:4519.
2. Yaginuma H, Kawai S, **Tabata KV**, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Noji H, Imamura H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci Rep*. 2014 Oct 6;4:6522.
3. Muraoka T, Endo T, **Tabata KV**, Noji H, Nagatoishi S, Tsumoto K, Li R, Kinbara K. Reversible ion transportation switch by a ligand-gated synthetic supramolecular ion channel. *J Am Chem Soc*. 2014 Nov 5;136(44):15584-95
4. Watanabe R, **Tabata KV**, Iino R, Ueno H, Iwamoto M, Oiki S, Noji H. Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force. *Nat Commun*. 2013;4:1631

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: 田端 和仁、野地 博行
発明の名称: チャンバー細胞生成方法
出 願 人: 国立大学法人東京大学
出 願 日: 2013/10/21

出 願 番 号：特 願 2013-218556

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演と海外発表

1. 2013 IEEE 26th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)
20–24 Jan. 2013. H. Wakioka, S. Yamamoto, K.V. Tabata and M. Sugiyama, Attoliter order
droplet formation using nanochannels and enzyme reaction inside a droplet.
2. EBEC2014・ポルトガル(リスボン), 2014 年 7 月, Kazuito V. Tabata, Direct observation of
CWD bacteria reproduction
3. Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and
the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis ・ケニヤ(ナイロ
ビ), 2014 年 9 月 9 日, Kazuito V. Tabata, ANALYSIS OF A SINGLE CELL FUSED
MICRODEVICE (招待講演)
4. 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences,
San Antonio, Texas, USA, October 26–30, 2014, Kazuito V. Tabata, PREPARATION AND
ANALYSIS OF BACTERIA HYBRID CHAMBER CELLS
5. Emergence in Chemical Systems 4.0, University of Alaska Anchorage, June 22–27, 2015,
Kazuito V. Tabata, HYBRID CELL ~SINGLE CELL BACTERIUM FUSED MICRODEVICE~
6. Gordon research conferences Synthetic Biology, Sunday River, Newry, ME, June 28 –
July 3, 2015, Kazuito V. Tabata, Reconstitution of a cell in femto litter sized
microchamber array.
7. EBEC2016・(第 19 回)・イタリア・Riva del Garda, 2016 年 7 月 2 日～7 日, Kazuito V.
Tabata, Reconstitution of a cell in femto litter sized microchamber array.

一般科学誌掲載

1. Newton 別冊 やさしく分かる生命の科学 ニュートンプレス, 2014 年 7 月, 田端和仁, 無生
物の部品をくみ上げて、生きた細胞は作れるか?

研究報告書

「カイメンが工学的に優れた骨格構造を自律的に構築するメカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 船山 典子

1. 研究のねらい

動物の外部形態は骨格により決定される。即ち、生物の多様な形態を生み出す仕組みの理解には、骨格形成機構の解明が必須である。これまで解析の進んできた脊椎動物、昆虫、棘皮動物などの骨格形成機構は全て、共通の形態形成原理、即ち「まず骨格のパターンが決まり、そのパターンに従って骨格構成要素(軟骨など)が細胞により作られ、その場で骨格が形成される」というものであった。

私達はこれまで全く解析されていなかったカイメン骨格形成機構に着目、解析を進めている。カイメンの骨格は、「骨片」と呼ばれる微細なガラス質の骨格構成要素が非常に多数組み上げられた建築工学的にもすぐれた柱と梁構造である。しかしカイメン体内で細胞が、どの様にこの骨片を建て繋げて骨格を構築するメカニズムは長い間未解明のままであった。私達は、骨片は新規に見いだした骨片を運搬する細胞(transport cellsと命名)により、体内をダイナミックに運ばれ、その先で建て・繋げられることを明らかにし、カイメン骨格形成機構は全く新しい骨格形成機構であることを見出していた。

本研究ではこの発見の上に「何時、どこに、どの様に骨片を建て・繋げていくかに関わる運搬細胞を中心とした細胞の協調作業を制御する全く新規と期待できるロジック」を、骨片骨格により刻々と広がる体内空間との関係に着目して解明することを目的とした。解明した骨片骨格形成機構から、固着性生物であるカイメンの、個体毎にバリエーションの大きな可塑的な成長を可能にする仕組の解明につながると考えた。

本研究の展開として、水流などその場の環境からの物理力に対応して形成する骨格が微調整されている可能性とその機構について明らかにすることを目指した。カイメンは同じく固着性生物である植物やサンゴなどと同様、種特異的な形態を持ちながらも、棲息環境によって形態が違ってくるといった一般的な観察などに着想した。これらの研究成果から、風力、水流、水圧など外部からの物理力に耐久性を持ちつつ、空間を常に拡張出来る「成長する」人工建築物デザインへの応用の可能性も探れるのではないかと考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、カイメン体内における骨片運搬経路の XY 面における詳細なトラッキングと解析を可能にし、その結果、骨片は上皮組織上を骨片運搬細胞によってストカスティックに運搬され、その先でたまたま骨片が上皮に刺さると建てられること、即ち、パタニングなどによって骨片が建てられる位置が決められ、その予定位置に向かって骨片が運搬されるのではないかと当初の仮説とは全く異なるメカニズムが存在することが明らかになった。次に、カイメン側面からの蛍光像の取得と多焦点面・長時間タイムラプスを可能にする独自の培養・顕微

鏡システムの構築に成功した。これにより、骨片が建てられる過程を捉えることに成功、そのステップを明らかにした。次に、建てられた骨片にさらに骨片が繋げられ、骨片から成る柱構造を伸長する過程も、同様の4つのステップによることを明らかにした。これらの成果から、カイメン骨格形成機構は、骨片の上皮組織上の「運搬」、上皮に骨片を「刺す」、「先端を持ち上げる」「基底側端を固定する」という、連続して起きる一連の物理的な細胞作用の繰り返しの結果、骨片が1本1本骨格に加わる、自己組織化機構であることを解明した。即ち、既知の動物の骨格形成機構に共通した形態形成メカニズムとは根本的に異なる、全く新規の動物の形態形成メカニズムの発見である。

(2) 詳細

研究テーマ A 「骨片を建てる過程およびその過程に働く細胞・組織メカニズムの解明」

本研究ではまず多焦点・XY平面での詳細なタイムラプス撮影法を確立し、骨片運搬過程の詳細なトラッキング法を検討した。ソフトウェアを用いた自動トラッキングは骨片の形状などから技術的に困難であり、最終的には全て手作業でトラッキングを行った。その結果、決まった骨片運搬経路はないこと、骨片が建てられる順に規則性はないこと、骨片が建てられる場のパタニングを示す遺伝子発現はみられないことを明らかにした。これらの結果から、骨片運搬はストカスティックであり、パタニングにより決定された建てられる位置に運搬されるのではないという予想外の結論に至った。また、骨片の先端が持ち上がった後も基底側端は移動していることが分かり、骨片を「運ぶ」、「先端を持ち上げる」、その後「基底側端が固定される」というステップを明らかにした。

次に、共同研究による共焦点顕微鏡を用いた骨片運搬細胞の挙動の詳細な解析により、骨片運搬細胞が基底上皮組織上を移動、骨片を運搬し続ける結果、体の縁付近などで上皮組織に骨片が「刺さる」こと、その後骨片の先端が持ち上がることを明らかにした。即ちカイメンでは、骨片を建てるために体の内側から外に骨片を着き出すという予想外のメカニズムを用いていることが初めて明らかになった。

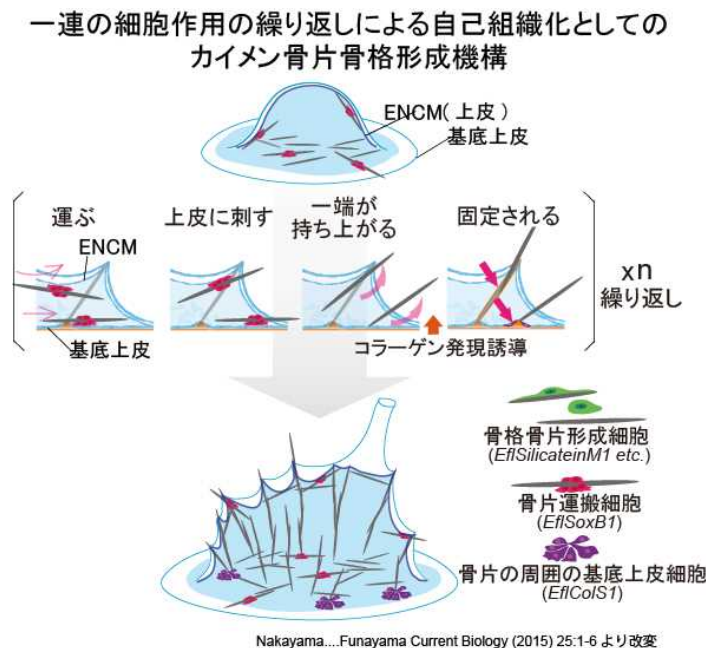
また、タイムラプス撮影と mRNA 発現解析を組み合わせる工夫を行い、建てられた骨片の周囲で特異的に発現する遺伝子として私達がすでに見出していた短鎖コラーゲン遺伝子が、骨片骨格形成過程においていつ発現しているのかを解析した。骨片の先端が持ち上げられ始めた後に、次第に基底側端付近の基底上皮細胞で短鎖コラーゲン遺伝子の発現が誘導されること、即ち「刺す」ステップの後、「先端を持ち上げる」ステップの間に短鎖コラーゲンの mRNA 発現誘導が行われていると分かった。この結果は、前もって骨片が建てられる位置が決まっているのではないという先の結論を支持する結果である。

研究テーマ B 「骨片を繋ぐ過程およびその過程に働く細胞・組織メカニズムの解明」

試行錯誤の結果、生きたカイメン側面からの蛍光像を取得出来る独自の顕微鏡システムを構築、生きたカイメンの側面から、蛍光可視化した骨片の画像取得に初めて成功した。また、多焦点面、5分毎、24時間以上の詳細なタイムラプス撮影を可能にする培養法を確立、骨片骨格形成過程を側面から観察・解析した。カイメンの体内空間を被う上皮組織は、基質に接着している基底上皮組織とその他の上皮組織部分(特定の名称がなく EMCM と命名)で

ある。カイメン側面からの詳細なタイムラプス撮影と解析により、骨片骨格形成の始めから、骨片はこれら基底上皮組織と ENCM 上をストカスティックに運搬されており、体の端などで建てられること、その後 ENCM 上を運搬された骨片が建てられた骨片の先付近に「運搬される」とそこで ENCM に「刺さる」、「先端が持ち上がる」、基底側端が建てられた骨片に「固定される」という建てられる際と同様の4つのステップにより「繋げられる」ことを明らかにした(下図)。即ち、当初は複雑な機構により繋げられると予想していた「骨片を繋げる」課程を明らかにすることが出来た。

研究成果のまとめ【カイメン骨片骨格形成機構の原理】



上記の研究結果から、既知の動物の骨格形成機構とは根本的に異なる形態形成メカニズムによる骨格形成機構の存在を見出し、その過程を明らかにした。カイメン骨片骨格形成機構は以下2つの形態形成メカニズムにより実現されていると解明した。第1に、「骨片形成細胞(資材屋)、骨片運搬細胞(大工)、コラーゲン分泌細胞(基礎屋)の分業」である。これにより、骨格形成要素の産生された場によらない自在な骨格形成を可能にしている。第2に、「連続して起きる骨片を「運ぶ」「刺す」といったシンプルで物理的な細胞作用の繰り返しによる自己組織化」である。これは、既知の動物の骨格形成機構とは根本的に異なる想像もされていなかった全く新規の機構である。固着性生物であるカイメンは、固着性生物の特徴の1つである、種特異的な形態を持ちながらも、個体ごとの形態バリエーションが大きな可塑的な成長を行う。本研究で明らかになった連続して起きる一連の「細胞が A という状況ではBを行う」という物理的な細胞作用の繰り返しの結果、骨格が形成される自己組織化機構は、「刺す」というステップに、体の成長に従って体の外側に骨片を建て・繋げることが実現でき、自然にその時その時の体に合わせた骨格が形成される、という非常に優れた機構であることも明らかに出来た。これらの成果を Current Biology 誌に発表した。

(2) 環境からの物理力(水流)に応じた骨格形成微調整機構の可能性と解析

平行して行っていた私達の別プロジェクトが終了したため 2015 年度からこの研究課題を引き継いで行った。この別プロジェクトではすでに、一定流速下でカイメンの個体形成を行わせ、同時に倒立顕微鏡を用いてカイメン側面から撮影できる培養・撮影システムを開発・確立に成功、タイムラプス撮影を可能にしていた。本研究では、2015 年度は学部学生の実験補助のパートタイム雇用によりタイムラプス撮影を行い、水流が当たる部分において建てられた骨片に次の骨片が繋がる結合位置が、静置条件での培養時よりも低い傾向があるという、別プロジェクトの結果からの仮説を支持する結果を得た。現在、骨片の結合位置が低くなる細胞・組織機構について詳細な解析を進めており、別プロジェクトの成果と併せ、論文にまとめてゆく予定である。

3. 今後の展開

本研究により、全く新規の細胞作用による自己組織化という骨格形成機構を見出す事が出来た。この上に、近年着目されている研究分野である、環境からの作用を含めた動物の形態形成及び成長の理解という Ecological Developmental Biology の視点を加えた展開が期待できる。カイメンは植物・サンゴなど他の固着性生物と同様、種特異的な棲息環境により外部形態が異なることが一般的に知られている。動物の外部形態を決定するのは骨格であるため、カイメンは棲息環境により形成する骨格を微調整できる仕組みを持つのではないかと予想出来る。棲息環境からの物理的な力に応じて、自己組織化による骨格形成がどの様に微調整されるのか解明出来れば、多様な形態を生み出す形態形成メカニズムの新たな知見が得られるだけでなく、深海、地球外惑星などといった事前に詳細な測定が困難な環境に自然に合わせた建物建築法など異分野への展開が期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究成果としては自分の予想以上に研究が進み成果を出すことが出来たと考えている。また、次の展開のためのシーズを複数得ることも出来た。これは、発生生物学・細胞生物学、生物物理学、物理学、生化学、工学など、非常に多様な分野の研究者が集まった本領域において、領域会議・自主勉強会などの度に、多くの助言や質問、コメントを貰え、そのおかげで独自の解析装置が確立出来たこと、研究内容に対して多角的な視点で考察出来たからこそ得られた成果と考えている。

この研究成果は、カイメン骨片骨格形成機構の過程とロジックに関する論文を発表することが出来た。EurekAlert で Cell press の記者による紹介文と共に主な 3 本の動画を一般に配信することも出来、それにより Nature 誌の Research highlight や、Phys.org, ナショナルジオグラフィック web 版、複数の新聞などで取り上げられ、生物学以外の研究者だけでなく一般の方々にも、動的で建築工法的なカイメン骨片骨格形成という生物の持つ巧妙で魅力的な形態形成メカニズムを伝える事が出来た。私達は、本研究が取り組むカイメン骨片骨格形成という現象は、科学・生物への興味を刺激する魅力的な現象であると考え、様々な方々に伝えたいと長く希望してきていたため、この様な形で社会へ発信できたことも本研究の大きな成果と考えている。

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

(研究総括)

最も外側の上皮を蛍光可視化し、ezDSLMで長時間撮影に成功し、骨片運搬細胞が刺さった骨片を運搬している可能性を示した。また、側面からのカイメン蛍光像を撮影する倒立顕微鏡システムの構築に成功して、長時間タイムラプス解析により、additional spiculesはENCM上を運搬され、1段目の骨片と同様の5つの連続したステップにより、骨片に結合し組み上がることを解明した。このように、長い努力が実って、運搬細胞の可視化と横方向からの撮影技術の開発に成功したことによって、全く研究されてこなかった現象の理解が大きく進展したことを、高く評価したい。

ストカスティックな骨片運搬と置き位置決定の仕組みは、結果的に、カイメンの体内空間を最大化することになるのか、構造体の強化と空間最大化の両者を追求することになるのか、などのカイメンの形態形成戦略解明が課題である。この点に関して、緩急水流中での培養や、斜めまたは凹凸のある底面上で育てるなどの工夫によって、興味深い結果が得られる可能性も有り、今後の研究の進展が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Nakayama S, Arima K, Kawai K, Mohri K, Inui C, Sugano W, Koba H, Tamada K, Nakata YJ, Kishimoto K, Arai-Shindo M, Kojima C, Matsumoto T, Fujimori T, Agata K, Funayama N. “Dynamic transport and cementation of skeletal elements building up pole-and-beam structured skeleton of sponges “ Current Biology (2015) 25:1-6
2. Alié A, Hayashi T, Sugimura I, Manuel M, Sugano W, Mano A, Satoh N, Agata K, Funayama N.” The ancestral gene repertoire of animal stem cells” Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 22;112(51):E7093-100

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

①プレスリリースなど

紹介記事

1. Research highlights How the sponge got its skeleton (Research highlight)
Nature 525, 428
2. Sponge cells build skeletons with pole-and-beam structure
http://www.eurekalert.org/pub_releases/2015-09/cp-scb091015.php
3. The Surprisingly Complicated Construction Work of Simple Sponge

<http://phenomena.nationalgeographic.com/2015/09/17/the-surprisingly-complicated-construction-work-of-simple-sponges/>

4. カイメン体内で微細な建築資材(ガラス質の骨片)を細胞が運び、立て、組み上げる全く新しい骨格形成機構を発見

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150918/>

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150918_2.html

5. 朝日新聞 (2015/9/24)

6. カイメンが明らかにした幹細胞の起源的な分子基盤

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/151207_1.html

② 総説

1. 近藤滋・船山典子 エ務店細胞が「建設」する深海のスカイツリー
細胞工学 34(11) 1096-1103 (2015)

③ 主要な学会発表

1. FUNAYAMA N. How do sponge cells build up the hierarchical spiculous skeleton?

日本生物物理学会第 51 回年会(招聘) (2013)

2. Funayama, N. What we can learn from sponges? – Origin of stem cells and a novel mechanism to construct 3-dimensional body International Workshop ” The origin of metazoans” (招聘) (2015)

3. 船山典子 5つの力学的細胞作用の繰り返しが自律的に海綿骨片骨格を形成する
第 55 回 生物物理若手の会夏の学校(招聘 講演) (2015)

4. Funayama, N. Transport and cementation of skeletal elements into pole-and-beam structure in sponges JST-HMS joint symposium on Systems Biology (2015)

5. Funayama, N. Skeleton construction of sponges: the simple and accordingly robust mechanisms underlying both their plastic growth and phenotypic plasticity 熊本大学リエゾンラボ研究会／リーディングプログラム : HIGO 最先端研究セミナー (招聘) (2016)

研 究 報 告 書

「分子輸送から解く生命の起源：構造、情報、輸送の動的相関の解明と新たな分子操作技術の確立」

研究タイプ：大挑戦型（※大挑戦型課題として延長有／増額有）

研究期間：平成23年12月～平成29年3月

研究者：前多 裕介

1. 研究のねらい

細胞は、母なる細胞がもつ遺伝情報に従ってコピーされて生まれる自己複製系である。遺伝情報は DNA の塩基配列にコードされ、その長大な情報分子の誕生は生命の起源を理解する重要な手がかりである。本研究は遺伝情報分子の物理的起源の探求をめざし、非平衡系における DNA 輸送現象と秩序形成の解明、そして酵素反応との共存により重合反応が増強された情報成長の構成的実験を行った。

さらに、我々が注目する分子輸送現象は、従来の分子操作技術である光ピンセットや磁気ピンセットとは大きく異なる特性がある。その性質は、生体分子や細胞の電磁気学的な性質に依らずにマニピュレーションを行うことができる「弱マテリアル依存性」である。この特性を利用し、生体分子と細胞を自在に操作し、機能制御を可能とする新たな分子操作技術の開発を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

空間内の二点に温度差があると温度勾配が形成され熱流が生じ、熱平衡から離れた非平衡系となる。我々は赤外線レーザーを集光することで、巨大な温度勾配を持つ実験系を構築した。高分子ポリエチレングリコール (PEG) 溶液中の温度勾配下では、DNA や RNA がサイズ依存的・構造依存的に高温側にあつまり、様々なパターンを形成する「選択的な分子輸送現象」が生じることを実験的に示した。さらに、輸送現象とともに DNA ライゲーション反応を進行させると長大な DNA が選択的に基質となって、より長くなる選択性を獲得することがわかった。温度勾配は自然界に顕在する非平衡系であり、海底の熱水噴出口には本研究で構築した温度勾配と同等の巨大な非平衡系が実現していると考えられる。得られた知見は、(1) DNA がサイズや構造に応じて選り分けられながら濃縮され、(2)濃縮とともに平衡系ではほとんど得られない長大な DNA を優先的に合成する、というメカニズムで濃度問題をシンプルな物理現象から解消しうることを示唆する。

さらに、マテリアル依存性のない新たな分子操作技術を実現するため、高分子 PEG 溶液中の温度勾配でタンパク質、バクテリア *E.coli*、細胞性粘菌 *Dictyostelium* の密度分布を光で制御する Opto-thermal diffusiophoresis 法 (OpTD 法)を開発した。さらに、集光レーザーが動く、すなわち熱源が動く状況では、溶液に流れが生じ、生体分子を捕捉する光マニピュレーションが増強される効果を新たに発見した。理論モデルは実験結果を良く再現しており、「マテリアル依存性のない新たな分子操作技術」の基盤を確立する重要な知見を得ることに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A: 「非平衡系における分子輸送の理解と生命の起源の濃度問題」

細胞分裂など自己複製において DNA は遺伝情報を保つ分子として重要な役割をもつ。では、いったいどのように太古の地球においてどのように DNA を保持する生命システムを得るに至ったのだろうか。DNA は塩基対配列に遺伝情報をコードする高分子ポリマーであり、とりわけ細胞のように複雑なシステムの構築や制御には膨大な配列情報を必要とする。しかし長大な DNA を作るには、拡散による分子の散逸を防ぐプロセスが不可欠である。これは「生命の起源の濃度問題」とよばれる分子進化の謎の1つである。本研究では、温度勾配下の分子輸送現象が濃度問題を解消しうることを示すため、構成的実験から解析を行った。

代表的な非平衡系の温度勾配であり、温度勾配下で溶質分子が輸送される現象が知られている。そこで赤外線レーザーを集光して定常的な温度勾配を形成し、同時に DNA の濃度分布を蛍光顕微鏡で計測する実験系を構築した(図1A)。次いで、溶液中にタンパク質を模したポリエチレングリコール高分子を少量ドープし、DNA の濃度分布を計測した。その結果、

1) DNA が局所的に集積し、リング状のパターン形成や高温側での濃縮が起こる

2) パターン形成は DNA サイズ依存的であり、大きな DNA ほど濃縮率が高い

3) DNA や RNA が二重らせん構造を持つことで分子濃縮率が增強される

ことを見いだした(図1B および1C)。温度勾配下の輸送方程式の理論解析から、PEG の浸透圧勾配と温度勾配のバランスで DNA 濃縮場所が決まることを示した。

温度勾配は海底の熱水噴出口や温泉の間欠泉など、地球上に顕在する非平衡系である。太古の地球の非平衡環境下では、温度勾配下のパターン形成と二重らせん構造による輸送の增強を通じて、長大な遺伝情報を保持する分子への進化が加速されたのかもしれない。

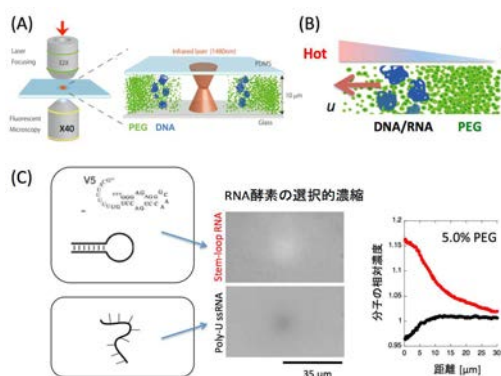


図 1. (A) 温度勾配下の分子輸送を計測する実験系. (B) 高分子溶液中の分子輸送モデルの概念図. (C) 温度勾配下の分子輸送による構造依存的な分子輸送の計測.

研究テーマ B: 「非平衡系の酵素反応と情報成長の統計則」

テーマ A では、温度勾配下での生体分子の選択的な分子濃縮を示す事に成功した。いかにして長大な DNA が温度勾配下で出現するか、これを構成的に理解することが次なる課題である。大挑戦型の延長課題として、非平衡系の輸送現象と酵素反応の共存による選択的な DNA 重合反応の構成的実験と統計則の解明を行った。

輸送現象と同時に DNA を基質とした酵素反応が共存する系を構築し、サイズ依存的な分子輸送を通じて長大な DNA が選択的に合成されうかを検証した。熱平衡条件下または温度勾配下において耐熱性の DNA 非相同組み換え反応(ライゲーション)を行い、qPCR (Quantitative polymerase chain reaction) を用いて DNA 長さ毎の濃度を定量計測した。その

結果、平衡条件下においては単一分子内で起こったライゲーション回数に対して、DNA 濃度が指数関数的に減少する統計則が現れることがわかった(図2)。温度一様の平衡系ではランダムにライゲーション反応が起こることを示唆しており、DNA 重合度が高まるほど反応産物の量は急速に減衰することがわかった。

次に、非平衡条件である温度勾配・濃度勾配の共存下で、DNA 分子を濃縮しながらライゲーション反応を行った。この非平衡条件下では、最も連結数の長い DNA が 100 倍の生成量を示すことが検出された。分子輸送によるサイズ依存的濃縮が指数関数的減衰を相殺し、増幅されたライゲーション反応(Non-random DNA Ligation)が誘起されたと考えられる。今後、選択的なライゲーション反応のメカニズムを解明し、生命の起源の濃度問題の解決に向けた物理的シナリオを構成的に実証することが期待される。

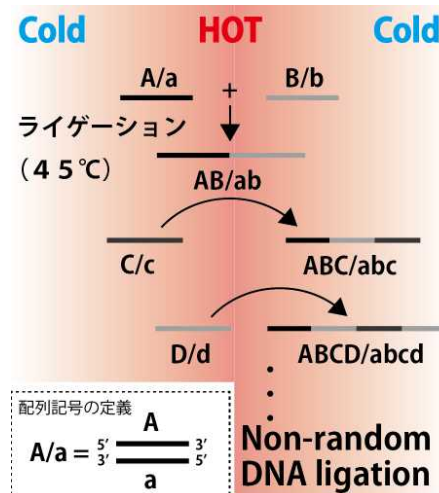


図2. 非平衡系で成長する DNA 重合反応の概念図

研究テーマ C: 「分子輸送を利用した新たな分子・細胞操作技術の確立」

温度勾配・濃度勾配下の輸送現象は運ばれる分子の電磁気学的な性質には左右されない。この性質は、光ピンセットや磁気ピンセットといった電磁気学的な性質を利用した操作技術と一線を画しており、生体分子や細胞の操作をマテリアル依存性無く行う新たな分子操作技術につながる。そこで、新原理に基づく分子操作技術”Opto-thermal-diffusiophoresis (OpTD)法”の開発を行った。

最大の温度差を 3.0 K、溶液中の PEG 濃度を 5.0%に設定した溶液下において濃度勾配の成型を行うと、タンパク質やバクテリアが高温側に集まり、レーザー強度を時間的に変化させることで局在分布も時空間的に操作できることが示された(図 3A および 3B, Appl. Phys. Lett. 2013)。さらに、OpTD 法はバクテリアに比べて複雑な表面をもつアメーバ細胞(細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum*)に対しても、適用可能であることを実証した(図 3C)。細胞形態やメ

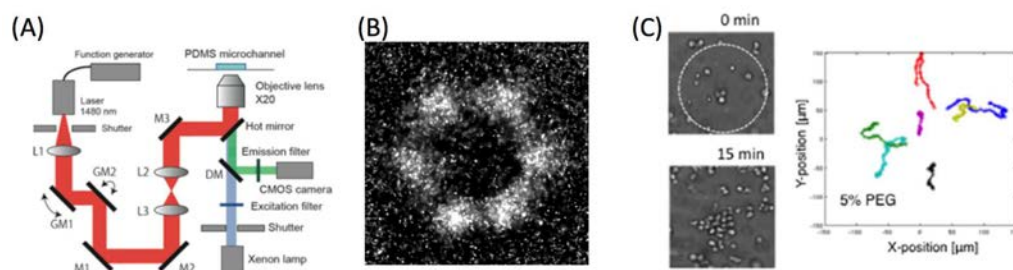


図3. (A) 分子操作の光学系. (B) 開発した光操作によって分布制御された *E. coli* 細胞集団. (C) 細胞性粘菌 *Dictyostelium* 集団の光操作.

カニカルな状態をモニターするバイオセンシングとしても利用できることを示すとともに、本手法が細胞のように複雑な表面をもつ物体に対しても有効であることを示した。

研究テーマ D: 「動的な温度勾配下における流れと秩序」

研究テーマ C を受けて、ヒト培養細胞(HeLa 細胞)を含む真核培養細胞の分布制御を行う技術開発を進めた。しかしながら、これらの培養細胞の光操作では設計と異なる分布を示す事がわかり、その原因究明を行った。その結果、温度勾配・濃度勾配を形成する赤外線レーザーのスキニング速度によっては、分子輸送のみならず溶液の流動化が起こっていることがわかった。本課題の達成目標である「新たな分子操作技術の確立」に向けた大挑戦型の延長課題として、新たに見いだされた流動現象の解析を行った。

実験においては PDMS チャンバーに 5.0% PEG20000 水溶液を封入し、赤外線レーザー(波長 1480nm)を一定速度でスキャンし、動く温度勾配を実現した(図 4A)。その結果、温度勾配が動く方向とは逆向きに溶液の流れが生じること、あるレーザースキャン速度(または周期的な温度刺激の周波数)で流速が最大となる共鳴現象に類似した周波数依存性を示すことがわかった。そして、(1)流れの Stokes 方程式、(2)熱拡散方程式、(3)温度変化による境界の熱膨張の 3つのダイナミクスに基づく理論モデルを導いた。流動をうみだす物理的起源が「温度勾配の波(温度波)の伝搬による熱膨張・粘性変化・熱拡散のクロストーク」にあることを意味している。この現象の利点として、溶液の条件を一切変える事なくレーザースキャン速度の変化だけで「分子濃縮率」と「局在パターン」を制御できる点がある(図 4B)。非平衡系の分子輸送による分子操作をより自在に行う技術基盤の確立につながる成果である。

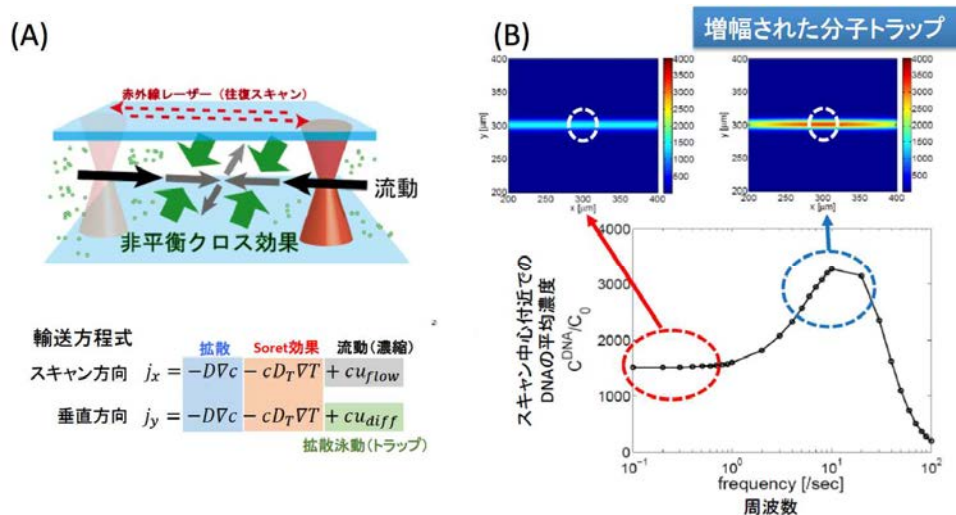


図 4. 動く熱源下で見いだされた新規の輸送・流動現象. (A) 実験結果の概要図. (B) 理論モデルで得られた動く温度勾配による増強された分子トラップ.

3. 今後の展開

自己複製する生命システムの起源と成長は、生命科学の最大の謎の1つである。その解明には単純な分子から複雑なシステムが生じる過程を実験室内で追体験し、普遍的な法則を明らかにする事が不可欠である。本研究で得た成果から、非平衡系の物理学が生命の起源に新たな視点からアプローチする方向を示したといえる。今後は、鑄型依存的な重合反応を進行させるなどして自律的複製をも駆動する物理的プロセスの探求し、物理学と合成生物学を連携させた異分野融合研究を展開することが期待される。

また、テーマAとBで得た知見は、パターン形成が酵素反応を非ランダムにし、質的な変化をもたらすことを示唆している。細胞内部は物質の流入出や生産と分解を繰り返すアクティブな系である。細胞内の非平衡環境で進行する酵素反応は、試験管内の平衡系とは大きく異なるダイナミクスを示すと期待され、システム生物学・合成生物学の反応論を再考する契機となる。

さらに、Opto-thermal diffusiophoresis (OpTD) 法による分子操作は、動く熱源による流動現象の理解を経て、分子操作技術としての原理の理解に到達したと自負している。光で生体分子を直接操る手法は少なく、Scale/CUBIC/Clarity などの透明化技術、Expansion microscopy 最先端イメージングとの融合を通じて”光で見て・光で操る”生命科学に向けた技術を確立してゆきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・ 研究目的の達成状況、延長／増額の目標の達成状況

テーマ A において高分子溶液中に形成された温度勾配下で、DNA や RNA のサイズや構造に依存して選択的な濃縮が起こることを実験的に示した。さらにテーマ B では、この選択的な分子輸送と DNA ライゲーション反応を組み合わせた系で、長く成長した DNA が優先的に合成される非ランダムなライゲーション反応が起こりえることを見出した。これらの結果は、遺伝情報を蓄える高分子の重合率が熱平衡系では指数関数的に減衰してしまう「濃度問題」が、温度勾配下の輸送現象を通じて解消されるコンセプトを提示している。当初目標であった「構造、情報、輸送の動的相関」を明らかにし、生命の起源の謎に挑む物理的プロセスの理解を達成したと評価できる。

またテーマ C として、温度勾配下の輸送現象を利用し、生体分子と細胞を操作する新たな光操作技術の開発を行い、2次元面上でのマニピュレーションを実証した。しかし、複雑で大きなパターンへと細胞密度分布を制御しようと試みたところ、流れが発生するという予想しない結果を得た。この新現象の解明が、本技術を拡張するために不可欠であると考え、大挑戦型延長期間に流動発生メカニズム解明を行った。その理解はテーマ D に示すように、十分達成することができた。今後は技術応用として、生体透明化技術やイメージングと光による分子操作を融合させ、「見て操り、理解する」生命科学の発展に貢献する基盤となることが期待される。

・ 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

採択当時は研究代表者がアメリカにいたため、帰国とともに研究が開始された。研究実施場所に計測の要となる光学系を含む実験室の構築に一年程度を要した。光学系を立ち上げた後に研究補助員2名(うち1名は学生)を含む3名の体制で研究が進められた。さらに分子・細胞操作の技術開発のため、マイクロ流体デバイスの系を新たに取り入れた。大挑戦型で延長が決まった直後、代表者は異動とともに自身のラボを立ち上げた。延長期間では物品の購入を主体とした研究費執行がなされ、DNA 重合反応をqPCR で定量分析する設備を整えた。非平衡物理学を基軸としつつ「光技術」「マイクロ流体デバイス」「分子進化」の3つを揃える世界的にみても独自性が高く、設備も整った研究室を立ち上げる事ができたと評価している。

・ 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究で開発した分子・細胞操作技術は、従来の光ピンセットや磁気ピンセットとは異なりマテリアル依存性が少ない光技術であるという特性がある。さらに、動く熱源の下で溶液の流れを光と熱で誘起するとともに、分子濃度を外液の条件を変えずに操作する事が可能となった。以上の成果より、非平衡系の輸送現象を基軸とする分子技術の基盤を確立した。マイクロ流体デバイスは医学・工学で近年注目を浴びる技術である。流れを光で制御する微小なポンプとして得られた成果を援用する事で、複雑なバルブを必要としないオプ्टフルイディクス^①の創出につながると期待される。

・ 研究課題の「挑戦性」

最後に、極限環境を模倣した実験系を再構成し、物理的アプローチから生命の起源の「濃度問題」の解決を試みた点が最大の挑戦的姿勢である。従来の分子進化説に立脚すれば、濃度問題の解決は自己触媒的な増幅プロセスによって説明されるが、自己触媒反応がなくとも温度勾配と濃度勾配の共存という非平衡環境下で選択的な分子濃縮を通じた物理的プロセスが同等の効果をもたらすことを提唱した。このようなプロセスが実際に生命誕生に寄与したかを示す事は困難であるが、極限環境を再構成し、物理的・数量的な手法で構成的に理解するひとつの道筋を拓いた点は、「大挑戦型」にふさわしい展開であったと考えられる。

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

(研究総括)

温度勾配濃度勾配の共存下で、DNA や RNA が二重らせん構造をもつことで輸送される新たな分子輸送現象を発見した。さらに、動く温度勾配下では、周囲の高分子濃度が一定であっても、温度勾配の動く速度というダイナミクスによって、分子が局在するパターンが変化する特性を発見した。温度勾配下での DNA 分子輸送によって、DNA ライゲーションによる重合が長い分子ほど選択的に進むという特性を見だし、これらのパターンのもとで DNA 重合反応を進めると、長い DNA が選択的に合成されることを示した。このような論証を集めて、「生命の起源を理解する前多理論」を提唱していることは高く評価できる。今後、ブレイクスルーする研究者の一人として、期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Y.T. Maeda, T. Tlusty, A. Libchaber. Effects of long DNA folding and small RNA stem-loop in thermophoresis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2012, vol.109, 17972–17977.
2. Y.T. Maeda. (2+1)-Dimensional manipulation of soft biological materials by opto-thermal diffusiophoresis, *Appl. Phys. Lett.*, 2013, vol. 103, 243704.
3. T. Ohmura, M. Ichikawa, K. Kamei, Y.T. Maeda. Oscillation and collective conveyance of water-in-oil droplets by microfluidic bolus flow, *Appl. Phys. Lett.*, 2015, vol. 107, 074102.
4. T. Fukuyama, A. Fuke, M. Mochizuki, K. Kamei, Y.T. Maeda. Directing and boosting of cell migration by the entropic force gradient in polymer solution, *Langmuir*, 2015, vol. 31, 12567–12572.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際会議・招待講演】

1. Y.T. Maeda and A. Libchaber. Molecular transport of DNA/RNA in thermal and solute gradients: possible sorter for the early life, *Origin of life workshop and Princeton center for theoretical sciences*, 2013 年 1 月 21–24 日, Princeton University, USA
2. Y.T. Maeda. Motion, pattern and collective oscillation in complex biological fluids out of equilibrium, *BioComplex Taiwan 2013: Taiwan International workshop on biological physics and complex systems*, 2013 年 7 月 17–20 日, National Taiwan University, Taiwan.
3. Y.T. Maeda. Opto-thermal approach for studying genetic polymers and cells, *International symposium: Breaking barrier from physics to biology*, 2014 年 6 月 15–17 日, Xian, China.
4. Y.T. Maeda. A physicist's approach to the origin of life: Non-equilibrium entropic force. NIG International Symposium 2016: Quantitative biology, 2016 年 1 月 8–11 日, The University of Tokyo, JAPAN

【受賞】

1. 前多裕介 第 30 回とやま賞理工部門(基礎ゲノム科学)「非平衡系の分子輸送と生命の起源に関する研究」2013 年 5 月 23 日.
2. 前多裕介 日本物理学会 第9回若手奨励賞「温度勾配濃度勾配の共存下での生体高分子の分離現象の発見および制御法の開拓」, 2015 年 3 月 21 日.

【解説・総説】

1. 前多裕介 「微小系の分子輸送: 生命の起源と分子操作」 *生化学*, 2013, vol. 85, 299–303.
2. 前多裕介, 福山達也. 「温度勾配・濃度勾配の共存下での生体高分子の非平衡輸送現

象」日本物理学会誌, 2015, vol. 71, 746-751.

【プレスリリース】

1. 前多裕介「DNA／RNA を分離・濃縮する熱泳動の分子構造依存性を解明」2012 年 10 月 16 日 京都大学プレスリリース

http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121016_1.htm

研究報告書

「細胞分裂周期の *in vitro* 再構成への挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 持田 悟

1. 研究のねらい

生命としての条件のうちの自己複製能について、DNA 複製は既に試験管内(*in vitro*)再構成が基本的なレベルで成功しているため、次の段階である「細胞」の複製を司る細胞分裂周期の構成的理解は現在の重要課題の一つである。本研究では、細胞分裂周期を統制しているタンパク質リン酸化のスイッチ的な変動メカニズム、具体的にはリン酸化酵素と脱リン酸化酵素を制御する機構の統合的解明を目指した。細胞分裂は、単細胞生物では生存環境に合わせた増殖戦略に、多細胞生物では発生・分化や癌など医学的側面において基盤的知見となるため、生命の理解という観点のみならず非常に重要なテーマである。

細胞分裂周期において、DNA 複製などを行う間期と染色体分配のための分裂期はゲノム安定性の観点から時間的に隔てられていなければならない。間期と分裂期の生化学的な差は、数百種あるサイクリン依存性キナーゼ(CDK)基質のリン酸化レベルの違いであり、それが高い時にのみ基質タンパク質の物理化学的性質が変化して核膜崩壊や染色体凝縮といった分裂期のイベントを誘起している。このリン酸化の制御において、リン酸化／脱リン酸化酵素がどのように間期と分裂期をスイッチ的に隔てるか(より具体的には、いかに閾値や履歴効果を生み出すか)を構成的に理解することで、細胞分裂周期の中核的な仕組みの確かな理解を目指した。

研究計画を立てるにあたって、リン酸化酵素に比べて脱リン酸化酵素の解析は一般にかなり遅れていること、CDK 基質に対する脱リン酸化酵素 PP2A^{B55} が CDK によって間接的に活性抑制されることを我々は見出していたことから、以下の4つの研究テーマを設定した。

- A. 簡便なリン酸化検出系の確立
- B. 分裂期キナーゼと対となる脱リン酸化酵素の同定
- C. 間期→分裂期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成
- D. 分裂期→間期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成

2. 研究成果

(1) 概要

本研究において、タンパク質リン酸化をいかに早く、簡便、かつ定量的に測定できるかがプロジェクトの推進にとって最初に解決すべき技術的課題であった。そのため近年発展の著しい光るタンパク質を利用したリン酸化検出光プローブ分子の開発に着手した。細胞内カルシ

ウムプローブとして利用されていたウミシイタケルシフェレースを利用したタンパク質性プローブ分子 (Saito et al., 2012, Nat. comm.) を CDK によるリン酸化で光強度が変化するように改変を加えたところ、リン酸化前後で光強度が2倍に増強するものを取得することができた(図1、最終的には4倍まで向上)。この分子は脱リン酸化されるとリン酸化前の光強度に戻るという可逆性も持ち合わせていた。これによってそれまで約2日かかっていたリン酸化の定量的解析がおよそ30分程度に短縮され、また発光測定器の導入によりデータ取得の自動化が可能となり、時間分解能も飛躍的に上昇したことなど、当初の目論見を上回る検出系が出来上がった。

次に細胞分裂周期の間期→分裂期進行に関わると予想していた CDK、PP2A、および PP2A 抑制経路に関わるタンパク質を精製し、*in vitro* 再構成を試みた(図2)。ここでは CDK 以外の因子の濃度は細胞内と同じ一定濃度とし、CDK のみ徐々に増量させるという通常の細胞の間期で起こっている変化を模倣した。その結果、ある CDK 濃度を超えると急激な基質リン酸化レベルの上昇が観察された。このことからこの再構成系が閾値を創り出せることを直接証明することができた。さらにリン酸化酵素阻害剤スタウロスポリンを用いることで、この再構成系が履歴効果を持つことを示すことにも成功した。

一連の再構成実験において、数理解析を同時に行うことは重要な推進力となる。適切なパラメーター(反応定数や結合/解離定数)が決まればコンピューターシミュレーションにより実験実施前に結果が予測でき、実験計画立案に非常に役立つからである。そこで細胞分裂周期分野における数理解析のスペシャリストであるオックスフォード大(英国)の Bela Novak 博士との共同研究により、すべての実験結果を説明出来るパラメーターセットの取得に成功し、さらに再構成した図2のタンパク質ネットワークが閾値を創り出せることも数理的に証明することができた。

(2) 詳細

テーマ A 「簡便なリン酸化検出実験系の確立」

前出の Saito et al., (2012) で報告されたカルシウムプローブを出発点に、カルシウム検出部位をリン酸化配列とリン酸化ペプチド結合ドメイン(WW)で置換した(図1)。これにより CDK にリン酸化されると発光強度が2倍になるものを取得した。そこからさらにリン酸化配列の長さやアミノ酸配列を変えることにより、発光が4倍となるプローブを取得している。また、元々のプローブは精製条件下で半減期20分程度と、リン酸化動態を解析するには不安定すぎたため、バッファ組成の検討やルシフェレース部分への変異導入により、半減期を約200分に延長することに成功した。このように本テーマでは当初の目的を十分に達成できた。

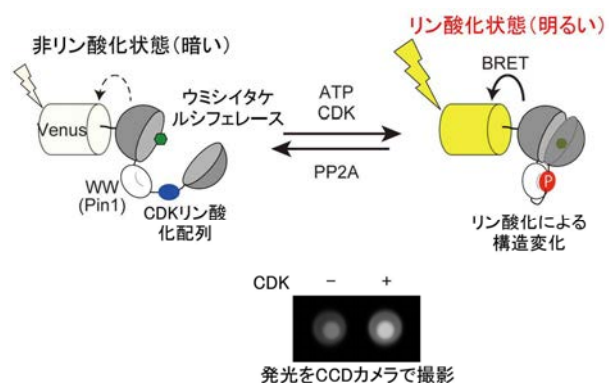


図1、リン酸化検出発光プローブの開発

テーマ B 「分裂期キナーゼと対となる脱リン酸化酵素の同定」

本テーマのためには脱リン酸化酵素の生理的な活性が保たれており、かつ酵素活性の直接測定が可能な実験系が必要である。アフリカツメガエル卵抽出液は抽出の過程で細胞内因子がほぼ希釈されておらず、穏和な抽出方法のおかげで多くの酵素活性が生理的に保たれている。さらに無細胞系であるため上記の要請を全て満たしている。そこでカエルゲノムにあるおよそ40種類(ヒトもほぼ同数)のセリン／スレオニン脱リン酸化酵素(触媒サブユニット)の cDNA クローニング、およびポリクローナル抗体を作成した。今後、卵抽出液からの抗体を用いた特定タンパク質の除去とキナーゼ基質の脱リン酸化活性測定法を併用することで、分裂期のリン酸化酵素と対になる脱リン酸化酵素を同定していく予定である。

テーマ C 「間期→分裂期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成」

間期から分裂期の進行時には、CDK 基質の急激なリン酸化レベルの上昇が見られる。この現象の原因として考えられるのは、(1)CDK の急激な活性化 (2)PP2A の急激な不活性化の2つである。(1)に関しては既にスイッチとして機能することが示されていた。しかし(1)を阻害した条件下でも卵抽出液において急激なリン酸化の上昇が見られたことから、(1)とは独立に、(2)もスイッチである可能性があった。そこで図2の経路にあるタンパク質8種を大腸菌と昆虫細胞を用いて発現／精製し(図3)、それらを試験管内で混合することで閾値現象を再現することに成功した(図4)。さらに双安定性と履歴効果も確認されたことから、わずか8種のタンパク質でスイッチを再構成することに成功したと言える。間期→分裂期進行時には(1)(2)の二つのスイッチが互いに相互作用することでより頑強な仕組みを作り上げていることを論文報告した(論文発表4)。

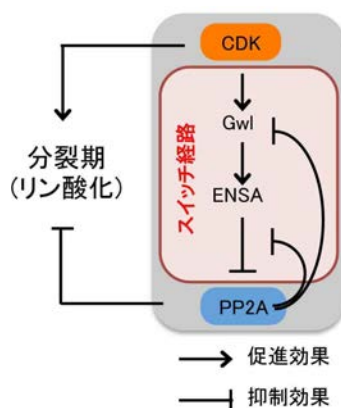


図2、再構成したタンパク質ネットワーク

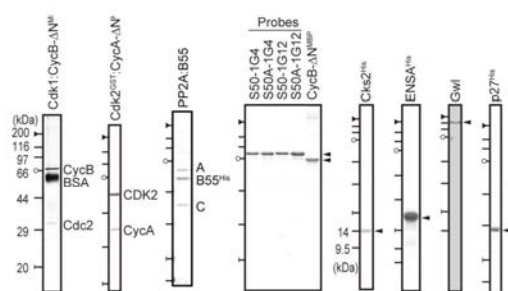


図3、再構成実験に使用した精製タンパク質たち

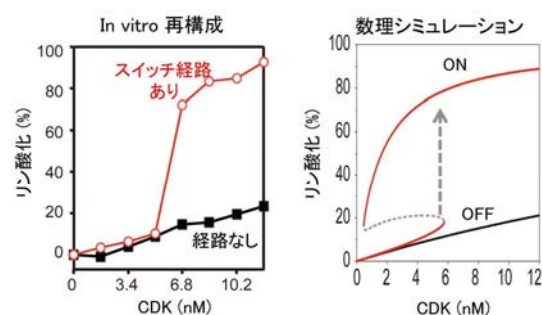


図4、再構成系での閾値(左)と、数理モデリングによる再現(右)

テーマ D 「分裂期→間期進行時のスイッチ機構の生化学的再構成」

分裂期→間期進行は、間期→分裂期進行の単純な逆反応ではなく、(脱)リン酸化反応に加えてタンパク質のポリユビキチン化(APC/cyclosome E3 ligase)とタンパク質分解(proteasome)をリン酸化とリンクさせつつ再構成する必要がある。両者は10以上のサブユニ

ットからなる巨大タンパク質複合体として機能するため独自に組換えタンパク質精製法を確立するのは難しい。幸い後者については市販品があるが、前者については市販品はなく、つい最近になって組換え技術による複合体の精製手法が確立されたばかりである。テーマCにおいて分裂期進行が再構成できたことから、ようやく本テーマに取り組む準備が整ったので今後精力的に推し進めていきたい。

3. 今後の展開

再構成したスイッチが示した不可逆的な性質は細胞内現象との齟齬であり、まだ未同定の因子があることを再構成系が示してくれていたということである(幸か不幸かこの因子は2015年にドイツのグループによって報告された)。今後もさらに細胞分裂周期の再構成を進めることにより推定を含まない確かな理解を積み上げるとともに、遺伝学等では探しかけていない重要因子の同定も行っていきたい。長期的には他分野における重要なスイッチなどの非線形現象の再構成的理解に挑戦したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は細胞分裂周期の再構成という目標を掲げて開始した。海外からの帰国後、独立ラボの立ち上げにあたり大型機器の購入や実験補助員の雇用が可能となり、また領域メンバーとの出会いからも刺激を受けることができた。期間前半はリン酸化検出系の確立(プローブ開発と精製系の改良)に費やし、予想以上の便利な系を作り上げることができた。期間後半ではテーマCでのスイッチ再構成に成功し、当該分野にとって画期的な技術的／概念的進展をもたらせたと考えている。テーマB、Dについてはまだ新規知見は得られていないが、抗体シリーズ作成と再構成系の確立により準備は着実に進んでいる。

本成果は細胞分裂周期分野にとどまらず、広範な生命現象の二者択一的な局面での意思決定メカニズムの解明にも寄与すると考えている。また *in vitro* でスイッチを再構成できた先例として、これまで変異体や数理モデルでの理解にとどまっていた多くの現象に対して、推定なしに実証しようという試みが生まれるきっかけになると期待できる。

(2) 研究総括評価

(研究総括)

細胞分裂周期の再構成という挑戦的な課題に対して着実に成果を出している。再構成系のCDK基質のリン酸化を定量的、かつリアルタイムに検出できる光プローブの開発と改良を行い、リン酸化によって3倍に光量が増加するという実用的なプローブを完成させた。さらに *in vitro* 系での発光量を安定させるためバッファー系の改良を行い、半減期を約10分から200分以上に延長させ、間期→分裂期に見られる急激なCDK基質のリン酸化レベルの上昇を精製タンパク質だけで部分的に再構成することに成功したことは、高く評価したい。本成果は、永井 健治 アドバイザーとの共著で、論文、Current Biology, (2016)として、着実に結実した。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mochida S., “Regulation of alpha-Endosulfine, an inhibitor of protein phosphatase 2A (PP2A), by multisite phosphorylation” *FEBS J.*, (2014) 281(4), 1159–1169.
2. Okumura E., Morita A., Wakai M., Mochida S., Hara M. and Kishimoto T. “Cyclin B-Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a Greatwall kinase-independent mechanism.” *J. Cell Biol.*, (2014) 204(6), 881–889.
3. Hino H., Tanaki K., Mochida S. “Inhibitor-1 and -2 of PP2A have preference between PP2A complexes” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015) 467(2), 297–302.
4. Mochida S.*, Rata S., Hino H., Nagai T. and Novak B. * (*共責) “Two bistable switches govern M phase entry” *Current Biology*, (2016) in press (doi 10.1016/j.cub.2016.10.022)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Mochida S., “Regulation of alpha-endosulfine, an inhibitor of PP2A-B55, by multisite phosphorylation” The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, 2013 年 11 月 於: National Health Research Institutes, Taiwan(招待講演)
2. Mochida S., “Toward Reconstitution of the Cell Cycle by Balancing CDK and PP2A” 細胞を創る研究会 7.0 Japanese Society for Cell Synthesis Research 7.0, 2014 年 11 月 13–14 日 於: 東京大学 弥生キャンパス(招待講演)
3. Mochida S., Takaki K. and Nagai T., “CDK, PP2A And CDK-dependent PP2A-inhibitory pathway Can Make A Switch-like Response of Mitotic Phosphorylation” EMBO Workshop: Cell Cycle 2015 年 9 月 4–7 日 於: Danubius Health Spa Resort, Budapest、ハンガリー
4. 持田 悟、Scott Rata、日野浩嗣、永井健治、Bela Novak “細胞周期の *in vitro* 再構成” 日本遺伝学会 第 88 回大会、2016 年 9 月 7–9 日 於: 日本大学国際関係学部 三島駅北口校舎(招待講演)

著作(総説論文)

1. Mochida S. and Hunt T. “Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis” *EMBO Rep.* (2012) 13(3), 197–203.
2. Mochida S. “Aurora borealis wraps Plk1 and CDK together” *Cell Cycle*, (2014) 13(12), 1835.
3. Mochida S. “PP1 inactivates Greatwall to release PP2A-B55 from mitotic confinement” *EMBO reports* (2015) 16(11), 1411–1412.

新聞報道

1. 熊本日日新聞 “細胞分裂「スイッチ」作成” 2016 年 11 月 24 日

研究報告書

「高次脳機能情報処理の再構成に向けた恐怖記憶の読み取りと操作」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 揚妻正和

1. 研究のねらい

大脳皮質は、知覚、随意運動、思考、記憶など、様々な脳の高次機能を担っており、これまでに広く研究の対象とされてきた。脳機能とそれに伴う情報処理機構を理解する上で、そこで働く遺伝子を理解しただけでは不十分であり、個々の細胞レベルでの理解に加え、神経「群」としてのレベルで理解することが必要である。本研究では、光学的アプローチによる神経群活動の「観察」・「制御」を行い、大脳皮質に保存された恐怖記憶を、強制的に読み出す、すなわち人工的に恐怖反応を「再構築」する。そこから大脳皮質による高次脳機能達成における「最小構成単位」を導き出し、集積回路としての大脳皮質神経回路網の仕組みについて、新たな理解と提案を行う。これにより、大脳皮質情報処理機構に関する研究分野全体の加速を促し、脳機能の再構成と理解をすすめる。また、恐怖やストレスに関する研究という点で医療への応用にもつなげていく。

2. 研究成果

(1) 概要

本課題遂行に際し、さまざまな光学系の開発・改良を進め、より高精度な観察・操作が可能となった。新たな顕微鏡、センサーの導入により、従来よりも高時間分解能なイメージングが可能となった。加えて、対物レンズを介した光遺伝学的制御システムの構築により、安定的・定量的な神経活動操作が可能となった。

また恐怖記憶を評価するために、頭部固定による2光子顕微鏡下での擬似自由行動を可能とし、さらには行動観察のシステムを進めた。遺伝子コード型のセンサーを用いることで、同一の神経細胞からの長期的な観察が可能である。これにより、従来の電気生理学的手法では困難だった時間経過を追った詳細な観察による「記憶の成立過程」および「時空間的な記憶の形の変遷」の同定が可能となった。

得られたデータの解釈に関しても様々な技術の導入を進め、局所回路内における多数の神経細胞がどのように集団として活動するかについて新たな知見を得ることが出来た。新たな共同研究を介して、情報論的な解析手法、さらには機械学習による神経活動の読み取り技術の導入も可能となった。

(2) 詳細

本研究では、以下の目標を設定し、研究を進めてきた。モデル動物であるマウスを用いて、

(A) 光イメージング技術による複数の神経からの同時活動記録と、(B) 光遺伝学的な活動制御法による抑制性神経の役割の検証を通じ、恐怖記憶制御における「最小構成単位」を導き出す。そして、(C) それに基づいた神経活動パターンの再現を行い、動物行動を再構築する。

研究テーマ A 「*in vivo* 光神経活動イメージングによる複数の神経細胞からの活動記録」

＜A-1＞ 二光子レーザー顕微鏡による神経活動イメージング

本研究では、最新の深部イメージング技術を利用することで、二光子レーザー顕微鏡による内側前頭前皮質からの *in vivo* 神経活動イメージングを行った。レゾナントスキャナー搭載型の顕微鏡の導入により、高速な計測を実現した。さらに、低倍率・高 NA の対物レンズの導入により、広視野からの観察とそれによるより多くの神経細胞からの同時観察を可能とした。神経活動の観察には、それに伴ってカルシウム濃度が上昇することを利用し、カルシウム濃度依存的に蛍光強度の変化を示すタンパク質プローブを用いた。その発現には、アデノ随伴ウイルスを利用した手法により、観察部位にのみ特異的な発現を可能とした。

＜A-2＞ マウス恐怖条件付けと、それに伴った神経活動の記録

内側前頭前皮質において、学習依存的な恐怖反応に伴った神経活動の観察を行った。実際の観察においては、頭部を顕微鏡対物レンズの下に固定し、非麻酔下のマウスにおける、学習に伴った神経活動パターンの変化を観察した。遺伝子コード型のセンサーを用いることで、同一の神経細胞からの長期的な観察が可能である。これにより、従来の電気生理学的手法では困難だった時間経過を追った詳細な観察による「記憶の成立過程」および「時空間的な記憶の形の変遷」の同定が可能となった。その結果、条件刺激により誘発される神経群の活動性・情報処理様式について様々な興味深い変化が観察された。現在はそれらの結果をまとめるべく、サンプル数を揃えたと共に、より詳細な解析を進めている。

研究テーマ B 「光遺伝学的手法による抑制性神経の役割の評価」

上記神経活動の観察と過去の知見より、学習における抑制性神経の役割を推察し、光遺伝学的操作によってその役割を検証することを目指す。抑制性神経は、パルブアルブミン (PV) 陽性神経やソマトスタチン (SOM) 陽性神経など、異なる分子マーカーによってサブタイプごとに分類され、それぞれ異なる生理学的性質や、投射先を持つ。そこで、すでに広く用いられている PV-Cre 系統とよばれるトランスジェニックマウスと、lox 配列によってはさまれた逆向きの ArchT 配列を持つアデノ随伴ウイルスを入手し、部位とサブタイプの両方に特異的な ArchT の発現を可能とした。二光子励起によって神経活動イメージングを行いながら、同時に LED による抑制性神経の活動抑制をすることで、サブタイプごとの役割を調べる系を確立した。光刺激に際しては、2 光子顕微鏡の対物レンズを介した光刺激の光学系の開発を行うことで、より安定的・定量的な神経活動操作が可能となった。その結果に関するデータは、現在解析中である。

研究テーマ C 「SLM による神経群活動パターンの再構築と、それによる恐怖記憶の読み出し」

上述の実験で得られた情報を元に、光学的技術による単一神経レベルの解像度での複数の神経同時活性化(活動パターンの再現)を実現し、脳からの記憶の「読み出し」、すなわちマウス個体で人工的に恐怖反応を生み出させることを目標とし準備を進めてきた。一方、研究テーマ A において、神経活動は非常に多彩な変化を遂げることが観察され、記憶の読み出し

を進める前に、どのような神経活動の再現が行動の再構成に必要であるかを十分に絞ることが重要であることが示された。そこで現在は、情報論的な方法を導入することで、その多彩な変化の中から記憶をコードするために重要な要素の選別を進めている。そして今後それを明らかにした後、光遺伝学と SLM(spatial light modulator)と呼ばれるシステムによる任意に選択した神経のみの活性化、あるいは光を全体に照射しながらの非特異的な活性化を行い、神経活動パターンの再現を進めていく。

3. 今後の展開

前述の結果に関しては早急に論文にまとめて行く計画である。一方で、イメージングによって予想していた以上に非常に多くの仮設が提示される結果となり、多くの重要な知見が得られつつある半面、再構成系によってこれらの仮説を検証する前に、さらに洗練した情報論的な解析を推進して行くことが必須であることが明らかとなった。あらたな解析手法の確立とそこから導き出される結果をもとに、今後は光遺伝学的神経活動操作による仮説の検証へとつなげて行く。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

実験に関しては概ね計画通りに進んだと考えている。本研究課題の実施に当たり、システムの購入・構築から細かい実験器具の準備にいたるまですべて新規に開始したため、なかなか思い通りに行かないこともあった。三年という限られた期間の中でのプレッシャーはしかしながら、結果として研究全体としては促進の方向につながったと捉えている。例えば、新たなプログラミング言語を比較的短期間で習得せざるを得なかったこと、必要かつ未開発のものは自力で創作するしかない状況、一人という限られた労働力の中で必要なものに焦点を絞った研究計画を立てる必要があったなど、これからの研究生活を考えた上で考えさせられることも多く、非常に貴重な経験となった。今後、既存の技術や概念にとらわれることなく、必要であれば精力的に新規システムを構築して行くことにもつながると考えている。そしてまた、その成果を示すためにも、できるだけ早く論文化することが必須だと考えている。

また、イメージングによって、予想していた以上に非常に多くの仮設が提示される結果となった。多くの重要な知見が得られつつある半面、生命現象の理解という観点で考えると、再構成系によってこれら仮説をやみくもに検証するのではなく、さらに洗練した情報論的な解析を推進し、そこから論理的に絞られた仮説を検証することが必須である。今後はこの「情報論的な解析からの仮説絞込みと、そこからの仮説依存的構成的アプローチ」の流れを確立することで、他の脳研究を含む広い研究分野へのまさに「さきがけ」となるような潮流を生み出していきたい。

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

(研究総括)

レゾナンスキャナー搭載型の顕微鏡の導入により、高速な計測を実現し、低倍率・高NAの対物レンズの導入により、広視野からの観察とそれによるより多くの神経細胞からの同時観察に

成功した。また、遺伝子コード型のセンサーを用いることで、同一の神経細胞からの長期的な観察が可能となり、従来の電気生理学的手法では困難だった時間経過を追った詳細な観察による「記憶の成立過程」および「時空間的な記憶の形の変遷」の同定を可能にした。このような成果から、条件刺激により誘発される神経群の活動性・情報処理様式について様々な興味深い変化の観察ができるようにしたことは、高く評価できる。恐怖だけではなく様々な高次脳機能へとアプローチするチャンスが拡大したことは大きな成果である。なお、さががけ個人研究を文字通り一人で取り組み、着実に進めたことを特記しておきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Karnani M., Agetsuma M., Yuste R.: A Blanket of Inhibition: Functional Inferences from Dense Inhibitory Connectivity. *Current Opinion in Neurobiology* (2014) 26, 96-102 (表紙に選出)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著作物

1. 揚妻正和: オプトジェネティクスー高次脳機能情報処理機構の理解へ向けて 「生体の科学(特集「生命動態システム科学」)」,Vol.65 No.5 p518-519(2014)

学会発表

1. Society for Neuroscience annual meeting 2016(2016)
2. 生理学研究所 研究会「生体多元シグナルダイナミクスの計測と操作」(2016)
3. 第 39 回日本神経科学大会(2016)
4. Cold Spring Harbor Laboratory meeting “Neural Circuit 2016”(2016)
5. バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ 2015(2015)
6. 第 37 回日本神経科学学会(2014)
7. 79th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology –Cognition (2014)
8. Society for Neuroscience annual meeting 2013(2013)

研究報告書

「生物時計中枢における細胞ネットワークの計測・制御と再構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 榎木 亮介

1. 研究のねらい

「生物時計」は、生命が地球の24時間の環境変化に適応する為、進化の過程で獲得した能力であり、生命は様々な形で自身の生物時計を巧みに利用して、己の生存戦略を有利にしている。我々ほ乳類の生物時計(概日リズム)の中枢は、脳深部の視床下部にある視交叉上核に存在する。視交叉上核は、多様な性質を持つ神経細胞やグリア細胞が相互連絡し、ネットワーク内に複数の領域振動体を形成し、さらに領域振動体同士が連絡しあう、「階層的」かつ「多振動体」構造をもつ細胞ネットワークを構築する。個々の神経細胞を分散培養して細胞連絡を疎にすると細胞レベルの概日リズムの周期や振幅は多様でばらつくが、細胞ネットワークを形成すると組織全体としては24時間に正確で強靱な概日リズムを刻むが、生理現象の背後にあるメカニズムについての多くは不明である。

本研究では、光イメージング計測を基盤として、生物時計中枢として特徴的な機能「自律振動性」や「光同調性」といった性質が、視交叉上核の細胞ネットワークでどのように達成されているかを解明する目的で研究を行った。特に高解像度の長期間の光イメージング計測により、神経細胞の時計遺伝子の発現リズムや、細胞内カルシウム濃度、膜電位変動といった神経細胞の複数機能を同時に可視化することを試みた。特に、細胞内における時計遺伝子の発現から中間分子であるカルシウム、膜電位や神経発射活動などの細胞出力応答を同時に可視化することで、その関連性を解析した。さらに光遺伝学による細胞機能を時空間的に自在に操作することや、微細加工技術などを駆使して、細胞ネットワーク機能を構成的に理解することを目指して研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

これまでの高解像度の長期光イメージング計測により、神経細胞ネットワークレベルでの概日カルシウムリズムを報告している(Enoki et al., PNAS, 2012)。本研究では、複数の細胞機能(時計遺伝子発現・神経発射活動・細胞内カルシウム濃度)を、同組織の同部位から同時計測する手法を確立し、概日カルシウムリズムが時計遺伝子と細胞間カップリングの2つの機構により制御されることを見出した。また、神経細胞の膜電位変動を光イメージングにより直接捉えることで、空間特異的な概日カルシウムリズムの位相パターンとは異なる、神経細胞ネットワーク全体で同期する「概日膜電位リズム」を見出し、細胞種により細胞機能の位相関係が異なることを発見した。また、さがけ領域の班会議や自主研究会で得た微細加工技術の知識を概日リズム研究に応用し、マイクロパターン基盤上に視交叉上核の神経細胞を分散培養することで、細胞ネットワークやグリア細胞の影響を排除した「真の 1 神経細胞」から、概日カルシウムリズムを計測することに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「視交叉上核の神経細胞ネットワークの多機能計測」

時計遺伝子 *Period2* (PER2) の発光レポーターマウス (PER2::LUC) と交配した正常マウス、及び時計遺伝子 *Cryptochrome*^{1/2} 二重欠損マウス (以下 Cry-dKO) より視交叉上核培養スライスを作成し、アデノ随伴ウイルスを用いて高感度カルシウムセンサー (GCaMP6s) を発現させ、多電極ディッシュアレイ (MED) 上に培養して、視交叉上核の細胞ネットワークの同領域から時計遺伝子発現/カルシウム濃度変化/神経発射頻度変化を同時計測した (図1)。

各リズムパラメーター、位相関係、空間パターンを詳細に解析した。正常マウスの視交叉上核では、カルシウム→神経発射活動→時計遺伝子発現のリズム位相順が観察された。一方、視交叉上核の神経間連絡が減弱する

Cry-dKO の視交叉上核では、各リズムの振幅が減弱し、野生型と比較して PER2-カルシウム間の位相関係が有意に短縮していることを見出した。またリズムの空間パターンを野生型と Cry-dKO 動物間で比較したところ、Cry-dKO では視交叉上核の背側領域でカルシウムリズムが著しく減弱し、腹側領域では PER2-カルシウム間の位相関係が顕著に短縮していた。

これらの結果を総合的に解釈することで、カルシウムリズムは「時計遺伝子」と「細胞間連絡」による二重の制御機構により調節されることを示した。本研究の結果は、原著論文の投稿を完了し、現在審査中である。

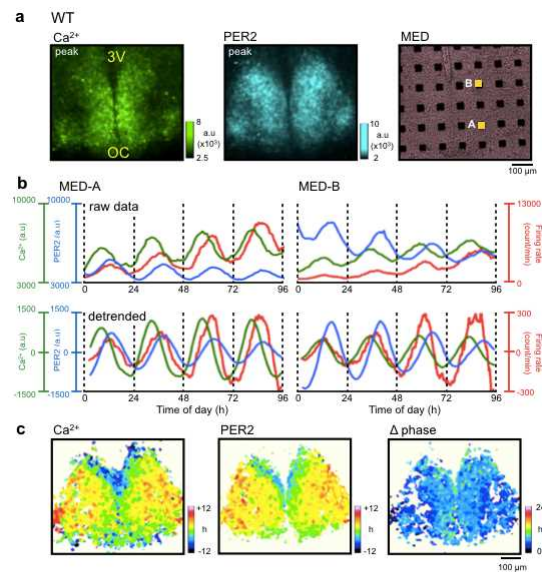


図1: 正常マウスにおける3機能同時計測

(a). カルシウム (左)、時計遺伝子PER2 (中央)、多電極アレイ (右).
(b). 3機能リズムの同時計測.
(c). 頂点位相マップ (左、中央) と位相差マップ (右)

Enoki R, Ono D, Kuroda S, Honma S, Honma KI. Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. under 2nd round of review.

研究テーマ B 「概日膜電位リズムの可視化解析」

培養視交叉上核スライスの神経細胞特異的に、アデノ随伴ウイルスを用いて遺伝子コード型の膜電位感受性蛍光プローブ (ArcLightD) を発現させ、長期蛍光タイムラプスシステムにより長期計測を行ったところ、視交叉上核の神経細胞ネットワーク全体でリズム位相が同期する膜電位の概日リズムを見出した。赤色カルシウムセンサー (R-GECO) を用いてカルシウムリズムと膜電位リズムの同時計測を行ったところ、概日カルシウムリズムは以前の報告の通り視交叉上核の背側-腹側領域で特徴的な位相空間パターンを示したが、膜電位リズムは視交叉上核全体で同位相だった (図2)。

さらに細胞種特異的に ArcLightD を発現させ、VIP 細胞と AVP 細胞特異的に膜電位リズムを計測した所、細胞種別に膜電位リズムとカルシウムリズムの位相関係が異なることを見出し

た。さらに、多電極アレイディッシュを用いた神経発射リズム計測と、光計測による膜電位リズムの同時測定により、神経発射リズムも視交叉上核ネットワークで同期することと、生後発達に伴い膜電位リズムの同期が強くなることが分かった。これらの結果をまとめた原著論文を投稿し現在審査中である。

Enoki R, Oda Y, Mieda M, Ono D, Honma S, Honma KI. Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. under 2nd round of review.

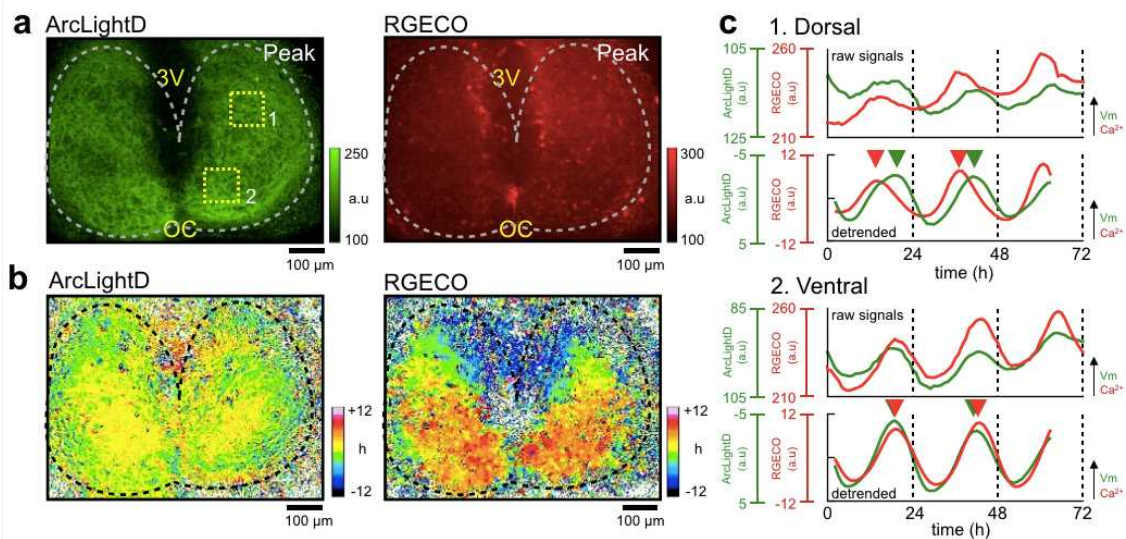


図2: 膜電位リズムとカルシウムリズムの同時計測

(a). 膜電位プローブと(左)カルシウムプローブ(右)の発現. (b). 頂点位相マップ.
(c)カルシウム(赤)と膜電位(緑)の概日リズム

研究テーマ C 「微細加工技術による単一神経細胞の概日カルシウムリズム計測」

細胞間連絡がない1神経細胞で自律的な概日リズムが観察できるか検証する為、微細加工技術を利用して細胞培養区画(ウェル)サイズの異なる様々なマイクロパターン基盤を作成し、視交叉上核から神経細胞およびグリア細胞を採取して分散培養を行った。アデノ随伴ウイルスによる感染発現によりカルシウムプローブ(GCaMP6s)を発現させ長期タイムラプス観察を行ったところ、細胞間の直接連絡のない、かつグリア細胞も存在しない1神経細胞のみからカルシウムリズムを観察することに成功した(図3)。

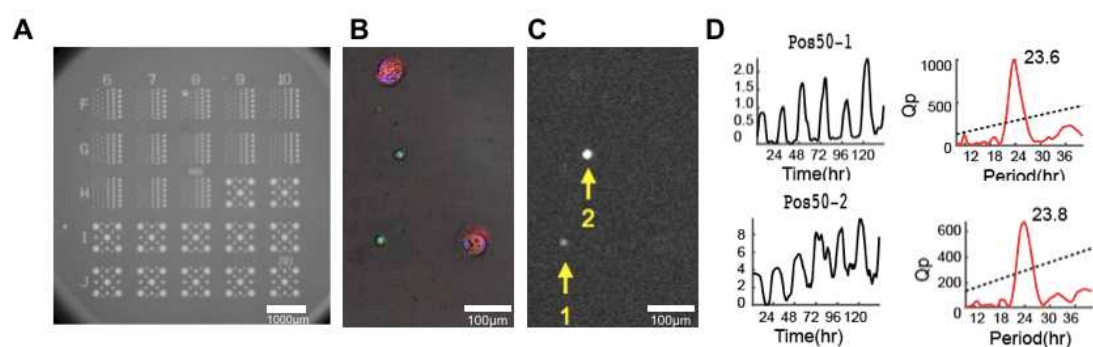


図3. マイクロパターン基盤を用いた単一神経細胞からの概日カルシウムリズムの計測

(A) マイクロパターン基盤. (B) 単一神経細胞の培養. 緑: 神経細胞、赤: グリア細胞、青: 細胞核
(C) カルシウム蛍光シグナル. (D) 概日カルシウムリズムの計測

3. 今後の展開

本研究課題により、光イメージング計測を駆使して生物時計中枢の細胞ネットワーク機能の自律振動メカニズムの本質に関わる発見をすることができた。一方で外界環境に適応する光同調メカニズムや、動物個体レベルでの機能については本研究でまだ明らかにすることが出来ておらず、継続課題である。一方、本研究を通じて今後の研究のシーズとなる新規の実験系を確立することや、新しい生命現象を見つけており、一つ一つの研究のシーズを育てて行きたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究により、これまでの生物時計の光イメージング計測を複数機能の同時計測に拡張し、新規プローブにより膜電位リズムを発見することが出来た。生物時計研究では世界でトップレベルの光イメージング計測の研究技術を確立し、独自の研究スタイルを築くことができたと自負している。また研究費サポートによりに研究に必須の顕微鏡タイムラプスシステムを構築することができ、また共同研究を通じて異なる分野との融合研究が進み、次世代の人材も育っており、今後の研究の大きな資産となってゆくと思われる。

一方で、当初掲げた目標である細胞操作やビボ計測などは計画通りには進んでおらず、まだ目標を達成できていない。これらは今後の継続課題であるが、当初計画では予想していなかった工学との融合研究などにより、今後の研究のシーズとなる新規の実験系を確立することや、新しい生命現象を見つけることが出来たことは大きな収穫である。これはさきがけでのサポート期間中に挑戦的な実験を行うことができたことが大きい。またこれらの研究のシーズはさきがけ会議や同期生との自主研究会での交流から生まれている。このさきがけ領域で、異なる分野の研究者が密に交流することで新しい研究が生まれることを実感した。今後もこのシーズを一つ一つ育てて行きたい。

最後に、3 度の書類と面接審査を通じて、実験計画の立て方、申請書の書き方、プレゼンテーション技術、質疑応答対応など、研究者として生きてゆくのに必要な力をつけることができ、

加えて今後 10 年単位の長期的な視点をもつ大切さも学ぶことができたことも大きな収穫であった。

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

(研究総括)

視交叉上核の神経細胞に細胞種選択的に様々な遺伝子コード型機能プローブを発現させて、長期間光計測することで、細胞ネットワークレベルで、細胞内カルシウム濃度、膜電位、神経発射活動などの概日リズムを同時計測することに成功した。一連の実験により、概日カルシウムリズム、時計遺伝子発現と細胞間連絡の2つの機構により制御されること、また細胞ネットワーク全体で同期する概日膜電位リズムの存在を見出したことを高く評価したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Brancaccio M, Enoki R, Mazuski CN, Jones J, Evans JA, Azzi A. Network-mediated encoding of circadian time: the suprachiasmatic nucleus (SCN) from genes to neurons to circuits, and back. J Neurosci. 2014;34(46):15192-9.
2. Yoshikawa T, Nakajima Y, Yamada Y, Enoki R, Watanabe K, Yamazaki M, Sakimura K, Honma S, Honma KI. Spatiotemporal profiles of arginine vasopressin transcription in cultured suprachiasmatic nucleus. European Journal of Neuroscience. 2015;42(9):2678-89.

(2) 特許出願

特になし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 第 15 回 日本生理学会奨励賞(2013.3)
2. 環境生理学 久野寧賞(2013.3)
3. Enoki R, Honma S, Honma KI. Imaging Circadian Calcium Rhythm in the Suprachiasmatic Nucleus. Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN, Hokkaido University Press, 2014; 37-49.
4. 榎木亮介. 動物の生物時計～視交叉上核を中心として～. 生体の科学(生命動態システム科学)2014; 65(5): 432-433.

研究報告書

「デグロン変異細胞創出のための基盤技術開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 鐘巻 将人

1. 研究のねらい

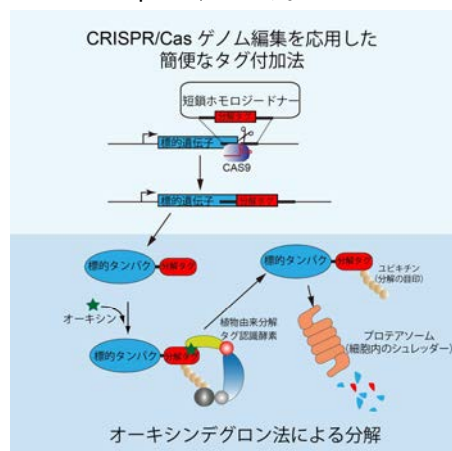
細胞内においてタンパク質の発現量を人為的にコントロールすることは、細胞内機能を設計する際に有用である。その際に利用する発現コントロール技術には、迅速性があり、可逆性と調節性があれば理想的である。私は植物のオーキシン依存的分解系を、出芽酵母に移植することにより、標的タンパク質の半減期をオーキシン添加によりコントロールする、オーキシンデグロン法 (AID 法) を発明した。この技術は、まさに上記 3 つのクライテリアを満たす新規発現コントロール法である。

AID 法は当初から動物培養細胞でも機能することがわかっており、ヒト細胞への応用が期待されていた。そこで、本研究において実際に内在性タンパク質を自由に発現調節できるヒト細胞を創出することを目指した。また、AID 法を進化させるための周辺技術も合わせて開発し、AID 法を中心としたヒト培養細胞における技術革新を目指した。さらには、ヒト培養細胞における発現制御だけでなく、将来 AID 法を ES 細胞やマウス個体レベルに応用することも視野に入れ研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒト細胞内において内在性因子を AID 法によりコントロールするにあたり、植物由来デグロンタグを付加する必要がある。そこで、近年利用が進んでいる CRISPR-Cas ゲノム編集を利用することにより、簡便に両アリルにデグロンタグを付加する技術を開発した (特許出願)。また、実際にヒト HCT116 細胞を材料として、複数の細胞増殖に必要な因子にデグロンタグを付加することにより、デグロン変異細胞を作することに成功した。これら成果を 2016 年 4 月に論文として公表した (Natsume et al. Cell Reports, 2016)。



(2) 詳細

研究テーマ A 「AID 変異細胞創出のための技術開発」【特許出願、論文公表】

ヒト培養細胞において、CRISPR-Cas を利用したタグ付加条件を検証したところ、従来用いられていた 1kbp 程度のホモロジーアームを用いず、150bp 程度の短鎖ホモロジーアームを用いてもタグ付加が可能であることが明らかになった。そのため、ホモロジーアーム部分をゲノムからのクローニングではなく、遺伝子合成などにより人工合成可能になった。また、タグ付加に利用するドナー DNA に二つの異なるセレクションマーカーを持たせ、ダブルセレクションすることにより両アリルに効率良くタグ導入が可能であることが明らかになった。開発した技術はデグロンタグ付加のみならず、蛍光タンパク質やアフィニティータグなどのタグ導入にも有効である。様々なタグに対応したドナー DNA 作成用プラスミドを作り、Addgene および NBRP に全て寄託した。2016 年 4 月から 11 月までの約半年で、すでに 400 件以上のリクエストを受けている。

ヒト AID 細胞を作るにあたり、ヒト HCT116 を材料に植物由来ユビキチンリガーゼを構成する OsTIR1 を発現する細胞を発現する親細胞樹立を行った。その親細胞を材料として、上記方法でデグロンタグ導入を行った。細胞核タンパク質コヒーシスを構成する RAD21 や細胞質ダイニンを構成する DHC1 に対する AID 変異細胞を作成し、オーキシン添加に伴いそれらタンパク質の分解除去を確認し、機能不全による表現系観察を行った。これら一連の研究により、細胞核および細胞質タンパク質両方において AID 変異細胞を作成することが示された。配布のため親細胞は NBRP に寄託した(2016 年 12 月配布開始予定)。

研究テーマ B 「AID 法の改良と新デグロン技術開発」

これまでオーキシンとしては、天然オーキシン IAA(インドール酢酸)および合成オーキシン NAA(ナフタレン酢酸)を利用してきた。これらのリガンドは化学修飾が可能であり、安定性、細胞毒性、膜透過性、光制御などに対する改良が可能である。アセトメチル化による膜透過性と低濃度における強い作用を確認した。

新デグロンとして植物ホルモンジャスモン酸イソロイシンによる分解系を利用した新たな分解システムの開発を行った。必要なユビキチンリガーゼ COI1 やデグロン JAZ1 を利用して、AID 法と同様のセットアップにより、酵母およびヒト培養細胞においてシステムの構築を行ったが、これまでのところ分解系の作成には成功していない。

3. 今後の展開

さがけ期間による一連の研究により、出芽酵母で確立していた AID 法をヒト HCT116 細胞に移植することに成功した。現在、OsTIR1 を導入した親細胞を複数のヒト細胞株で樹立することを進めており、近い将来様々なヒト培養細胞で本技術が利用可能になることが期待される。また、培養細胞株のみならず、iPS 細胞や ES 細胞といった幹細胞への応用が可能である。これら幹細胞で AID 技術が利用できる環境を整えることにより、細胞分化における迅速なタンパク質発現制御が可能になるであろう。さらには、マウス個体レベルでの応用も期待されるが、そのためにはオーキシンの投与方法確立や毒性低減など、薬理的な視点からの技術開発が重要になるであろう。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究テーマAに関しては、当初の目標であるヒトAID変異細胞を実際に作成することに成功し、基本技術を完成させることができた。作成した材料は全て論文公表に伴い、バイオリソースに寄託しているため、ヒト培養細胞における利用が急速に進むと期待している。AID技術に関しては、最初の出芽酵母を用いた開発から、ヒト細胞への利用まで全て論文として公表することができたため、本技術に関しては原理開発者として貢献することができた。今後はAID技術が世界的に認知されることを期待している。

研究テーマBの、オーキシナンalogの利用に関しては現在進行形であり、これらアナログの利用により、AID技術をより汎用性の高い技術へと改良したいと思っている。ジャスモン酸イソロイシン分解系に関しては、二匹目のドジョウを狙いに行ったが、残念ながらうまくいかず、そうしている間にアメリカのグループが同様のアイデアを成功させて論文報告した。この点は競争に勝てなかったところを残念に思っている。

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

(研究総括)

ヒトHCT116細胞を材料として、内在性遺伝子に対する効率的なデグロンタグ付加技術を開発し、デグロン変異細胞作出に成功した。実際に1.5ヶ月で変異細胞を作成できるようになった成果は大きい。そして、共同研究など多くの使用例が増えて、このシステムの有効性・独自性が認められるようになったことは大きな成果である。その成果をすでに論文にして、公表し、着実に実績としていることも評価できる。オーキシナンalogを開発する上で、新たに光制御が可能なケージドオーキシシンを用いる光操作も興味深く、その成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. Cell Reports, 15, 210-218 (2016)
2. Devrekanli A, Kanemaki MT. Conditional Budding Yeast Mutants with Temperature-Sensitive and Auxin-Inducible Degrons for Screening of Suppressor Genes. Methods in Molecular Biology, 1369, 257-278 (2016)
3. Nishimura K, Kanemaki MT. Rapid Depletion of Budding Yeast Proteins via the Fusion of an Auxin-Inducible Degron (AID). Current Protocols in Cell Biology, 64, 20.9.1-20.9.16 (2014)
4. Kanemaki MT. Frontiers of Protein Expression Control with Conditional Degrons. Pflugers Archive - European Journal of Physiology, 465, 419-425 (2013)

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 鐘巻将人、夏目豊彰

発 明 の 名 称: 動物細胞ゲノム部位特異的外来 DNA 挿入方法

出 願 人: 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構

出 願 日: 2015/8/20

出 願 番 号: 特願 2015-162612

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 鐘巻将人 「短鎖ホモロジードナーを利用したオーキシンドグロンタグ付加による迅速なヒト細胞中のタンパク質除去」、第一回日本ゲノム編集学会 (広島)、2016 年 9 月 7 日
2. 鐘巻将人 「ヒト細胞における染色体機能を理解するためのオーキシンドグロン (AID) 法」、日本細胞生物学会 染色体諸機能の連携と機能統合体としての理解 (京都) 、2016 年 6 月 15 日
3. 鐘巻将人 「Auxin-inducible degron (AID) technology in human cells.」第 33 回染色体ワークショップ、第 14 回核ダイナミクス研究会 (焼津)、2016 年 1 月 12 日
4. 鐘巻将人 「A short-homology-mediated tagging method for generation of human conditional mutants by use of the auxin-inducible degron (AID) technology」Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 (奈良)、2015 年 11 月 19 日
5. プレスリリース (JST、遺伝研) 「取り除けば働きがわかる 特定のヒト細胞内タンパク質を素早く取り除いて機能を探る方法を開発」2016 年 3 月 25 日
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160325/>

研 究 報 告 書

「細胞膜模倣リン脂質非対称膜による自己再生産可能な人工細胞モデルの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研 究 者: 神谷 厚輝

1. 研究のねらい

人工細胞膜(リポソーム)は、細胞膜と同じ分子であるリン脂質から構成されているため薬物担体等に使用されている。特に、光学顕微鏡で観察可能な細胞サイズのリポソーム(直径約 5-20 μm)に膜タンパク質の再構成や、リポソーム内でタンパク質発現を行う人工細胞モデル研究に用いられている。細胞サイズのリポソームでこの様な細胞で起こる反応の解析や再現に成功している。しかしながら、リポソームは実際の細胞膜環境とはまだかけ離れている。一例として、真核生物の場合、細胞膜のリン脂質二重膜を構成するリン脂質分子の組成は非対称になっているが、そのようなリポソームの作製は、従来の古典的な自己組織的なリポソーム作製方法では困難である。将来、多くの機能を単一リポソームに搭載した複雑な人工細胞を作製するにあたり、細胞を模倣したリポソーム作製が必要になってくる。

本研究ではマイクロ流体デバイスを利用することに既存のリポソーム作製法で困難であった細胞膜を模倣したリポソームの作製を行い、細胞膜に似た環境下で生物的な反応を行った。具体的には、マイクロ流体デバイスを用いて、リポソーム作製時に使用する有機溶媒が残留しないリン脂質非対称膜リポソームを作製し、様々なタンパク質を非対称膜リポソームに組み込むことにより非対称膜リポソームの機能化を目指した。特に、無細胞タンパク質発現系で発現させた膜タンパク質コネキシンは、あるリン脂質非対称膜組成であるとコネクシンの取り込みが増大した。また、バキュロウイルス-リポソームによりリン脂質非対称膜を維持する膜タンパク質を再構成し機能保持に成功している。この研究はリポソームによる複雑な人工細胞作製のする際のパーツ形成に寄与すると考える。

2. 研究成果

(1)概要

マイクロ流体デバイスを用いたリポソーム作製法で作製したリポソームに膜タンパク質等を再構成し、機能化することにより再生産可能なリポソーム作製を目指した。再生産するような多種類の反応を単一リポソームに再構成し機能発現をさせることは難しい。よって、戦略としては、機能の要素ごとリポソームに再構成しリポソーム内での機能発現の観察を行なう。そして、最終的にはこれらのユニットを組合せ複雑な人工細胞構築を図る。

作製時に使用する有機溶媒が極めて少ないリポソームの作製に成功し、このリポソームの作製過程の詳細を高速カメラで観察を行った。そして、シミュレーションによりこのリポソームの作製過程のモデル化を行った。

このジェット水流印加によるリポソーム作製法で作製したリポソームへ、種々の膜タンパク質の再構成と機能観察を行なった。熱により非対称膜リポソームはリン脂質の分子運動が活発になり、非対称性が崩れることによりリン脂質対称膜リポソームになる。そこで、細胞膜上

で非対称膜を維持する働きを持つ膜タンパク質を再構成し、非対称膜リポソーム中でこの膜タンパク質の活性評価を行った。また、リポソームの外側から無細胞発現系で膜タンパク質であるコネキシンを発現させ、非対称膜リポソームへの再構成の観察を行った。また、非対称膜へコネキシンの取込みが増大することが分かった。さらに、再構成されたコネキシンがリポソーム膜上でポアを形成していることも明らかにした。ジェット水流を平面膜へ印加しリポソーム内に思い通りの濃度で物質をことが可能である。DNA 封入のロスを検討と無細胞タンパク質発現系を用いたタンパク質発現を行った。

リン脂質平面膜を2枚配置したデバイスを作製して、ジェット水流をこの2枚の平面膜に印加することにより、小さなリポソームが細胞サイズリポソームに内包された小胞モデルリポソーム作製に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ジェット水流印加による残留有機溶媒が少ないリポソーム作製の開発」

高速度カメラ撮影によりリポソーム形成過程の詳細を観察した。∞状のデバイス内に有機溶媒溶解したリン脂質を加え、∞状のデバイスの各ウェルに緩衝溶液を加えた。この液滴の周りにリン脂質の単分子膜が形成され、液滴の接触界面に平面リン脂質 2 重膜が形成される。このリン脂質平面膜にジェット水流を印加するとリン脂質マイクロチューブが形成される。そして、リン脂質マイクロチューブが次第に変形し、最終的には大きなサイズのリポソーム(直径約 200 μm)と小さなサイズのリポソーム(直径約 5-20 μm)に分裂し、リポソームが形成された(図 1)。小さなリポソーム膜の間に残留有機溶媒が存在しないことを明らかにしている。このリン脂質チューブの不均一な分裂の様子を数値流体力学シミュレーションにより解析したところ、レイリー・プラトー不安定性がこの分裂に支配的に関与していることが示唆された。この不均一な分裂時に、リン脂質チューブ内に存在する有機溶媒も不均一に分布し大きなリポソーム

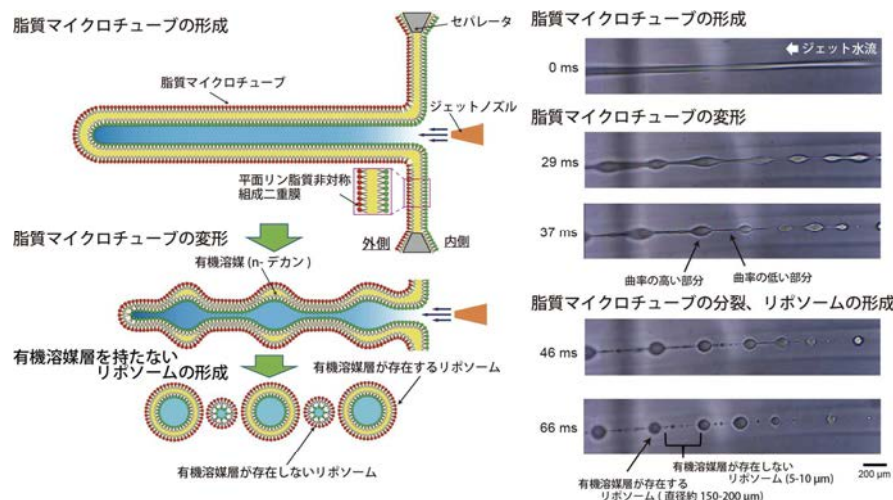


図 2. 有機溶媒層が存在しないリポソーム形成の模式図。直径約 100 から 500 マイクロメートルのマイクロ孔に接触法により、リン脂質非対称組成平面脂質二重膜を形成させる。ジェット水流を印加すると、マイクロサイズのリン脂質チューブが形成される。そして、脂質マイクロチューブ

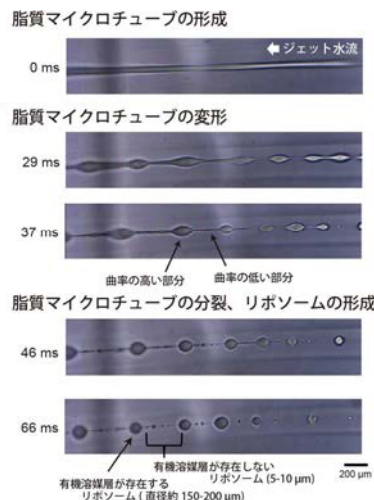


図 3. 本リポソーム作製法の高速度カメラ撮影。ジェット水流印加後、脂質マイクロチューブの形成が観察された。そして、この脂質マイクロチューブが徐々に変形し、曲率の高い部位と低い部分が形成された。曲率の低い部

図 1. ジェット水流印加によるリポソーム作製法の概略図と作製過程の高速度カメラ撮影。大きなサイズの小さなサイズのリポソームが形成され小さなサイズのリポソームを回収し、使用した。

ムに有機溶媒が多く存在すると考える(論文 1 参照)。

1つのデバイスチップで多種類のリン脂質非対称膜リポソームを作製できる機構を構築した。方法としては、 ∞ のウェルの片方を回転させることにより、別のリン脂質と接触することができ、多種類の平面リン脂質膜が形成される。これらの平面膜にジェット水流を印加することにより、1つのデバイスチップで多種類のリン脂質非対称膜リポソームの作製に成功した。

研究テーマ B「リポソーム内でのタンパク質発現と機能」

ジェット水流を印加してリポソームを形成する際、リポソーム内に効率良く物質を封入可能であると考えている。このリポソーム作製方法はプラスミド DNA (26 ng/ μ L)の封入効率は約 90%であった。無細胞タンパク質発現系をジェット水流でリポソーム内へ封入し、GFP の発現に成功している。次に大腸菌の分裂系の再現を目指した。無細胞タンパク質発現系によりタンパク質発現には成功したが、機能発現には至らなかった。

しかし、他の膜タンパク質をリポソームに再構成し機能発現を示している。このリン脂質非対称膜リポソームは、37°Cでインキュベートすると約 10 時間でリン脂質が完全に混和した。リン脂質非対称性を長時間維持するために、リン脂質を輸送することによりリン脂質膜の非対称性を維持する働きを持つ膜タンパク質をリン脂質非対称膜リポソームに再構成した。バキュロウイルス-リポソーム融合法を用いて、この膜タンパク質をリン脂質非対称膜リポソームに再構成した。バキュロウイルス-リポソーム融合法は、バキュロウイルスの出芽ウイルスに目的の膜タンパク質を発現させ、この出芽ウイルスをリポソームに融合させることにより、リポソームへ膜タンパク質を再構成させた。この膜タンパク質は ATP 存在下で活性化する。ATP 存在下と非存在下で脂質輸送活性が明らかに異なっていた。よって、リン脂質非対称膜リポソームに非対称膜を維持する膜タンパク質の機能の付与に成功した。

リン脂質非対称膜リポソームの外側から無細胞タンパク質発現系でコネキシンを発現させ、リン脂質非対称膜の組成がコネキシンの再構成にどのような影響を及ぼすかを観察した。外膜にホスファチジルセリン/ホスファチジルコリン、内膜にホスファチジルコリンの非対称膜でコネキシンの再構成量が多くなった。また、外膜のホスファチジルセリン量を変化させた結果、外膜に 50%以上のホスファチジルセリンが存在するときに、コネキシンの再構成が増大することが分かった。コネキシンはナノポアを形成することが知られている(図 2) (論文 1 参照)。

リン脂質非対称膜リポソーム上でコネキシンの機能観察をリポソーム内に蛍光色素を封入し蛍光色素のリポソーム

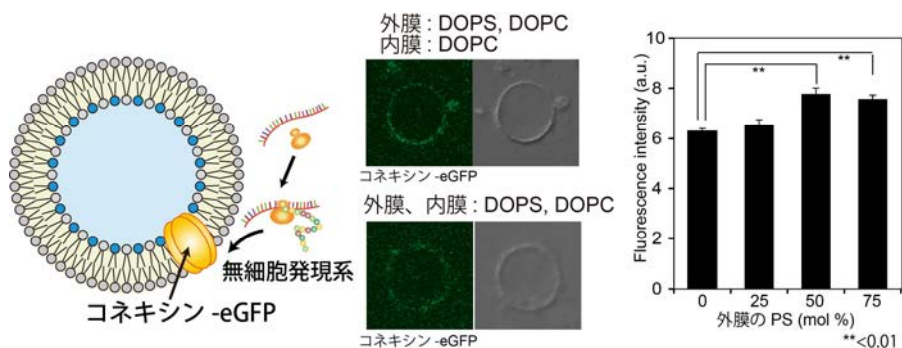


図 2. リン脂質非対称膜リポソームへの膜タンパク質の再構成。コネキシンの再構成量は eGFP の蛍光強度から判断した。

ムからの流出によって行った。その結果、リン脂質非対称膜に再構成されたコネキシンはナノポアを形成していることが分かった。また、電気生理的手法においてもコネキシンがナノポアを形成していること証明している。

研究テーマ C 「自己再生生産リポソームの作製」

リン脂質平面膜を2枚作製可能なデバイスを作製して、ジェット水流をこの2枚の平面膜に印加することにより、小さなリポソームが細胞サイズリポソームに内包された小胞モデルリポソーム作製に成功した。この小胞封入リポソームは、細胞の形質膜と小胞膜の関係を再現できる利点を持つ。

3. 今後の展開

リン脂質非対称膜リポソームを用いることにより膜タンパク質の再構成量の制御が可能であることが示唆された。今後の展開としては、非対称膜の影響による膜タンパク質の機能発現の差異の観察を行う。細胞膜を忠実に模倣した長期間安定なリン脂質組成非対称膜リポソームを用いることで生体分子の活性・機能評価を観察することにより、ペプチドやタンパク質の未知機能や活性条件の発見に繋がる。今回、非対称膜リポソームのハイスループット作製デバイスの構築も行った。したがって、多種類の非対称膜リポソームが作製でき、細胞膜へ与える影響を観察可能な薬剤スクリーニングに使用可能である。また、このリン脂質非対称膜リポソームは、真核生物の形質膜がなぜ非対称膜であるかという問いに対する回答が明らかできるツールになる可能性を持っている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

高次な人工細胞作製に必要な技術を開発する目的で、自己再生産するリポソーム作製を目標に掲げ、それに必要なパーツを作製した。膜タンパク質が再構成可能なリン脂質組成非対称膜リポソームを作製に成功した。コネキシンに関してであるが、リン脂質非対称膜へコネキシンの再構成量の制御が可能であることが分かった。また、小胞を封入したリポソームが作製可能なデバイスや多種類のリン脂質非対称膜リポソームを作製するデバイスの構築に成功している。目標の一つに掲げた分裂するリポソームは、本リポソーム作製方法で作製したリポソーム内で分裂因子のタンパク質発現には成功したが、機能発現には至らなかった。因子の濃度や種類の選定等が必要である。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

リン脂質非対称リポソームを観察するための、最新の顕微鏡システムが構築できたことで飛躍的に研究が加速した。また、このリポソーム作製の要である、ジェット水流の印加圧や印加時間を細かく設定可能なジェット水流発生装置を購入できたことで安定的な構築がなされた。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

このリン脂質組成非対称膜リポソームは、膜タンパク質が再構成できるため細胞に近い状態で膜タンパク質の素反応観察が可能になると考える。また、膜に影響をおぼすペプチドや薬剤のスクリーニングとしても利用可能であると考え。この非対称膜リポソーム研究が成熟することにより、ドラッグデリバリーの担体や食品分野への応用がなされる可能性がある。

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

(研究総括)

ジェット水流を印加することにより、1つのデバイスチップで多種類のリン脂質非対称膜リポソームの作製に成功し、独自の製法を開発した。この製法では、脂質膜の間に有機溶媒層がないことをラマン顕微鏡により確認している。そして、小さなリポソームが細胞サイズリポソームに内包された自己再生生産できる小胞モデルリポソームの作製に成功している。このように、当課題であった膜タンパク質が再構成可能なリン脂質組成非対称膜リポソームを作製できることを実証したことから、創薬スクリーニング、ドラッグデリバリーなどの多方面の研究者との連携で、その応用分野が広がることを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kamiya K., Kawano R., Osaki T., Akiyoshi K., Takeuchi S. Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. Nature Chemistry, 2016, 8, 881-889.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 日刊工業新聞(2016年6月14日)“本物並みに縮小作製 人工細胞で覆う球体“
2. 神谷厚輝「人工細胞モデルの創成」生体の科学(2014) 65, 492-493.
3. 吉田昭太郎、神谷厚輝、竹内昌治、「マイクロ・ナノデバイスによる膜系システムの理解」人工細胞の創製とその応用(書籍)(2017年1月刊行予定)
4. 神谷厚輝、竹内昌治“膜タンパク質やリン脂質非対称膜を再構成した人工細胞膜の作製”細胞を創る研究会 8.0 2015年11月
5. 神谷厚輝“Preparation of artificial cell models by bottom-up approach”第53回生物物理学会年会 2015年9月

研 究 報 告 書

「分裂様式の操作による細胞運命の制御と個体構築原理の追究」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研 究 者: 清光 智美

1. 研究のねらい

複雑で神秘的な多細胞体も、元を辿れば1つの受精卵が分裂を繰り返し、秩序立って細胞の数と種類を増やすことで形成されている。従って、多細胞体形成の基礎を理解するためには、細胞コピーを増やす「対称分裂」と、細胞種を増やす「非対称分裂」のそれぞれの仕組みや意義、両者の変換メカニズムを正確に理解することが必要となる。

これまでの研究から、細胞分裂の対称性・非対称性制御の鍵は、染色体分配装置である紡錘体の配置制御にあることが明らかとなってきた。なぜなら、紡錘体は細胞分裂面を決めるシグナルを発信するため、紡錘体の向きや細胞内配置が、細胞運命を担う極性因子の分配や娘細胞サイズの対称性・非対称性を規定し、細胞運命の制御に直結するからである。私たちはこれまで、対称分裂するヒト培養細胞において、紡錘体の配置は、主に細胞皮層ダイニンによる紡錘体の牽引力と、細胞皮層ミオシンによる細胞膜の収縮力によって制御されることを明らかにしてきた。またその過程において、これらの制御因子群の局所的な局在制御こそが、紡錘体配置制御の本質を担うとの着想に至った。

よって、本研究では、まず近年開発された光遺伝学ツールを用いて、ダイニンやミオシン制御因子群の分裂期での局所的な局在操作を行い、人為的に機能的なダイニンやミオシン複合体を細胞内で再構成することによって、それらの機能の十分性や、紡錘体配置制御における役割を理解することを目的とした。また、非侵襲的に任意の1細胞の紡錘体の向きや配置を自在に操作する技術を確認できれば、それを組織や個体中の1細胞にも応用することで、生理的環境下における紡錘体配置の制御メカニズムやその意義の理解にも貢献できると考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

局所光照射と高精細な生細胞観察が可能な顕微鏡システムを整備し、光照射依存的なタンパク-タンパク相互作用の誘導系 iLID(improved Light-induced dimer, Guntas et al., PNAS 2015)を改良することによって、分裂期の細胞皮層で自在な局在操作を可能にした。また iLID とCRISPR/Cas9によるゲノム編集を融合し、ダイニン制御因子の細胞皮層局在を光操作することで、分裂期の細胞で紡錘体の向きや位置を操作することに成功した。さらにダイニンのみならず細胞皮層ミオシンの制御因子の局在操作にも成功し、紡錘体配置制御に間接的に関与する細胞膜の収縮力を一部操作できるようになった。また同領域の鍾巻将人研究者との共同研究により、効率的なゲノム編集技術やダイニン複合体のオーキシン誘導デグロンヒト細胞株を確立することができ、ヒト細胞で任意の内在性遺伝子産物の可視化、分解、操作を自在にできる道が拓けた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「分裂期における局所的局在操作ツールの最適化と顕微鏡システムの構築」

2009 年頃から光照射依存的なタンパク-タンパク相互作用誘導ツールが相次いで報告されている。4種類の光操作ツールを検討した結果、CRY2-CIBN(Kennedy et al., Nat Methods 2010) 研究成果リスト¹⁰、および iLID(improved Light-induced dimer, Guntas et al., PNAS 2015)が分裂期のヒト培養細胞でよく機能することを確認した。その後最適条件を検討する中で、iLID がより条件に合うことを見出し、以降の実験では iLID をベースに光操作の実験を行った。また局所照射可能な顕微鏡装置として Mosaic3 (Andor 社)を導入した。さらにタイムラプス撮影中に任意の場所を任意のタイミングで光照射できるように Metamorph ソフトウェア(Molecular devices 社)のマクロを構築した。この顕微鏡システムを用いて、分裂期の細胞皮層を局所的に照射すると、細胞質にある mCherry タンパク質(光操作タグ付き)を光照射した細胞皮層領域に局在化させることに成功した。また様々な照射パターン(1 点照射、2 点同時照射、多点経時間照射、1 点経時照射)を試すことにより、細胞皮層での非対称局在化、対称局在化、回転操作、持続的局在化にも成功した^{研究成果リスト 5,6,7}。

研究テーマ B 「分裂期における細胞皮層ダイニン制御因子の局在操作」

4.1G/R タンパク質に保存されたカルボキシル末端ドメイン(CTD)は、分裂期後期においてダイニンの細胞皮層局在化に十分である(Kiyomitsu and Cheeseman Cell 2013) 研究成果リスト³。そこで、まずこのドメインと光操作タグの融合タンパク質を恒常的に発現する培養細胞を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて樹立した。この細胞株と上記成果 1 で確立した照射法を用いて、分裂期後期の細胞皮層において光操作を行ったところ、4.1G-CTD タンパク質の非対称局在化を実現でき、紡錘体配置の偏りが誘導される様子が観察された。しかし紡錘体の偏りにもかかわらず、極端な不等分裂(異なるサイズの娘細胞に分裂)には至らなかった。その原因を解析したところ、紡錘体に近い細胞膜領域が伸長し、細胞境界が拡張されるために、操作による紡錘体配置の偏りが部分的に抑圧されることを見出した。この現象は等分裂細胞が有する紡錘体中央配置化のバックアップ機構として知られる現象であり^{研究成果リスト 1,3}、ヒト培養細胞のように比較的小さい等分裂細胞が不等分裂に移行するためには、細胞皮層ダイニンの非対称化のみでは不十分であり、細胞膜の伸長を抑圧するその他の要素が必要となることが示唆された^{研究成果リスト 5,6,7}。一方、もう一つのダイニンの細胞皮層レセプター(Gai-LGN-NuMA 経路)の光操作を分裂期中期の細胞で行ったところ、紡錘体の配置や方向を操作することに成功した。

研究テーマ C 「分裂期における細胞皮層ミオシン制御因子の局在操作」

上記の理由により、極端な娘細胞サイズの非対称性を誘導するには、ダイニンによる紡錘体の牽引のみならず、ミオシンによる細胞膜の伸長も同時に制御する必要があると考えられた。よって、次に細胞皮層ミオシンに依存した細胞膜の収縮力を光操作することにも挑戦した。細胞皮層ミオシンの収縮力を制御する経路の最上流因子として RhoA の GEF である Ect2 が知ら

れている。そこで光操作タグを融合した Ect2 を発現できる細胞株を樹立し、分裂期の細胞において光操作を行った。分裂期中期においては局所的な光照射に依存して、Ect2 の非対称な局在化が誘導され、その後細胞膜の収縮と細胞の変形が観察された。一方、分裂期後期の極側の細胞皮層領域に Ect2 を局在化させると、それほど顕著な収縮はみられなかったが、わずかに不等なサイズの娘細胞が誘導される様子が観察された。これらの結果から、分裂期中期と後期の細胞皮層ではミオシン依存的な収縮力の発生機構に違いがあること、また等分裂するヒト細胞においてはミオシン制御因子の非対称化のみでも極端な不等分裂を誘導するには不十分であることが示唆された^{研究成果リスト 5,6,7}。

研究テーマ D 「分裂期における内在性ダイニンの可視化と分解操作」(鐘巻将人研究者との共同研究)

光遺伝学的手法以外の方法を用いて分裂様式の操作を行うため、同領域の鐘巻将人研究者と共同してオーキシン誘導デグロン(AID)法の検討を行った。手始めに、ダイニンのモーター活性を担うダイニン重鎖(DHC, 約 500kDa)遺伝子に mClover(蛍光タンパク質)と mAID タグ(分解誘導タグ)の融合遺伝子をノックインし、内在性ダイニンの可視化とオーキシン依存的分解操作を行った。この方法を用いることによって、初めて内在性ヒトダイニンの細胞内局在を生細胞で可視化することに成功し、またオーキシン添加依存的に DHC タンパク質を分解することにも成功した(Natsume et al., Cell Reports 2016)^{研究成果リスト 2,4,5,6}。この方法では内在性ダイニンのタンパク質量を mClover の蛍光としてモニターしつつ、細胞の表現型を解析できるため、これまでの siRNA による mRNA の発現抑制実験よりもより確実な表現型解析を実現できる。またオーキシンをパルス的に添加することにより、一時的なタンパク質分解を誘導できるため、ダイニンレセプターである LGN と 4.1G/R タンパク質を標的にすれば、これまでの siRNA に依存した方法(Kiyomitsu and Cheeseman Cell 2013)とは異なる方法で不等分裂を誘導できると考えられる。またヒト培養細胞において、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集と蛍光タンパク質、オーキシン誘導デグロン法、あるいは光操作技術を組み合わせることによって、任意のヒト内在性遺伝子産物の可視化、分解、操作を自在にできる道が拓けた。

3. 今後の展開

本研究により、分裂期のヒト培養細胞において、光操作技術を任意のタンパク質に適用する基本技術を確認することができた。また細胞皮層のダイニン制御因子群の局在を時空間的に自在に操作することによって、紡錘体配置の操作を行う目処が立った。しかし、娘細胞サイズを自在に操作する段階にはまだ至っていない。本研究成果を元に、ダイニンやミオシン制御因子の同時局在操作や操作条件の最適化を行うことによって、娘細胞サイズを自在に操作する技術の確立につなげたい。本研究で用いた光操作技術は組織や個体にも応用可能なため、一旦最適な技術が確立できれば、それを対称分裂するガン細胞などの培養細胞のみならず、自己複製する幹細胞やマウス初期胚、細胞極性を持つ組織中の細胞等に適用し、より生理的環境下における対称分裂の基本原則とその意義の理解に貢献できると考えている。

またダイニンに代表されるように、紡錘体の形成や配置に関与する因子の多くは、細胞周期を通じて様々な異なる機能を担っている。鐘巻将人研究者が開発されたオーキシン誘導デグロン(AID)法とゲノム編集を組み合わせると、急速(半減期約 20 分)に内在性タンパク質そのものを時期特異的に分解できるため、細胞周期のある時期特有の機能をより正確に解析することができる。例えば、ダイニンを分裂期中期特異的に分解することによって、分裂期中期の紡錘体極でのダイニンの機能を明らかにすることや、間期で核-細胞質輸送に関与する Ran 関連因子群の分裂期機能を理解することが期待できる。また AID 法は一時的な標的タンパク質の分解操作が可能のため、ダイニンの表層レセプター(LGN, 4.1G/R)を一時的に分解できれば、従来の RNAi 法とは異なる方法で不等分裂を誘導でき、娘細胞サイズ維持の仕組みや生理的意義の多角的な理解にも貢献できると考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

0から顕微鏡装置のセットアップや光操作、ゲノム編集に取り組んだため、操作ツール、操作条件の最適化に予想以上に時間がかかってしまったが、昨年(2015年)公開されたツール(iLID)の素早い導入や改良、同領域の鐘巻将人研究者との共同研究など、最新技術や領域内での協力を最大限に活かすことにより、最終的に分裂期細胞で標的タンパク質の局在を自在と言ってよいレベルまで操作することができた。また細胞皮層のダイニンやミオシン複合体の光操作を実現し、紡錘体の方向や配置の操作を通じて、細胞分裂の対称性・非対称性の操作に目処が立ったこともある程度評価できる。個体レベルの解析は研究期間中に達成はできなかったが、本成果は個体への応用も可能な技術であるため、最適化した技術を今後速やかに応用することで、効率的に研究を展開して行きたい。

これまで分子モーター複合体を分裂期の細胞皮層で再構成し、紡錘体のような巨大な細胞内構造物の配置を操作した例はない。操作分子の機能解析や、操作後の細胞の表現型解析を進めることで、これまでとは異なる知見や、新奇の細胞特性の発見につながることを期待できる。また本研究が焦点にしている、任意の内在性遺伝子産物の可視化・分解・操作は極めて汎用性が高い基礎技術であるため、その他の研究分野や技術開発メーカーへの波及効果も期待できる。さらに、細胞分裂の対称性・非対称性の制御の破綻は、初期発生の異常や神経疾患等との関連が示唆されているため(Yu et al., Nat Commun 2014, Noatynska et al., J Cell Biol. 2012)、今後の進展により、原因不明とされている初期発生の異常や神経疾患の対処法の開発などにも貢献できる可能性も考えられる。

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

(研究総括)

光照射依存的なタンパク-タンパク相互作用の誘導系 iLID を改良することによって、分裂期の細胞皮層で自在な局在操作を可能にした。また iLID と CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を融合し、ダイニン制御因子の細胞皮層局在を光操作することで、分裂期の細胞で紡錘体の向きや位置を操作することに成功した。さらにダイニンのみならず細胞皮層ミオシンの制御因子の

局在操作にも成功し、紡錘体配置制御に間接的に関与する細胞膜の収縮力を一部操作できるようになった。このように周辺技術を駆使して、細胞の局在操作を着実に実証してきた功績は、大いに評価される。予定外の成果として、同領域の鐘巻将人研究者との共同研究により、効率的なゲノム編集技術やダイニン複合体のオーキシン誘導デグロンヒト細胞株を確立することができたことは、さきがけ研究ならではの大きな成果と注目したい。今回開発した技術を使って、さらに何を解析していくのか、興味が尽きない。今後の展開に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Kiyomitsu T. Analyzing Spindle Positioning Dynamics in Cultured Cells. <i>Methods in Molecular Biology</i> 誌. 2016 年, 1413 号, 239–252 頁 |
| 2. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, and Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. <i>Cell Reports</i> 誌. 2016 年, 15 巻 1 号, 210–218 頁 |
| 3. Kiyomitsu T. Mechanisms of daughter cell-size control during cell division. <i>Trends in Cell Biology</i> 誌. 2015 年, 25 巻 5 号, 286–295 頁 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

1. 仁科桃子、夏目豊彰、鐘巻将人、清光智美「ヒト細胞質ダイニン複合体による紡錘体二極構造の維持」第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016.11.30
2. Kiyomitsu T, “Manipulation of cytoplasmic dynein during mitosis” 第 54 回生物物理学会年会 つくば 2016.11.25
3. 清光智美、「デグロン及び光操作による細胞質ダイニンの分裂期局所機能の解析」、第 6 回分子モーター討論会 大阪 2016.7.25
4. 清光智美、「細胞が等分裂する仕組みとその意義の理解に向けて」、第 24 回日本バイオイメーjing学会 東京 2015.9.27
5. Kiyomitsu T, “Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase“, Dynein 2013 International Workshop 神戸 2013.10.31

【受賞】

1. 平成28年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 2016.4.20

【著作物】

1. 清光智美「分裂様式の操作による細胞運命制御」生体の科学 65(5).10 月号 特集 生命動態システム

研究報告書

「細胞機能の制御・設計に向けたアロステリックタンパク質の人工設計」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年4月～平成29年3月

研究者: 古賀 信康

1. 研究のねらい

タンパク質分子はアミノ酸配列に従い、ほどけた紐のような状態から自発的に折りたたまり特異的な三次元立体構造を形成して機能を発現する。生命は何十億年という長い年月をかけてタンパク質を進化させ、それらを生命システムにおけるパーツとして巧みに利用し様々な生命現象を生み出している。しかし、我々が現在見ている自然界のタンパク質は個々の環境に応じて進化した結果であり、それらを解析するのみでは自然が創り上げたタンパク質分子の動作メカニズムの本質に辿りつくことは難しい。そこで、立体構造形成や機能発現に関する様々な仮説を立てながらタンパク質分子を計算機上で設計し、それらが実際にどのように動作するのか実験により調べるという構成的アプローチが力を発揮する。タンパク質分子を実際に創ることにより立体構造形成および機能発現の原理を理解し、さらに望みの機能を発現するタンパク質を自在に設計できる技術確立する。本研究では、アロステリックタンパク質を設計することに着目し研究を展開する。アロステリックタンパク質は、リガンド結合や光などの外部入力により立体構造を変化させてスイッチのように機能発現を制御することにより、様々な生命現象を適切な位置とタイミングで発現する。アロステリックタンパク質の示すこの動的な機能は、タンパク質構造に精巧に組み込まれた「折りたたみ」「少分子結合」「構造変化」「多量体形成」などの複数の「機能要素」が組み合わさって生じる。本研究では、アロステリックタンパク質をゼロからデザインすることを大きな目標としながら、上記のそれぞれの機能要素の理解とそれらをデザインする技術、更にはそれらの機能要素を一つの分子に組み込む技術の開発を行うことを目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

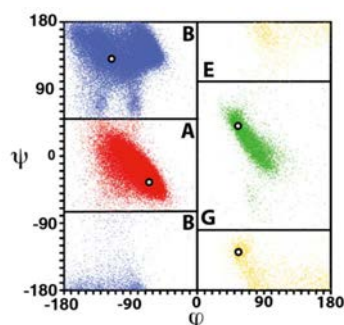
ATP 結合および加水分解に重要とされる P-loop motif を持つアロステリックタンパク質のデザインを目標として研究を行った。まず、「折りたたみ」に着目して研究を行い、我々がこれまでに開発してきたタンパク質立体構造をゼロからデザインする技術を発展させ、様々な形状の α /型タンパク質構造および α ヘリカル構造をデザインする手法を開発した。その結果、2次構造を連結するループ構造に主鎖二面角パターンが存在することを明らかにし、これらの主鎖二面角パターンを用いることで 4 本および 5 本ストランドからなる様々な形状の α /型構造、 α ヘリックス5本からなる α ヘリカル構造のデザインに成功した。次に「少分子結合」に着目しデザインを行った。我々が発見した前述の主鎖二面角パターンと、自然界のタンパク質である分子モーターや Ras 等において、ヌクレオチド結合・加水分解に伴う構造変化に重要とされる P-loop motif を用いることで、 α /型構造を持つリン酸結合タンパク質のデザインに成功した。アロステリックタンパク質のゼロからのデザインは道半ばであるが、その土台となる研究成果

を得ることができた。

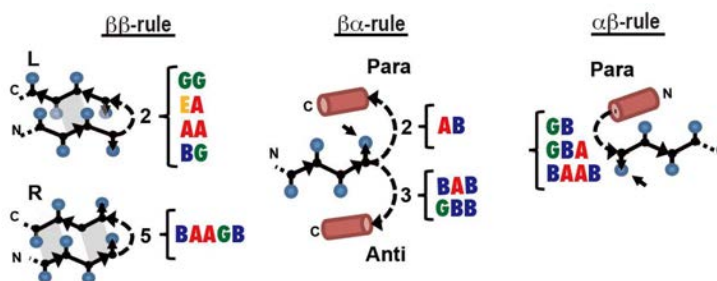
(2) 詳細

研究テーマ A 「折りたたみ」

タンパク質の機能は、アミノ酸配列に従って折りたたまれたその立体構造に基づいて発現される。すなわち、望みの機能を持つタンパク質構造をデザインするためには、自在にタンパク質構造をデザインする技術の確立が必要不可欠である。そこでまず望みの形状や大きさのタンパク質をデザインする手法の開発を行った。タンパク質分子は、アミノ酸がペプチド結合で連なったものであり、タンパク質分子の様々な立体構造は、ペプチド結合面同士の主鎖二面角 (ϕ , ψ) が変化することにより生み出される。これら二面角の範囲は局所的な原子同士の排除体積により制限されていることが知られ、これらはラマチャンドランマップとして表現されている。我々は、ラマチャンドランマップを5つの領域(A,B,E,G,O)に分割し(左下図)、このABEGO タイプを用いて二次構造をつなぐループ構造について、自然界のタンパク質構造を網羅的に解析したところ、ループ構造に主鎖二面角パターン、すなわち ABEGO パターンのルールが存在することを明らかにした(右下図)。これらのルールを用いてループ構造を設計することにより、ループ両端に接続されている二次構造間の相対位置を制御することができ、タンパク質の形状を制御することが可能になる。加えて、連続する3つの二次構造(beta-alpha-beta motif)に関して、それらを連結しているループの ABEGO パターンに応じて α ヘリックスと β ストランドの長さを選ぶことで、タンパク質の大きさを制御することができる。



5つの領域に分割した
ラマチャンドランマップ

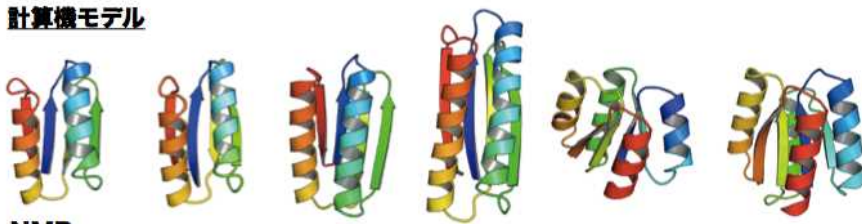


二次構造をつなぐループ構造の ABEGO パターンのルール

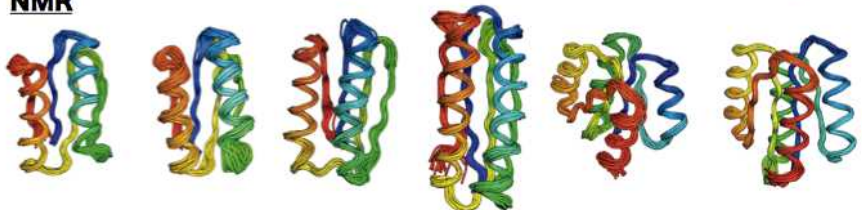
発見した ABEGO パターンのルールを用いて、様々な形状と大きさの $\alpha\beta$ 型のタンパク質構造の設計図を描き、これら設計図を基にして計算機でタンパク質構造のデザインを行った。デザインしたタンパク質のアミノ酸配列を大腸菌に組み込み発現・精製を行い、実験的にその立体構造を決定したところ、デザインした構造は非常に高い精度で実験構造と一致しており(下図)、本研究で確立した様々な形状と大きさのタンパク質構造をデザインする手法の有用性を示した。

計算機でデザインした構造(上段)と実験(NMR)により決定した構造(下段)の比較

計算機モデル



NMR



研究テーマ B 「小分子結合:リン酸結合タンパク質のデザイン」

自然界には分子モーターや Ras 等において、ヌクレオチド結合・加水分解に伴う構造変化に重要とされる P-loop motif(GXXXXGT/S)が存在する。この P-loop motif と研究テーマ A で構築したデザイン手法を用いて、リン酸結合タンパク質のデザインを行った。P-loop motif の ABEGO パターンと、研究テーマ A で発見した ABEGO パターンのルールを用いて $\alpha\beta$ 型タンパク質の主鎖構造設計図を描き、この設計図を基にして計算機でリン酸結合タンパク質のデザインを行った。デザインしたタンパク質のアミノ酸配列を大腸菌に組み込み発現・精製を行い、蛍光偏光法を用いてデザインしたタンパク質のリン酸結合能を調べたところ、mM 程度の親和性でリン酸に結合するタンパク質を得ることに成功した。

3. 今後の展開

さきがけ研究を実施することで、アロステリックタンパク質のデザインに向けて、様々な研究の種を蒔くことができた。今後は、更に「小分子結合」に着目して研究を行い、ATP に特異的に結合するタンパク質を創出する。研究テーマ B でデザインした P-loop モチーフを持つ $\alpha\beta$ 型構造に all- α 型構造を増築することでマルチドメイン化し、2つのドメイン間に ATP のアデニン環を特異的に認識して結合するポケットを持つタンパク質のデザインを行っている。加えて、ATP 結合時にこれらドメイン間で「構造変化」を生み出すことのできるタンパク質のデザインも計画している。研究期間内では、「多量体形成」についての研究を実施することはできなかったが、将来的には現在デザインしている ATP 結合タンパク質を多量体化させることにより、ATP 結合に伴う構造変化により多量体形成を制御するアロステリックタンパク質の創出を目指す。

4. 評価

- (1) 自己評価
(研究者)

2014 年より、さがけ研究者として採用されると共に、分子科学研究所においてタンパク質分子をデザインする研究室をスタートさせた。残念ながら3年の研究期間内では、アロステリックタンパク質の創出までには至らなかったが、本研究を遂行することで、タンパク質分子を計算機および生化学実験両方を用いてデザインするための研究環境の整備はもちろんのこと、今後どのように研究を展開していくか、その骨となるコンセプトと研究の土台を作り上げることができた。社会・経済への波及効果に関しては、望みのタンパク質分子デザインするための技術の確立に大きな一歩を踏み出すことができたと考えており、今後デザインしたタンパク質分子による細胞の機能・設計や医療および産業への貢献、さらには新規酵素やマテリアル開発による産業へ貢献できると考えている。

(2) 研究総括評価

(研究総括)

タンパク質の主鎖二面角を5つの領域に分割し、タンパク質の3次元立体構造を主鎖二面角パターンとして捉えることで、タンパク質の二次構造をつなぐループの形状に、いくつかのパターンがあることを発見した。さらに、局所および非局所構造に関するルールを用いることで様々な形状や大きさを持つ α/β 型タンパク質構造の様々なデザインに成功した。このルールと ATP 結合・加水分解に関わる P-loop モチーフを組み合わせることで、リン酸に結合するタンパク質のデザインに成功したことは高く評価できる。タンパク質分子を自在にデザインする手法を広めて、細胞の制御・設計の基礎分野から、新規素材の開発、新規医薬品など広い産業分野で貢献すること期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. #Yu-Ru Lin, #*Nobuyasu Koga, Rie Tatsumi-Koga, Gaohua Liu, Amanda F. Clouser, Gaetano T. Montelione, *David Baker (# Yu-Ru Lin and Nobuyasu Koga contributed equally.) Control over overall shape and size in de novo designed proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**(40), E5478-5485, 2015

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著作物

1. 古賀理恵, 古賀信康, 「計算機でゼロからタンパク質をデザイン - 望みのタンパク質分子のテーラーメイド創出を目指して」, *化学*, **71**, 42-46, 2016 年 3 月

研究報告書

「光の色を使った細胞内情報伝達因子の時空間的に精密な制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 小柳 光正

1. 研究のねらい

細胞は、さまざまな刺激に対して適切に応答することで個体の生命活動を支えている。さまざまな刺激を受容するための受容体は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に限っても、ヒトで約800種類にも上るのに対して、細胞内でその情報を伝える役割を担う因子は、環状ヌクレオチドやカルシウムイオンなどわずか数種類である。したがって、これら細胞内情報伝達因子を制御できれば、さまざまな刺激が引き起こす細胞の分化や形態の変化、転写の調節、膜電位の変化といった多様な細胞応答を制御でき、さらにその先にある多様な生理機能を制御することが可能である。

本研究のねらいは、動物の視覚を支えるロドプシンに代表される光感受性 GPCR (GPCR 型オプシン) を起点として、細胞内 cAMP 濃度およびカルシウムイオン濃度を光で制御できる新しい光操作ツールを開発することである。個体レベルでも通用する頑強で汎用性の高い GPCR 型光操作ツールの創出に成功すれば、GPCR から始まるさまざまな生理機能を、光を用いることで高い時空間的分解能で制御することが可能となり、さまざまな生命機能研究分野に対し、従来にない精度と角度からの研究手法をもたらすと期待できる。

さらに本研究では光の色に着目する。GPCR 型オプシンには、吸収極大波長が 360nm の UV オプシンから 560nm の赤オプシンまで幅広い波長感受性をもつオプシンが存在する。この波長感受性の多様性を利用することで、2つの色を使って、活性状態と不活性状態を速やかに切り替えできる GPCR 型光操作ツールの開発も可能である。このツールを用いることで、細胞内情報伝達因子の時間的に精密な制御に加え、活性化する色の光と不活性化する色の光を細胞や組織の部位ごとに照射し分けることで、空間的にも精密な細胞内情報伝達因子の制御が可能になると期待できる。また、近赤外光は、“生体の窓”と呼ばれる生体深部に届きやすい波長域の光であるため、近赤外光に高い感度をもつ光操作ツールを開発し、光刺激のために挿入するファイバーで組織を傷つけない、すなわち非侵襲的な光操作を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、多様な細胞機能や生理機能の光による精密な制御をめざし、動物に存在する多様な GPCR 型オプシンを起点に、細胞内情報伝達因子を光の色によって精密に制御できる実用的な光遺伝学ツールの開発を試みた。その結果、従来の GPCR 型オプシンでは出来なかった、血清中に含まれる程度の微量なレチナール環境下での GPCR 型オプシンの機能発現に成功し、GPCR 型光操作ツールが生体内の多様な組織で機能できることを示した。また、光の色依存的な細胞内 cAMP 濃度の制御やシグナル伝達の繰り返し操作にも成功した。さらに、個体レベルでの実用性の評価として、線虫の特定の神経細胞に GPCR 型オプシンを

導入し、光による GPCR シグナル伝達を介した行動制御に成功した。また、非侵襲的な光操作をめざして長波長感受性オプシンの探索を行い、ある種の昆虫から動物界最長波長感受性の赤オプシンを見出した。さらに、昆虫の赤オプシンの感度を向上させ、活性化する G タンパク質選択性の改変を行うことで、非侵襲的光操作ツールとして有望な長波長感受性ツールを開発した。

(2) 詳細

研究テーマA「さまざまな組織で高効率に機能できる GPCR 型光操作ツールの開発」

ハマダラカから見出した Opn3 (MosOpn3) は、光吸収により生じた活性化型が安定で、再度の光吸収により不活性型に戻るという“光再生型”オプシンであった。さらに、従来のオプシンが 11 シス型レチナールという一般的な組織には存在しないレチナール異性体を発色団として要するのに対し、MosOpn3 は「13 シス型レチナールという生体内にユビキタスに存在するレチナール異性体でも発色団として結合して機能できる」というユニークな性質をもっていた。そこでこの 13-シス型レチナール結合能をもつ光再生型オプシンをベースとして、血清中に含まれるような微量かつ 11 シス型がほとんどないレチナール環境下でも機能する光操作ツールの開発を行った。具体的には、Gi および Go 共役型オプシンである野生型 MosOpn3 と Gs 共役型オプシンであるクラゲオプシンあるいは Gq 共役型オプシンであるミツバチオプシンとの間でキメラ変異体を作製し、MosOpn3 の特性をもちながら、Gs あるいは Gq を活性化できる光操作ツールを開発した。これらのツールを用いることで、細胞内の cAMP 濃度の増加と減少およびカルシウム濃度の増加を光によって制御することが可能となった(招待講演 1-5)。さらに、MosOpn3 が、生体内で、毒性なくかつ分子特性を反映した機能性を発揮できるかについて線虫を用いて検証した。その結果、忌避行動を引き起こす神経細胞に MosOpn3 を発現するトランスジェニック線虫は、11 シス型レチナールを加えなくても光によって忌避行動を引き起こした(招待講演 3, 5)。この結果は、MosOpn3 型光操作ツールが生体レベルでも十分に使えることを示している。

研究テーマB「色依存的にオン・オフ可能な GPCR 型光操作ツールの開発」

ヤツメウナギの松果体から見出したパラピノプシンは、“光再生型”オプシンである点は MosOpn3 と同じであるが、「不活性型が UV 感受性」で「活性型が緑色感受性」と2状態の波長感受性が大きく異なる点特徴的である。すなわち、少なくとも受容体レベルでは、UV 光刺激で活性型が生じ、緑色光刺激によって完全に不活性型に戻る。そこでこの“色”依存的なオン・オフの性質に着目し、細胞内情報伝達因子の色依存的制御を試みた。その結果、Gi 共役型オプシンである野生型パラピノプシンを発現させた培養細胞において、UV 光による cAMP レベルの減少と緑色光による上昇を引き起こすことが出来た(図1)(原著論文 3)。さらに、Gs 共役型クラゲオプシンとのキメラ変異体によって、野生型とは逆に、UV 光による cAMP の上昇と緑色光による減少を引き起こすことに成功した(招待講演 1, 2, 5)。このパラピノプシンによる色依存的な応答は、繰り返し何度でも起きること、11 シス型レチナールを加えなくても起きること、一般に有害とされる UV 光ではなく青色光でも起きることを確認した。また、魚類松果体から青色光に最大感度をもつパラピノプシン(PP2)を見出した(原著論文 2)。さらに、MosOpn3

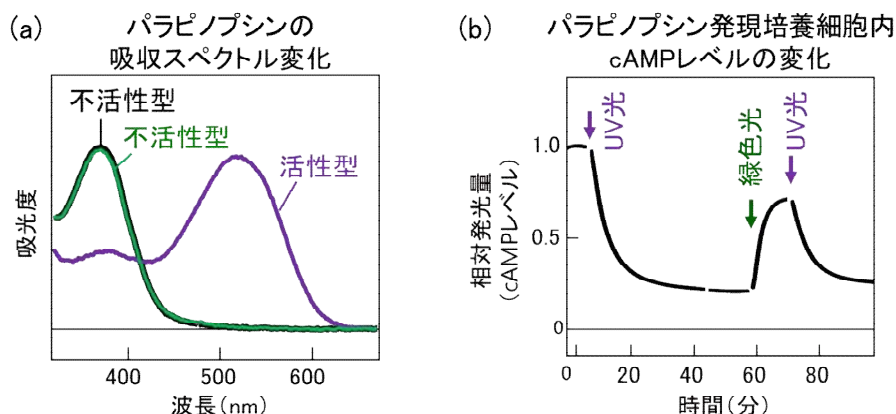


図1 パラピノプシンを用いた細胞内情報伝達因子の色制御

(a) UV感受性オプシンであるパラピノプシン(黒曲線)は、UV光照射により緑色光感受性の安定な活性型(紫曲線)となり、活性型に緑色光を照射すると元の不活性型(緑曲線)に完全に戻る。すなわち、UV光と緑色光によって活性状態と不活性状態を切り替えることができる。(b) Gi共役型であるパラピノプシンを導入することで、培養細胞内のcAMPレベルをUV光によって減少、緑色光によって増加させることができる。

と同様、線虫の忌避行動を引き起こす神経細胞にパラピノプシンを導入し、生体内での機能性を調べた結果、パラピノプシンを導入したトランスジェニック線虫は、UV 光依存的に忌避行動を引き起こした。興味深いことに、緑色光存在下では、このUV 光依存的な忌避行動は起きなかった(招待講演 5)。このことは、パラピノプシンが受容体レベルの分子特性、すなわち UV でオン、緑色光でオフという特徴を備えた“色”操作ツールとして成体内でも使えることを示している。

研究テーマC「近赤外光で作動する GPCR 型光操作ツールの開発」

近赤外光は、“生体の窓”と呼ばれる生体深部に届き易い波長域の光であるため、近赤外光で作動する光操作ツールを開発できれば、光刺激のために挿入するファイバーで組織を傷つけずに、非侵襲的な光操作が可能である。これまでに知られている動物のオプシンの中で最も長波長に感受性のあるオプシンは脊椎動物の赤感受性視物質(吸収極大が~560nm)であるが、これは光再生能がなく光操作ツールに不向きであると考えられていた。一方、光操作ツールとして有用な光再生型オプシンの中で吸収極大が最も長波長にあるのはクモの緑感受性オプシン(吸収極大が~535nm)であり、近赤外光に対する高い感受性は望めない。そこで本研究では、生理学的に長波長光を感じることが知られている動物のオプシンについて網羅的に解析を行った。その結果、チョウの赤オプシンが、動物界で最も長波長感受性(吸収極大が~575nm)の光再生型オプシンであることを見出した(招待講演 1, 2, 3)。さらに、配列の改変によって感度を約8倍に上げることに成功した。これら昆虫の赤オプシンについても、野生型の Gq 共役型に加え、Gs 共役型を作製し、培養細胞において、>700nm 光によるカルシウム濃度の上昇と cAMP 濃度の上昇をそれぞれ引き起こすことに成功しており、近赤外光で作動する光操作ツールとして期待できると考えている。

3. 今後の展開

本研究によって、いろいろな特徴をもつ GPCR 型光操作ツールを開発し、それらの実用性を示すことに成功した。現在、トランスジェニックマウスを用いた機能性の検証を進めており、その結果によってはさらなる改良が必要かもしれない。また、開発した光操作ツールをアデノ随伴ウイルス(AAV)にパッケージングする体制も整えており、さまざまな生理機能の解析系において GPCR 型光操作ツールの機能性を検証していく予定である。さらに今後は、“非侵襲的な光操作の実現”や“遅い・長期間の細胞応答への応用”といった GPCR 型光操作ツールならではの光操作へと成果を発展させたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の第一の目標であった「実際に使える GPCR 型光操作ツールの開発」は達成できたと考えている。また、細胞内情報伝達因子の色依存的制御を可能とするツールの開発にも成功し、研究課題名に掲げた「光の色を使った精密な制御」が可能となった。さらに、長波長感受性の GPCR 型光操作ツールの開発では、当初の予想よりも長波長で高感度なツールが得られたと考えており、近赤外光を用いた非侵襲的光操作への期待がもたれる。ただし、長波長感受性ツールについては、まだ生体内での機能性の検証が十分にできておらずその点は今後の課題である。

GPCR 型光操作ツールは、さまざまな生命活動の光操作を可能とすることから、本研究成果の生命科学研究への波及効果は大きいと思われる。すでに、開発したツールを AAV として配布する体制も整っており、さまざまな研究分野への速やかな波及が見込める。

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

(研究総括)

Opn3をベースとして、Gi型共役型に加え、Gs共役型、Gq共役型およびG12共役型ツールの開発に成功し、GPCRシグナル伝達系の主要4カスケードの光操作を可能とする成果を挙げている。また、UV感受性のbistableオプシンをベースにしたツールを開発し、色によるシグナル伝達のON/OFFの切り替え、さらに色に応じた細胞内cAMPレベルの調節に成功した。さらに、オプシンの新規探索によって、チョウおよびトンボから動物界最長の波長感受性の赤オプシンを見出し、近赤外光で作動する光操作ツールの開発にも成功した。このように、GPCR型光操作ツールは、当初提案の通り、実際に新規に設計して生体内で機能するところまで実証した点は高く評価できる。さらに、波長や性質の異なるGPCRの設計も手掛けており、評価できる。GPCR型のメリットを強調できる系の共同研究者と共にGPCR型オプシンの技術(GPCR型光操作ツール)をさらに普及させて頂きたい。タンパク質の主鎖二面角を5つの領域に分割し、タンパク質の3次元立体構造を主鎖二面角パターンとして捉えることで、タンパク質の二次構造をつなぐループの形状に、いくつかのパターンがあることを発見した。さらに、局所および非局所構造に関するルールを用いることで様々な形状や大きさを持つ α/β 型タンパク質構造の様々なデザイン

ンに成功した。このルールとATP結合・加水分解に関わるP-loopモチーフを組み合わせること
で、リン酸に結合するタンパク質のデザインに成功したことは高く評価できる。タンパク質分子
を自在にデザインする手法を広めて、細胞の制御・設計の基礎分野から、新規素材の開発、新
規医薬品など広い産業分野で貢献すること期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sun L, Kawano-Yamashita E, Nagata T, Tsukamoto H, Furutani Y, Koyanagi M, Terakita A. Distribution of mammalian-like melanopsin in cyclostome retinas exhibiting a different extent of visual functions. PLoS One (2014), 9(9):e108209.
2. Koyanagi M, Wada S, Kawano-Yamashita E, Hara Y, Kuraku S, Kosaka S, Kawakami K, Tamotsu S, Tsukamoto H, Shichida Y, Terakita A. Diversification of non-visual photopigment parapinopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. BMC Biology (2015), 13:73.
3. Kawano-Yamashita E, Koyanagi M, Wada S, Tsukamoto H, Nagata T, Terakita A. Activation of Transducin by Bistable Pigment Parapinopsin in the Pineal Organ of Lower Vertebrates. PLoS One (2015), 10(10):e0141280.
4. Sugihara T, Nagata T, Mason B, Koyanagi M, Terakita A. Absorption Characteristics of Vertebrate Non-Visual Opsin, Opn3. PLoS One (2016), 11(8):e0161215.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

1. Mitsumasa Koyanagi. Molecular properties of diverse and engineered bistable pigments and their optogenetic potential. 16th International Conference on Retinal Proteins. (2014).
2. Mitsumasa Koyanagi. Introduction of animal rhodopsins and their optogenetic potentials. 2015 年光化学討論会 (2015).
3. Mitsumasa Koyanagi. Optical control of cell signaling using bistable animal opsin-based pigments. 17th International Conference on Retinal Proteins. (2016).
4. Mitsumasa Koyanagi. Potential of bistable pigments for optical control of cell signaling. 22nd International Congress of Zoology & 87th meeting of Zoological Society of Japan. (2016).
5. Mitsumasa Koyanagi. Optogenetic potentials of bistable animal opsin-based pigments for regulating GPCR signalings. 第 54 回生物物理学会年会 (2016).

【著書・総説】

1. 小柳光正、寺北明久. “非視覚”型光受容タンパク質 Opn3 とその GPCR 研究への応用.

ファルマシア 50 巻 9 号 (2014).

2. 小柳光正. 「細胞内情報伝達分子の時空間的に精密な制御」 生体の科学 Vol.65 No.5 (2014).
3. Terakita A, Nagata T, Sugihara T, Koyanagi M. “Optogenetic Potentials of Diverse Animal Opsins.” Optogenetics. pp77-88 (Springer) (2015).

研究報告書

「血流による血管ネットワークの制御と再現」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 佐藤 有紀

1. 研究のねらい

血管は、中枢から末梢へ向かって分岐を繰り返し、末梢部では細かい網目状のネットワークを形成している。中枢の太い血管から末梢血管まで、血流量に対応した階層的な循環網と役割分担が確立されている。毛細血管は、損傷を受けてもすぐに再生あるいは迂回路を作ることができる。その一方で、このような末梢血管の可塑性こそが、腫瘍近傍に新たに血管を呼び込むことにつながり、ガン細胞の増殖・浸潤の危険性を高める要因となっている。また、近年の実現可能性が高まりつつある組織の再建研究では、培養条件下の未熟な組織に機能的な血管網をいかにして呼び込むかが重要な課題である。このような背景から、血管形成の制御に直結する研究・技術開発への要請は高い。からだの広域にわたる血管パターンの階層性は、血流循環を介して中央集権的に制御される可能性が高い。このため、形成途中の血管に対する血流操作は血管ネットワークを人為的に制御する有効なアプローチであることが期待されるが、その方法論は確立されていない。本研究では、ウズラ胚血管網への高いアクセシビリティを利用し、生体内の血流を実験的に操作することによって、血管形成のしくみを理解する。血流の構成的変化(流量・速度等)と血管内皮細胞の挙動との相関について、イメージング・定量解析から基礎的な知見を積み上げ、血流の役割を詳細にする。これをもとに、血管パターンを変えうる必要十分な要素を導きだし、血流操作による血管ネットワークの形成制御を試みる。本研究を通じて、実際の生体内において血管ネットワーク形成を自在に操ることができるモデルシステムを確立する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、血管内皮細胞を可視化できるトランスジェニックウズラ胚に第2の心臓(マイクロポンプ)を取り付け、生体内における血流操作を試みた。マイクロポンプを通じてウズラ胚の血管内へ灌流させる血流量・血球数などの要素を変化させ、血管内皮細胞の挙動のタイムラプス観察、定量化を行った。その結果、血流の速さに応じて血管内皮細胞が移動速度および方向を変化させることを明らかにした。また、細い血管から太い血管へのリモデリング過程を血流が制御することがわかった。さらに血管の脈動が空間伸縮刺激として作用し、細胞外基質のフィブロネクチン(FN)の分布パターンを制御することを発見した。この発見をもとに、FNの全く新しいパターンニング機構およびその生物学的意義を解明した。本研究を通じて、血流が血管内皮細胞のみならず、その外側に位置する細胞外基質にもメカニカルストレスとして作用することが明らかとなり、血管と周辺組織の形態形成のカップリング機構の解明に繋がった。

(2) 詳細

研究テーマ A「血管内皮細胞挙動における血流の役割の解明」

卵殻外で培養したウズラ胚の背側大動脈をマイクロシリンジポンプと連結させ、外部からウズラの血液を灌流させる実験システムを構築した。さらに、灌流させた血球細胞と血管内皮細胞の双方を可視化する為、全細胞を可視化できる PGK:H2B-mCherry トランスジェニックウズラ胚から血液を採取し、血管内皮細胞を特異的に可視化する Tie1:H2B-EYFP トランスジェニックウズラ胚へ輸血する手法を確立した。これにより、血管内皮細胞と血球細胞の双方の可視化に成功した。この方法を用いて、血球量を増大させ血流停滞を引き起こす操作を行い、血流停滞が血管内皮細胞の移動停止を引き起こすことを明らかにした(図1)。さらに光刺激による血栓誘導実験を行い、血流が全くない状況下の血管内皮細胞挙動を詳細にした。これらの血流操作実験から、血流存在下の血管内皮細胞は上流に向かって移動し、その結果、上流に位置する血管ほど多くの血管内皮細胞の寄与を受けて太くなること、一方で血流量が低下した領域は太い血管を維持することができず、毛細血管を形成することがわかった(論文投稿準備中)。

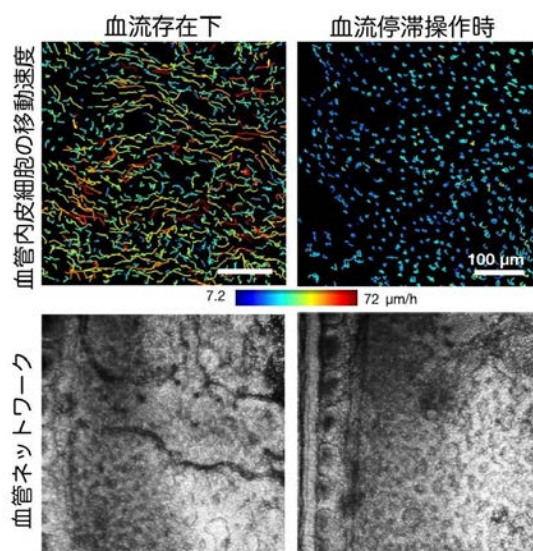


図1 血流操作時の細胞挙動と血管形成への影響

研究テーマ B「脈動ストレスによる細胞外マトリクス制御」

心臓に近い位置に形成される背側大動脈の近傍の空間がどのような分子機構により支持されるのかを明らかにする為、細胞外マトリクスのフィブロネクチン(FN)に着目し、詳細な解析を行った。FNは背側大動脈の側方空間に「ピラー(柱)」様に蓄積し、背側大動脈の周囲の組織群(体節中胚葉と内胚葉)を架橋することを発見した。ピラー様のFN構造体形成には、体節細胞から伸長する長い糸状仮足のインテグリン受容体および細胞内のアダプタータンパク質 Talin を介して起こることを明らかにした。FNの繊維化および束化には、「力」によるFNの unfolding が必須のステップであることから、背側大動脈の脈動に起因する空間伸縮ストレスがピラー形成に作用すると仮定し、検証を試みた。上記の血栓誘導システムを利用して解析を行った結果、血管の脈動が空間伸縮刺激として作用してFNピラーが維持されることが分かった(図2)。さらに、本研究で初めて存在を証明したFNピラー形成に関わる糸状仮足が、分泌

性シグナル分子 Sonic hedgehog (Shh)の伝播にも関わる可能性を示した。これらの成果をもとに、組織構築過程における空間伸縮ストレスの新しい役割を明らかにした(Sato et al.,

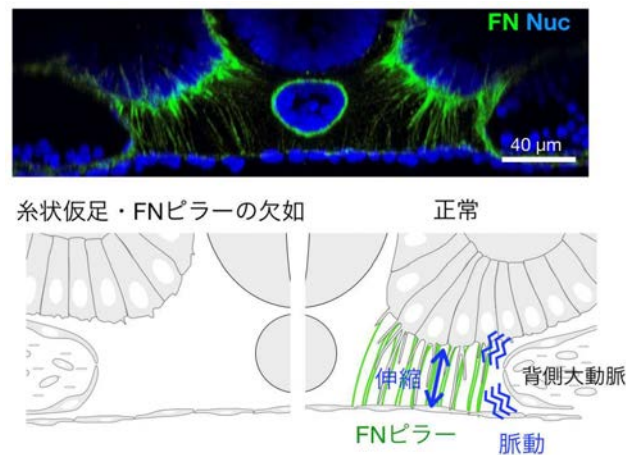


図2 脈動による空間伸縮ストレスがFNピラー形成に関わる

(Development, in press)。

3. 今後の展開

(研究テーマ A の発展)心拍に起因する血液の脈流が血管ネットワーク形成に及ぼす影響を明らかにする為、脈流制御実験を行う。シリンジポンプとピンチバルブを組合せ、血液に脈を付ける灌流システムを構築し、ウズラ胚へ連結する。定常流の場合と脈動制御時とで血管内皮細胞挙動を比較し、脈動の有無や間隔が血管形成に果たす役割を理解する。また、血流が順・逆行を周期的に繰り返す灌流システムを構築する。この実験系を用いて、血流方向変化に対する血管内皮細胞の応答時間を明らかにし、血流の向きを感知する分子機構解明の糸口を得る。

(研究テーマ B の発展)血管脈動による空間伸縮ストレスの生物学的意義をより詳細に理解する為、血管の脈動を模した動きを起こすマイクロデバイスを作製し、ウズラ胚へ取り付け形態形成への影響を調べる。これにより、反復的空間伸縮ストレスの役割および細胞応答の分子機構を明らかにしていきたい。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

研究期間中に米国の共同研究者から血球を可視化できるトランスジェニックウズラ系統を入手できた為、生体に近い条件で血球と血管内皮細胞の多色イメージング解析を実施でき、当初計画以上に精緻な実験システムを構築できた。これを用いて血流操作下における血管内皮細胞挙動の定量データを得ることができ、目的を達成できた(研究テーマ A)。今後は血管パターンニング過程のシミュレーション実験を行い、数理的なアプローチからも仮説を検証する。本研究を進める中で脈流の重要性が浮上してきた為、脈動ストレスによる細胞外マトリクス制御

の課題(研究テーマ B)にも取り組むことができ、論文発表までこぎ着くことができた。

・研究の進め方

研究期間を通じてテクニカルスタッフ 1 名を雇用し、研究を円滑に推進することができた。所属先の異動に伴い、動物飼育施設の新設や実験設備の移設などの為、実験がストップする期間が発生したが、研究費の増額措置を受けることができた為、予算不足で研究が停滞することがなかった。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究成果が起点となり、メカノバイオロジーの観点からの組織形態形成機構の解明が進むことを期待している。また本研究は、培養条件下での再建組織内への血管誘導技術の開発や、血管腫の発症メカニズム解明への応用を強く意識し、生体内血流操作モデルの確立に挑んだ。血流に応答する細胞挙動を数値化できることが大きなメリットである為、創薬標的分子の同定・評価等に利用可能なモデルシステムとしての普及も考えている。さらには医療用のマイクロデバイスの性能向上や、安全性試験の生体モデルとしても貢献できる可能性が高い。今後も積極的に本研究成果を発信していきたい。

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

(研究総括)

PGK:H2B-mCherryトランスジェニックウズラとTie1:H2B-EYFPトランスジェニックウズラとの掛け合わせによって、血管内皮細胞と血球細胞の同時可視化に成功し、これを用いて、血球の流れと血管内皮細胞挙動を解析することが可能になった。このユニークな実験系を確立したことは高く評価できる。さらに、培養条件下での再建組織内への血管誘導技術の開発や、血管腫の発症メカニズム解明への応用を目指し、血管ネットワークの再構築と精密な制御の実現を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Sato Y, Nagatoshi K, Hamano A, Imamura Y, Huss D, Uchida S, Lansford R. “Basal Filopodia and Vascular Mechanical Stress Organize Fibronectin into Pillars Bridging the Mesoderm-Endoderm Gap”. *Development* (in press, *corresponding author)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Sato Y. “Vascular mechanical stress organizes Fibronectin into pillars bridging tissue gap”. 日本生物物理学会第 54 回年会,つくば国際会議場, 11 月 25 日 (2016) 招待講演

2. Sato Y, Huss D, Lansford R, “Dynamic imaging of endothelial cells and circulating blood in developing embryos”. CYMV2015 心血管代謝週間, 神戸, 12 月 10 日 (2015) 招待講演
3. Sato Y, Nagatoshi K, Imamura Y. “Basal Fillopodia and Vascular Pulsing Organize Fibronectin into Pillars That Bridge Somites and the Endoderm”. Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2015, 西安(中国), 9 月 13 日 (2015) 招待講演
4. 佐藤有紀「血管内皮細胞挙動と血流動態の関係性を探る」第 8 回 Symphony, ホテルメトロポリタンエドモント飯田橋, 9 月 27 日 (2015) 招待講演
5. Sato Y, Nagatoshi K, Imamura Y. “Fibrillar Adhesion and Vascular Constriction Regulate Patterned Deposition of Fibronectin Pillars that Bridge Somites and the Endoderm”. 第 48 回日本発生生物学会大会, つくば国際会議場, 6 月 4 日 (2015)
6. Sato Y, Nagatoshi K, Imamura Y. “Filopodia-Mediated Fibrillar Adhesion and Vascular Constriction Facilitate Patterned Deposition of Fibronectin Pillars that Bridge Somites and the Endoderm” 62nd NIBB conference, Force in Development, 岡崎カンファレンスセンター, 11 月 17 日 (2014)
7. 佐藤有紀「血管パターンニングにおける血流の役割」**生体の科学** 65 巻, 5 号, p430-431 (2014)
8. Kanda S, Tanigawa S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Suzuki Y, Sato Y, Hino S, Sander M, Perantoni AO, Sugano S, Nakao M, Nishinakamura R, “Sall1 maintains nephron progenitors and nascent nephrons by acting as both an activator and a repressor”. **Journal of the American Society of Nephrology**. 25, p2584-2595 (2014)

研 究 報 告 書

「精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年4月～平成29年3月

研 究 者: 篠原 美都

1. 研究のねらい

精子幹細胞は一生にわたって増殖し、毎日膨大な数の精子を産生する。幹細胞は精巣に多数(マウス精巣では2-3万個といわれている)あり、精子はそれらが作りだすものの混合体であるが、それぞれの幹細胞が均等に精子を作っているのか、幹細胞の使われ方に偏りがあるのかは不明であった。

本研究では個々の幹細胞が精子形成にどのような動態で寄与するかを明らかにするため、精子幹細胞に試験管内でウイルス遺伝子を感染させ、標識を行った。ウイルス遺伝子はランダムにゲノムに挿入されるため、個々の幹細胞を特異的に標識することができる。この細胞集団を内因性の精子形成が欠損した W マウス精巣に移植した。このマウスの精巣は移植された幹細胞からの精子形成を支持するため、いわば“空”の器の中で精子形成を構築することができる。本研究では、このホストマウスを野生型の雌マウスと交配させ、生まれた仔のゲノムにおけるウイルス遺伝子の挿入パターンから、それぞれの仔がどの幹細胞から生まれたかを判定し、幹細胞が精子形成に寄与する動態の時間的推移を調べた。その結果から幹細胞が精子形成に寄与しうる“機能的寿命”を求めるとともに、数理解析により実際に精子形成に寄与している幹細胞数を推定し、幹細胞が偏って使われているかの判定を試みた。また、それぞれの幹細胞が寄与する間隔を数理解析し、幹細胞の精子形成活性の変動を数式にて表すことを試みた。

また、上記のような幹細胞の活性の変動が、幹細胞のどのような振る舞いによって起きているかについて解明を試みた。幹細胞から精子が形成される効率に影響すると考えられる主要な2つの因子である幹細胞の分裂速度と、その後の分化過程におけるアポトーシス頻度を測定し、精子形成効率への影響を数理解析にて調べた。

精子形成の効率は遺伝病の伝達や、種の進化・保存に影響する重要なファクターである。精子幹細胞の活性の変動や、幹細胞間の競争の存在が明らかになれば、雄の生殖細胞を介する遺伝制御の理解に新たな局面を拓くことになる。また、精子幹細胞の精子形成活性を遺伝子操作などで制御することができれば、家畜の品種改良法に新たな工夫を加えられる可能性や、男性不妊症の治療にも繋がる可能性がある。精子幹細胞をターゲットとして、精子形成活性の制御の可能性を追求することが本研究のねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では内因性の精子形成のない精巣に、ウイルスにより特異的に標識された精子幹細胞集団を移植し、精子形成を再構成することで、個々の幹細胞の精子形成への寄与の動態を調べることを目指した。まず移植によって再構成された精巣が、定常状態を達成している

か否かを検証したところ、移植後2ヶ月ですでに定常状態に達し、正常な精巣に近い精子形成を再現できること、この精巣では約 400–500 個の幹細胞が生着していることが分かった。

この移植の実験系を用いて、レトロウイルスおよびレンチウイルスで標識した幹細胞集団を移植した雄個体を作成し、ホストマウス 10 匹から生まれる仔のゲノム DNA を最長2年にわたってサンプリングした。合計 1325 匹の仔について、サザンブロットニングにてウイルス遺伝子の挿入パターンに基づき、それぞれの仔がどの幹細胞に由来しているかを調べたところ、同じ腹や、違う日に生まれた腹に、同じ幹細胞由来の仔が生まれるケースが頻繁に見られた。全ての幹細胞が一律に精子形成に寄与しているとすると、重複は殆ど起こらないはずであるため、一部の幹細胞が偏って寄与している可能性があると考え、数理解析にて検討した結果、以下のことが分かった。

(1) 幹細胞の機能的寿命(精子形成できる期間)は長く、平均 124 日であり、最も長い例では 482 日である。

(2) 同じ幹細胞から重複して仔が生まれる頻度は有意に高く、一部の幹細胞が偏って使われていることを示している。

(3) 個々の幹細胞からの精子形成数は、増大期と休止期を繰り返す。また、精子形成活性の数式を導くことができ、それによると周期は約 77 日であった。

次に、なぜ精子が形成されない幹細胞があるのかを調べた。造血系では幹細胞そのものが分裂せず休止することが知られている。精子幹細胞で同様に分裂の休止によって精子形成活性が変動しているか否かを明らかにするため、細胞分裂によって蛍光タンパク質の発現が半減する変異マウスを用いて幹細胞の分裂速度を測定したところ、全ての精子幹細胞は休止することなく、常に分裂していることが分かった。一方、精子幹細胞の分化の途中で高い頻度でアポトーシスが起きており、これまで考えられてきたように幹細胞自体の分裂活性が精子形成の効率を決めているのではなく、幹細胞から精子へと分化する過程で、細胞死によって精子形成する幹細胞と、しない幹細胞の選択が起こることが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A 「移植による精子形成の再構成系の検証」

本研究項目では精子幹細胞の移植による精子形成系の再構成系において、移植後どのようなタイムコースで定常状態の幹細胞動態が出来上がるかを検証した。

GFP マウスと野生型マウスの精子幹細胞を 1:6 にて混合した細胞集団を W マウス精巣に移植し、移植後2ヶ月、4ヶ月、8ヶ月にレシピエントマウスの解析を行った。EGFP 陽性コロニー数を UV 照射下で観察してカウントし、さらに二次ホスト(生後6–8週齢の W マウス)へ継代移植を行った。一次コロニー数、および自己複製活性 $= (\text{二次ホストコロニー} \div \text{一次ホストコロニー}) \times \text{Seeding efficiency}(10\%)$ と定めて幹細胞の自己複製活性を求めた。その結果、移植後2ヶ月以降、精巣重量・1次コロニー数、自己複製活性とも有意な変動はなく、移植後2ヶ月にて定常状態の精子形成が再構成されていることがわかった。

また、精巣上体尾部より精子のゲノム DNA を採取し、qPCR 法にて Protamine 遺伝子と EGFP 遺伝子のゲノム量をもとに、精子全体のうち何%が EGFP 陽性細胞由来であるかを測

定した。また EGFP 陽性コロニーの数と EGFP 陽性精子の割合のデータから、精巣全体で何個の幹細胞が精子形成に寄与しているかを算出したところ、約 400-500 個程度であることがわかった。

研究テーマB「精子幹細胞の in vitro のクローナルマーキングによる精子形成への寄与の解析」

本項目では精子幹細胞をウイルスにて in vitro でマーキングし、移植によって幹細胞から産生される仔の幹細胞 origin の解析から、幹細胞の動態をクローナルな視点で解明することを目指した。

Venus を発現するレンチウイルス (CSII-IRES-Venus) を感染した精子幹細胞集団を移植したレシピエント (W マウス) を移植後6週間

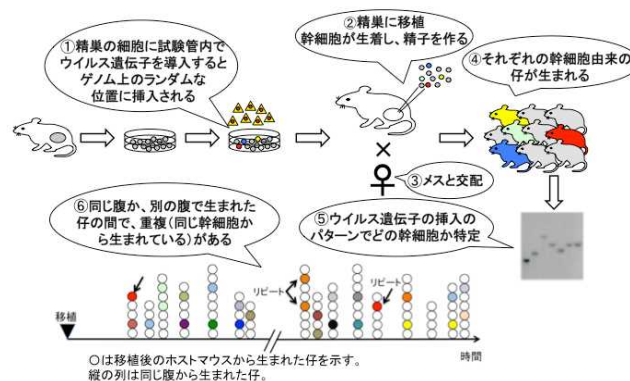


図1

から、野生型 C57BL/6 雌マウスと自然交配し、産仔ゲノム DNA について Venus プローブにてサザンブロッティングを行い、ウイルス遺伝子の挿入パターンから、どの幹細胞由来であるかを分類した(図1)。10匹のレシピエントから得られた1300匹以上の産仔について解析を行った結果、ウイルス遺伝子の入った幹細胞のパターンの総数は310種類であった。Kaplan-Meyer 法にて最短の寿命を求めたところ、平均221日であり、同じクローンが出てくる最長の間隔は、平均で124日、一番長いものでは482日離れて同じクローンが生まれるものがあった。このことは精子形成の1サイクルがマウスでは35日であることを考えると、これらの結果は幹細胞がかなり長期にわたって機能し続ける事を示している。

また、同じ幹細胞由来の仔が重複して生まれる事が頻繁に観察され、実際に限られた数の幹細胞が使われている可能性が示唆された。そこで最尤推定法にて精子形成している幹細胞数を求めたところ、平均188個程度という結果が得られた。この結果は、研究テーマAにおいて求めた総コロニー数が400-500個程度であるのと比較して低く、一部の幹細胞だけが使われている可能性を示唆している。さらにモンテカルロテストにて実際に同じ腹に同じ幹細胞由来の仔が重複して生まれる事象をシミュレーションしたところ、産仔数が多く十分なサンプル数の得られた一部のレシピエントでは観察された重複の頻度はシミュレーションの結果よりも有意に高いことがわかった。

そこで、幹細胞は長期に精子形成するが、その活性は周期をもって変動しているのではないかと考え、どのような周期をもって変動しているかを調べた。同じクローンが離れた腹で出てくる間隔を調べたところ、特定の幹細胞から仔が生まれる頻度は一旦低下したのち上昇し(図2)、幹細胞の活性が burst と休止期を繰り返している可能性が示唆された。このモデルに基づき幹細胞の精子形成活性を表す確率密度関数を導出し、Monte-carlo シミュレーション

により、実測値と一致することを確認した。

研究テーマ C 「精子幹細胞の分裂とアポトーシスの頻度が精子形成効率に及ぼす影響の解析」

本項目では Rosa26 rtTA/tetO-H2B-GFP マウスを用いて、精子幹細胞の分裂速度を測定した。

成体の Rosa26 rtTA/tetO-H2B-GFP 雄マウスに Doxycycline を含有する水を35日間投与した後、精巣を摘出し、flow cytometry により GFP 発現の割合を測定した。未分化型精原細胞マーカーCDH1CDH1 強陽性の精原細胞集団をゲーティングし、GFP 発現細胞の割合を測定した。Doxycycline 投与終了後最長1カ月まで観察を行ったが、GFP の発現は doxycycline 除去後速やかに減少し、半減期約 3.9 日で分裂しており、かつ造血幹細胞のように分裂休止している細胞はなく、全ての幹細胞が活発に分裂していることが分かった。

そこで、精子形成の休止は幹細胞の分裂速度ではなく、その後の分化過程でアポトーシスにより起きているのではないかと考え、Annexin V 染色にて調べた。Rosa26 rtTA/tetO-H2B-GFP マウスの精原細胞は、フローサイトメリーにより精原細胞マーカーCDH1 と GFP 発現にて展開すると、5つの population に分けられる。幹細胞があると推察される最も CDH1 の発現の高い細胞集団が最も GFP 発現が高く、CDH1 発現低下に伴って GFP 発現レベルは低下する。Annexin V 染色の結果、未分化な細胞(CDH1 high)に比べて分化度の高い細胞(CDH1 low, 分化型精原細胞マーカーKIT 発現)ではアポトーシスが活発に起きている事が分かった。さらにこれらのデータをもとに精子幹細胞の分裂とアポトーシスの頻度が精子形成効率に及ぼす影響の数理モデルを構築した。

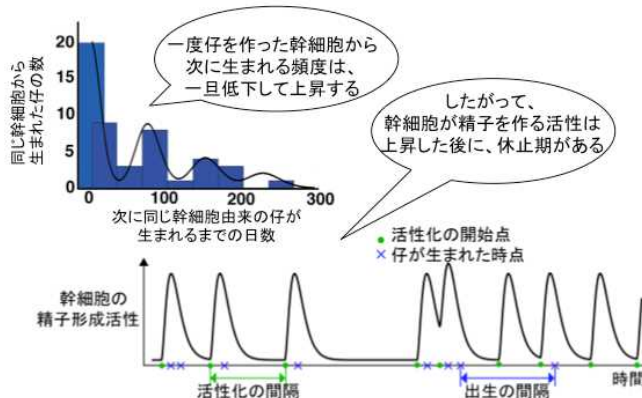


図2

3. 今後の展開

本研究では精子幹細胞の精子形成活性に周期変動があることを見だし、その制御に幹細胞から精子へと分化する過程で起こるアポトーシスが関与している可能性を示した。今後の研究では、(1)幹細胞の精子形成活性の制御に関わる分子機構を明らかにし、その発現操作により精子形成活性を制御する方法の確立を目指す。周期の制御により、特定の幹細胞から精子を選択的に作ることができれば、家畜の品種改良法に新たな工夫を加えられる可能性や、男性不妊症の治療に繋がる可能性がある。また(2)精子形成活性の周期の存在意義は未だ明らかでないが、作られる精子のクオリティーコントロールに必要である可能性もあり、操作して周期を壊すことで検証する。さらに、(3)高齢の男性から遺伝性疾患を持つ子が生まれる頻度が亢進することが知られているが、その原因に周期の破綻が関与している可能性がある。今後の研究では、精子幹細胞活性の周期と疾患の関連についても検討していきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況:本研究の開始時に掲げた課題は、「精子幹細胞の精子形成活性の動態を数理解析にて解く」と、「その動態を制御する」ことであった。前者については計画したこととのほぼ全てを達成し、特に数理解析については当初の予想以上の展開が得られた。一方、後者については現在、精子幹細胞の精子形成活性周期の制御に関わる遺伝子をスクリーニングしながら進めているが、未だ関与が確定できる遺伝子が見いだされていないため、スクリーニング対象を広げながら、継続して行う予定である。

研究の進め方: 本研究は大学院生および実験補助者の協力により行った。研究室外からは大学内の支援センターの技術協力と、数理解析に関して共同研究者の協力を得て遂行した。本研究ではできるだけ既存の機器や大学の共通機器を活用し、研究費の大部分を実験動物の飼育や購入、試薬類の購入など、実際の実験に直接活用できるよう努めた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果: 本研究の成果は、生殖・遺伝のメカニズムについて新たな観点を示した点で社会に学術的な効果を及ぼすと期待できる。また本研究で確立した精子幹細胞の移植を用いた、精子形成系の再構成と幹細胞の動態解析法は、精子幹細胞のみでなく他の幹細胞システムの理解にも役立ち、組織幹細胞に基づく再生医療の発展に寄与しうると考えられる。また本研究を発展させ幹細胞をターゲットとして精子形成を制御できるようになれば、家畜の品種改良や男性不妊症の治療に新たな展開をもたらすことも可能である。

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

(研究総括)

クローナルマーキングした精子幹細胞を、内因性の精子形成のない不妊マウス精巣に移植して精子形成を再構成し、レシピエントから生まれる仔を生涯にわたってサンプリングし、幹細胞の由来を同定した。そして、数理モデルの構築に挑戦し、独自のモデル系を構築できたことは大きな財産である。このような地道な辛抱強い研究から、精子幹細胞の機能的寿命と、全部の幹細胞が均一に精子形成に寄与するのではなく偏りがあること、さらに各幹細胞の活性には周期的変動があること、を次々に明らかにした。また、精子形成活性に休止期があることを発見するなど、予想外の成果も得られた。

精巣内で移植した標識幹細胞からの分化を再構成するというユニークなアプローチと、領域内共同研究によってそのモデル化を成功させたことは大きな成果である。アポトーシスの関与という新たな視点からの研究の展開も期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mito Kanatsu-Shinohara, Takashi Tanaka, Narumi Ogonuki, Atsuo Ogura, Hiroko Morimoto, Pei Feng Cheng, Robert N. Eisenman, Andreas Trumpp, Takashi Shinohara.
Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal.

Genes & Development In press

2. Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Lei Z, Rao CV, Shinohara T. The luteinizing hormone-testosterone pathway regulates mouse spermatogonial stem cell self-renewal by suppressing WNT5A expression in Sertoli cells. **Stem Cell Reports** 2016, 7(2):279-91
3. Kanatsu-Shinohara M, Naoki H, Shinohara T. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. **Dev Cell** 2016, 38 (3): 248-61
4. Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Shinohara T. Fertility of male germline stem cells following spermatogonial transplantation in infertile mouse models. **Biol Reprod** 2016, 94(5):112
5. Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Shinohara T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by the stem cell dye CDy1. **Biol Reprod** 2016, 94(1):13

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

口頭発表

1. Takashi Shinohara, Honda Naoki, and Mito Kanatsu-Shinohara “Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells”文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」による国際シンポジウム 平成 28 年 2 月 17 日-19 日

ポスター発表

1. Mito Kanatsu-Shinohara, Hiroko Morimoto, and Takashi Shinohara “Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by a stem cell dye CDy1”文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」による国際シンポジウム Epigenome Dynamics and Regulation in Germ cells Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University 平成 28 年 2 月 17 日-19 日

プレスリリース

- 1.「一つの幹細胞からできる精子の数は周期的に変動することを発見、一つの幹細胞からできる精子の数は周期的に変動することを発見」 2016 年 8 月 9 日

科学技術振興機構(JST)ホームページ

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160809/index.html>

京都大学広報ホームページ

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/160809_1.html

新聞記事

1. 「効率が種の保存左右 精子形成に周期あり 精巣幹細胞分化が鍵」 科学新聞 4面

2016 年 8 月 12 日

2. 「精子幹細胞研究成果 京大グループ 形成周期的、遺伝子に偏り」 京都新聞 25 面
2016 年 8 月 19 日

一般向けのイベントにおける研究紹介

1. 篠原美都「幹細胞が精子を作る活性には周期がある」 京都大学アカデミックデイ 2016
京都大学百周年時計台記念館 平成 26 年 9 月 18 日
<http://research.kyoto-u.ac.jp/academic-day/2016/>

研 究 報 告 書

「力のベイズ推定から解き明かす組織の変形と力」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研 究 者: 杉村 薫

1. 研究のねらい

力のベイズ推定法による力の動態の定量化、力学的・遺伝学的摂動実験、組織の力学モデリングを統合した独自のアプローチを展開し、ミクロスコピックな分子の活性からマクロスコピックな組織の機械物性と変形を階層横断的に解き明かすことを目指す。本研究で得られた知見は、上皮組織の変形と力を操作し、構成的に理解するための基盤になりうる。

2. 研究成果

(1) 概要

個体発生とは、体の前後軸などの空間情報をもとに、細胞が増殖・分化し、組織が変形することで、生き物が形づくられる過程である。このとき、体を引きのばす、曲げるなどのダイナミックな変形を駆動するのが機械的な力である。個体発生の主要なシグナル伝達経路が同定された今、機械的な力がいかにして生き物の形づくりを制御するのか? という問いに注目が集まっている。このような問いは、一般に力学という学問で扱われる。物質に力をかけたときにどれくらい変形するのかは、それぞれの物質の機械物性により決まり、この力と変形、機械物性の関係を理解するのを目指すのが力学である。生体組織でこの三者の関係を調べることは難しく、研究が進んでいなかった。

生体内力計測が難しいという技術的困難を克服するために、私たちは以前、細胞のかたちから細胞の圧力と細胞接着面の張力をベイズ推定する手法の開発に成功していた。圧力と張力を足し合わせることで、応力テンソルを計算できる。本研究では、この力のベイズ推定法を活用することで、機械的な力による上皮形態形成制御機構を構成的に理解することを目指す。

私たちは、まず、成長する上皮組織の応力と変形を一元的に定量する手法を開発し、世界で初めて組織全体で応力の時空間マップを測定することに成功した。続いて、石原秀至明治大学准教授と共同で、これらの定量データと対応可能な新しい連続体理論を構築した。さらに、力のベイズ推定法をもとに、力と変形をつなぐ機械物性を簡便に評価する方法を開発し、ショウジョウバエの上皮組織における細胞配置換え速度を決定する力学メカニズムを示唆する結果を得た。最後に、力が形態形成の「方向情報」をコードしているという私たちの過去の研究成果を発展させて、細胞が応力場を読み取り、分子の動態を制御して、細胞配置換えを駆動する仕組みを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ A 「上皮組織の力と変形の一元的定量化手法の開発」

細胞分裂などの細胞の動態が時空間的に精緻に制御されることで、組織が正しい形に成長

する。このとき、細胞の動態や分子の活性・局在が応力場を変化させる一方で、これらは組織応力の制御を受ける。私たちは、このような細胞と組織の階層間の関係を明瞭に記述するために、以下の定量手法を開発した。ショウジョウバエ翅全体の発生過程を長時間に渡り観察した動画から、1 動画あたりのべ 2×10^6 個の細胞形態を抽出する画像処理プロトコルを開発した。このデータに力のベイズ推定法を適用することで、世界で初めて、応力の時空間マップを組織全体で定量化することに成功した。さらに、フランスのグループが開発した組織の変形、①細胞の変形、②細胞の再配置、③細胞分裂/細胞死を同一の「単位」で定量し、①-③の細胞動態の組織変形への寄与を定量的に解析できるテクスチャーテンソル手法と力のベイズ推定法を統合することで、上皮組織の力と変形の一元的に定量化する強力なパイプラインを構築した (Guirao et al. *eLife*, 2015)。

研究テーマ B 「生体上皮組織の新しい連続体モデルの構築」

生体組織、特に上皮組織の変形を扱う理論モデルとして、Cell Vertex Model などの個々の細胞が陽に表されるモデルがよく用いられる。離散モデルは、細胞変形やタンパク質の細胞内局在を扱いやすいという利点を持つが、組織スケールと細胞スケールの力・変形を解析的に結びつけるのには適さない。一方で、骨などの成体構造の力学特性を解析するのに使われてきた弾性体理論などの連続体モデルは、細胞という内部構造を無視しており、細胞動態が中心的な役割を果たす組織成長過程を扱うには粗すぎる。そこで、私たちは、離散モデルと連続体モデルの両者の強みを合わせ持つ理論モデルとして、細胞の形態や配置関係を内部自由度に持つ新しいクラスの連続体モデルを構築した (Ishihara, Marcq, Sugimura. Submitted; A.の実験手法により計測される応力テンソルや変形テンソル(テクスチャーテンソル)と対応する形式でデザインされている)。新しい連続体モデルは、既存モデルでは困難だった細胞スケールの諸過程(例: 細胞増殖、分子活性)と組織スケールの変形・応力という異なる階層の関係を明瞭に記述することができ、当該分野における汎用的かつ強力なツールになることが期待される。

研究テーマ C 「細胞配置換え速度を決定する力学メカニズムの解析」

「力」と「変形」と「機械物性」のうち、我々は、力と変形の定量手法を開発してきた。例えば、上述のように、力のベイズ推定法を用いれば、上皮細胞のかたちから、細胞の圧力と細胞接着面の張力の時空間マップを計測することができる。しかしながら、磁気ピンセットなどの既存の細胞機械物性の測定手法は歩留まりが悪いので、対応する時空間情報を得ることが非常に困難である。したがって、細胞の機械物性を新しい視点、アプローチで定量することができれば、組織力学の研究を大きく発展させる可能性がある。

私たちは、上皮組織で細胞の機械物性を簡易に調べるために、力のベイズ推定法を活用した新しいアプローチを採用した。機械物性は力と変形の関係から求められるので、力のベイズ推定法で定量した力を変形(もしくは形)に対してプロットすることで、細胞の機械物性を評価する。この手法により得られたデータは、2*。 非公開の研究成果に記載した。

研究テーマ D 「外力駆動型の細胞配置換えを支えるアクチン細胞骨格制御の解明」

最近の研究により、細胞が化学的シグナル伝達を感知し、組織形態形成を引き起こす力を生成するメカニズムが明らかになってきた。例えば、細胞は、組織のグローバルな極性を読み取って、分子モーターの細胞内局在を偏らせる。その結果、細胞接着面の張力の強さに偏りが生じ、細胞配置換えが引き起こされる。対照的に、私たちは以前、グローバルな機械シグナル（すなわち、組織の外から働く引っ張り力によって生成された組織応力の異方性）が、ショウジョウバエの翅において遠近軸に沿った細胞配置換えを駆動することを明らかにしていた。しかしながら、細胞が外力を感知し、読み取った機械情報を、細胞配置換えを制御する分子機構に伝達するメカニズムは、未知のままである。

これらの問いに答えるために、私たちは、細胞内局在を指標としたアクチン結合タンパク質のスクリーニングを実施した。その結果、Actin interacting protein 1 が組織応力の方向を感知して前後軸方向の細胞接着面に濃縮し、アクチン細胞骨格や細胞接着の再編成を制御することで、遠近軸に沿った細胞配置換えを駆動することを明らかにした（Ikawa, Sugimura. In prep.）。

研究テーマ E. その他

機械的な力による上皮の構築と維持に関する共同研究を実施した（Kajita et al. *Nat. Commun.*, 2014; Arata, Sugimura, Uemura. Submitted; Ishimoto, Sugimura. Submitted）。

3. 今後の展開

研究テーマ A, B からの発展.

遺伝学的に応力場や化学極性シグナリングを攪乱し、翅の形態が変化した個体を対象に、構築した定量手法と理論モデルの統合解析を実施することで、分子や細胞などの個々の構成要素の振る舞いから、機械的な力を介して、細胞集団の秩序だった形が生みだされるメカニズムの解明に取り組んでいきたい。

研究テーマ C からの発展.

本研究で開発した簡易評価法を利用して、細胞の機械物性という新しい指標に基づく遺伝学スクリーニングを実施する。まずは、細胞配置換えの速度と方向を決定する分子メカニズムを解明することを目指す。

研究テーマ D からの発展.

本研究で明らかになったメカノセンシング機構が、プログラム細胞死など、個体発生その他のコンテキストにおいて働いている可能性について検証する。

将来的には、特定のモデル系の各論を超えて、複数のモデル系の発生現象を統一的に説明できるようなコンセプトの導出を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究成果で記載したほぼ全てのデータが、スピニングディスク型共焦点顕微鏡システムが構築され、研究補助者が研究室に加わった2014年4月以降に取得された。さきがけの支援を受けたことで、組織の変形と力、機械物性を理解するための定量手法と理論モデルの開発など、研究を発展させることができた。概ね、申請書の提案に沿うかたちで研究を進めてきたが、研究プロジェクトDにおいて、アクチン構造多型の多細胞生命現象における意義を示唆する結果を得られたことは、予想以上の成果であった。

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

(研究総括)

ショウジョウバエの翅全体の発生過程を長時間に渡り、タイムラプス観察したデータから、細胞形態を抽出する画像処理プロトコルを開発し、世界で初めて組織全体で応力の時空間マップを定量することに成功した。さらに、組織応力と組織変形、細胞レベルの形態形成プロセスを統合的に解析する強力なパイプラインを開発した。こうしたハード・ソフト両面の手法開発によって、当初の目的に沿った研究成果を出したことを評価したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Kajita M, Sugimura K, *Fujita Y et al. (20人中2番目). Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. Nat. Commun. 2014, 5, 4428. |
| 2. Guirao B, Rigaud SU, Bosveld F, Bailles A, López-Gay J, Ishihara S, Sugimura K, Graner F, Bellaïche Y. Unified quantitative characterization of epithelial tissue development. eLife 2015, 4, e08519. |
| 3. Sugimura K, Lenne PF, Graner F. Measuring forces and stresses in situ in living tissues. Development 2016, 143, 186–196. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

1. 日本生物物理学会若手奨励賞受賞(H26.9)

著作物

1. 杉村 薫, 石原秀至.「組織の力場の定量生物学」. 小林徹也(編)「定量生物学」第八章.

学会発表

1. Sugimura K, Ikawa K. 第 54 回日本生物物理学会 2016 年 11 月 25 日

2. Sugimura K, Ikawa K. 第 39 回日本分子生物学会 2016 年 12 月 1 日

3. Sugimura K, Ikawa K. リーディングプログラム主催国際シンポジウム IGER International Symposium on “Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage” -アクチン研究の今:新たなステージを迎えるモータータンパク質研究- 2016 年 12 月 13 日

研究報告書

「神経スパイク列の再構成から迫る神経活動依存的な神経回路形成機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 竹内 春樹

1. 研究のねらい

高等動物の脳のもつ高度な情報処理能力は、 10^8 を超える神経細胞が構築する複雑かつ精緻な神経回路によって担われている。この神経回路の形成不全は様々な神経疾患の原因となることから、『神経回路がどのように作られるのか』を明らかにすることは脳機能の理解、並びに神経疾患治療の観点からも重要であると考えられる。

高等動物の神経回路は、臨界期と呼ばれる生後の限られた期間に生じる神経活動を介して成熟することが知られている。神経活動は、活動電位と呼ばれる電気的パルス単位とするスパイクの列として検出されるが、経時的に変化するスパイク列のパターンがどのように細胞内のシグナル伝達系に読み取られ適切な回路が形成されるのかに関しては殆ど解明がなされていない。本研究では、解剖学的に回路構造が単純で神経回路形成研究の優れたモデルであるマウス嗅覚系を用いて、神経活動依存的な回路形成メカニズムの解明に挑む。

マウスの嗅覚系では、個々の嗅覚神経細胞(以下嗅神経)で発現する単一の嗅覚受容体(olfactory receptor: OR)遺伝子が細胞の個性を決定する。同種のORを発現した嗅神経の軸索は互いに収斂して嗅球の特定の糸球体へと投射する。このOR依存的な軸索投射は、OR分子が複数の軸索ガイダンス分子の遺伝子発現を調節し軸索末端に『分子コード』を作り出すことによって達成される。その際、これら軸索ガイダンス分子群の発現は嗅神経で生じる自発的な神経活動によって影響を受けることから、ORの種類に依存した『分子コード』は神経活動を介して形成されると考えられる。しかしながら、OR分子の違いがどのように神経活動の中に表現されるのか、また神経活動がどのように複数の軸索ガイダンス分子の発現を制御しているのかといった具体的なメカニズムについては殆どわかっていない。そこで本研究では、近年目覚ましい発展を遂げた光遺伝学、光イメージングの手法を用いて神経活動を観察・操作し、神経活動依存的な回路構築メカニズムの解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

マウス嗅覚系におけるOR分子依存的な軸索投射は、神経活動を介した複数の軸索ガイダンス分子の発現制御によって達成される。個々の軸索ガイダンス分子の発現は発現するOR分子に依存しているものの、軸索ガイダンス分子間での発現パターンは大きく異なっている。このことから、以下の 2 つ疑問が想定される。一つは、どのようにORの種類という情報が神経活動の中に表現されるのか(研究テーマ1)、もう一つは神経活動を介してどのように軸索選別分子の多様な発現パターンが作り出されるのか(研究テーマ2)である。そこで本研究では、嗅神経の神経活動を観察・操作することを通じて上記の 2 つ問題の解明に努めた。まず一つ目の問題を明らかにするために、カルシウムイメージング法を用いて嗅神経の神経活動

を可視化し、時間変化のパターンを解析した。その結果、発生期に生じる神経活動のパターンと発現するORの種類との間に相関関係があることを明らかにした。

次に、神経活動がどのようにして軸索ガイダンス分子の多様な発現パターンを作り出しているかを明らかにするために、光遺伝学の手法を用いて嗅神経の神経活動を操作する系を構築した。その後、嗅神経に光照射によって人為的に様々な神経活動パターンを作り出し軸索ガイダンス分子群の発現変化を調べた。その結果、神経活動の異なる発火パターンに対して異なる軸索ガイダンス分子の発現が影響を受けることがわかった。これらの光刺激依存的な遺伝子の発現上昇はカルシウムイオン依存的であったことから、神経活動に伴って変化する細胞内のカルシウム濃度変化を細胞内の複数の転写因子がそれぞれ独自の読み枠で読み取ることによって多様な発現パターンを生み出しているという可能性が示唆された。

以上より、嗅覚系における神経活動はORの種類という神経個性を自身の経時的な発火のパターンへと変換し、ORの種類に固有な遺伝子発現を制御すると考えられた。このモデルは、既存のよく知られたヘブ則とは異なるものであり、本研究を通じて活動依存的な回路構築の新しいメカニズムの存在を見出すことが出来た。

(2) 詳細

研究テーマ A 「どのように嗅覚受容体(OR)の種類という情報が神経活動の中に表現されるのか→カルシウムイメージング法による嗅神経の神経活動の可視化」

嗅神経の自発的な神経活動を可視化するためにカルシウムイメージング法を導入した。我々は、遺伝子改変技術を用いて現時点(2016 年 12 月現在)で最高感度の蛍光カルシウムセンサーである GCaMP6f を嗅神経特異的に発現する変異マウスを作製し、嗅神経の自発的な神経活動の可視化に初めて成功した。またこのマウスの嗅覚組織スライスをニポウディクス型共焦点顕微鏡下で観察することで、一度に大多数の嗅神経から長期間に及ぶ神経活動の記録に成功した。特定のORを発現する嗅神経における神経活動に着目して解析を進めたところ、発生期に生じる神経活動のパターン(カルシウムスパイク頻度、スパイクの形、スパイク間の間隔)と発現するORの種類との間に相関関係があることがわかった。

続いて、遺伝子改変技術を用いてOR遺伝子のプロモーターを変えずにOR遺伝子だけを入れ替えた変異マウスを用いて同様の実験を行ったところ、発現するORに依存して神経活動パターンが変化した。このことから、嗅神経における自発的な神経活動は発現するORによってそのパターンが制御されているものと推察された。

研究テーマ B 「神経活動を介してどのように軸索選別分子の多様な発現パターンが作り出されるのか→光遺伝学を用いた神経活動操作による遺伝子発現変化の観察」

研究テーマ1で、ORの種類と神経活動パターンに相関が見られたことから、神経活動のパターンが軸索ガイダンス分子群の多様な発現を作り出している可能性が考えられた。この仮説を検証するために、まず遺伝子改変技術を用いてチャネルロドプシン2という光活性化型オプシンを嗅神経特異的に発現させる遺伝子改変動物を作製した。この変異マウスの嗅神経に光パルス照射することで、40Hz までの高周波数の神経活動をシング

ルスパイクレベルで制御できることを確認した。その後、発火頻度を揃えて嗅神経に様々な神経活動パターンを作り出し、軸索ガイダンス分子群の発現への影響を検討した。その結果、異なる神経活動のパターンに対して異なる軸索ガイダンス分子の発現量が上昇することがわかった。カルシウムイオンをキレートした状態では軸索ガイダンス分子の発現上昇は観察されなかったことから、神経活動に伴って変動する細胞内のカルシウム濃度が重要であることが示唆された。

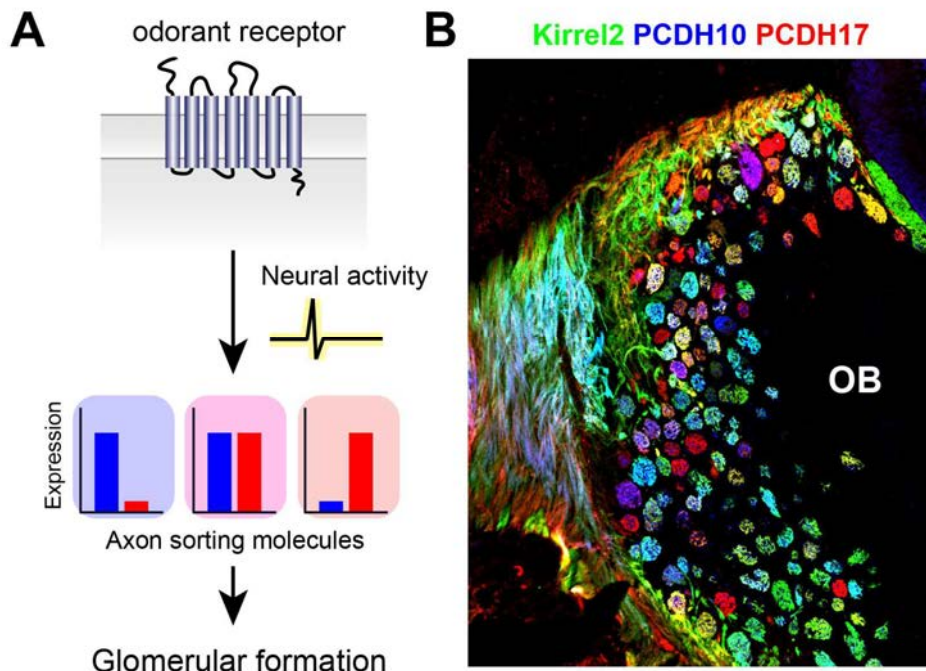


図1. 本研究を通じて明らかとなったマウス嗅覚系における
神経活動依存的な回路形成メカニズム

(A) 嗅覚受容体 (OR) は、嗅神経の自発的な神経活動のパターンを制御する。OR に固有な神経活動のパターンは複数の軸索ガイダンス分子 (axon sorting molecule) の発現量を調節する。これにより軸索末端に OR の種類に固有な『分子コード』が作り出され、適切な神経回路 (glomerular formation) が形成される。

(B) 3 種類の軸索ガイダンス分子の嗅神経軸索における発現パターン。軸索末端では軸索ガイダンス分子の種類と量からなる『分子コード』が形成される。OB: olfactory bulb

3. 今後の展開

本研究では、神経活動パターンが遺伝子の発現制御を介して回路構築に貢献するというメカニズムの存在を明らかにした。これは、ヘブ則として知られる神経細胞間の同期的な活動を利用したこれまでの回路形成メカニズムとは、時間スケールの長さや遺伝子発現を介するという点で大きく異なっている。従って、本研究で得られた知見は活動依存的な回路形成原理の新しいメカ

ニズムであると考えられる。

今後は、嗅覚受容体がどのように自身の種類を反映した神経活動パターンを作り出すのか、また経時的に変化するカルシウム動態をどのように下流の因子がパターン特異的に読み取るのといった問題を明らかにしていく必要がある。また、本研究で見出された回路形成のメカニズムが他の脳領域にも当てはまる敷衍的な原理であるかどうかを検証することも重要な課題であると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の目的は、嗅覚系における神経活動依存的な回路構築メカニズムを明らかにすることであった。研究結果に示した通り、既存のモデルに当てはまらない新しいモデルの存在を示唆するデータを得ることが出来た。また単純な観察結果に留まらず、光遺伝学を使って神経活動パターンと遺伝子発現との間の因果関係を明らかにすることが出来た点には満足している。当初予定していた目的については概ね計画どおり達成することが出来たと考えている。しかしまだ一本の細い道筋がついた程度に過ぎず、今後より実験を積み重ねることでより信頼性の高いモデルとして主張することが出来るようになると思われる。また、本研究を通じて更なる疑問が生まれてきている。これらを一つ一つ解決していくことを通じて、回路形成に関するより本質的な理解を深めると共に、研究のオリジナリティを高めていく必要があるだろう。

また本研究領域では、領域内メンバーとの交流、共同研究が強く奨励された。本領域は異分野の研究者が集まる非常にヘテロな集団であり、さきがけ研究開始当初、共同研究はおろか、研究内容すら理解することができなかった。しかしながら数回に及ぶ勉強会の甲斐もあり、複数の研究者と気軽に情報交換できるところまで親密になれたこと、また複数の共同研究に発展する可能性のあるプロジェクトを開始できたことについてはとても満足している。

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

(研究総括)

特定の嗅覚受容体を発現する神経細胞を遺伝子改変技術によって蛍光標識し、電気生理学的手法によって神経活動の記録に成功し、その結果、発現する嗅覚受容体ごとに神経発火のパターンが異なっていることが判明した。神経細胞の発火パターンを得意とする池谷研究室との連携が功を奏したと言える。さらに、カルシウムインディケーターである GCAMP6f を用いたカルシウムイメージングによって一度に多数の神経細胞の活動パターンを記録することに成功し、細胞間の同期的活動性の有無などを検証することが出来たことは、今後の発展につながる大きな成果と評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Eerdunfu, Ihara N, Bao Ligao, Ikegaya Y, and Takeuchi H

“Differential timing of neurogenesis underlies the dorsal-ventral topographic projection of olfactory sensory neurons” <i>Neural. Dev</i> submitted
2. Ihara N, Nakashima A, Hoshina N, Ikegaya Y and <u>Takeuchi H</u> “Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons” <i>Eur. J. Neurosci</i> 2016, Vol.44(3), 1998–2003 Featured in World biomedical Frontiers[ISSN:2328-0166]
3. <u>竹内春樹</u> “嗅覚情報処理を担う神経地図形成の分子基盤” 生体の科学 増大特集 生命動態システム 2014, Vol.65,10 月号
4. <u>Takeuchi H</u>, and Sakano H “Neural Map Formation in the Mouse Olfactory System.” <i>CMLS</i>, 2014, Vol71, 3049–57
5. ※Nakashima A, ※<u>Takeuchi H</u>, Imai T, Saito H, Kiyonari H, Abe T, Chen M, Weinstein LS, Yu CR, Storm DR, Nishizumi H, and Sakano H “Agonist-Independent Receptor Activity Regulates Axon Targeting of Olfactory Neurons.” <i>Cell</i>, 2013, Vol.154 1314–1325 ※ equally contributed

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

1.Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H “Patterned spontaneous activity regulates OR-specific axon sorting”Keystone Symposia “Synapses and Circuits” (New Mexico, USA), 2017/3/5–8

2.Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H “An instructive role for spontaneous neural activity in glomerular map formation”CSHL meeting “Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration” (New York,USA), 2016/9/20–24

3.Takeuchi H “Patterned spontaneous activity regulates OR-specific axon sorting”
KoSCL symposium (Seoul, Korea), 2016/10/28–29

4.Takeuchi H, Ihara N, Nakashima A and Ikegaya Y “Differential expression of axon-sorting molecules in mouse olfactory sensory neurons”Society for Neuroscience 2016 (San Diego, USA), 2016/11/12–16

5.Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and Ikegaya Y “Activity-dependent olfactory neural circuit formation” 日本神経科学大会, 横浜, 2016/7/20–22

6.Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H “Activity dependent mechanisms of the olfactory map formation” ISOT2016 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

7.竹内春樹、中嶋藍 “嗅覚神経地図形成の分子基盤” 生命動態システム科学四拠点・CREST・PREST 合同シンポジウム, 2015/3/16-17

【受賞】

1.日本神経科学学会「奨励賞」(2016)

研究報告書

「多細胞系からなる複雑なヒト臓器の人為的構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 12 月 - 平成 29 年 3 月

研究者: 武部 貴則

1. 研究のねらい

人工多能性幹細胞(iPS 細胞)等の幹細胞を用いた再生医療の実現を目指す上では、目的とする機能細胞のみならず、血管や血液、間質、神経などの支持細胞を含む立体的な複雑構造の時・空間変化を再現することが必要であるという仮説が有力になりつつある。これらを実現するために、多種多様な細胞間相互作用を多能性幹細胞に由来する器官創出系に応用する革新的な 3 次元(4次元)培養系が待望されていた。

近年、われわれは、試験管内においてヒト iPS 細胞から立体的な肝臓の原基(肝芽)の自律的な複合組織化(自己組織化)を誘導できることを示してきた。すなわち、前腸内胚葉からの出芽により形成される肝芽(Liver Bud)の誘導に必要な間葉系前駆細胞、血管内皮前駆細胞と肝内胚葉細胞との細胞間相互作用を模倣する培養系を確立してきた。本法により、特別な条件下で未分化な 3 種類の細胞(内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞)を共培養すると、培養 48 時間程度で細胞が集合し、数日の培養により立体的な肝芽が形成される。しかしながら、肝臓原基が自律的に形成されるメカニズムは全く未解明であった。

本研究では、まず iPS 細胞由来肝芽の自己組織化現象を細胞動態の数理解析および、分子細胞生物学的手法で解析することにより、肝臓原基形成のメカニズム解明を目指した。次に、肝臓原基を創出するために必須となるパラメータを検討し、細胞外部、および内部環境における条件の最適化を図った。さらに、肝臓以外のさまざまな臓器における器官原基(臓器の芽: Organ Bud)を人為的に創出するための培養法および移植操作技術の確立を行った。以上を通じて、多細胞系から複雑なヒト組織を構成するための基盤技術である器官原基法(Organ Bud Generation 法)という新規概念の有効性実証を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

近年われわれは、器官形成期に生じる細胞間相互作用を再現する特殊な培養により、ヒト iPS 細胞由来肝内胚葉細胞から巨大な肝臓原基が自律的に形成されることを発見した。本現象では、まず多数の細胞が巨大集合体を形成し(Self-condensation)、その後器官原基が自己組織化(Self-organization)する。本研究ではこのメカニズムを詳細に解析したところ、立体的な肝臓原基の作製には 1. 間葉系細胞を起点とした細胞集合体の力学的な収縮、および 2. 最適な物理因子を有する外部環境(硬さ環境など)の設計、が必要であることを明らかにした。さらに、このメカニズムを他器官原基の作製に応用した結果、肝臓のみならず、膵臓、腎臓、腸、肺、心臓、脳、がん細胞などを含む複数種類の細胞から 3 次元的な血管化された複合組織を創出することに成功した。創出された 3 次元器官原基は、移植後すみやかに血流を有する血管網を再構成するのみならず、機能的な組織を自律的に形成した。中でも、腎臓原

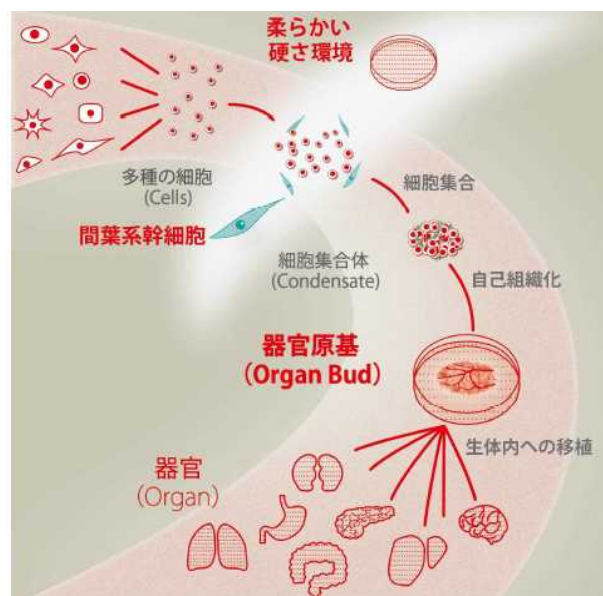
基や膀胱原基を移植した群においては、最終的に尿を産生する腎組織や、糖尿病治療効果を有する膵組織を生み出すことが示されている。本技術は、複雑構造を有した組織形成を実現する画期的な技術基盤であり、さまざまな器官の再生医療への応用のみならず、新たな医薬品開発のツールとしての応用が強く期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「器官原基形成メカニズムの解明」

器官原基形成が、迅速な集合反応 (Self-condensation) により細胞集合体が形成された後に、内皮細胞によるネットワーク形成といった自己組織化 (Self-organization) を通じた空間の再構成が生じ、器官原基 (Organ Bud) が形成されるという2段階の反応で説明できることを見出した。さらに興味深いことに、器官原基形成の第一ステップ (Self-condensation) では、その急激な細胞集合体収縮ダイナミクスは、化学分野で扱われる粘弾性体の収縮を記述するための数理モデルである Kelvin-Voigt model で良く近似できることがわかった。つまり、細胞集合体の形成と収縮現象が、個々の細胞の自律的遊走ではなく、多数の細胞系における力学的な収縮によるものであることを示唆する結果を得た。

このような異分野の考察からのアナロジーに基づき、薬理的阻害剤や、細胞種特異的ノックダウンなどの分子生物学的検討を加えたところ、間葉系細胞における細胞骨格系タンパク質の収縮力が、Self-condensation の駆動源であることが示された。

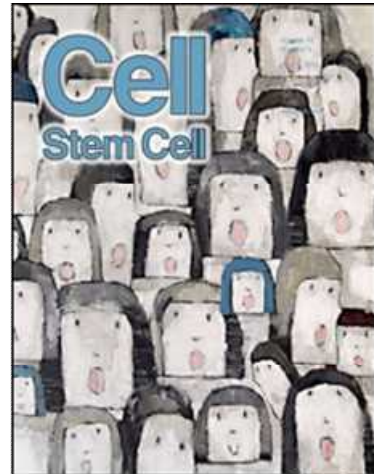


研究テーマ B「細胞外部環境の再設計に基づく器官原基形成の人為制御」

以上のような力学的な細胞集合体形成メカニズムを活用し、次にこれらを人為的に制御するための培養外部環境の再設計を図った。具体的には、細胞播種を行う培養基板上の「生化学的因子 (ラミニン、エンタクチン、フィブロネクチン等)」と、「物理的因子 (硬さ)」の双方を自在に制御可能なハイドロゲル基板を用いて、さまざまな培養条件の比較検証を実施した。その結果、基板の硬さ (ヤング率, E) が、細胞の接着力や収縮力など力学的相互作用に最も強く影響を与えることが強く示唆され、細胞集合体の形成は $E \sim 10$ kPa 程度の硬さ条件でのみ効率的に誘導されることがわかった。本結果は、ミリメートルに渡る大きなサイズスケールの場合、細胞—細胞間の収縮力・接着力と、細胞—外場間の接着力との間に力の競争が存在し、ゲル基板の硬さがその制御パラメータであることを示していると考えられた。上記の結果から、最適な力学条件を有するゲル基板の設計を行うことで、多細胞系から器官原基が形成される過程を制御する手法の確立に成功した。これらの技術は特許出願を行い、企業への技術導出を行った。

研究テーマ C「器官原基法を用いたさまざまな器官への応用」

至適な硬さ環境における間葉系細胞を起点とした収縮現象が、自律的な細胞集合現象 (Self-condensation) に重要であることが示されたため、本法は胚葉の由来に関係なく、他臓器の自己組織化培養に拡張することができるものと考えられた。そこで、さらなる汎用性を評価するために、胚や成体マウスの複数臓器から細胞を単離し、本法により共培養を行ったところ、細胞集合現象による複合組織形成は、肝臓のみならず、内胚葉性臓器の膵臓・腸・肺、中胚葉性臓器の心臓・腎臓・軟骨、外胚葉性臓器の脳、さらには癌を含むすべての細胞種でも保たれていた。再構成された膵臓原基は劇症1型糖尿病の疾患モデルマウスへの移植により、優れた治療有効性を示すことが明らかとなった。一方、作出した腎臓原基は移植により数日で血液を濾過する原尿生成機能を有した糸球体様組織を再構成することが明らかとなった。以上の結果は、Cell Stem Cell 誌に報告を行うことができた。本成果は同号の表紙を飾ったことに加えて、Cell Stem Cell 誌が年間を通じて最も優れた研究成果を紹介する Best of Cell Stem Cell に選出されるなど世界的にも大きな注目を集めた。



Cover workに選出

また、さがけ研究期間で当初計画想定していなかった進展として、血管や神経を欠く極めて単純な構造として知られている軟骨組織においても、血管系の一過的な再構成とその排除を伴うことが効率的な軟骨発生に重要であるという全く新たな原理を世界で初めて明らかとした。この知見に基づき、ヒト弾性軟骨を効率的に再構成するための技術を新たに確立し、J Clin Invest 誌に報告するとともに、特許出願・各国移行を行った。

以上から、当初計画で想定していた内容として、メカニズム解明からの横展開(多臓器への応用)を中心に、概ね達成することができた。また計画を超えて、軟骨組織の新たな発生原理を解明するなど予期せぬ知見も得ることが出来た。今後は、縦への展開(肝臓分野におけるさらなる発展技術開発)を中心に、複雑臓器の人為構成モデルの確立を目指す。

3. 今後の展開

今後は、本研究期間で達成することが出来た「多細胞システム」を発展させ、隣接多臓器間の相互作用を加味した複雑モデルである「多臓器システム」を人為構成するための研究を展開する。これにより、未踏課題であった隣接臓器間の連結部(例えば、肝・胆・膵組織)の人為創出に挑む。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

ヒト臓器原基を誘導するための多細胞培養システムを確立するとともに、そのメカニズムを解明した。メカニズム解明については、全く異なる分野である化学分野における理論からのアナロジーにより生物学的疑問を解くという、独創的な着眼を実証することができた。さらに、当

初想定していた肝臓のみならず、軟骨や、膵臓・腎臓・癌といったさまざまな臓器の人為的構成に有益な技術であることを発表し、中でも Cell Stem Cell 誌に報告した論文は年間論文の中でも最もインパクトが高い成果が紹介される Best of Cell Stem Cell に選出された。一方で、従来の培養では不完全な要素、例えば、肝臓・胆道・膵臓の連続性が欠損していることが明らかとなった。すなわち、臓器間の境界条件の適正発現が担保された臓器形成といった、より高度な生命現象の再構成に向けた技術課題があぶり出され、今後の研究開発の方向性の示唆を得ることが出来た。

また、本研究課題の成果創出に基づき、新たにシンシナティ小児病院での独立准教授として、日本にて武田薬品工業との共同プロジェクトである T-CiRA プログラムで PI として、新規の研究室を2つ立ち上げることができ、今後のさらなる発展に向けた研究推進体制が整った。

さがけの研究成果は、複数のテレビ・新聞・ネットなどで取り上げられるなど注目を集め、一般の方々にとっても「器官原基」という概念の重要性が認知されるに至った。今後研究が進展することにより、ヒト iPS 細胞からさまざまな器官原基を自在に構成することができれば、それらを利用した創薬スクリーニングや、移植による再生医療の実現が期待され、莫大な患者救済につながる革新的技術となる可能性がある。今後も、臓器移植を待つ多くの患者さんを一日でも早く治療できるよう研究を推進する。

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

(研究総括)

iPS細胞由来肝芽の自己組織化現象を肝臓原基形成のメカニズムの解明にとどまらず、肝臓以外のさまざまな臓器における器官原基を人為的に創出するための培養法および移植操作技術の確立に成功した功績は、すでに、国際的に高く評価されている。さらに、隣接臓器を含めた臓器系統(例えば、肝胆膵)を連続的に誘導するという新たな革新概念へ転換するための基盤技術開発に着手しており、その意欲的な展開は称賛に価する。再生医療分野の様々な研究者や臨床医と共同研究を行い、基礎研究と臨床研究の両輪で、着実に進めて頂きたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Takebe T***, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa H-Y, Taniguchi H: Vascularized And Complex Organ Buds From Diverse Tissues Via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell*, (*Corresponding author, Best of Cell Stem Cell),16(5): 556-565, 2015
2. **Takebe T ***, Kobayashi S, Suzuki H, Mizuno M, Chang YM, Yoshizawa E, Kimura M, Hori A, Asano J, Maegawa J, Taniguchi H: Transient vascularization of transplanted human adult-derived progenitors promotes self-organizing cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 2014 Oct 1;124(10):4325-34. (*: Corresponding author)
3. **Takebe T***, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, Sekine K, Taniguchi H*: Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud

transplant. *Nature Protocols* 9, 396–409 (2014). (*: **Corresponding author**)

4. Kagimoto S, **Takebe T***, Kobayashi S, Yabuki Y, Hori A, Hiroto K, Mikami T, Uemura T, Maegawa J, Taniguchi H*: Autotransplantation of monkey ear perichondrium-derived progenitor cells for cartilage reconstruction. *Cell transplantation*. (*Joint corresponding authors), 2016;25(5):951–62.

(2)特許出願

研究期間累積件数:5 件

1.

発 明 者: 武部貴則、張冉冉、谷口英樹

発 明 の 名 称: 原始腸内胚葉細胞及びその作製方法

出 願 人: 横浜市立大学

出 願 日: 2014/12/9

特 許 番 号: 特許第 5777127

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な招待講演

1. **Takebe T**: Generating diverse organ buds towards therapy. *CiRA / ISSCR 2016 International Symposia / Kyoto* 2016 22–24 Mar 2016, Japan.
2. **Takebe T**: Generation of Diverse Organ Buds from Human iPSCs. *French Society for Cell and Gene Therapy*, 14 March 2016, Marseille, France.
3. **Takebe T**: De Novo Generation of Diverse Organ Buds from Human iPSCs –Modeling human organogenesis–. *The Gladstone Institute of Cardiovascular Disease and the Cardiovascular Research Institute, Seminar*, 21 Sep 2015, San Francisco. **Invited Speaker**
4. **Takebe T**: De novo generation of liver buds from stem cells, *International Conference of Future Hepatology at Kaohsiung*, 25 Jul 2015, Kaohsiung Taiwan. **Invited Speaker**
5. **Takebe T**: Realization of human iPSC-derived liver bud transplantation therapy, *the Young Investigators' Stem Cell Symposium 2015*, 8 June 2015, Singapore. **Invited Speaker**
6. **Takebe T**: Realization of iPSC-organ bud transplantation therapy, Cambridge, Wellcome Trust–Medical Research Council, **Cambridge Stem Cell Institute**, Apr 2015, UK. **Invited Speaker**
7. **Takebe T**: Regenerative approaches through developmental biology *EASL, 50th the International Liver Congress*, 22–26 Apr 2015, Vienna Austria. **Invited Speaker**
8. **Takebe T**: Human iPSC-derived organ bud based approaches. *112th ITC(INTERNATIONAL TITISEE CONFERENCE)*, 22 Oct 2015, Mainz Germany. **Invited Speaker**

受賞

- ・ベルツ賞(2014 年)
- ・文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2016 年)
- ・New-York Stem Cell Foundation(NYSCF)Robertson Investigator Award(2016 年)
- ・WIRED Audi INNOVATION AWARD (2016 年)
- ・発表論文が Best of Cell Stem Cell に選出(2016 年)
- ・文部科学省科学技術・学術政策研究所 ナイスステップな研究者(2016 年)

主なメディア掲載

1. 日経産業新聞「肝臓育て移植の代替に」2016.2.4
2. テレビ東京「クロスロード【武部貴則／再生医療研究者】」2015.10.31
3. 日経産業新聞「ヒト iPS から作製した肝芽を使った再生医療の開発について」2015.10.19
4. 朝日新聞「科学の扉」2015.10.11
5. 読売新聞「ヒト肝細胞を大量培養する装置の開発」2015.8.13
6. HORIEMON.COM「「ネアンデルタール人の臓器も再現可能」横浜市立大学准教授・武部貴則が語る「再生医療」と「広告医療」の最先端とは？」2015.7.20
7. 産経新聞「さまざまな種類の臓器を立体的に作製する汎用的手法を確立」2015.5.4
8. NHK「臓器の芽を作製する革新的な培養手法を確立」2015.4.17
9. BS フジ「プライムニュース番外編 SP～再生医療大国に挑むサムライたち」2014.12.31
10. 日刊工業新聞 23 面「拓く・研究人(52)横浜市立大学大学院医学系研究科准教授・武部貴則氏」
11. 日刊工業新聞 朝刊 17 面「ヒト軟骨効率再生」2014.9.11
12. 神奈川新聞 朝刊 19 面「体外で軟骨作製新しい手法開発」2014.9.11
13. 日経産業新聞 朝刊 10 面「再生医療で立体臓器 横浜市大や東大作製」2014.6.23
14. 日経新聞 朝刊 科学技術面「立体構造の腎臓マウスで作製」2014.6.17
15. 日経新聞 朝刊 科学技術面「マウスで脾臓作製に成功 横浜市立大が基盤技術を開発」2014.3.3
16. TBS テレビ「未来の起源: 治らないその病気から救いたい」2014.2.23 放送
17. 日経新聞 朝刊 科学技術面「臓器をつくる・上」2014.1.28
18. 神奈川新聞 元旦特集紙面一面「夢抱く若き研究者」2014.1.1

研 究 報 告 書

「なぜ夢を見るのか ～トランスジェニックマウスによるレム睡眠の操作と解析～」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研 究 者: 林 悠

1. 研究のねらい

私たちは一晩の間に 2 種類の睡眠、ノンレム睡眠とレム睡眠を行き来する。レム睡眠は睡眠全体の15%程度にしか満たないが、この間、寝ているにも関わらず脳は活発に活動し、鮮明な夢が生み出される。なぜ夢を見るのかという問題は古くから多くの人の興味を集めてきた。レム睡眠は哺乳類や鳥類に固有の生理状態であることから、脳の高次機能に関わることが期待された。また、レム睡眠は、成人では一晩に1時間半程度しかないのに対し、新生児では実に8時間にもものぼる。従って、レム睡眠が複雑な脳の発達過程に重要であることも期待された。しかしながら、レム睡眠の発見から 60 年経ってなお、その生理的意義は全く不明であった。レム睡眠だけを、特異的かつ有効に操作できる方法がなかったことが、その最大の理由である。例えば、レム睡眠に入ったら起こす、という法では、刺激そのもののストレスの影響を排除できなかった。

そこで本研究では、世界でも前例のないアプローチでレム睡眠や夢の意義の解明に挑んだ。すなわち、『レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを司る脳部位を特定し、その操作により強制覚醒に依らずにレム睡眠を阻害できる技術や、人為的にレム睡眠時固有の脳の状態を誘発できる技術を開発し、レム睡眠の意義を解明する』という構想のもと、まず、マウスにおいて、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを司る神経細胞群の特定を試みた。次に、特定されたそれぞれの細胞群の遺伝学的手法による活動操作をめざし、各細胞群に選択的な遺伝子プロモーターの同定を試みた。特定された細胞のうち、レム睡眠からノンレム睡眠の切り替えを担う細胞群の活動を遺伝学的に操作することで、任意のタイミングでレム睡眠を遮断できるトランスジェニックマウスの作製を試みた。さらには、ノンレム睡眠からレム睡眠の切り替えを担う細胞群の活動を遺伝学的に操作することで、任意のタイミングでレム睡眠固有の脳活動を誘導できるトランスジェニックマウスの作製も試みた。これらのマウスにおいて、レム睡眠操作の効果を調べることで、これまで謎であったレム睡眠の意義の解明に挑んだ。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではレム睡眠の意義やメカニズムを理解する上で、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを司る中枢の役割を担う神経細胞群を同定し、その人為的操作を実現することが有用であると考えた。古典的な研究から、レム睡眠の制御に関しては脳幹の関与が知られたが、脳幹は多様なニューロンが混在するため解析が困難であった。私たちは胎児期の遺伝子発現に着目した細胞系譜特異的な神経活動操作という独自のアプローチを確立し、複雑な脳幹に適用した。その結果、胎児期に *Atoh1* という遺伝子を発現した神経細胞が、レム睡眠からノンレム睡眠への切り替えを担うことを特定した。具体的には、*Atoh1* 陽性の神経細胞の活動を

遺伝学的手法により促進することで、マウスにおいてレム睡眠を人為的に遮断することが可能となった。その結果、レム睡眠の阻害は、その後のノンレム睡眠中に生じる徐波(記憶学習やシナプス可塑性に重要な脳活動)に影響を与えたことから、レム睡眠が徐波の制御を介して記憶学習に貢献する可能性が示唆された。

さらに、脳幹の橋背側領域の遺伝子プロファイリングと網羅的なニューロンの機能解析の結果、上記のレム睡眠からノンレム睡眠への切り替えを担うニューロンのすぐそばに、逆のレム睡眠への切り替えを担うニューロン群の特定にも成功した。これらのニューロンの遺伝学的な活性化により、人為的にレム睡眠を誘導することにも成功した。

今後、私たちが実現したレム睡眠の人為的操作が、行動レベルでどのような効果をもたらすかや、神経疾患モデルマウスの症状にどのように影響するかなどを明らかにすることで、レム睡眠の意義のさらなる解明が期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A 「レム睡眠の阻害が及ぼす影響の解明」

これまでに、レム睡眠とノンレム睡眠との切り替えのメカニズムを解明しようとする研究が多くなされてきた。1960 年代に Jouvet らにより、ネコの脳幹以外の脳部位を大きく破壊しても、覚醒・レム睡眠・ノンレム睡眠のような状態が見られるという実験がなされた。従って、レムとノンレム睡眠の切り替えを司る神経細胞群は脳幹にあることが推察された。しかしながら、脳幹はさまざまな機能をもつ神経細胞がはっきりとした領野を形成せずに混在する複雑な脳部位であったため、具体的にどの神経細胞が重要なのかは不明であった。

近年、マウスの胎児期における神経細胞の細胞系譜が明らかになり、脳幹の一部の神経細胞が胎児期のみ出現する小脳菱脳唇(cerebellar rhombic lip)と呼ばれる神経上皮構造に由来することがわかってきた。そこで私たちは、この小脳菱脳唇に由来する細胞系譜や、そのほかの脳幹に寄与する細胞系譜について、発生過程における細胞の挙動を追い、胎児期の各細胞系譜に由来する細胞が成体の脳幹のどの場所に分布しているかを調べた。様々な細胞系譜の中からレム睡眠に関わる系譜を探索したのである。その結果、胎児期に小脳菱脳唇に由来する脳細胞のうち、Atoh1 遺伝子を発現していた細胞の系譜がレム睡眠に関わっていることが明らかになった。具体的には、胎児期に Atoh1 遺伝子を発現していた神経細胞のみに、神経活動を人為的に活性化できる DREADD-hM3Dq と呼ばれる遺伝子を発現させた

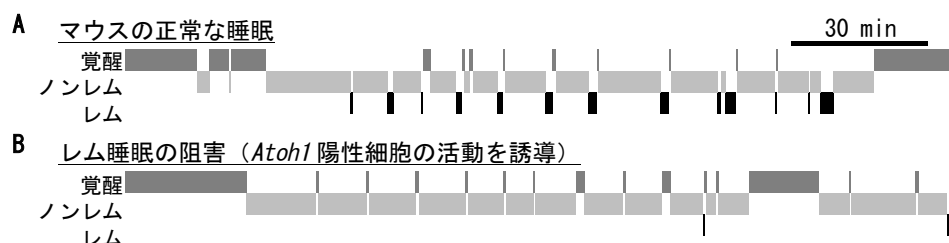


図 1. マウスのレム睡眠の人為的な阻害 (Hayashi ら, Science, 2015)

A. マウスは睡眠中、ノンレム睡眠・レム睡眠・短い覚醒を行き来する。

B. Atoh1 陽性のレム睡眠抑制ニューロンの活動誘導により、数時間レム睡眠をほぼ完全に遮断できた。

トランスジェニックマウスを構築し、実際に活性かせたところ、レム睡眠がほとんどなくなり、この細胞群がレム睡眠を抑制し、レムからノンレム睡眠への切り替えを促す役割をもつことがわかった。これにより、レム睡眠のみを有効に阻害できるトランスジェニックマウスをつくることに成功した(図 1)。

上記のとおり、当初の目標であった、外部からの刺激に依らないレム睡眠の阻害方法を確立できた。レム睡眠を一時的に阻害されたマウスは、一見何もないように見えたが、時間が経つにつれ、次第にノンレム睡眠の質に変化が現れた。ノンレム睡眠の特徴である学習や記憶形成を促す脳波(徐波)の強さが次第に弱まったのである(図 2)。レム睡眠を元に戻すと、その直後にノンレム睡眠の徐

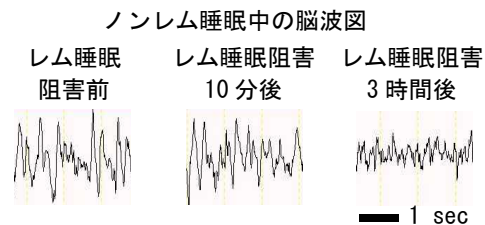


図 2. レム睡眠の遮断はノンレム睡眠中の徐波の低下を引き起こす。(Hayashi ら, Science, 2015)

波の強さも元に戻ったので、レム睡眠には徐波を促す作用があると判明した。徐波は、周波数 4 Hz 以下のゆっくりとした脳波であり、神経細胞同士をつなぐシナプスの柔軟性を高め、記憶の定着などを促す効果がある。本結果から、長年謎であったレム睡眠の生理的意義の一端が初めて明らかとなった(Hayashi ら, Science, 2015)。レム睡眠が徐波の発生に関与するという今回の結果をふまえると、レム睡眠が徐波を介して記憶学習や脳の発達に関与している可能性が期待される。

研究テーマ B 「レム睡眠の制御を担う遺伝子プロモーターの同定」

レム睡眠が徐波と呼ばれる学習や記憶形成を促す脳波を誘導するという上記の結果を踏まえると、レム睡眠固有の脳活動を人為的に誘導することができれば、脳機能の向上へつながり、アルツハイマー型認知症など、認知機能・記憶学習能力の低下を伴う疾患の新たな治療法の開発へもつながることが期待される。そこで次に、レム睡眠の誘導に関わる神経細胞を特定するために、マイクロアレイ法による脳幹のトランスクリプトーム解析を行った。同定された遺伝子について、そのプロモーターの下流に Cre を導入したトランスジェニックマウスを多数作成した。その結果、研究テーマ A で述べたレム睡眠を遮断する神経細胞群に加え、下記に述べるとおり、レム睡眠の誘導に関わる神経細胞群を遺伝学的に同定することに成功した。

研究テーマ C 「レム睡眠固有の脳活動の人工的再構成の試み」

遺伝学的手法により、レム睡眠固有の脳活動を人為的に誘導することを目指し、研究テーマ B で同定された多種多様な脳幹な神経細胞群について、化学遺伝学的手法または光遺伝学的手法により、活動を誘導することで、睡眠に与える影響を調べた。その結果、多様な多種の神経細胞群のうち、橋から延髄へと投射する神経細胞群が重要であることが判明した。これらの神経細胞群に、チャンネルロドプシンと呼ばれる光依存的に神経活動を誘発できる遺伝子を発現させて、光ファイバにより光を照射すると、わずか数秒以内に自然なレム睡眠と全く区別のつかない脳の活動状態を誘導することに成功した。

3. 今後の展開

夢を生み出すレム睡眠は、その役割が脳科学の最大の謎の一つであった。私はレム睡眠が「徐波」と呼ばれる記憶形成や脳機能の回復に重要な神経活動を、ノンレム睡眠中に誘発する役割があることを発見した。この発見は、レム睡眠の脳発達や回復への貢献を支持するのみならず、レム睡眠の人為的な操作により、様々な神経疾患の症状を改善できる可能性も示唆する。実際、多くの神経疾患がレム睡眠の異常を伴う。今後、幼若期や高齢期のレム睡眠の操作が脳機能に与える影響を解明すると同時に、様々な神経疾患の症状の改善を試みる。本研究により、脳の発達・恒常性維持機構の理解や、全く新しい神経疾患の治療標的の発見に貢献できると期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

全ての研究テーマが概ね順調に進み、研究目的の大部分を達成できたと考えられる。特に、レム睡眠の生理的意義がこれまでは全くの謎であったため、その一端を解明できたことは非常に有意義であるといえる。さらに、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えのメカニズムの解明に当たっては、主要な神経回路ネットワークとその作用機序についての理解が大きく進んだ点において、当初予想していた以上の成果が得られた。一方、レム睡眠固有の脳の活動状態の誘導に関しては、*in vivo* での高い時間分解能での誘導は実現したものの、当初計画していた脳スライス標本を用いた *in vitro* での誘導には至らず、今後の課題となった。ただ、*in vivo* での結果を踏まえると、有望であると期待される。

本研究の主題である「レム睡眠の意義」は、社会からの関心も非常に高く、従って、本研究の成果はマスコミ等でも非常に大きく取り上げられた。また、多くの神経疾患がレム睡眠の異常を伴うことを踏まえると、今後、全く新しい神経疾患の治療標的の発見に貢献できると期待される。

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

(研究総括)

レム睡眠を遮断できるトランスジェニックマウスを2系統、独自開発し、いずれの系統においても、共通して、レム睡眠の一時的な遮断が、記憶学習や神経可塑性に重要な徐波と呼ばれる脳活動の低下へつながることを解明した。このことにより長年謎であったレム睡眠の生理的意義の一端が初めて明らかとなり、国内外で、その発表は大きく取り上げられた。さらにレム睡眠操作による鬱病・記憶学習・脳の老化への影響を調べるための系に取り組み、その成果が待たれる。このさきがけ期間中に、レム睡眠の研究分野で大きく飛躍した研究者の一人である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. †Yu Hayashi, Mitsuaki Kashiwagi, Kosuke Yasuda, Reiko Ando, Mika Kanuka, Kazuya Sakai, †Shigeyoshi Itoharu. Cells of a common developmental origin regulate REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. Science. 2015, 350, 957-961. † 責任著者.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

- 1.第 1 回 アステラス病態代謝研究会優秀発表賞 受賞(2014.10)
- 2.平成 26 年度・筑波大学若手教員奨励賞受賞(2014.12)
- 3.第 21 回 日本睡眠学会研究奨励賞 受賞(2016.5)
- 4.第 26 回 つくば奨励賞(若手研究者部門) 受賞(2016.11)

プレスリリース・紹介記事等

- 1.「夢のスイッチが明らかにする夢を見る理由 ～レム睡眠の意義を初めて科学的に証明～」.
筑波大学プレスリリース.

<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201510230400.html>

- 2.「睡眠の進化を語る細胞の発見.」 JT 生命誌ジャーナル.

<http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/090/research/2.html>

- 3.「レム睡眠とノンレム睡眠との切り替えを担うニューロンの同定により明らかにされたレム睡眠の役割」. ライフサイエンス新着論文レビュー.

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/11921#more-11921>

4. Vladyslav V. Vyazovskiy. “Mapping the birth of the sleep connectome.” Science. 2015, 350, 909-910.

研 究 報 告 書

「非侵襲脳刺激による脳領域間の情報伝達効率の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研 究 者: 森島陽介

1. 研究のねらい

適応的行動とは環境や他者とうまくやっていく能力である。この為、臨機応変に必要な認知プロセスを用いて適切な情報処理を行う必要がある。しかしながらどのように脳の中の情報処理が行われるのであろうか？脳内で情報処理を行うためには脳の領域間で情報の明け渡しを行う必要があり、このやり取りは一方通行ではなく、相互にやり取りをおこなうと考えられている。これまでの研究では複数の脳領域や神経細胞の相関のある活動変化を機能的結合と呼び、この機能的結合の上昇はその瞬間における認知プロセスを反映していると考えられてきた。機能的結合は認知課題遂行中の課題の成績とも相関があることが知られているが、これらの研究では相関関係を超えた因果律として証明はされていなかった。そこで申請者は脳波計測中に経頭蓋磁気刺激を与えることで刺激を与えた脳領域から他の領域へ影響を因果律のある形で証明した。しかしながら、このような研究アプローチでは neural correlates を捕らえるばかりで、どのような脳活動が適応的行動に本当に必要かを明らかにすることができない。

本研究課題では構成論的アプローチの考え方を認知神経科学の分野に導入し、特定の脳活動を創出したときの神経ネットワークの活動、ならびに行動を測定することで必須構成要素を同定するアプローチを取る。これにより、これまでの neural correlates を集める研究から必須構成要素を明らかにする研究へのパラダイムシフトを起こすための方法論の確立を目指す。具体的には経頭蓋電流刺激(transcranial electric current stimulation)装置を用いて、非侵襲的に特定の周波数のサイン波を与える事で、複数の脳領域に同期的な神経活動を創出し、その時の脳領域間の情報伝達効率の変化を測定する。これにより、機能的結合の調整に必須となる構成要素を明らかにする。また、並行して適応的行動に必要となる脳のネットワークの解析並びに新たな解析法の技術開発を行う。これらの新しい方法論を組み合わせることにより、認知課題遂行中に機能的結合を操作したときの行動変化を調べ、適応的行動必須となる構成要素を明らかにする。

2. 研究成果

(1)概要

脳は非常に複雑なネットワークを形成し、そのネットワークで情報処理を行っている。脳はこれまでに蓄積してきた情報や、その時に外部から受け取る情報をその時々状況に応じて、取捨選択して、適応的な行動をつかさどっている。この情報処理のためには脳の領域間で効率の良い情報のやり取りを行う必要があると考えられているが、脳のネットワークの結合性を操作することで、脳のネットワークの機能的な変化が我々の行動を制御していることを証明した研究はいまだになかった。

本研究ではヒトの脳のネットワークを非侵襲的に操作するために、脳の神経振動(neural

oscillations)に着目することにした。脳の神経振動は1930年代にドイツのBergerによって初めて観察された。その後1990年代以降は神経振動が脳の領域間の情報伝達の基盤として働いているのではないかと考えられている。一方近年経頭蓋電流刺激といわれる、頭皮に電極を張り非侵襲的に脳活動を操作する手法がヒトでも用いられてきた。本研究ではこの経頭蓋電流刺激を用いて、同期的な脳活動を創出し、これに伴う脳領域間の情報伝達効率を測定し、脳領域間の機能的結合を制御する手法の新たに確立した。具体的には tACS(経頭蓋交流電流刺激)によって特定の周波数、位相差を持った同期的脳活動を導入し、その時の脳領域間の機能的結合を TMS-EEG 法によって測定した。

また、一方で脳のどのネットワークを操作すると行動に影響が出るかを調べるためには、健常や精神疾患の患者における脳のネットワーク変化をこれまで以上に明らかにする必要がある。このために、機能的 MRI のデータに構造方程式ベースの脳のネットワーク解析手法である Dynamic causal modelling を用いて脳のネットワークのどのような流れが行動・疾患と関連が起こるのかを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマA「経頭蓋交流波刺激、経頭蓋磁気刺激、脳波の同時記録法(tACS-TMS-EEG 法)の確立」

本研究課題の中核的な手法となる tACS-TMS-EEG 法は、tACS 自身が比較的新しい手法であるために、実験系を新たに立ち上げる必要があった。tACS-TMS-EEG 法は tACS による神経振動を導入した結果を検証するために経頭蓋磁気刺激(TMS)によりプローブ刺激を与えて、その活動を脳波(EEG)によって検証する手法である(図1)。



図1 tACS-TMS-EEG 法概略

この手法を確立するうえで難点は大きく2つあり、1つ目は tACS によって引き起こされる脳波へのアーチファクトである。このアーチファクトは周期的でかつ非常に大きい振幅を持っているが、これは脳波を MRI 装置中で記録する際のアーチファクトの性質に非常に似ている。この点に着目して、これまでに開発された MRI 装置中での脳波へのアーチファクトを除去するアルゴリズムを実装して我々のデータセットで試した。Niagy らの2005年の手法が我々の実験には適していることを見出し、tACS による脳波アーチファクト除去アルゴリズムを開発した(図1)。

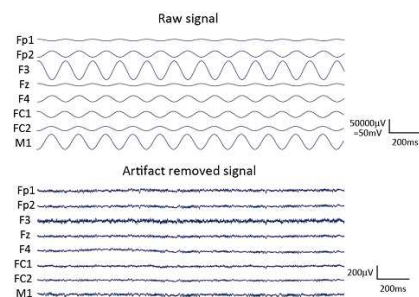


図2 tACSによるアーチファクト除去例(上)アーチファクト除去前では振幅50mVを超えるものもある(下)アーチファクト除去後は通常の脳波の振幅の活動(50µV程度)が観察される

2つ目の問題点は脳波を記録する際に脳波記録電極に干渉することなく電気刺激電極を配置する必要があり、これを実現するために蓄積した実験ノウハウをプロトコル論文として発表した(Fehér and Morishima, 2016)。以上により、本研究課題

の基盤技術となる tACS-TMS-EEG 法を確立することができた。

研究テーマ B 「tACS-TMS-EEG 法を用いた脳のネットワーク操作の手法の確立」

本研究で確立した tACS-TMS-EEG 法を用いて、神経振動導入した際の脳のネットワーク変化を調べた。ここでは大きく分けて 2 つの実験を行った。1 つ目の実験では、tACS による脳活動調節のメカニズム自身が不明な点が多く、前頭前野にどのように調節しているかによって脳の興奮性がどのように変化するかを調べた。前頭前野で多いといわれるシータ帯である 6Hz の交流波電気刺激を前頭前野に与えて、電流の各位相 (90 度、180 度、270 度、360 度) のタイミングで磁気刺激を与えて、脳のネットワークの状態を測定した。すると、これまで考えられてきたメカニズムと異なり、tACS の電流と脳の興奮性の位相は同一ではなく、約 45 度ほどずれてくることが分かってきた (図 3)。また、コントロール条件として頭頂皮質に tACS を与えて、前頭前野に磁気刺激を与えた実験を行った。この実験では磁気刺激の部位に tACS を与えていないので、磁気刺激のタイミング依存的なネットワーク変

化は起こらないはずである。この予想通り、頭頂皮質刺激実験では、位相依存的な変化が見られなかった。これにより tACS によるネットワーク変化は、データプロセスの過程で生じたアーチファクトではなくて、実際の脳のネットワーク変化によるものであると結論付けられる。現在はこれらの結果をまとめて論文投稿中である。

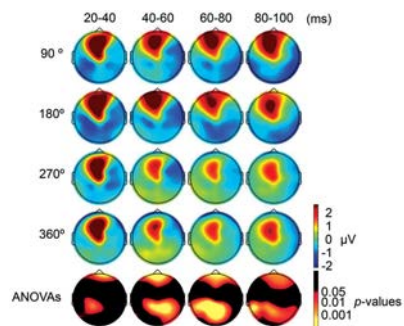


図 3 前頭前野 tACS 中の位相依存的な脳のネットワークの変化 (1-4 段目) 6Hz 交流波刺激中の各位相のタイミングに磁気刺激を与えた時の脳波電位の変化 (5 段目) 位相依存的な変化のある部位 (ANOVA, $p < 0.05$)

研究テーマ C 「脳のネットワーク解析による適応的行動のメカニズム解析」

テーマ A,B では脳のネットワークを操作することに主眼を置いているが、特定の行動もしくは疾患の状態を変化・改善するにあたり、どのネットワークを操作したらよいのかという知見はまだ十分とは言えない。そこで、様々な行動における脳のネットワーク変化を調べた。ここでは特に dynamic causal modelling (DCM) と呼ばれる、脳の機能的 MRI のデータに対して、構造方程式モデルを仮定して、脳の領域間の方向性を持った因果律を数学的に推定する手法を用いた。

一つ目の実験では我々が他者に対して利他的な行動をとるときに、以前に助けられた場合 (互惠性) と相手の痛みに関心する場合 (共感性) の 2 種類の操作を行い、その人の利他的行動がどちらの動機に基づいて行われたかを、DCM によって得られた脳領域間の結合定数に機械学習を適応することで約 78% の予測率で予測を行う事が出来た (Hein, Morishima et al., Science, 2016)。これらは、脳のネットワークの変化が利他的行動と言う非常に複雑な行動に寄与している事を示す知見となった。

別の実験では恐怖症の患者に薬剤投与中の脳活動を機能的 MRI で取得し、DCM 解析を用いることで、コルチゾール治療は視床-扁桃体のネットワークの活動を抑制することを明らか

にした(Nakataki et al., Neuropsychopharmacology, 2016)。その他、不利益をこうむっても不正があった時に正直に告白する人と、不利益を被る場合は不正を告白しない人では前頭前野のネットワークの使い方が異なる事を明らかにした(Dogan, Morishima, et al., Scientific Reports, 2016)。

3. 今後の展開

本研究では脳の領域間の伝達に特に寄与していると考えられているシータ帯に着目したが、今後はシータ帯のみならず、他の帯域が脳領域間の情報伝達にどのような形で寄与しているかを明らかにしていきたい。そして、この手法を進めて、脳のネットワークの機能的な変化が我々の認知プロセスを制御している事を明らかにしていきたいと考えている。この手法がロバストな手法として確立できれば、将来的には脳のネットワークを改善することによる、精神神経疾患の新たな治療として展開できればと思う。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究課題はヒトの脳のネットワークを制御する基盤技術の構築とヒトの認知プロセスの神経メカニズムの解析を目標に行った。計画書で設定した目標の多くは順調に達成し成果を上げることができた。ただ、新しい手法の確立と提案であるがゆえに、追加の検証実験・解析を行っており論文の発表と言う面では想定よりも時間がかかっているが、新しい分野を開拓するための生みの苦しみとして一步一步進めている。この手法が受け入れられれば、脳のネットワークの特性やその認知プロセスとの関わりを様々な形で調べることが出来るようになり、今後は順調に研究を進め・発展させていけると確信している。

研究費は実験系構築のための大型備品、実験を補佐するスタッフの雇用に充てた。このような研究実施体制・環境を構築することが出来たので、効率よく研究課題を遂行することが出来たと考えられる。

科学技術への貢献としては、ヒトで脳のネットワークを制御するという新しいアプローチを確立したことは、実験結果のみならず、コンセプトレベルでの非常に大きな影響があると考えられる。また、社会・経済への貢献としては将来的には脳のネットワークの改善による精神疾患の治療の可能性を拓く第一歩として貢献できたと考えられる。

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

(研究総括)

経頭蓋電流刺激を用いて、同期的な脳活動を創出し、これに伴う脳領域間の情報伝達効率を測定し、脳領域間の機能的結合を制御する手法を確立した。また、機能的MRIのデータに構造方程式ベースの脳のネットワーク解析手法であるDynamic causal modellingを用いて脳のネットワークのどのような流れが行動・疾患と関連が起こるのかを解明した。このようにヒトの脳のネットワークを非侵襲的に操作する技術を、1つ1つ積み上げていることを高く評価する。

この基盤技術により、将来の非侵襲での脳の解析、治療への期待は大きい。用いる技術において、他のさきがけ研究者との共通点が少なく、領域活動の効果が十分でなかったのではないと思われるが、今後も、他分野の研究者への説明や理解を求めていっていただきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Masahito Nakataki, Leila M. Soravia, Simon Schwab, Helge Horn, Thomas Dierks, Werner Strik, Roland Wiest, Markus Heinrichs, Dominique J.-F. de Quervain, Andrea Federspiel, Yosuke Morishima
“Glucocorticoid administration improves aberrant fear processing networks in spider phobia”
Neuropsychopharmacology, advanced online published
2. Azade Dogan, Yosuke Morishima, Felix Heise, Carmen Tanner, Rajna Gibson, Alexander F. Wagner, Philippe N. Tobler “Prefrontal connections express individual differences in intrinsic resistance to trading off honesty values against economic benefits” Scientific Reports, Vol. 6, 33263
3. Grit Hein, Yosuke Morishima, Susanne Leiberg, Sunhae Sul, Ernst Fehr
“The brain’s functional network architecture reveals human motives” Science, Vol. 351, pp. 1074–1078, 2016
4. Kristoffer D Feher, Yosuke Morishima
“Concurrent electroencephalography recording during transcranial alternating current stimulation” Journal of Visualized Experiments, Issue 107, 2016
5. Simon Schwab, Thomas Koenig, Yosuke Morishima, Thomas Dierks, Andrea Federspiel, Kay Jann “Discovering frequency sensitive thalamic nuclei from EEG microstate informed resting state fMRI” Neuroimage, Vol. 118, pp. 368–375, 2015

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著書

1. Yosuke Morishima “Prefrontal anatomical architecture and top-down behavioral control in human and non-human primates” Brain Evolution by Design, Springer, in press
2. 森島陽介「利他愛」日本語総説 生体の科学 2015 年 2 月号

学会発表

1. Yosuke Morishima “Control of effective connectivity through transcranial alternating current stimulation” 第 38 回 日本神経科学学会大会 シンポジウム 2015 年 7 月 28 日
2. Yosuke Morishima “Functional architecture of brain networks reveals (mal)adaptive processing of social information” 第 39 回 日本神経科学学会大会 シンポジウム 2016 年 7 月 22 日

3.Kristoffer D. Fehér, Yosuke Morishima “Synchronized tACS entrained oscillatory activity modulates long-range neuronal transmission efficacy” 6th International Conference on Transcranial Brain Stimulation, 2016/9/22

4.森島陽介「経頭蓋電流刺激の基礎、経頭蓋交流刺激と脳波の同時記録による神経ネットワークの解析」第45回臨床神経生理学学会 エキスパートレクチャー 2015年11月6日

研究報告書

「電界誘起気泡インジェクションメスによる分子操作と再構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 山西 陽子

1. 研究のねらい

本研究では研究代表者が発見した指向性電界誘起マイクロナノバブル列現象を活用し、その気液界面に遺伝子などの高分子を封入し高速微細バブルとして打ち出すことにより高効率なインジェクションを局所的に狙った位置に達成する技術として提案した。さらに放出された指向性気泡列は、そのサイズが微細なことから気泡内ガスが回りへ溶解し気泡自体が収縮され、さらに気液界面に付着していた分子が濃縮されるメカニズムが存在していることを確認し、タンパク質結晶をはじめとした新しい再構成技術の確立を目標として研究をおこなった。放出される気泡の気液界面には固相・液相・気相などあらゆる相を封入でき、高粘度の高分子やセンサ等も封入することができる。特に微細化したワイヤレスセンサを封入して細胞内の狙った場所にインジェクションすることで細胞からの応答を発信させることにより高精度な細胞の機能発現へ繋がる技術となる。微細気泡を用いて加工とインジェクションを狙った場所に高速・高効率・高精度に行うことで細胞の高精密な再構成技術の確立を目指すものとする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではすでに発見した指向性電界誘起マイクロナノバブル列現象を活用し、その気液界面に遺伝子などの高分子を封入しナノバブルとして打ち出すことにより濃縮した高効率なインジェクションを局所的に狙った位置に行える技術として研究を進めた。さらに放出された指向性気泡列が断熱圧縮されることにより、気液界面に付着していた分子が濃縮され、タンパク質結晶をはじめ細胞膜や組織として生み出す新しい再構成技術の確立を目標として研究に取り組んだ。放出される気泡の気液界面には幅広い薬剤や人工物を付着させることが可能であり、狙った場所に高速・高効率・高精度に導入を行うことで細胞や組織の高精密な再構成技術の確立を目指した。

本研究では、幅広い対象へのインジェクション実験を行うことにより、それぞれに要求される問題を明確に分類し、幅広いダイナミックレンジの大きい対象や輸送される試薬の種類や大きさなどに対応するインジェクション技術の構築に取り組み、これまで困難とされてきた対象へのインジェクションを成功させるに至った。特に、気泡内にプラズマ放電が走る技術を用いることにより、より固い対象へのインジェクション技術を達成することを可能とし、その特異なメカニズムと制御性についての評価を行った。さらに使用者の習熟度によらず安定にインジェクションできる構造・及びインジェクション量の向上を達成するための多筒式インジェクタを構築するに至り、高速・高効率・高精度なインジェクションへむけた新しい展開が期待されている。

さらに、気液界面に付着するタンパク質分子の凝集によるタンパク質結晶生成について、そのメカニズムと従来法と比較しての優位性について評価を行い、結晶の生成時間と品質及び

め技術と導入量及びオペレータによらないロバストな構造とシステムについて検証と評価を行った。まずオペレータによらないロバストな構造とシステムについて解決するためにこれまで作成していた2次元多筒式インジェクションチップの完成度を上げて、下図に示すようにバックサイド露光という技術によるアスペクト比の大きな筒状のインジェクタを2次元チップ上に配列させ、これまで困難であった複数の筒からの気泡発生と圧壊の同時観察に成功した。これにより電気回路パターンの最適化設計と電流回収を最適化にすることにより、高効率にインジェクションすることができ、柔軟な基板に電極構造を作り込むことにより3次元プローブから高集積・大容量のインジェクタを微小なエリアに構築することが可能となった。これにより現在 in-vivo 埋め込み式チップへの展開をスタートしている。

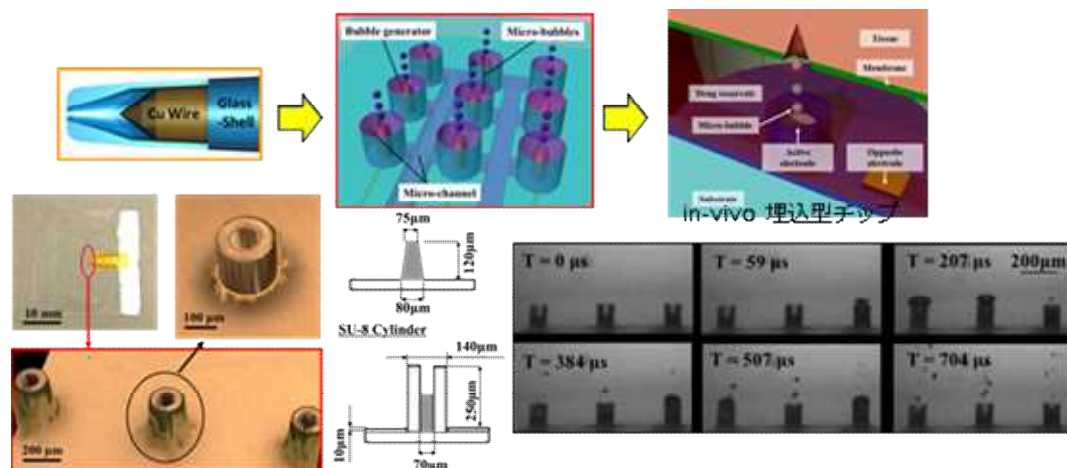


Fig.2 インジェクション気泡メスの2次元チップ化によるロバスト・高精度・ハイスループット化

研究テーマC「遺伝子導入の実用化:幅広い対象への遺伝子導入」

電界誘起気泡メスの実用化を目指し、幅広い対象へのインジェクションを可能にするため、幅広い固さを有する対象へのインジェクションを行った。この際、印加電圧を上昇させるとともに気泡内に放電が走るといった特異な現象を確認し、気泡の圧壊による物理的な穿孔能力だけでなく、電氣的な穿孔能力も合わせたシナジー効果によって、穿孔能力の増大を達成するに至り、より固い対象へのインジェクションを達成するに至った。印加電圧が2.5kV以上になると金属も穿孔する能力があることがわかり、このことより、プラズマキャビテーションメスとしての新しい機能を生み出すことに成功した。回りが培養液環境下ではない、空気中でのインジェクションメスの構造についても達成したため、本技術を生育中の植物等へインジェクション可能な注射器として展開するに至った。幅広い対象へインジェクション可能となったため、多くの機能創発を行うに至り、幅広い業種への実用化へ向けた企業等との連携・スピノフ的な共同研究を数件立ち上げている。

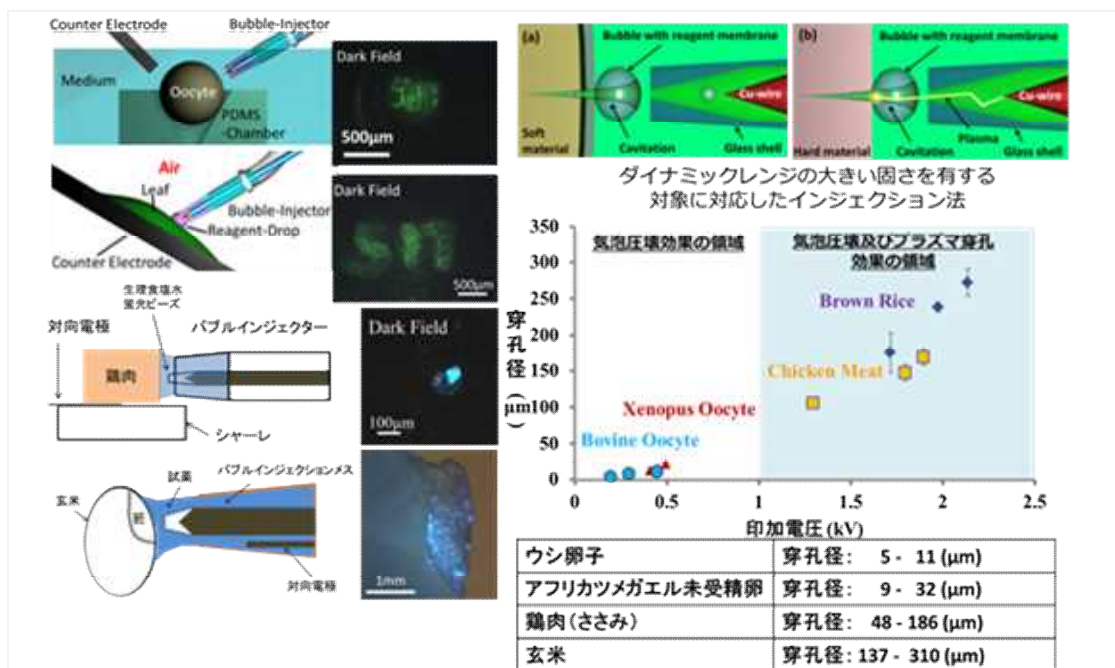


Fig.3 ダイナミックレンジの大きな固さを有する幅広い対象へのインジェクション結果

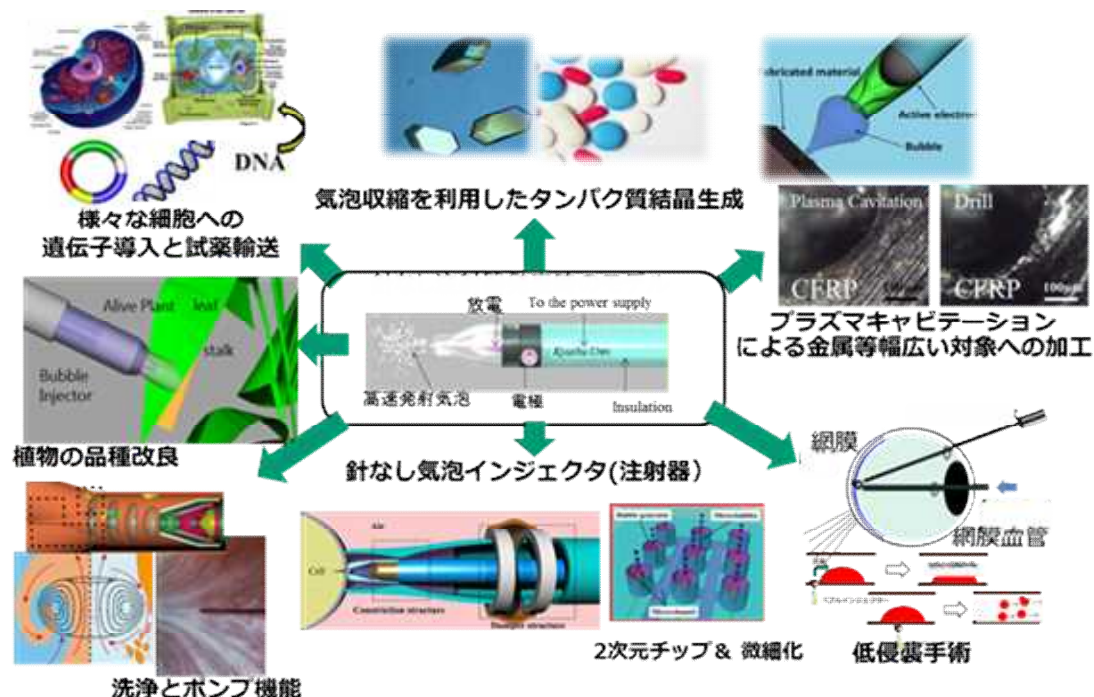
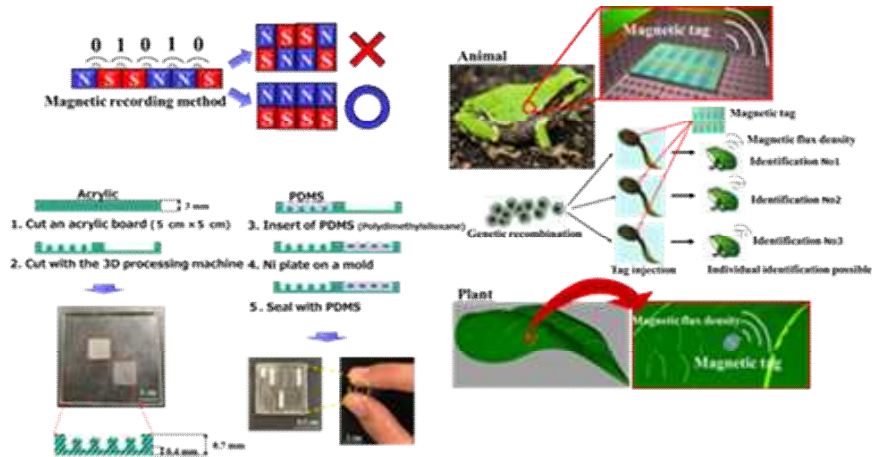


Fig.4 電界誘起インジェクション気泡メスにおける幅広い業種への実用化と機能創発

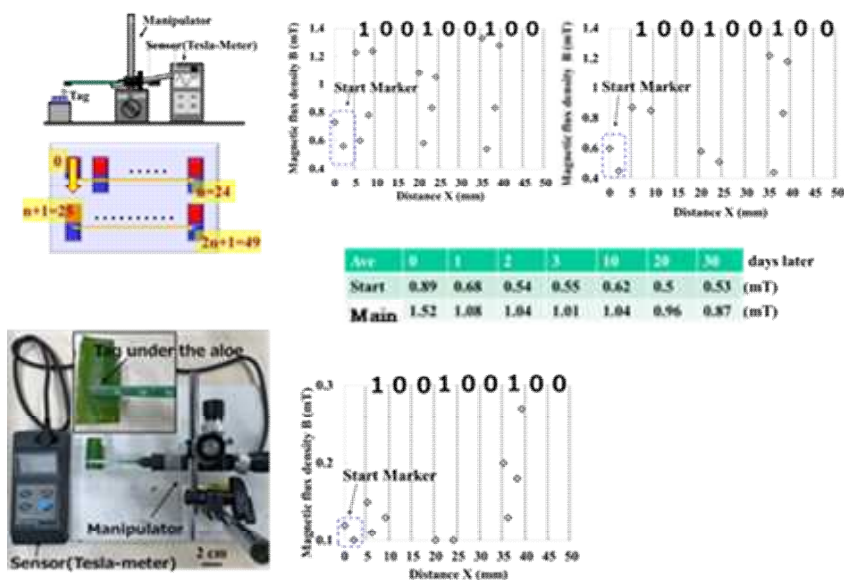
研究テーマD「細胞からの情報発信」

細胞からの情報発信については予備実験や試作を数多く行った結果、ウェットな環境下においても長期間安定な情報発信が可能な磁気タグを選択するに至り、現在ソフトなポリマー膜に覆われたソフトな磁気タグとなり、生体への埋込に向けた研究を続行中である。図5はソフト磁気タグのプロセス図とコンセプト図を示している。最終的には細胞レベルまでのスケール

ルに落とし込む前に、比較的大きな対象(カエルやオタマジャクシや植物等)への磁気タグのインジェクション実験を行ない、模擬生体膜等を透過しても長期間経過後に磁気信号を捉えることに成功している。今後はより小さい対象への埋込・実証実験を行っていく予定である。



(a)磁気タグ製作のコンセプト図とプロセス図



(b)着磁した磁気タグのセンシング

Fig.5 磁気タグセンシング方法 (PDMS 膜 300 μ m を通しての結果, S100100100=No.292)

3. 今後の展開

電界誘起で発生する特異な高速気泡列の発生メカニズムについては、印加電界によって変化する非平衡な電場(プラズマ放電)と非平衡な熱・流体場(キャビテーション)のシナジー効果によるものである可能性が高いことがわかってきた。今後はこの2種類の非平衡な場の制御し、気液界面におけるラジカル等の反応メカニズムをより詳細に研究していきたいと考えている。また現在インジェクション対象としての人工物としての磁気性タグの研究を行っており、細胞や組織といった微細な対象へのタグ付けやセンシングや発信などの研究に着手している。IoT 技術が進

む中で、インジェクション技術や薬剤放出の自動化さらには、インジェクションした対象細胞や組織のネットワーク化などへ繋がる技術としていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の狙いについては動植物細胞など幅広い固さを有する対象に遺伝子等をインジェクション可能にする新しいインジェクション技術の確立を目標としており、ほぼ達成したと言える。また電界誘起気泡の収縮と気液界面の凝集機能を利用したタンパク質結晶生成、人工物をインジェクションすることによる細胞からの発信技術など、この技術から図4に示すような数多くのスピナウトプロジェクトを作り出すことに成功した。また電界誘起気泡の穿孔とインジェクション技術の機序解明について気泡内の絶縁破壊などの理解を進めることができ、印加電圧ごとのマッピングを作成することに成功し、将来実用化の際の制御性に大きく貢献する知見を得ることができたといえる。また気液界面の収縮性及び分子凝集と付着についての物理的な評価を進めることができたことも、安定なタンパク質結晶生成へ大きく貢献したといえる。

今回は研究の途中で新たな機能を数多く生み出し実用化へ向かって進んでいることは、大変幸運であり、上田総括はじめアドバイザーの先生方やさがけ研究者の方々、共同研究者及び企業の方々からの多くのアドバイスによって実用化へより近づくことができ深く感謝申し上げます。今後新しい気液界面技術のみならず、気液界面上の反応性並びに気泡圧壊という大きな物理的な変化による電荷の生成という新たな知見を利用して、大きな物理的な変化を制御性のある電気的変化へと繋げる新しい学理を展開していきたいと考えている。

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

(研究総括)

ガラス毛细管内のマイクロ空間内に放電を発生させ、その爆発的なパワーによって液中に指向性を有する高速気泡列を発射する現象を利用して、高精度に遺伝子を導入するインジェクション技術を確認した。動物細胞から植物細胞まで固さなどが異なる細胞に対して遺伝子導入できるプラットフォームを開発した。生物学者のニーズを積極的に汲み取ろうとする姿勢も成果に繋がっており、領域内外で7件の共同研究を行うとともに、国内外に多くの特許を出願し、社会への貢献を視野に活動していることも評価できる。今後は、成果の原著論文としての発表も重要であろう。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Naoyuki Kurake, Hiromasa Tanaka, Kenji Ishikawa, Kae Nakamura, Hiroaki Kajiyama, Fumitaka Kikkawa, Masaaki Mizuno, Yoko Yamanishi, and Masaru Hori “Synthesis of calcium oxalate crystals in culture medium irradiated with non-equilibrium atmospheric-pressure plasma”, Applied Physics Express 9, 096201, (2016).

- | |
|--|
| 2. 山西陽子, “電界誘起気泡による針なし注射器”,自動車技術, 69(4), pp.86-87, (2015.4). |
| 3. 山西陽子, “電界・プラズマを利用したマイクロバブル射出による細胞加工”, 日本機械学会誌, 117(1148), pp.28-31, (2014.7). |
| 4. 山西陽子, “電界誘起気泡メスと機能性界面”, 生体の科学, 65(5), pp.510-511, (2014). |
| 5. “Local Ablation of a Single Cell Using Micro/Nano Bubbles”, Hiroki Kuriki, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma, Satoshi Akagi, Fumihito Arai, Journal of Robotics and Mechatronics, 25-3, (2013), pp.476-483. |

(2)特許出願

研究期間累積件数:6件

1.

発明者: 山西陽子, 神林卓也, 高橋和基

発明の名称: 気泡噴出チップ、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、並びにインジェクション装置及びインジェクション方法

出願人: 芝浦工業大学

出願日: 2015年10月19日

出願番号: 特願 2015-205948

2.

発明者: 山西陽子, 高橋和基, 小見駿

発明の名称: 「気泡噴出部材、気液噴出部材、局所アブレーション装置及び局所インジェクション装置」

出願人: JST

出願日: 2015年11月4日

出願番号: PCT/JP 2015-080998 WO2016/072408

3.

発明者: 山西陽子, 高澤曹, 周澤道

発明の名称: 「有機結晶加工用チップ、有機結晶回転装置及び有機結晶加工装置」

出願人: JST

出願日: 2014年10月17日

出願番号: 特願 2014-213243

4.

発明者: 山西陽子, 高澤曹

発明の名称: 「渦輪発生装置、該渦輪発生装置を含む洗浄装置」

出願人: JST

出願日: 2014年9月30日

出願番号: 特願 2014-201439

5.

発明者: 山西陽子, 濱野洋平, 神林卓也

発明の名称: 「気泡噴出チップ、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、並びにインジェクション装置及びインジェクション方法」

出願人: JST

出願日: 2015年9月29日

出願番号: PCT/JP 2015-077526 WO2016/052511

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(著作物)

1. 山西陽子, “第6節 気泡の応用～電界誘起気泡メスについて～”, 書籍「材料表面の親水・親油の評価と制御設計」の4章, 石井淑夫 監修, (株)テクノシステム, pp.213-218, 2016 年 7 月 27 日発行.
2. 山西陽子, “ナイスステップな研究者から見た変化の新潮流”九州大学工学研究院機械工学部門流体医工学研究室山西陽子教授インタビュー, STI Hotizon, 2016 年秋号, Vol.2, No3, pp.14-17, 文部科学省 科学技術・学術政策研究所, 2016 年 9 月 26 日発行.

(主要な学会発表)

1. Y. Yamanishi1, “Emerging Functions of Plasma-Induced Bubbles”, 2016 MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, November 27 – December 2, 2016, Boston, U.S.A. (発表日:2016.11.28), PM2.2(Plasma Processing via Liquid for Life Sciences and Environmental applications), Oral, 2016. (Invited)
2. Yoko Yamanishi, Takuya Kobayashi, “Concentration and Extraction of Plasma-induced Radical Species for Protein Crystallization”, (G1.04) Symposium G – Plasma Processing and Diagnostics for Life Science, 2015 MRS Fall Meeting&Exhibit, Boston(2015.11.29-12.04), U.S.A, (発表日:2015.12.3)Oral
3. Y. Yamanishi, S. Takasawa, H. Kuriki, F. Arai, “Electrically-driven micro-bubbles assisted protein crystallization”, 5th International conference on Plasma Medicine (ICPM5), 20-O07. (発表日:2014.5.20).
4. 山西 陽子 “針のない注射器の実現に向けたマイクロ流体を用いたインジェクション技術の開発”, 近未来への招待状 ～ナイスステップな研究者 2015 からのメッセージ～, 科学技術・学術政策研究所主催講演会, 文部科学省 科学技術・学術政策研究所 (発表日:2016.6.7).

(受賞)

1. 「ナイスステップな研究者2015」文部科学省科学技術・学術政策研究所(2015.12.10)
2. 日本ロボット学会誌論文賞, 2014年9月5日

(プレスリリース等)

1. 「～マイクロレベルの気泡で高精度の試薬輸送を実現～高速発射気泡による「針なし注射器」の開発」芝浦工業大学(2014 年 12 月 2 日)
<http://www.shibaura-it.ac.jp/news/2014/40140347.html>
2. TBS 夢の扉+「針のない」注射器に挑む! , 2015 年 5 月 10 日
3. ナース専科,カンゴのゴカン,「痛くない? 穿刺孔が見えない? 針なし注射器の話 気泡注射器の誕生」, Vol.17, p.70-75, 2015年5月号.
4. 日刊工業新聞「探訪:先端研究:微細気泡で穴あけ」, 2015 年 1 月 30 日.
5. 毎日新聞「針なし注射器を開発」気泡の力で体内へ, 2015 年 1 月 3 日.
6. 日刊工業新聞「痛み感じにくい注射器 微細気泡で試薬注入 芝浦工大」, 2015 年 12 月 4 日.

(展示会)

1. JST フェア2015, 東京ビッグサイト,「低侵襲針なし気泡注射器による試薬導入」, 2015年 8月27-28日