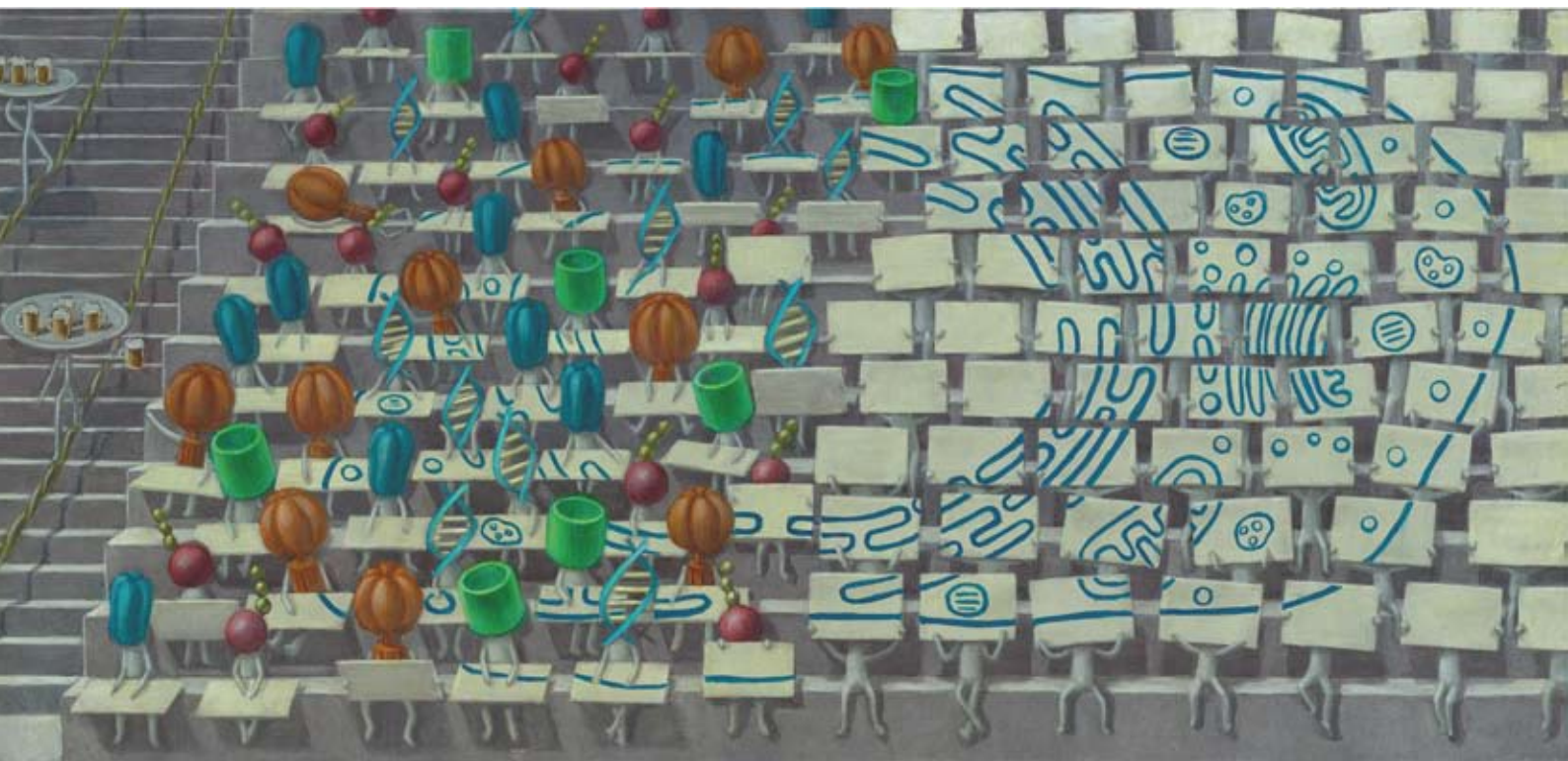


Spying Minority in Biological Phenomena

少数性生物学

— 個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求 —



NEWS LETTER No. 4

文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究(平成23年度-27年度)
略称「少数性生物学」 領域番号「3306」

Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (2011-2015), MEXT, Japan



• 巻頭言	3
• 研究組織	
組織表	7
総括班	9
A01 班	10
A02 班	12
A03 班	14
• 私と少数性生物学	16
• 活動報告	21
• 少数性生物学トレーニングコース	40
• 学会・研究会報告	45
• 関連書籍紹介	50
• 注目研究	51
• 2014 年度受賞報告	58

文部科学省科研費・新学術領域研究「少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—」は後半戦に突入しました。新規メンバー 14 名を含む計 19 名の個性豊かな公募研究代表者が参入し、新しい血が注ぎ込まれました。少数性生物学とは何かを明確に意識した公募研究の採択により、本領域が目指しているものが明瞭になってきたと確信しています。計画研究でさえ前半戦は暗中模索的な研究班が無きにしもあらずの状態でしたが、そのような研究班も後半戦に入り着実に的が絞られつつあります。領域内の共同研究は前半期にも増して活発になりました。さらに、年 2 回の領域会議だけでなく「少数性生物学デバイス研究会」や「少数性生物学データ検討会」などのディープで実践的な研究会が開催されることにより領域メンバーの交流が深化しています。このような領域内の交流が一役買っているのかもしれませんが、ようやく少数性生物学のコンセプトが共通認識され始めたように見受けられます。神原秀記アドバイザーから頂いた、「将来の明確なターゲットを絵にして見せ、領域内で問題意識を共有することで、皆が同じ方向を歩くようになると良い」のアドバイスを真摯に受け止めたからに他なりません、そのことを裏付けるがごとく、6 月に琵琶湖畔で開催された領域会議では金子邦彦アドバイザーから「ようやく少数性生物学らしくなってきた」と、お褒め？のコメントを頂戴しました。しかし、「らしくなってきた」程度で満足している場合ではありません。領域内は当然のこととして、国内そして全世界の研究者にも少数性生物学のコンセプトを認識・理解してもらわないと本領域を発足させた意味がないからです。そのため、“領域メンバーが一丸”となって領域外の研究者に対し少数性生物学のコンセプトに基づく議論を事あるごとに吹っ掛けることが肝要です。みなさんは是非実践して下さい。そしてもう一つ重要なことがあります。新学術領域は“領域型研究”である以上、いわゆる個人戦ではなく団体戦です。しかし、こと本新学術領域においては必ずしもその考えを踏襲しようとは思いません。何故なら、少数性生物学は“個性ある少数の要素分子がマクロスコピックな現象に働きかけその状態を変え得る”ことに着眼しており、これは分子のみならず個体レベル、社会レベルでも成立するからです。つまり、新学術領域「少数性生物学」の意義を自ら証明するためには、“領域メンバー一丸”とは対極にある個人の突き抜けた（個性ある）研究が不可欠なのです。そのような研究こそが科学界に風穴を開け旋風を巻き起こすのです。後半戦（といってもあと一年しかありませんが）では、これまでに身に付けたであろう少数性生物学のコンセプトを自身の個人研究にとことん取り入れて、“宇宙まで突き抜けた”研究成果を出しまくってください。各人の研究が自我作古たることを願ってやみません。

領域代表 永井 健治

昨年6月の領域会議に出席した。計測技術の進展にはいつもながら瞠目させられたが、今回はそれ以上に「少数性」という新たな視点を意識した研究が多く見られ、このテーマが浸透し深まってきたと感じられた。もちろん、「少数性生物学」が分野として確立していくには、分子数が少ないがゆえの揺らぎの増大、そして分子1つ1つの動態の計測、といった昨今の発展にとどまらずに、少数性固有の現象、概念を提示することが必要であろう。そして、「生物学」としては、分子のレベルを超えた、生命機能の発現に至る高次階層へのつながりを示していかなければならない。計測技術の高度さについては語る任ではないので、ここではこうした、「少数性生物学」についての概念的側面をいくつか述べさせていただきたい。以下、個人的 (idiosyncratic) で、かなり我田引水のコメントである。

【少数性制御】 私自身が最初、少数性の意義ということを考え出したのは15年ほど前、阪大の四方さんと少数性コントロール (Minority Control) を提唱したときだった。これは、DNAと蛋白質はその複製に互いを必要としつつも、なぜDNAのほうが「遺伝情報」を担うとされているのだろうかという素朴な疑問から始まった研究で、結局相互に助けあって複製する系では、少数しかない側が、よく保存され、また相手側を制御するので、そちらが情報を担うようにみえるという帰結であった。そして、多数もつ成分ではランダムな変異が全部を同時に一方向には変えられないので平均としては変化が相殺されるのに対して、少数しかない側はそれが変異すると全体が影響を受ける。そこで、少数成分を持つことは、進化性につながる [1]。これが理論とシミュレーションの主張で、また、四方さんのグループで実験的検証も行われた。以上は情報の起源や進化に関して議論したのだけれども、もっと一般的に生物は少数成分を用いて重要な働きを制御していると敷衍できるかもしれない。今回、分子の少数性と細胞機能を結びつけようとする研究が多くみられたのは興味深く、少数性制御の考えが展開できないかといういろいろ考えさせられた。

【少数性と多様化】 種分化まで持ち出さなくても、細胞は多様化し、それが環境への適応にもつながっている。では少数性はこのような多様な形質の生成に関係しているだろうか。ある分子成分が多数存在すれば、その量は平均のまわりに一山の連続的分布を持つ。これに対して、少数しかない成分は、有るか無いか、という形で離散的なタイプを形成しうる。実際、分子数が少数になっていくと双安定なタイプが形成されるという「少数性転移」がおこることを、富樫さんと以前示した [2]。言い換えると、少数性は多様タイプの生成装置として使えるということになる。いくつかの成分がそれぞれ少数性による離散化を示せば、それを組み合わせて多様性がもたらされるだろう。今回の公募研究ではES細胞など分化に関する研究も含まれていた。発生や免疫の分野でも、少数性による多様化という新しい視点が重要になってくるのではないだろうか。

【少数性から高次階層へ】 永井代表の講演では、少人数が踊りだし、そのダンスが伝播していくという、野地さん発掘の動画が示された。少数制御で述べたように、少数ゆえに新しいきっか

けはつくられやすい。その変化が同期して雪崩のように伝播していけば、分子より高次の階層での状態変化につながる。相互触媒反応ネットワークでは、ある成分が0から1になるとそれがトリガーとなり、雪崩のように大きな変化につながるが見出されている [3]。今回、少数性が増幅されて、記憶、嗅覚、ウイルス感染といったマクロな階層へつながる研究が始まっていたのは、「生物学」を冠した分野としての期待が広がった。

【少数性と時間】 もちろん、生物において、「時間」の問題は避けて通れない。一般に成分量が少数になっていくと揺らぎは大きくなるだろう。そうすると、せっかくなつくった多様な状態も短時間でこわれてしまうかもしれない。では少数性は状態の長期維持や記憶に寄与できないのだろうか。最近、畠山らは生体内の反応が多くは酵素が必要であることに着目し、もしその量が少ないと、その少量を各反応がとりあうので、反応が進みにくくなり、緩和が（対数的に）遅くなって状態の長期維持（記憶）につながることを示している [4]。今回、一方では少数資源の取り合いによる対称性の破れ、他方では記憶を担うシナプスのスパイン内での分子少数性の研究もみられ、長期持続や記憶という時間次元への展開があり、先が楽しみである。

【少数性と空間】 時間を議論すれば、次には、空間を考えなければならないだろう。そして、少数性というからには、どの範囲の空間領域にある個数が少ないのかを考えなければいけない。そこでサイズの問題が必須になる。例えば、少数成分が制御できるのは、その成分が消えない間（あるいは細胞が分裂するまでに）に（拡散で）動ける領域に限られる。以前、細胞のサイズはこれにより拘束されているという議論を行った [5]。今回の公募研究では、細胞の構成的研究もいくつか加わり、そこでは微小空間のサイズが重要な要素である。もちろん、この問題は構成的生物学だけでない。今回の発表でも、細胞、シナプス小胞、スパイン、などの適正サイズとは、といった本質的な問いを考えさせられるものも多かった。

以上、ずいぶんバイアスがかかった感想を述べた。やや強引にまとめると、制御、多様性、階層性、記憶、空間、といった生物学としては欠かせない問題と少数性が密に結びついて、新たな概念が生まれる気配が感じられた。多様なメンバーの間で考えが増幅されて、「少数性生物学」という領域が確立されてくることを期待している。

参考文献

- [1]KK, T. Yomo, J. Theor. Biol. 214 (2002) 563-576
- [2]Y. Togashi, KK, Phys. Rev. Lett. 86 (2001) 2459-2462
- [3]A. Awazu, KK, Phys.Rev. E76(2007) 041915
- [4]T. S.Hatakeyama, KK, PloS.Comp.Biol. 10 (2014) e1003784
- [5]KK, Orig. Life Evol. Biosph. 37(2007) 465-468

研究組織

組織表

総括班			
総括班	少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—	永井 健治	大阪大学・産業科学研究所
A01 班 少数性の生物学研究に必要な技術開発と整備			
A01-1 班	細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発—少数生体分子の計数化技術—	野地 博行	東京大学・工学系研究科
A01-2 班	分子プローブと光撮動ツールの開発—少数生体分子の可視化・操作技術—	永井 健治	大阪大学・産業科学研究所
A02 班 少数性の生物学			
A02-1 班	細胞内情報伝達の少数性生物学—生命システムにおけるポアソン性の解析—	石島 秋彦	東北大学・多元物質科学研究所
A02-2 班	遺伝子発現の少数性生物学—少数分子による情報探索原理の解明—	前島 一博	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター
A02-3 班	生体リズムの少数性生物学—生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性—	上田 泰己	東京大学・大学院医学系研究科
A03 班 少数性の生物学の理論構築と in vitro 再構成による検証			
A03-1 班	少数分子反応ネットワーク理論の構築—少数性と階層性の観点からのモデリング—	富樫 祐一	広島大学・理学研究科
A03-2 班	少数分子生体システムの再構成—複合体構成分子の数の制御と理論検証—	今田 勝巳	大阪大学・理学研究科
公募班（平成 26-27 年度）			
A01 班	ミオシン少数分子間の動態を可視化する 1 分子計測法に基づく協同性の検証	茅 元司	東京大学・大学院理学研究科
	細菌の走性における数的多様性の解明	井上 圭一	名古屋工業大学・工学研究科
	動的少数分子複合体ユニット機構：3次元 1 分子超局在顕微鏡による解明	藤原 敬宏	京都大学・物質—細胞統合システム拠点
	DNA—タンパク質相互作用のデジタルカウンティング	原田 慶恵	京都大学・物質—細胞統合システム拠点
	少数のプロトンが駆動するシナプス小胞再充填の定量解析	高森 茂雄	同志社大学・大学院脳科学研究科
	シナプス内状態揺らぎによる反応モジュレーションと機能連関	村越 秀治	生理学研究所
	細胞集団中のマイノリティのジェノタイプを一細胞レベルで同定する方法の開発	城口 克之	理化学研究所

A02 班	バイオイメーキングによるウイルス感染と細胞応答の定量解析	大場 雄介	北海道大学・ 大学院医学研究科
	細菌べん毛本数を厳密に制御する分子機構	小嶋 誠司	名古屋大学・理学研究科
	情報伝達チャンネルの興奮と抑制を修飾する少数分子の機構解明	竹内 裕子	大阪大学・ 大学院生命機能研究科
	発現のオンとオフを繰り返す少数分子による E S 細胞の多能性の制御	堀江 恭二	奈良県立医科大学・医学部
	構成論的アプローチによる収縮環の収縮機構の解明	宮崎 牧人	早稲田大学・理工学術院
	細胞内局所 pH 制御メカニズムの解明	森本 雄祐	理化学研究所
	神経細胞の自発的形態形成における少数資源の奪い合いによる自己組織化機構の研究	岡田 康志	理化学研究所
A03 班	少数のタンパク質モーターによる神経細胞オルガネラ輸送の協同的メカニズムの解明	林 久美子	東北大学・工学研究科
	少数性転移を起こすコア反応モチーフの解析とその探索	斉藤 稔	東京大学・総合文化研究科
	生体高分子が化学反応ネットワークに与える微小空間効果の解明	市川 正敏	京都大学・大学院理学研究科
	細胞分裂時のゲノム分配における 1 分子性のモデル研究	鈴木 宏明	中央大学・理工学部
	シグナル伝達系におけるゆらぎの生成と伝搬の少数性生物学	柴田 達夫	理化学研究所
技術支援班			

総括班

少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—

研究の目的			
<p>本領域研究では、顕微光学、MEMS 工学、蛍光物理化学、合成有機化学、タンパク質工学、細胞生物学、システム生物学、数理科学、など、多岐にわたる若手専門家を結集した学際研究を推進します。このような取り組みにおいては、明快な研究目標を掲げるとともに、各研究グループ間における緊密な連携が欠かせません。したがって、総括班の役割は、まず各研究リーダー同士の交流を積極的に促進させるための班会議運営を核とします。また、少数性生物学に関する学際研究に関する動向を調査する上でも、国内外からの招待講演者を交えた企画シンポジウムを行ないます。さらに、各研究班が有する研究ノウハウを班員間で共有するための技術支援を行うだけでなく、国内外の研究者への普及を目指し、班員の指導による技術講習会を開催します。</p>			
	氏名	機関	役割分担
研究代表者	永井 健治	大阪大学・産業科学研究所	領域総括
連携研究者	石島 秋彦	東北大学・多元物質科学研究所	領域推進方針の策定
	今田 勝巳	大阪大学・理学研究科	領域推進方針の策定
	前島 一博	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター	企画担当（国際会議）
	野地 博行	東京大学・工学系研究科	広報担当（ホームページ）
	上田 泰己	東京大学・大学院医学系研究科	広報担当（渉外、広報誌発行）
	富樫 祐一	広島大学・理学研究科	研究支援担当
	新井 由之	大阪大学・産業科学研究所	事務担当（総務）
	松田 知己	大阪大学・産業科学研究所	事務担当（会計）
	吉村 成弘	京都大学・生命科学研究科	企画担当の補助
	堀川 一樹	徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部	企画担当（国内学会）
	渡邊 朋信	理化学研究所・生命システム研究センター	研究支援担当
	藤田 克昌	大阪大学・工学研究科	研究支援担当
	金原 数	東北大学・多元物質科学研究所	研究支援担当
	山東 信介	東京大学・工学系研究科	研究支援担当
	竹内 昌治	東京大学・生産技術研究所	研究支援担当
	小松崎 民樹	北海道大学・電子科学研究所	研究支援担当
アドバイザー	柳田 敏雄	理化学研究所・生命システム研究センター	評価委員
	神原 秀記	株式会社日立製作所	評価委員
	河田 聡	大阪大学・工学研究科	評価委員
	金子 邦彦	東京大学・複雑系生命システム研究センター	評価委員
海外 アドバイザー	Jie Xiao	Johns Hopkins University, USA	技術アドバイス
	Thomas Dertinger	SOFast GmbH, Germany	技術アドバイス
	Peilin Chen	Academia Sinica	技術アドバイス

A01 班

少数性の生物学研究に必要な技術開発と整備

研究の目的 本研究領域が目指す「数」の観点でタンパク質の反応を論じるには、先ずどの細胞がどのタンパク質を何個有しているのかに関する情報を取得しなければなりません。このために内在性の任意のタンパク質を計数できる 1 細胞デジタル ELISA 法を開発し、これを利用して網羅的に細胞内タンパク質数を決定し、プロテオームマップ上にその個数情報を追加します（野地）。また、蛍光標識した外来性のタンパク質を生きた細胞内の局所領域（数 10 nm の空間スケール）でビデオレート計数観察できる高速超解像蛍光顕微鏡（渡邊）を開発すると共に、NVC ナノダイヤモンド標識した外来性タンパク質をビデオレート以上の時間分解能で長時間計測できる電子スピン共鳴顕微鏡（朽尾）、タンパク質の構造変化をビデオレートで捉える事ができる高速 AFM（内橋）も整備し、タンパク質の数をその他のパラメータと同時解析できるようにします。さらに、タンパク質リン酸化や細胞内イオンなどの計数観察を可能とする蛍光タンパク質、蛍光化合物、蛍光アプタマーなどの分子ツールの開発も行います（永井、金原、堀川）。	
A01-1 班 細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発—少数生体分子の計数化技術—	
 研究代表者 野地 博行 東京大学・工学系研究科	 研究分担者 渡邊 朋信 理化学研究所・生命システム研究センター
 研究分担者 市村 垂生 理化学研究所・生命システム研究センター	 研究分担者 藤田 克昌 大阪大学・工学研究科
A01-2 班 分子プローブと光摂動ツールの開発—少数生体分子の可視化・操作技術—	
 研究代表者 永井 健治 大阪大学・産業科学研究所	 研究分担者 金原 数 東北大学・多元物質科学研究所
 研究分担者 堀川 一樹 徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部	 連携研究者 山東 信介 東京大学・工学系研究科
 連携研究者 浦野 泰照 東京大学・医学系研究科	 連携研究者 小澤 岳昌 東京大学・理学系研究科
 連携研究者 松田 知己 大阪大学・産業科学研究所	 連携研究者 新井 由之 大阪大学・産業科学研究所

A01 公募班



研究代表者

茅 元司 東京大学・大学院理学系研究科

ミオシン少数分子間の動態を可視化する 1 分子計測法に基づく協同性の検証



研究代表者

井上 圭一 名古屋工業大学・未来材料創成工学専攻

細菌の走性における数的多様性の解明



研究代表者

藤原 敬宏 京都大学・物質-細胞統合システム拠点

動的少数分子複合体ユニット機構：3次元1分子超局在顕微鏡による解明



研究代表者

原田 慶恵 京都大学・物質-細胞統合システム拠点

DNA-タンパク質相互作用のデジタルカウンティング



研究代表者

高森 茂雄 同志社大学・大学院脳科学研究科

少数のプロトンが駆動するシナプス小胞再充填の定量解析



研究代表者

村越 秀治 生理学研究所・脳機能計測・支援センター

シナプス内状態揺らぎによる反応モジュレーションと機能連関



研究代表者

城口 克之 理化学研究所・統合生命医科学研究センター

細胞集団中のマイノリティのジェノタイプを一細胞レベルで同定する方法の開発

研究の目的

本計画班においては、タンパク質複合体、細胞の刺激受容と情報伝達、細胞核内情報検索と遺伝子発現、遺伝子産物の数制御の4点について計画班が研究を行います（石島、朽尾、前島、上田、鶴飼、中嶋）。

計画班の研究内容だけでは十分に生命現象を網羅できないため、公募班から少数性生物学に相応しい課題を扱うものを採択することで不足部分を補うこととします。

細胞の刺激受容と情報伝達については、ポアソン性と空間階層性に着目して解析を行います。光照射によってスイッチング可能な走化性因子を開発し、これを用いて、細胞に走化性行動を誘起させます。その時の光照射から細胞運動（例えばべん毛運動など）の変化までの一連の分子プロセスを1分子レベルで分子の結合/解離、回転拡散、並進拡散を計測し、それぞれの時定数と刺激受容から細胞応答までの時間を解析します（石島、朽尾）。

細胞核内情報検索と遺伝子発現については、ゲノム情報をもつ染色体の構造ゆらぎと遺伝子発現に参与するタンパク質の少数性に起因する数ゆらぎとの関係に着目します。まず、染色体の構造ゆらぎを測定します。そして、化学反応場の構造ゆらぎが、少数の分子からなる化学反応に及ぼす影響を、計算機シミュレーションや、分子数を人為的に操作した時の遺伝子発現の変化を解析することで検討します（前島）。

遺伝子産物の数制御については、そのターンオーバー制御、つまり合成速度と分解速度の制御に着目します。同じタンパク質複合体を構成するタンパク質でもターンオーバーの速いものもあれば、遅いものもあり、数が多いものもあれば、少ないものもあります。これが生理的にどのような意味があるのかほとんど明らかになっておらず、少数分子の数の制御の観点も併せ持つことから、遺伝子産物の生理的アウトプットとして現れる生体リズムとの関連で解析を行います（上田、鶴飼、中嶋）。

A02-1 班 細細胞内情報伝達の少数性生物学－生命システムにおけるポアソン性の解析－

	<p>研究代表者</p> <p>石島 秋彦 東北大学・多元物質科学研究所</p>	 <p>研究分担者</p> <p>朽尾 豪人 京都大学・理学研究科</p>
---	---	---

A02-2 班 遺伝子発現の少数性生物学－少数分子による情報探索原理の解明－

	<p>研究代表者</p> <p>前島 一博 国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター</p>	 <p>研究分担者</p> <p>谷口 雄一 理化学研究所・生命システム研究センター</p>
	<p>連携研究者</p> <p>高橋 恒一 理化学研究所・生命システム研究センター</p>	 <p>連携研究者</p> <p>吉村 成弘 京都大学・生命科学研究所</p>

A02-3 班 生体リズムの少数性生物学—生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性—	
 <p>研究代表者 上田 泰己 東京大学・医学系研究科</p>	 <p>研究分担者 大出 晃士 東京大学・医学系研究科</p>
 <p>研究協力者 (研究分担者 2011 ~ 2012 年度) 鵜飼 英樹 理化学研究所・生命システム研究センター</p>	
A02 公募班	
 <p>研究代表者 大場 雄介 北海道大学・医学研究科 バイオイメージングによるウイルス感染と細胞応答の定量解析</p>	
 <p>研究代表者 小嶋 誠司 名古屋大学・大学院理学研究科 細菌べん毛本数を厳密に制御する分子機構</p>	
 <p>研究代表者 竹内 裕子 大阪大学・生命機能研究科 情報伝達チャンネルの興奮と抑制を修飾する少数分子の機構解明</p>	
 <p>研究代表者 堀江 恭二 奈良県立医科大学・医学部 発現のオンとオフを繰り返す少数分子による ES 細胞の多能性の制御</p>	
 <p>研究代表者 宮崎 牧人 早稲田大学・先進理工学研究科 構成論的アプローチによる収縮環の収縮機構の解明</p>	
 <p>研究代表者 森本 雄祐 理化学研究所・生命システム研究センター 細胞内局所 pH 制御メカニズムの解明</p>	
 <p>研究代表者 岡田 康志 理化学研究所・生命システム研究センター 神経細胞の自発的形態形成における少数資源の奪い合いによる自己組織化機構の研究</p>	

A03 班

少数性の生物学の理論構築と *in vitro* 再構成による検証

研究の目的

A02 班の実験で得られたデータは逐次 A03 班に送り、細胞環境場で濃度概念がどのような分子数のオーダーで出現するのか、また分子数の離散性がどのような新しい概念を創出するのかを、分子のコヒーレンス性を取り込んだ少数分子化学反応ネットワークを生命動態データから掘り起こすことを通して論じていきます（富樫、小松崎）。上記実験データ解析と並行して、反応速度定数の環境場依存性や反応速度定数そのものの成立の可否など、従来、暗黙裡に前提とされていた化学反応理論を多角的な観点から見直し、細胞内の化学反応を表現できる理論モデルを検討・構築します。また、その理論モデルをもとに *in silico* 実験を行い、得られた結果からウェットでの再構成実験の指針を立てて実行し、理論モデルの妥当性・有用性を検証します（今田、石島、前島、上田、富樫、小松崎）。また、少数分子反応のモデルとして人工膜への再構成が可能なバクテリアのべん毛構成タンパク質の発現制御機能を有する基質タンパク質輸送システムを取り上げ、生体分子複合体における構成タンパク質の“数の制御”の観点で解析を行い、理論構築にフィードバックします（今田、南野、内橋）。

A03-1 班 少数分子反応ネットワーク理論の構築—少数性と階層性の観点からのモデリング—

	<p>研究代表者</p> <p>富樫 祐一 広島大学・理学研究科</p>		<p>研究分担者</p> <p>小松崎 民樹 北海道大学・電子科学研究所</p>
	<p>連携研究者</p> <p>李 振風 北海道大学・電子科学研究所</p>		<p>連携研究者</p> <p>寺本 央 北海道大学・電子科学研究所</p>
	<p>連携研究者</p> <p>新海 創也 広島大学・理学研究科</p>		

A03-2 班 少数分子生体システムの再構成—複合体構成分子の数の制御と理論検証—

	<p>研究代表者</p> <p>今田 勝巳 大阪大学・理学研究科</p>		<p>研究分担者</p> <p>内橋 貴之 金沢大学・自然科学研究科</p>
	<p>連携研究者</p> <p>竹内 昌治 東京大学・生産技術研究所</p>		<p>連携研究者</p> <p>南野 徹 大阪大学・生命機能研究科</p>

A03 公募班



研究代表者

林 久美子 東北大学・工学研究科

少数のタンパク質モーターによる神経細胞オルガネラ輸送の協同的メカニズムの解明



研究代表者

斉藤 稔 東京大学・総合文化研究科

少数性転移を起こすコア反応モチーフの解析とその探索



研究代表者

市川 正敏 京都大学・理学研究科

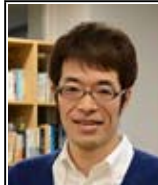
生体高分子が化学反応ネットワークに与える微小空間効果の解明



研究代表者

鈴木 宏明 中央大学・理工学部

細胞分裂時のゲノム分配における1分子性のモデル研究



研究代表者

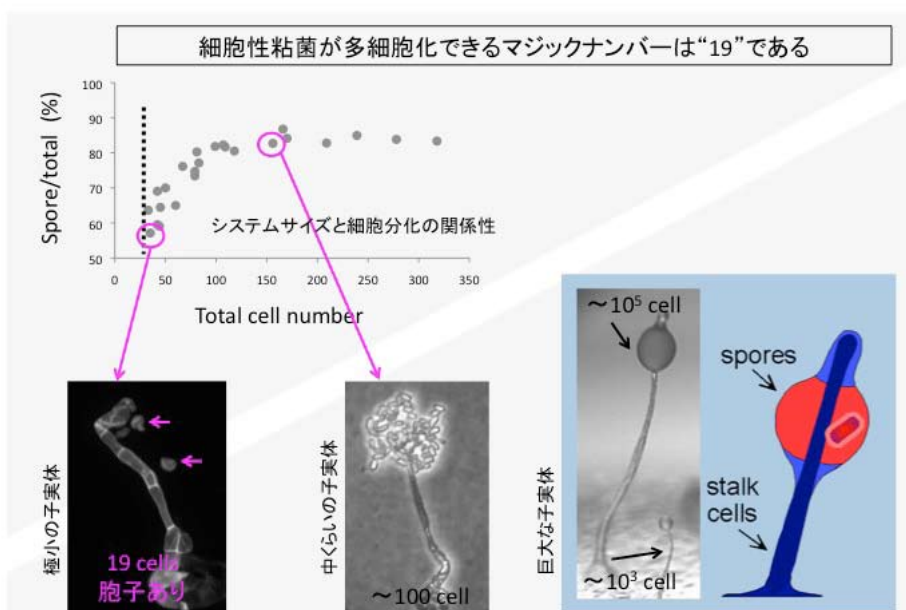
柴田 達夫 理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター

シグナル伝達系におけるゆらぎの生成と伝搬の少数性生物学

私と少数性生物学

少数性って何なの！？ 領域発足当時の、私の第一印象はおそらく多くの研究者と同じものでした。漠然と思い描いていた「要素の数」がもつ意義についてきちんと考えるきっかけを与えてくれたのは、現在私たちがモデル生物としている「細胞性粘菌」と呼ばれるしなやかな生存戦略をもつ生き物での研究でした。

細胞性粘菌は、栄養リッチな条件では普通の培養細胞のように増殖しますが、ひとたび危機的な環境（栄養の枯渇）にさらされると、単細胞相から多細胞相にその生活相をスイッチさせます。走化性により自発的に集合し最大 1mm 程度の極小のキノコのような形をした多細胞体、つまり子実体と呼ばれる孢子と柄からなる構造、を作り出します。数の観点から最も興味深い特徴の一つに、多細胞体を構成できる細胞数の幅が 4 桁という広い領域にある点が挙げられます。ほぼすべての動植物は、その胚を構成する細胞の総数が種によって固有であり、1 桁のばらつきさえも許容するものはないことと比較すると、細胞性粘菌の多細胞化戦略がいかに柔軟であるかわかります。本領域の立場からの単純な問いとして、どれくらい少数個の細胞でも多細胞体を作ることができるのか調べたところ、105 個程度を最大に、1,000 細胞、100 細胞からなる多細胞体を作る事が確認できましたが、私のラボでは 19 個の細胞からなる子実体が最小記録で、それ以下では孢子をもたない柄しか作り得ない事がわかりました。4 桁にわたるシステムサイズにあってもほぼ等しい孢子／柄比率で細胞分化を実現できる遺伝子プログラムの詳細は未だ謎につつまれています。19 細胞というマジックナンバーにこそ、この謎を解明する秘密があるだろうと考えています。



少数細胞からなる多細胞システムでは細胞の数が問題になるのと同様に、離散性が顕在化するような分子社会でもその要素数が問題となります。「走化性を可能にする誘因因子の数は？」、「細胞内シグナル伝達系の実行するに十分な各要素の数は？」など時間や空間のスケールを超えて繰り返し顔を見せる「数の問題」を解き明かせる日が来る事を期待し研究に取り組んでいます。

「私達の細胞は、わずか容量 1 ピコリットルの核の中に、全長 2m のゲノム DNA が折り畳まれている。このゲノムには同じ遺伝子が基本的に「2 個」しか存在しない。(途中略)このような核内におけるゲノム情報検索のメカニズムは、「少数性生物学」の最も基本的な事例だと思われる。」

班会議の要旨はいつもこのような文章ではじめていました(毎度すみません)。「2 個」、なるほど少数です。しかし、少し考えると、「2 個でなく 1 個」の大切な遺伝子群があることに気づきます。X 染色体遺伝子群です。X 染色体には(異常が起きると血友病となる)血液凝固に関連する遺伝子など、生命維持に欠かせない遺伝子が多数含まれています。元々オスは X 染色体が 1 つです。一方、メスは 2 つ持ちますので、X 染色体遺伝子群の発現をオス・メスで「公平」にするために、遺伝子量補償が行われます。具体的には父親由来、母親由来の X 染色体のうち、どちらか一方が不活性化され、ほとんど発現しないようになっています(バー小体)。この補償はとても大切らしく、胎盤をもつ哺乳類では X 染色体上の遺伝子群のセットはほぼ完全に保存されています(発見者大野乾先生の名にちなんでオオノの法則(Ohno's law)と呼ぶ)。ほぼ完全に保存されているということは、X 染色体の遺伝子群の 1 つでも 2 個になるだけでその個体が致死(アウト)ということなのでしょう。それくらい厳密に 1 個に限定されているのでしょうか。学生時代はこれらの記述を読んで「ふーん」と納得していました。

一方、近年の解析技術の進歩によって個々の遺伝子発現の大きな「ゆらぎ」が見えてきました。皆さんよくご存じ、本領域の谷口らの仕事(Science 2010)では、大腸菌の 1 匹 1 匹のなかのタンパク質の個数を数えています。そして大変大きなゆらぎがあることを見出しました。ある必須遺伝子産物(タンパク質)を 1 個も持たない大腸菌もありました。同じタンパク質でも、ある大腸菌は数個、あるものは約百個という場合もありました。真核細胞でも遺伝子発現ゆらぎは確認されていますので、これは大腸菌に限ったことではないようです。

そうすると、、、哺乳類の X 染色体遺伝子群が「2 個でなく絶対 1 個」にこだわる理由は何なのでしょう？？遺伝子発現に大きなゆらぎがあるならば、1 個と 2 個であまり差が無いようにも思えます。これら遺伝子群の遺伝子発現ゆらぎが少ないのでしょうか？？それとも多数の細胞の発現アンサンブル平均では、2 倍の差があるのでしょうか？そしてその差が必須なのでしょうか？DNA 中の「少数」はまだまだ楽しい話題でいっぱいです。

私が分子の個数を意識するようになったのは、細菌べん毛が回転するときに流入するプロトンの量の話聞いたときです。変異体を使った実験から、べん毛が1回転するときに流入するプロトン量は300~1,000個と見積もられています。えらい多いなというのが聞いたときの印象でした。こんなに入ってきたら、菌体内のpHが下がってえらいことになるのではと思い、どの程度影響があるか計算してみました。サルモネラのべん毛は200~300Hzで回転するので、1回転1,000個とすると1秒間に20~30万個、菌体あたり5~8本のべん毛が生えているので1秒間に約200万個のプロトンが細胞内に流れ込むこととなります。一般的なサルモネラの体積は約1.3 fLですから、菌体内のpHを7.5とすると遊離のプロトン数は菌体あたり平均25個です。そこへ1秒間に約200万個も入ってきては、えらいことです。実際は、蛋白質のカルボキシ基やアミノ基など、細胞内にはプロトンをバッファーするものが大量に存在するので、すぐにpHが大きく変動することはないでしょう。しかし、プロトンは流入し続けているので、かなりがんばって排出しないといけません。イオンポンプの輸送速度は1秒間にせいぜい数百個といわれていますから、少なくとも1万個ぐらいのプロトンポンプは、べん毛専用で休みなく働き続けなければならないこととなります。となると菌体あたりのプロトンポンプ数が気になります。

菌体あたりどれくらいかといった類いの計算は、やりだすと意外なことが見えてきて結構楽しめるので、いろいろ試したくなります。例えば、菌体内に蛋白質は最大でどれくらい詰め込めるだろうか計算してみました。分子量5万の蛋白質は球近似すると半径が約2.4 nm、体積は約61 nm³ですから、この球を細菌に細密充填すると約1,600万個入ります。一方、細胞内の蛋白質と核酸の濃度は、300~400 mg/mlと見積もりがあるので、これを使うと菌体内には分子量5万の蛋白質に換算すると約600万個で、これは兵庫県や千葉県の人口に相当する数です。細胞の中を1種の蛋白質・核酸分子から成る社会とみなすと細菌は県のレベルか、などと妙に納得してしまったりします。

これらは一種のお遊び計算ですが、細菌の中の蛋白質分子の数が県の人口ぐらいというのは、結構示唆に富んでいます。この数になると、分子や分子集合体ひとつひとつを把握したくなります。ただ、議論のもとになる数値がまだ正確ではありません。べん毛モーターが回転するときに流入するプロトン量も、多数の生きた細菌を相手にした実験に基づいているので、本当に1回転あたり1,000個かというところと怪しいです。菌体を構成する各システムの数値データが信頼できるものになってくると、お遊び計算が現実のものとなり、思いがけないものがいっぱい出てくるでしょう。この領域の皆さんの最近の発表を聞いていると、意外に近いうちに、そうなるような気がします。

活動報告

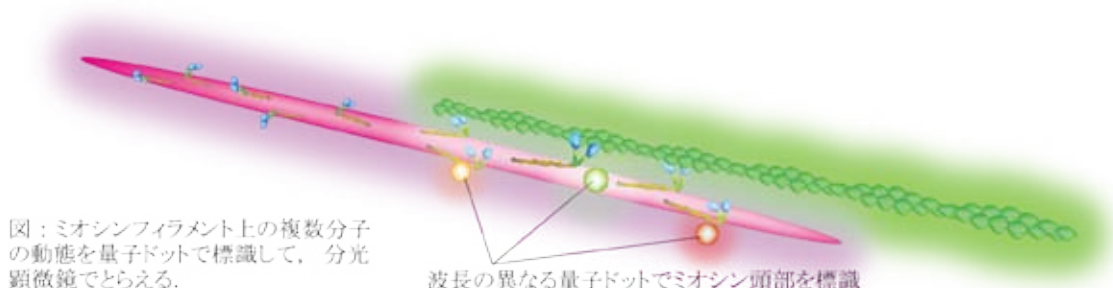
ミオシン少数分子間の動態を可視化する 1 分子計測法に基づく協同性の検証

研究代表者：茅 元司（東京大学）

活動初年度であるこの一年間では、骨格筋収縮を担うミオシン分子間の協同性を理解するため、2つの実験系による計測の検証実験に時間を費やしてきました。

1つ目の実験では、ミオシン分子間の協同性において重要であると考えている i) ミオシン力発生時の負荷依存的な結合時間特性、ii) 複数段階の構造変化（パワーストローク）による力発生を検証することを目的としています。このような特性を獲得するためには、マイクロ秒での計測が必要であるため、ミオシン制御軽鎖にビオチンタグを入れたものにアビジン化金粒子を結合させて、その散乱像を高速カメラ（10000 フレーム / 秒）で撮影しました。しかし、ATP 濃度を変えても変位波形に変化はみられず、金粒子がガラス表面に非特異結合している可能性が懸念され、今後はこうした非特異結合の可能性を検証しながら、金粒子を用いて修飾したミオシン分子が機能的に問題なくアクチンと結合しているのかしっかり確認し、ミオシン動態を検証していく予定です。

2つ目の実験では、ミオシン分子の力発生が分子間で同調して行われているのか検証するために、ミオシンフィラメント上の複数分子の動態を同時に観察することを目的としています。そこで、蛍光波長の異なる量子ドットでミオシンフィラメント上の複数分子を標識し、計画班の理研 QBiC 渡邊朋信研究室 市村垂生研究員が開発された蛍光分光顕微鏡を用いて各量子ドットを波長バンド別に表示して、これらの分子動態を同時に観察することを試みました。実験では、ミオシン複数分子を標識することには成功しましたが、アクチンの蛍光染色に用いた Alexa Fluor 488 が量子ドットの蛍光波長バンドにオーバーラップして、量子ドット変位データにアーティファクトとしてのってしまう可能性が示唆されました。一方で、比較的明るい蛍光量をもつ量子ドットのデータでは、連続的にステップ状に変化する変位データがみられ、これはミオシン頭部がアクチン上を探索している様子を示している可能性を示唆しています。しかし今後、データを繰り返し計測しながら、慎重に検証していく予定です。またアクチンの蛍光染色には、蛍光波長の長い Alexa Fluor 594 などを用いて、アーティファクトを抑える工夫をしていきます。



細菌の走性における数的多様性の解明

研究代表者：井上 圭一（名古屋工業大学）

センサリーロドプシンは細菌が光に対して遊泳する際に使われる光センサータンパク質で、光を感知するとその信号をトランスデューサータンパク質やCheタンパク質に伝え、べん毛の回転制御のための信号伝達を行います。センサリーロドプシンには緑～赤色の波長の光を吸収し、その光に向かって遊泳する正の走光性のセンサーとして働くセンサリーロドプシンI (SRI) と、それより短波長の青い光を吸収して、それに対する忌避反応（負の走光性）を引き起こすセンサリーロドプシンII (SRII) が知られています。私たちは本領域で、これらの分子がどのようにして光をとらえ、タンパク質間で効率的な信号伝達を行い、光に対する応答性の高い感度を達成しているのか、そのメカニズムの解明に向け一分子観察法を用いた研究を行っています。また SRI や SRII はメタゲノム研究によりそれぞれ 10 種類以上のものが異なる生物種から発見されていますが、その性質の多様性が分子の少数性とどのように関係するのかについても明らかにしたいと考えています。今年本領域で新たに全反射照明用の投光管を導入し、大幅な観測系の改良を行いました（図 1）。その結果従来のもよりも非常に高い S/N で一分子蛍光像を取得することに成功しました（図 2）。また SRI や SRII などの膜タンパク質を一分子観察する際には、従来界面活性剤からなるミセルや脂質二重膜リポソームに分子を導入する必要がありましたが、センサリーロドプシンの場合これらの手法を用いると光反応ダイナミクスが大きく影響を受けてしまうことが明らかになりました。そこで新たにナノディスクと呼ばれるナノメートルサイズの脂質二重膜に再構成する手法を開発したところ、細菌中とほぼ同一の光反応を示し、ナノディスクを用いればより生理的な条件での測定が行えることも明らかにしました。

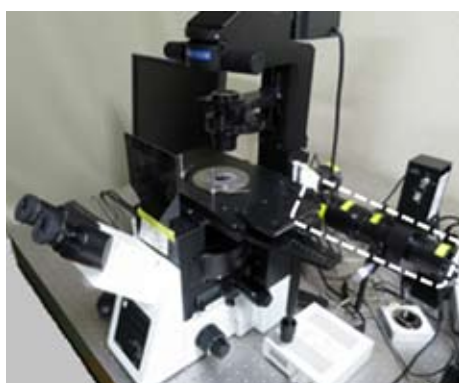


図 1. 新規に導入した投光管

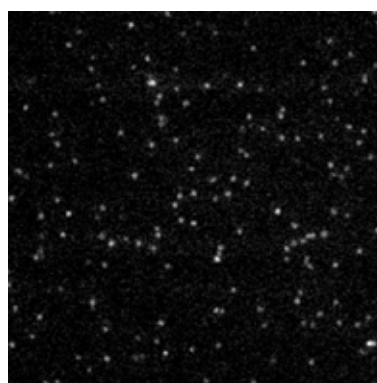


図 2. 今回構築した系を用いて得られた一分子蛍光イメージ

動的少数分子複合体ユニット機構：3次元1分子超局在顕微鏡による解明

研究代表者：藤原 敬宏（京都大学）

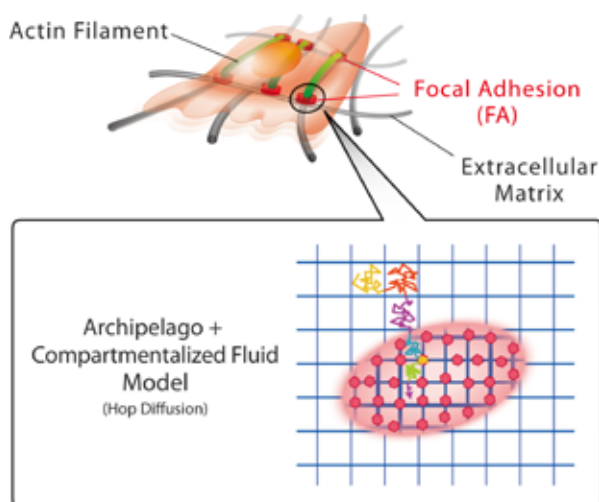
細胞膜上のミクロンサイズの構造を形成・分解する過程を理解するために、私は、分子の「少数性」が重要な役割を担っていると考えられる、「短寿命、少数分子からなる動的ユニット」の仮説と、「群島構造」の仮説をもとに、研究を進めています。細胞膜上のさまざまな機能ドメインの中でも、Focal Adhesion (FA) に代表される細胞-基質間接着構造、Tight Junction、Adherens Junction、シナプスなどの細胞間接着構造は、ミクロンサイズの大きな構造であるにもかかわらず、外界の状況に応じて急速に再編成したり、短時間で形成・分解を完了したりする必要があります。

本年度は、サブミリ秒時間分解能での1蛍光分子観察と、これを応用した1分子局在超解像法による秒単位の微細構造観察を組み合わせ、FAにおける「群島構造 (archipelago architecture)」の検証をおこないました。超解像観察により、FAは構成分子で隙間なく占められているわけではなく、ある程度隙間のある群島のような構造を取っており、構成分子は拡散で容易にFA内部にアクセスできることが示唆されました。

FA形成には直接関与しないトランスフェリン受容体を、サブミリ秒分解能 (0.17 ミリ秒) 1分子追跡した結果、FA外では平均110ナノメートルのアクチン膜骨格で仕切られた領域に、時定数40ミリ秒の閉じ込めを受けた「ホップ拡散」を示しました。一方、FA内では閉じ込めを受ける領域のサイズが平均74ナノメートルと面積で約1/2となり、滞在時間の時定数が61ミリ秒と約1.5倍長くなりましたが、それでも「ホップ拡散」で内部を移動し、FA

を出入りできることがわかりました。このことは、FAの群島構造の隙間が、FA外に比べて密な仕切りの入った細胞膜で占められていることを示しています。また、パキシリン分子をマーカーとしてFAの群島構造を超解像観察しながら、同時に、FAの主要な構成分子であるインテグリン β 3を1分子追跡 (4ミリ秒分解能) したところ、インテグリン分子は群島上で短時間の停留を繰り返しながらFAを出入りすることがわかりました。以上の結果は、FAが少数分子からなるメゾスケールの群島構造をユニットとして形成されていること、FA内外の構成分子が群島構造の隙間を拡散で移動して急速に交換することにより、ミクロンサイズのFA構造を短時間で再編成するような制御が可能なること、を示しています。

今後は、この超解像観察を3次元化し、Adherens Junctionやシナプスにも同様な「群島構造」が存在するかどうかを調べたいと考えています。



DNA –タンパク質相互作用のデジタルカウンティング

研究代表者：原田 慶恵（京都大学）

「少数性生物学」では数を知ることが重要です。分子の数を数える方法として、蛍光 1 分子イメージング技術があります。水溶液中の蛍光色素を 1 分子イメージングする方法として、現在一般的に用いられているのは、全反射照明蛍光顕微鏡法です。全反射照明で生じるエバネッセント光によってガラス基板表面近傍を局所励起し、背景光を低減させることで、ガラス基板表面近傍に存在する個々の蛍光分子を 1 つ 1 つの輝点として観察することが可能になります。全反射照明蛍光顕微鏡法はとても画期的な方法ですが、残念ながら蛍光色素分子の濃度がおおよそ 50 nM を超えると、常に近接した領域に複数の蛍光分子が存在するようになり、個々の分子の観察が困難になります。数多くの酵素のミカエリス定数 (Km) が登録されている Brenda database (<http://www.brenda-enzyme.org/>) によれば、99 %以上酵素の Km 値は 50 nM 以上であり、全反射照明蛍光顕微鏡法による蛍光 1 分子イメージングで解析できる酵素は、基質との親和性が十分高いごくわずかな酵素に限られていました。このような状況の中、ナノ開口 (zero-mode waveguides) を用いた新しい蛍光 1 分子イメージング法が 2003 年に W. W. Webb らによって開発されました。ナノ開口はガラス基板上の厚さ 100nm 程度のアルミフィルムに作製した直径 80 ~ 100nm の穴のことです。穴の直径に比べて励起光の波長が大きいので、ガラス基板の下から励起光を照射すると、励起光は穴の外に出ることができず、穴の底面ごく近傍に近接場光が生じます。全反射照明法よりさらに微小領域を励起するこの方法を用いることで、数 μ M でも 1 分子観察が可能になります。ナノ開口は Pacific Biosciences 社の DNA シークエンサーに使われており、これまでの限界を打破する研究手法として注目を集めつつあります。

シリコン基板上にナノメートルサイズの加工を施す技術はナノインプリント法、EB ナノ加工をはじめ、いくつかの方法がすでに確立され、半導体やメモリ作製に使われていますが、ガラス基板上にナノメートルサイズの加工を施す技術は確立されておらず、ナノ開口の作製は容易ではありません。これまでいくつかのナノ開口基板作製手法が報告されていますが、Ion Beam Milling 法と Metal Lift-off 法に大別できます。私たちは Metal Lift-off 法で、ナノ開口基板を作製しています。この 1 年間、条件検討を繰り返し、安定して石英カバーガラス基板にナノ開口を作製できるようになりました。今後は、自作のナノ開口を使って DNA 組換えやエピジェネティクス制御にかかわるタンパク質の機能解析を行う予定です。また、積極的に領域内の共同研究も行いたいと思っています。

少数のプロトンが駆動するシナプス小胞再充填の定量解析

研究代表者：高森 茂雄（同志社大学）

シナプス小胞という微細なオルガネラに魅せられて研究を始めてから、もうすぐ 20 年近く経ちます。当時はまだゲノム解析も終了しておらず、分子探しの旅が収束に向う頃でしたが、運良く小胞型グルタミン酸トランスポーターを同定し（てしまっ）たのをきっかけに、神経伝達物質が小胞内に濃縮される仕組みの解明に向けた次の旅が始まりました。

シナプス小胞上にある神経伝達物質のトランスポーターは二次輸送体であり、小胞内外のプロトン勾配によって駆動されることは古くから知られていましたが、輸送のメカニズムとなると依然として不明な点が多く、世界中に点在するマニアな研究者達の間でも共通見解に至っていません。小胞内での定常 pH が約 5.6、直径 40nm の小胞内には計算上、free のプロトンは存在しません。そのプロトンが如何にしてトランスポーターを駆動できるのか？が最大の疑問として残っています（ご興味のある方は、Neuron. 2014 Dec 17;84(6):1110-2 をご覧ください。混沌振りがおわかりいただけだと思います）。当研究室でも 2009 年にトランスポーターの再構成系を使った生化学的解析結果を論文報告した後、なかなか次の一手が見つからず、慢性的な偏頭痛状態が続いていました。

そんな折に参加のチャンスをいただいた新学術領域「少数性生物学」で皆さんの生物物理学的な研究のお話を拝聴するにつけ、個々のパラメーターをつぶさに定量測定していく重要性を再認識した次第で、手始めに小胞内プロトンの定量と動態測定に着手しました。シナプス小胞内 pH 測定は、1998 年に Jim Rothman らが改良した pH 感受性 GFP である pHluorin を用いて行なわれて来たのですが、これまでの小胞内 pH 測定のデータを見ると、プローブの pKa に問題があるのは明白でした。そこで、シナプス小胞内 pH 測定に最適な pKa を持つ mOrange2 を使ってみた所、小胞酸性化の時定数が従来の報告よりも 3 倍ほど大きいこと、小胞内に運ばれるプロトン数が 1000 個以上であることなどが明らかになりました。特に後者の知見は、「シナプス小胞内にはプロトンは殆んど無い」と先入観を植え付けられてきた私にとっては大きな驚きでした。小胞内腔の緩衝能は予想を遥かに越えていたのです（Egashira et al., J Neurosci 35:3701-10, 2015）。また、シナプス小胞酸性化やグルタミン酸再充填の Q_{10} を比較してみると、今まで見えていなかった物性が見えてきたこともあり、まだまだ primitive な実験から教えられることが多いと感じる昨今です。残りの期間も、皆様のご指導ご鞭撻の程よろしくお願いいたします。

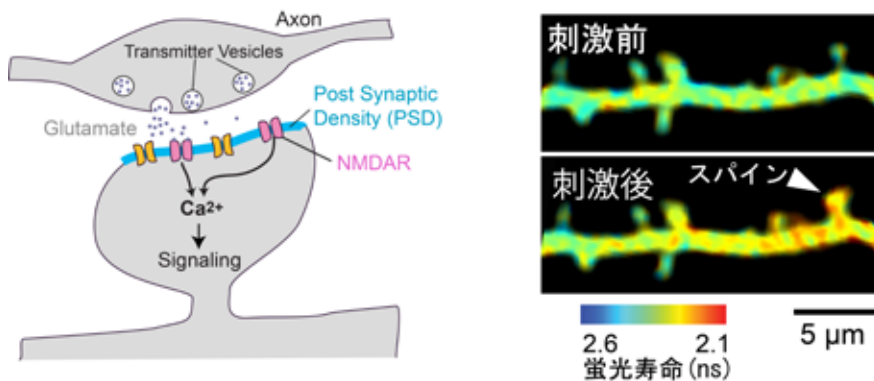
シナプス内状態揺らぎによる反応モジュレーションと機能連関

研究代表者：村越 秀治（生理学研究所）

神経細胞樹状突起上のマッシュルーム様の形態をスパインと呼びます。スパインのおよそ 85% はシナプスを形成しており、これが記憶形成の最小単位であると考えられています。また、スパイン内で起こる生化学反応がシナプスに可塑的な変化を誘起しますが、このメカニズムはこれまで殆ど明らかにされてきませんでした。本研究では、シグナル分子光操作法や分子活性イメージング法により、スパイン内生化学反応機構を明らかにしたいと考えています。

スパインの大きさは 0.1 フェムトリッター程度の容積しかありません。これは、ある分子が細胞に 100 nM の濃度で発現しているとする、1 個のスパインには 10 分子程度しか存在しないことを意味しています。すなわち、このような微小領域では、各種分子数のゆらぎが機能に大きく影響している筈です。しかしながら、既存の方法ではシナプスに一定の入力を与えることができないため、入力に対する揺らぎ応答と機能を調べることはできませんでした。そこで本研究では、神経細胞シナプスの長期増強発現に必須のタンパク質に着目し、その分子活性を青色光照射で、“ミリ秒レベルの時間分解能”と“マイクロメートルの空間分解能”で制御できるように遺伝子改変します。この分子を用いて、様々なレベルの分子活性を示しているスパインを刺激し、反応性（スパイン体積増大や長期増強）の違いを 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡や電気生理学実験により調べています。

今年度は光操作可能なシグナル分子の開発に成功し、スパインに可塑的な変化を惹起することに成功しました。また新規蛍光タンパク質の開発にも成功し、多数種のシグナル分子を同時に可視化することによりシナプス内シグナル伝達機構を調べるのが可能になりました。来年度も引き続きこれらの技術を用いて少数の分子によって担われているシナプス内シグナル伝達機構の解明を進めていきます。



シナプスの入力に対する応答を調べる。

細胞集団中のマイノリティのジェノタイプを一細胞レベルで同定する方法の開発

研究代表者：城口 克之（理化学研究所）

公募班として採択していただき、今年度の6月に領域会議に出席、そこでご挨拶&トークをさせていただきました。またこの冬には、合同シンポジウムを含めて2回もトークさせていただくという機会を頂きました。公募班としての参加ということもあり、期待と不安が入り混じっていましたが、いざ会議に出席してみますと、強烈でした。とにかく班員のレスポンスがよく、各々のトークの後に、たくさんの質問や suggestion が寄せられます（そのため、いつも進行は遅れます）。また、各研究者が個性を持ちながらも、同時に大きなコンセプトを強く共有していると感じました。班員の発表に対して真剣に議論する姿勢は通常の学会以上のものを感じ、何かが生まれつつあるのではないか、という強い刺激を受けています。

少数性生物学では、少数の分子を対象にしている研究が多い中、私は、少数の細胞に注目して研究を進めています。例えば免疫システムでは、異物を認識する少数の細胞から身体を守る反応がスタートすると考えられています。これらの少数細胞の数がどのように維持・制御されているかなどは、生命システムを少数性から理解する上で、興味深い課題であると考えています。Minority を扱う領域で、私はさらに Minority となっていますが、Minority 細胞が生体組織や個体に与える影響を研究していくことで、Minority ながらも存在感を発揮していきたいと考えています。参加してもうすぐ一年になりますが、思うように研究が進まなかった時期もなんとか乗り越え、測定系の最初の output を得るまであと少しのところまでできています。領域の期限であるあと一年間の間に、なんとか系の開発に目処をつけ、Biology へ展開していく足がかりを得たいと思っています。

引き続き熱いディスカッションの輪に加わり、領域として集まるが故に得られるものを吸収し、“班員”を楽しみたいと思います。

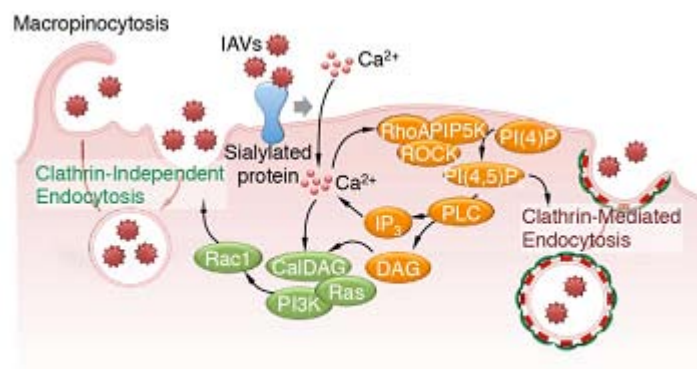
バイオイメージングによるウイルス感染と細胞応答の定量解析

研究代表者：大場 雄介（北海道大学）

医学が大幅に進歩した現在においても、ウイルス感染症は人類が対策を怠ることのできない疾病の1つです。有効なウイルス感染対策基盤を形成するためには、特に変異のスピードの早いRNAウイルスの場合、変異獲得前のステップである取込過程を明らかにすることが重要です。しかし、これまでのウイルス研究では、実際のヒトでの感染では生じ得ない大過剰量のウイルス粒子を細胞に感染させて研究が行われてきました。私達の研究グループは、本新学術領域研究において、「何個のウイルス粒子が、その後の細胞応答と感染成立に必要なか？」という命題にチャレンジしています。

上記目標達成のために私達は、蛍光ラベルしたウイルス粒子と、FRETの原理を利用した各種バイオセンサーによるバイオイメージングを中心に、生化学・分子生物学・細胞生物学手法を統合的に用いて研究を行っています。もともと私たちは、バイオイメージングを用いたシグナル伝達の研究を行っており、細胞が外界の環境変化に対してシグナル伝達が「いつ・どこで・どのくらい」活性化するかを、生きた細胞で明らかにしてきました。最近では、エンドサイトーシスやインフルエンザウイルス粒子取込を制御するシグナルネットワークを明らかにするとともに、細胞内カルシウムイオンがそのネットワークのキーとなることを報告しています(図)。またその過程で、ウイルスに直面した細胞が示す応答を、定量的に解析する手法も蓄積してきました。本研究はそれらの研究の過程で生じた新たな疑問にもとづいて立案されたものです。

本研究は、実際の生体で起こっている現象を、「少数性」という観点からの解明することを目指して行っています。また、領域内の他の研究者が行う研究との相乗効果により、「少数性医学生物学」という新しい研究への展開も目指して行きたいです。実際、領域内の研究者との共同研究により、当初の予想より遥かに多いウイルス粒子が感染に必要なことが明らかになりつつあります。



エンドサイトーシスとウイルス粒子取込を制御するシグナル経路

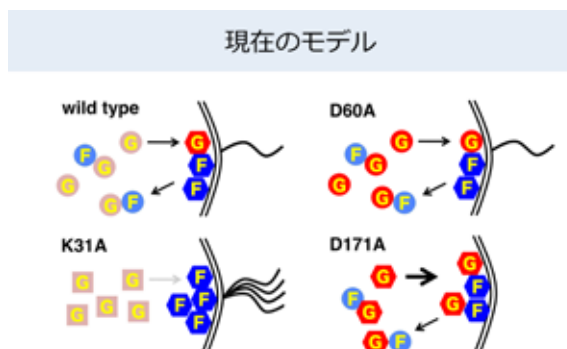
細菌べん毛本数を厳密に制御する分子機構

研究代表者：小嶋 誠司（名古屋大学）

細菌は効率良く運動するために、運動超分子であるべん毛の形成位置と本数を厳密に制御しています。海に生息する海洋性ビブリオ菌は、細胞の極に 1 本だけべん毛を形成するため、細胞における超分子の位置と数の制御機構の解析に適しています。私たちの目標は、ビブリオ菌がどのようにして、極に 1 本だけべん毛を形成することができるのか、その仕組みを明らかにすることです。これまでに、べん毛本数は FlhF が正に、FlhG が負に制御することが分かっていました。FlhF は単独で極に局在できますが、FlhG 存在下では FlhG と結合して細胞質に拡散していることから、FlhG による極の FlhF 分子数制御が重要であろうと考えられてきましたが、その詳細は分かっていませんでした。

FlhG は細胞分裂に関与する MinD に相同性を示し、MinD では ATPase 活性が機能に必須です。FlhG にも ATPase モチーフが保存されているため、私たちは FlhG の ATPase 活性とべん毛本数制御の関係を調べました。まず、大腸菌の発現系を用いて過剰発現・精製を行い、精製した FlhG が単独では低い ATPase 活性を示すことを明らかにしま

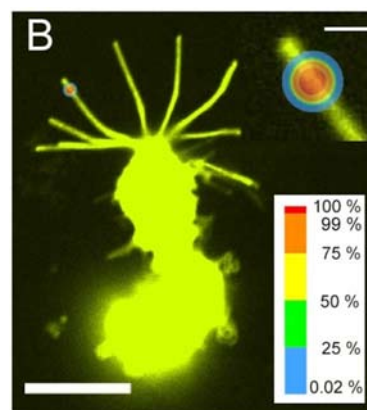
した。続いて FlhG の ATPase モチーフに変異を導入し、ATPase 活性、べん毛形成本数、運動能、FlhG と FlhF の細胞内局在を調べました。その結果、ATP 結合に必要とされる残基に変異 (K31A、K36Q) が入ると FlhG の機能は失われ、運動能は低下して極に多べん毛が形成されました。また FlhG の極局在は失われ、代わりに FlhF が極に強く局在するようになりました。一方、ATPase 活性化に重要とされる残基に変異 (D171A) を導入すると、ATPase 活性が野生型の 7 倍程度上昇しました。この変異体では、運動能は強く阻害され、ほぼ無べん毛となり、FlhG の極局在が増加する一方で、FlhF 極局在は低下していました。以上の結果は、ATPase 活性の高い FlhG は極に移行し、FlhF を極から解離させている可能性を示唆していました。ところが、ATP 加水分解触媒部位の変異 (D60A) では、ATPase 活性は失われるにもかかわらず、べん毛本数制御に関わる形質は野生型よりやや低下しただけで、ある程度維持されていました。つまり FlhG のべん毛本数を負に制御する機能は、自身の ATPase 活性よりも ATP 結合能に依存していると考えられます。来年度は FlhG と FlhF の相互作用や ATP 結合能を調べて上記の仮説の検証を行い、さらに極に何分子の FlhF があるとべん毛形成が 1 本となるのか、分子計測を行う予定です。



情報伝達チャネルの興奮と抑制を修飾する少数分子の機構解明

研究代表者：竹内 裕子（大阪大学）

少数性生物学での1年目はあっという間でした。参加直後の2014年6月に予期しない形で他研究室が起こした事故に巻き込まれ、研究機器や装置の大規模な浸水による甚大な被害により、実験室が危機的状況に陥りましたが、研究の方向性や実験計画を一から見直すことで新しい視点での研究目標ができました。今年度は、ナノスケールの構造体であり、嗅覚情報変換の場でもある線毛内での分子の動向を実時間で可視化・測定することを目標として、デバイス作り、セットアップへの組みこみ等を進めました。最新の機器ではないものの、譲り受けた中古品を元に、研究室で作製したオリジナル機器やプログラムを組み込んで使用しています。直径100nm、長さ10 μ mでの構造体の中では、情報変換を司るセカンドメッセンジャー分子であるcAMPが5個増えるだけで濃度が1 μ M増加する計算となり、太い線維（神経線維）と比較すると、線毛ではS/V比が大きい（cAMPと結合するイオンチャネルの発現密度が高いため）、線毛内の分子は長軸方向に殆ど拡散していないことが、シミュレーションと細胞実験から明らかとなりました。少数の分子が生体の感覚に影響を及ぼすことが可能であることのメカニズムを調べるには、嗅細胞の線毛はうってつけのモデル細胞であると思います。キーポイントとなるのは、高いS/V比でしょう。私の用いている技術の1つにパッチクランプ法がありますが、この方法だと生きている細胞の応答がイオンチャネルを通る電流で記録できることから、リアルタイムでの機能を検証することができます。つまり、Caイメージング等では見ることのできなかつた数分子の増減による生理活性をリアルタイムでとらえることができます。ただ、イメージングもある側面では有用な情報を示します。そこで、今後はイメージングとパッチクランプ法を同時併用することで、セカンドメッセンジャーであるcAMPや嗅線毛で信号増幅を担うCa²⁺の定量的な機能解析を行うことができるのではないかと新しい実験を計画しています。



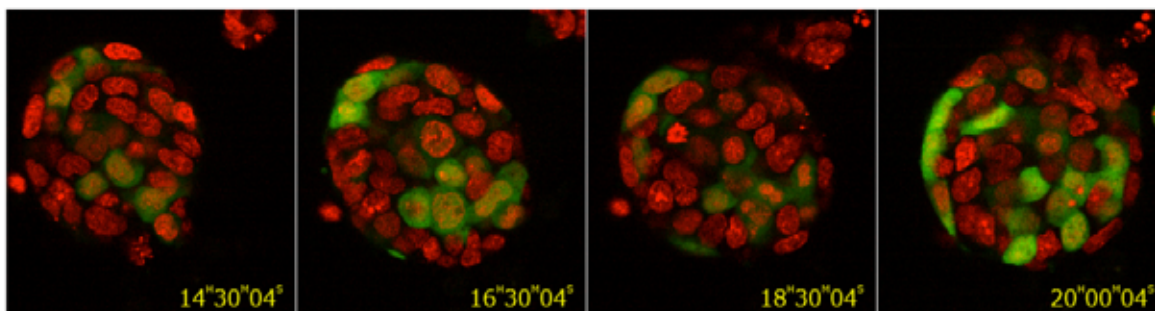
蛍光色素で染色した嗅細胞。線毛が光学顕微鏡の解像度以下の直径のため、染色することで形態を明確してから、実験を行う。スケールバーは5 μ m。カラフルな円は刺激位置。Insetは線毛の拡大写真。スケールバーは1 μ m。

発現のオンとオフを繰り返す少数分子による ES 細胞の多能性の制御

研究代表者：堀江 恭二（奈良県立医科大学）

幹細胞の多能性は、学術的にも臨床応用の点でも重要性が高い一方で、多能性に特有の動的かつ精巧にプログラムされた現象を説明するためのモデルは、未だ確立していません。我々はこれまでに、遺伝学的なスクリーニング法を用いて、未分化ES細胞で発現がオンとオフを繰り返す遺伝子が存在することを見つけました。さらに、このような遺伝子の発現変動が、ES細胞の多能性と相関することも見出しました。遺伝子発現の周期的変動がES細胞の多能性を規定するとの知見は、過去に報告例はあるものの極少数に留まっており、遺伝子の発現変動の多能性制御における重要性については、未だに一定の見解が得られていません。本研究では、「少数分子の発現の変動がES細胞の多能性を規定する」との仮説のもとに、発現がオンとオフを繰り返す遺伝子を系統的に同定します。さらに、同定した遺伝子の発現レベルとES細胞の多能性に相関のある遺伝子を特定して、その分子機構を明らかにすることを目指しています。

近年の幹細胞研究は、臨床応用への期待が高まる中で、大きな進展を遂げたかにみえます。しかし現実には、幹細胞を自由自在に様々な系譜へ分化誘導する段階にはほど遠い状況です。臨床応用が叫ばれる時代だからこそ、基礎的な研究を大切にして、着実な進展を目指したいと思います。



マウスES細胞において発現がONとOFFを繰り返す遺伝子の同定

遺伝子内へ緑色蛍光蛋白を挿入することで、内在性遺伝子の挙動を追跡した。細胞ごとに発現レベルが異なり、かつ、時間とともに発現レベルが変動している。本研究では、このような遺伝子を系統的に単離するとともに、多能性制御における役割を解析する。赤色はH2B-mCherryによる細胞核の可視化を示す。

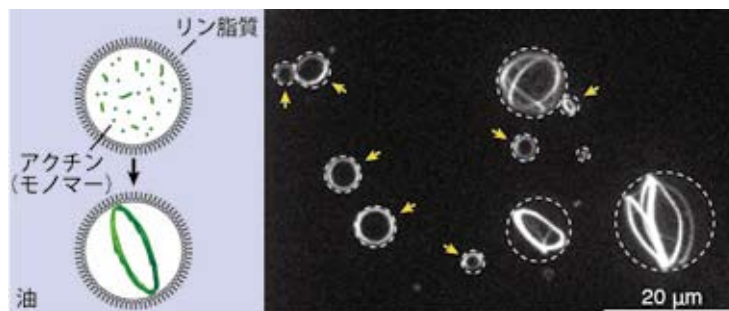
構成論的アプローチによる収縮環の収縮機構の解明

研究代表者：宮崎 牧人（早稲田大学）

動物細胞の多くは有糸分裂期になると細胞の形を丸く変化させ、赤道面に収縮環と呼ばれるリング状のバンドル構造をつくります。収縮環は主にアクチン繊維とミオシン分子モーターから構成されており、アクトミオシンの収縮力で細胞膜をくびれさせることで細胞は分裂します。収縮環はどのような仕組みで自己組織化されるのでしょうか？赤道面近傍のみでアクチン重合などが活性化される、という局所活性化説が広く受け入れられている説です。一方で、細胞のような微小閉鎖空間ではアクチン繊維の振る舞いはバルクと異なることが色々報告されており、収縮環形成においても細胞という微小反応場の物理的寄与が考えられます。

そこで初年度は、収縮環形成における微小閉鎖空間の物理的効果を明らかにするために、細胞から単離したアクトミオシンを細胞サイズの球状閉鎖空間（油中液滴）に閉じ込めた人工細胞系で、収縮環様のリングが自発的に形成されうるかを調べました。その結果、アクチンモノマー、ミオシンとアクチン繊維の束化因子を液滴に封入してアクチンを重合させると、「液滴サイズ<アクチン繊維の持続長」の条件を満たす場合はリングが自発的に形成されることを発見しました。アクトミオシン活性の空間制御シグナルが無いにも関わらず、リングは必ず赤道面に形成され、ミオシン濃度に依存してアクチンリングの形成確率が上がることも発見。タイムラプス顕微鏡観察により、ミオシンがアクチンネットワークをリモデリングすることでリング形成が促進されていることが分かりました。さらに、アクチン繊維に結合しているミオシン分子の密度の上昇によりリングが収縮することを発見。収縮速度が収縮直前のリングの周長に比例するという収縮環の基本的性質を満たしていました。

このように初年度は、収縮環が自己組織化される仕組みを、反応場の「システムサイズ」に着目して解明してきました。翌年度（最終年度）は収縮環の収縮機構を、ミオシン繊維中のミオシン分子の「数」に着目して解明することを目指します。

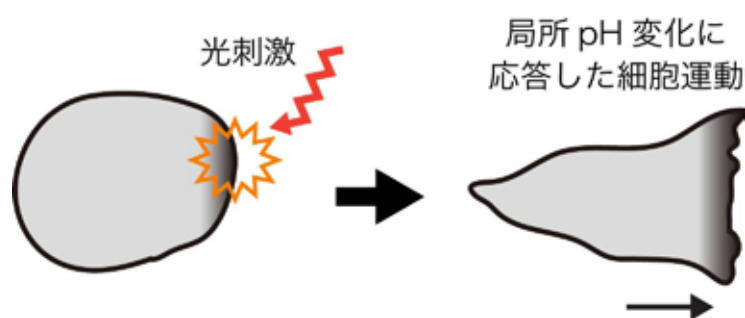


細胞内局所 pH 制御メカニズムの解明

研究代表者：森本 雄祐（理化学研究所）

細胞内 pH は、細胞運動や細胞分化を制御するシグナル伝達機構において重要な要因として働いていることが示唆されています。細胞性粘菌などで見られるアメーバ運動は、特異的な細胞質 pH 領域が一細胞内で局所的に形成されることによって、効率よく指向性をもった運動をすることができているものと考えられています。しかしながら、実際にはアメーバ運動における細胞内局所 pH の制御機構および詳細な役割は明らかではありません。その理由の一つが、細胞内 pH を経時的に安定して測定する方法、さらには生細胞内 pH を局所的に制御する手法が確立されていないためです。

本研究課題のこれまでの研究によって、pH 感受性蛍光タンパク質を用いた FRET 型の新規高感度 pH プロブを作製し、1 波長励起 2 波長蛍光型の蛍光 pH プロブとすることにより、高時間分解能での定量的なタイムラプス pH 計測を一細胞レベルで行うことが可能となりました。この pH 感受性蛍光プロブを細胞性粘菌内で発現させ、細胞内 pH と細胞運動の同時計測を行った結果から、cAMP に対する指向性の高い走化性運動を行うとき、運動方向に依存して単一細胞局所において細胞質 pH が変化することが計測されました。このことは、細胞内局所 pH と細胞運動の関係性を強く示唆するものです。今後は、細胞運動を制御する分子機構における細胞内局所 pH 変化の直接的な役割を解明するために、バクテリオロドプシンおよびチャネルロドプシンを用いた光遺伝学技術を応用することにより、細胞内局所 pH の人為的制御を行うことを検討しています (図)。



神経細胞の自発的形態形成における少数資源の奪い合いによる自己組織化機構の研究

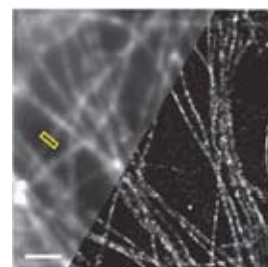
研究代表者： 岡田 康志（理化学研究所）

私たちは、神経細胞の発生を支える細胞内物質輸送の制御機構を題材に分子の少数性と形態形成・自己組織化の関係を理解すべく、超解像顕微鏡法を含むライブイメージング技術の開発と応用を進めています。

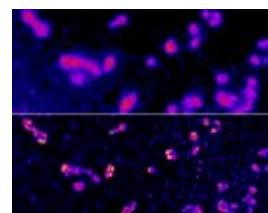
平成 26 年度は、超解像顕微鏡法について 2 本、プローブ開発について 1 本の論文を発表することが出来ました。

(1) 自発的ブリンキング能を持つ新しい蛍光色素を用いた超解像イメージング

S. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M.C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita, Y. Urano. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. Nat Chem. 6; 681-689, 2014, doi:10.1038/nchem.2002

(2) スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた世界最高時間分解能の超解像ライブイメージング法

S. Hayashi, Y. Okada. Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics. Mol Biol Cell. 2015, doi: 10.1091/mbc.E14-08-1287

(3) (A01-2 班永井先生、A01-1 班渡邊先生との共同研究) 超高輝度生物発光蛋白質ナノランタンの多色化

A. Takai, M. Nakano, R. Haruno, T.M. Watanabe, T. Ohyanagi, T. Jin, Y. Okada, T. Nagai. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multi-color luminescence imaging. Proc Natl Acad Sci USA, in press, 2015

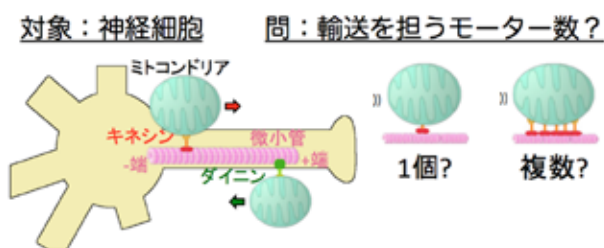


少数のタンパク質モーターによる神経細胞オルガネラ輸送の協同的メカニズムの解明

研究代表者：林 久美子（東北大学）

岡田康志先生（公募 A02 班）, 澤入尚人氏（研究協力者 東北大工）との共同研究

神経細胞内でオルガネラ（細胞小器官）は、微小管に沿ってキネシンモーターとダイニンモーターに輸送されます。エネルギーや物質の輸送は生命活動に不可欠です。本研究では、複数（少数）のモーターがオルガネラを協同輸送するメカニズム解明を目指します。非平衡統計力学に基づく揺らぎ解析から力測定の新しい理論を構築し、それを用いて、細胞内のオルガネラに働く力を実験で計測しました。生物が持つ揺らぎを利用した新測定法は、生きた状態の細胞を低侵襲に調べることを可能にします。この手法により、私たちは神経細胞内のオルガネラに働く力が離散的であることを発見しました。この離散性はモーター数に起因すると推測しています。将来は、モーター数減少が原因で生じる疾患などをテーマに医療分野に貢献したいと考えます。



野地博行先生（A01-1 班）との共同研究

平成 26 年度は上述の研究課題の遂行のために、非平衡統計力学の基礎研究を進展させ、2つの論文にまとめました。

(1) 揺らぎの定理を利用した V_1 -ATPase の回転トルク測定

F-subunit reinforces torque generation in *V*-ATPase. Euro. Biophys. J. 43 p415-422 (2014).

J. Kishikawa, A. Seino, A. Nakanishi, N. E. Tirtom, H. Noji, K. Yokoyama*, K. Hayashi*

私たち研究グループは、非平衡揺らぎを利用したトルク計測の理論を構築し [Hayashi et al. Noji, 2010]、本研究では回転タンパク質モーター V_1 の実験に応用しました。

(2) F_1 -ATPase の 1 分子実験による拡散の Giant Acceleration の観察

Giant Acceleration of diffusion observed in a single-molecule experiment on F_1 -ATPase. (in revision) R. Hayashi, K. Sasaki, S. Nakamura, S. Kudo, Y. Inoue, H. Noji, K. Hayashi*

非平衡統計力学分野で、拡散の Giant Acceleration という新しい非平衡現象が理論研究から提案されています [Reimann et al., 2001, Hayashi et al., 2004]。私たちの研究グループは 1 分子実験で拡散の Giant Acceleration を初観測しました。

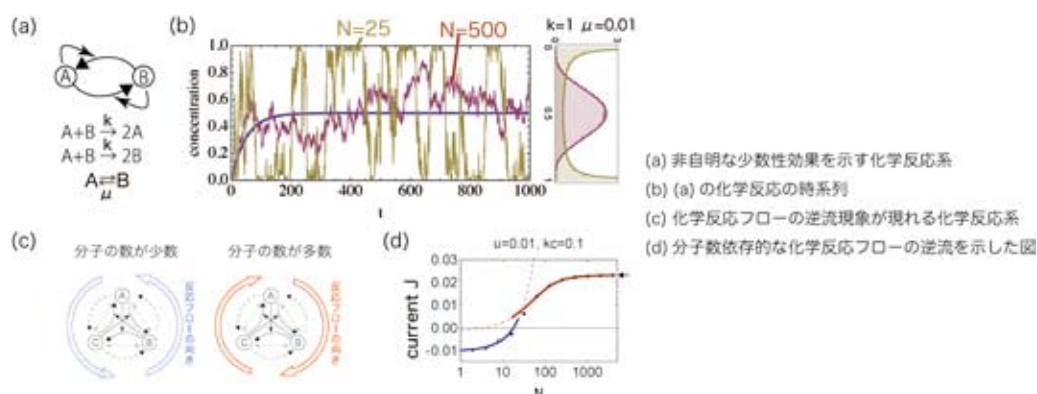
少数性転移を起こすコア反応モチーフの解析とその探索

研究代表者：齊藤 稔（東京大学）

化学反応において分子の数が少数になった場合、従来の化学反応論はどのように修正されるでしょうか。細胞小器官や細胞内局所構造などで起こる反応では、こういった状況が起こりえます。分子の数が少なくなると、多くの場合、古典的な化学反応論が予測する振る舞いのまわりに単純なゆらぎが現れる程度のことしか起きません。しかし、特定の化学反応系においては、分子の少数性によって化学反応に新たな協同性が生まれ、系の性質を質的に変えてしまう現象（双安定性の出現：図 (a),(b) など）が起こりうると、理論的に示唆されてきました。このような例では、（濃度ではなく）分子の個数依存的に化学反応の振る舞いが変わるといふ非自明な少数性効果が起きます。しかしこの現象のはっきりとした定義や数理的表現はこれまで存在せず、どのような構造がこの効果を生むのかも不明瞭なままでした。

今年度は系の定常状態に注目し、このような少数性効果を数理的に特徴づける手法を提案しました。この手法を用いると、与えられた化学反応系に少数性効果が起きうるかどうか、どのような効果が起きるのか、いくつからが“少数”であるのかに答えることが出来ます。この手法を応用し、非自明な少数性効果を持ちうる化学反応モチーフの列挙を行ない、どのような構造が少数性効果に必要なのかを明らかにしようと研究を進めています。

これらの現象の興味深いところは同じ化学反応でも、狭い空間に閉じ込められているかどうかで反応の性質を変化させるといった多義性にあります。例えば研究 [1] では反応できる分子の数依存で化学反応フローが逆流するといった現象を報告しました（図 (c), (d)）。こういった“濃度ではなく分子の数に依存した制御”を実際の細胞が機能として有している可能性があります。このような例を見つけるため、実際の生体内化学反応ネットワークから、非自明な少数性効果を持ちうる化学反応モチーフを探索していくことも目指しています。

[1] Saito, Kaneko, *PHYSICAL REVIEW E* **91**, 022707 (2015)

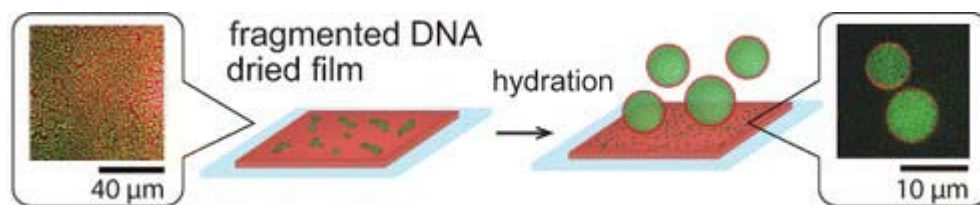
生体高分子が化学反応ネットワークに与える微小空間効果の解明

研究代表者：市川 正敏（京都大学）

本課題は、DNAなどの生体高分子が細胞サイズのリポソームに封入されるプロセスやその後の生化学反応に関して、分子の少数性が関わっている事を期待し、物理化学的な見地から封入機構の解明を目指しています。

今年度は、細胞サイズのリポソームが、その形成時にDNAを封入するプロセスを詳細に検討し、脂質とDNAとの混合物が、乾燥フィルム形成を経由する事で、膜小胞内への高効率なDNA封入が為されるメカニズムを解明しました [1]。脂質とDNAの混合溶液が乾燥するとき、乾燥の最終プロセスで、脂質が豊富なドメインとDNAが豊富なドメインとで相分離します。この時の面積比は濃度比などに依存します。次にその乾燥フィルムが水和されるととき、DNAがリッチなドメインは局所の浸透圧が高い状態になり、その圧力差を駆動力としてリポソームが成長します。エネルギーの収支で言い換えると、相分離という構造形成によって、エントロピーの形で自由エネルギーが蓄えられ、再水和の時にはそのエントロピーを駆動力として、DNAを成長核とした脂質膜小胞の形成が行われている事になります。

[1] "Emergence of DNA-Encapsulating Liposomes from a DNA-Lipid Blend Film", Shunsuke F. Shimobayashi and Masatoshi Ichikawa, J. Phys. Chem. B 118, 10688-10694 (2014).

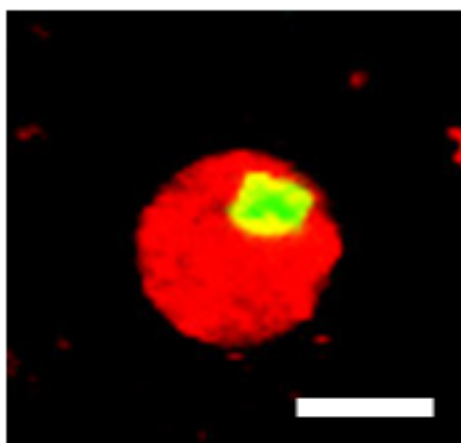


細胞分裂時のゲノム分配における 1 分子性のモデル研究

研究代表者： 鈴木 宏明（中央大学）

少数性生物学の公募班に採択していただいて、はや3年が過ぎました。私は第1回目（H24-25）の公募から続いて採用していただきましたので、これまでに春冬計6回の領域会議に参加しました。その間、私自身にも大きな変化がありました。前任の大阪大学を離れ、現職の中央大学理工学部で研究室を構えることができました。また、第一子が誕生し、子育てをするなかで研究室の立ち上げと新しい講義の準備などに奮闘しました。この重要な転換期に、少数性生物学の領域に参加し、研究内容その他に関する議論やアドバイスが頂けたことは本当に貴重でした。研究室も3年目に入り、研究環境も整いましたので、全力で本領域に貢献できる成果を出していきたいと意気込んでいます。

少数性生物学の領域会議は、本当にアットホームな雰囲気といますか、科学に対して厳しく真剣な中で、垣根のない議論ができ、利害なく貴重なアドバイスがもらえます。これは、研究者にとって至福の環境だといえます。私は、細胞分裂においてゲノムが等分配する物理的機構を、モデル膜系を用いて検証する提案をしています。大腸菌と同程度の巨大ゲノムを用いて実験を行う必要があると考えていますが、機械系の研究室ということもあり DNA の抽出に関するノウハウを持ち合わせておらず、均一なゲノムを得ることに苦慮しておりました（下図）。1月末の領域会議で現状を報告したところ、実に多くのアドバイスをいただくことができました。これから、有望な方策を順次試していこうとしているところです。この至福の環境をかみしめつつ、「おもしろい」成果が得られるようにまい進したいと思います。



大腸菌から抽出した DNA を封入したジャイアントリポソーム。
スケールバーは 5 μm

シグナル伝達系におけるゆらぎの生成と伝搬の少数性生物学

研究代表者： 柴田 達夫（理化学研究所）

本研究では、シグナル伝達系におけるノイズの生成・伝搬の解明を目指しています。

理論面では、適応現象のノイズと応答の関係に取り組みました。適応は、環境の刺激に応答を示した後に、元の状態に戻ろうとする現象で、大腸菌の走化性や酵母の浸透圧応答などに見られます。完全な適応は、incoherent feedforward loop (iFFL) と negative feedback loop (nFBL) の2種類のネットワーク回路によって実現されることが知られています。今回、私たちはこれらの回路に刺激を与え、それに対する応答と適応に内在するノイズを定量しました。理論的および数値的な解析から、次のことがわかりました。a) iFFL と nFBL の両方について、また適応が完全な場合と不完全な場合のいずれでも、応答の大きさは内在ノイズの大きさに制限される (図 1)。b) 多くのパラメータ条件に対して、nFBL の方が一般に大きな応答を示す。一方、完全な適応を実現する上では、iFFL の方がよりロバストである。c) 適応に内在するノイズ (intrinsic noise) に比べて、環境刺激に含まれるノイズ (extrinsic noise) の影響は小さい。今回得た結果は、適応現象を示す実際の細胞のシグナル回路に iFFL よりも nFBL が多いことの1つの説明になっていると考えられます。

実験面では、細胞性粘菌を用いて、走化性に重要な役割を果たすイノシトールリン脂質シグナルのノイズの可視化に取り組みました。このために、2重レポータータイメーシングという新しいノイズの可視化手法を開発しました。脱リン酸化酵素 PTEN に HaloTag を付加したものを2色の HaloTag リガンドで標識することで、2色の PTEN を用意し、その細胞内動態を蛍光観察、定量します。これを数理モデルで解析することによって、PTEN が細胞膜と細胞質を往復することに伴うノイズ (intrinsic noise) と、PTEN の上流のシグナルで生成し伝搬するノイズ (extrinsic noise) を精密に分けて定量することができました (図 2)。現在さらにその動態の解析を進めています。2重レポータータイメーシングは、PTEN 以外にも様々なシグナル伝達に応用可能なノイズ可視化手法であると考えられ、今後の発展が期待されます。

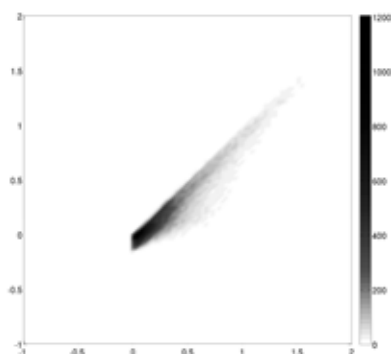


図 1：nFBL 回路での応答とノイズ。応答の大きさ (縦軸) はノイズの大きさ (横軸) に制限される。

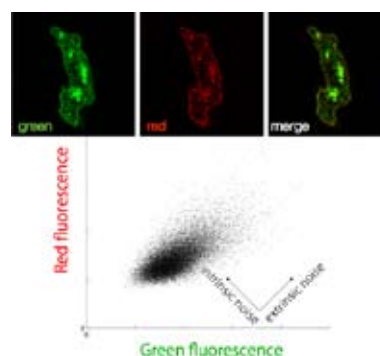


図 2：脱リン酸化酵素 PTEN の 2 重レポータータイメーシングによるノイズの定量。

少数性生物学トレーニングコース

期間： 2014年7月20日（日）～8月2日（土）
場所： 大阪大学産業科学研究所
受講生： 15名 オブザーバー参加：11名
講師陣： 24名 TA：7名

協賛企業： 株式会社オプトライン オリンパス株式会社 株式会社ニコン スペクトラ
フィジックス株式会社 ソーラボジャパン株式会社 日本ナショナルインス
ツルメンツ株式会社 株式会社ナノフォトン 浜松ホトニクス株式会社



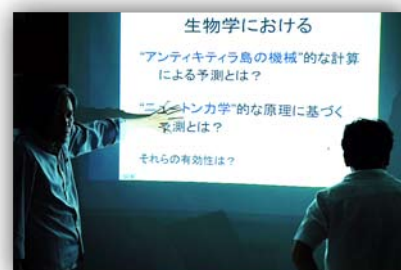
昨年度開催した第1回少数性生物学トレーニングに引き続き、第2回トレーニングコースを同時期・同期間（2週間）、大阪大学産業科学研究所にて開催致しました。顕微鏡の基礎から超解像計測まで実習できる実験編に加え、データ解析・シミュレーションまで行う理論編まで一貫して行いました。また、本コースの特色であるジンギスカンパーティ、アイデアセミナーも実施し、受講生・講師陣ともに深い交流を行うことが出来ました。今回のトレーニングコースも、永井研メンバーをはじめ、講師陣、協賛企業といった、多数の協力のもと開催することができました。

既に第3回の企画が始まっており、2015年7月27日から8月9日の2週間の開催を予定しております。

実習プログラム

- 7/20 開会式
- 7/21 講義：幾何光学・光学顕微鏡の基礎（藤田@阪大）
実習：単レンズによる顕微鏡作成（藤田@阪大）
- 7/22 講義：蛍光プローブ（永井@阪大）
実習：1分子蛍光顕微観察（岡田@QBiC）
- 7/23 講義・実習：LabView 基礎・実習（石島@東北大）
- 7/24 講義・実習：全反射照明顕微鏡の基礎・組立（新井@阪大）
- 7/25 講義：検出器（伊東@浜松ホトニクス）
実習：1分子蛍光観察のためのカメラ比較（伊東@浜松ホトニクス）
- 7/26 講義：超解像顕微鏡（渡邊@QBiC）
実習：PALMによる超解像イメージング（市村@QBiC）
夜：ジンギスカンパーティ
- 7/28 講義・実習：画像解析（三浦@EMBL）

- 7/29 講義・実習：1分子時系列データ解析（小松崎@北大）
- 7/30 講義・実習：1分子拡散シミュレーション（富樫@広大）
- 7/31 アイデアセミナー1：「少数の少数たる条件」（富樫@広大）
 アイデアセミナー2：「シグナル伝達系を構築する分子の個数～絶対数と細胞間ヘテロ性～」（堀川@徳島大）
 アイデアセミナー3：「細胞におけるゆらぎの階層化」（上田昌弘@阪大理）
- 8/1 アイデアセミナー4：「超分子複合体形成における数の調節」（今田@阪大理）
 アイデアセミナー5：「少数の遺伝子が一体どのように検索されるのか？」（前島@遺伝研）
- 8/2 成果発表会、閉会式



LabView を用いた機器制御
 ImageJ による画像処理
 イメージングデータからのデータマイニング等

田中 裕行 (大阪大学産業科学研究所)

電子工学出身の自分は現在まで走査型トンネル顕微鏡等を用いて研究を行ってきましたが、一分子イメージングの理論と実験技術について系統的に学びたいと強く感じていたところ、ボスの理解もあり幸運にも本コースに参加させていただくことになりました。現役バリバリの講師陣の基礎知識の講義から装置の組み立てを含んだ実験、それにデータ解析や今後の展望と、自分の想像を遙かに超える内容であり感動的でもありました。まずは少数性生物学のメンバーの方々への感謝の一言に尽きるというのが正直な感想です。

一分子イメージングはできれば凄いが、素人には難しい！という先入観ないしバリアのようなものを感じていましたが、講師の先生はとてもフレンドリーにそのバリア下げてくださいました。「医学生物学論文の70%以上が、再現できない！」(2013 Nature)、研究結果の再現性の低さが深刻な問題となっていますが、人が自分の思惑を指示する結果・理由を集めたがるのも一因なので、このような落とし穴にはまらないためのデータ解析の講義も強烈に印象深いものでした。

講義では分子の個性や社会性についても触れられました。そのような分子達から命と意志を授かった自分も、小数分子達に負けずに、本コースをただ乗りするだけでなく信頼関係を深め、本研究分野のさらなる発展に寄与したいと強く思いました。

真野 智之 (東京大学理学部物理学科4年)

今、改めて本トレーニングコースのテキストを見返してみると、二週間のうちにこんなにも多くのことを学んだのかと、我ながら驚きを感じてしまいます。TIRFも超解像イメージングも、親身な指導のもと自分の頭と手を動かしてやってみると意外なほど簡単にできることに気が付きました。一分子イメージングに対する「壁」のようなものを、きれいさっぱり打ち破ってくれた、というのは多くの参加者が共有する感想でしょう。また、私の個人的な例で言うと、本コースでの実習をきっかけにLabVIEWを自分の研究に導入し、計測のためのオリジナルのプログラムを作るなどして、現在では私の実験になくてはならない必須のツールとなっています。

本トレーニングコースのもう一つの収穫は、少数性生物学が探求する生物における「少数性」の問題について、何人もの講師の方々と連日白熱した議論を行うことができた点です。「少数性」は今後の生命科学を、さらには辺縁の物理学・数学までも革命しうる理解の枠組みなのではないか、と私の生物観を一変してしまったと言っても過言ではないでしょう。私は2015年秋より米国の大学院に進学します。本トレーニングコースで学んだ貴重な経験を武器に、微力ながらも、アメリカの地で「少数性生物学」の考えを広め深めることができるよう、研究に励んでいきたいと思えます。

安田 哲（大阪大学理学研究科）

私はこれまで電子スピン共鳴（E S R）を用いてタンパクの動的構造解析をしており、E S Rと同様な構造解析を一分子で解析でき、なおかつE S Rとは異なる速度範囲を計測できる蛍光分子を使用した一分子計測の手法を学びたくて、このプログラムに参加させて頂きました。その期待以上に、その分野で第一人者である先生方が“コツ”を含めて、丁寧に解説していただいたため、2週間という期間の長さもあって非常に多くのものを得ることができました。今後はこのプログラムで学んだ1分子計測をいかして、これまで私が行なってきたE S R計測による揺らぎの解析と比較することで、幅広い領域の揺らぎ解析をしていけたらと考えています。

また、今回の実習では講師の先生方だけでなく実習で同じ班になった人達からも刺激を受け、有意義な時間を過ごすことができました。色々な分野の方と長時間話す機会はなかなかないので、飲み会も含めて議論ができたことは非常に良い思い出です。そしてなにより観測の技術を学ぶというだけでなく、『少数性生物学』といった新たな視点を学べたことや、そういった新しい分野の開拓へと邁進している人達の熱意を身近で感じる事ができたことは、今後の私の研究人生において大切な財産になりました。

大野 良和（琉球大学理工学研究科）

本コースでは、レンズやカメラ特性といった光学系の基礎から、TIRFやPALM顕微鏡の自作まで、幅広い知識を体系立てて学習ができる国内で唯一の実習であるため、参加を心待ちにしておりました。実習内容は予想以上に充実しており、これまでの勉強不足を痛感したと同時に、最先端で活躍されている先生方の研究内容を紹介していただき、毎日がとても新鮮でした。特に、生命現象の本質を明らかにしていく「少数性生物学」に関する講義内容は目から鱗の内容で、生命現象を定量的に解析する重要性を再認識することができました。

これまでの自身の研究生活では顕微鏡の中身に触れたことが無く、結果的に既存の顕微鏡システムや解析ソフトに実験手法が限定されてしまっていたのですが、座学だけではなく、実際に自分達で手を動かして顕微鏡を自作することでメカニズムの理解が進みました。実習終了後では、自身の実験結果に対して自信を持つことができるようになったうえ、実験手法に応用力が付いたことを実感しております。

午前は講義、午後は実技、夜間部では永井先生や受講生の方々とのミーティングといったハードスケジュールではありましたが、様々な研究分野の受講生と知り合い、切磋琢磨できたことは貴重な体験となり、今後のモチベーションの向上に繋がりました。

学会・研究会報告

2014年6月11日から13日にかけて奈良でおこなわれた第66回日本細胞生物学会大会で、シンポジウム「遺伝情報を司る DNA のふるまい」を本領域の京都大学・原田慶恵先生と共にオーガナイズしました。実は奈良は私の故郷です。会場の奈良公園の辺り（奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター）は高校生の頃よくうろついていた思い出の場所です。

さて、シンポジウムでは DNA のふるまいの物理的な側面に焦点を当て、1分子操作・計測など、日本発のナノテクノロジーをもちいた研究を紹介して頂きました。演者の先生方は生物物理学会のシンポか？という面々でしたので、前日に「明日のシンポですが、細胞生物学会です（生物物理学会ではありません（笑））。このため、聴衆が理解できるよう、内容を調節し、分かりやすい言葉でお願いいたします。」というメールをお送りしておきました。

シンポジウムは12日朝9時からでしたので聴衆が集まるかとても心配でしたが、講演会場はほぼいっぱいになりました。演者の先生方は、メールでお願いしたとおり、平易な言葉で語って下さり、とても熱いディスカッションが繰り広げられました。飯野先生（分子研）は、F1モーターをDNAのリールに使ったお話。多田隈先生（東大）はDNAの塩基対合を精緻に利用したDNA折り紙の話題。吉川先生（同志社大）はDNAの試験管内の多様な振る舞い、原田先生は、高濃度のタンパク質環境下で1分子観察を可能にするナノ開口、小穴先生（東大）は精巧なチャンバーのなかで、細胞核からクロマチンを紡ぐお話でした。そして、話は細胞の中に移り、私が細胞核のなかのクロマチンの振る舞い、最後に荒井先生（遺伝研）が、線虫の初期胚発生におけるクロマチン動態変化について講演されました。細胞生物学会の皆さんにもとても興味を持って頂けたと思います。おかげさまで私自身も勉強になりましたし、楽しい時間を過ごすことができました。以前、試験管内のDNA研究と細胞生物学的なクロマチン研究は、とても大きな隔たりがあるように感じていましたが、最近その距離は急速に縮まっている印象を受けました。

最後に、本シンポジウムの演者、聴衆の皆さま、ご協力どうもありがとうございました。



このシンポジウムは、新学術領域の企画ではありませんが、テーマは通底しています。要素数 $N=1$ と ∞ の狭間、すなわち少数のものたちが対象です。

ここでなぜ物理学会かと思われるかも知れません。例えば、酵素反応を考えてみますと、 N が非常に大きい場合については、熱力学や生化学の教科書に載っているような理論体系があります。 $N=1$ 個の (確率的) 振舞いは、1 分子生物学がターゲットとしてきたところです。複数であっても、それらがバラバラに動くのであれば、単なる足し合わせと考えると問題ありません。ところが、中途半端な個数のものが互いに影響しつつ動く場合には、まだ整理されていない問題が残っています。これこそ「少数性生物学」で考えてきたことですが、さらに、細胞の中の分子、組織・個体の中の細胞、生態系・社会の中の個体と、階層の違うところで共通して「少数性」問題が現れるとなると、理論物理研究者としては、それらをできるだけ統一的に説明したくなります。そこで、この問題を生命システムの特徴の 1 つとみて、同じく物理の研究者に問う、という趣旨でシンポジウムを提案しました。

講演は、まずは分子の階層から「少数性の生物学において顕在化する分子個性」(小松崎民樹さん)、「1 分子バイオモーターのランダム運動を方向性のある運動に変換する機構」(矢島潤一郎さん)、次いで細胞レベルの振舞いに移り「シミュレーションが接続する分子・細胞・個体—Berg-Purcell 限界を出発点に—」(高橋恒一さん)、「細胞内情報処理反応の 1 分子計測」(佐甲靖志さん)、「神経のスパインはなぜ小さいか? ゆらぎを利用したロバストでセンシティブな情報処理」(黒田真也さん)と、実験・計算・理論を交えて 5 名の方をお願いしました。「少数性生物学」メンバーでもある小松崎さん、矢島さん、高橋さんはもちろん、分子の反応・状態変化を細胞レベルの情報伝達・行動へとつなぐ展望を示した佐甲さん、スパインが小さく (中の分子が少なく) かつ数が多いことの利点を示した黒田さんと、一貫して、具体的な生物や分子の名前を超えて一般化するものがあるという感触を得られるものであったように思います。

夕方遅い時間帯の開催となりましたが、最後の総合討論まで 3 時間半以上にわたり、多くの方々に議論頂きました。統計物理などを専門とする参加者も多く、これまでの生物系学会でのシンポジウムとは異なる視点からの質問・意見が多かったように思われます。この先に、物理としても新しいといえる発見につながればと願っています。

(2014 年 9 月 9 日 中部大学春日井キャンパス)

生物物理学会シンポジウム「少数性、数揺らぎが創出する機能のシナリオ」
(Scenario of functions from minority and number fluctuations)計画 A03 班 小松崎 民樹 (北海道大学電子科学研究所)
計画 A01 班・領域代表 永井 健治 (大阪大学産業科学研究所)

2014年9月25-27日、生物物理学会においてシンポジウム「少数性、数揺らぎが創出する機能のシナリオ」(9月26日)を開催し、200名近く参加して、少数性が生命機能にどのような効果をもたらすか、および、細胞個性が創る分子数の非対称分布と機能との関係について議論した。東京大学大学院 総合文化研究科 上村淳さん(講演題目 Minority molecules and competitions in a catalytic reaction network)は、細胞分裂に類似した離散挙動を与えうる細胞内化学反応モデルに基づいて、化学反応の素過程に費やされるリソース(酵素に相当)の拡散係数が大きく(小さく)、常に餌が供給される(とは限らない)環境では、増殖する細胞内の化学成分の濃度比の多様性が小さい(大きい)ことを新規に見出した研究について講演された。東京大学大学院理学系研究科 藤井 雅史さん(Stochasticity in Ca^{2+} increase in spines enables robust and sensitive information coding)は、神経細胞に比べて体積が約 10^4 倍も小さいスパイン ($0.1 \mu\text{m}^3$) 内では、化学反応は濃度を変数とする力学系ではなく確率的な過程であることに着眼し、そのような少数場の利点(ノイズに対する相対的な頑健性)を情報理論的に解明した研究を講演された。理化学研究所生命システム研究センター 柳沼秀幸さん(Heterogeneity in ATP Concentrations in a Single Bacterial Cell Population Revealed by Quantitative Single-cell Imaging)は、細胞内のATP濃度を検出・定量化できる新しいプローブの開発と大腸菌のATP濃度の分布が、餌が潤沢にあり食べ始める対数増殖期、ならびに初期定常期では、正規的であるのに対し、晩期定常期では対数正規分布に移行することを初めて明らかにした実験研究に関して講演された。これまで、連続培養条件下の対数正規分布のモデルはあるが(古澤一金子)、“社会”のダイナミクス(正規→対数正規)のモデルはなく、“個”に対する“社会”全体の時間発展を今後解明されていくものと期待された。東京大学大学院総合文化研究科 複雑系生命システム研究センター 若本祐一さん(Single-cell lineage statistics reveals fitness and selection strength for heterogeneous phenotypic states)は、ある化学物質に対して細胞の大半は死滅するところ、一部の細胞は耐性を有し生き残るが、細胞分裂後は耐性を失う(遺伝型ではなく表現型レベルで耐性を獲得している)パーシスター細胞に関する研究と、イメージング解析から構築される lineage の系統樹に基づいて“祖先”から“子孫”への前方時間発展(=実データ)と“子孫”から“祖先”への仮想的な後方時間発展(=それまでの系譜、環境に依存せず、乱数でその逆時間発展をシミュレートする)の相違から、細胞が取っている(であろう)選択則を評価する新しいデータ駆動型サイエンスの研究を講演された。細胞個性と表現型の新しい機軸を展開できる可能性を示唆し、今後の更なる展開が期待された。

少数性生物学の重要性が理論・実験両面から議論でき、会場からも積極的な質問が多く、シンポジウム自体は大成功であったといえる。敢えて批判的に自己評価すると、全体を通して、パーシスター細胞を除いて、“個性”、“少数性”の重要性を実験的に証明できているとは必ずしも断定できないことにある。更に、一分子計測、一分子イメージングはそのS/N比の低さから“意味のある”少数性とノイズ・数揺らぎを峻別することが原理的に困難であるため、少数性の実験生物学の展開として、離散性に基づく計数生物学など、また、理論生物学では、“個”に限らない細胞社会の動態のモデル構築など、多角的に議論していく必要もあるであろう。



「第2回少数性生物学データ検討会」

計画 A03 班 富樫 祐一 (広島大学理学研究科)

オーガナイザーとして執筆を依頼されましたが、これほど報告の書きにくい研究会もありません。この会は、少数性生物学に関係する（かも知れない）が解析困難な（ゆえに未発表の）データを持ち寄って議論するもので、その内容はまだ公開できないものばかりだからです。募集時に「潜在的に重要なものが埋もれている可能性がある（他の参加者が何かを見出す可能性がある）ため、持ち込むデータの内容に特に制限は設けない」としたこともあり、非常に興味深いデータもあったのですが、残念ながら。とはいえ、伏せ字だらけというわけにも参りませんので、この会が企画された経緯について記したいと思います。

一昨年6月の領域会議の際、岡田康志さん（A01-1班・当時）から、解析の方針が立ちそうなデータより、むしろどう解析したら良いかまったく分からないデータを持ち寄って検討する会が必要では、という提案がありました。ここから「わけのわからないデータ」というキーワードが生まれ一人歩きした結果、次の領域会議で、深夜のカラオケボックスにノートパソコンを持ち込んで議論する、という軟らかいスタイルから始まった（しかし議論はむしろ白熱した）のがこの検討会です。せっかく実験・計算・理論研究者、さらには機器メーカー関係者まで揃っている領域ですので、何が起きているかも分からないデータについて議論しているうちに何かが見えてこないかという期待がありました。実際に、解析の方針にとどまらず、実験を改良するアイデアもいくつも提案されていました。

第2回となる今回は、昼は1人ずつ順に発表する一般的な研究会のスタイル、夜は意見交換会で自由に討論を、という形となりました。とはいえ、まとまった研究を発表する場とは異なり、途中でも次々に質問や意見が飛びます。データ持参の4名を含め12名という参加者数もあり、研究室セミナーのような話しやすい雰囲気を感じつつ、異分野のスペシャリストからの意見が次々に出てくる、という点では面白い試みにできたかと思っております。その場で答が出ない多くの宿題が残されたのが、理論・解析担当班としては課題です。今年1月の領域会議では初回と同じスタイルで開催し、来年度も同様の企画を予定しております。少数性生物学に関係する（かも知れない）データをお持ちの方は、ぜひ御相談ください。



(2014年10月31日 広島パシフィックホテル)

1 分子生物学

化学同人 2014年10月10日発行、原田慶恵、石渡信一 編

1分子で働く機能性タンパク質、その機能を1分子レベルで見ることによって初めて分かることはどのようなことでしょうか。従来の溶液系実験を超えて、1分子を研究することによって初めて分かったこと、分かるであろうことはどのようなことなのでしょう。1分子の生物機能を捉えることを目標とする“1分子機能学”は今、創成期を過ぎて定常期に入ったように見えます。この研究分野の現状を俯瞰し、“1分子生物学”に至る将来を見据える機会となることを願って本書を編集しました。本書は「Part1 1分子生物学の研究対象」と「Part2 1分子生物学の研究手法」に分かれています。この2本柱は、現在の「1分子生物学」を推進させる両輪であり、新規な現象の発見や機能の解明と、手法の開発は決して切り離すことのできないものです。1分子生物学は“単純かつピュアな生体分子集合体（生物分子機械）”の場合には、分子間相互作用や、その分子の機能のダイナミクスを直接捉えることができ生物分子機械が働くメカニズムを知りうるという点で、大きな意味があります。ある程度の大きさのシステム内で1分子の時空間的な挙動を捉え操作することも意味があるでしょう。それでは、細胞や細胞集合体以上の高次構造の中で、1分子の動態を捉えることにどのような意味があるのでしょうか。その答えが「少数性生物学」にあると思うのですが、いかがでしょうか。

1 分子ナノバイオ計測

化学同人 2014年6月30日発行、野地博行 編

この本のそもそもの位置づけは、特定領域「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」（代表：野地博行、期間：平成18年度～平成22年度）の成果報告書です。ただ、この本の章立てを取りまとめる段階で現新学術領域がタイミングよく立ち上がることが分かったため、2つの領域を跨ぐ形も意識しています。そのため、現領域メンバーの何人かの方々には執筆を依頼しました。この本の特徴は、まだ1分子計測と連携していないけれど今後1分子ナノバイオと融合することが期待される分野も取り込んでいる点です。例えば、量子化学計算、タンパク質ザイン学、システムズバイオ、非線形光学などがそれに相当します。知り合いの研究者からは、「特に巻頭言と座談会がおもしろい」との評価をいただいています。座談会では、1分子のレジェンドとなった柳田先生を囲んで、永井さん、林さん、野地でかなり勝手なことを放談しています。売り上げは??ですが、店頭で見かけたら手に取っていただくと幸いです。

注目研究

【研究の背景】

生命にとって「外環境情報を処理し応答する」ことは最も重要な生命活動の一つです。この情報処理には様々なタンパク質がシステムを構成することで行われ、細胞システムの根幹を担っています。これまでの研究は、情報処理を担う生体分子の相関図の解明に焦点が当てられてきた一方で、近年の蛍光イメージング法の発展によって、情報処理を担うタンパク質の“挙動”“量”“相互作用”の生きた細胞内での計測がようやく可能になってきましたが、依然として多くの課題が残されています。

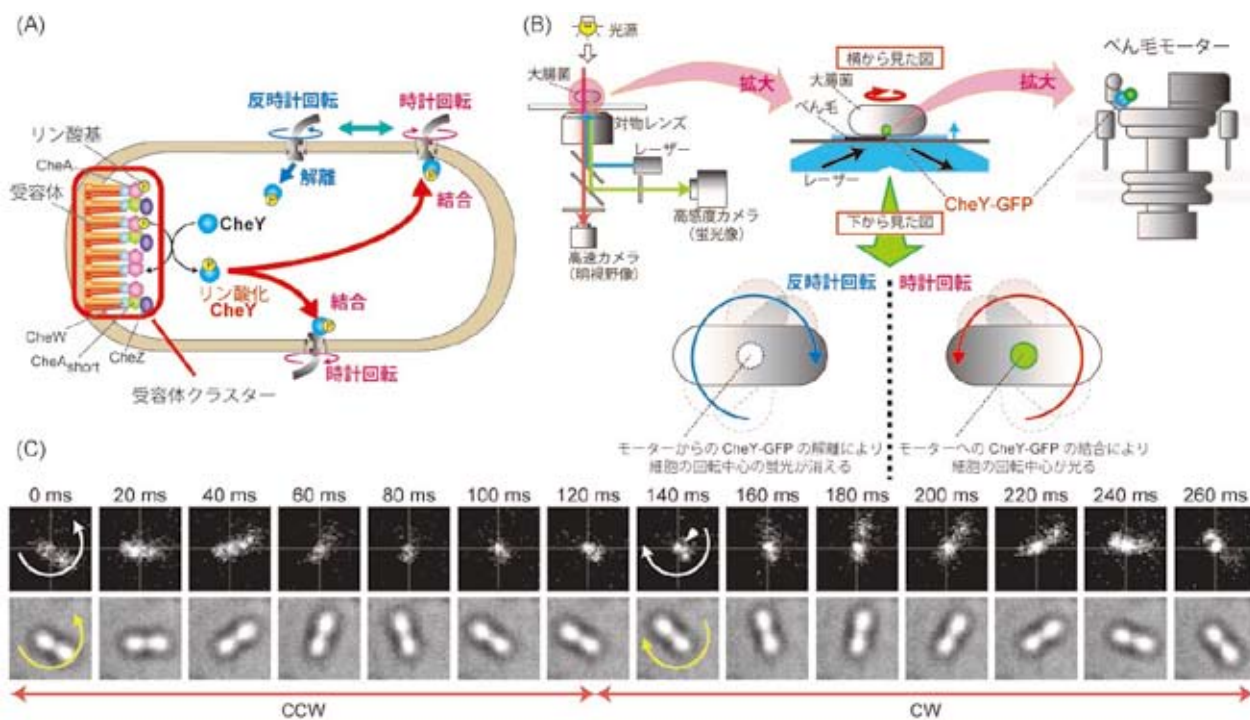
【細胞内情報伝達分子と細胞応答の同時計測】

私が研究対象としている大腸菌は、走化性システムと呼ばれる情報処理システムにより、「環境の変化」を感知・判断し、べん毛モーターの回転方向を変え、自身にとって好ましい環境へ遊泳します。システムに関わるタンパク質の殆どが明らかであり、大腸菌は「環境の変化に応じて自ら考え動く」ことを分子レベルで理解可能な魅力的な対象です。私は、大腸菌の情報処理システムを、システムを担うタンパク質の生細胞内での動態、時間、数などの定量的情報を基に理解することを目指して研究を行ってきました。外界の環境変化を認識し、べん毛モーターへ伝達し、その回転方向を制御するのが走化性システムです。細菌の走化性システムでは、分子遺伝学および生化学的な知見に基づいて、細胞内の情報伝達分子であるリン酸化型 CheY (CheY-P) のモーターへの結合・解離がモーターの回転方向を制御すると推測されてきましたが、CheY-P (情報伝達分子) の結合・解離によるべん毛モーターの回転方向転換 (走化性システムの出力) が機能的なモーターで本当に起こっているかどうかは分かっていませんでした。そこで私達は、緑色蛍光タンパク質による CheY の蛍光イメージング (CheY-GFP) と、モーターの回転方向転換 (明視野観察) を同時に計測しました。その結果、モーターの回転方向転換が CheY-P の結合・解離によって直接制御されることを実証することができました。CheY-P 分子は必ずしもモーター基部体のすべての結合部位 (34 箇所) に結合する必要はなく、 13 ± 7 個の結合で時計回りの回転を誘導すること、回転方向転換時に CheY-P 分子は ~100 ms 以内にモーターと結合・解離すること、時計回転型のモーターの方が CheY-P に対する親和性が高いことなどが分かってきました。

【今後の展望】

べん毛モーターの回転方向転換に CheY-P の結合・解離が必要であること、また、私達の先行研究 (Terasawa et al. 2011) において、同一細胞上のべん毛モーター同士の回転方向転換が高度に同調することが分かってきました。これら二つの事象を説明するためには、モーターの回転方向転換のたびに細胞内の CheY-P の濃度がダイナミックに増減することが考えられます。そのように CheY-P 濃度が増減するためには、10,000 分子以上から成る受容体クラスターが、高い協同性を伴って、少数の分子のように振舞っていることが想像されます。受容体の高い協同性は、大腸菌が少数の外部シグナル分子を確実に認識するのに役立っているのかもしれませんが。現状では受容体クラスターの活性や細胞内の CheY-P 濃度を、単一の生細胞内でかつ細胞応

答とともに計測することはできていません。困難な課題ではありますが、今後、受容体クラスターの活性や細胞内の CheY-P 濃度を可視化し、それらと細胞の応答を同時に捉えることで、細胞の中で行われる情報伝達メカニズムの解明に近づけると期待しています。



(A) 大腸菌の走化性システム (B) 実験方法. CheY-GFP の局在を全反射蛍光顕微鏡とレーザーセル法 (細胞が回転) で観察. (C) CheY-GFP の局在画像 (上) と明視野観察による細胞の回転像 (下). 時計回転時に細胞の回転中心に CheY-GFP の局在が観察される (上段, 矢頭).



名古屋大学大学院理学研究科にて博士 (理学) 取得。

2006 年 8 月まで同研究科で研究員を務めた後、2006 年 9 月より現職。

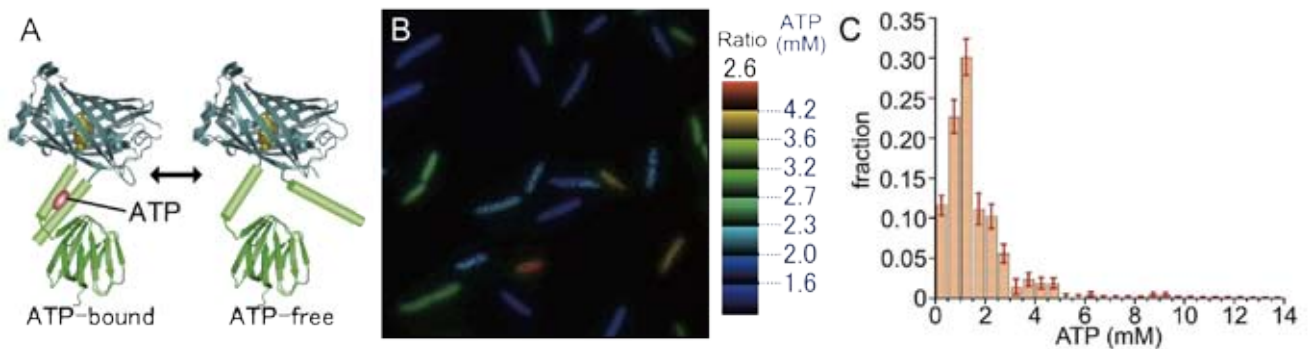
人間をはじめとして、我々が目にする多くの生物は多数の細胞の集合体です。一方大腸菌などのバクテリアは一つ一つが独立した個体である単細胞生物です。人間にもいろいろな人がいますが、もっとずっと単純に見えるバクテリアでも、一つ一つの細胞に着目するとそれぞれに「個性」が見られることが近年わかってきました。細胞ごと(あるいは個体ごと)に個性があるというのは、生物の重要な性質の一つであるように思われます。たとえば大多数の個体が環境に最適化した戦略をとる中で、少数の最適化しない「変わり者」の個体がいることで、かえって急激な環境の変化に対応できるということがあります。また、癌という病気は大多数の細胞が正常にルールを守って分裂している中で、少数ながら異常に分裂が活発な細胞が増殖してしまった結果だと考えることもできます。こうした少数の「変わり者」は、ほかの大多数の個体や細胞と何が違うのか、そしてその違いがなぜ生じるのかを考えることは、生物を理解するうえで重要だと考えています。

これまで、細胞ごとの個性は主として遺伝子の発現量の違いという観点から論じられてきました。遺伝子発現に伴って合成される mRNA やタンパク質の量は細胞内で比較的安定しており、一細胞における測定手法も確立されてきているのが大きな理由です。一方、細胞内の代謝物質の量については、変動の時間スケールが非常に速く、また一細胞に適用できる感度の良い測定手法も限られていたため、計測が困難であり細胞ごとの違いはあまり論じられてきませんでした。我々は代謝物質の中でも、さまざまな反応に重要で「細胞内のエネルギー通貨」とも称されるアデノシン三リン酸 (ATP) に着目し、一つ一つの大腸菌細胞ごとの濃度の違いを明らかにしたいと考えました。とりわけ我々がこだわったのは、単に細胞ごとに ATP の量の多い少ないという定性的な測定系で満足せず、定量的な評価方法を開発するという点でした。

そこで我々は新しい蛍光タンパク質型 ATP センサーである「QUEEN (Quantitative Evaluation of Energy の略)」を開発しました。QUEEN は、ATP に結合する F_0F_1 -ATP 合成酵素の ϵ サブユニットを N 末側と C 末側に分割し、単一の蛍光分子の両末端にそれぞれ結合した構造をしています(図 A)。ATP の結合により蛍光団付近の構造が変化すると、400 nm 付近と 500 nm 付近の波長の光による励起効率が変わるため、これら二波長で励起した際の輝度の比から ATP 濃度を求めることが可能です。このセンサーは単一の蛍光分子から成っているというのがポイントです。過去に開発された分子内に二種の異なる蛍光タンパク質を含む ATP センサーでは、片方の蛍光タンパク質が正常に機能しない不完全なセンサー分子が出現することにより、蛍光シグナルの値がおかしくなるという問題が発生する場合があります。QUEEN は分子内に一つしか蛍光タンパク質をもたないため、この問題を回避し高い定量性を実現しています。

QUEEN を用いた一細胞イメージングにより大腸菌の細胞内 ATP 濃度を測定したところ、細胞ごとに ATP 濃度は大きくばらついていることがわかりました(図 B、C)。シグナルのばらつきは測定系のノイズを考慮しても十分に大きなものであり、同一遺伝子をもつ同一条件の大腸菌でも代謝状態は大きく異なっていることが示されました。これまで細胞内 ATP 濃度は一定なのか広く分

布しているのかは全く不明であったことを考えると、非常に面白い結果だと考えています。ただし、このような違いがもたらされる原因は、まだよくわかりません。細胞で発現しているタンパク質の種類と量は遺伝子発現の揺らぎにより細胞ごとに異なるため、確率的に ATP 合成側と消費側のどちらの酵素の比率が高いか、といった違いを反映しているのではないかと考えていますが、検証が必要です。また、こうした ATP 濃度の違いが細胞のほかのシステム（例えば、代謝遺伝子の発現量など）に影響しうるのかについても現時点では不明です。これらの疑問点については、細胞の個性を ATP の濃度という新しい観点から評価できるようになったという利点を生かして、今後明らかにしていきたいと考えています。



(A) ATP センサー「QUEEN」の模式図。(B) 一細胞イメージングの例。(C) 測定された ATP 濃度分布。



2009年に東京大学理学系研究科にて修士号（理学）、2013年に大阪大学生命機能研究科にて博士号（生命機能学）取得。東京大学工学系研究科の研究員を経て、現在は理化学研究所生命システム研究センターの細胞極性統御研究チームにて特任研究員。

私たちは、凝集したクロマチンドメインにおける転写制御に、転写因子やその複合体の「物理的な大きさ」が重要であるという新しいモデルを提唱しました。本論文は国立遺伝学研究所の前島一博教授、横浜市立大学の古久保哲朗教授らと共同で執筆され、私はモンテカルロ・シミュレーションによって仮説の妥当性を検証しました。

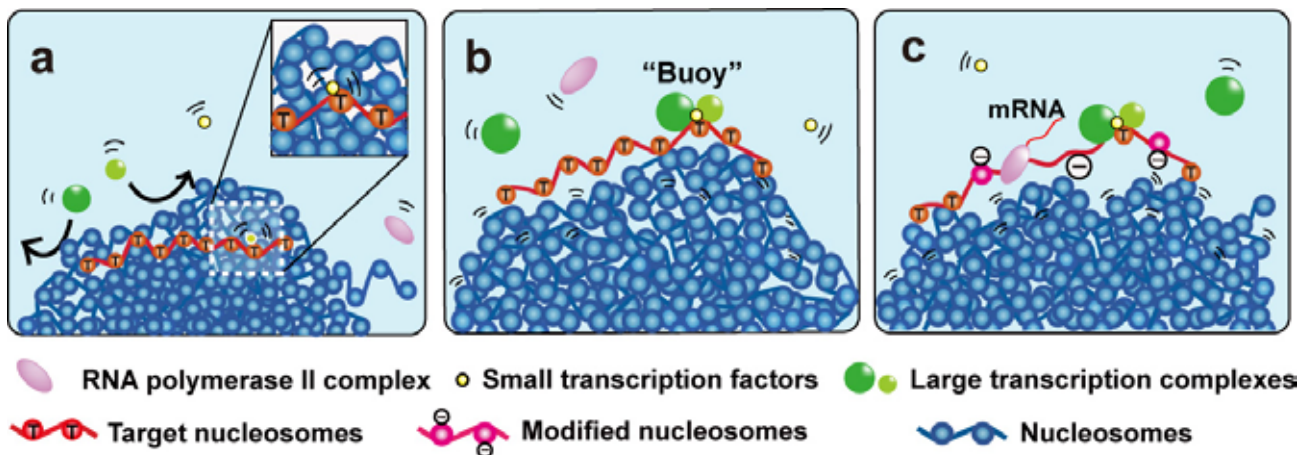
クロマチンの不規則な折り畳み構造 これまで真核生物の染色体は、DNA がヒストンに巻きついてできた 11 ナノメートル程度のヌクレオソーム繊維が、らせん状に規則正しく折り畳まれて直径 30 ナノメートルのクロマチン繊維を形成し、それらがさらに 100、200、500 ナノメートルと規則正しいらせん状の階層的な構造を形成することで出来上がると考えられてきました。しかし、共同執筆者である前島教授らは、これまでにクライオ電子顕微鏡や X 線散乱による染色体構造の観察結果から、染色体の中には 30 ナノメートルの規則正しいクロマチン繊維や階層的な高次構造が見られないことを発見し、実際には 11 ナノメートルのヌクレオソーム繊維が不規則に収納されているという新しい染色体像を提唱しました。さらに最近、細胞核内ではこのヌクレオソーム繊維が不規則に凝集することでクロマチンドメインを多数形成することも分かってきました。

クロマチン動態と情報探索原理 核内では少数の転写因子が長大なゲノム DNA から標的とする非常に少数の遺伝子を的確に探索することで、情報の制御や発現が行われています。不規則に収納された DNA では、個々のヌクレオソームがある程度の自由度を持って動き、こうした転写因子と出会う余地があるため、情報検索がより効率的に行われると私たちは考えました (Hihara et al., *Cell Reports*, 2012, 2 1645–56)。こうしたクロマチンの動態を知るには、蛍光相関分光法や 1 分子追跡を用いた計測が欠かせませんが、数ナノメートルという微小な運動や、それがゲノム情報検索に及ぼす影響を理解するには、シミュレーションによってクロマチン環境や分子の運動を再構成することが非常に有効です。そこで私が用いたシミュレーションの手法は非常に簡単なものです。ヌクレオソームや転写因子などの分子は各々 1 つの剛体球として表されます。まず非常に短い時間幅 (例えば 1 ナノ秒) を決めて、各分子について乱数 (サイコロ) を使って時間内に進む距離と方向を拡散係数に基づいて決めます。次にそれに従って分子を順々に動かしてゆき、他の分子と衝突した場合はその分子は動かさないことにします。これを全ての分子について繰り返した後、時間幅の分だけ時計を進めます。以上を目標とする時刻になるまで繰り返すだけです。この非常に簡単な計算でも、例えば分裂期の混み合ったクロマチン領域ではヌクレオソームが動かなければ 10 ナノメートル程度の分子でさえ自由に動けないことや、逆にわずか 20 ナノメートルのヌクレオソームのゆらぎが領域内の分子の運動を劇的に改善すること、この結果がヌクレオソームの 1 分子計測の結果と矛盾しないことなどがわかりました (Hihara et al., *Cell Reports*, 2012)。

転写因子の物理的サイズを利用した「ブイ」モデルの提唱 さらに今回、シミュレーションの結果によれば、大小様々な転写因子のうち、凝集したクロマチンドメイン内部に入り込むことのできる分子の物理的大

きさには限界があることが示されました。実際に転写因子やメディエーター、RNA ポリメラーゼ、ヌクレオソームリモデラー、ヒストン修飾因子など転写に関わる分子の物理的大きさと比較すると、情報検索において最初に調節領域へ遺伝子特異的に結合する転写因子のサイズは小さく（～50 kDa）、クロマチンドメイン内部に入ることができる一方、その後で結合が誘導されると言われる巨大タンパク複合体（1～3 MDa 以上）はドメイン内部に直接入ることができないことが分かりました。この結果、まずサイズの小さな転写因子がクロマチンドメイン内に入り込み、標的配列を探索して結合し（図 a）、その転写因子と結合した標的配列がドメイン表面に表れてきた際、この転写因子を「目印」として、サイズの大きい転写因子複合体が標的配列に結合する（図 b）と考えました。標的配列に結合した巨大な転写因子複合体は、もはやドメイン内部へと動くことが難しいため、標的配列をドメインの表面に維持する「ブイ（浮き袋）」のような働きができます。そして、リモデラー、ヒストン修飾因子など、他の巨大複合体と共に安定的な転写を可能にする（図 c）という新しいモデルを提唱しました。

本研究で使っているシミュレーション手法は非常に素朴なもので、実際には存在する相互作用や分子の形など多くの要素が取り込まれていません。それでも生細胞の計測による定量データと組み合わせることで、仮説を組み立て、検証するための多くの知見が得られました。私は、とりわけ少数分子の微小な時空間的なふるまいが細胞全体の動態を左右する「少数性生物学」において、シミュレーションが計測技術の限界を補い、分子のダイナミクスを理解するために必要不可欠な技術であると信じています。



2011年に慶應義塾大学大学院理工学研究科で博士（理学）号取得後、（独）理化学研究所生命システム研究センター生化学シミュレーション（高橋恒一）チームにて特別研究員。2013年3月より同所属にて基礎科学特別研究員。

2014 年度受賞報告

2014. 4.15

平成 26 年度文部科学大臣表彰（若手科学者賞）

井上 圭一（公募 A01 班研究代表者）

「微生物型ロドプシンの物理化学研究」

2014. 7. 8

平成 26 年度大阪大学総長奨励賞（研究部門）

竹内 裕子（公募 A02 班研究代表者）

2015. 3.12

中谷奨励賞

野地 博行（A01-1 班研究代表者）

「バイオ分子の 1 分子デジタル計数技術の創成とその応用」

新学術領域研究「少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—」

Newsletter No. 4

<領域代表> 永井 健治
大阪大学産業科学研究所
〒 567-0047 大阪府茨木市美穂が丘 8-1

<事務担当者> 酒井 和代
大阪大学産業科学研究所
〒 567-0047 大阪府茨木市美穂が丘 8-1
TEL 06-6879-8481
FAX 06-6875-5724
Email sakai@sanken.osaka-u.ac.jp