

H23-27 年度 文部科学省 新学術領域研究

「少数性生物学」領域 研究成果報告会

目次

1. 会議概要
2. 会場へのアクセス
3. 参加の皆様へのご案内
4. 発表者へのご案内
5. プログラム
6. 口頭発表 要旨
7. ポスター発表演題リスト
8. ポスター発表要旨

「少数性生物学」領域 研究成果報告会

代表 大阪大学 永井健治

平成 23 年の発足以来、「少数性生物学」領域では、指折り数えることができる程度の少数の要素分子から構成されるナノシステムが“協同的”に動作する原理の解明に努めて参りました。特に、「個と多数の狭間である少数個の要素分子が織りなす化学反応システム」に注目し、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、数理科学の諸分野の英知を融合させた、従来とは異なる視点でアプローチして参りました。今回、延べ 70 名を超える研究者と 20 社の技術開発支援班による研究成果を一般公開するにあたり、成果の活用だけでなく、新たな研究の芽を育む機会としていただきたく、ご案内致します。

平成 28 年

3 月 15 日 (火)

会場：東京大学 伊藤謝恩ホール（本郷キャンパス）

開催概要

- 9:15- 受付開始
- 10:00- 18:30 成果報告講演
ポスター発表
- 19:00- バンケット (要事前登録)

※成果報告会へは当日参加できます。
バンケットの当日参加は受け付けておりません。

お問い合わせ先

〒567-0047 茨木市美穂が丘 8-1
大阪大学 産業科学研究所 永井研究室
新学術領域「少数性生物学」事務局
pi_office@paradigm-innovation.jp
(担当 酒井)

講演者

10:10- セッション 1

野地博行 東京大学
富樫祐一 広島大学
今田勝巳 大阪大学
石島秋彦 大阪大学

13:15- セッション 2

永井健治 大阪大学
村越秀治 生理学研究所
小松崎民樹 北海道大学
大場雄介 北海道大学

15:00-16:20 ポスターセッション

16:25-18:05 セッション 3

前島一博 遺伝学研究所
城口克之 理化学研究所
粟津暁紀 広島大学
上田泰己 東京大学

2. 会場:伊藤謝恩ホールへのアクセス

A. 伊藤国際学術センターまでの道のりはHPなどを参照願います。

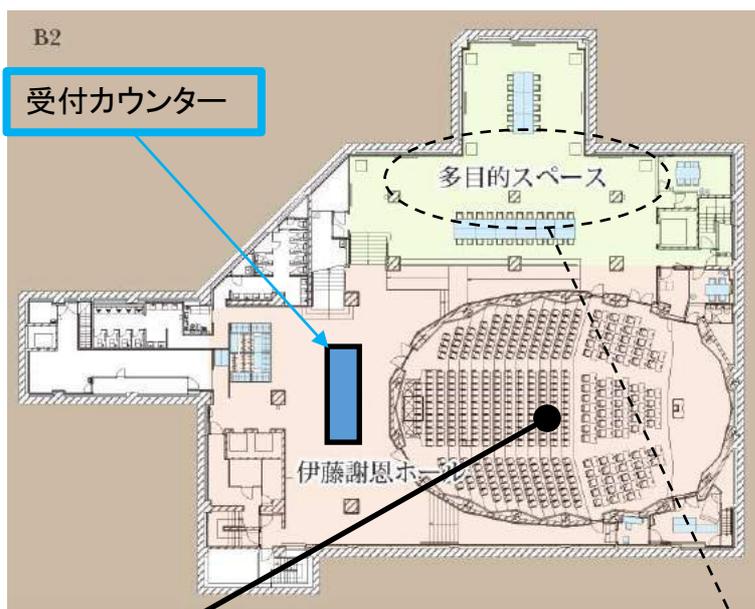


B. 東大赤門(看板あり)もしくは、伊藤国際学術センター中庭を経て、会場入り口(左図黒丸)へ。



C. 地上入り口(看板あり)より、地下2階へ。

C. ホール前の受付カウンター(右図)にて受付を済ませ、会場へお進み下さい。



成果発表会_会場

ポスター発表
ならびに
バンケット会場

注意事項

- 大学内の駐車場はご利用いただけません。
- タクシーでお越しの場合は、JR東京駅から約25分(¥2,000)、JR上野駅から約15分(¥1,500)です。所要時間、料金は交通状況によります。

3. 参加の皆様へのご案内

■受付

当日は、9:15 より伊藤国際学術研究センターB2F 受付ブースにて、受付を開始します。

バンケットへの参加を申し込み済みの方は、受付時に参加費 4000 円を徴収させていただきます。受付時の混雑緩和のため、釣り銭がいないよう準備願います。

■バンケット

19:00 より、伊藤国際学術研究センターB2F 多目的スペースにて、バンケットを行います。バンケット参加費（4,000 円）は、成果報告会受付時に(9:15-)現金でお支払い下さい。当日の参加受付は出来ませんので、領域 HP より事前登録を行って下さい。また申し込み後のキャンセルは、3/8（火）17:00 までとさせていただきますので、締め切りまでに堀川 (horikawa.kazuki@tokushima-u.ac.jp)までご連絡願います。これ以降のキャンセルについては実費を負担いただくこととなりますので、ご了承願います。

■クローク

当日は、クロークの準備はございません。貴重品を含む携行品の管理は、個々の責任で行って下さい。

■録音や撮影の禁止

発表者の許可なしに講演スライドやポスターの撮影、録音を行うことを禁止します。

■飲食について

ホール内は、飲食不可となっております。

■要旨集

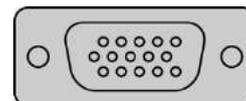
当日会場での配布の予定はございませんので、必要に応じ、印刷物を持参願います。

4. 発表者への案内

■口頭発表の方へ

- ・ 使用言語は日本語です。
- ・ 発表時間は15分+質疑応答8分です。
- ・ 液晶プロジェクターの解像度はXGA (1024 x 768) です。解像度の切り替えが必要なPCは、本体の解像度の設定を予め変更しておいて下さい。
- ・ セッション開始前に、事前接続の確認をお願いいたします。会場の発表舞台に直接PCをお持ち下さい。

- ・ 演台にはレーザーポインタとマイクが備え付けられています。
- ・ PCからの音声出力はできませんので、予めご了承下さい。
- ・ 接続はMiniD-sub15ピン3列コネクタ（通常のモニター端子：右下図）となります。PC本体の外部モニター出力端子の形状を必ずご確認ください、必要な場合は専用の接続端子をご持参下さい。近年はWindows PCであっても、HDMI接続端子のみが搭載されている場合が増えておりますので、ご注意ください。



■ポスター発表の方へ

- ・ 使用言語は、日本語、英語どちらでも構いません。
- ・ ポスター発表は、伊藤国際学術研究センター地下多目的スペースにて行います。
- ・ ポスターボードサイズは縦240 cm × 横90 cm (A0 縦)です。
- ・ 下記の時間帯で指定番号(ポスター演題リストを参照)のボードに掲示して下さい。
 - 掲示： 9:30 ~
 - 発表： 奇数番：15:00-15:40 (40分)
偶数番：15:40-16:20 (40分)
※ バンケット時にもポスターセッションを継続します。
 - 撤去： 21:00~ バンケット終了後に撤去して下さい。
(バンケット不参加の発表者は、成果報告会終了後に取り外して下さい)

5. プログラム

- 会議名 新学術領域「少数性生物学」研究成果報告会
- 開催日 平成28年3月15日(火)
- 開催場所 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール

	時間	演者	所属	演題
受付開始	9:15	10:00		
開会の挨拶	10:00	10:10	永井 健治	大阪大学
Session1	10:10	11:50	野地 博行	東京大学
			富樫 祐一	広島大学
			今田 勝巳	大阪大学
			石島 秋彦	大阪大学
全体写真撮影	11:50	12:00		
昼食	12:00	13:15		
Session2	13:15	14:55	永井 健治	大阪大学
			村越 秀治	生理学研究所
			小松崎 民樹	北海道大学
			大場 雄介	北海道大学
ポスターセッション	15:00	16:20		
Session3	16:25	18:05	前島 一博	遺伝学研究所
			城口 克之	理化学研究所
			栗津 暁紀	広島大学
			上田 泰己	東京大学
総評	18:05	18:20	金子邦彦	領域アソシイザー(東大)
			神原秀記	領域アソシイザー(日立)
閉会の挨拶	18:20	18:30	永井 健治	大阪大学
バナーカット	19:00	21:00		

6. 口頭発表要旨

セッション1-1

デジタル分析法と非線形光学を用いた少数生物学研究

【A01-1 班】

田端和仁¹、大場雄介²、野地博行¹、市村垂生³、渡邊朋信³

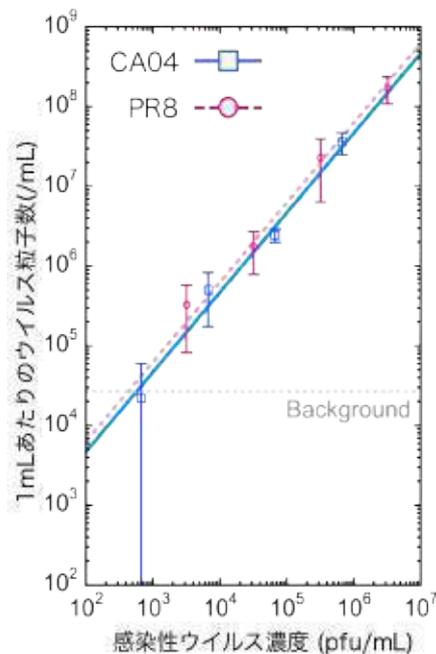
¹東大工学研究科、²北大医学研究科、³理研 QBiC

我々は生体分子を1個1個数え上げる技術を開発し、この技術の少数性生物学研究への応用を行った。開発した技術は、超微小溶液チャンバーを用いたデジタルバイオ分析法と、顕微分光技術を利用した超並列1分子イメージング技術である。

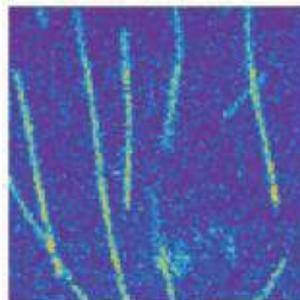
デジタルバイオ分析法の開発では、まず1分子デジタル ELISA 法を開発した。これによって通常の ELISA と比較して100万倍感度の高い手法を確立した。次に、公募 A02 班が提供するインフルエンザ粒子の1粒子計測法を開発した。その結果、感染能を有するウイルス数より数十倍高い値が得られた。これは、細胞から分泌してくるウイルス粒子の殆どは単体では感染能を持たないことを意味する。A02 班が提唱する粒子同士の協同的な感染現象とあわせて興味深い知見である。

顕微鏡技術の開発では、多色標識とイメージング分光計測を利用した分光ナノメトリ法を提案・開発した。ナノ空間中で近接して動作する、複数のタンパク質の一分子動態を同時追跡できるようになった。本研究期間内にて、30ms の時間分解能で 3nm の空間精度で計測を実現した。合わせて、少数のタンパク質の相互作用によるタンパク質構造変化の計測を目的として、二次の非線形散乱（第二次高調波）を用いたタンパク質構造動態計測法を開発し、解析法を含めた計測技術体系を構築した。とくに、タンパク質フィラメントである微小管の計測に重点的に取り組み、フィラメント内のタンパク質構造の遷移の検出を実現した。

さらに、班内共同研究として、マイクロチャンバー技術と質量分析技術を利用した単細胞セクレトミクス法を提案・開発し、細胞外分泌物の単一細胞ごとの計測を実現した。



上図：感染性ウイルス数（横軸）とデジタル分析によるインフルエンザ粒子数（縦軸）。CA04, PR8 はそれぞれインフルエンザの株名。



下図：第二次高調波による単一微小管のイメージング。蛍光による染色は不要。第二次高調波の偏光解析により微小管構造を計測する。

少数分子反応系の理論～化学・力学複合ネットワークの理論へ

【A03-1 班】

中川 正基¹, Holger FLECHSIG^{1,2}, 新海 創也^{1,2}, 富樫 祐一^{1,2}¹ 広島大学理学研究科, ² 広島大学クロマチン動態数理研究拠点

生命システムは多種多様な要素からなる一方で、それらの中には少数個しかない要素（例えば細胞あたり少数個しかない分子）が含まれている。もし、こうした少数個の要素の影響が少数の範囲にとどまるのであれば、大きなシステム全体の振舞いへの影響は無視できるだろう。しかし、例えば生体分子の中には、触媒（酵素など）や鋳型（DNA など）として働くものがあり、少数であっても繰り返し反応に関与して影響を増幅する可能性がある。

このような場合、系を小さく（分子を少なく）するだけで、分子が無数にある場合（生化学）とは質的に異なる振舞いを生じることが、簡単な触媒反応モデルを用いて示されてきた。プロジェクトを始めるにあたり、我々はまずこの原点に戻り、抽象的なモデルを用いつつ、残された問題に対する理論の構築を目指した。具体的には、より複雑なネットワーク構造への展開と、個別のシミュレーションによらない法則の導出である。例えば、ある条件を満たす触媒反応ネットワーク一般に対し、濃度の平均や分散といった量を予言する理論を新たに構築し、平均濃度の順位に関する法則、特殊な定常状態の存在などを導いた (Nakagawa & Togashi, *Front. Physiol.* 2016)。また、少数分子間の反応が確率的・離散的であることは、一般に「ゆらぎ」としてとらえられるが、この「ゆらぎ」が反応拡散系の時空間パターン形成に与える影響は、例えば酵素分子の内部状態（構造）に起因する「ゆらぎ」とは質的に異なることを示した (Togashi & Casagrande, *New J. Phys.* 2015)。

さて、これら少数個の要素が独立に働いている（例えばある分子の性質が別の分子によらず常に一定）のであれば、全体の振舞いは個々の要素の振舞いの足し合わせとして議論することができる。しかし多くの場合、要素の振舞いはフィードバック機構などにより相互に干渉しあう。要素が協同的に働くことにより、多数の要素が少数のように振舞う可能性さえある。

要素間の相互作用としては、もちろん分子を介した化学的なものが考えられる。この場合、前記の反応系の理論の枠組みで議論できる。一方、分子複合体の内部、混雑環境下で隣接する分子の間などでは、力学的な相互作用もまた重要である。分子機械、例えば分子モーターが効率的に働くためには、内部で力学的に情報を伝える機構が欠かせない。これら分子機械を構成する要素（サブユニット）の数は少数、かつ、数・配置が決まっていることが多い。そうした少数個の要素間での相互作用・協調動作の原理、またそもそもそれらを適切に配置する原理はどのようなものか。この問いに答えるべく、粗視化モデルを用いた動力学計算により、タンパク分子（複合体）内部で構造変化を介して情報が伝わる様子（向きと強さ）を解析した (Düttmann *et al.*, *Biophys. J.* 2012; Flechsig, *PLOS ONE* 2014 ほか)。特に、サブユニットが周期的に配置した分子に注目した事例を紹介したい。

このような情報伝達・協調動作の理論を検証する上では、実験データから少数要素間の協同性を検出できる解析手法が求められる。開発した手法 (Shinkai & Togashi, *Europhys. Lett.* 2014 ほか) と、そこから派生した領域内共同研究についても、あわせて紹介する。

オルガネラ構築における少数性 *in vivo* および *in vitro* 系を用いたアプローチ

【A03-2 班】

今田勝巳¹、寺島浩行¹、南野徹²、内橋貴之³¹大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻²大阪大学大学院生命機能研究科³金沢大学理工研究域／バイオ AFM 研究センター]

細菌の運動器官であるべん毛は、細胞膜外へ伸びる繊維状のオルガネラである。べん毛は、基部体・フック・繊維の3つの部分から構成され、基部体中のロッド・フック・繊維は軸構造と呼ばれる。細胞内で合成された軸構造構成蛋白質は、べん毛基部にある輸送装置を通して構築中のべん毛先端へ輸送され重合する。べん毛は約30種の蛋白質で構成され、少数成分は数個だが多数成分では数万個の分子が含まれる。正常なべん毛中の各成分の構築順序と分子数は決まっているが、輸送すべき分子を多数の中から選択し、輸送順序と数を制御するしくみは、そのしくみの存在も含めてよくわかっていない。また、1個体あたりのべん毛本数は制御されており、多すぎても少なすぎても運動に支障を来す。べん毛の数の制御の中心は輸送シャペロンと呼ばれる蛋白質群で、細胞質でのべん毛蛋白質の凝集防止や輸送促進に加えて、べん毛構築状態と連動したべん毛蛋白質の発現制御といった多機能性を持つ。正常本数を保つには少数のフリーな輸送シャペロンを生成し、べん毛蛋白質の適切な発現制御を行う必要があるが、その詳細は不明である。

そこで、我々は蛋白質輸送の順番・数を制御するメカニズム、べん毛数を制御するメカニズムの解明に取り組んでいるが、べん毛形成は少数分子のふるまいがべん毛全体の構築や本数決定に大きく影響するため、分子数制御の困難な *in vivo* での分子生物学的手法には限界がある。そこで、我々は *in vivo* 実験に加えて、制御可能な *in vitro* 系の確立に取り組み、反転膜小胞を用いた輸送アッセイ系の構築に成功した。この系を用いた実験から輸送に必要なコンポーネントを同定し、プロトン駆動力だけでなく、ATP加水分解のみでも輸送を駆動できることを明らかにした。また、反転膜小胞を用いてロッド・フック蛋白質の輸送とロッド・フックの構築を試みたところ、小胞内での構築に成功した。そして、フックキャップ蛋白質 FlgD がフック蛋白質輸送を大きく促進すること、ロッド・フック蛋白質には構築順序にカップルした輸送順序があり、輸送装置が順序を決めていることを明らかにした。さらに、ロッド・フック型蛋白質から繊維型蛋白質への輸送基質特異性の切替えとフックの長さ制御が FliK 蛋白質の量で左右されることを示した。一方、*in vivo* および生化学的な実験から、輸送シャペロンが輸送基質との親和性をどのように制御し、少数のフリーな輸送シャペロンがどのように生成されるかということを中心に、新たな *in vitro* 実験系を用いることで明らかになったことを中心に、べん毛形成における輸送順序・輸送数・べん毛数制御のしくみについて紹介する。

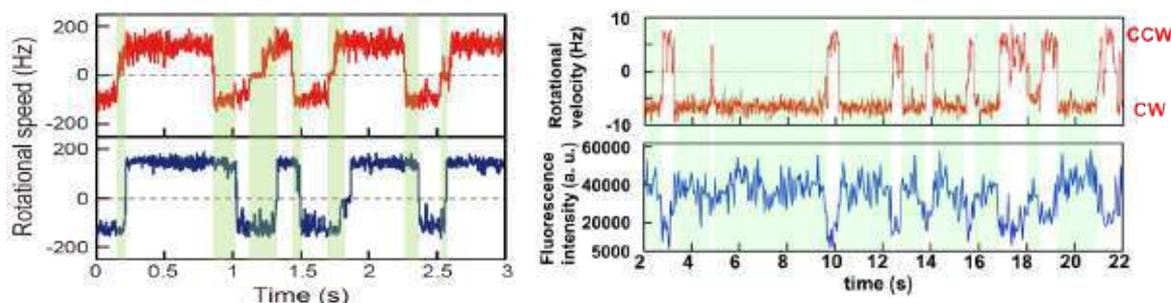
細胞内情報伝達の少数性生物学 —生命システムにおけるポアソン性の解析—

【A02-1 班】

石島 秋彦¹, 朽尾 豪人²

¹大阪大学大学院生命機能研究科, ²京都大学大学院理学研究科

細胞内における少数、もしくはあたかも少数のように振る舞う分子集団の挙動を明らかにするために、我々は細胞への外部刺激によるサブミリ秒での制御 (caged 化合物), 細胞表面受容体の構造変化の直接計測 (ダイヤモンドナノ粒子), 細胞内情報伝達機構の直接計測 (マルチモーターの同時計測, 蛍光イメージング) を用いた多角的な同時計測システムを構築し, 細胞外部からの誘因・忌避物質刺激に対する受容体応答の高ダイナミックレンジ検出機構及び細胞内情報伝達系を統合的に理解することを目的としました. 我々は, 同一細胞内での複数のモーターがある時間遅れを伴いながら高度に同調することを明らかにすることができました. このことは数万もの分子で構成されている受容体クラスターが高い協同性を示し, あたかも 1 分子の様に振る舞うことを示します. さらにこの高い協同性は誘因・忌避物質の変化がなくても起こり, 受容体クラスターは自発的に細胞内に情報を発信していることを強く示唆します. さらに CheY-GFP のべん毛モーターへの結合・解離とモーターの回転方向転換を同時に計測することにより, モーターへの情報伝達物質の結合・解離に伴う回転方向転換に高い協同性が存在することを明らかにしました. これらの結果が示すように細胞内情報伝達においては各所に高い協同性を示すことがわかりました.



大腸菌内の二つのモーターの回転の変化, 赤: 受容体に近いモーター, 青: 受容体から遠いモーター. 縦軸: +が反時計回り, -が時計回り. 二つのモーターの回転方向転換が同調しており, 受容体に近いモーターの方が, 約 0.1 秒先じているのがわかる

大腸菌テザードセルにおける回転方向転換 (赤) と回転中心の蛍光強度変化 (青). CW 中に蛍光強度が増加していることがわかる. つまり, CheY-P のモーター基体部に結合・解離により回転方向転換が起きている

主な発表論文

- Yuichi Inoue, Mitsunori Nagata, Hiroshi Matsutaka, Takeru Okada, Masaaki K. Sato, and Akihiko Ishijima, "Single Carbon Nanotube-Based Reversible Regulation of Biological Motor Activity", *ACS Nano*, 9:3677-3684, 2015
- Yuji Shimogonya, Yoichiro Sawano, Hiromichi Wakebe, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima & Takuji Ishikawa, "Torque-induced precession of bacterial flagella", *Scientific Reports*, 5:18488, 2015
- Takeshi Kimura, Naotaka Tsutsumi, Kyohei Arita, Mariko Ariyoshi, Hidenori Ohnishi, Naomi Kondo, Masahiro Shirakawa, Zenichiro Kato and Hidehito Tochio, "Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extracellular complexes", *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 70:1351-1356, 2014
- Hajime Fukuoka, Takashi Sagawa, Yuichi Inoue, Hiroto Takahashi, and Akihiko Ishijima, "Direct Imaging of Intracellular Signaling Components That Regulate Bacterial Chemotaxis.", *Science Signaling*, 319:ra32, 2014
- Hidehito Tochio, "Watching protein structure at work in living cells using NMR spectroscopy", *Current Opinion in Chemical Biology*, 16:609, 2012
- Shun Terasawa, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Takashi Sagawa, Hiroto Takahashi and Akihiko Ishijima, "Coordinated reversal of flagellar motors on a single Escherichia coli.", *Biophys. J.*, 100(9):2193-2200, 2011

分子プローブと光摂動ツールの開発および走化性応答の少数性生物学

【A01-2 班】

永井健治¹、金原数²、堀川一樹³¹阪大産研, ²東工大生命理工, ³徳島大医歯薬

我々は、細胞内の少数分子によって引き起こされる生理現象を可視化する機能プローブの開発並びに細胞内の分子数を制御するための光摂動ツールの開発を行い、少数性生物学の基盤技術として他班の研究に適用するとともに、少数の分子によって引き起こされる細胞性粘菌の走化性応答機構の解明を目指してきた。蛍光プローブとしては、青、緑、赤の高感度 Ca^{2+} センサー GECO シリーズ[1]や、細胞への光損傷が少ない超解像イメージングを可能にする光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor[2] (A01-1 藤田らとの共同)などを開発すると共に、高性能な FRET 型指示薬を迅速かつ簡便に開発できる手法を確立し、新規 cGMP 指示薬の開発に成功した[3]。さらに本手法を用いて、 Mg^{2+} センサー MARIO の開発にも成功し、2セットのゲノムDNAが正確に分配される過程で重要となる染色体凝集に Mg^{2+} の増加が関与することを突き止めた (A02-2 前島らとの共同)[4]。光摂動ツールについては、細胞内の任意の領域における特定のタンパク質を瞬時に不活性化することが可能な光増感蛍光タンパク質 SuperNova[5]や光照射によって細胞内の任意の部位における Ca^{2+} 濃度の操作を可能にする PACR[6]、光照射により cAMP 濃度を可逆的に調節可能なタンパク質モジュール[7]を開発した。また、細胞内情報伝達に関与するアミノ酸をケージド化し、光による濃度制御を可能にしたのみならず (A02-1 石島らとの共同)、細胞内イオン濃度の人為的調節を目的として、リガンド応答性イオンチャネルの開発にも成功した[8] (A01-1 野地らとの共同)。さらに、光操作をしながらのイメージングを可能にする化学発光プローブ Nano-lantern[9]およびその波長変異体[10] (A02 岡田らとの共同)などを開発してきた。これら様々な分子ツールを駆使して、指折り数え切れる数の cAMP 分子に対して細胞性粘菌が示す走化性応答のメカニズムにアプローチした。その結果、細胞性粘菌の自己組織的集合流形成を制御する二つの少数性として、GFP 融合分子の数を正確に計測できる技術により、10数個/ μm^2 という極めて低密度 (=少数) で機能する分子を同定[11]し、超高感度な赤色 cAMP 指示薬の開発により、数千細胞中ごく少数個の細胞が、自己組織的集合流形成において支配的な役割を担うことを見出した。

参考文献

- [1] Zhao Y, et al. **Science**, 333, 1888-1891, 2011
- [2] Tiwari DK, et al. **Nature Methods**, 12, 515-518, 2015
- [3] Ohta Y et al., Submitted
- [4] Maeshima K et al. in preparation
- [5] Takemoto K, et al. **Scientific Report**, 3, 2629, 2013
- [6] Fukuda N, et al. **ACS Chemical biology**, 9, 1197-1203, 2014
- [7] Ui M, et al. **Chemical Communications**, 48, 4737-4739, 2012
- [8] Muraoka T, et al., **Journal of American Chemical Society**, 136, 15584-15595, 2014.
- [9] Saito K, et al. **Nature Communications**, 3, 1262, 2012.
- [10] Takai A, et al. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 112, 4352-4356, 2015
- [11] Mukai A et al., Submitted

微小領域神経シナプス内シグナル伝達の光操作とイメージング

【2012,2014 A01 公募班】

村越秀治 生理学研究所、脳機能計測・支援センター

記憶形成の最小単位であると考えられているシナプスは極めて小さく、その体積は0.1-1fL程しかない。ある分子が細胞に100nMの濃度で発現しているとする、単一シナプスには5から50分子程度しか存在していないのである。このような微小領域では、各種分子数や活性レベル（生化学反応）のゆらぎが機能に大きく影響していると考えられるが、その実体や機能（シナプス可塑性）との関係は殆ど知られていない。

我々は、シナプス（微小領域）内での生化学反応システムの実体を明らかにするために、2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡¹を用いた分子活性化イメージングや光応答性シグナル分子の開発を行ってきた。我々は記憶のメモリー分子と考えられているCaMKIIとそのシグナル伝達経路に着目しており、これまでに、高精度でCaMKIIの活性化を捉えるためのFRETプローブ²や新規蛍光タンパク質（ShadowG）³の開発に成功した。また、シナプス内カルシウムとシグナル分子活性を同時に観察するためのプローブ（ShadowR）⁴の作製にも成功した。このように、微小領域内での少数分子の振る舞いを定量するための技術整備を進める一方で、局所光刺激によってシナプス内の生化学反応を操作するための光応答性分子の開発も進めてきた。これまでに、マイクロメートルの空間分解能と秒レベルの時間分解能をもつ、光応答性CaMKII阻害分子（paAIP2）⁵や光応答性CaMKII（paCaMKII）⁶の開発にも成功している。

我々は、上記プローブや顕微鏡技術を駆使することで以下のような結果を得てきた。

- 1) メモリー分子（長時間活性化）と考えられているCaMKIIが実はメモリー分子ではなかったこと。
- 2) Ca²⁺やCalmodulinによって活性化される数十種類の分子の内、CaMKIIを活性化させるだけでシナプス長期増強を惹起出来ること。
- 3) シナプス内での低分子量Gタンパク質Cdc42の活性化はinactivatorをシナプスから排除することで起こる可能性がある（通常はactivatorをリクルートすることで活性化すると考えられてきたが実は逆のようである）。

最終報告会では上記についてを最終報告として発表する。

参考文献

- [1] Murakoshi H. et al. *Springer-Verlag, Germany*. 185-197, 2015
- [2] Shibata A. et al. *PLoS ONE* 10, e0121109, 2015
- [3] Murakoshi H. et al. *Scientific Reports* 5, 15334, 2015
- [4] Nakahata Y. et al. in preparation.
- [5] Murakoshi H. et al. in revision.
- [6] Shibata A. et al. in preparation.

少数性生物学の新展開：分子個性から細胞個性へ

【A03-1 班】

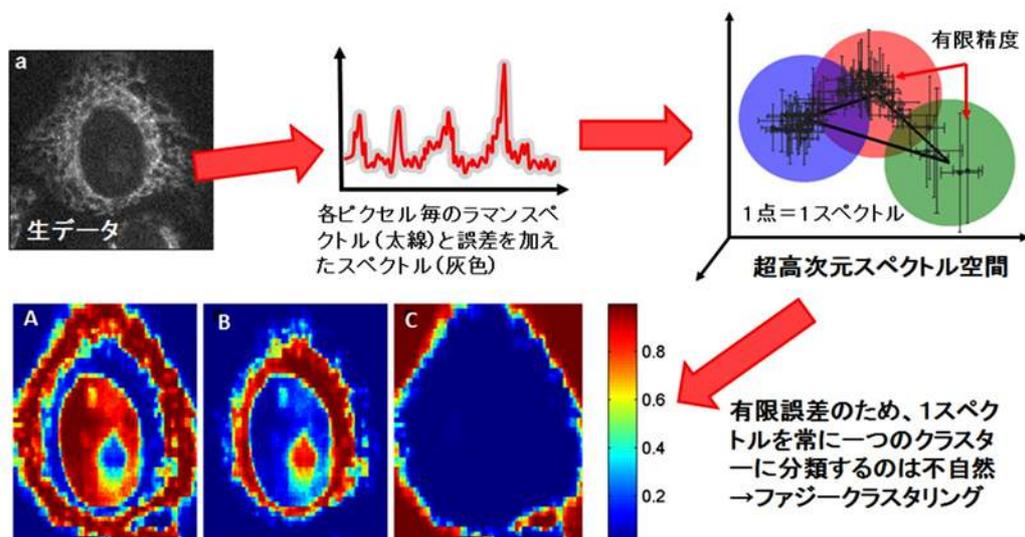
小松崎民樹

北海道大学電子科学研究所

1 分子計測技術、イメージング技術などの進展により、細胞などの複雑な分子環境におけるデータが膨大に蓄積されてきた。例えば、Sunney Xie らは酵素反応を一分子レベルで観察し、ある理論モデルを前提として、分子の形に依存して速度定数が異なり得る分子個性 (Dynamic disorder) の概念を提唱し (English ら *Nature Chem. Bio.* 2006)、世界中の多くの研究者が追随した。しかしながら、その 6 年後、我々、ベルギー、オランダのチームにより、統計科学的な反証が行われ、彼らの帰結は「物理モデルとしては蓋然性が高いものの」解析上のアーティファクトであることが明らかにされた (Terentyeva ら *ACS Nano* 2012)。すなわち、「分子情報を担ったデータから如何に背後の分子情報を正しく抽出するか」は喫緊の研究課題であり、情報科学、データ科学だけでなく、計測原理を踏まえつつ分子の目線の「分子データ科学」を確立することが極めて重要である。我々は、『物理モデルとしての蓋然性が高い＝観ている複雑な現象を正しく解釈している』保証はまったくないことを理解する必要がある。

一方、近年、パーシスタ細胞のように細胞集団のなかには遺伝子上の違いではなく、表現型 (例: 蛋白質の発現量) の違いによって獲得された機能をもつ細胞が存在することが明らかとなった (Balaban ら *Science* 2004、若本ら *Science* 2013)。また、非破壊・非侵襲に1細胞レベルで分析を可能とする 1 細胞ラマン分光法 (Palonpon ら *Nature Protoc* 2013) によって、細胞分裂や細胞死におけるラマンスペクトルも計測されるようになった。しかしながら、「如何に膨大なスペクトルデータから表現型の違う個性的な細胞を抽出し得るか、そこから (薬物耐性、癌化などの) 細胞機能を判別し得るか」という問いに応える分子データ科学は未開拓である。

従来、スペクトルの分類は主成分解析などで極少数の自由度に射影し、その低次元空間でクラスター解析を行う。しかしながら、ここでは重要な次元を見落としている可能性が高い。本講演では Kantorovich 測度と呼ばれる分布関数間の距離を導入し、ラマンスペクトルの全情報を反映した (スペクトル間の) 距離空間でのクラスタリングを行い、類似したラマンスペクトル群を同定し、細胞内の化学的環境が類似した領域を抽出する方法論の開発の現状と細胞個性学への展望を述べる。



インフルエンザウイルス粒子の取り込みと感染を制御する シグナル伝達ネットワーク

【2014 A01 公募班】

大場雄介¹、藤岡容一朗¹、田端和仁²、西出真也¹、南保明日香¹、野地博行²

¹北海道大学大学院医学研究科細胞生理学分野

²東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻

インフルエンザウイルスは、鳥類や哺乳動物など多種多様な生物種に感染し、高い伝染性と厳しい呼吸器症状から毎年数千人の死亡を来す。しかし、現在承認されている防御戦略（ワクチンやノイラミニダーゼ阻害薬等）の効果は限定的である。なぜなら、RNA に遺伝情報がコードされるインフルエンザウイルスは、頻繁な変異による抗原ドリフトや組換えを経て、治療に抵抗性を獲得するからである。したがって、複製の前段階、すなわちウイルス粒子の取り込み過程の分子メカニズムを解明することが重要である。インフルエンザウイルス粒子はエンドサイトーシスにより宿主細胞に取り込まれることが明らかになっているが、インフルエンザウイルスが宿主エンドサイトーシス経路をどのように利用するかの詳細は、いまだ多くの点が謎であった。

我々は、2分子蛍光相補性（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）の技術を用いて、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) がエンドソームにおいて活性化型の Ras と結合することを報告した (Tsutsumi *et al.*, *Cell. Signal.* 2009)。また、Ras-PI3K シグナルがクラスリン非依存性エンドサイトーシス (clathrin-independent endocytosis, CIE) を制御し、結果としてインフルエンザウイルス粒子の宿主細胞への取り込みに関与することを明らかにした (Fujioka *et al.*, *PLoS ONE* 2011)。さらに我々は、細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇がインフルエンザウイルス感染時における Ras の活性化を制御することを、FRET バイオセンサー Cameleon を用いたイメージングにより見出した。 Ca^{2+} は Ras-PI3K シグナルを介した CIE の制御のみならず、RhoA、ROCK、PIP5K および PLC からなるシグナルネットワークを介してクラスリン依存性エンドサイトーシスも制御することで、インフルエンザウイルス粒子取り込みに中心的な役割を担う (Fujioka *et al.*, *Nat. Commun.* 2013)。実際、 Ca^{2+} の抑制は強いインフルエンザ感染抑制効果を示した。我々は現在、蛍光バイオイメージング技術を利用し、インフルエンザウイルスと宿主細胞のインタフェースの分子機構解明に取り組んでいる。その結果、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) タンパク質に直接結合し、細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入の制御に関与する分子を同定した。この因子の阻害薬処理やノックダウンは細胞内 Ca^{2+} キレートと同程度の感染抑制効果を示した。またこれら分子生物学的な解析に加え、マイクロチャンバーテクノロジーを用いた厳密なウイルス粒子数測定技術により、感染するウイルス粒子数に応じた宿主細胞の応答性の詳細が明らかになってきた。当日はこれら最新の知見を紹介するとともに、ウイルス感染における少数性問題について議論したい。

少数のゲノム DNA が細胞の中に収納される仕組み

【A02-2 班】

前島 一博

国立遺伝学研究所

私たちの細胞は、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DNAは2セットあるため、同じ遺伝子が基本的に「2個」存在する。核の微小空間において、2セットのゲノムDNAはどのように収納されるのか？さらには、少数の遺伝子がどのように検索され、どのように読み出されるのだろうか？このような問題は、「少数性の生物学」の最も基本的な事例だと思われる。

教科書などでは、まずDNAはヒストンに巻かれ、ヌクレオソームと呼ばれる構造体になり、さらに折り畳まれて直径約30nmのクロマチン線維になるとされてきた。しかしながら、私たちのクライオ電子顕微鏡やX線構造解析を用いた研究によって、ヒトの間期核・分裂期染色体内には30nm線維を含めて階層構造が存在せず、直径11nmのヌクレオソームの線維が不規則に折り畳まれているという、従来のモデルをくつがえす知見が得られた (EMBO J. 2012; Chromosoma 2014; Curr Opin Genet Dev. 2016)。

このようなクロマチンの性質はゲノム情報検索において極めて有利である。例えば、転写因子がある遺伝子にターゲットする際、階層状に規則的に折り畳まれていると、多くの領域が隠されてしまう。しかしながら、不規則に折り畳まれ、クロマチンがダイナミックに動くと、ターゲット配列の露出頻度も増え、スムーズにターゲットされると考えられる。実際、1分子ヌクレオソームイメージングによって、私たちはこのようなクロマチンのダイナミックな「ゆらぎ」を観察した (Cell Reports 2012; Nucleus 2013)。さらに、「ゆらぎ」があることで、タンパク質がクロマチン内部をより自由に動くことができ、DNAにアクセスしやすくなることも示唆された (Cell Reports 2012; Nucleus 2013)。

また、細胞は分裂する際、複製されたゲノムDNAを娘細胞に正確に分離・分配する。この過程の失敗は、ガンなど様々な疾病を引き起こすため、細胞はコピーした2セットのゲノムDNAを姉妹染色体として凝縮させ、厳密に分配する。本領域の終盤、阪大・永井グループが新規に開発したMg²⁺センサーを用いることによって、私たちは染色体の凝縮過程に細胞内のMg²⁺の増加が関与することを見出した。

少数性生物学の成果報告として、少数(2セット)のゲノムDNAが細胞内にどのように収納され、どのように分離するのか？その仕組みを紹介する。

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

【2014 A01 公募班】

城口克之

理化学研究所 統合生命医科学研究センター

少数の細胞が生体に大きく影響するシステムがある。例えば、免疫システムにおいては、免疫反応の中核を担う細胞のうち、全体の数万分の一にも満たない少数の細胞が活性化し、外界からの混入物から生体を守っている。生体システムをより深く理解するためには、このような Minority を検出することが重要である。一方で、Minority 研究と関連するものとして、母集団となる細胞分布を捉えることも重要である。例えば、近年研究が進んでいる腸内細菌叢では、多種の Minority と同時に、Majority も含めた細胞各種の数のバランスが大事だと考えられている。このバランスが崩れると、宿主に悪い影響を与えることが知られている。このような背景のもと、本研究では、細胞種を特徴付けるゲノム配列に注目し、Minority 各種の検出と同時に、Majority も含めた細胞分布を計測できる方法の開発を行った。

細胞分布を捉えるためには、単一細胞の分解能を維持しながらも、たくさんの細胞を同時に扱えるハイスループット計測が必要である。これを実現するため、以下のようなアプローチを行った。(i)まず一細胞毎にドロプレットに封じ込めてゲノム上のターゲット配列(細胞種を見分ける配列)を増幅した。(ii)増幅産物に、各ドロプレット(つまり細胞)毎に異なるバーコード(ユニークな DNA 配列)を結合させた。通常、手作業で行うバーコーディングをここでは自動化することで、ハイスループット計測を実現した。(iii)各ドロプレット内で増幅した産物をすべて混合させ、次世代シーケンサでバーコードとターゲット配列を解析した。(iv)ターゲット配列により細胞種を同定し、バーコードの種類の数により、細胞数を計数した。数種類の菌を既知の濃度で混合したものをサンプルとして用いたところ、シーケンシングによる測定の結果が、最初の菌の混合比と強い相関を示した。

これらにより、Minority 細胞を同定すると同時に、細胞集団の分布を得られる計測系の基礎を構築することができた。

真核生物核内染色体動態と減数分裂時対合形成の動力学モデル

【2012 A03 公募班】

栗津暁紀^{1,2}, 高宮一徳¹, 山本佳典¹, 勇修平¹, 西森拓^{1,2}

¹広島大学理学研究科, ²広島大学核内クロマチンライブダイナミクス数理研究拠点

生命の最小単位である細胞の活動は、内在する多様な生体高分子による化学反応の結果として実現する様々な機能によって支えられている。そのような細胞内での化学反応では、巨視的な（例えば試験管内での反応のような）反応溶液系とは異なり、高分子が微小空間に閉じ込められている事から生じる「混み合い」、及び分子の種数と比較して各高分子の数が十分に多くないという「分子の少数性」が顔を出す。そしてこれらの性質は、化学反応の際に、各分子や環境の「形状・物性」といった「力学的な個性」を表面化させ、その分子間相互作用に寄与する。

本研究ではそのような例の一つとして、真核生物の核内染色体間の相互作用と動態に着目する。特に真核細胞の減数分裂前期に起こる「相同組み替え」に対し、染色体や核の「力学的個性」が如何なる影響を及ぼしうるのか、理想的な高分子モデルを用いた考察を進める[1]。

真核生物は、減数分裂時に相同染色体間の塩基配列を交換する「相同組換え」により、同一種内における遺伝的多様性を実現している。相同組換えを実現するには、相同染色体が互いに平行に並び「対合」を形成する必要がある。しかし、例えばヒトであれば、2本で一对の相同染色体対が22種類存在するが、そのような多種多様なものが混在した中でどのように各染色体が相同な染色体を認識し、対合を形成するのかは、自明ではない。

近年様々な生物種において、減数分裂前期に核及び染色体のダイナミックな運動が観察されており、この運動が対合形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。そこで本研究では、減数分裂前期における染色体動態を考察するため、3種類の染色体のみを持つ分裂酵母に着目し、その減数分裂期染色体の粗視化モデルを構築と分子動力学シミュレーションを行った。そして相同染色体間の「形状の相同性」、核内における染色体の「混み合い」、及び「核の動的な形状変動」が、対合形成に重要な役割を果たす可能性を見出した。

また、核の動的な形状変化と染色体の局所的な物性の不均一性が、間期における核内染色体構造形成にも強い影響を及ぼす可能性も見出した[2]。時間があればこちらも紹介したい。

[1] Takamiya, K., et al., Excluded volume effect enhances the homology pairing of model chromosomes. NOLTA (2016) in press

[2] Awazu, A., Nuclear dynamical deformation-induced hetero- and euchromatin positioning Phys. Rev. E 92, 032709 (2015)

生体リズム制御の少数性生物学 —ターンオーバー制御を超えて—

【A02-3 班】

大出晃士 鵜飼英樹 上田泰己

東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 システムズ薬理学教室
理化学研究所 生命システム研究センター 合成生物学研究グループ

生命における計時機構である概日時計は、生命活動に約1日周期の変動を生み出すことにより、地球の自転に伴う約1日周期の外部環境の変動に生命を積極的に適応させている。CRY や PER タンパク質に代表される概日時計タンパク質の発現量が一日周期で変動することで生み出される、概日リズムの周期は正確であり、その誤差は、1%程度(10分程度)である。その周期長の制御には、概日時計構成タンパク質の半減期(ターンオーバー制御)が重要であることが示されてきた。マクロな挙動の正確性の一方で、幾つかの報告は、これまでの一般的な認識よりも時計タンパク質の細胞内分子数が極端に少ないことを示唆しており、哺乳類概日時計においても少数性に起因する不安定性の影響が無視できないことが示唆されてきた。

少数分子の活性変動が、個体全体の行動リズムをいかにして安定に担保しているのだろうか。我々はこの問題に対して、まず、超高感度質量分析によって細胞内の概日時計タンパク質コピー数を絶対定量することで、概日時計における分子少数性を実際に測定することを行った。多種類のペプチドに対する絶対定量を効率的に行う新規手法を開発し、概日時計振動子を構成する主要なタンパク質発現量をほぼ全て絶対定量することに成功した。その結果、主要概日時計タンパク質は1細胞あたり 1,000~20,000 分子の低コピー数領域で変動することが明らかとなった。

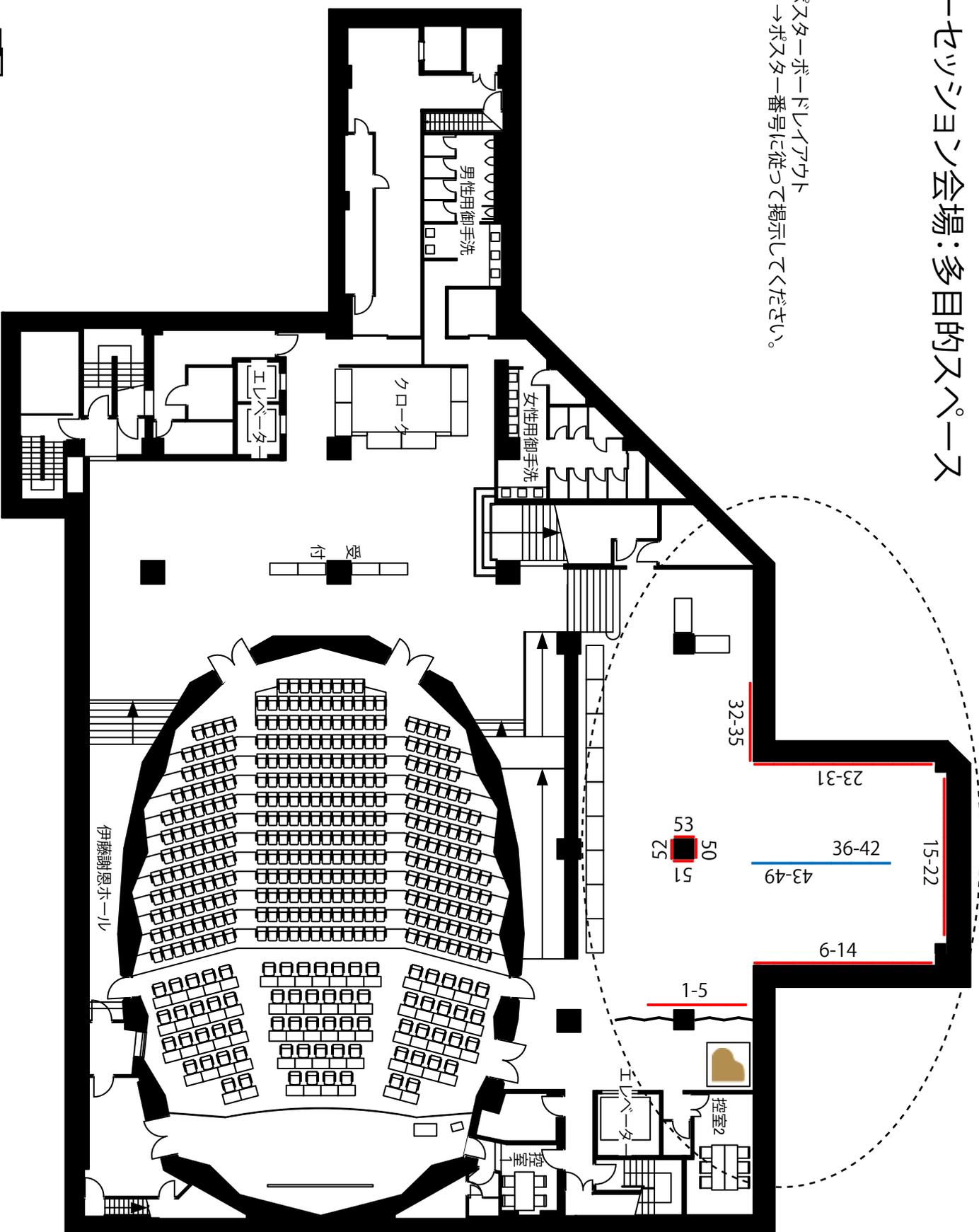
頑強な周期長制御を可能にする概日時計タンパク質固有の性質を知るために、さらにCRY タンパク質の網羅的な変異体作成と、細胞およびマウス個体における概日周期長測定を行った。その結果、周期長変化をもたらす分子領域を特定し、CRY 構造情報を元に周期長を大幅に変化させる変異体を予測し、作製することが可能となるに至った。興味深いことに、周期長変化をもたらす変異は、必ずしもCRY1 タンパク質のターンオーバー制御に影響を与えない。これらの結果を元に、分子数(量)が少数個で変動する一見すると不安定な概日時計制御に於いて、タンパク質の修飾・構造変化(質)が安定した発振周期長をもたらす機構を議論する。

7. ポスター発表 演題リスト

区分	ポスター番号	発表者	タイトル	班名
A01-1班	1	渡邊 朋信	単細胞セントロミクス技術の確立	A01-1班 野地博行
	2	岡本 和子	細胞の塊が、集団として少数自由度を保つ仕組み	A01-1班 野地博行 渡邊 希同
	3	田村 亜生	少数分子ナノ動態の光学計測法の開発	A01-1班 野地博行
	4	藤田 亮昌	可視光による2光子励起を用いた蛍光顕微鏡の開発と多色・高解像度イメージング	A01-1班 野地博行
A01-2班	5	高内 大貴	A spontaneously switchable fluorescent protein for super-resolution imaging	A01-2班 永井健治 永井希同
	6	金原 数	High-speed single molecule detection	A01-2班 永井健治
	7	堀川 一樹	Minority control of synchrotron dynamics in the population of biological oscillators	A01-2班 永井健治
	8	和沢 義一	光スピンツングタツバクをKohlihoorとSpeed-EMAN法を用いた生体適合性の高い超解像蛍光イメージング	技術開発支援班
	9	福岡 創	大腸菌進化性システムに内在する少数分子によるシステム制御	A02-1班 石島秋彦
	10	初尾 豪人	Development of Fluorescent Nanodiamond Probes for Studying Protein Function and Structure	A02-1班 石島秋彦
技術開発支援班	11	野崎 博	Visualization of chromatin structure and dynamics with single nucleosome imaging	A02-2班 前島一博
	12	谷口 雄一	遺伝子発現の少数性生物学	A02-2班 前島一博
A02-3班	13	大出 晃士	少数分子を介した分子協同性と生命リズム制御	A02-3班 上田泰己
	14	嶋銅 英樹	Development of High-throughput Production System of Genetically Engineered Mice	A02-3班 上田泰己
	15	富樫 祐一	少数分子反応系の理論〜化学・力学複合ネットワークの理論〜	A03-1班 富樫祐一
A03-1班	16	李 振風	The Key and Unlock Mechanisms in F1-ATPase Unveiled by Single Molecule Time Series Analysis	A03-1班 富樫祐一
	17	新海 創也	“少数性生物学的”細胞内拡散現象の理論〜アグネーテ拡散とスクリュー拡散を例に〜	A03-1班 富樫祐一
	18	Fleischig Holger	Evolutionary optimization of simple polymer networks: Models of synthetic allosteric proteins	A03-1班 富樫祐一
	19	中川 正基	少数性問題のための触媒反応ネットワークの解析的枠組みとその応用	A03-1班 富樫祐一
A03-2班	20	柴田 幹大	高濃度期による生きた細胞のナノスケールでの形態観察	A03-2班 今田勝巳
	21	杉山 翔吾	Dynamic interaction between Kai proteins dependent on phosphorylation states of KaiC revealed by HS-AFM	A03-2班 今田勝巳 内橋代理
2012_A01公募班	22	山下 高廣	非揮発子ゲルを用いた細胞内情報伝達系の光による制御	2012_A01公募班
	23	水上 達	Development of Photochemical Tools to Regulate Biomolecular Functions	2012_A01公募班
2012_A02公募班	24	上香増 喬	Stochastic expression and rapid assembly of the TSSSI is a critical step for regulating cytotoxicity of Vibrio parahaemolyticus	2012_A02公募班 高橋代理
	25	坂池 知子	極小体積電子マイクロチャネルでの微小管ダイナミクス観察とリソ酸抽出	2012_A01公募班
	26	矢島 潤一郎	微小管依存性モータータンパク質のランダム運動を方向性運動に変換する分子機構	2012_A02公募班
	27	丹末 繁行	少数のシグナス分子の微細配置による中核シグナス可塑性の制御機構	2012_A02公募班
	28	丹羽 達也	発現量の少ないタンパク質のフォールディングにおけるシヤペロン依存性の解析	2012_A02公募班
2012_A03公募班	29	小嶋 勝	微小空間の動的環状制御システムの開発	2012_A02公募班
	30	笠井 倫志	Temporal Dimer Formations of Various G-Protein Coupled Receptors	2012_A02公募班
	31	桑田 昌宏	核膜孔複合体の機能に見られる少数性の追突	2012_A02公募班
	32	曾和 義幸	生物回転ナノマシン構成素子の協同的相互作用	2012_A02公募班
2012_A01公募班	33	川岸 敬明	大腸菌異物排出トランスポーター-AcrBの基質依存的分イオンシグナス	2012_A02公募班
	34	石原 秀至	分子のハラキによる情報伝達の強化	2012_A03公募班
	35	濱田 昶	Molecular behavior of DNA in a cell-sized compartment coated by lipids	2012_A03公募班
2014_A01公募班	36	茅 元司	ミソソル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	2014_A01公募班
	37	井上 圭一	細菌の走性における動的多様性の解明	2014_A01公募班
	38	藤原 敬宏	少数分子複合体動的ユニット機構による細胞膜機能制御	2014_A01公募班
	39	原田 慶恵	Character Projection方式電子線描画によるナノ開口基構大規模製法の開発	2014_A01公募班
2014_A02公募班	40	高森 茂雄	GBAAI胞のフォトリポシ動態からみるGBAAI輸送機構	2014_A01公募班
	41	藤岡 啓一朗	カルシウムシグナルを介したインフルエンザウイルス宿主細胞侵入機構の解明	2014_A02公募班 大場希同
	42	小嶋 誠司	細菌中心毛本数を厳密に制御する分子機構	2014_A02公募班
	43	竹内 裕子	少数分子による興奮情報伝達シグナル抑制とその機構	2014_A02公募班
	44	堀江 恭二	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	2014_A02公募班
	45	宮崎 牧人	構成論的アプローチによる収縮環の形成・収縮機構の解明	2014_A02公募班
	46	森本 雄祐	走化性シグナル伝達に伴う自発的膜位変化	2014_A02公募班
2014_A03公募班	47	岡田 美志	細胞内物質輸送制御における協同性と少数性	2014_A02公募班
	48	林 久美子	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	2014_A03公募班 林希同
	49	長谷川 博	少数のタンパク質モーターによるセグメンテッドシグナル伝達の協同的メカニズムの解明	2014_A03公募班
	50	斉藤 聡	化学反応系および分子モーター多体系における少数性効果の理論的研究	2014_A03公募班
	51	市川 正敏	微小液滴空間に閉じ込められたアグネーテシグナルで見せるアグネーテな変形とゆらぎ	2014_A03公募班
52	鈴木 宏明	Partitioning of genome-size DNA in the dividing model cell membrane	2014_A03公募班	
53	柴田 達夫	Fluctuations and responses in chemotaxis signaling systems	2014_A03公募班	

ポスターセッション会場：多目的スペース

ポスターボードレイアウト
→ポスター番号に従って掲示してください。



B2F フロア図

東京大学伊藤国際学術研究センター

8. ポスター発表要旨

単細胞セクレトミクス技術の確立

【A01-1 野地班】

藤田英明², 升島努¹, 金秀炫⁴, 野地博行^{3,4}, 渡邊朋信¹

¹理研・QBiC, ²阪大・免疫フロンティア, ³阪大院・生命機能, ⁴東大院・工学

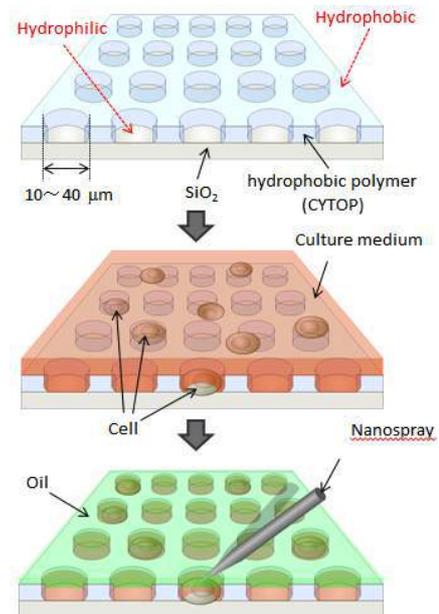
本研究期間で、「分子の少数性と細胞の少数性とのアナロジー」の議論から新しいオミックス技術が発明された。本会では、この技術について発表したい。

細胞集団において、時に、稀なひとつの細胞が、細胞集団の挙動を大きく変える。例えば、がんの転移メカニズムを説明する「種と土壌 (Seed and Soil)」仮説によれば、原発巣組織内にあった腫瘍細胞 (Seed) が、血中を通り、他の組織 (Soil) に転移し、そこで増殖し新たな腫瘍を形成する。この Seed は、血中循環腫瘍細胞または末梢血循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) と呼ばれ、その血液中での存在確立は、100 万個に 1 個程度と言われている。他の例では、体細胞が人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) にリプログラミングされる際にも、増殖能が低い iPS 細胞が低確率で出現した後に、その周囲に増殖能が高い iPS 細胞が出現しコロニーを形成することが知られている。細胞集団における「マイノリティが出現するメカニズム」「マイノリティからマジョリティが生まれるメカニズム」が、本領域で行われてきた分子の少数性とアナロジーを成している。

我々は、分泌液に着目した。細胞分泌液は、長距離間での細胞間情報伝達に必須であり、少数細胞が、多数の細胞に影響を与えるための重要な要素である。しかし、分泌液は、分泌後すみやかに溶液中に拡散してしまうため、その高感度計測は用意ではない。我々は、その問題点を解決し、ひとつの細胞が放出する小分子を網羅的に分析する新しいオミックス技術、単細胞セクレトミクス技術を確立した。

野地グループが開発したマイクロドロップレットデバイス (直径 10~40 μ m) に単細胞を閉じ込める。銀コートされた極細キャピラリーにより、細胞を生かしたまま、単細胞が放出した分泌物質を抽出する。抽出された細胞外液は、キャピラリー先端で直接イオン化され、質量分析器により解析される。上記により、僅か数十~数百フェムトリットルの細胞外液の質量分析が可能となった。

本技術をもちいて、完全な多能性を示す iPS 細胞が、不完全な iPS 細胞では放出していない小分子 Pentadecane を放出していることを発見した。本技術は、キャピラリーによるサンプル抽出過程が人の手によるため、スループットは高くないが、少数しか収集できない細胞でも分泌液分析が可能であり、十分に細胞の少数性に適応できる。現在は、スループット向上を目指し、マイクロウェルデバイスの改良やサンプル抽出の自動化、および、光を用いた分泌液分析法の開発を進めている。



単細胞分泌液質量分析法の概略図!
Fujita H, et al., *RSC Adv.*, 5, 16968 (2015)!

細胞の塊が、集団として少数自由度を保つ仕組み

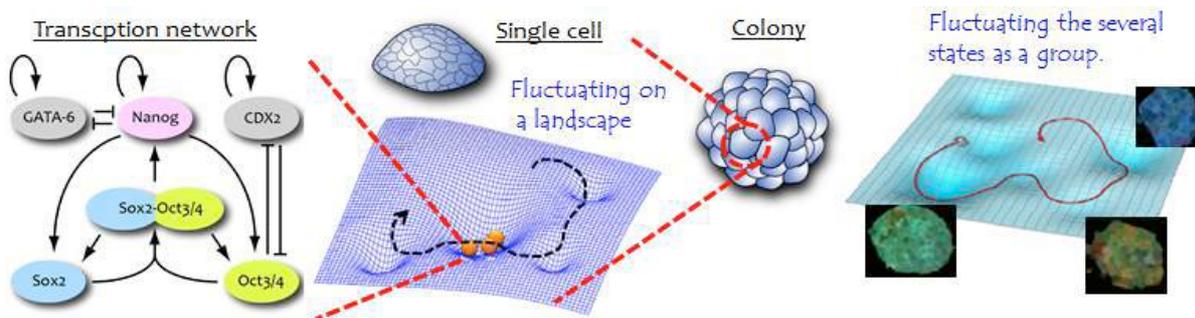
【A01-1 野地班】

岡本和子¹, 古澤力¹, 藤田英明², 渡邊朋信¹

¹理研・QBiC, ²阪大・免疫フロンティア

研究班内での議論が、他分野へと飛び火し、展開された例をここで示したい。生命現象においては、多種多様な素子が互いに複雑に相互作用して集団として機能している場合が多々見受けられる。我々は本領域での議論を通して、「少数性」の言葉には、「多種多様の中に重要な少数が存在すること」と「多種多様な素子から少数の機能が形成されていること」と言う両方の意味が含まれていると考えた。

二状態間を揺らぐ素子から構成される集合体を考えてみる。素子が独立的かつ確率的に揺らぐのであれば、その集合体の状態は、素子のゆらぎの平均となり、安定状態を持たない。しかし、実際の生命現象では、集合体もまた、少数個の安定状態を持ち、その間を揺らいでいる。これは、胚性幹細胞（ES 細胞）の初期分化過程において、良く見られる現象である。我々は、ここに「多数の素子から少数性が生まれる仕組み」が隠されていると考え、その仕組みの解明を目指した。



ES 細胞は、未分化状態維持に必須である転写因子 Nanog、Oct4 の発現に不均一性が観察されており、その発現量から主となる二状態が定義される。我々は、ES 細胞塊を、未分化状態から初期分化 8 日目まで、9 培養条件において 100 細胞塊ずつ(計約 27,000 細胞)の顕微鏡像を取得し、各細胞における細胞の位置、Nanog/Oct4 の発現量、および、他細胞との接触の情報を収集した。様々な解析を行った結果として、以下が示唆された。①細胞は二状態間を自発的にゆらぎ、そのゆらぎは細胞間コミュニケーションにより緩く抑制される。②細胞間コミュニケーションの強弱が細胞塊の多様性の弱強となり、細胞塊は二つの安定した状態を示す。③細胞の分化遷移は、細胞間コミュニケーションによる引き込み現象の結果として起こる。

さらに我々は、上記のルールを考慮した数理モデルの構築を行い、実験データが再現できることを確認した。数理モデルによると、ES 細胞は、未分化状態では隣接する細胞の発現ゆらぎを小さくする相互作用を行っており、分化が始まるとその相互作用は消滅し、新たな相互作用が生まれている事が予想される。この数理モデルは、細胞接着を阻害した時の表現型や、細胞密度による影響も再現できる。

少数分子ナノ動態の光学計測法の開発

【野地班】

市村垂生, 垣塚太志, 金城純一, 渡邊朋信
理化学研究所生命システム研究センター

生命システムは様々な分子機械モジュールにより構成され、それら分子機械は有限種類・有限個数のタンパク質で構成され、タンパク質分子間の相互作用や協同性に基づいて動作・機能している。個々のタンパク質の動作原理解明の研究は、一分子計測法によってこの20年の間に飛躍的に進捗したが、それらの相互作用・協同性の研究を進めるためには、計測法の整備が必要となっている。このような生命システム研究の課題の解決を目的として、我々は応用物理と生物物理の研究者で共同体制を組み、目的に特化した光学計測法の開発に取り組んできた。本発表では、その中でも以下の2つの研究成果について紹介する。

(1) モータータンパク質の複数同時追跡のための分光ナノメトリ

ナノ空間中の複数分子の動態を同時に追跡するために、従来の一分子計測顕微鏡（全反射照明蛍光顕微鏡）にイメージング分光器を導入した。分子を異なる色の蛍光プローブで標識し、蛍光輝点を分光器によって空間的に分離して検出した。これにより、通常の蛍光顕微鏡では分離できない距離で近接する個々の分子の動態を、同時に計測できるようになった。4つ以上の分子の動きを、30msの時間分解能で3nmの空間精度で計測できることを示した[1]。並進モータータンパクの代表としてミオシンVおよびVIを用いた計測例を紹介し、他のモータータンパク質やモータータンパク以外への応用の可能性についても議論する。

(2) タンパク質フィラメントの構造遷移を計測する非線形散乱イメージング

細胞内では、少数分子からの作用によってタンパク質集合体の構造・機能が変化する現象が多数知られていて、細胞システムの機能に貢献している。また、集合体の変化も、集合体内の少数のタンパク質によって支配されている。このような現象の理解を進めるために、我々は、二次の非線形散乱（第二次高調波）を用いたタンパク質構造の光学計測法を開発し、解析法を含めた計測技術体系の構築に取り組んだ[2]。とくに、タンパク質フィラメントである微小管の計測に重点的に取り組み、単一フィラメント内のタンパク質構造の遷移を計測しうることを実験的に示した。少数分子とフィラメントの相互作用およびフィラメント内のタンパク質間の協同性について議論し、本手法の今後の可能性について展望する。

[1] T. Kakizuka, et al., submitted.

[2] J. Kaneshiro, T. M. Watanabe, H. Fujita, and T. Ichimura, *Appl. Opt.* in press.

可視光による2光子励起を用いた蛍光顕微鏡の開発と 多色・高解像度イメージング

【A01-1 班】

山中真仁¹、上垣久美子¹、齊藤健太²、スミス ニコラス³、新井由之²、米丸泰央¹、
望月健太郎¹、河田聡¹、永井健治²、藤田克昌¹

¹大阪大学 大学院工学研究科 応用物理学専攻

²大阪大学 産業科学研究所

³大阪大学 免疫学フロンティア研究センター

蛍光性タンパク質は、細胞内の特定の部位やタンパク質を生きたまま染色できるため、細胞の活動の蛍光顕微鏡観察に頻繁に利用されている。蛍光タンパク質の発光波長は紫から近赤外付近から選択できるため、異なる波長で発光するタンパク質で多重に試料を染色すれば、観察する生体活動に関わる複数のタンパク質の空間分布や時間変化を同時に画像計測できる。しかしながら、異なる発光波長をもつ蛍光タンパク質を光励起するには波長の異なる励起光が用いられることが多く、複数の蛍光タンパク質を”同時”に観察することは困難な場合がある。

本研究では、525-560nm 付近の可視光の2光子吸収を用いれば、多くの発光波長の異なる蛍光タンパク質を励起できることを見出した[1]。多くのタンパク質は深紫外光を吸収しても可視光の発光を生じるため、深紫外励起と同じ程度のエネルギーを可視光の2光子吸収を用いれば、複数の種類の蛍光タンパク質を同時に励起できる。実際に Sirius, EGFP, mTFP1, mseCFP を導入した HeLa 細胞を観察し、紫から緑色までの蛍光タンパク質を同時観察することに成功した。さらに、GFP、TFP、CFP 等のいくつかのタンパク質については、非常に高効率に2光子励起が行え、また蛍光タンパク質からの蛍光は自家蛍光に比べて数十～数百倍高く、非常に高いコントラストで蛍光観察が行えることも実験的に示した。

開発した可視2光子励起顕微鏡は、比較的短い可視光線による非線形光学効果を用いるため、光の波動性による限界を超えた空間分解能を理論的にもたらす。そこで、理論的、実験的に開発した空間分解能を評価し、波長 500nm の光を用いながらも、面内方向に約 120nm、光軸方向に約 290nm の空間分解能が得られることを確かめた。この結果は、超解像顕微鏡のひとつとして知られる構造化照明顕微鏡と同程度の空間分解能を、可視2光子励起顕微鏡を用いて得られることを示している。

Reference

1. M. Yamanaka, K. Saito, N. I. Smith, Y. Arai, K. Uegaki, Y. Yonemaru, K. Mochizuki, S. Kawata, T. Nagai, K. Fujita, "Visible-wavelength two-photon excitation microscopy for fluorescent protein imaging," J. Biomed. Opt., 20 (10), 101202 (2015).

A spontaneously switchable fluorescent protein for super-resolution imaging by high-speed single molecule detection

Hiroki Takauchi¹, Yoshiyuki Arai^{1,2}, Masahiro Nakano^{1,2}
and Takeharu Nagai^{1,2}

【A01-2 班】

¹Department of Biomolecular Science and Engineering, Osaka University

²The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

Super-resolution microscopy has been enabled us to overcome diffraction barrier and observe nanometer-scale biological events in living cells. A photoswitchable fluorescent proteins (RSFPs), which can be switched between fluorescent and non-fluorescent states by light play an important role for super-resolution imaging. Among them, Dreiklang is the first RSFP whose fluorescence excitation spectrum is independent from those for switching on and off [1], enabling us compatible use with many super-resolution methods such as RESOLFT (Reversible Saturable Optical Fluorescence Transitions), PALM (PhotoActivatable Localization Microscopy), and SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging). However, the switching speed of Dreiklang is too slow to perform high-speed super-resolution imaging. Herein, we have developed a novel switchable fluorescent protein, SSFP (Spontaneously-Switchable Fluorescent Protein) that can spontaneously switch on from the dark state at millisecond order kinetics. SSFP allows single molecule localization-based super-resolution imaging within 1 s (Figure) at fast acquisition rate (1 ms exposure time). Thus, SSFP is promising for investigating and intricate nanometer-scale biological phenomena in cells.

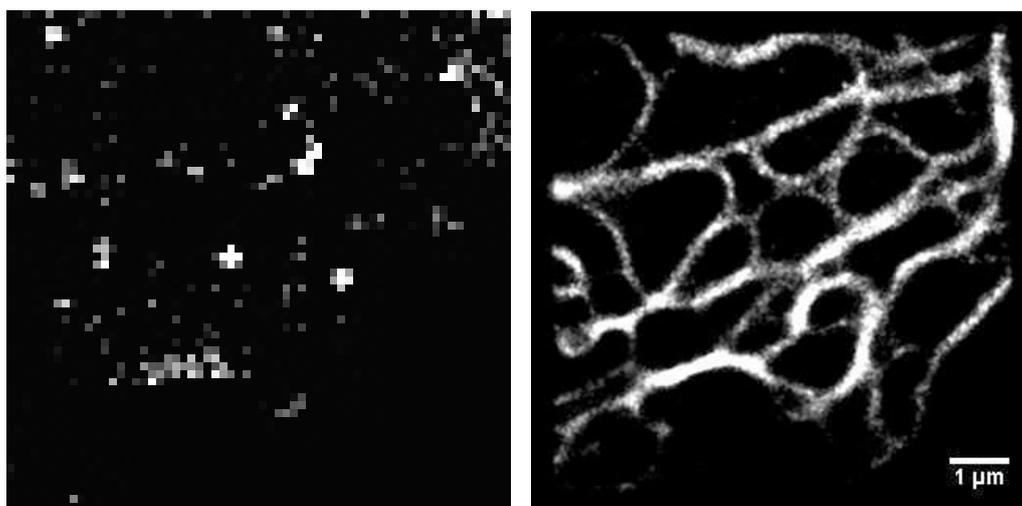


Figure. Left: Single molecule image. Right: Reconstructed super-resolution image of SSFP-vimentin in HeLa cells.

[1]Tanja Brakemann et al. *Nature Biotechnology* **29**, 942–947 (2011)

PYP を利用した光応答性生体機能分子の創製

【A01-2 班】

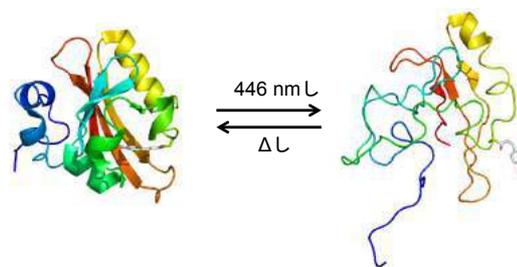
金原 数

東京工業大学大学院生命理工学研究科

近年、分析技術の進歩や生命科学の学術的発展に伴い、生命現象を分子レベルで記述することが可能になりつつある。分子機構に基づいた真に有効な医薬品の開発、生体内の物質動態を解明するのに有用な分子ツールやイメージング試薬、機能性材料の開発は、人類の健康福祉の観点からも重要性が高い。特に最近では、オプトジェネティクスをはじめ光を使った新しい解析技術が台頭し、光を使って細胞活動を計測、あるいは人為的に操作しようとする試みが積極的になされている。本研究では、少数性生物学あるいは医療・生命科学への応用を見据えた生命活動の光操作へ貢献する分子ツールの開発を目的とし、光受容蛋白質 PYP を融合した光応答性機能分子を構築した。加えて、人工分子での代替による蛋白質の人工化とその光機能制御に挑戦した。

PYP は、紅色光合成細菌 *Ectothiorhodospira halophila* から単離された分子量 14 kDa 程度の比較的小さいサイズの可溶性球状蛋白質である。450 nm 付近の可視光を吸収することで発色団の異性化とそれに続くプロトン化が起こり、それに伴って高次構造の変化が起こることが報告されている(図 1)。本研究では、遺伝子工学的手法を用いて PYP を目的蛋白質に融合し、光照射に伴う PYP の構造変化を用いて二種類の蛋白質の光制御に成功した。

一つ目の蛋白質は、孔形成蛋白質毒素 α -ヘモリジン(H1a)である。孔形成に参与する H1a の N 末端に PYP を融合した N-PYP-H1a は、450 nm の可視光照射下で羊赤血球に対する溶血活性の低下が認められた。また、光応答の分子機構に関して変異体を用いた解析の結果、光反応中の PYP 部位が H1a の孔形成過程あるいは孔形成後の物質透過を阻害している可能性が示唆された。¹⁾ さらに、H1a に関しては、膜貫通領域を人工分子で置き換えるという新たな蛋白質工学のデザイン設計を提案し、実際、人工分子の特性に応じた溶血活性の調節・制御が可能となった。²⁾ 二つ目の蛋白質は、加水分解酵素 PDE である。分光学的な分子特性評価の結果、PYP 融合 PDE は野生型 PYP より長寿命の光反応サイクルを持ち、光照射下においては著しく触媒効率が低下することが明らかとなった。本発表では、これらの研究成果について詳細に報告する。



J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9395-9404. L

図 1 PYP の光照射による立体構造変化 (基底状態;左、光反応中間体;右)

1) K. Kinbara *et al.*, *Chem. Commun.*, **48**, 4737 (2012)

2) K. Kinbara *et al.*, *Mol. Biosyst.*, **10**, 3199 (2014)

Minority control of synchronized dynamics in the population of biological oscillators

A01-2

Kazuki Horikawa

Div. Bioimaging, Inst. Biomedical Sciences, Tokushima Univ.

Oscillation & Wave is a commonly observed dynamics in many biological processes. While experimental and mathematical analysis have significantly deepened our understanding of robust dynamics such as stable oscillation and wave propagation, unstable dynamics characteristic to the transition from premature to mature system were poorly understood. To experimentally address how the robust oscillation and wave emerges from un-organized initial condition, we focused on the developmental pattern formation of social amoeba that self-organizes the spiral shaped aggregation wave assisted with intercellular cAMP relay. We first investigated the transition dynamics from unorganized to synchronized oscillation and identified the cellular heterogeneity of cAMP signaling ability. To ask the molecular basis of heterogeneous cAMP dynamics, we next quantified the abundance of key enzymes for cAMP oscillation. GFP-knockin strains for cAMP receptor, adenylate cyclase and associated positive/negative regulators were generated and were subjected for biochemical and microscopic analysis, revealed that the copy number of key enzymes significantly differs among genes and cell population (max. 2-order of the difference in both cases). Finally, coupled analysis of molecular counting and cAMP dynamics identified the heterogeneous signaling ability strongly correlates with protein copy number of the most rare enzyme. On the basis of our quantitative data, we would like to discuss how the small number of genes controls structural and functional changes of genetic network and how the minority of cells regulates the collective behavior of cell population during the developmental pattern formation.

光スイッチングタンパク質 Kohinoor と SPoD-ExPAN 法を用いた生体適合性の高い超解像蛍光イメージング

技術開発支援班

和沢鉄一, 高内大貴, 新井由之, 永井健治

大阪大学産業科学研究所

近年開発された超解像蛍光イメージング法である RESOLFT や PALM などにより、回折限界を超えた高い分解能の観察が可能になった。しかし、これらの顕微鏡法は、非常に高い強度の照明光 ($> \text{kW/cm}^2$) による細胞に対する光毒性のため、生細胞のタイムラプス観察に適していない。そこで本研究では、低強度照明光で観察可能な超解像蛍光イメージング法の開発を行った。我々のイメージング法は、パターン化された偏光を有する励起光と抑制光による照射で広視野超解像イメージングを行う SPoD-ExPAN 法 (Superresolution by Polarization Demodulation-Excitation Polarization Angle Narrowing) [1] を改変し、我々が開発した高速光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor [2] を用いることで、実現した。我々は、照明光の干渉縞を避けるためにハイパワー LED を光源として用いて SPoD-ExPAN 超解像顕微鏡を製作した。この顕微鏡を用いて、 1 W/cm^2 オーダーの非常に弱い照明光で Kohinoor 融合タンパク質発現細胞の観察を行ったところ、細胞に対する光毒性の兆候がなく、 30 nm 程度の分解能が得られることが分かった。本研究の手法は、生細胞における超解像蛍光イメージングに有用であると期待できる。

[1] Hafi et al., Nat. Methods 11 (2014) 579.

[2] Tiwari et al., Nat. Methods 12 (2015) 515.

大腸菌走化性システムに内在する少数分子によるシステム制御

【A02-1 班】

福岡 創, 蔡 栄淑, 石島秋彦
大阪大学大学院・生命機能研究科

大腸菌の走化性システムでは、受容体クラスターにより検出された刺激が、クラスター構成因子の一つヒスチジンキナーゼ CheA によって情報伝達タンパク質のリン酸化 CheY (CheY-P) へ変換される。そして CheY-P がべん毛モーターに結合するとモーターの回転が時計方向 (CW) へ転換 (switching) し、細胞の遊泳が制御されると解釈されてきた。これら一連の解釈は、生化学的知見や細胞集団を対象とした実験など、マクロな実験系による平均化されたデータを元になされてきた。しかし、システムを実際に駆動するのは細胞内のタンパク質分子であり、従来のマクロ的な手法では、少数の個々のタンパク質分子の重要な働きが見落とされてきた可能性がある。そこで我々は、システムを担うタンパク質の分子数と細胞応答を定量的に理解するために、大腸菌走化性システムの 1 細胞計測を行った。

まずべん毛モーターの switching と、GFP-fusion を用いた情報伝達タンパク質 CheY の細胞内動態の同時計測を行った。その結果、CheY-P の結合によってべん毛モーターの CW 回転が起こることを初めて証明した。また CheY-P 結合部位 (34 のモーターサブユニット) のうち、わずか 13 分子の CheY-P 結合により CW 回転が引き起こされることが分かった。これは CheY-P が結合した少数のモーターサブユニットの構造変化が起点となり、CheY-P の結合していない他のサブユニットへ構造変化が伝播し、モーター全体が CW 型へ構造変化することを示唆する(1)。

また我々は先行研究にて、刺激のない環境下で、同一細胞上のべん毛モーター同士の switching が高度に同調することを明らかにした(2)。前述の研究結果と合わせて考えると、刺激のない環境下にもかかわらず、細胞内ではモーターの switching 毎に CheY-P 濃度がダイナミックに増加・減少することが分かってきた。そのためには、CheY-P を産み出す受容体クラスターにおいて、クラスターを構成するタンパク質分子同士が高い協同性を伴って一分子的に活性化・不活性化する必要がある。つまり受容体クラスター内の少数の受容体タンパク質の活性化が起点となり、活性化が受容体クラスター全体に伝播することが推測される。またケージドセリンを用いた 1 細胞計測においても受容体クラスターの協同性が計測されており上述のモデルを支持する(3)。現在、受容体クラスターの協同的な活性化を実験的に直接証明するための研究手法を開発している。

本領域での研究により、走化性システム内の少数のタンパク質分子を起点とした協同的機構の存在を、実験的な現象として捉えられるようになってきた。本報告会では、本領域での研究によって明らかになったこれらの知見について議論したい。

研究成果および関連論文

- (1) Fukuoka *et al.* 2014. *Sci. Signal.* **7**:ra32.
- (2) Terasawa & Fukuoka *et al.* 2011. *Biophys. J.* **100**:2193-2200.
- (3) Sagawa *et al.* 2014. *Biophys. J.* **107**:730-739.

Development of Fluorescent Nanodiamond Probes for Studying Protein Function and Structure

【A02-1 班】

朽尾豪人

京都大学理学研究科生物科学専攻

ダイヤモンドの窒素-空孔中心 (NVC: Nitrogen-Vacancy Center) が発する蛍光は高い安定性を示すとともに、その蛍光強度が励起電子のスピン状態を反映するため、ナノ空間における磁場計測や、超高感度の電子スピン共鳴(ESR)、核磁気共鳴(NMR)への応用が期待されている。特に、ダイヤモンドのナノ粒子で特定のタンパク質を標識し、1分子蛍光イメージング技術と組み合わせれば、タンパク質1分子レベルの磁気共鳴スペクトルを *in situ* 計測できる可能性がある。磁気共鳴スペクトルはタンパク質立体構造の情報を豊富に含んでいる。細胞事象をタンパク質の分子機能から理解するには、ナノ空間中で機能する少数分子について、構造変化を直接、個別観測することが求められる。本研究が目指す「1分子磁気共鳴」は、そのような1分子レベルの *in situ* 構造解析を実現できる可能性を持つ。

我々は、過去に、ナノダイヤを細胞や線虫に取り込ませ、その NVC 蛍光を用いて磁気共鳴を検出するシステムの構築を行ってきた。本研究では、細胞膜上に発現させた特定タンパク質を NVC ナノダイヤで共有結合的に標識し、1分子蛍光イメージングや蛍光検出磁気共鳴法で観察することを目指した。その実現のために、ナノダイヤ中の NVC 濃度の向上させる方法、ダイヤ表面の親水化修飾法、ナノダイヤとタンパク質の連結方法を検討した。NVC 濃度の向上は、イオンビーム照射による空孔生成と続くアニーリング処理により、ダイヤの親水化は、ポリエチレングリコール誘導体ポリマーによる表面被覆により実現した。また、タンパク質との連結のためには、BL(β -lactamase)-tag を利用した。その結果、平均粒径 25 nm サイズの NVC ナノダイヤによって細胞膜上のインターロイキン受容体を特異的に標識すること、および、この標識タンパク質の1分子蛍光観察に成功した。本成果は、NVC 蛍光を利用した「1分子磁気共鳴計測」への端緒を開くものであり、1分子レベルでの「*in situ* 構造動態解析」の実現に向けた第一歩と位置づけられる。1分子磁気共鳴が実現出来れば、少数分子が相互作用している「現場」において、直接的にタンパク質構造の変化を解析できるようになり、少数性生物学にも大きな貢献ができると思われる。発表では、一連の成果について報告するとともに、ダイヤ NVC を用いた光検出磁気共鳴の将来展望について議論する。

Visualization of chromatin structure and dynamics with single nucleosome imaging

【前島班】

Tadasu Nozaki and Kazuhiro Maeshima

Long genomic DNA is organized three dimensionally within the eukaryotic cell and proteins search their target sites in such crowded nucleus. In this situation, a protein as molecular machinery needs to move around such complicated folded DNA and interrogate its target site, and the chromatin becomes a huge obstacle. Thus, chromatin structure and dynamics seem to be deeply related to diverse cellular functions but not merely packaging, and play a fundamental role in epigenetic regulation. Therefore, making the detailed observation and description of chromatin is essential to understand the various life phenomena in eukaryotes. Here, we report chromatin environment including structure and dynamics in living mammalian cells observed by newly developed single nucleosome imaging. We identified the difference of nucleosome dynamics in two transcriptional chromatin states; nucleosomes around euchromatin-rich regions moved larger than around heterochromatin-rich regions. Furthermore, single nucleosome imaging enabled us to identify numerous compact clusters of nucleosomes in the interphase nucleus and mitotic chromosomes. We propose the variation of chromatin dynamics and structure play crucial roles in search of genomic information by proteins.

遺伝子発現の少数性生物学

—1 分子遺伝子発現解析法、並びに超高解像度ゲノム構造解析法の開発—

A02-2 班 研究分担者

谷口 雄一

理化学研究所生命システム研究センター

少数性生物学において、細胞内に少数個のみ存在する分子の振る舞い・影響性を明らかにすることは本質的なテーマの一つである。とりわけ我々は過去の研究において、大腸菌内に存在するタンパク質の個数を網羅的に調べることにより、細胞内で 10 個以下のコピー数しか持たないような少数性のタンパク質が、細胞機能に十分に影響性を与えることを明らかにしてきた (Taniguchi et al., *Science*, 2010)。本学術領域において我々は、こうしたタンパク質の少数性・ノイズ性が生命機能に与える影響の普遍性を明らかにすることを目標とし、大腸菌のみならず一般的な細胞・生物においてタンパク質発現の 1 分子レベル解析を行う方法論の開発を目指してきた。

一般的な生物種における 1 分子レベルタンパク質発現量解析を実現する鍵となる技術として我々が開発を行ってきたのが、ハイスループット型 3 次元 1 分子イメージングシステムである。従来の 1 分子イメージングシステムでは細胞膜の底面近傍数ミクロンの領域のみでしか 1 分子レベルでの解析は難しかったが、ライトシート型照明システムを導入することにより、数十ミクロンの厚みを持つ細胞でも全体積において一様に 1 分子解析を行うことが可能となった。さらに我々は新規光学系を開発することにより、従来のライトシート型顕微鏡では難しかった測定の高スループット化を行うことにも成功している (谷口、西村、PCT/JP2014/059883)。我々はこの技術を駆使することで、出芽酵母の複数遺伝子において、mRNA とタンパク質発現を同時に、1 分子レベルで、かつリアルタイムに捉えることに成功している。

一方で我々は、細胞の遺伝子発現状態を規定するゲノムの構造状態を、ゲノムワイドに、かつ超高分解能で捉える技術の開発を行っている (Ohno et al., *submitted*)。ゲノムの構造的性を全染色体に渡って解析する手法としては、染色体立体配座捕捉法 (HiC) が近年開発され、様々な生物種において解析が行われている (Dekker et al., *Science*, 2002)。我々は最近、本法の空間分解能を大幅に改善し、単一ヌクレオソームレベルでの詳細なゲノム構造を決定することができるようになった。これにより、染色体内において各ヌクレオソームが不規則な配列構造を取っていることが見えてきており、現在その生理学的意義と遺伝子発現との関連性について解析を進めている。

今後の研究においては、ゲノム構造解析により得られる様々なゲノム領域を可視化しながら 1 分子遺伝子発現イメージングを行うことにより、細胞内に 1 または数コピーのみ存在するゲノムの構造的性の機能原理、並びにそこから生じる遺伝子発現のノイズ性・状態性・少数性のメカニズム並びに生理学的意義について、さらなる解析を進めていきたいと考えている。

少数分子を介した分子協同性と生命リズム制御

【A02-3 上田班】

大出晃士

東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 システムズ薬理学教室

哺乳類概日時計は複数の転写制御因子が形成する転写翻訳フィードバックループにより自律振動子が形成されると考えられているが、安定した周期発振を担保する機構は明らかでない。CRY1 は PER1 や PER2 とヘテロ二量体を形成して転写抑制因子として働き、自らの転写を抑制する負のフィードバック回路を形成することで、概日時計の自律発振を担う中心的なタンパク質である。我々は CRY1 や PER1、PER2 蛋白質の存在量を絶対定量し、その存在量は概日変動の過程で、一細胞あたり 1×10^4 分子を下回る低発現量の期間を経ることを明らかにした。特に PER2 タンパク質は 2000 分子/細胞を下回る非常に少ない発現量を経る。このように、概日時計振動子を形成する転写制御因子群のタンパク質発現量は総じて低いにも関わらず、転写活性を顕著に抑制した時でも、周期長はなお正確に保たれていることが示されている。少数分子によって駆動される概日時計は、なぜ、確率的な揺乱が影響する細胞内環境で、時間的に強調して働き、正確な時間周期を刻むのであろうか。

CRY1 による概日周期長制御機構を理解するために、我々は概日周期長および周期安定性（振幅）を決定する CRY1 の特性を探索した。質量分析計を用いて決定した多数の CRY1 リン酸化修飾部位を手掛かりにし、それらの修飾が概日時計発振に及ぼす影響を、網羅的な CRY1 変異体の機能解析から検証した。その結果、概日時計発振の安定性には、CRY1 と PER2 の親和性が重要であることが明らかとなった。一方で、周期長に関しては、CRY1 の分解速度や転写抑制活性ではなく、CRY1 に存在する特定のループ構造に生じる複数のリン酸化状態が重要であることが示唆された。

さらに、我々はタンパク質の量変化によらない自律周期発振機構の象徴的なメカニズムを知るために、可逆的なリン酸化制御のみから振動子を形成するための最少要求性を数理モデルを用いて探索した。その結果、少数分子との結合親和性を介した基質リン酸化状態の同期が時空間周期構造の振幅に重要な役割を果たすこと、および連続したリン酸化サイトが特定の順序で修飾される速度が周期長の決定に重要であることが示された。

CRY1 による概日周期長制御機構と可逆的なリン酸化の数理モデルから、「タンパク質ネットワークからなる振動子形成においては、周期長を担う分子間の状態を少数分子との相互作用を介して同期させることが重要である」、という少数分子の果たす重要性を議論したい。

Development of High-throughput Production System of Genetically Engineered Mice

【A02-3 班】

鵜飼英樹¹⁾ 上田泰己^{1,2)}

¹⁾理化学研究所生命システム研究センター合成生物学研究グループ

²⁾東京大学大学院医学系研究科システムズ薬理学教室

少数分子からなる化学反応システムがどのように階層を超えてマクロな生命システムの頑健かつ柔軟な動作を作り出しているのかを明らかにするための手法として、遺伝子変異や遺伝学的ツール等を用いて細胞内少数分子を摂動し、その細胞内挙動および表現型を計測・解析するアプローチがあげられる。本課題では、細胞内少数分子の振舞いと個体レベルで観察される高次生命現象とを繋ぐシステムを理解していくために、マウス個体を用いた仮説検証サイクルを高速かつ並列に回す技術の構築を目的として、仮説に基づいて任意の変異や遺伝学的摂動ツールを導入したゲノム改変マウス個体を高速・並列に作製する方法の開発・整備を行ってきた。これまでに、基盤技術として、ほぼ全ての細胞が任意のES細胞に由来するキメラマウス個体(100% ES マウス)を安定に作製する技術を整備するとともに、CRISPR/Cas9 法を用いて高効率に高品質な遺伝子破壊 ES 細胞を樹立する技術、TALEN を高速・並列に作製可能な技術、TALEN 法を用いた高効率遺伝子ターゲティングプロトコルと並列化・少量化リポフェクションプロトコルを組み合わせたノックイン ES 細胞の多種類並列樹立技術、を開発した。これらの要素技術を用いてノックアウト-レスキュー実験系を構築する事で、目的の遺伝子に任意の変異を持たせたゲノム改変マウス個体ライブラリーの作製が可能になりつつあるので、紹介する。

少数分子反応系の理論～化学・力学複合ネットワークの理論へ

【A03-1 班】

中川 正基¹, Holger FLECHSIG^{1,2}, 新海 創也^{1,2}, 富樫 祐一^{1,2}

¹ 広島大学理学研究科, ² 広島大学クロマチン動態数理研究拠点

生命システムは多種多様な要素からなる一方で、それらの中には少数個しかない要素（例えば細胞あたり少数個しかない分子）が含まれている。もし、こうした少数個の要素の影響が少数の範囲にとどまるのであれば、大きなシステム全体の振舞いへの影響は無視できるだろう。しかし、例えば生体分子の中には、触媒（酵素など）や鋳型（DNA など）として働くものがあり、少数であっても繰り返し反応に関与して影響を増幅する可能性がある。

このような場合、系を小さく（分子を少なく）するだけで、分子が無数にある場合（生化学）とは質的に異なる振舞いが生ずる可能性が、簡単な触媒反応モデルを用いて示されてきた。我々は、まずはこの原点に戻り、残された問題に対する一般的な理論の構築を目指した。

例えば、こうした少数分子の影響は、（他の多く存在する成分も含む）長時間平均濃度のようなマクロな量にも及ぶが、その評価は個別のシミュレーションによっていた。これに対し、例えば濃度の平均や分散といった量を予言する一般的な理論を新たに構築し、平均濃度の順位に関する法則、ある特殊な定常状態の存在とその必要条件などを導いた。

また、少数分子系においては、個々の分子内部の「ゆらぎ」が顕在化すると考えられる。一方で、少数個の分子間の反応が確率的・離散的な事象であることも顕在化し、反応の「ゆらぎ」としてとらえられる。ところが、酵素を含む反応拡散系の時空間パターン形成において、これら2つの「ゆらぎ」は全く異なる影響を与えることが示された。

さて、これら少数個の要素が独立に働いている（例えばある分子の性質が別の分子によらず常に一定）のであれば、その振舞いは個々の要素の振舞いの足し合わせとして議論することができる。しかし多くの場合、要素の振舞いはフィードバック機構などにより相互に干渉しあう。要素が協同的に働くことにより、多数の要素が少数のように振舞う可能性さえある。

要素間の相互作用としては、もちろん分子を介した化学的なものが考えられる。この場合、前記の反応系の理論の枠組みで議論できる。一方、分子複合体の内部、混雑環境下で隣接する分子の間などでは、力学的な相互作用もまた重要である。分子機械、例えば分子モーターが効率的に働くためには、内部で力学的に情報を伝える機構が欠かせない。これら分子機械を構成する要素（サブユニット）の数は少数、かつ、数・配置が決まっていることが多い。そうした少数個の要素間での相互作用・協調動作の原理、またそもそもそれらを適切に配置する原理はどのようなものか。この問いに答えるべく、粗視化モデルを用いた動力学計算により、タンパク分子（複合体）内部で構造変化を介して情報が伝わる様子（向きと強さ）を解析した。特に、サブユニットが周期的に配置した分子に注目した事例を紹介したい。

このような情報伝達・協調動作の理論を検証する上では、実験データから少数要素間の協同性を検出できる解析手法が求められる。開発した手法と、そこから派生した領域内共同研究についても、あわせて紹介する。

The Key and Unlock Mechanisms in F₁-ATPase Unveiled by Single Molecule Time Series Analysis

【班名】 A03-1 班 富樫祐一

Chun-Biu Li¹, Hiroshi Ueno², Rikiya Watanabe^{2,3,4}, Hiroyuki Noji^{2,4}, Tamiki Komatsuzaki¹

¹Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University. ²Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, University of Tokyo. ³PRESTO, Japan Science and Technology Agency. ⁴CREST, Japan Science and Technology Agency.

F₁-ATPase (F₁) is a rotary motor protein that can efficiently convert chemical energy to mechanical work of rotation via fine coordinations of its conformational motions and reaction sequences. Compared with reactant binding and product release, the ATP hydrolysis has relatively little contributions to the torque and chemical energy generation. To scrutinize possible roles of ATP hydrolysis, we investigate the detailed statistics of the catalytic dwells from high-speed single wild-type F₁ observations, and detect a small rotation during the catalytic dwell triggered by the ATP hydrolysis that is indiscernible in previous studies. Moreover, we find in freely rotating F₁ that ATP hydrolysis is followed by the release of inorganic phosphate (P_i) with low synthesis rates. Finally, we propose functional roles of the ATP hydrolysis as a key to kinetically unlock the subsequent P_i-release and promote the correct reaction ordering.

Reference:

C.B. Li, H. Ueno, R. Watanabe, H. Noji, T. Komatsuzaki, "ATP Hydrolysis Assists Phosphate Release and Promotes Reaction Ordering in F₁-ATPase", **Nat. Commun.**, 6, 10223 (2015)

“少数性生物学的”細胞内拡散現象の理論 —アクティブ拡散とヌクレオソーム拡散を例に—

【A03-1 班】

新海 創也, 富樫 祐一

広島大学 クロマチン動態数理研究拠点

細胞内分子を観測でき、かつ、数を測れるという技術革新ゆえに直面した少数性生物学の理論的課題は、生命システムの階層性における対象の適切な時空間スケールの認識とそれに有効な理論の創出である。

われわれは、細胞内のように熱ゆらぎが支配的な世界で観測される拡散現象に対して、理論的研究を進めた。その成果として2例を報告する。一つは細胞内でのアクティブ拡散における散逸エネルギーを評価するものであり、もう一つは、クロマチンドメイン内のヌクレオソーム拡散からドメイン構造を評価するものである。どちらの成果も本新学術領域内での新たな共同研究に発展している。前者は公募A02（H24-25）班の矢島グループ、後者はA02-2班の前島グループとのものである。われわれの理論的成果がどのように実験データに適用され、そこから何が新しい情報としてもたらされるかについても、報告する。

Evolutionary optimization of simple polymer networks: Models of synthetic allosteric proteins

Holger Flechsig

Department of Mathematical and Life Sciences and Research Center for the Mathematics on Chromatin Life Dynamics (RCMCD), Graduate School of Science, Hiroshima University

Allostery describes the phenomenon that couples binding of a ligand at an allosteric site to a structural/dynamical change at a remote regulator site. This mechanism is ubiquitous in enzymes and often controls their functional activity. On the other side, the breakdown of allosteric communication is related to enzymatic malfunction and may cause diseases or lead to resistance in therapeutic treatments. I have constructed a model system that is based on the conformational dynamics of elastic networks and allows the investigation of general principles of allosteric effects. Starting from random elastic networks, which generally do not reveal ordered communication between the two ligand sites, an iterative evolutionary algorithm is applied in order to obtain networks which are optimized with respect to the allosteric communication between the distant sites. The optimization strategy relies on structural mutations which are evaluated in terms of their quality to improve allostery inside the network conformation. Two prototype examples are presented, one in which cooperative allosteric coupling is present and the second in which anti-cooperative allostery is realized. The designed networks are analyzed in terms of their structural flexibility and the propagation of forces and strain between the distant functional sites is investigated. Thereby, clusters and individual elements which represent key agents in the transmission of allosteric changes are identified and the robustness of allosteric signaling with respect to perturbations of them can be studied. The designed networks represent synthetic toy templates which allow to study important aspects which underlie the mechanisms of allosteric communication via conformational signaling on the level of purely mechanical properties.

少数性問題のための触媒反応ネットワークの解析的枠組みとその応用

【A03-1 班】

中川 正基¹, 富樫 祐一^{1,2}

¹ 広島大学大学院理学研究科, ² 広島大学クロマチン動態数理研究拠点

生体内では多数の分子成分が複雑な反応ネットワークを構成している。特に、酵素などによる触媒反応は生体内反応ネットワークにとって重要な役割を果たしていると考えられている。近年、簡単な触媒反応ネットワークにおいて少数分子成分が存在する場合、多数の場合とは質的に異なる振る舞い(速度方程式では予言できない)が生ずる可能性が示されてきた(少数性効果)。このような系での少数性効果の定量的な評価は、分子間の反応が離散的かつ確率的であることを考慮して、状態確率に関する常微分方程式(化学マスター方程式)を用いなければならない。しかし一般に、化学マスター方程式を解析的に解くことは困難とされており、少数性効果の影響は個別の計算機シミュレーションによって評価されてきた。このような状況の中で、我々は少数性効果を予言するための一般的な理論の構築を目指した。

一般的な議論をするために我々は抽象的な2体触媒反応ネットワークを考えた。対応する化学マスター方程式に対して「確率母関数の方法」を用いて解析し、ある条件(「全体エルゴード性」と呼んでいる)の下で、各成分濃度の長時間平均や分散といったマクロな量を予言する解析的な公式を得ることに成功した。簡単な応用として、各平均濃度に対する順位保存則や、連続極限(分子数 ∞)で総取り状態に繋がる特殊な定常状態の存在とその必要条件などを導いた。さらに、今回の枠組みには含まれない自己触媒反応を含むネットワークへの適用法も考案した。

今回開発した枠組みは触媒反応ネットワークの理論解析を効率的にしてくれる。これにより懸案であったランダムネットワークの理論解析に道が開けてきた。シミュレーション結果によれば、触媒する反応数に偏りのあるランダムネットワーク(ヘテロなランダムネットワーク)において、多機能な触媒ほど速度方程式が予言する濃度よりも低下あるいは上昇したりする。この現象の本質を理解するために簡単なヘテロ・ランダムネットワークを用いた理論的な考察もあわせて紹介したい。

高速 AFM による生きた細胞のナノスケールでの形態観察

【A03-2 班】

柴田幹大¹, 内橋貴之^{1,2}, 安藤敏夫^{1,2}, 安田涼平³

¹ 金沢大学理工研究域・数物科学系

² バイオ AFM 先端研究センター

³ Max Planck Florida Institute for Neuroscience

分子 1 個から 10 数個の少数分子間で生まれる少数性生体システムを理解するためには、個々の分子の振る舞いを個別に観察できる顕微鏡が必要となる。そんな中、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）は、液中環境で機能している生体分子の振る舞いをナノメートルサイズの高い空間分解能で、かつ、リアルタイムに観察できるため[1, 2]、細胞に潜む少数性生体システムを可視化できる有力な手法となる可能性がある。

その一方で、これまでの高速 AFM は、主に、単離・精製したタンパク質の動態観察に用いられており、生きた哺乳類の細胞の動態を可視化した例はなかった。そこで本研究は、高速 AFM を生きている細胞の動態観察へ適用することを目指し、既存の高速 AFM 装置の改良を試みた。最初に、プローブである AFM 探針と細胞が高速 AFM 走査中に衝突し、細胞にダメージを与えるのを防ぐため、これまでより長い AFM 探針を作成した。次に、高速 AFM の走査範囲内に細胞をセットするため、蛍光顕微鏡と組み合わせた。これらの改良により、HeLa, COS-7 細胞の細胞端で起こる波打つような形態変化、エンドサイトーシスに由来する細胞表面の形態変化を可視化することに成功し、また、ラットの海馬に由来する神経細胞の樹状突起が成長する様子、樹状突起の波打ち現象といった神経細胞のダイナミックな動態を観察する事にも成功した[3]。これらの結果は、高速 AFM が生きた細胞の動態観察にも適用可能である事を示しており、今後、生きた細胞表面の少数性生体システムを直接可視化できる可能性を示した。

[1] M. Shibata *et al.*, *Nature Nanotech.* 5, 208–212 (2010).

[2] T. Ando *et al.*, *Chem. Rev.* 114, 3120-3188 (2014).

[3] M. Shibata *et al.*, *Sci. Rep.* 5, 8724 (2015).

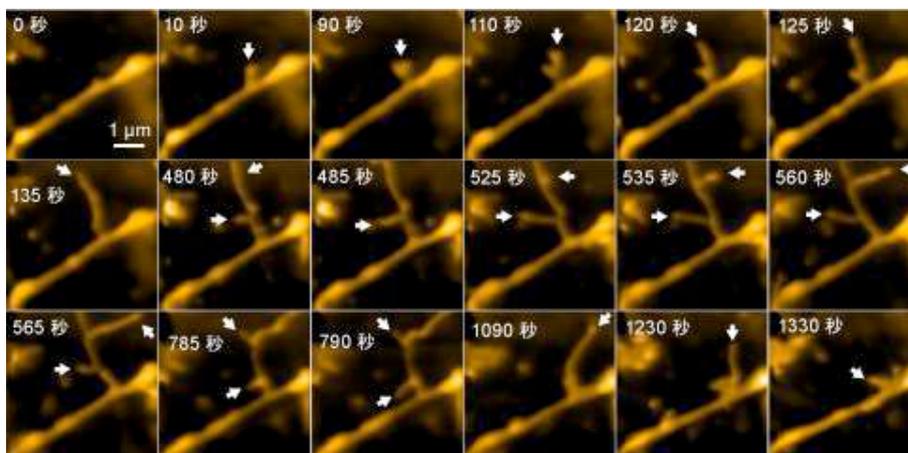


図 培養 9 日目の神経細胞の高速 AFM 画像。矢印で示した樹状突起が時間経過によって形態を変える様子が可視化された。

Dynamic interaction between Kai proteins dependent on phosphorylation states of KaiC revealed by HS-AFM

【A03-2】

Takayuki Uchihashi¹, Tetsuya Mori², Shogo Sugiayma¹, Carl H. Johnson², Toshio Ando¹

¹Department of Physics/Bio-AFM FRC, Kanazawa University

²Department of Biological Science, Vanderbilt University

The circadian rhythm in cyanobacteria is essentially generated by an oscillator composed of three Kai proteins (KaiA, KaiB and KaiC). The Kai system is very unique because the self-sustainable oscillation of KaiC phosphorylation can be reconstructed in vitro only by incubating KaiC with KaiA, KaiB and ATP.¹⁾ KaiC is composed of tandemly duplicated N-terminal (C1) and C-terminal (C2) domains and forms a hexamer with a double-ring shape.²⁾ It is known that KaiA stimulates the auto-phosphorylation of KaiC, whereas KaiB promotes the auto-dephosphorylation of KaiC by sequestering KaiA. Thus, interactions between three Kai proteins modulate the phosphorylation state of KaiC and determine the phase of circadian rhythm. Also, the number ratio of Kai proteins is essential to create the rhythm. However detailed molecular mechanism and the reason why the number ratio of Kai proteins is essential are unclear. Furthermore, it is still unknown whether the circadian rhythm can be created at a low molecular concentration such as single molecular level.

Here we applied high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) to directly visualize dynamic interaction between Kai proteins. The HS-AFM image clearly showed that the KaiA binds to the CII ring of KaiC but the KaiB binds to the CI ring. Also we found that the binding affinity of KaiA and KaiB to the KaiC significantly depends on the phosphorylation state of KaiC. KaiA repeated binding and dissociation on the CII ring of the phosphorylated KaiC with a dissociation rate of ~ 4.5 /s, while, KaiA was strongly bound to the KaiC. We confirmed that the dissociation constants of KaiA to KaiC showed circadian period synchronized with the phosphorylation states of KaiC. KaiB also showed different affinity to the CI ring of the KaiC dependent on the phosphorylation state. These results suggest that the dynamic interaction plays a crucial role for the circadian rhythm of Kai systems and could provide a novel model about the molecular interactions during the circadian model, which can reasonably explain the importance of the number ration of Kai proteins. Furthermore we try to investigate if the interaction Kai protein's is homogeneous or not depending on the phosphorylation states of the KaiC hexamers.

¹⁾ M. Nakajima et al., *Science* **308**, 414-415 (2005).

²⁾ T. Mori et al., *PNAS* **99**, 17203-17208 (2002).

非視覚オプシンを用いた細胞内情報伝達系の光による制御

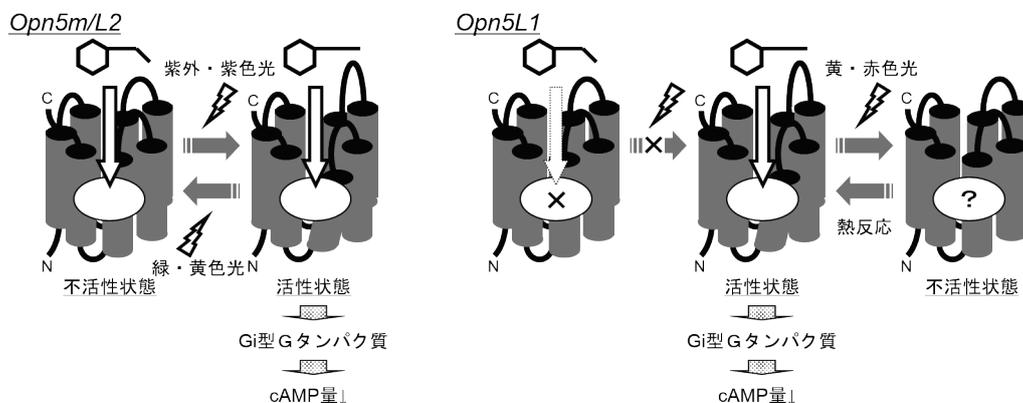
【2012-2013 公募 A01】

山下高廣

京都大学 大学院理学研究科 生物物理学教室

G蛋白質共役型受容体(GPCR)はヒトゲノム上に約 800 遺伝子存在し、市場で利用される薬の約 30%のターゲットにもなっているため、創薬分野において重要である。GPCR が駆動するG蛋白質シグナリングなどの細胞内情報伝達系の機能を個々の組織や細胞において明らかにするためには、それを人工的に制御できるシステムが必要である。動物のオプシン類は光受容に特化した GPCR である。そのためオプシン類は、光によってGタンパク質シグナリングを on/offし、多くの細胞で重要な働きをしている cAMP、IP₃、Ca²⁺などの細胞内分子数を低侵襲的に制御するオプトジェネティクスのツールになりうる可能性がある。

オプシン類は、受容する光の波長、結合するレチナール異性体、活性化するGタンパク質サブタイプなど分子特性の異なるいくつかのグループが見つかっている。その中で、脊椎動物の非視覚機能に関わる Opn5 グループは、11 シス型レチナールだけでなく多くの動物組織で利用できる可能性が高い全トランス型レチナールを直接結合できるため、汎用的に利用できる可能性が高い。Opn5 グループは4つのサブグループ (Opn5m, L1, L2, n) に分類できる。このうち、Opn5m/L2 は紫外光感受性の不活性状態と可視光感受性の活性状態は光により相互変換可能であり、この性質を利用して、哺乳類培養細胞に適当な波長の光を順に照射することで、cAMP 濃度を増減させることが可能であった。さらに、Opn5L1 は 11 シス型レチナールを結合せず、全トランス型のみを結合し、光刺激とは関係なく活性化し、光刺激により不活性化した後、元の活性状態に熱反応で戻る特異な分子特性を有していた。そして、これを哺乳類培養細胞に発現させ光を照射することにより、cAMP 濃度が増加することも確認できた。このような Opn5 グループの分子特性を変化させることも可能になっている。また、実際に動物組織に異所的に発現させ、Opn5 により生理現象を変化させる例についても併せて紹介する。



Development of Photochemical Tools to Regulate Biomolecular Functions

【2012 公募班】

Shin Mizukami^{1,2}

¹Graduate School of Engineering, ²Immunology Frontier Research Center, Osaka University

顕微鏡技術や蛍光蛋白質、化学プローブなどの進歩により、生細胞イメージング実験によって様々な生体分子の挙動や機能が明らかにされている。一方、細胞内に存在する生体分子の数とその細胞応答との関係は、ほとんど明らかにされていないが、この課題を解決するには、細胞内の特定分子の数を精密に制御し、その結果として誘起される細胞応答を観察することが必要だと考えられる。そこで我々は光を用いて、蛋白質等の生体機能を制御する為の技術開発を行ってきた。我々はこれまで、有機化学と分子生物学的手法を組み合わせ、蛋白質を機能性分子で修飾する技術の開発を行ってきた¹。この技術を BL-tag テクノロジーと名付け、未反応のラベル化プローブを洗浄操作で取り除く必要がない「発蛍光ラベル化」等の応用例について報告してきた²。

本技術を用いて蛋白質を光で活性化する技術をはじめ、多様な解析技術の開発に取り組んだ。蛋白質を光で活性化する為に、異種の蛋白質タグを光照射によって連結するケージドリンカー化合物を開発した。このリンカー化合物を用いて受容体の光二量化を達成し、受容体の活性化を起点とする細胞内シグナル伝達経路を活性化することに成功した。また、可逆的に生体機能を光制御できれば、非常に幅広い応用が可能であると考えられるが上記のケージドリンカーでは可逆的な制御は難しい。そこで、新たにフォトクロミック色素とヘアピン構造ペプチドを用いて可逆的に生体機能を制御する為の基盤技術の開発にも取り組んでいる。

[参考文献]

1. S. Mizukami, Y. Hori, K. Kikuchi, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 247.
2. S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Akimoto, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1623.

Title: Stochastic expression and rapid assembly of the T3SS1 is a critical step for regulating cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus*

【A01 班】

Authors: Akira Takahashi¹, Takashi Uebanso¹, Takaaki Shimohata¹, Hitomi Iba¹, Kazuya Nishimura², Yuichi Taniguchi², Kazuki Horikawa³, Mutsumi Aihara¹, Kazuaki Mawatari¹

Affiliations: 1. Department of Preventive Environment and Nutrition, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

2. Laboratory for Single Cell Gene Dynamics, Quantitative Biology Center, RIKEN, Osaka, Japan

3. Division for Bioimaging, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

Background. Type 3 secretion system (T3SS), is major virulent factor in over twenty species of Gram-negative bacteria which export bacterial protein (effectors) to host cell to manipulate its cellular function for owns hope. Moreover, T3SS is a prospective useful tool with both experimental and therapeutic applications, including vaccine development.

Objectives. Upon analysis of the contribution of the T3SS injectisome and effector involved in this paradigm, it is still unknown that the number and timing of expression of the T3SS injectisome and effectors, and which factor have dominant role during infection are unclear. In the present study, we used fluorescence protein combined with single cell analysis to solve dynamics of the T3SS and effector during infection in *Vibrio parahaemolyticus*.

Methods and Results. During infection, Vp1671 (T3SS component) but not the Vp1680 (effector) proteins showed to make spot like localization along the membrane of the cell. Although both percentages of spot positive cells and number of T3SS spots were increased depend on a time of infection, assemblies of the Vp1671 to the T3SS occur prior to increase fluorescence levels of bacterium in early time of infection. A dynamic range of the number of T3SS spot is 10^0 to 10^1 . Cytotoxicity against the host cells were increased depend on both the expression levels of Vp1680 and the number of T3SS spot.

Conclusions. The T3SS1 of *V. parahaemolyticus* uses a combination of a few injectisomes and an abundance of effector protein to kill host cells.

極小体積マイクロチャンバーでの微小管ダイナミクス観察とリン酸検出

【A01】【A02】

小野寺優¹, 樋口真之¹, 野地博行², 島知弘³, 岡田康志⁴, 政池知子^{1,5,6}

1. 東京理科大学・理工学部・応用生物科学
2. 東京大学・工学研究科・応用化学専攻
3. 東京大学・理学系研究科・生物科学専攻
4. 理化学研究所・QBiC,
5. 東京理科大・総合研究院・イメージングフロンティアセンター,
6. JST さきがけ

本研究では、10～数十フェムトリットルオーダーのマイクロチャンバーを利用し、極小体積溶液中における微小管ダイナミクスの観察とリン酸検出系の構築を通じて、少数個蛋白質や少数個基質の振る舞いの解明を目指す少数性生物学を展開した。

微小管ダイナミクス観察の狙いは、細胞内の混みあった環境を模倣し、溶液組成の急激かつ局所的な変化が微小管の重合・脱重合に及ぼす影響を調べることにある。1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ の細長い鋳型を用いて体積約 15fL の細長いオーバル型 PDMS 樹脂製マイクロチャンバーを作成し、このチャンバー内に微小管のシードと遊離チューブリンを閉じ込めて重合・脱重合の様子を蛍光顕微鏡で撮影した。マイクロリットルオーダーの十分な体積がある条件での重合・脱重合と比較し、これまでのところ極小体積空間では重合・脱重合のサイクルが速い傾向が示唆されつつある。現在、PDMS の壁による行き止まりの影響や整列された重合による効果を検証している。

リン酸検出系については、蛍光標識したリン酸結合蛋白を調製し、従来のフローセル、円柱形 PDMS マイクロチャンバー、上記オーバル型細長チャンバーのそれぞれに封入することに成功し、顕微鏡下でリン酸濃度依存的な蛍光強度増加を確認した。現在、この実験を油中の水滴でできたチャンバー(droplet chamber)で行っているところである。Droplet chamber での実験が可能になれば、さらに小さな体積での少数個リン酸の検出、ひいては1分子のタンパク質からの1分子のリン酸の検出へと発展させる道が拓けるはずである。

以上2つの研究は、オーバル型細長チャンバーでの微小管の伸長・短縮・転換とリン酸解離のタイミングの同時可視化という形で融合し、微小管の動的不安定性の解明へとつながることが期待される。

微小管依存性モータータンパク質のランダム運動を 方向性運動に変換する分子機構

【公募班 A02】

矢島潤一郎、須河光弘、佐藤秋彦

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

モータータンパク質は、細胞分裂や小胞器官の輸送、繊毛運動など様々な細胞運動に関与し、極めて巧妙な仕掛けをもつ。これらのモータータンパク質は、ヌクレオチドの加水分解の化学エネルギーを(熱機関のように気体などの熱膨張・収縮を介せず)直接運動に変換可能のようで、現行の人工モーターとは異なる作動原理で働く、生命独自のエンジンを搭載している。モーターのうち「キネシン」や「ダイニン」は、細胞骨格・微小管と特異的に作用し、微小管上を移動する。このキネシンやダイニンは ATP の加水分解を伴い微小管のプラス端(微小管の重合が速い端)方向、もしくは、マイナス端(微小管の重合が遅い端)方向に並進運動をする(並進モーター)とともに、微小管の長軸の周りに左回転、もしくは、右回転運動をする(回転モーター)。さらに、いくつかのキネシンやダイニンでは、微小管上に沿って拡散運動をすることも報告されている(拡散モーター)。このように多様な運動特性を示すが、ATP の加水分解のエネルギーがどのように利用されているのか、運動方向がどのように決定されるのかについては、いまだによくわかっていない。そこで我々は、微小管依存性モータータンパク質 Kif1a(1分子)及び細胞質ダイニン(少数分子)が微小管上を並進・回転・拡散運動する様子を定量的に解析し、モータータンパク質が運動方向を決定する仕組みの解明を目指した。

少数のシナプス分子の微細配置による中枢シナプス可塑性の制御機構

【公募班】

並木繁行、坂本寛和、有吉哲郎、金原直也、廣瀬謙造
(東京大学大学院医学系研究科)

中枢神経系の神経細胞間に形成されるシナプスは神経回路機能を調節する際に極めて重要な基本素子である。特にシナプス前部の末端にあるアクティブゾーンと呼ばれる微小な部位では極少数の分子（シナプス分子）が機能して神経伝達物質の放出量、放出される確率などを状況に応じて可塑的に変化させて（シナプス可塑性）、神経回路機能を調節していると考えられている。しかしながら個々のシナプス前部から放出される神経伝達物質の定量が困難であること、さらには数百 nm 程度の超微小環境であるアクティブゾーン内での分子の配置を精密に測定する方法論が確立していなかったことから、どのシナプス分子の、どのような配置によって神経伝達物質の放出が調節されてシナプス可塑性を実現しているのかは不明であった。本研究では、シナプス前部から放出される神経伝達物質であるグルタミン酸の放出ダイナミクスを制御する分子の微細配置の実態とその意義についての理解を目的とした。新規に開発したグルタミン酸の蛍光イメージング技術によって、培養海馬神経細胞上に存在するシナプスから放出されたグルタミン酸を単一シナプスレベルの解像度で可視化、解析することでアクティブゾーンからのグルタミン酸放出ダイナミクスを決定づけるパラメーター（シナプス小胞の放出確率、グルタミン酸放出量、シナプス小胞放出部位の数）の精密測定を可能にした。さらに、グルタミン酸イメージングによるグルタミン酸放出ダイナミクスの解析と、超解像顕微鏡法を用いた複数のシナプス分子がシナプス前部で形成する超微細配置の解析とを組み合わせることによって、シナプス分子の微細配置とグルタミン酸放出ダイナミクスとの連関についての解明を進めてきた。これまでの解析で明らかになった、**Munc13-1** がアクティブゾーンで形成する微細配置がシナプス小胞の開口放出部位を形成する分子実体の一部であること、**Munc13-1** などのシナプス分子の微細配置のシナプス可塑性制御における重要性などについての知見の詳細を述べる。

発現量の少ないタンパク質のフォールディングにおける シャペロン依存性の解析

【公募 A02 班(平成 24-25 年度)】

丹羽達也、松野有希、小佐野由貴、田口英樹
東京工業大学 大学院生命理工学研究科

細胞内のタンパク質の発現量はその種類によって数コピー程度から数万コピー程度まで非常に大きくばらついており、細胞が正常に機能するためにはそれらの「数」の制御が正しく行われる必要がある。細胞内におけるタンパク質発現量の制御には遺伝子レベルの制御だけでなく、シャペロンによるフォールディングの補助やプロテアーゼによる分解などのタンパク質品質管理機構による制御も深く関与している。私たちは過去の大腸菌全タンパク質の網羅解析により、発現量が少ないタンパク質は自発的にフォールディングできずに凝集を形成しやすい傾向があること、またこれらのうちのいくつかは主要なシャペロンによって凝集形成が抑制されることを見いだしてきた。私達はこの結果が、発現量が少ないタンパク質が適切に機能するために、タンパク質品質管理機構が重要な働きを担っている、ということを示唆するものであると考え、発現量の少ないタンパク質のフォールディングおよび分解とシャペロン及びプロテアーゼの効果について調べることにした。

まずシャペロンによる効果については、大腸菌の主要なシャペロンである GroEL/ES について、過去の大腸菌全タンパク質の網羅解析結果から、発現量は少ないと予想されるが GroEL/ES による補助を受けている可能性が高いものを選び出し、それらが細胞内で GroEL/ES によるフォールディング補助を必要とするかを調べた。その結果、29種類の候補のうち20種類ものタンパク質が、細胞内でフォールディングするのに GroEL/ES を必要とすることが判明した (Niwa T. *et al.*, *FEBS Lett.*, 2015)。この結果から、発現量が少ないタンパク質においても、その多くが GroEL/ES をはじめとするシャペロンによるフォールディング補助を必要とする可能性が高いと考えられる。

次に、発現量の大小とシャペロンのフォールディング補助を直接的に調べるために、無細胞タンパク質合成系と大腸菌の主要なシャペロンである DnaK/DnaJ/GrpE および GroEL/ES、そして大腸菌が持つ基質特異性の低い Lon プロテアーゼを用いた評価系を構築し、発現量の多寡とこれらのシャペロンの効果の関係について調べた。その結果、いずれのシャペロンとも発現量の多寡にかかわらずフォールディングを助ける能力があるものの、発現量の少ないタンパク質は凝集形成の速度が早く、シャペロンによる保護を受ける前に凝集しやすい傾向があることが明らかとなった。この結果は、発現量の少ないタンパク質が細胞内で正しく機能を発揮するためには、シャペロンによるフォールディング補助が発現量の多いタンパク質と比べてより重要である、つまり発現量の少ないタンパク質はよりシャペロンの補助を強く必要とするということを反映したものであると考えている。

微小空間の動的環境制御システムの開発

【2012, A02 班公募】

小嶋 勝

大阪大学 基礎工学研究科 システム創成専攻

近年、単一細胞解析などの細胞の個性に注目した研究がさかんに行われている。平均化された集団からの解析結果ではなく、細胞一つ一つを、さらには細胞内の分子にも注目して個別に解析する手法である。このような手法を用いる場合、局所環境制御技術が有効となる。我々はマイクロ・ナノロボティクスを基盤としたマニピュレーション・環境操作技術を、バイオ分野での微細作業自動化などに適用することを目的とした研究を推進しており、本研究室では二本のエンドエフェクタを箸のように扱う特徴的な二本指マイクロハンドの開発を行っている。本マイクロハンドの機能を拡張し、微小空間での反応を自在に行うことが出来る系の確立を目指した、局所環境制御システムの開発を行った。まずは、化学的環境を制御可能なツールとして、画像フィードバックにより化学刺激をリアルタイムで制御する局所化学刺激システムの開発を行った。このような高時間分解能で対象を解析することが可能なシステムは、様々な生命現象を理解する上で非常に有用なツールとなりうる。さらに、本システムの有用性の確認のために、周辺の Na^+ 濃度により回転数が変化するべん毛モータの回転速度計測・操作や、ディッシュ一面に培養された動物接着細胞の部分的な剥離操作を行ったので、これらの成果を報告する。

Temporal Dimer Formations of Various G-Protein Coupled Receptors: Quantitative Approaches by Using Single-Molecule Observation Method

【2012 A02】

Rinshi S. Kasai

Institute for Frontier Medical Sciences,
Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS),
Kyoto University, Japan

G-protein coupled receptors or GPCRs comprise the largest protein superfamily in mammalian genomes. Although GPCRs were previously believed to function as monomers rather than dimers or larger oligomers, according to recent studies, both homo- and hetero-dimerizations of GPCRs are found to have important roles for tuning signal transduction processes. However, the actual mechanism of how both homo- and hetero-dimers harmonically organize various signal transduction cascades remains to be solved. As the first step to understand this, the numbers of monomers, homo- and hetero-dimers as well as their lifetimes must be known, which can be obtained from the parameters describing equilibria and dynamics of homo- and hetero-dimer formations.

Despite the importance of such parameters, most of previous researches were unable to derive them because of the limitations of research methods; denaturing conditions, e.g. chemical crosslinking and solubilization with detergent, as well as insufficient spatiotemporal resolution of dimer detection mask the nature of dimer formation.

The single fluorescent-molecule observation method enables us to directly observe diffusion of each protein in living cell. By applying this, it turned out that all of the GPCRs I observed form temporal homo-dimers with the lifetimes of ~100 milliseconds. Therefore, this result suggests that the temporal association/dissociation, or so-called “dynamic equilibrium between monomers and dimers in the plasma membrane”, is one of the common characteristics found in GPCRs. In addition, the single fluorescent-molecule observation method allows us to investigate how this dynamics of dimer formation is affected by agonist stimulation. Here, I'd like to report recent findings of GPCR dimerization, which lead to understand how GPCR dimers are employed in signal transductions.

核膜孔複合体の機能に見られる少数性の追究

【2012-A02 公募班】

桑田昌宏, Ogheneochukome Lolodi, 山崎啓也, 吉村成弘

京都大学大学院生命科学研究科

真核生物において核-細胞質間の物質輸送を担う核膜孔複合体 (Nuclear Pore Complex, NPC) は、およそ 30 種のサブユニットから構成される総量 112MDa にも及ぶ巨大分子複合体であり、一般的なヒト培養細胞においては一細胞核あたり 3000-5000 個存在している。NPC の構造や *in vitro* での分子通過能に関してはこれまでによく研究されてきたが、細胞内における定常状態での動的活動や、NPC ごとの機能的差異などは明らかになっておらず、細胞活動を支える核-細胞質間の分子動態の実態には迫れていなかった。

我々は、代表的な輸送担体であるインポーチンによる核内輸送サイクルをモデル化し、実験によって得られたパラメータを元にその NPC 通過を計算した。その結果、1) 定常状態においてもインポーチンは NPC 内外を活発に行き来していること、2) インポーチンが取りうる三様態 (単体、輸送分子結合型、Ran 結合型) のいずれでも NPC を双方向に通過できること、3) 単体ではインポート/エクスポート比は 100 以上あるが、Ran 結合型は 0.1 以下であり、輸送分子結合型は輸送分子サイズにも依存するがほぼ 1 となること、などを明らかにした。特に重要なことに、インポーチンがその名前に反して核内で分子を捕捉して核外に排出することも定常的に起こっており、このごく少数の“隠れた逆輸送”が適切な細胞内タンパク質分布に影響している可能性がある。この逆輸送は、細胞核に均一な 3000 個の NPC が存在するとしたとき、単一 NPC あたりおよそ 1~2 分子/秒と予測された。この隠れた逆輸送は、FRAP や FLIP によって実験的にも証明することができ、およそ 1.1~3.7 分子/秒と、理論値に近い値を示した。

これらの分子動態は、NPC を均一な集団とみなした場合のものであるが、実際の細胞内 NPC は少しずつ特徴の異なるヘテロな集団であるかもしれない。現在我々はその点を追究すべく、TIRF を斜方照明にして用いることで NPC の分子通過を一分子蛍光によって追跡するシステムを立ち上げ、その機能的バリエーションの定量評価に取り組んでいる。

生物回転ナノマシン構成素子の協同的相互作用

【公募 A02 班(平成 24-25 年度)】

曾和義幸^{1,2}, 荒居謙太¹, 笠井大司²

¹法政大学・生命科学部, ²法政大学マイクロナノテクノロジー研究センター

大腸菌などの多くの遊泳する細菌は、時々刻々と変化する周囲の環境を感知し、より良い環境へと移動する。この高度に制御された細胞運動の推進力は、細胞本体の周囲から数本はえているべん毛とよばれる運動器官から生み出される。べん毛の根元にあたる細胞膜に埋まる直径わずか 50 nm 程度のナノマシン:べん毛モーターが、らせん状繊維をスクリューのように回転させる。モーターは複数のリングからなる回転子とその周囲に最大約 10 個配置される固定子ユニットから構成されており、毎分 1 万回転以上もの高速駆動をしながら、瞬時に回転方向を切り替え、100%に近い効率でエネルギー変換することが知られている。モーターを駆動するエネルギー源は、細胞膜を介した電気化学ポテンシャル差にしたがって細胞外から細胞内へと流入するイオンである。利用できる共役イオンはモーター固定子によって決まっており、大腸菌やサルモネラ菌がもつモーター固定子は水素イオンを利用し、好アルカリ性細菌などのモーター固定子はナトリウムイオンを利用する。

本研究では、1~10 個という少数個の固定子ユニットが 1 個の回転子を共有して協同的に相互作用する機構の解明を目指している。今回、特性の異なる固定子ユニットが同時に機能できることを報告する。自然界の大腸菌べん毛モーターは水素イオンを利用するが、大腸菌内でナトリウムイオン流を利用できるように固定子を遺伝子改変できる。ナトリウムイオン固定子はイオン濃度によって固定子ユニットの出力特性およびモーターへの組み込み効率を制御できるので、モーター機能解析に都合がよい。大腸菌内に両固定子を発現させて、モーター内に存在するそれぞれの固定子ユニット数を特定したところ、特性の異なるユニットが同時に相互作用して加算的に回転トルクを発生していた。つまり、自然界では水素イオン流のみをエネルギー源として利用する大腸菌べん毛モーターを、ナトリウムイオン流も同時に利用できるハイブリッドエンジンのように機能することを明らかにした。また、このモーターは、環境に応じて柔軟に構成素子の配合を調整するなど、モーターの協同的相互作用の研究にも有用であることがわかった。現在、1 つのユニットで複数種のイオンを利用できる固定子を用いた研究も進めており、その結果もあわせて報告する予定である。

大腸菌異物排出トランスポーターAcrBの基質依存的ダイナミクス

【2012_A02 公募】

山本健太郎, 玉井怜, 山崎萌, 稲葉岳彦, 曾和義幸, 川岸郁朗

法政大・生命・生命機能

細菌の多剤耐性化は、異物排出トランスポーターによる薬剤の能動的排出が要因の一つである。大腸菌における主要な異物排出システムは、基質を捕獲・輸送する内膜トランスポーターAcrB、基質を細胞外に輸送する外膜チャネルTolC、両者を繋ぐ膜融合蛋白質AcrAの三種のコンポーネントからなるRND型異物排出蛋白質複合体である。AcrBも、それと複合体を形成する外膜チャネルTolCも三量体として機能し、膜融合蛋白質AcrAは二量体としてAcrB単量体に結合する。したがって、AcrB-AcrA-TolC複合体は合計わずか12分子のタンパク質からなる分子装置であるが、強固なペプチドグリカン層を貫き、2つの膜をつなぐ蛋白質複合体がどのように形成されるのか、よく分かっていない。大腸菌はこのような複合体を5種類もつ。そのうち、AcrAB-TolC複合体のみが構成的に発現しており、他の複合体の多くは、外的環境からの刺激に応答して発現が誘導されることが知られている。また、興味深いことに、すべてのRND型異物排出蛋白質複合体はTolCを外膜チャネルとして利用している。ここで、一つの疑問が生じる。環境刺激により新たに合成されたトランスポーターは、すでにTolCと複合体を形成しているトランスポーターと置き換わり、新規複合体を構築することができるのだろうか(トランスポーター交換モデル)。この点を明らかにするために本研究では、分子イメージングと動態解析による異物排出蛋白質複合体の構築過程の可視化を行った。

まず、内膜トランスポーターAcrBと緑色蛍光蛋白質GFPの融合体を構築した。全反射蛍光顕微鏡観察を行うと、このAcrB-GFPはTolC存在下ではほぼ動かないのに対して、*tolC*遺伝子欠失株中では激しく動いていた。AcrA、TolCをAcrBと共有するホモログAcrDを強制的に発現すると、その発現量が増えるに従って、動くAcrB-GFPの割合が増加した。これは、AcrDがAcrB-GFPと置き換わることによって、AcrB-GFPが複合体から外れることを示唆している。すなわち、AcrBとAcrDは競争的にTolCと結合し、一つのTolCに対してAcrBとAcrDの交換が起こる可能性を示している(図)。さらに、AcrB-GFPとAcrDが共発現している菌の培養液中にAcrB特異的基質を添加するとAcrB-GFPの多くが固定されていた。このことから、AcrBは基質を排出している駆動状態ではAcrAB-TolC複合体が安定化され、AcrDとの交換が抑制されていると考えられた。以上の結果は、RND型異物排出蛋白質複合体の構築は動的に制御される過程であることを示唆しており、トランスポーター交換モデルを支持するものである。これは、有害物質を速やかに細胞外へ排出するための優れた機能であると言える。

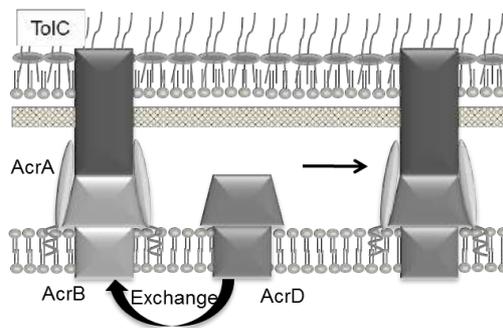


図 トランスポーター交換モデル

分子のバラツキによる情報確度の強化

【2012A_03 公募班】

石原秀至

明治大学理工学部物理学科

生体分子は修飾箇所を持つなどの多型性を持ち、したがって個々の分子には個性、バラツキがあるといえる。このようなバラツキ(品質の不均一性)があると、一見、細胞が果たすべき生体機能の性能を弱めることになると思われる。細胞膜にあるレセプター分子を考えてみよう。単分子レセプターとリガンドとの反応は確率的なので、揺らぎが生じる。この確率的な反応から、外界のリガンド濃度 c をどれほど精確にはかれるのか、という問いが Berg と Purcell によって調べられ(Berg-Purcell 限界[Berg and Purcell, 1977])、その後の研究での改良されてきた(Bialek and S. Setayeshgar 2005, Endres and Wingreen 2009, Kaizu et al. 2014)。

これらの研究ではそれぞれのレセプターのバラツキを考慮することはなく、レセプターが N 個あるときには単純にその揺らぎ $[\delta c]^2$ が $1/N$ 倍されるとしている。では、レセプターにバラツキがある場合はどうなるだろうか？簡単なモデルを採用することで、実はバラツキがある方が、確度が高くなる、つまり、ゆらぎを $[\delta c]^2/N$ 以下にすることが出来ることを示せる。直観的には以下のように説明することが出来る。各レセプターはそれぞれ濃度に応じて応答曲線を持ち、ダイナミックレンジなどが異なってくる。もし全てのレセプターが同じ性質を持っていれば、同じ濃度領域で同じように応答するが、情報検知の立場からは、それは無駄である。むしろ素子ごとに異なる濃度領域を受け持つことで、レセプターの集団として外界シグナルへのシグナル-ノイズ比や相互情報量を上げることが出来る。この議論を確認するために、on 状態, off 状態を持つ簡単な binding-unbinding process を考察した。簡単な計算から平均が同じならば

$$\sigma_{homo}^2 \geq \sigma_{hetero}^2$$

が成り立つことをしめせる。この式から、①ある瞬間で見た時に on 状態にあるレセプター個数 N_{on} の分布 と ②時間 T で見た時に、レセプターが on 状態である全時間合計 T_{on} の分布について、バラツキのある系の方が一様な系にくらべ揺らぎが小さいことを示し、実際数値計算でも確認した。これらの量は Berg-Purcell 限界の評価でも重要な役割をもっている量である(Endres and Wingreen 2009)。

Molecular behavior of DNA in a cell-sized compartment coated by lipids

【公募 A03 班】

Tsutomu Hamada

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)

The behavior of long DNA molecules in a cell-sized confined space was investigated [1]. We prepared water-in-oil droplets covered by phospholipids, which mimic the inner space of a cell [2], following the encapsulation of DNA molecules with unfolded coil and folded globule conformations. Microscopic observation revealed that the adsorption of coiled DNA onto the membrane surface depended on the size of the vesicular space. Globular DNA showed a cell-size-dependent unfolding transition after adsorption on the membrane. We discuss the mechanism of these trends by considering the free energy of DNA together with a polyamine in the solution. The free energy of our model was consistent with the present experimental data. The cooperative interaction of DNA and polyamines with a membrane surface leads to the size-dependent behavior of molecular systems in a small space. These findings may contribute to a better understanding of the physical mechanism of molecular events and reactions inside a cell.

[1] T. Hamada, et al., *Phys. Rev. E*, 91, 062717 (2015).

[2] T. Hamada & K. Yoshikawa, *Materials*, 5, 2292-2305 (2012).

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

【A1】

茅 元司

東京大学 大学院理学系研究科 物理学専攻

本研究では、骨格筋ミオシン1分子の機能が、多分子複合体形成により、どのように機能発現されていくのかを明らかにする目的として、分子間の協同性に着目し、ミオシン分子間の力発生が同調してくる仕組みを実験と理論モデルから紐解いていく。

ミオシン17分子程度がアクチン1本と相互作用するミオシンフィラメントを合成し、アクチンと相互作用時の力発生をアクチンに結合させたビーズを光ピンセットで補足して計測した。ビーズの変位は、斜光レーザー照明によるビーズの散乱像を四分割フォトダイオードに投影して計測しており、高SN比による変位データの獲得が可能となる。さらに、複数のミオシンがアクチンに結合するため、ビーズ・タンパク質間の揺らぎが大幅に削減された。その結果、生理学的条件に近い1mM ATPにおけるサブミリ秒間隔で起こるステップを検出することに成功した(図1a)。この計測結果は、以下に論じるミオシン分子間の力発生同調メカニズムの解明にあたり、非常に有用なものである。

ミオシン分子間の協同性を検証するためにシミュレーションモデルを開発し、その結果から1mM ATPにおいては、分子間力発生の同調現象が頻繁に起こることが示唆された。一方、10 μ M ATPではそのような協同現象は起こりにくいと予想された。そこで、このようなATP濃度に依存した協同性変化を実験的に検証するために、図1aのようなサブミリ秒間隔のステップ波形を加算平均し、ステップの立ち上がり部分の特徴を1mMと10 μ M ATPにおいて比較した(図1b)。その結果、1mMでは10 μ M ATPに比べて、波形の立ち上がりがゆっくりで、また大きなステップ幅の増加を示した($\tau=0.28\text{ms}$, $d=6.2\text{nm}$ at 1mM; $\tau=0.11\text{ms}$, $d=3.9\text{nm}$ at 10 μ M)。シミュレーションモデルで同様な解析を行った結果は、実験データと極めて一致する傾向にあった(図1b)。このような立ち上がり波形の差は、ステップの立ち上がり中に介在する分子数が1mMではより多いためと考えられる。すなわち、1mMではステップの立ち上がりから0.6msの間に平均3分子のミオシンがほぼ同調して力を出しているため、ステップが定常状態に落ち着くまでに時間を要し、またステップが増え続ける傾向にある。以上の実験データとシミュレーションモデルの検証から、ミオシン分子間の力発生が同調する協同現象は、ATP濃度が生体内程度まで高いと促進されることがわかってきた。また、こうした分子間の協同的な力発生を直接みる実験も現在進行中であり、近日中に報告できる予定である。

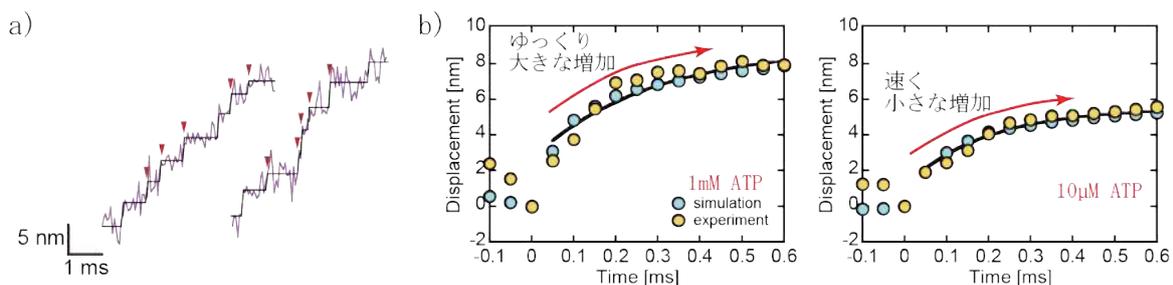


図1 a) サブミリ秒のアクチン変位ステップ波形, b) ステップの加算平均波形

細菌の走性における数的多様性の解明

【A01 公募班】

井上 圭一

名古屋工業大学

【序】 微生物は物質や光、温度など様々な環境要因を感知して、より生存に適した環境を選ぶ「走性」を示し、その機構の解明は生物の環境への適応を理解する上で重要な鍵となる。我々は一分子蛍光エネルギー移動 (FRET) を利用し、タンパク質の構造変化やタンパク質間相互作用ダイナミクスについて調べることで、微生物の走性の分子論的なメカニズムの解明を目指した研究を行っている。特に細菌の光受容膜タンパク質であるセンサリーロドプシン (SR) は光の信号をトランスデューサータンパク質 (Htr) や Che タンパク質を介して細胞内部に伝達し、べん毛の回転パターンを変えることで、細胞の光に対する遊泳パターンの変化 (走光性) を引き起こす。このシグナル伝達系は光を使って容易に制御を行うことが可能であり、SR-Htr-Che の系を調べることで、微生物の走性全般に通じる信号伝達メカニズムの理解が期待される。また一分子測定系の強みを活かし、信号伝達過程に関わる分子数を明らかにすることで、細胞の中の信号伝達における少数性についても理解が可能となり、最終的には異なる種間での比較を通じ、その多様性についても知見を得ることが期待される。

【研究内容】 我々はまず本領域において全反射型近接場照明法を用いた、SR-Htr-Che 複合体上における一分子 FRET 観察のための測定系の構築に取り組んだ。SR には正・負それぞれの走光性に関与する SRI と SRII の二種類が存在し、それぞれ 500 nm および 570 nm 程度の光で活性化される。そこで我々は通常のタンパク質の一分子観察系に、さらにタンパク質活性化用の光源を導入した光学系を新たに構築した。また活性化光による蛍光色素の励起を避けるため、一般的な FRET 観察に用いられるものよりも長波長の蛍光色素の組み合わせを検討し、それに合わせた光励起/蛍光検出系の最適化を行った。その結果、シャッターによって SRI-HtrI と SRII-HtrII のそれぞれに適した波長のレーザー光による光照射の切り替えが可能な観察系を実現した。そしてそれを用いて

測定した一分子蛍光像が図 1 である。これを見ると明瞭に一分子像が観察されていることが分かる。講演ではさらに全反射近接場顕微鏡を用いて行った FRET 観察などについて報告する。

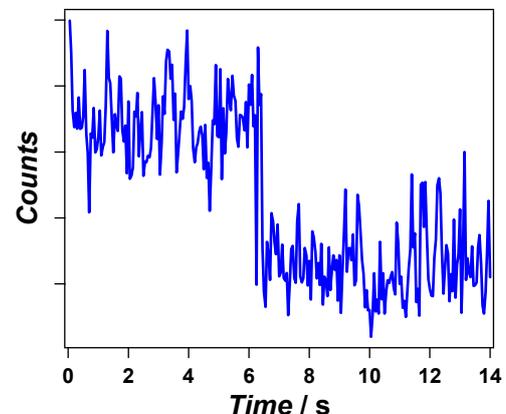
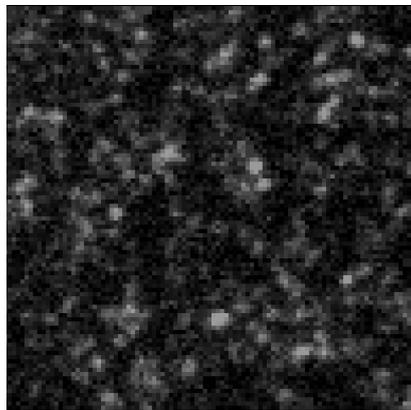


図 1. 本研究で構築した光照射系を用いて観察された一分子蛍光像 (左) および蛍光強度の時間変化 (右)

少数分子複合体動的ユニット機構による細胞膜機能制御

【A01 公募班】

藤原敬宏

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 メゾバイオ1分子イメージングセンター

細胞膜分子の運動、会合、ナノメゾスケールの複合体形成から、ミクロンスケールの膜ドメイン形成に至る過程とその制御機構の理解は、さまざまな細胞機能に関わる、最も基本的で重要な課題の一つである。私は、この基本的な問いに答えるため、細胞膜上の受容体や脂質の拡散運動を、1分子ごとに、サブミリ秒時間分解能で追跡する技術(金コロイド標識分子は 40,000 Hz; 1蛍光標識分子は 10,000 Hz、数 100 個の分子を 2種/3種同時、2次元/3次元)の開発と改善を進めてきた。これらの技術を利用したさまざまな1分子実験とシミュレーションの結果、

- (1) アクチン膜骨格の網目による運動の閉じ込めと衝突の誘導、膜骨格への結合/解離
- (2) スキャフォールド分子やアダプター分子による異種分子の共局在の誘導
- (3) 脂質ラフトに代表される、分子間のアフィニティーを利用したセグリゲーション
- (4) 細胞の一部を異なる分子組成と機能を持つ領域に分ける、細胞膜上の拡散障壁
- (5) 輸送小胞への分子種選択的濃縮と、細胞表面への極性輸送/細胞内への取り込み

などの細胞膜の基本的な構造や機能が、1分子運動の自由度を下げることでランダム熱運動に秩序を与え、コピー数に限りのある分子どうしを限られた時間内に効率的に会合/反応させている可能性、また、その分子種選択性により、特定の少数分子で構成される動的複合体形成を促している可能性が示された。

本研究では、接着斑/アドヒアレンスジャンクション/シナプスなどのミクロンサイズの接着構造の形成/分解が、上記の動的複合体を単位としておこなわれているという仮説、すなわち、「少数分子複合体動的ユニット」仮説を検証してきた。主に接着斑を対象とし、生細胞超解像と高速1分子追跡を組み合わせた装置で観察をおこなった結果、細胞膜上のミクロンサイズの構造は、構造外の細胞膜と同様にその内部がアクチン膜骨格の網目によって仕切られていること、メゾスケール(数 10 nm 程度)の少数分子複合体をユニットとした群島構造を持つこと、構造内部もユニット構成分子は群島の隙間を拡散で移動して内部の島にも容易にアクセスできること、島への局在は1秒以下の短時間の場合も多く、接着構造内外の分子は常に交換していること、などが分かってきた。これらは、ミクロンサイズの接着構造を、環境の変化に応じて短時間で急速に再編成するのに適した分子機構であり、細胞は、「少数分子複合体動的ユニット」がはたらく場として、(1)–(5)に代表される細胞膜の基本的な構造と機能をうまく利用していると考えられる。

Character Projection 方式電子線描画によるナノ開口基板大量作製法の開発

【A01 公募班】

韓龍雲¹、多田隈尚史¹、中尾公子¹、原田慶恵^{1,2}

¹京都大学物質－細胞統合システム拠点、²京都大学大学院生命科学研究科

高濃度蛍光分子存在下で1分子イメージングを可能とするナノ開口基板は直径 100nm 程度の穴の開いた厚さ 100nm 程度のアルミニウムで覆われたガラス基板である。励起光をガラス側から当てると、励起光はその波長の半分程度の径の穴を通過することはできず、穴の底のごく狭い領域($< 10^{-19\sim 20}$ L)のみを照らすことにより、余分な蛍光分子が励起されず背景光が低減され、数 μ M の蛍光分子存在下での 1 分子イメージングが可能になる。

これまで、走査型の電子線描画装置を利用して、ナノ開口基板を作製する方法を確立し、DNA 相同組換え中間体である Holliday 構造 DNA の分岐点移動に関与するモータータンパク質 RuvB の機能解析を行った。しかしながら、ナノ開口を用いた研究を汎用性の高い研究手法とするためには、作製コスト並びに作製効率の面で、改善が必要である。走査型の電子線描画装置は、描画に費やす時間が膨大となるため、大量作製には適さない。そこで、Character Projection (CP)方式電子線描画装置を利用し、電子線を一括照射することにより、作業効率を上げ、コストを下げることを試みた。その結果、1回の工程で直径 10cm の石英ガラス基板から、10mm×10mm のナノ開口基板を 61 枚作製可能となった。現在、CP 方式で作製したナノ開口基板を用いて、様々な DNA 結合タンパク質の機能解析を行っている。今回はエピジェネティクス制御に関連したメチル化シトシンパターン維持においてヘミメチル CpG 認識に関与する UHRF1 タンパク質の SRA ドメインについて、これまでに得られた結果について報告する。

GABA 小胞のプロトン動態からみる GABA 輸送機構

【A01-公募】

高森茂雄

同志社大学大学院脳科学研究科

神経間の情報伝達は、神経伝達物質を介したシナプス伝達によって行なわれている。神経伝達物質は、プロトンによって駆動される輸送体によって小胞内に濃縮されるが、伝達物質によってプロトンの要求性が異なり、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。一方、シナプス小胞は直径 40 ナノメートルと微小なため、定常状態の pH (約 5.6) で遊離のプロトンは 1 つもない計算となる。本公募研究計画では、定常状態においてシナプス小胞内で殆んど存在しないプロトンが神経伝達物質を濃縮する機構の解明を目的とし、以下の研究成果を得た。

【1】 シナプス小胞へのプロトン流入機構の定量解析：従来シナプス小胞の酸性化は、pKa が 7.1 程度の pH 感受性緑色蛍光タンパク質の蛍光強度変化から時定数 5 秒程度の反応であると言われていた。しかしながら、従来の pH プロブでは pH6 以下をモニターできなかつたはずである。そこで、我々は pKa ~6.5 の pH 感受性橙色蛍光タンパク質をプローブとして、小胞酸性化の時定数を再計測したところ、従来の報告よりも 3 倍程度遅い 15 秒程度であった。また、小胞内腔の緩衝能が非常に高く (58mM/pH)、一つの小胞の酸性化過程において約 1200 個のプロトンが蓄積していることが判明した。酸性化の時定数 (15 秒) は、最近報告されたグルタミン酸の取込み速度に近いことから、小胞内へのプロトン流入速度がグルタミン酸取込み速度を規定している可能性が示唆された (Egashira et al., J Neurosci, 35, 3701-3710, 2015)。

【2】 抑制性神経伝達物質 GABA 輸送機構の解明：興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と抑制性神経伝達物質である GABA の小胞内輸送における pH 要求性は異なることが示唆されている。上記【1】で用いた標本は、大部分がグルタミン酸性ニューロンであるため、GABA 小胞におけるプロトン動態については不明である。そこで、GABA 性ニューロンのみに Venus を発現するマウス由来の海馬初代培養細胞を用いて、GABA 小胞内プロトン動態の定量解析を行なった。その結果、(1) 定常状態の GABA 小胞内 pH が 6.4 と非常に高いこと、(2) 定常状態に辿り着くまでに、一度 pH6.4 以下まで酸性化され、その後アルカリ化して 6.4 に戻ること、(3) GABA 輸送を欠損したニューロンでは、一過性の酸性化が見られず、pH6.0 まで酸性化すること、等が明らかになった。これらの結果から、GABA 輸送体の活性化には小胞内 pH の低下が必須であること、GABA 輸送はプロトンとの対向輸送であること、小胞内 GABA の維持には GABA-H⁺対向輸送が常時行なわれている必要があること等、シナプス小胞内への GABA 輸送機構の一端が明らかになった (Egashira et al., 投稿中)。

今回の最終研究成果報告会では、【2】についてポスター発表を行なう。

カルシウムチャネルを介したインフルエンザウイルス 宿主細胞侵入機構の解明

A02 公募班

藤岡容一郎、南保明日香、西出真也、大場雄介
北海道大学大学院医学研究科細胞生理学分野

我々は最近、インフルエンザウイルスが宿主細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇を介したカルシウムシグナルの活性化によりエンドサイトーシスを亢進し、細胞に効率的に取り込まれることを見出している。本研究では、インフルエンザウイルスが宿主細胞内への Ca^{2+} 流入を促す分子メカニズムを探索した。蛍光標識したウイルス粒子を用いた顕微鏡観察により、粒子が細胞に吸着したスポット付近で局所的かつ微弱な Ca^{2+} 濃度上昇が観測された。このことから、細胞膜表面のシアル化されたタンパク質がウイルス感染依存的に細胞外から細胞内へ Ca^{2+} を流入させる候補分子であると考えられた。また、カルシウムブロッカーを培養細胞に処理したところ、ウイルス依存的な Ca^{2+} 濃度上昇が消失し、ウイルス感染も抑制された。siRNAを用いるカルシウムチャネルのノックダウンでも同様の結果が得られた。以上の結果から、インフルエンザウイルスはカルシウムチャネルを介して細胞内に Ca^{2+} を流入させることが示唆された。次に、カルシウムチャネルはシアル化されることが報告されていることから、インフルエンザウイルスタンパク質とカルシウムチャネルが直接結合するか検討した。免疫沈降法を用いた解析の結果、カルシウムチャネルとウイルス HA タンパク質が結合することが示された。さらに、カルシウムチャネルのトランケーション変異体を作製し同様の解析を行ったところ、カルシウムチャネル膜貫通領域のC末端側がHAタンパク質との結合に重要であることが示唆された。以上の結果から、インフルエンザウイルスはカルシウムチャネルと結合することで細胞内に Ca^{2+} を流入させ、亢進されたエンドサイトーシスに乗じて細胞に取り込まれることが明らかとなった。最後に、*in vivo* におけるカルシウムブロッカーのウイルス感染抑制効果を検討した。マウスにカルシウムブロッカーを経鼻投与し、ウイルス感染を評価したところ、カルシウムブロッカーの投与により、ウイルス感染が抑制された。したがって、*in vivo* においてもカルシウムチャネルがウイルス感染に重要な役割を担うことが示された。

ポスターでは、「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？」というインフルエンザウイルス感染における少数性問題に関してもあわせて議論したい。

細菌べん毛本数を厳密に制御する分子機構

【公募 A02 班】

小嶋誠司、小野宏樹、平田ひかる、高島明里、本間道夫
名古屋大学・大学院理学研究科・生命理学専攻

多くの細菌は運動超分子であるべん毛を回転させて溶液中を遊泳する。効率良い運動を実現するために、べん毛の形成位置と本数は厳密に制御されている。海洋性ビブリオ菌は細胞の極に1本だけべん毛を形成し、極べん毛の本数は、GTPase の FlhF が正に、FlhF とオペロンを組み ATPase である FlhG が負に制御している。本領域に参画して以来、我々は解析の遅れていた FlhG にまず焦点を当て、GFP 融合タンパク質を用いた FlhF, FlhG それぞれの局在観察と FlhG ATPase モチーフ変異体の解析を進めた。その結果、ATPase 活性が失われた FlhG 変異体では、べん毛本数制御が損なわれて多べん毛を形成したが、逆に ATPase 活性が高い FlhG 変異体では、べん毛形成が強く阻害されほぼ無べん毛になったことから、ATPase 活性が FlhG のべん毛本数制御機能において重要であることを見出した。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するに留まり、ある程度維持されていたため、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る。ATP の加水分解は、べん毛形成を1本のみに厳密に制御するために必要であり、ファインチューニングの役割を果たしていると考えている (論文発表済み)。

続いて我々は、ATPase 活性が非常に高く、べん毛の本数を抑える FlhG としての機能も高い D171A 変異体に着目して、その生化学的性質の解析を進めた。その過程において、この変異体は凝集性が高く、さらに、ATP を加えるとその凝集性が増すことがわかった。また、凝集しやすい条件で野生型の ATPase 活性が上昇した。このことから、ATPase 活性と凝集性には構造を介した相関性があると考えられる。動的光散乱の測定結果では、ATP 存在下でも単量体であることが示唆されたため、凝集は積極的な重合によるものではないと考えている。培養方法を変えて凝集性を抑える工夫をし、変異体におけるヌクレオチドの結合状態をアイソトープ標識で確認しようとしたが、検出できなかった。現在他の方法を探っている。

本研究では、蛍光標識した FlhF または FlhG を分裂中の細胞内において実時間観察し、細胞内でいつ FlhF が極へ移動するのか、極における FlhF の分子数とべん毛本数の関係を明らかにすることも目標としている。現在、A02 班の谷口雄一博士 (理研 QBiC) との共同研究により、Venus を融合させた FlhF の分子数計測を始めている。FlhF-Venus を染色体から発現させる菌株を観察に用いて、極べん毛1本が形成される条件において FlhF の極に存在する分子数の計測を試みており、解析を鋭意行っている。べん毛基部の C リング構成蛋白質 FliG が 26 分子で C リングの上部を構成すると考えられるため、Venus-FliG の計測・比較により FlhF の分子数を推定できると期待している。

少数分子による嗅覚情報伝達シグナル抑制とその機構

【公募 A02 班】

竹内 裕子

大阪大学大学院 生命機能研究科 生理学研究室

嗅覚は外界と接している嗅上皮内嗅覚神経細胞の受容体タンパク質に揮発性分子が結合することでスタートする。揮発性分子の多くは分子量数百の炭素化合物であり、その化学的な性質により、嗅覚受容が修飾を受けることを近年明らかにした。現時点では、嗅覚応答に対し、極めて強い抑制をする化学物質として 2,4,6-trichloro anisole (TCA) ($EC_{50} = 190 \text{ nM}$) とその構造類似物質を報告している。そもそも、嗅覚神経細胞は線毛上に高密度かつ局所的に存在するサイクリックヌクレオチド感受性陽イオンチャネル(Cyclic nucleotide-gated channel, CNG channel)とカルシウム感受性クロライドチャネル(Calcium-activated Cl channel, $Cl_{(Ca)}$ channel) が連続的に開口することで、受容器電位を発生し、それが活動電位発生へと引き続くという電気的興奮性細胞である。イオンチャネルのダイナミクスを知るためには、カルシウムイメージングなどの間接的な測定法ではなく、パッチクランプ法を用いることで様々な条件下でのイオンチャネルを通過する電流値を測定し(ボルテージクランプ法)、イオンチャネルを通るイオンの個数、セカンドメッセンジャー濃度および速度変化等、極めて定量的なアプローチや解析が可能であると考えられる。更に、これらのチャネル自身の電気生理学的特性のみならず、チャネル開口を引き起こすセカンドメッセンジャー(cAMP) やカルシウムイオン濃度の定量的な実時間挙動の検証は、嗅覚受容におけるシグナル修飾のメカニズムを知る上で、重要な課題の1つである。しかし、これまでの電気生理学分野において、嗅線毛は直径が 100nm 程度であるため、生きた状態で電気生理学的手法を用いた電流測定は困難であり、線毛内の分子挙動を知ることもほとんど研究が進んでいない状態であった。そこで、パッチクランプ法を中心としたシステムを使用し、蛍光色素を用いた線毛の可視化、光解離物質を用いた局所的物質濃度変化を同時併用し、電流応答を記録・解析した。

本領域の目的は、少数の要素分子が生体システムに影響する点を解明することにある。本研究においては、少数の分子がイオンチャネル電流をドラスティックに抑制する現象について、実際に線毛をターゲットとした実験系で線毛内部の細胞内因子のダイナミクスを検証した。また一方で、嗅覚は細胞の興奮だけで生じる感覚ではなく、細胞内外からのチャネル抑制(olfactory adaptation, olfactory masking)が関与していることから、嗅覚情報変換におけるチャネルの興奮と抑制が制御される機構を解明するために、化学物質と線毛上のイオンチャネル、細胞膜の関係性について検証した。

今回の領域会議では、イオンチャネルの修飾機構に関係するデータを中心に、少数分子が強いシグナル抑制を引き起こすメカニズムと、線毛内外での分子ダイナミクスを併せて考察する。

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

【A02 公募班】

堀江恭二、吉田純子

奈良県立医科大学 生理学第二講座

ES 細胞は、未分化状態を維持しながらも、分化刺激に速やかに反応して多様な細胞系譜を生み出すという、相反する性質を内包する。ES 細胞が有すこのような動的性質の分子基盤の研究は、発生プログラムを理解するための優れたモデル系である。

ES 細胞が分化刺激に対して多彩な細胞を生み出すということは、未分化状態の ES 細胞が不均一な細胞集団であることを示唆する。このような不均一を規定する遺伝子は過去にも探索され、とりわけ、転写因子 *Nanog* の遺伝子発現が ES 細胞で揺らいでいることは、広く知られている。一方、最近の研究から、*Gsk3b* と *Mek* の inhibitor を添加した無血清培地（以下、2i 培地と呼ぶ）においては、*Nanog* の均一性が高まることも知られており、未分化 ES 細胞における遺伝子発現の揺らぎの重要性を疑問視する考えもある。しかし、2i 培地で培養した ES 細胞であっても、分化誘導に対する反応性は細胞間で不均一であることから、*Nanog* の発現が一定な状態でも ES 細胞の状態は揺らいでいると推定される。この揺らぎを規定する遺伝子は、ES 細胞の多能性を *Nanog* の上位レベルで制御すると考えられ、ES 細胞の多能性研究に新たな分野を切り拓くと期待される。そこで我々は、*Nanog* が高い均一性を示す 2i 培地においても発現が大きく変動する遺伝子を探索した。

マウス ES 細胞に対して、splice acceptor に *Venus* を連結したカセットを有す遺伝子トラップベクターを、piggyBac トランスポゾンを用いて導入した。このベクターがゲノム上の様々な遺伝子へ挿入すると、遺伝子の転写状態が *Venus* の発現に反映される。本法では、ゲノムへの挿入はランダムに生じるので、研究者の恣意が介入することなく様々な遺伝子をスクリーニングでき、新規遺伝子の特定を期待できる。我々は *Venus* の発現を生細胞において経時的に観察することにより、2i 培地においても発現が変動する遺伝子を多数同定した。同定した遺伝子をさらに解析し、*Venus* の発現変動が分化能と相関する遺伝子を特定した。この遺伝子の高発現細胞と低発現細胞を、*Venus* 陽性細胞と陰性細胞として sorting して RNAseq を行った結果、*Venus* 陽性細胞は、発生的に極めて未分化性の高い状態と考えられた。さらに、この遺伝子の発現レベルを qRT-PCR で定量したところ、*Venus* 陰性細胞では、転写産物の絶対量の平均値が 1 以下であり、発現レベルがゼロの細胞も存在することが示された。

これらの結果は、マウス ES 細胞には、これまで特定されていなかった超未分化状態が存在することを示す。さらに、この超未分化状態が、我々が同定した遺伝子を中心とする少数分子により制御されている可能性を示唆しており、少数性生物学のモデル実験系として有用と考えられる。

構成論的アプローチによる収縮環の制御機構の解明

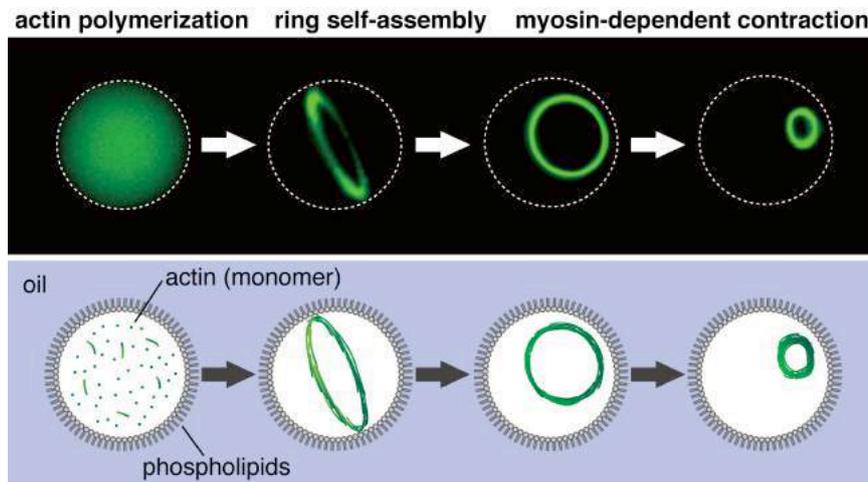
【公募 A02 班】

宮崎 牧人

早稲田大学先進理工学部物理学科

多くの動物細胞は、分裂期になると形が丸くなり、赤道面に収縮環と呼ばれるリング状のアクチンミオシンバンドルを形成する。やがてアクチンミオシンの収縮力によってリングが収縮し、細胞中央部がくびれることで細胞は分裂する。収縮環の形成を制御するシグナル伝達系や収縮環の構成タンパク質の同定は進んでいるが、収縮環が自発的に形成される仕組みは未解明な部分が多い。また、収縮環は、筋肉に見られる秩序立ったサルコメア構造とは対照的に、長さも極性も不揃いなアクチン繊維が束化した無秩序な構造をしており、なぜ収縮出来るのかも良くわかっていない。そこで本研究課題では、構成論的手法によって、①収縮環が自発的に形成される仕組みと、②収縮できる仕組みを理解することを目標とした。

我々はアクチンミオシンを細胞サイズの油中液滴に封入した人工細胞系を構築し[1]、収縮環様のリングが自発的に形成される条件を調べた。その結果、アクチンモノマーと双頭ミオシン（HMM）、アクチン繊維の束化因子（メチルセルロース or アクチニン）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収縮環様のリングが自発形成されることを発見した。空間的制御シグナルが無いにも関わらず、リングは曲率が最小となる赤道面に必ず形成され、ミオシンによるアクチン繊維の動的再配置によってリング形成が促進された。本研究によって、収縮環形成における微小閉鎖空間とミオシンの物理的寄与を明らかに出来た。さらに、アクチン繊維上のミオシン密度の上昇に伴いリングが収縮し、最終的に分解されることを発見したほか、リングの収縮速度は収縮直前のリングの直径に比例するという、動物細胞の収縮環に共通する性質の再現に成功した[2]。



[1] Miyazaki, Chiba, Ishiwata, *Protoc. Exch.* doi:10.1038/protex.2015.029 (2015)

[2] Miyazaki, Chiba, Eguchi, Ohki, Ishiwata, *Nat. Cell Biol.* **17**, 480-489 (2015)

走化性シグナル伝達に伴う自発的膜電位変化

【A02 公募班】

森本雄祐¹、上田昌宏^{1,2}

¹理化学研究所 生命システム研究センター、²大阪大学 大学院理学研究科

細胞膜が保持する膜電位は、膜内外のイオン濃度差によって形成され、生物共通の基本原理の1つとして働いている。また、バクテリアからヒト細胞に至るまで、細胞は自身にとってより良い環境へと移動するために走化性運動を行っていることはよく知られていることである。しかし、走化性を引き起こすシグナル伝達の経路は非常に複雑であり、特に真核生物のシグナル伝達経路の詳細は大部分が未解明である。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壤中に生息する真核微生物で、通常はアメーバ状の単細胞生物として分裂増殖しているが、飢餓状態になると自身が産生する cAMP に対する走化性運動によって集合し、多細胞体を形成する。細胞性粘菌は cAMP を感受すると、それに応答して H⁺ の流出と Ca²⁺ の流入が起こり、これに追従して運動速度が上がることが知られている。走化性運動中の細胞において、細胞前方部ではアクチン重合によるアクチンフィラメントの伸長が仮足を前方に押し出し、後部ではアクチンフィラメントがミオシン II と相互作用することで収縮している。これに対して、アクチンの重合・脱重合には H⁺ や Ca²⁺ が大きく働いていることが知られている。以上のことから、走化性運動における極性形成と細胞運動を協調的に制御するために、膜電位変化が重要な要因として働いていることが考えられる。しかし、実際には膜電位が走化性におけるシグナル伝達や運動制御に直接的に働いているのかは明らかではない。これを明らかにするためには、膜電位の経時変化と走化性シグナル伝達および細胞運動を同時計測する必要がある。

本研究では、膜電位感受性色素を用いた細胞性粘菌の膜電位計測系を確立し、蛍光顕微鏡下で膜電位のタイムラプス計測を一細胞レベルで行うことが可能となった。これまでに、人為的な cAMP 刺激によって膜電位が一過的に脱分極することが計測されるとともに、細胞集合期における cAMP シグナルの周期的な自発振動に応じて、膜電位の脱分極も周期的に起こっていることを可視化することに成功し、cAMP 振動に自発的膜電位変化が関わっていることが明らかになった。また、膜電位と各種シグナルの同時計測を行った結果から、膜電位の変動には Ca²⁺、K⁺、H⁺ などの陽イオンが複合的に関わっていることが示唆された。この自発的膜電位変動が cAMP 走化性シグナル伝達において、どのような働きを担っているかを報告する。

細胞内物質輸送制御における協同性と少数性

【公募班】

岡田康志

理研・生命システム研究センター

細胞内物質輸送は、我々の社会のトラック輸送と同様に、様々な細胞機能を支える兵站として重要な役割を果たしている。例えば、神経細胞においては、突起伸長から記憶・学習にいたるまで多くの過程で輸送が律速段階であることを示唆する結果が得られている。効率的な輸送のためには、必要な物を必要なときに必要とされる場所に運ぶことが重要である。では、細胞の中で物質輸送を担う分子モーターであるキネシンは、どのようにして今背負っている荷物をどこに運べばよいのかを知ることが出来るのだろうか。

私たちは、これまで、細胞内1分子イメージング法の応用による細胞内反応速度計測、超解像ライブイメージング法、溶液中でのタンパク質複合体の動的構造変化の実時間検出法などの新しい計測手法を開発することで、この問題に取り組んできた。その結果、キネシンによって微小管に協同的な構造変化が惹起され、細胞内物質輸送が局所的に高い正の協同性を示すことが判ってきた。また、一連の実験の過程から、細胞内のキネシンのコピー数が数 nM 程度と限られているという少数性が輸送制御に本質的に重要であることが示唆された。そこで、両者を組み合わせた数理モデルを構築し、計算機シミュレーションで検証した結果、協同性と少数性の組合せにより、細胞全体で協調のとれた輸送制御を実現しうることが示された。

さらに、同一の手法を EGF シグナル伝達系に応用することで、細胞質から核へのリン酸化 ERK の輸送においても、正の協同性と少数性による制御の重要性を示唆する結果が得られつつある。これらの結果は、反応拡散系におけるチューリング機構での局所活性化と遠距離不活性化が、細胞内で正の協同性と少数性によって実装できることを示しており、少数性の生物学的意義の一側面を反映するものではないかと考えられる。

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

【公募 A03】

林久美子^{1,2}

¹ 東北大学工学研究科, ² AMED・AMED-PRIME

キネシンやダイニンなどのタンパク質モーターはオルガネラを背負ってレールである微小管上を輸送する。オルガネラ輸送によって ATP（アデノシン三リン酸）や神経伝達物質を始めとする生命活動に重要な物質が細胞内の必要な場所に行き渡る。本研究では、少数性の観点から、1つのオルガネラを輸送するモーターの数に着目した。細胞内で、少数（1個、2個、3個）モーターによる協同輸送が秩序だった速い物質輸送を実現していると予想した。

近年、蛍光顕微鏡観察を用いて細胞内のオルガネラの位置を追跡することは容易になった。高い分解能で観察するとオルガネラは、モーターに輸送され一方向に進みながらも熱ノイズ等の影響でゆらぐ。本研究では、オルガネラ位置のゆらぎ解析から、モーター数を測定する方法を提案した。このゆらぎ解析は、非平衡統計力学のゆらぎの定理に基づくものであるが、オルガネラ輸送時にモーターが出す力の情報を与える。実験では1つのオルガネラに働く力（＝モーターの出す力）は飛び飛びの離散的な値を取り、この離散性が輸送を担うモーター数を反映していると考えた。本公募研究では、具体的に神経細胞エンドソーム輸送やミトコンドリア輸送に応用し、これらの輸送が少数（1個、2個、3個）モーターによる協同輸送であることを発見した（論文準備中）。

神経細胞オルガネラ輸送は神経系の疾患と関連が深い。輸送を担うモーター数の検出は疾患メカニズム解明に必要である。今後、アミロイド前駆タンパク質輸送への応用を皮切りに医療方面に研究を展開し、将来は、物理学発の新しい測定法を医療分野で役立てたい。

※本研究は連携研究者 岡田康志先生（公募 A02・理研生命システム研究センター）との共同研究である。

少数のタンパク質モーターによるゼブラフィッシュ色素顆粒輸送の協同的メカニズムの解明

【A03 公募】

長谷川慎¹, 池田一穂², 岡田康志², 林久美子^{1,3}

¹東北大学工学研究科, ²理化学研究所生命システム研究センター,

³AMED・AMED-PRIME

真核細胞内では細胞小器官(オルガネラ)がキネシンやダイニンといったタンパク質モーターに微小管場を輸送される。林(研究代表者)、岡田(連携研究者)らの A03 公募研究で、新たに開発された細胞小器官の重心位置のゆらぎ解析から神経細胞内のエンドソームが複数のモーターに協同的に輸送されることが分かった。本研究では、同様の手法で、ゼブラフィッシュ色素細胞のメラノソーム(黒色素胞)輸送を調べた。なお、本研究では、LabVIEW を用いて解析の自動化を行ったため、大量のデータを扱うことが可能になった。

ゼブラフィッシュはホルモンによってメラノソームの凝集と拡散を引き起こし、個体表面の明度を変化させる(下図)。ゼブラフィッシュのウロコから色素保有細胞を採取し、培養した。エピネフリン(ホルモン)を添加し、色素保有細胞内のメラノソームの凝集(ダイニンによる輸送)を光学顕微鏡で観察した。メラノソームの重心位置のゆらぎ解析から、1つのメラノソームの輸送を担うダイニンモーターの数を測定した。1、2、3個程度の少数のモーターで協同輸送されていることが分かった。

Ciliobrevin はダイニンを阻害する試薬として知られている[Firestone, *et al.*, *Nature*, **484**, P125-9, 2012]。本研究では、メラノソーム輸送を担うダイニンモーターの数への Ciliobrevin の影響を調べる予定である。これまでに Ciliobrevin の添加で、凝集の速度低下が観察された。今後は、Ciliobrevin を添加した状態の色素保有細胞で、ゆらぎ解析からモーター数を測定したい。

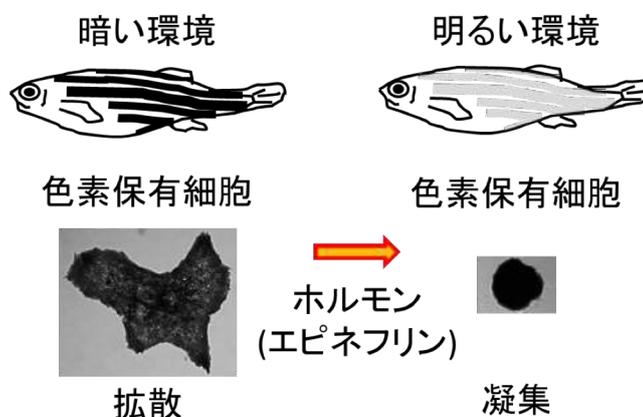


図:メラノソームの凝集と拡散

化学反応系および分子モーター多体系における 少数性効果の理論的研究

公募 A03 班

齊藤稔

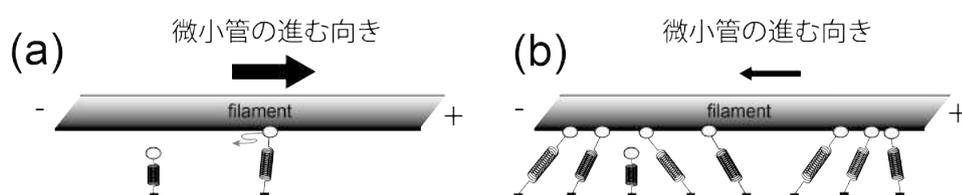
東京大学 総合文化研究科

細胞内での様々な現象において、しばしば反応に寄与する分子の数が非常に少数になるといった状況が起こりうる。近年、こういった状況において、無数に分子が存在する状況と比べて劇的に異なる現象が起こることが示され[1]注目を集めている。このような“少数性現象”は、分子の密度ではなく数に依存して様々な振る舞いが現れる。理論的側面だけではなく、近年の一分子観測技術に伴い、こういった現象が生体内でどのような機能を持ちうるのかが注目され始めている。

本発表では、化学反応系における少数性効果、および微小管-キネシン多体系における少数性効果についての研究成果について報告する。

化学反応系においては、少数性効果を数理的に特徴づける手法[2]を紹介し、どのような構造が少数性効果に必要なのか議論する。また、このモチーフの組み合わせにより、化学反応フローが逆流するような特異な少数性効果なども起こりうる[3]ことを議論する。

また、微小管-キネシン多体系においても近年同様の現象が報告されている。キネシンは微小管と結合し、一方向(プラス端あるいは、マイナス端方向)のみに進む方向性を持った分子モーターとして知られている。しかし近年、Kinesin5-Cin8 という酵母の持つ分子モーターは微小管に結合しているキネシン分子の数に依存して、進む方向性をスイッチさせることが実験的に明らかになった[4]。しかし、どのような機構でこのようなスイッチが生じているのか、全くわかっていなかった。本研究では、数理モデルを用いこれらの現象を説明する(図を参照)。また、このキネシンの持つ双方向性が果たす生体機能についても議論する。



モデルの振る舞いの模式図。少数個のキネシンが微小管に結合している場合は微小管はプラス端方向に進む(a)が、多数個の時はマイナス端方向に進む(b)。キネシンの濃度ではなく、個数依存的に進む方向性が変わるといふ少数性を示す。

[1]Togashi, Kaneko *PRL* **86** 2459 (2000);
[3]Saito, Kaneko *PRE* **91** 022707 (2015);

[2]Saito, Sughiyama, Kaneko arXiv 1512.02937
[4] Roostalu, et al. *Science* 332.6025 (2011): 94-99.

微小液滴空間に閉じ込められたアクトミオシンが 見せるアクティブな変形とゆらぎ

【公募 A03】

西上幸範、伊藤弘明、園部誠司^A、市川正敏
京大院理,^A 兵庫県立大理

筋肉を収縮させる分子モーターであるアクチンとミオシンは、単一細胞レベルでも多くの動的現象で重要な役割を担うタンパク質である。アクトミオシンとも呼ばれるその2種のタンパク質は、細胞分裂や細胞運動、胚発生など、細胞の変形や運動において能動的な力生成を行っている。細胞運動の中でも特にブレッピング運動は、細胞表面直下のアクトミオシンのネットワーク構造、アクトミオシンコーテックスの収縮によって駆動されているとされている[1]。コーテックスがどのように収縮するのか、それらがどのような境界条件の時にブレッピング運動が生まれるのか、その様な物性的、物理化学的な性質を調べるとき、少数の要素のみからモデルを再構成する実験系が力を発揮する。これら再構成モデルを用いた研究は、アクトミオシンから発生する能動的な収縮力が、細胞運動と似た運動を生み出せる事を示している[2,3]。

本研究では、アクトミオシンが自発的に創り出す構造が生むアクティブなゆらぎや、収縮性のアクトミオシンコーテックスが見せる液滴変形を報告する。我々は *Amoeba proteus* から抽出したアクトミオシン溶液が激しく運動する事を報告している[4]。今回、このアクトミオシン溶液を脂質一分子膜で覆われた油中水滴の中に閉じ込めた。アクトミオシンと膜が静電結合する条件におく事で、アクトミオシンの運動が膜界面の運動や変形として顕れる事を期待した。その結果、時間と共に激しく界面がゆらぐ現象と、界面に出来たしわが時間と共に成長していく現象の、2つの興味深い挙動が得られた。これらの性質を、ゆらぎのパワースペクトル解析や変形挙動の数値モデルを通じて明らかにした[5,6]。

- [1] G. T. Charras, C. Hu, M. Coughlin, and T. J. Mitchison, *J. Cell Biol.* 175, 477-490 (2006).
- [2] S. K. Vogel, Z. Petrusek, F. Heinemann, and P. Schwille, *eLife*, 2, e00116 (2013).
- [3] K. Carvalho, F.-C. Tsai, E. Lees, R. Voituriez, G. H. Koenderink, and C. Sykes, *PNAS*, 110, 19969 (2013).
- [4] Y. Nishigami, M. Ichikawa, T. Kazama, R. Kobayashi, T. Shimmen, K. Yoshikawa, and S. Sonobe, *PLoS One*, 8, e70317 (2013).
- [5] Hiroaki Ito, Yukinori Nishigami, Seiji Sonobe, Masatoshi Ichikawa, *Phys. Rev. E* 92, 062711 (2015).
- [6] Yukinori Nishigami, Hiroaki Ito, Seiji Sonobe, Masatoshi Ichikawa, *Scientific Reports* 6, 18964 (2016)

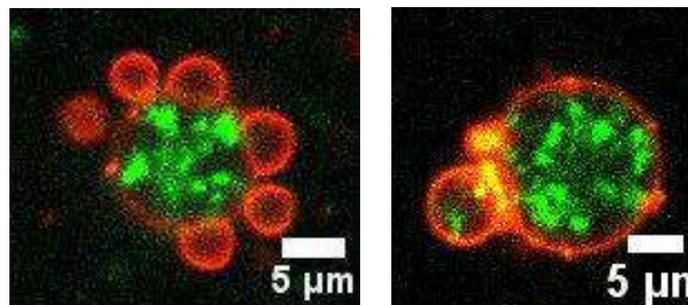
Partitioning of genome-size DNA in the dividing model cell membrane

【公募 A03 班】

Hiroaki SUZUKI

細胞内におけるゲノムの「数」は、真核細胞であれば有糸分裂において様々なモータータンパク質等の協同的作業により制御されている。大腸菌などの原核細胞では、高度な制御機構がないものの、成長・分裂過程において1細胞あたり1ゲノムDNAがうまく入るようになっている。Jun と Mulder は、大腸菌の細胞膜・壁内の非常に小さな領域に押し込められたゲノム DNA のモンテカルロシミュレーションを行い、DNA がエントロピー的に自己排除する効果でDNA の分配が遂行されるという説を提唱した[1]。また、Errington の研究グループは、細胞壁や分裂に必要とされるタンパク質を持たないバクテリア（枯草菌）でも、増加した膜がちぎれるように分裂し、増殖することが可能なことを示した[2]。これらの報告は、原始的な細胞またはモデル細胞が成長して分裂する際に、特別な機構を持たずとも倍加した DNA が均等に分配され得ることを示唆している。

本研究では、モデル細胞膜としてジャイアントユニラメラリポソーム(GUV)を用い、それが細胞分裂様に変形する際に、中に封入したゲノムサイズの DNA がどのように分配されるかを検証した。具体的には、長さが約 1.6×10^5 塩基対、回転半径が約 $1 \mu\text{m}$ である T4 ファージ由来の gDNA を直径 $5 \sim 20 \mu\text{m}$ 程度の GUV に封入し、浸透圧ショックを加えることで分裂様の変形を誘起した。また、細胞内の混雑環境を模擬するため、分子量 20k Da のポリエチレングリコール(PEG)を 0~8wt% の濃度で共封入し、その影響を調べた。その結果、DNA が変形した娘細胞膜に比較的均一に分配されるには、膜変形の手がかりが影響すること、また、GUV 内が混雑環境にある場合、速い膜変形においても DNA の分配が実現されることが明らかになった。



(左) GUV が高浸透圧ショックにより素早く変形する際には、内封 gDNA 娘ベシクルに取り込まれない。(右) PEG が共封入されている場合には、gDNA の娘ベシクルへの分配が促進される。

[1] S. Jun & B. Mulder, *PNAS*, 103, 12388-393, 2006.

[2] R. Mercier et al., *Cell*, 152, 997-1007, 2013.

Fluctuations and responses in chemotaxis signaling systems

【公募 A03 班】

柴田達夫

理化学研究所 生命システム研究センター フィジカルバイオロジー研究チーム

大腸菌や真核細胞の走化性シグナル伝達系は、外部の誘引物質のきわめてゆるやかな勾配を検出し、適切に応答することが出来る。大腸菌が検出できる誘引物質のリガンド数の時間変化は極めて少数であり、また、真核細胞の走化性のモデル生物である細胞性粘菌では、その細胞の前後の長さに対して数パーセントの濃度差があれば十分に走化性を示すことが出来る。もっとも走化性効率の良い濃度において(25nM)、細胞膜上に結合しているリガンドの前後の数の差は平均 100 程度、効率が半分程度になる濃度(0.1nM)においては前後の数の差は平均 10 以下になる。さらにノイズの大きさを見積もると、それぞれの平均値と同程度か、それ以上になる(Ueda & Shibata, *Biophys. J.* 2007)。細胞は、微弱でノイズに満ちたシグナルからどのように適切に情報を取り出して、適切な応答を導き出しているのかは、生物学にとってとりくむべき大きな課題である。

走化性シグナル伝達系では、細胞外の刺激に応答した後に活性のレベルが元に戻る応答・適応反応が重要な役割を果たしていることが知られている。一般に、シグナル伝達系で応答・適応回路を作るにはフィードバックループ(FBL), もしくはフィードフォワードループ(FFL)が必要である。私たちの結果から、両者に共通して「ゆらぎの大きさ」は「応答の大きさ」に比べて必ず大きいことが明らかになった (Shankar, Nishikawa & Shibata, *PLoS One* 2015)。さらに、細胞性粘菌の走化性シグナル伝達系では、走化性誘引物質の勾配のない状態においても、シグナル伝達系の応答が時空間的にランダムに自発的に起こっており、勾配下においては同じ自発応答の方向と頻度をバイアスすることで走化性応答を生みだしていることを明らかにした (biased-excitability) (Nishikawa et al, *Biophys. J.* 2014)。