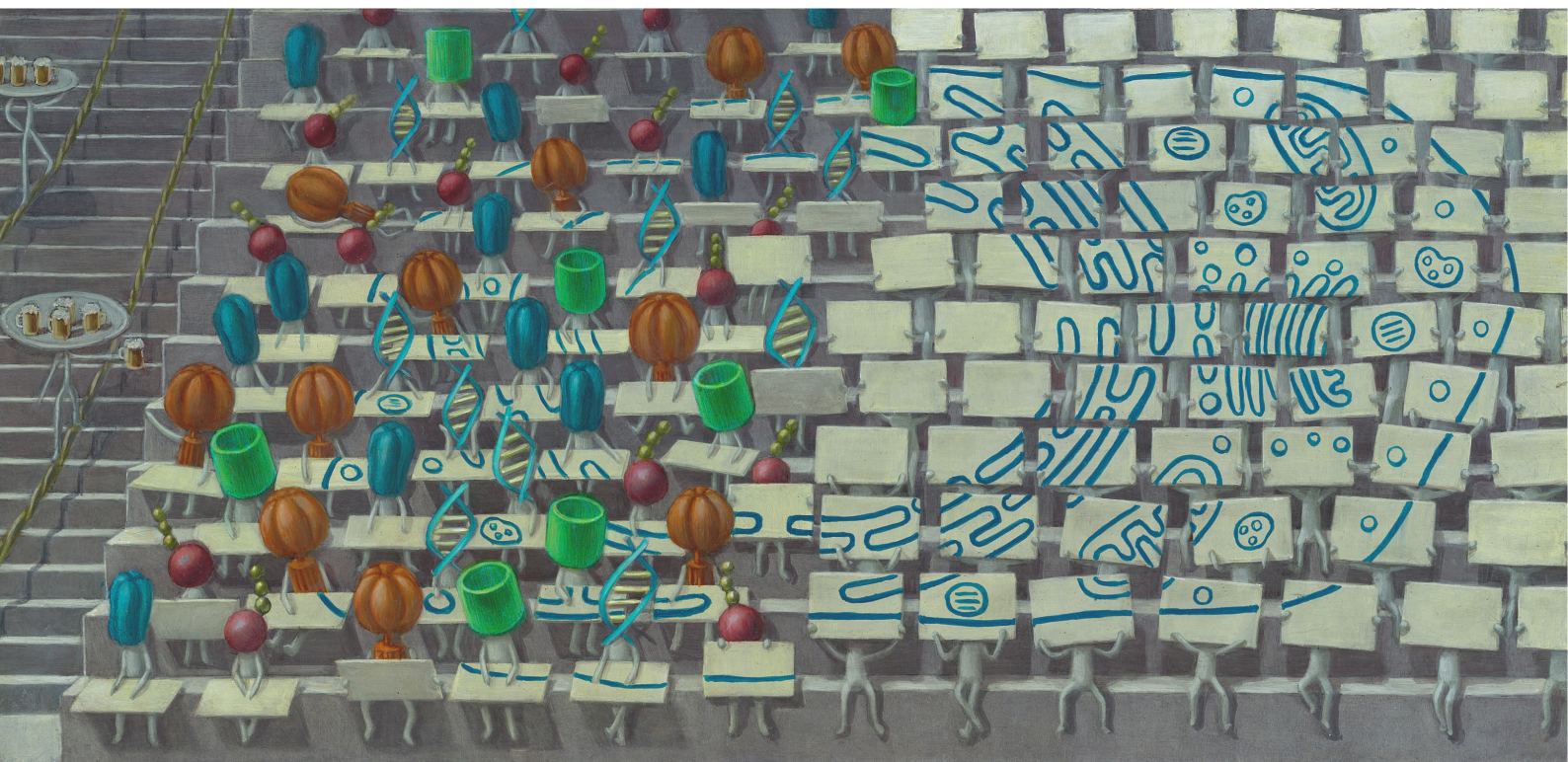


Spying Minority in Biological Phenomena

少数性生物学

— 個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求 —



NEWS LETTER No. 1

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

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



「生命システムの動作原理に迫るプロジェクトがついに始動！」	3
領域代表 永井 健治	
「少数の陰で蠢く膨大な自由度」	4
領域アドバイザー 柳田 敏雄 (理化学研究所・生命システム研究センター)	
■ 研究組織 ■	
組織表	8
総括班	9
A01 班	10
A02 班	12
A03 班	15
■ 研究内容 ■	
A01 班	18
A02 班	22
A03 班	28

生命システムの動作原理に迫るプロジェクトがついに始動！

領域代表 永井 健治（北海道大学・電子科学研究所）

生命現象を分子論的に理解するためには、分子の集合体（アンサンブル）の振る舞いではなく、現象の素過程である個々の分子の振る舞いを捉える事が重要です。このような考えに基づいて、1分子観察技術が近年大いに発達し、様々な生体分子の振舞いが観察されてきました。ところが、確かに素過程を検出・解析できるようになったものの、実験毎のデータが大きくばらつくため、結局のところ多くの1分子観察データをかき集めて平均値や分散値、あるいは自己相関を求め、それらアンサンブル統計量によって議論を展開しているのが現状です。さらには、1分子の素過程を論じるのにボルツマン定数や濃度や自由エネルギーなど多数分子の挙動を扱うパラメータを用いるのみならず、非平衡な細胞内化学反応に局所平衡を仮定して、 K_d や K_m 、 IC_{50} などの平衡を扱うパラメータを適用してしまっているのも散見されます。これでは生命システムの正しい描像に迫ることができません。



もちろんこのことを認識している研究者は、1分子観察データのみならず構造生物学的、分子生物学的、生化学的な知見を取り込んで、各々の方法論で得られた知見の不足分を補完する形で生命システムの動作を記述し、その原理を理解しようとしてきました。しかし、それらは依然として、分子の2状態変化（例えばタンパク質リン酸化）による on/off スイッチや、連続的な量（濃度）の変化（例えば遺伝子発現量の変化）によるシステムの変化、或いはそれらの組み合わせによる理解に留まっていると言っても過言ではありません。

これまでの生命科学におけるもう一つの問題点は、生物には遺伝子（通常2コピー/細胞）をその代表として、細胞当たり少数個の分子しかない成分が多種含まれることの重要性があまりにも認識されていないことです。あらゆる生体分子の反応が“濃度”を前提にして議論されています。そもそも濃度はアボガドロ数 (10^{23}) 程度の個数が存在した時に適用できる連続“量”であって、fL（シナプス）～pL（核）オーダーの体積しか持たない機能コンパートメント内の数個～数千個しかない分子を扱う場合は不連続な離散“数”になるため、濃度の適用は不適切です。しかしながら、本来適用できない概念を無意識的に利用してしまい、その結果、少数の分子成分からなるシステムの頑健的動作原理の理解に迫れないまま現在に至っています。では、なぜこのようなことが起きるのか？それはひとえに生体分子の反応を扱う理論体系・実験系がなかったからに他なりません。

そこで、本研究領域では「少数の分子が織りなす化学反応システムとして生命現象を捉えなおす」ことを目指し、技術開発系と実験系、理論系の専門家が手を組み、従来とは異なる視点で生命現象にアプローチします。とくに、少数の生体分子からなる化学反応システムにおける分子の“個性”や、個性ある分子がどのようにして“協同性”を発揮していくのかに重点をおいて研究を進めていきます。

本ニュースレターの表紙絵はそのような本領域の研究テーマを漫画化したもので、サイエンス・イラストレーターの菊谷詩子さんに作成してもらいました。絵の左半分はいくつかの種類の生体分子が個性豊かに振る舞っている模様を表し、右半分はそれらが協同して

細胞の形を構築したり機能を発揮したりしている様子を示しています。本領域はこのような「新しい視点、切り口」から従来の生命現象を見つめ直すことで、新しいパラダイムの創出に結びつく研究を展開しようと目論んでいます。このような研究を展開するには研究者の個性と個性がぶつかり合う激しい議論が欠かせません。その実現のため、血気盛んな若手研究者による7つのグループを形成すると共に、班友(連携研究者)や技術開発支援メーカーにも積極的に参画してもらいました。発足時点で既に50人を超える集団を形成しています。この個性豊かな研究者の集団が協同性を示した時、とてつもなく大きな何かが生まれるはずで。これからの5年間で、何が飛び出すかご期待下さい。



少数の陰で蠢く膨大な自由度

柳田 敏雄 (理化学研究所・生命システム研究センター)



少数性。。というタイトルをポスターなどで見つけたとき、なかなかセンスの良いのがあるなあに興味をそそられ、どんな連中がやっているのかなと見ると、永井らか。。。なるほど。私は、生命体はやたら複雑で自由度が膨大のように見えるが、どのように制御されているか疑問に思っていた。そこで、まず、ロボットや情報ネットワークなど制御を専門としている人たちに聞いてみた。答えは、制御できるパラメータは指で数える事ができる程度でしょうと。それ以上増えると組み合わせの数が爆発して制御不能になるか、膨大なパワー

をもつコンピュータで無理矢理制御することになると。

生命体は、細胞一つをとってみても、膨大な数の自由度があり、組合せ爆発が起こっているように見える。スパコンでその組合せを真っ正直に全ての可能性について計算すれば、スパコンを働かせるためのエネルギーは、原発が何億台あっても足りないという計算になる。しかし、細胞が使うエネルギーは1兆分の数ワット程度である。この桁違いの差は何であろうか？各自由度を厳密に制御しないで、キーとなる少数自由に落とし込み、それらを制御しているのではないだろうか？分子モーターの運動、粘菌細胞の極性の決定過程、そしてヒト脳の視覚認知の過程の研究は、少数に落とし込まれた自由度を熱的または自発的ゆらぎで状況に合う自由度を探索して状態を決定していることを示唆していた。

昨年末、ATRの川人さんらのグループも、図形を見せなくてもいくつかの特徴図形それぞれにリンクしたヒト脳活動パターン（少数自由度）が脳内で自発的にゆらいでおり、このゆらぎにバイアスを加えるとある特定の図形認知が強化される事を示した（Science 2011）。これも少数自由度への落とし込みが起こっている事を明確に示している。四方さんや金子さんのグループの研究もこのような事だと解釈できる。落とし込まれた少数自由度が細胞や組織の活動を決定づけていることは間違いないと思う。この少数自由度は反応ネットワークのアトラクターのような形で現れるかもしれないし、分子そのものかもしれない。生命体を動システムとして研究することなど複雑過ぎてできる訳が無いと諦めかけていたが、これならできそうな気がしてくる。計測で何かを捉えたり、モデル化やシミュレーションもしてみようかという気も起こる。こうして、細胞や組織の状態を少数のパラメータで記述し、将来を予測できる日がくるかもしれない。しかし、これだけでは不十分である。陰に潜む膨大な自由度からどのように少数自由度に落とし込まれたかを明らかにしなければならない。生命体が環境や条件が突然変化したり、想定外の変化が起こったりした時に如何に陰に潜む膨大な自由度から新たな少数自由度を見出し、それらに柔軟に対応するかという問題でもある。

これらは、生命科学の根源に関わる問題であり、本領域がこの問題に課題を設定し果敢に挑戦されるのはとても喜ばしい事である。そして、本領域研究が生命科学で“少数”の役割を果たしてくれる、すなわち普通からかけ離れて“ぶっ飛んだ”研究を展開してくれる事を切に希望する。

研究組織

組織表

総括班			
総括班	少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—	永井 健治	北海道大学・電子科学研究所
A01 班 少数性の生物学研究に必要な技術開発と整備			
A01-1 班	細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発—少数生体分子の計数化技術—	野地 博行	東京大学・工学系研究科
A01-2 班	分子プローブと光撮動ツールの開発—少数生体分子の可視化・操作技術—	永井 健治	北海道大学・電子科学研究所
A02 班 少数性の生物学			
A02-1 班	細胞内情報伝達の少数性生物学—生命システムにおけるポアソン性の解析—	石島 秋彦	東北大学・多元物質科学研究所
A02-2 班	遺伝子発現の少数性生物学—少数分子による情報探索原理の解明—	前島 一博	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター
A02-3 班	生体リズムの少数性生物学—生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性—	上田 泰己	理化学研究所・生命システム研究センター
A03 班 少数性の生物学の理論構築と in vitro 再構成による検証			
A03-1 班	少数分子反応ネットワーク理論の構築—少数性と階層性の観点からのモデリング—	富樫 祐一	神戸大学・システム情報学研究科
A03-2 班	少数分子生体システムの再構成—複合体構成分子の数の制御と理論検証—	今田 勝巳	大阪大学・理学研究科
技術支援班			

総括班

少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—

研究の目的			
<p>本領域研究では、顕微光学、MEMS 工学、蛍光物理化学、合成有機化学、タンパク質工学、細胞生物学、システム生物学、数理科学、など、多岐にわたる若手専門家を結集した学際研究を推進します。このような取り組みにおいては、明快な研究目標を掲げるとともに、各研究グループ間における緊密な連携が欠かせません。したがって、総括班の役割は、まず各研究リーダー同士の交流を積極的に促進させるための班会議運営を核とします。また、少数性生物学に関する学際研究に関する動向を調査する上でも、国内外からの招待講演者を交えた企画シンポジウムを行ないません。さらに、各研究班が有する研究ノウハウを班員間で共有するための技術支援を行うだけでなく、国内外の研究者への普及を目指し、班員の指導による技術講習会を開催します。</p>			
	氏名	機関	役割分担
研究代表者	永井 健治	北海道大学・電子科学研究所	領域総括
連携研究者	石島 秋彦	東北大学・多元物質科学研究所	領域推進方針の策定
	今田 勝巳	大阪大学・理学研究科	領域推進方針の策定
	前島 一博	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター	企画担当（国際会議）
	野地 博行	東京大学・工学系研究科	広報担当（ホームページ）
	上田 泰己	理化学研究所・生命システム研究センター	広報担当（渉外、広報誌発行）
	富樫 祐一	神戸大学・システム情報学研究科	研究支援担当
	新井 由之	北海道大学・電子科学研究所	事務担当（総務）
	松田 知己	北海道大学・電子科学研究所	事務担当（会計）
	吉村 成弘	京都大学・生命科学研究科	企画担当の補助
	堀川一樹	国立遺伝学研究所・新分野創造センター	企画担当（国内学会）
	渡邊 朋信	理化学研究所・生命システム研究センター	研究支援担当
	藤田 克昌	大阪大学・工学研究科	研究支援担当
	原田 慶恵	京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点	研究支援担当
	金原 数	東北大学・多元物質科学研究所	研究支援担当
	山東 信介	九州大学・稲盛フロンティア研究センター	研究支援担当
	竹内 昌治	東京大学・生産技術研究所	研究支援担当
	小松崎 民樹	北海道大学・電子科学研究所	研究支援担当
	アドバイザー	柳田 敏雄	理化学研究所・生命システム研究センター
神原 秀記		株式会社日立製作所	評価委員
河田 聡		大阪大学・工学研究科	評価委員
金子 邦彦		東京大学・複雑系生命システム研究センター	評価委員

本研究領域が目指す「数」の観点でタンパク質の反応を論じるには、先ずどの細胞がどのタンパク質を何個有しているのかに関する情報を取得しなければなりません。このために内在性の任意のタンパク質を計数できる1細胞デジタルELISA法を開発し、これを利用して網羅的に細胞内タンパク質数を決定し、プロテオームマップ上にその個数情報を追加します(野地)。また、蛍光標識した外来性のタンパク質を生きた細胞内の局所領域(数10nmの空間スケール)でビデオレート計数観察できる高速超解像蛍光顕微鏡(渡邊)を開発すると共に、NVCナノダイヤモンド標識した外来性タンパク質をビデオレート以上の時間分解能で長時間計測できる電子スピン共鳴顕微鏡(朽尾)、タンパク質の構造変化をビデオレートで捉える事ができる高速AFM(内橋)も整備し、タンパク質の数をその他のパラメータと同時解析できるようにします。さらに、タンパク質リン酸化や細胞内イオンなどの計数観察を可能とする蛍光タンパク質、蛍光化合物、蛍光アプタマーなどの分子ツールの開発も行います(永井、金原、堀川)。

A01-1 班

細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発
—少数生体分子の計数化技術—

氏名：野地 博行

機関：東京大学・工学系研究科

専門分野：マイクロデバイス

役割分担：無標識生体分子計数デバイスの開発

HP：<http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>

研究の目的

「少数性生物学」を確立するために、細胞内にごく少数しか存在しないタンパク質の数を1細胞ごとに計測し、さらにそのダイナミクスを明らかにするための新しい技術開発を行います。具体的には(1)1分子デジタルELISA法を利用した1細胞タンパク質計数法、(2)超解像顕微鏡と改変型蛍光タンパク質に基づいた1細胞タンパク質計数法、に集中的に取り組みます。(1)は無標識でタンパク質数を決定することができ、(2)は標識が必要であるが非破壊的にリアルタイム計測ができます。このように、2つの手法は相補的であり、これによって、本領域における様々な技術的課題に柔軟に対応することが可能となります。

研究分担者

氏名：渡邊 朋信

機関：理化学研究所・

生命システム研究センター

専門分野：生物物理工学

役割分担：高速超解像蛍光顕微鏡の開発

HP：<http://www.qbic.riken.jp/japanese/>

研究分担者

氏名：市村 垂生

機関：理化学研究所・

生命システム研究センター

専門分野：非線形光学

役割分担：非線形光学原理の基盤研究

HP：<http://www.qbic.riken.jp/japanese/>

連携研究者

氏名：藤田 克昌

機関：大阪大学・工学研究科

専門分野：非線形光学

役割分担：光学系構築に関するノウハウの提供

HP：http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home_j.html

A01-2 班

分子プローブと光摂動ツールの開発 —少数生体分子の可視化・操作技術—

氏名：永井 健治

機関：北海道大学・電子科学研究所

専門分野：分子生物工学

役割分担：機能性タンパク質のデザインと開発

HP： <http://nano.es.hokudai.ac.jp/>



研究の目的

少数個の要素が支配的な働きをする少数ネットワークシステムを理解するためには、従来行われてきた薬剤などの過剰刺激、遺伝子やタンパク質の過剰発現/発現抑制という“極限状況下”における表現系の解析ではなく、“生理的環境と同等の状況”で、生理的変動程度の摂動を与え、高い時空間分解能で起きている現象を解析することが肝要です。そこで本研究では、少数分子間、少数細胞間における協同性の誘発機構にアプローチ可能にすることを目標に、“自発的”に生じる現象を分子レベルで超解像計数化・操作する技術を創出します。また、具体的な対象の1つとして、極微弱なシグナルによって誘発される細胞の走化性や走光性の頑健性に着目し、研究を展開します。

研究分担者

氏名：金原 数

機関：東北大学・多元物質科学研究所

専門分野：合成有機化学

役割分担：機能性有機化合物の合成

HP： <http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/kinbara/index-j.html>



研究分担者

氏名：堀川 一樹

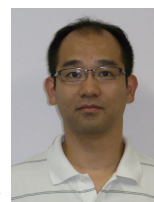
機関：国立遺伝学研究所・

新分野創造センター

専門分野：発生生物学

役割分担：機能性分子導入細胞の作成
／解析

HP： <http://www.nig.ac.jp/section/horikawa/horikawa-j.html>



連携研究者

氏名：山東 信介

機関：九州大学・

稲盛フロンティア研究センター

専門分野：化学生物学

役割分担：機能性化合物作成に関する

助言 HP： http://www.inamori-frontier.kyushu-u.ac.jp/soft_material/



連携研究者

氏名：浦野 泰照

機関：東京大学・医学系研究科

専門分野：合成有機化学

役割分担：機能性有機化合物作成に関する助言

HP： <http://cbmi.m.u-tokyo.ac.jp/>



連携研究者

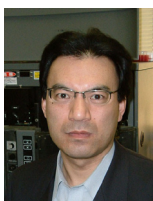
氏名：小澤 岳昌

機関：東京大学・理学系研究科

専門分野：分析化学

役割分担：生体分子操作・分析に関する助言

HP： <http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/analyt/index.html>



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

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

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

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

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

A02-1 班

細細胞内情報伝達の少数性生物学 —生命システムにおけるポアソン性の解析—

氏名：石島 秋彦

機関：東北大学・多元物質科学研究所

専門分野：生物物理学

役割分担：実験デザイン、試料調整

HP：<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/ishijima/Index-J-tate.html>



研究の目的

細胞内における生体分子の相互作用・生化学反応は、試験管レベルにおけるモル数レベルの自由度を有する反応とは違い、少数分子が高密度に存在する反応です。その動作原理を理解するためには、細胞内の少数分子の挙動を直接観察し、これに立脚した理論の構築が必要です。従来にもいくつかの計測手法が計画され、実行されてきましたが、いずれも単一のパラメータのみの計測であり、細胞内生体分子反応の全体像をつかむまでには至っていません。本計画では、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、ラマン分光法）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す。

研究分担者

氏名：朽尾 豪人
機関：京都大学・工学研究科
専門分野：構造生物学、磁気共鳴分光
役割分担：細胞内蛋白質の構造解析



HP : http://www.moleng.kyoto-u.ac.jp/~moleng_01/

連携研究者

氏名：原田 慶恵
機関：京都大学・
物質 - 細胞統合システム拠点
専門分野：1 分子生物学
役割分担：光学設計に対する助言



HP : <http://www.harada.icems.kyoto-u.ac.jp/index.html>

A02-2 班

遺伝子発現の少数性生物学

—少数分子による情報探索原理の解明—

氏名：前島 一博
機関：国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター
専門分野：生物物理学
役割分担：染色体構造ゆらぎイメージング

HP : <http://www.nig.ac.jp/labs/MacroMol/index.html>



研究の目的

全長 2 m のゲノム DNA には同じ遺伝子が基本的に「2 個」しか存在しません。また、遺伝子の発現を司る転写因子群も一般的に少数であるとされています。本計画研究では遺伝子発現制御のうち、「細胞核という微小空間の中でゲノム情報がいかに検索されるのか？」に焦点をあわせ、少数分子による情報検索原理を「ゲノムの足場の動き」と、ターゲットを探す「転写因子の動き」の両面から明らかにすることを目的としています。従来、ゲノムはヌクレオソーム構造が規則正しく、階層構造を作り、細胞核内で折り畳まれていると考えられていましたが、代表者らはこのヌクレオソーム構造が不規則な形で折り畳まれていることを見出しました。このことはゲノムの足場が動く可能性を示唆しています（構造ゆらぎ）。本計画研究では、生細胞内の個々のヌクレオソーム（ゲノムの足場）と転写因子の動きを 1 分子レベルで直接イメージングする技術を開発し検証します。さらに、計算機シミュレーションを組み合わせて、核内の動的な環境をモデル化し、既存データを加えて、今までほとんど研究が成されてこなかったゲノムの情報検索の原理を解明します。

研究分担者

氏名：谷口 雄一
機関：理化学研究所・
生命システム研究センター
専門分野：生物物理学
役割分担：核内 1 分子イメージング
HP : <http://www.qbic.riken.jp/japanese/>



連携研究者

氏名：高橋 恒一
機関：理化学研究所・
生命システム研究センター
専門分野：計算機科学
役割分担：シミュレーション技術の提供
HP : <http://www.qbic.riken.jp/japanese/>



連携研究者

氏名：吉村 成弘
機関：京都大学・生命科学研究所
専門分野：分子生物学
役割分担：核内物質輸送制御の技術提供
HP : <http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/chrom/>



A02-3 班

生体リズムの少数性生物学

－生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性－

氏名：上田 泰己

機関：理化学研究所・生命システム研究センター

専門分野：システム生物学

役割分担：実験デザイン

HP : <http://www.cdb.riken.jp/lsb/jpn/index.html>



研究の目的

生命における計時機構である概日時計により生み出されるリズム（概日リズム）の周期は、構成分子の少数性に比して正確です。また外部環境の温度変化に対して頑健である一方で、外部環境の照度変化や急激な温度変化に対しては柔軟に適応します。概日時計の構成分子（遺伝子、タンパク質）についての多くの分子生物学および細胞生物学的知見の蓄積にもかかわらず、概日時計の正確性・頑健性・適応性をもたらす分子・ネットワーク機構については完全には理解されていません。本提案ではこれまでのシステム科学的研究を踏まえて、未解明である哺乳類概日時計の正確性・頑健性・適応性をもたらす分子機構・ネットワーク機構について、ネットワーク構成要素の少数性に着目し、1) ターンオーバー制御による周期の正確性、2) 時計タンパク質間相互作用および酵素反応特性による周期の頑健性・適応性の2つの問題に対するアプローチを通じて解明することを目指します。

研究分担者

氏名：鵜飼 英樹

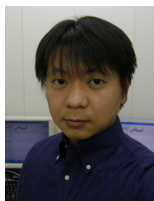
機関：理化学研究所・

生命システム研究センター

専門分野：分子細胞生物学

役割分担：in cellulo 実験

HP : <http://www.cdb.riken.jp/lsb/jpn/index.html>



研究分担者

氏名：中嶋 正人

機関：理化学研究所・

生命システム研究センター

専門分野：生化学

役割分担：in vitro 実験

HP : <http://www.cdb.riken.jp/lsb/jpn/index.html>



A03 班

少数性の生物学の理論構築と *in vitro* 再構成による検証

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

A03-1 班

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

氏名：富樫 祐一
機関：神戸大学・システム情報学研究科
専門分野：理論生物物理学
役割分担：少数分子反応系の理論構築
HP : <http://www.togashi.tv/lab/>

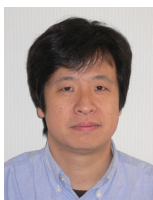


研究の目的

細胞では、分子数が1個から数万個と多種多様な成分が階層的に関与しあっています。分子が数～数十個程度になると「数」の離散性が顕著となり、フィードバック回路等の動作不安定が誘発されます。一方、こうした少数分子の離散性が、システムの可塑性・適応性をもたらす重要な役割を果たす可能性も示されています。本研究では、少数分子性・階層性に着目し、1分子計測データなどから、背後に存在する階層をつなぐ高次反応ネットワークおよび分子の少数性・離散性を抽出・評価しつつ、生命システムの特質である高い動作安定性（頑健性）と適度な動作不安定性（可塑性・適応性）の両立のメカニズムを定量的に予測・検証することが可能な、新しい理論と汎用な解析基盤技術を開発します。

研究分担者

氏名：小松崎 民樹
機関：北海道大学・電子科学研究所
専門分野：非線形数理科学
役割分担：生命の階層性解析基盤の開発
HP : <http://mlns.es.hokudai.ac.jp/>



連携研究者

氏名：李 振風
機関：北海道大学・電子科学研究所
専門分野：非平衡統計物理
役割分担：非平衡統計力学に関する助言
HP : <http://mlns.es.hokudai.ac.jp/>



連携研究者

氏名：寺本 央
機関：北海道大学・電子科学研究所
専門分野：数理理論化学
役割分担：階層間の非断熱性理論開発への助言
HP : <http://mlns.es.hokudai.c.jp/>



A03-2 班

少数分子生体システムの再構成 — 複合体構成分子の数の制御と理論検証 —

氏名：今田 勝巳
機関：大阪大学・理学研究科
専門分野：構造生物学
役割分担：研究の総括，分子デザイン／再構
HP : <http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/okuyama/>



研究の目的

多機能性を持つ分子で構成され、各々が少数の分子のターンオーバーによって機能する細菌のべん毛タンパク質輸送システムを再構築します。システム構成要素の構造、数、種類、エネルギー源に様々な操作を加えてシステムが構造変化する様子を観測することで、タンパク質複合体の構成サブユニットが離合集散（ターンオーバー）を繰り返しながら、頑健に機能する機構や輸送システムの作動機構、基質タンパク質の個数をモニターしながら発現系にフィードバックする機構の解明を目指します。

研究分担者

氏名：南野 徹
機関：大阪大学・生命機能研究科
専門分野：遺伝学
役割分担：タンパク質変異体作成／
機能解析
HP : <http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/namba/index.html>



研究分担者

氏名：内橋 貴之
機関：金沢大学・自然科学研究科
専門分野：工学
役割分担：タンパク質複合体の計測
／解析
HP : <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>



連携研究者

氏名：竹内 昌治
機関：東京大学・生産技術研究所
専門分野：マイクロ／ナノデバイス
役割分担：人工膜システム／MEMS
技術の提供
HP : <http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp/>



研究内容

研究代表者：野地 博行（東京大学・工学系研究科）

研究分担者：渡邊 朋信（理化学研究所・生命システム研究センター）

市村 垂生（理化学研究所・生命システム研究センター）

連携研究者：藤田 克昌（大阪大学・工学研究科）

① 概要

計画班 A01-1 では、小数性生物学の発展に不可欠な「細胞内分子の数と動態を定量計測する」ための基盤的技術を開発する。すなわち、破壊法ではあるが汎用性・応用性が広く非標識である「1 細胞単位の 1 分子デジタル ELISA」法と、分子標識が必要ではあるが非侵襲でかつ分子動態を明らかにすることができる「超解像蛍光イメージング」法との 2 項目に取り組む。この 2 項目は互いに相補的な関係にあるため、他の計画班グループと多角的に研究連携することができる。

② 1 細胞単位の 1 分子デジタル ELISA

基本原理は、我々が開発した生体分子 1 分子デジタル計数法 (*Nat. Biotechnol.* 2005) に基づく。超微小チャンバー中に酵素アッセイ溶液を封入すると、極少数の分子にからの信号（ここではに蛍光）が局所化するため感度が桁違いに向上する。これによって、酵素 1 分子の活性検出が可能となる。さらに、我々はマイクロドロプレット 100 万個以上を簡便かつ安定に作成する新システムを開発した (*Lab on a chip.* 2010)。本研究では、この新システムに基づく実用的かつ超高感度なデジタル ELISA 法を確立する。基本実験プロトコルは以下の通り。まず、表面を 1 次抗体で修飾したマイクロビーズで抗原を捕捉し、次に酵素で標識された 2 次抗体を結合させる。次に、マイクロビーズを超微小溶液チャンバーに個々に捕捉する。抗原を結合している場合には酵素反応に由来する蛍光信号が得られるため、蛍光を発しているチャンバー数を数え上げることで試料中の抗原分子数を求める。次に、これを 1 細胞計測に用いる。ここでは、細胞溶液を限界希釈して 1 細胞だけ含む溶液を処理した後 1 分子デジタル ELISA デバイスに導入する方法や、細胞トラップマイクロシステムと 1 分子 ELISA 法を組み合わせた手法を試みる。最終的には、細胞内に数十個から

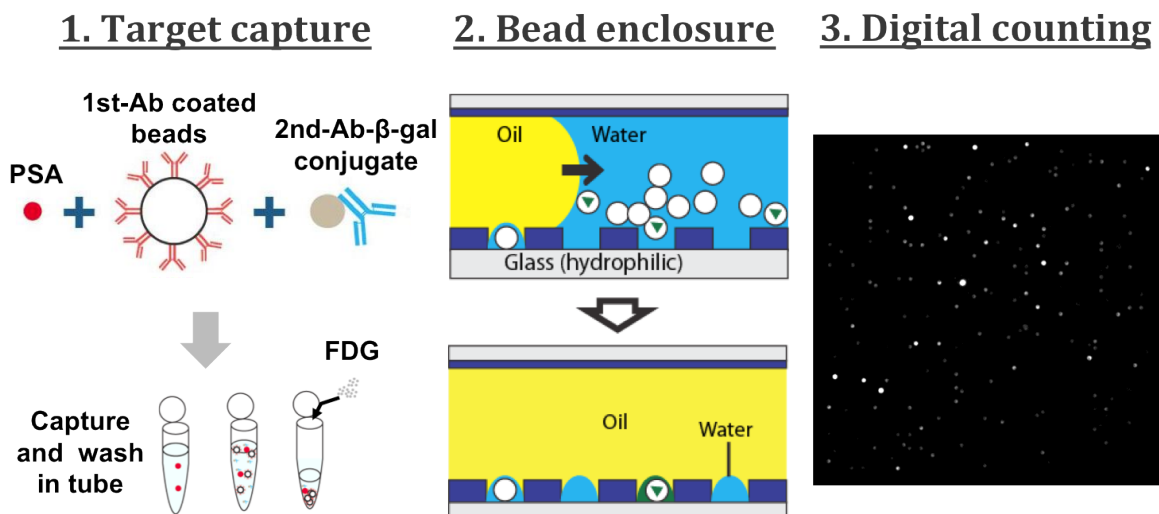


図 1 : digital ELISA 法の模式図。右は、実際に得られた蛍光像。1 つ 1 つの輝点が 1 個の抗原分子に由来する。

数百個しか存在しない分子を数え上げるシステムを開発することを目標とする。

③ 超解像蛍光イメージング

神経細胞のスパイン構造や細胞核のクロマチン構造に代表されるように、生命現象には、1 ミクロンにも満たない微小構造体の中で繰り返られる蛋白質の挙動が、決定的に働く。現在、蛋白質の挙動を生きたまま直接観察する技術は、光学顕微鏡しかないが、光学顕微鏡では、Abbe の回折限界 (250nm) により分解能が制限されるため、その大きさより小さな構造体内における蛋白質の挙動を観察することは不可能である。また、微小構造体内における蛋白質の数は、～数十個と見積もられ、濃度の概念が通用せず、ひとつひとつを数え上げる必要がある。「超解像蛍光イメージング」では、微小構造体内部における細胞内分子計数とダイナミクス計測に適した新規の超解像イメージング技術を確立する。

回折限界を超えた分解能を得る光学技術として飽和励起顕微鏡法 (SAX; Fujita, et al., *Phys Rev Lett.*, 2007)、誘導放出制御顕微鏡 (STED; Hell & Wichmann, *Opt. Lett.*, 1994)、構造化照明顕微鏡 (SIM; Gustafsson, *J. Microsc.*, 2000) など非線形光学技術を用いた方法論が提案され製品化されている。しかしながら、これらは全て細胞内におけるナノメートルオーダーの構造の観察を目的しているため、時間分解能が低く (\sim s)、本研究課題の目的を達成しうる技術ではない。一方で、我々はこれまでに、細胞内分子計数、および、分子運動観察を目的とした超解像技術を開発してきた。ひとつは、解析学的な超解像技術であり、90nm/80ms の時空間分解能を達成している (VISion; Watanabe, et al., *Biophys. J.*, 2010)。もうひとつは、光学的な瞳変調を利用した超解像技術 (DiMPS) であり、120nm/2ms の時空間分解能を達成している。

我々の開発している技術と従来の技術とを効果的に組み合わせ、まず、90nm/40ms の時空間分解能を目指す。さらに、細胞膜上にある膜蛋白質「全て」の運動を同時に追跡する時空間分解能である 30nm/30ms を達成するための、さらなる技術開発にも取り組む。

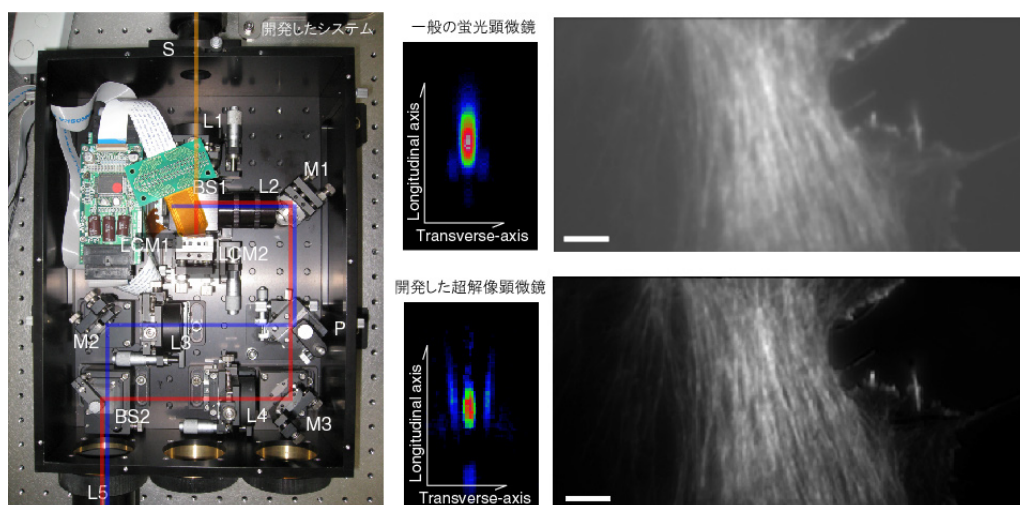


図 2：我々が開発した超解像顕微鏡装置。
通常の蛍光顕微鏡と開発した顕微鏡装置の点増分布 (中) と、観察されたアクチンフィラメントの像を示す (左)。

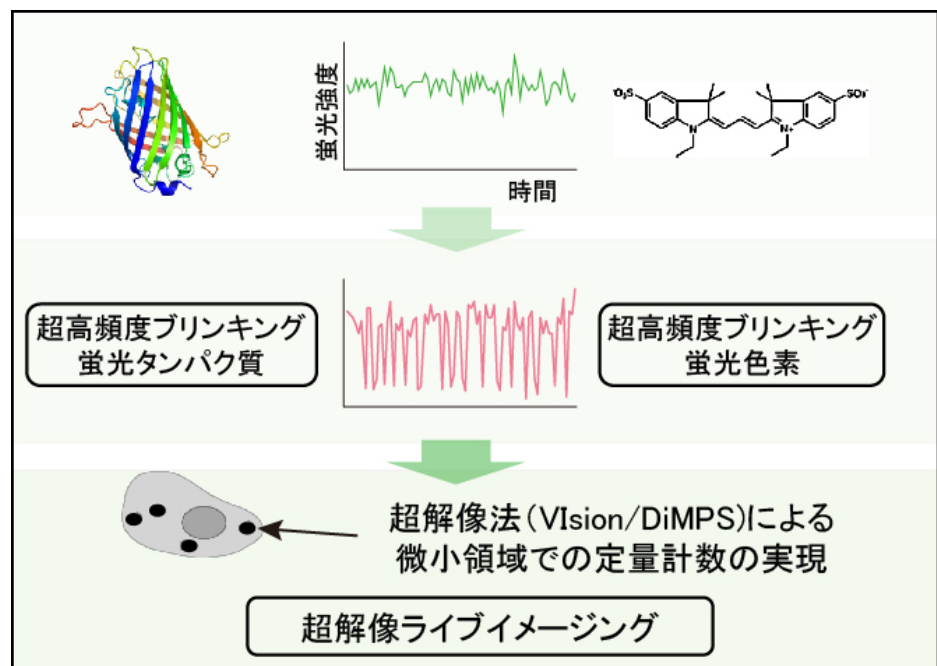
研究代表者：永井 健治（北海道大学・電子科学研究所）
 研究分担者：金原 数（東北大学・多元物質科学研究所）
 堀川 一樹（国立遺伝学研究所・新分野創造センター）
 連携研究者：山東 信介（九州大学・稲盛フロンティア研究センター）
 浦野 泰照（東京大学・医学系研究科）
 小澤 岳昌（東京大学・理学系研究科）

生きた細胞の中であらゆる分子の振る舞いをリアルタイムに計測することは生命学者にとっての共通の夢です。本研究班では、これを実現するための様々な基盤技術の開発を行います。

複雑な生命システムにまつわる大きな謎の一つに、生命システムは観察の階層に応じて異なる様相をみせることがあげられます。つまり超分子複合体や細胞レベルでのマクロな動作は非常に安定である一方、一分子レベルの要素ダイナミクスは揺らぎの影響を受け乱雑な振る舞いを見せることが明らかになりつつあります。したがって、信頼性の低いミクロ素子をつかって再現性の高いマクロ動作を保證するためには何らかの特別な機構が存在するはずですが、その具体的なメカニズムはほとんど明らかになっていません。私たちは、この問いに答えるための鍵が「要素の数」と「要素間の共同性」にあるという立場に立ち、分子一つ一つを解析対象とする一分子計測と多数の分子の平均的な振る舞いを解析対象とする古典的な生化学的手法の間のギャップを埋めるための研究手法を開発します。具体的には 10-100 個程度の機能分子から構成される「少数分子ネットワーク」を対象とし 1) 数と活性を分子レベルでリアルタイム計測するための技術、2) 任意の場所と時間においてその機能を分子単位で制御するための技術を構築します。3) さらに生細胞ならびに試験管内再構成系を用いて、システム動作に劇的な変化をもたらす要素の数 = 「マジックナンバー」を明らかにすることで、少数分子ネットワークの動作原理の解明を目指します。

1. 超解像ライブイメージング法の開発

フェムトリットルほどの極限微小空間からマイクロリットル程度の細胞全体に存在する分子の数や機能をリアルタイムに計測するための新規手法を開発します。既存の超解像イメージング法ではサンプリングレートが数 Hz 程度にとどまり、



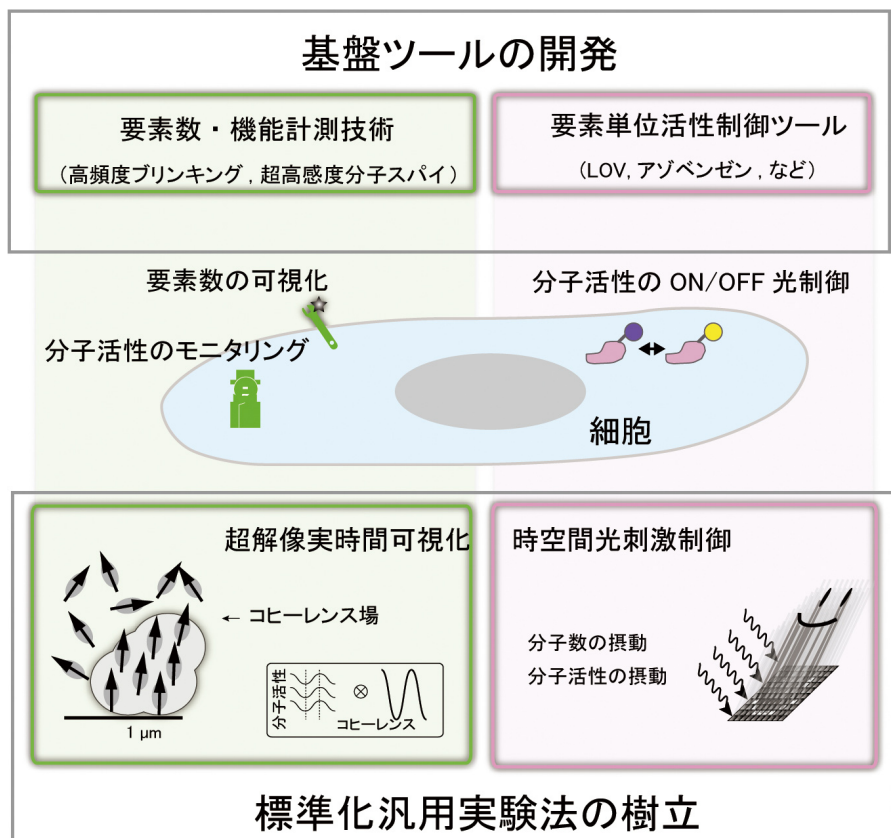
分子レベルで細胞内の化学反応過程を計測するには時間分解能が不足します。そこで、従来の蛍光イメージングで利用されてきた蛍光波長や蛍光寿命などの物理量にかわり、「プリンキング特性」に注目することで、少数分子ネットワークに関与する全ての分子の挙動を、ビデオレート一分子イメージングできる技術を開発します。あわせて、複数種の分子を同時にイメージングするための多チャンネル化、局在だけでなく分子活性の計測を可能にするための超高感度プローブを開発します。

2. 単分子レベルでの活性制御技術の開発

少数分子ネットワークの動作原理を構成的アプローチにより解析するために、分子の数と活性を自在に操作するための基盤技術を開発します。具体的には、分子の細胞内濃度をフェムトモラ - からミリモラ - オーダーまで任意に操作できる誘導型遺伝子発現系の構築、ならびに分子単位で機能の ON/OFF スwitchングを可能にする光応答性機能分子の開発を行います。光応答性機能分子は、タンパク質や核酸アプタマーに LOV ドメインやアゾベンゼン等のフォトクロミック分子を融合させることで作製します。

3. ハイスループットアッセイプラットフォームの構築

少数分子ネットワークの動作は要素の個数や機能に加えて、反応のシステムサイズや、温度、粘性などの環境パラメーターにも大きな影響を受けます。これらの物理量変化の影響を解析するため、A01-1 班が構築するデジタルエライザ - チャンバーをベースにハイスループットなアッセイプラットフォームを構築します。生細胞内においても少数要素の定数計測と機能制御を行うため、ゲノム改変が極めて容易な真核モデル生物（細胞性粘菌）を材料に、走化性シグナル伝達系における支配因子の探索と分子数計測・制御アッセイを行います。



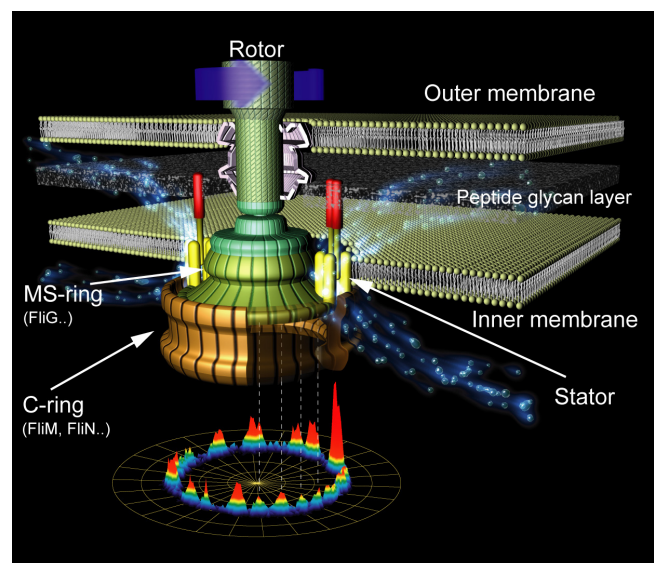
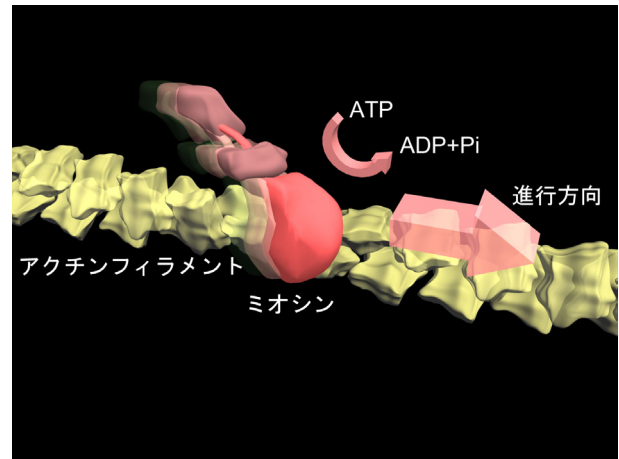
研究代表者：石島 秋彦（東北大学・多元物質科学研究所）

研究分担者：朽尾 豪人（京都大学・工学研究科）

連携研究者：原田 慶恵（京都大学・物質—細胞統合システム拠点）

大腸菌などのバクテリアは生物界の中で最下層に位置する下等生物ですが、そこには、“周囲の環境を検知し、その情報を細胞内部の適切な器官に伝達する情報伝達器官”、“それらの情報を受け取り、適切な環境に向かっていく動力機関”など、およそ人工機械にはまねのできない高等なメカニズムを有しています。そのため、“E. コリ（大腸菌）にあてはまることは、ゾウにもあてはまる！”（ジャック・モノー）とまで言われ、生命現象を理解する上で大腸菌はとてもよいサンプルなのです。しかし、問題は相手が小さいこと。一般的な細胞はその大きさが10ミクロン以上あるのに対し、大腸菌は直径1ミクロン、長さ2ミクロン程度。さらにその形状はロッド型であり、光学顕微鏡にとって、その大きさ、形状はとても観察困難な対象です。さらに先に述べた、“情報伝達”に関しては、対象タンパク質のリン酸化が重要な鍵を握ります。しかし、今日のように、イメージング技術が発達していても、リン酸化、非リン酸化を区別して観察することは非常に困難です。さらに、生物の教科書では、“バクテリアなどの小さい生物は情報伝達は神経、血管などを必要とせず、拡散でまかなう”とよく説明されていますが、その具体的な記述は全くされていません。また、“動力機関”であるバクテリアべん毛モーターはその直径がたかだか40ナノメートルと非常に小さく、いまだ、“どこをどのようにイオンが流れているのか？”、“イオンの流れがどうトルクに変換されているのか？”、“どのように回転方向が転換されるのか？”、などまだまだわからない点が非常に多いです。

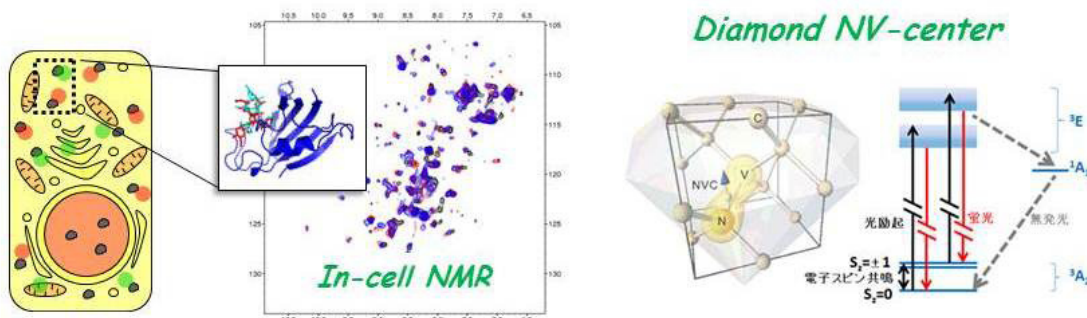
また、べん毛モーター以外の動力機関であるアクチンフィラメントにおいても、それらの立体構造、生化学的活性など古くから研究が行われていますが、“どのようにしてATPの加水分解エネルギーを力学エネルギーに変換しているのか？”、“その際にどう立体構造が変化するのか？”などもいまだ未解決のままです。我々は、これらの問題を、“1分子レベルで”、“生きたまま”、“水溶液中で”、“定性的でなく定量的に”明らかにしようとしています。そのために、従来の市販の



装置だけでなく、実験装置自体を改造、開発し、さらにはカーボンナノチューブなどの新しい材料も取り入れて研究を行っております。

タンパク質を分子機械と見立てれば、その機能を詳細に理解するためには「構造」を明らかにする必要があります。分担研究者の朽尾らは、核磁気共鳴法（NMR）や X 線結晶回折法を用いて、タンパク質の「立体構造」を原子分解能で解析し、それに基づいて生命現象を解明する、いわゆる「構造生物学」の研究を行っています。通常の構造研究においては、解析対象となるタンパク質を高純度に精製し、これを試験管内にて解析しますが、実際に細胞や生体内で働くタンパク質を取り囲む環境は、試験管内に純化されたタンパク質のそれとは大きく異なります。従って、生体内にあるタンパク質の「真の姿」は、試験管内で決定されたものとは異なる可能性があります。また、一般にタンパク質の構造はガチガチに固定されたものではなく、大なり小なりの「ゆらぎ」を持っており、これが機能発現に重要な場合も多く見られます。この「ゆらぎ」の大きさもまた周囲環境・媒質の影響を受けることから、細胞内タンパク質の「真の姿」に迫るには、「タンパク質構造のダイナミクス」もまた、細胞内環境下で評価してやる必要があります。朽尾らは、細胞内タンパク質について、できるだけ精密な立体構造やダイナミクス情報を取得するための手法開発を行っており、HeLa などの培養細胞内のタンパク質を NMR を使って解析する手法を開発してきました。本課題では、この開発を進めると同時に、ラマン分光法を使って細胞内タンパク質の構造情報を取得する手法の開発に取り組みます。

朽尾らは並行して、連携研究者の原田らとともに、磁気共鳴と蛍光顕微鏡の技術を組み合わせた、新たなライブセルイメージング法の開発も行います。「蛍光」は光励起された電子がエネルギーを放出する過程ですが、その電子のスピン状態を電子スピン共鳴（ESR）の技法を用いて操作することにより、蛍光強度を変調できるような系があります。中でも、ダイヤモンド内の窒素-空孔中心（NV-center）の発する蛍光は、生体内計測において有用な性質を有しています。そこで、NV-center を含むダイヤモンドをナノ粒子化し、タンパク質間相互作用や構造変化、及び細胞のダイナミクスをモニターするための新たな蛍光プローブを開発します。



研究代表者：前島 一博（国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター）
 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）
 連携研究者：高橋 恒一（理化学研究所・生命システム研究センター）
 吉村 成弘（京都大学・生命科学研究所）

私達の体は約 60 兆個の細胞から出来ている。そして、その細胞のわずか容量 1 ピコリットルの核の中に、全長 2m のゲノム DNA が折り畳まれている。このゲノムには同じ遺伝子が基本的に「2 個」しか存在しない。また、遺伝子の発現を司る転写因子群は一般的に少数であるとされている。さて、微小空間に閉じ込められた広大なゲノム上で、少数の遺伝子が少数の転写因子によって、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？これは「少数性の生物学」の最も基本的な事例だと思われる。本計画研究では遺伝子発現制御のうち、「ゲノム情報がいかに検索されるのか？」に焦点をあわせ、少数性分子による情報検索原理を「ゲノムの足場の動き」と、ターゲットを探す「蛋白質の動き」の両面から明らかにしたいと考えている。

それでは、ヒトゲノム DNA は一体どのように折り畳まれて、細胞核や染色体に収納されているのだろうか？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。さらに古くから提唱されているモデルでは、「30nm クロマチン線維が、100、200、500nm 線維と、らせん状の階層構造を形成するのではないか」と予想されてきた。

しかしながら、最近の私たちのクライオ電子顕微鏡を用いた解析では、分裂期染色体中に、30nm クロマチン線維は検出されず、11nm のヌクレオソームが不規則に折り畳まれてできていることが示唆された。さらに、染色体構造の全体像を捉えるため、大型放射光施設 SPring-8 にて、放射光散乱を用いた染色体の構造解析をおこなった。その結果、ヒト染色体には 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ている。また、私たちの知見を含めて、HeLa 細胞などの間期核内でも 30nm 線維のような規則正しい構造は観察されず、ヌクレオソーム線維が不規則に折り畳まれていると考えている。このような性質はゲノム情報検索において極めて有利である（図 1）。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、ゲノムの足場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（図 1）。

本計画研究では、これまでの私たちの研究を足がかりとし、研究協力者谷口雄一ら、連携研

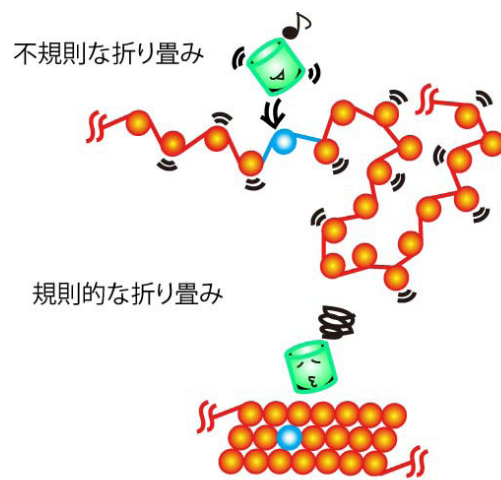


図 1

究者吉村成弘の協力を得て、タンパク質 1 分子イメージングをおこない、微小空間の中でターゲットを探す「蛋白質の動き」の解析をおこなう。さらに連携研究者の高橋恒一らの協力を得て、ゲノムの足場と転写因子を独立に動かすモンテカルロシミュレーションを行い、情報検索におけるそれぞれの効果を解析し、ゲノム環境を再構築し、少数性分子による情報検索原理を明らかにしたい。

一方、研究分担者の谷口雄一らは、最近、単一生細胞におけるプロテオームとトランスクリプトームとを単一分子検出感度で定量化することにはじめて成功した(図2)。その結果、1細胞内遺伝子発現の動的・確率論的ゆらぎの全ゲノムレベルでの普遍的性質が明らかとなり、その定式化にも成功した(図2)。1分子とシステム両方のレベルからの網羅的分子情報を取得できるこの技術は、複雑な階層性をもつ生命の仕組みを分子・細胞相互のスケールから理解できる手法として期待できる。また、ひとつひとつの細胞にある分子数の確率的变化を絶対感度で捉えることが可能であるため、遺伝子発現をはじめ、様々な少数性生物学的問題にも応用できる。

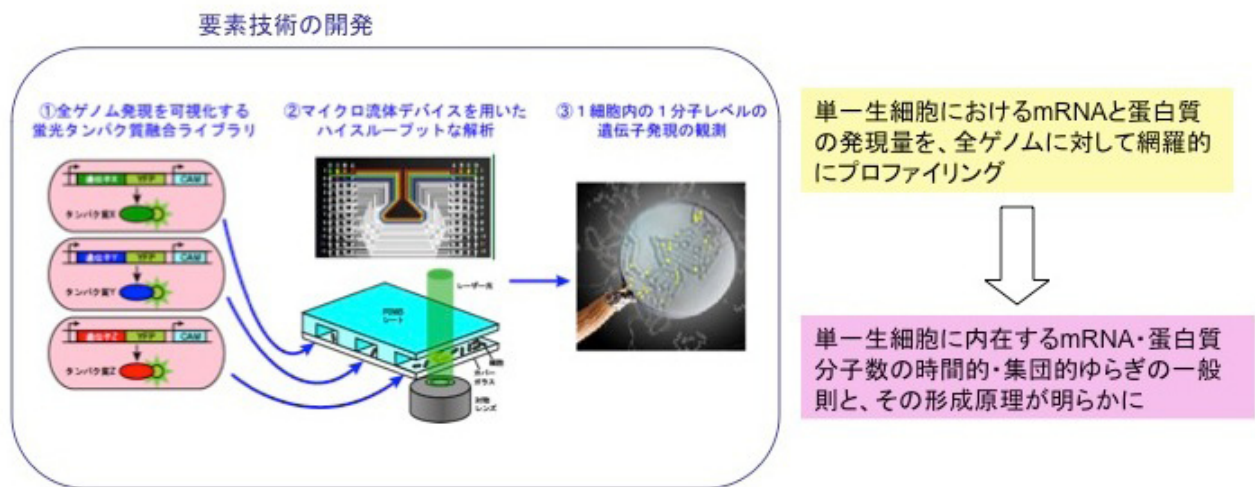


図2

研究代表者：上田 泰己（理化学研究所・生命システム研究センター）
研究分担者：鵜飼 英樹（理化学研究所・生命システム研究センター）
中嶋 正人（理化学研究所・生命システム研究センター）

地球上の生命は概日時計と呼ばれる計時機構を細胞内に持ち、概日時計が刻む時間に従い生命活動に約1日周期の変動を生み出すことにより、地球の自転に伴う光や温度などの約1日周期の外部環境の変動に積極的に適応している。概日時計により生み出されるリズム（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）であることが明らかにされている。この概日リズムの周期は生理的温度範囲内で不変である（温度補償性）など、外部環境の温度変化に対して頑健である一方で、照度変化や急激な温度変化に対して鋭敏に反応するなど適応性も有している。これらのマクロな挙動の正確性の一方、細胞内に存在する概日リズムを生み出す分子ネットワークは、正確性を損なう原因となる“ゆらぎ”にさらされている。例えば哺乳類概日時計で中心的な役割を担うPERIODの細胞内分子数が少数（数十分子～数百分子）である可能性が示唆されているなど、細胞内では少数性に起因するゆらぎが、分子ネットワークの正確な動作を妨げている可能性が予想されている。しかし現在のところ、構成分子（遺伝子、タンパク質）についての分子生物学および細胞生物学的知見の蓄積にもかかわらず、概日時計の正確性・頑健性・適応性をもたらす分子機構についての報告は極めて少なく、理解は不十分である。

我々は、これまで哺乳類概日時計を対象として、概日時計を構成する時計タンパク質の分子特性、および時計遺伝子の転写ネットワーク構造やその動的挙動についてのシステム科学的な研究を行い、時計関連遺伝子が構成する転写ネットワークの全体像を明らかにしてきた。さらに分子ネットワークを構成する少数の分子が関与する反応が、分子ネットワーク全体の性質である概日時計の周期決定と周期の温度非依存性（温度補償性）において決定的な役割を果たしていることを示した。これらの過去の取り組みにおける成果は、頑健性や適応性といった概日時計のシステム特性が、ネットワーク構造だけでなく、構成分子の特性にも起因する可能性を示唆するものであると考えている。

我々はこれまでの概日時計のシステム科学的な研究を踏まえて、未解明である哺乳類概日時計の正確性・頑健性・適応性をもたらす分子機構・ネットワーク機構について、ネットワーク構成要素の少数性に着目し、1) ターンオーバー制御による周期の正確性、2) タンパク質間相互作用および酵素反応特性によってもたらされる周期の頑健性・適応性の2つの問題に対するアプローチを通じて解明することを目指す。

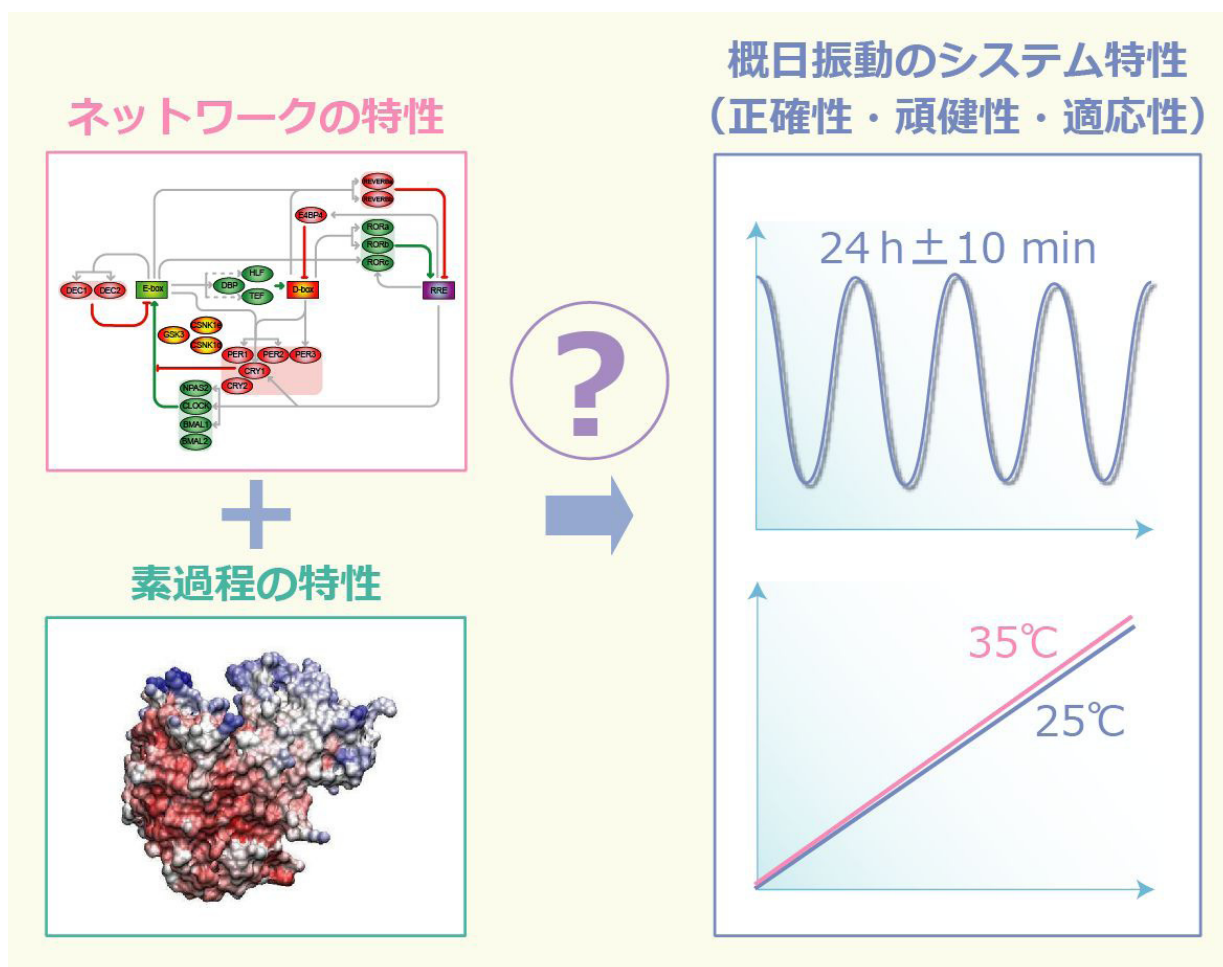
1. ターンオーバー制御による周期の正確性 (鵜飼・上田)

過去の実験的解析結果に基づく幾つかの報告は、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いる。そこで概日時計における分子の少数性に起因する不安定性について評価するために、時計タンパク質の細胞内分子数および合成・分解速度の定量的測定を行う。さらにマウス由来時計遺伝子破壊細胞株を用いて相補実験系を構築し、遺伝子およびタンパク質改変による合成・分解速度の制御に

よる概日リズム周期の正確性への影響を評価し、概日リズムの正確性におけるターンオーバー制御の重要性を明らかにする。

2. タンパク質間相互作用・酵素反応特性による周期の頑健性・適応性 (中嶋・上田)

我々は哺乳類概日時計の外部環境の温度レベルに対する頑健性(温度補償性)、照度変化や急激な温度変化に対する適応性が、概日時計を構成するタンパク質の分子特性に起因することを明らかにしつつある。この知見は、頑健で柔軟な概日リズムを生み出す上で、タンパク質の分子特性の理解が必要不可欠であることを示唆するものである。そこで哺乳類概日時計を構成する分子の特性について詳細な解析を行うために、時計タンパク質の発現・精製系の構築ならびに一分子解析系を確立する。この試験管内解析系から得られる知見を基に分子機能改変を行い、改変タンパク質を細胞に導入し表現系解析を行う。このような解析を通じて分子に実装される頑健性・適応性をもたらす分子機構を明らかにし、高次生命現象における安定性をもたらされる分子基盤を明らかにする。



研究代表者：富樫 祐一（神戸大学・システム情報学研究科）
 研究分担者：小松崎 民樹（北海道大学・電子科学研究所）
 連携研究者：李 振風（北海道大学・電子科学研究所）
 寺本 央（北海道大学・電子科学研究所）

細胞は、性質も量も様々な、数多くの成分によって構成されている。中には、モーターに代表される分子機械のように、ひとつひとつの分子がダイナミックな構造変化を通じて機能を実現しているものもある。それらが互いに化学反応するのみならず、力学的な相互作用や複合体形成などを通じて（通常の化学反応系の概念を超えた）化学・力学複合的なネットワーク構造を形成し、その結果として「生命システム」が実現されている。

生命システムは一人工システムが未だ到達できないレベルで高い動作安定性（頑健性）と適度な動作不安定性（可塑性・適応性）を両立している。そのメカニズムもこうしたネットワーク構造の内にあるだろう。では、その本質は何か？ 我々は、少数分子性・階層性がその鍵であると考え、この問題に迫るべく、(1) あるネットワークが与えられた時にその振舞いを予言する理論の構築と、(2) 実験で観測されたデータ（ネットワークの振舞い）からその背後にあるネットワークを抽出する解析技術の開発とを組み合わせ、生命システムの振舞いの定量的な予測・検証を可能にすることを目指している。

(1) 少数分子反応系の理論構築

細胞を反応拡散系としてモデル化した研究はこれまで数多くなされてきた。従来の反応拡散方程式を用いた枠組みでは、成分の「濃度」を変数として用いている。しかし「濃度」は、非常に多数・高密度の分子があるからこそ、連続変数として定義できるものである。細胞では、分子数が1個から数万個と多種多様な生体高分子が階層的に関与しあっており、そもそも「濃度」概念の妥当性を理論と実験的検証の両面から精査した研究は皆無である。

しかしながら、分子が数～数十個程度になると、「数」の離散性、とりわけ「有」「無」の厳然たる違いが顕わになる。こうした少数分子成分を含む反応系では、分子の有無が時々刻々と変化することにより、反応が急激に起こっては、また停止するバースト的な振舞いや、反応に必要な成分の欠乏・回復による反応ネットワークの動的な組替えを生ずる可能性がある。簡単なモデル系でこうした振舞いが起こることは、我々を含めいくつかのグループによって理論的に示されてきた（Togashi & Kaneko, *Phys. Rev. Lett.* 86, 2459 (2001) ほか）。しかし、実際の細胞の持つネットワークは、少数分子成分を数多く含む。このような複雑なネットワークの振舞いの定量的予言を目指し、手始めに、多成分に拡張した（しかし分子数には限りがある）ネットワークモデルによる考察を進めている。

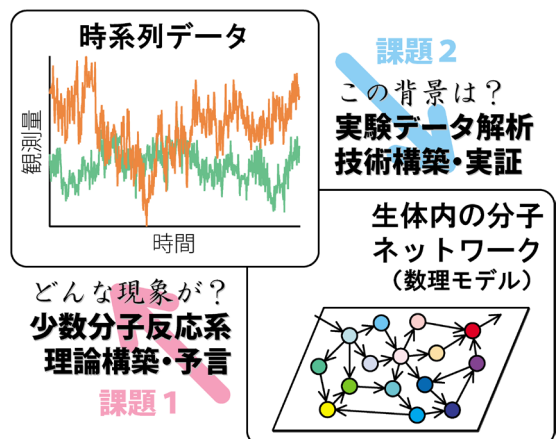


図1: 当研究班のアプローチ
 ～相補的な2つの課題～

また、細胞には、小胞や細胞骨格のように、細かな区画や幅の狭い通路が数多く存在する。そこでは、拡散が阻害されたり、中に入れる分子の数が制約されたりすることにより、他の部分と反応の様相が大きく異なる「少数分子反応場」ができていている可能性がある。そうであれば、反応の振舞いを、その他の（広い）部分と比較することで、細胞における少数性の効果を実証できることが期待される。その可能性を、まずは理論的に探っている。

(2) 空間階層の異なる分子反応の連関を評価する解析理論構築

一方で、こうした様々な成分が関与し合うことで成り立っている生命システムを理解するためには、システムそのものを“観測”し、その“観測”から実際の細胞環境における階層的な高次反応ネットワークを評価・抽出し、分子数の離散性・数揺らぎに対する安定性などを学びとる実践的な理論・手法の開拓が必要となる。

現在、1分子時系列データから背後に存在するモデルを評価するほとんどの方法では、何らかのモデルを仮定した上で観測データからパラメータを推定する「モデル駆動型」の方法論が採られている。そのため、仮定したモデルに依存することから汎用性に欠け、想定したモデルから到達可能な帰趨を越えることができない。多階層生命動態システムの設計原理を理解するためには、実際に観測される時系列情報から背後に存在する数理構造を彫り起こす実践型理論展開が必要となる。

具体的には、計算力学 (Crutchfield, *Nature Physics* 8, 17 (2012)) などの数理科学的手法に基づいて、少数分子系と多数分子系の多次元時系列データから、背後に存在する反応ネットワークおよびエネルギー地形を抽出し、時空間の異なるネットワーク群の遷移が相互に相関しているか、情報の流れに方向性があるか、すなわち、少数系が多数系のダイナミクスへ影響を与えているか（または、その逆）、などを定量化する方法論を新規に開発するとともに、分子数の離散性・数揺らぎに対するネットワークの安定性・頑健性を評価する指標を探る。

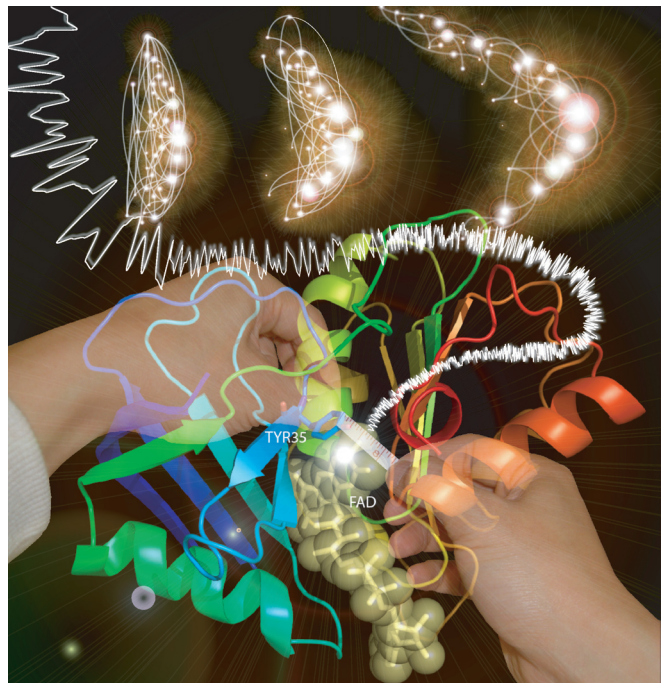


図2: 一分子蛍光時系列データから取り出したフラビン還元酵素の時間依存型状態空間ネットワーク (Liら, PNAS 105, 536 (2008)).

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

細胞内では、少数の多機能性分子が他の分子との離合集散（ターンオーバー）を通じて働く生体分子システムが多くあります。このようなシステムの機能を細胞内で調べることはもちろん重要ですが、システムの特異性や機能を調べるために細胞に加えた摂動が細胞内の複雑なネットワークを通じて思わぬ作用を及ぼし、システム自身の機能や特性を測定・評価できなくなることもしばしば起こります。そこで私たちの研究グループでは、様々な条件をコントロール可能な再構成系を構築し、各々は少数の分子が協同的に働くことで行われるシステムの作動機構を明らかにすることを目指しています。

具体的なターゲットとして、細菌べん毛タンパク質輸送システムを調べています。細菌の運動器官であるべん毛は、約30種類のタンパク質が各々数個から数万個重合してできた超分子複合体です。細胞膜外へ伸びる構造体なので、細胞内で合成されたべん毛タンパク質は、べん毛根元の輸送システムを通して細胞膜を通過し、成長端へ運ばれます。複雑で巨大な構造体を構築するため、輸送システムは輸送基質選択機構を備えると共に、べん毛の構築状況をモニターして発現系にフィードバックする機構を持ち、適切なタイミングでべん毛タンパク質を合成し菌体外へ輸送します。運動性を持つことは細菌の生死に直結しますが、べん毛構築は細菌の全エネルギーの10%以上を要することから、その構築制御も細菌の生存にとり極めて重要です。

輸送装置本体は6種類の膜タンパク質と3種類の可溶性タンパク質で構成され、可溶性タンパク質は離合集散を伴って機能します。輸送前の基質タンパク質は、それぞれに特異的な輸送シャペロンタンパク質と結合しています。輸送シャペロンは、輸送基質の安定化や輸送効率を上げる機能に加えて、基質タンパク質の発現制御も行う多機能性分子です。輸送シャペロン分子は基質タンパク質の個数をモニターしながら発現系にフィードバックをかけ、輸送基質の生産量を調節してべん毛構築を最適化しています。その結果1個体あたりのべん毛数も制御されています。これまでの研究から、べん毛タン

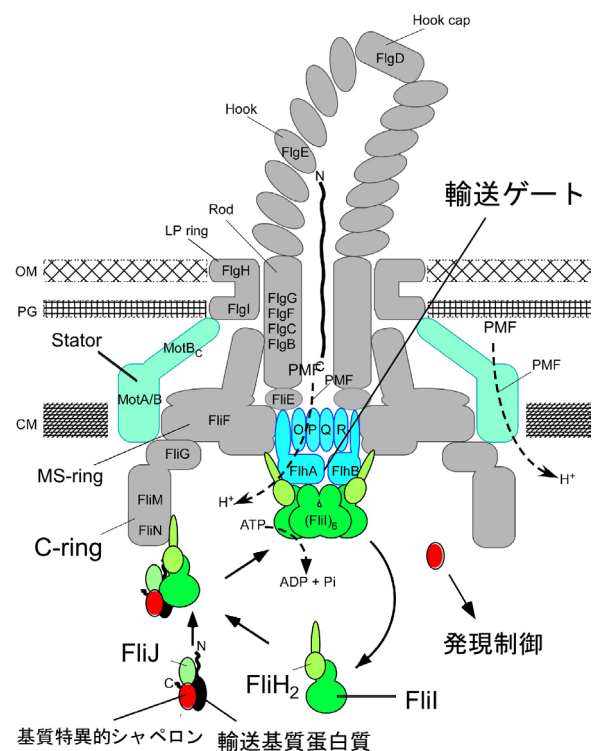


Fig.1 べん毛タンパク質輸送システム

パク質輸送システムがプロトン駆動力をエネルギー源に用いること、可溶性タンパク質群の構造がF/V型ATPaseと酷似すること、輸送シャペロンが相互作用相手に合わせて構

造変化するしくみが明らかになりました。また、輸送に関わる分子の多くが少数で機能する多機能性分子であり、他の分子との離合集散を通じて輸送におけるエネルギー変換や、輸送と輸送基質遺伝子発現をカップルさせることを見出しました。しかし、本来少数の分子のターンオーバーによって機能するシステムであり、各分子の発現量の多寡の影響を大きく受けるため、例えば輸送系タンパク質の変異の効果の解釈が難しくなります。さらに、べん毛構築に影響するシグナル伝達経路が様々に存在することも、問題を複雑にしています。そこで、このような擾乱を受けない再構成系を構築し、輸送に伴う構造変化、輸送機構の解明を目指しています。最終的な目標は、細胞内膜に形成される輸送装置複合体を MEMS 技術を用いて作成した溶液交換可能なチップ上に再構成し、膜内外の条件を様々に変え、そこで起きる構造変化や輸送装置の作動機構を解明することです。また、各輸送サイクルにおける構造変化を、高度化した高速 AFM を使って観測し、結晶構造解析で解明した原子レベルの構造と対応させることでそこで起こる変化を明らかにします。この目標に向かう中間段階として、可溶性成分から成る輸送装置部分複合体や、一部の膜内成分を発現して作成した部分複合体を再構成し、輸送基質 - シャペロン複合体との相互作用および構造変化を計測します。

輸送機構の解明には、各分子や複合体の構造および構造変化、1分子計測等の動的測定や理論的な解析など、異なる実験・計測グループの協力が必須です。領域内の他グループとの連携により、少数分子のターンオーバーで駆動するシステムの作動機構、構造と機能の関係を明らかにしたいと考えています。また、本研究で高度化し測定に用いる予定の高速 AFM や我々の得意とする構造解析技術などは、領域内で活用いただければと思います。

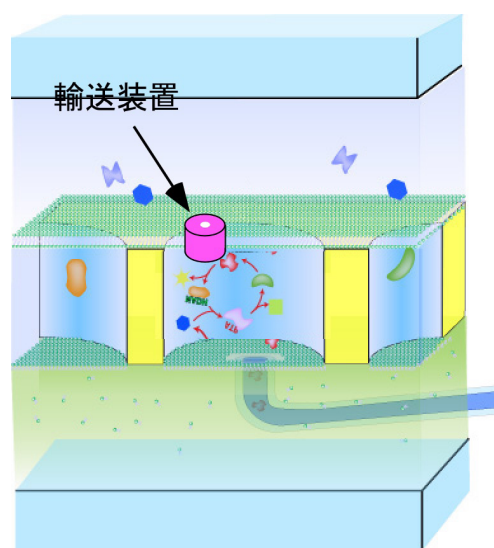


Fig.2 a 平面膜チップへの輸送装置の再構成

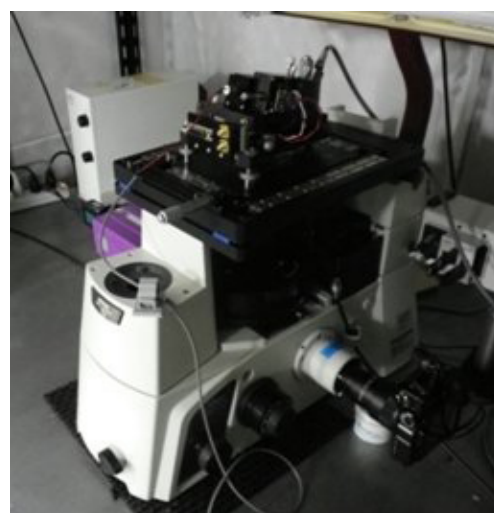


Fig.2 b 高速 AFM/ 蛍光顕微鏡複合機

新学術領域研究「少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—」

Newsletter No. 1

<領域代表>

永井 健治

北海道大学電子科学研究所

〒 001-0020 北海道札幌市北区北 20 条西 10 丁目

<事務担当者>

村本麻衣子

北海道大学電子科学研究所

〒 001-0020 北海道札幌市北区北 20 条西 10 丁目

TEL 011-706-9441

FAX 011-706-9443

Email muramoto@es.hokudai.ac.jp