

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. 2

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

目次



• 巻頭言	
「少数に影響される多数」.....	3
領域アドバイザー 神原 秀記（株式会社日立製作所）	
• 研究組織	
組織表.....	5
総括班.....	7
A01 班.....	8
A02 班.....	10
A03 班.....	13
• 研究内容	
公募 A01 班.....	16
公募 A02 班.....	23
公募 A03 班.....	33
• 活動報告	
「デジタル ELISA 法の開発」.....	38
A01 計画班 野地 博行（東京大学・大学院工学研究科）	
「光操作技術と併用し実時間観察を可能にする高輝度発光タンパク質」.....	39
領域代表・A01 計画班 永井 健治（大阪大学・産業科学研究所）	
「細胞のなかで揺らぐクロマチン！！」.....	40
A02 計画班 前島 一博（国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター）	
会議報告 新学術領域「少数性生物学」第 1 回国際会議.....	41
国際会議担当 前島一博（国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター）	
• ご紹介	
新学術領域「少数性生物学」バイオナノフォトニクスコンソーシアム.....	43

少数に影響される多数

領域アドバイザー 神原 秀記 (株式会社日立製作所)

DNA シーケンサ開発を始めてしばらく経った 1990 年頃、「人の細胞は約 60 兆個あり、個々の細胞の中のゲノムは同じである」と言われていたことが気になった。松原謙一先生に「隣り合った細胞、あるいは組織の中の細胞は本当に全く同じゲノムなのですか」と聞いたことがある。先生は「誰も分析したことがないから本当のところは分からない」とおっしゃった。1つ1つの細胞を分析するなど当時の技術では何ともしがたい課題であったが、それ以来、「個々の細胞の中味は本当に同じだろうか」という疑問が頭にこびり付いた。



あるとき、細胞の集団である人間の行動には細胞が持つ特性が表れるに違いないと思った。人間の集団を考えてみると、1つの集団の中にはルールやリーダーの指示に捉われず行動する人や、リーダー格の指示に忠実に従う人などさまざまな人がいる。外部の刺激に過剰に反応する人に釣られて動く人も多く、それが集団としての行動になる場合もある。そんな時でも冷静に物事を見極めようとする人もいる。リーダー格の人が死んだりしていなくなると必ずその役目をする次のリーダー格の人が現れる。組織の中の細胞もそのように行動するのではないかという気がしてくる。外部の刺激に過剰に反応する細胞が周りを刺激して組織の行動に大きな影響を与えたり、リーダー格の細胞の指示に従って多くの細胞が行動したりしているかもしれない。がん細胞のように組織にお構いなしに行動する細胞もあるかもしれない。いずれにしても少数の細胞の行動が集団に大きな影響を与えている可能性は高い。しかも、そのような細胞を動かしている要因は少数の分子である可能性が高い。最近では技術が発展し、1つの分子の振る舞いをモニターしたり、1つの細胞の中味を分析したりすることができるようになってきた。さらなる技術進歩で個々の細胞に大きな影響を与えている分子をモニターし、細胞の行動を予測したり、更には細胞群の行動を予測したりできるようになるかもしれない。本学術研究の目的の一つはこのような流れを先取りして技術を開発し、個々の細胞あるいは細胞群に大きな影響を与える分子を捉えて解明していくことと聴いている。様々な生命現象の解明につながる重要なテーマであると感じる。新たな発想で課題に取り組み、大きな成果が出ることを期待している。

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	大阪大学・産業科学研究所
A01 班 少数性の生物学研究に必要な技術開発と整備			
A01-1 班	細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発—少数生体分子の計数化技術—	野地 博行	東京大学・工学系研究科
A01-2 班	分子プローブと光摂動ツールの開発—少数生体分子の可視化・操作技術—	永井 健治	大阪大学・産業科学研究所
A02 班 少数性の生物学			
A02-1 班	細胞内情報伝達の少数性生物学—生命システムにおけるポアソン性の解析—	石島 秋彦	東北大学・多元物質科学研究所
A02-2 班	遺伝子発現の少数性生物学—少数分子による情報探索原理の解明—	前島 一博	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター
A02-3 班	生体リズムの少数性生物学—生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性—	上田 泰己	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
公募班（平成 24-25 年度）			
A01 班	「数」を視点とした走光性信号伝達過程における信号増幅機構の解明	井上 圭一	名古屋工業大学・工学研究科
	光による G タンパク質シグナリング制御を可能にする受容体の開発	山下 高廣	京都大学・理学研究科
	動的カドヘリン複合体の機能：3次元1分子超追跡法の開発による解明	藤原 敬宏	京都大学・物質—細胞統合システム拠点
	光機能性プローブを用いた生体分子の少数活性化	水上 進	大阪大学・工学研究科
	腸炎ビブリオにおけるⅢ型分泌機能の数と病原性誘導	高橋 章	徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部
	リン酸結合蛋白の微小溶液チャンバーによる、少数個蛋白質からのリン酸検出系の構築	政池 知子	学習院大学・理学部
	シナプス内分子数揺らぎが可塑性誘起に与える影響	村越 秀治	生理学研究所

A02 班	染色体分離を制御する動原体に働く力バランスの定量	矢島 潤一郎	東京大学・総合文化研究科
	シナプス機能制御における少数分子の空間的コーディネートの意義の解明	並木 繁行	東京大学・医学系研究科
	発現量の少ないタンパク質の凝集性とシャペロン要求性の解析	丹羽 達也	東京工業大学・生命理工学研究科
	細菌べん毛形成を1本に制御する仕組み	小嶋 誠司	名古屋大学・理学研究科
	少数分子時における生物時計の時計安定性評価	小嶋 勝	大阪大学・基礎工学研究科
	GPCRのシグナル伝達経路の分岐の仕組み：1分子観察法を用いた研究	笠井 倫志	京都大学・再生医科学研究所
	核一細胞質間の物質輸送を制御する核膜孔複合体内の分子動態の解明	桑田 昌宏	京都大学・生命科学研究科
	生物回転ナノマシン構成素子の機能イメージング	曾和 義幸	法政大学・生命科学部
	分子イメージングによる異物排出ポンプ細胞内動態の解析	川岸 郁朗	法政大学・生命科学部
	少数のダイニンと微小管から成る振動系の作成と構造・機能研究	広瀬 恵子	産業技術総合研究所
A03 班	少数分子世界の細胞情報伝達理論	石原 秀至	東京大学・総合文化研究科
	ミクロ小胞内DNAの分子挙動と微小空間特性	濱田 勉	北陸先端科技大学・マテリアルサイエンス研究科
	モデル生体膜の物質封入における1分子性の物理化学的基盤の解明	鈴木 宏明	大阪大学・情報科学研究科
	細胞内反応場の実効的分子数の少数性と状態・機能最適化の統計力学的研究	粟津 暁紀	広島大学・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す。さらに、各研究班が有する研究ノウハウを班員間で共有するための技術支援を行うだけでなく、国内外の研究者への普及を目指し、班員の指導による技術講習会を開催します。</p>			
	氏名	機関	役割分担
研究代表者	永井 健治	大阪大学・産業科学研究所	領域総括
連携研究者	石島 秋彦	東北大学・多元物質科学研究所	領域推進方針の策定
	今田 勝巳	大阪大学・理学研究科	領域推進方針の策定
	前島 一博	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター	企画担当（国際会議）
	野地 博行	東京大学・工学系研究科	広報担当（ホームページ）
	上田 泰己	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	大阪大学・産業科学研究所	事務担当（総務）
	松田 知己	大阪大学・産業科学研究所	事務担当（会計）
	吉村 成弘	京都大学・生命科学研究科	企画担当の補助
	堀川一樹	徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部	企画担当（国内学会）
	渡邊 朋信	理化学研究所・生命システム研究センター	研究支援担当
	藤田 克昌	大阪大学・工学研究科	研究支援担当
	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
	岡田 康志	理化学研究所・生命システム研究センター	研究支援担当
アドバイザー	柳田 敏雄	理化学研究所・生命システム研究センター	評価委員
	神原 秀記	株式会社日立製作所	評価委員
	河田 聡	大阪大学・工学研究科	評価委員
	金子 邦彦	東京大学・複雑系生命システム研究センター	評価委員
海外アドバイザー	Jie Xiao	Johns Hopkins University, USA	技術アドバイス
	Thomas Dertinger	SOFast GmbH, Germany	技術アドバイス
	Peilin Chen	Academia Sinica	技術アドバイス

A01 班

少数性の生物学研究に必要な技術開発と整備

研究の目的 本研究領域が目指す「数」の観点でタンパク質の反応を論じるには、先ずどの細胞がどのタンパク質を何個有しているのかに関する情報を取得しなければなりません。このために内在性の任意のタンパク質を計数できる 1 細胞デジタル ELISA 法を開発し、これを利用して網羅的に細胞内タンパク質数を決定し、プロテオームマップ上にその個数情報を追加します（野地）。また、蛍光標識した外来性のタンパク質を生きた細胞内の局所領域（数 10 nm の空間スケール）でビデオレート計数観察できる高速超解像蛍光顕微鏡（渡邊）を開発すると共に、NVC ナノダイヤモンド標識した外来性タンパク質をビデオレート以上の時間分解能で長時間計測できる電子スピン共鳴顕微鏡（朽尾）、タンパク質の構造変化をビデオレートで捉える事ができる高速 AFM（内橋）も整備し、タンパク質の数をその他のパラメータと同時解析できるようにします。さらに、タンパク質リン酸化や細胞内イオンなどの計数観察を可能とする蛍光タンパク質、蛍光化合物、蛍光アプタマーなどの分子ツールの開発も行います（永井、金原、堀川）。	
A01-1 班 細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発—少数生体分子の計数化技術—	
 研究代表者 野地 博行 東京大学・工学研究科	
 研究分担者 渡邊 朋信 理化学研究所・生命システム研究センター	 研究分担者 市村 垂生 理化学研究所・生命システム研究センター
 連携研究者 藤田 克昌 大阪大学・工学研究科	 連携研究者 岡田 康志 理化学研究所・生命システム研究センター
A01-2 班 分子プローブと光摂動ツールの開発—少数生体分子の可視化・操作技術—	
 研究代表者 永井 健治 大阪大学・産業科学研究所	 研究分担者 金原 数 東北大学・多元物質科学研究所
 研究分担者 堀川 一樹 徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部	 連携研究者 山東 信介 九州大学・稲盛フロンティア研究センター
 連携研究者 浦野 泰照 東京大学・医学系研究科	 連携研究者 小澤 岳昌 東京大学・理学系研究科

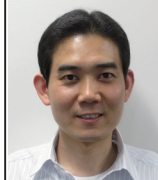
A01 公募班



研究代表者

井上 圭一 名古屋工業大学・工学研究科

「数」を視点とした走光性信号伝達過程における信号増幅機構の解明



研究代表者

山下 高廣 京都大学・理学研究科

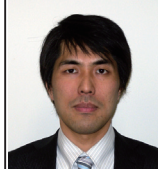
光によるGタンパク質シグナリング制御を可能にする受容体の開発



研究代表者

藤原 敬宏 京都大学・物質-細胞統合システム拠点

動的カドヘリン複合体の機能：3次元1分子超追跡法の開発による解明



研究代表者

水上 進 大阪大学・工学研究科

光機能性プローブを用いた生体分子の少数活性化



研究代表者

高橋 章 徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部

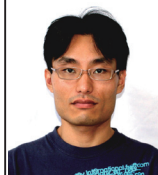
腸炎ビブリオにおけるⅢ型分泌機能の数と病原性誘導



研究代表者

政池 知子 学習院大学・理学部

リン酸結合蛋白の微小溶液チャンバーによる、少数個蛋白質からのリン酸検出系の構築










研究代表者

村越 秀治 生理学研究所・脳機能計測・支援センター


シナプス内分子数揺らぎが可塑性誘起に与える影響

A02 班

少数性の生物学


研究の目的 <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>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）。</p> <p>細胞核内情報検索と遺伝子発現については、ゲノム情報をもつ染色体の構造ゆらぎと遺伝子発現に参与するタンパク質の少数性に起因する数ゆらぎとの関係に着目します。まず、染色体の構造ゆらぎを測定します。そして、化学反応場の構造ゆらぎが、少数の分子からなる化学反応に及ぼす影響を、計算機シミュレーションや、分子数を人為的に操作した時の遺伝子発現の変化を解析することで検討します（前島）。</p> <p>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）。</p>	
A02-1 班 細細胞内情報伝達の少数性生物学ー生命システムにおけるポアソン性の解析ー	
 <p>研究代表者 石島 秋彦 東北大学・多元物質科学研究所</p>	
 <p>研究分担者 朽尾 豪人 京都大学・工学研究科</p>	 <p>研究分担者 原田 慶恵 京都大学・物質ー細胞統合システム拠点</p>
A02-2 班 遺伝子発現の少数性生物学ー少数分子による情報探索原理の解明ー	
 <p>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</p>	 <p>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</p>
 <p>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</p>	 <p>連携研究者 吉村 成弘 京都大学・生命科学研究所</p>


A02-3 班 生体リズムの少数性生物学—生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性—


	<p>研究代表者 上田 泰己 理化学研究所・生命システム研究センター</p>	
---	---	--


	<p>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</p>	 <p>研究分担者 中嶋 正人 理化学研究所・生命システム研究センター</p>
---	---	---


A02 公募班


	<p>研究代表者 矢島 潤一郎 東京大学・総合文化研究科 染色体分離を制御する動原体に働く力バランスの定量</p>
---	--


	<p>研究代表者 並木 繁行 東京大学・医学系研究科 シナプス機能制御における少数分子の空間的コーディネートの意義の解明</p>
--	---

	<p>研究代表者 丹羽 達也 東京工業大学・生命理工学研究科 発現量の少ないタンパク質の凝集性とシャペロン要求性の解析</p>
---	--

	<p>研究代表者 小嶋 誠司 名古屋大学・理学研究科 細菌べん毛形成を1本に制御する仕組み</p>
---	--

	<p>研究代表者 小嶋 勝 大阪大学・基礎工学研究科 少数分子時における生物時計の時計安定性評価</p>
---	---

	<p>研究代表者 笠井 倫志 京都大学・再生医科学研究所 GPCRのシグナル伝達経路の分岐の仕組み：1分子観察法を用いた研究</p>
---	---

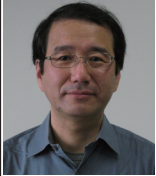
	<p>研究代表者 糸田 昌宏 京都大学・生命科学研究科 核—細胞質間の物質輸送を制御する核膜孔複合体内の分子動態の解明</p>
---	--



研究代表者

曾和 義幸 法政大学・生命科学部

生物回転ナノマシン構成素子の機能イメージング



研究代表者

川岸 郁朗 法政大学・生命科学部

分子イメージングによる異物排出ポンプ細胞内動態の解析



研究代表者

広瀬 恵子 産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門

少数のダイニンと微小管から成る振動系の作成と構造・機能研究

A03 班

少数性の生物学の理論構築と *in vitro* 再構成による検証

研究の目的 A02 班の実験で得られたデータは逐次 A03 班に送り、細胞環境場で濃度概念がどのような分子数のオーダーで出現するのか、また分子数の離散性がどのような新しい概念を創出するのかを、分子のコヒーレンス性を取り込んだ少数分子化学反応ネットワークを生命動態データから掘り起こすことを通して論じていきます（富樫、小松崎）。上記実験データ解析と並行して、反応速度定数の環境場依存性や反応速度定数そのものの成立の可否など、従来、暗黙裡に前提とされていた化学反応理論を多角的な観点から見直し、細胞内の化学反応を表現できる理論モデルを検討・構築します。また、その理論モデルをもとに <i>in silico</i> 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—	
 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	 連携研究者 寺本 央 北海道大学・電子科学研究所
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—	
 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
 研究分担者 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

A03 公募班



研究代表者

石原 秀至 東京大学・総合文化研究科

少数分子世界の細胞情報伝達理論



研究代表者

濱田 勉 北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科

ミクロ小胞内DNAの分子挙動と微小空間特性



研究代表者

鈴木 宏明 大阪大学・情報科学研究科

モデル生体膜の物質封入における1分子性の物理化学的基盤の解明



研究代表者

栗津 暁紀 広島大学・理学研究科

細胞内反応場の実効的分子数の少数性と状態・機能最適化の統計力学的研究

研究内容

「数」を視点とした走光性信号伝達過程における信号増幅機構の解明

研究代表者：井上 圭一（名古屋工業大学・工学研究科）

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と期待されています。この中でも私たちは光に対して細菌などが誘引されたり、または光を忌避したりする生理反応である「走光性」に着目して研究を行っています。走光性を示す細菌の細胞の中で光を受け取る重要なタンパク質がセンサーロドプシン（SR）と呼ばれる膜タンパク質です。光によって活性化されるとSRはトランスデューサー（Htr）やCheタンパク質といった下流のタンパク質に信号を伝達して、最終的に細胞の遊泳の駆動力を生み出すべん毛モーターの回転を変化させてることで、菌体の光に対する走性を制御していると考えられています（図1）。ここで一つの細胞内には、4,000個程度のSRが存在していますが、そのわずか1%にあたる40個程度のSRが活性化されるだけで、細胞の遊泳パターンに変化が現れるといわれています。このような極めて効率的な信号伝達が行われる背景にはSRからべん毛モーターへ信号が伝達される過程において、信号の増幅が行われるためであると考えられています。その詳細は全く明らかになっていません。そこで本研究において、私たちは蛍光エネルギー移動（FRET）一分子観察を使って（図2）、タンパク質同士がどのように相互作用するのか、またさらにその時タンパク質の構造がどのように変化して信号が伝達されていくのかを明らかにすることで、微生物の走性全般に関連する信号伝達過程や信号増幅のメカニズムの解明を目指します。

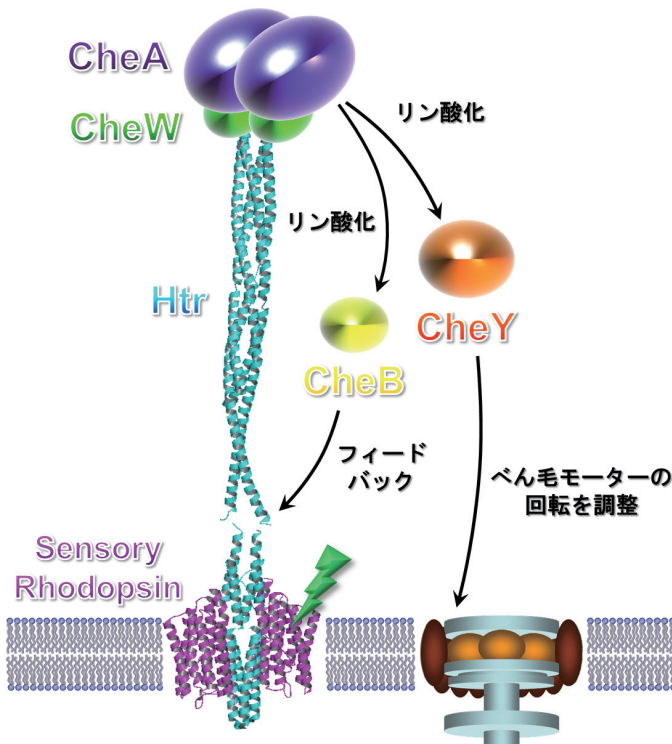


図1. 細菌の走光性に関わるタンパク質

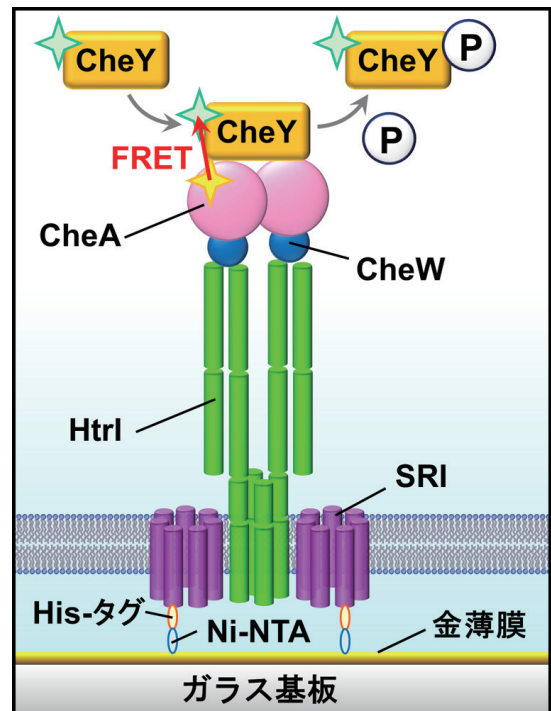
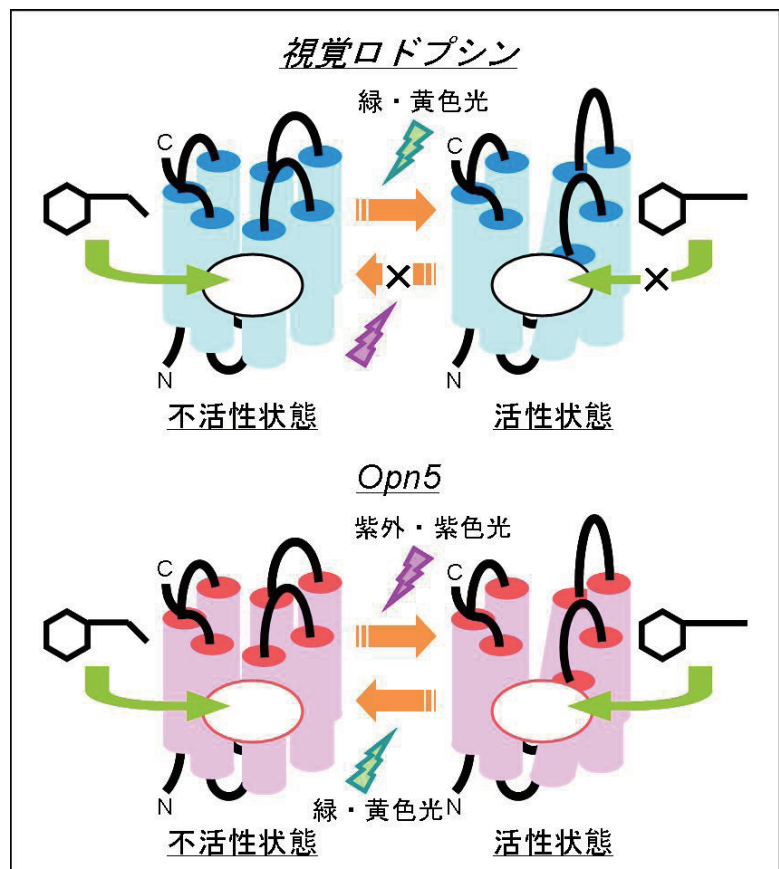


図2. 本研究で用いるタンパク質への情報伝達過程の一分子観察法

研究代表者：山下 高廣（京都大学・理学研究科）

Gタンパク質共役型受容体は、ヒトゲノムにおいて約 800 遺伝子が存在し、現在使われている薬の約 30%のターゲットになっているとも言われます。このように多くの細胞において重要な働きをしているGタンパク質シグナリングによる cAMP、IP₃、Ca²⁺ などの細胞内濃度変化を、光によって非侵襲的に制御するオプトジェネティクスの試みが始まっています。その際に、動物の光受容タンパク質として最も研究が進んできた脊椎動物の視覚ロドプシン（代表はウシロドプシン）の改変タンパク質が開発されてきました。ロドプシン類は光を受容するために発色団としてレチナールをタンパク質内に結合する必要がありますが、ウシロドプシンは11シス型レチナールを結合しないと機能することができません(下図)。しかし、網膜など一部の組織以外では11シス型レチナールの供給メカニズムが見いだされていないため、種々の組織・細胞に適応できる汎用性に乏しいと考えられます。

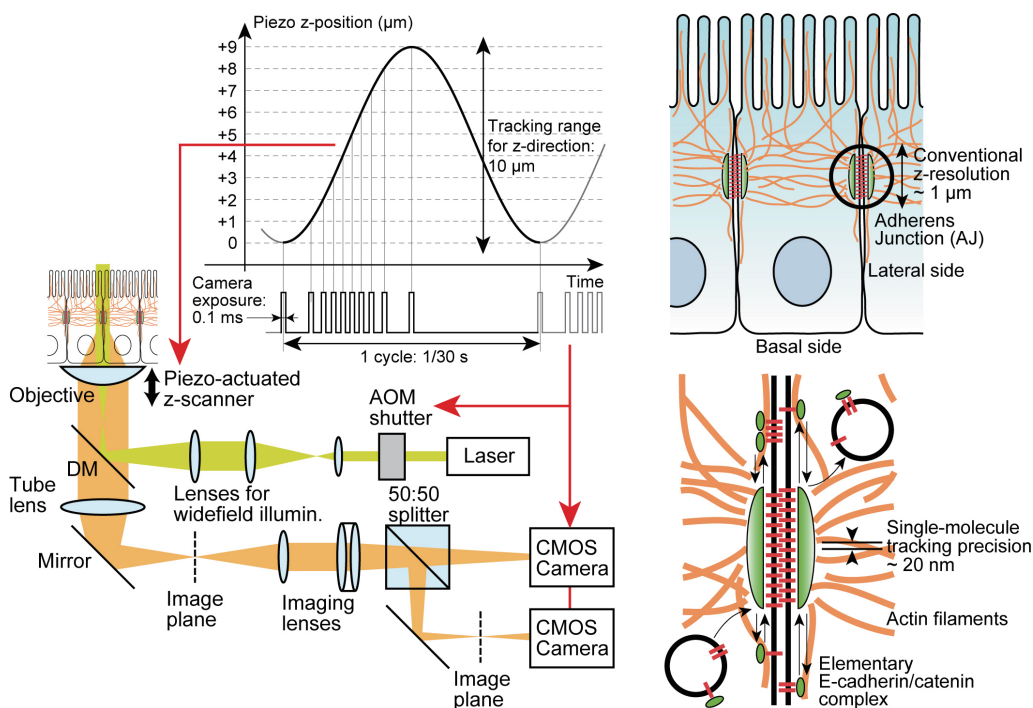
私たちは最近、脊椎動物に広く見られるロドプシン類の1種 Opn5 の分子特性の解析を行い、11シス型レチナールを結合し紫外光により活性状態を形成する以外にも全トランス型レチナールを直接結合し光非依存的に活性状態を形成できることを見いだしました。また、活性状態は可視光により不活性状態へと変換します。つまり、Opn5 では不活性状態と活性状態は、紫外光・可視光といった適当な波長の光を照射することにより相互変換可能であることがわかりました(下図) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; *PLoS One* 2012)。これまで、全トランス型レチナールを発色団とする古細菌やクラミドモナスのポンプ・チャンネル型のロドプシン類は、多くの組織・細胞で機能することが確認されています。動物のロドプシン類でも全トランス型レチナールを結合できるものの方が多くの組織・細胞で光受容タンパク質を形成でき、汎用性が高いと考えられます。そこで本研究では、脊椎動物以外の動物に見られるものも含めいくつかのサブタイプに分類される Opn5 について解析を行い、さらにはそれらの分子特性変換を行うことで、オプトジェネティクスのツールとしてふさわしいものを作製することを目指します。



研究代表者：藤原 敬宏（京都大学・物質-細胞統合システム拠点）

本研究では、サブミリ秒時間分解能で生細胞上の1蛍光分子を追跡できる、高感度-高速カメラ顕微鏡システムをさらに発展させ、2種類以上の蛍光分子について、多数分子を同時に、1分子毎に追跡できる、3次元1分子イメージング顕微鏡を開発することを目的としています。これまで、対物レンズのフォーカスを33ミリ秒（ビデオ速度）の間に深さ方向に10ミクロン走査し、1ミクロンおきにサブミリ秒露光時間での撮像をおこなうために、対物レンズピエゾZスキャナの選定と、駆動モードの評価をおこないました。対物レンズの負荷のもとでのピエゾZスキャナの応答から、正弦波駆動が最も安定していることが分かったので、これに同期して励起光照明と撮影をトリガーし、フォーカス面をずらして撮影した1分子蛍光像から3次元の位置決めをおこないます（左図）。それにより、縦横30ミクロン、深さ方向10ミクロンの直方体中の1分子毎の運動を、ビデオ速度で追跡することを目標としています。

少数性生物学のパラダイムとしては、細胞が集合して組織を作るための、きわめて重要な素過程である、細胞間接着構造（アディーレンス・ジャンクション= AJ）の形成、分解機構をとりあげます。開発した3次元1分子イメージング顕微鏡を用い、細胞間接着が起る縦軸方向に走る細胞膜上で1分子の動きを追跡します（右図）。そこで、「細胞間接着分子E-カドヘリンや、細胞中のアンカー・シグナルタンパク質カテニンが形成する、短寿命、少数個のタンパク質複合体（動的少数E-カドヘリン複合体）が動的ユニットとなり、これらがアクチン線維と相互作用しながら会合し、大きなAJ構造を形成する。このような動的複合体は、ルースに結合してAJを形成するので、分解も短時間で完了できる。」という作業仮説の可否の検証をもとに、研究を推進します。

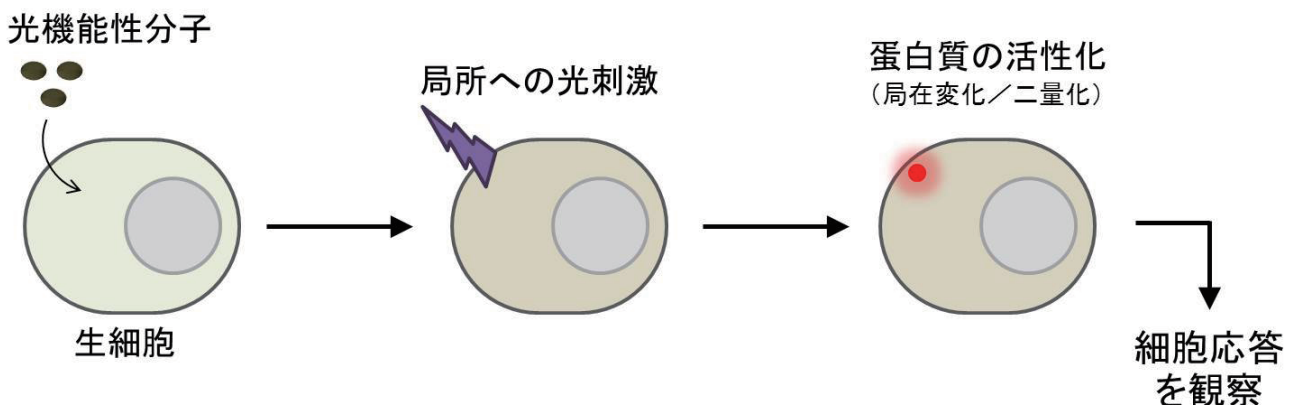


細胞内に存在する少数分子は通常の生化学実験法では検出困難であり、その少数分子数の解析には何らかの工夫が必要です。一方、少数分子の数を直接測定する研究手法以外には、その分子数を時空間的に精密に制御し、それによる細胞応答を観察するというアプローチにより、生体分子の“数”の意義を解析することも可能だと思われれます。そこで本研究では、細胞内外の蛋白質を定量的に活性化する技術の開発に取り組みます。具体的には、細胞表面あるいは細胞内の標的蛋白質を光照射によって活性化させる技術を開発します。光を用いることで、活性化させる蛋白質数を制御できると考えられます。研究項目としては、Ⅰ. 生細胞内の蛋白質を連結する技術の開発、Ⅱ. 光による蛋白質機能の活性化技術の開発の順に行い、最終的にⅢ. 少数の蛋白質分子を活性化する技術の開発、に繋がります。

Ⅰ. 「蛋白質連結技術の開発」では、研究代表者らが開発してきた変異体β-ラクタマーゼ (BL-tag) に基づく蛋白質ラベル化技術を利用して、タグ蛋白質同士を連結する合成低分子プローブを開発します。

Ⅱ. 「蛋白質機能の光活性化技術の開発」では、生細胞内における蛋白質の連結または解離を光で制御する低分子プローブを開発します。光応答性分子の設計には、光を吸収すると結合が開裂する「ケージド化合物」や光異性化反応を起こす「フォトクロミック化合物」を利用します。また、蛋白質の連結や解離を活性の制御に繋げるために、①局在変化によって活性が変化する、あるいは②ダイマー化／オリゴマー化によって活性が変化するといった特性を示す細胞蛋白質を標的とします。

Ⅲ. の「少数の蛋白質分子の活性化」に繋げるためには、上述の有機化学と蛋白質化学を組み合わせたアプローチに加え、本領域内で研究されている最先端光学技術を積極的に取り入れる必要があります。これにより、生きた細胞内の標的蛋白質を定量的に活性化し、蛋白質の少数性に関する研究を促進するような新たな有機化学的手法の開発を目指します。



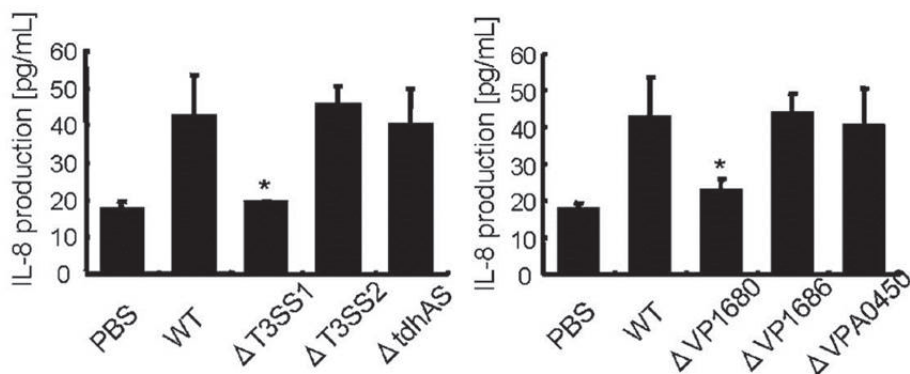
研究代表者：高橋 章（徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部）

細菌が病原性を発揮するとき、細菌内の病原因子を宿主細胞内に注入する機構を持つものが知られています。腸炎ビブリオでは長年耐熱性溶血毒（thermostable direct hemolysinTDH）が病原性発現に中心的な役割を持つと考えられてきました。しかし、全ゲノム配列が決定され、大小2つの環状染色体より構成されること、2セットのⅢ型分泌装置（Type Three Secretion System：TTSS）を保有していることが明らかとなってきました。腸炎ビブリオではTTSSが2組存在しており、TTSS1は細胞毒性に関与しTTSS2は腸管毒性にそれぞれ関与すると考えられています。このTTSSは一つの細菌に約10～50個存在していると考えられており、その数と活性が変化することで病原性が変化すると考えられますが、その制御機構の詳細は不明です。

私たちはこれまで腸炎ビブリオの病原性発揮機構に関する研究を進めてきました。すでにVP1680などの病原因子がTTSS1を介して宿主細胞に注入され宿主細胞に炎症反応を引き起こすことを見出しています。しかしTTSS1やVP1680の細胞あたりの数は非常に少なく、TTSS1数とVP1680分泌能が病原性誘導活性にどの様に関与しているのか、従来からある濃度依存的な反応速度論のみで説明することは難しい状況です。そのため少数の蛋白質とその機能に制御される反応（マクロ的な病原性）を理解するためには、少数分子の挙動を厳密に測定したうえでマクロ的な挙動を説明する理論を構築することが必要だと考えられます。

本研究では、TTSS1に焦点を当てます。細菌の状態に対応したTTSS1数と病原因子（VP1680）数の厳密な測定をもとに、宿主細胞への炎症反応誘導機構の新たな説明法を考案します。本研究の成果は、病原性細菌と宿主間における反応の新しい反応機構モデルを提唱する可能性があり、細菌の病原性発揮機構の完全な理解につながると考えられます。

VP1680はIL-8産生を引き起こす



HeLa細胞に腸炎ビブリオを感染させるとIL-8の産生増加が認められます。しかしTTSS1の破壊株ではIL-8の産生増加は認められません。これはTTSS1がIL-8の産生増加に必要なことを示します。さらにTTSS1により分泌されるVP1686やVPA0450の破壊株ではIL-8の産生増加が認められますが、VP1680の破壊株ではIL-8の産生増加が認められません。これらよりVP1680がIL-8の産生増加に必要なことを示しています。

1. 概要

少数個の蛋白質から放出される少数個の無機リン酸 (以下 P_i) を検出するための実験系を開発するのが本研究の目標です。研究対象の蛋白質 1 個～数個を数十フェムトリットル以下の体積をもつ超微小チャンバーに閉じ込め、 P_i が生成する酵素反応を進めます (図 1)。そのチャンバー内に蛍光標識したリン酸結合蛋白を共存させ、 P_i が結合する事による蛍光強度の増加から P_i の生成個数と速度を見積もります。

2. 目的

細胞内には P_i が関与する化学反応を触媒する蛋白質が多数存在します。ATP 加水分解の自由エネルギーを利用して運動するモーター蛋白質などもその例です。これらの蛋白質が細胞内において少数個で高濃度を實現して働くときの分子協同性や分子個性、エルゴード性を明らかにしたいと考えました。そこで、超微小チャンバーとリン酸結合蛋白を使って通常の 1 分子観察では可視化することが困難な P_i の個数測定を目的としました。

3. 研究内容と展望

PDMS 樹脂でできた容積 64 フェムトリットルのチャンバーアレイ (図 1) に極低濃度まで希釈した回転分子モーター F_1 -ATPase を封入すると、1 個の蛋白が閉じ込められたチャンバーがところどころにできます。このチャンバーにおける ATPase 反応の進行を蛍光顕微鏡で観察しました。既知濃度の P_i を用いて測定したチャンバーの蛍光強度を基準として P_i 生成速度を見積もると、 F_1 -ATPase の ATPase 活性と同程度でした。この事から、この実験系の有用性が示されました。また、チャンバー内のガラス表面に固定された蛍光標識蛋白質 1 分子の段階退色から会合数を決定する実験も行い、サブユニット会合数と P_i 生成の関係を調べる実験系の検討も行っています。今後はチャンバー体積を小さくするか、微小体積を作る別の技術も応用し、 P_i の検出限界を下げ、究極的には 1 個のリン酸の生成を長時間で検出できる実験系の構築を目指します。

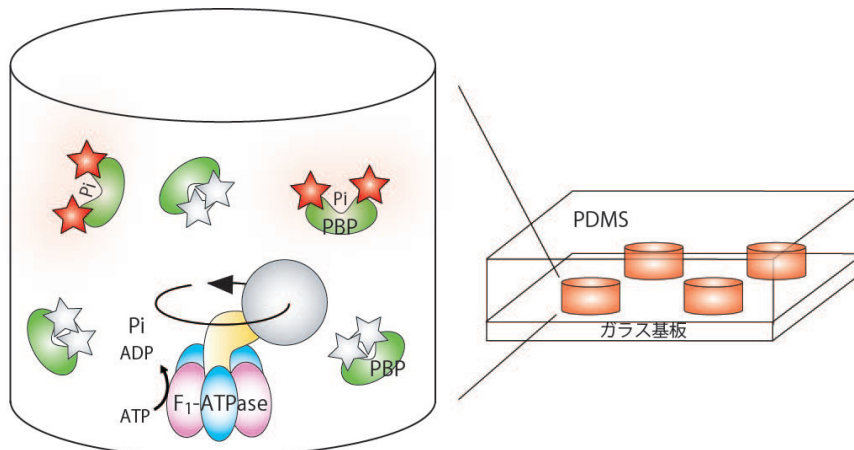
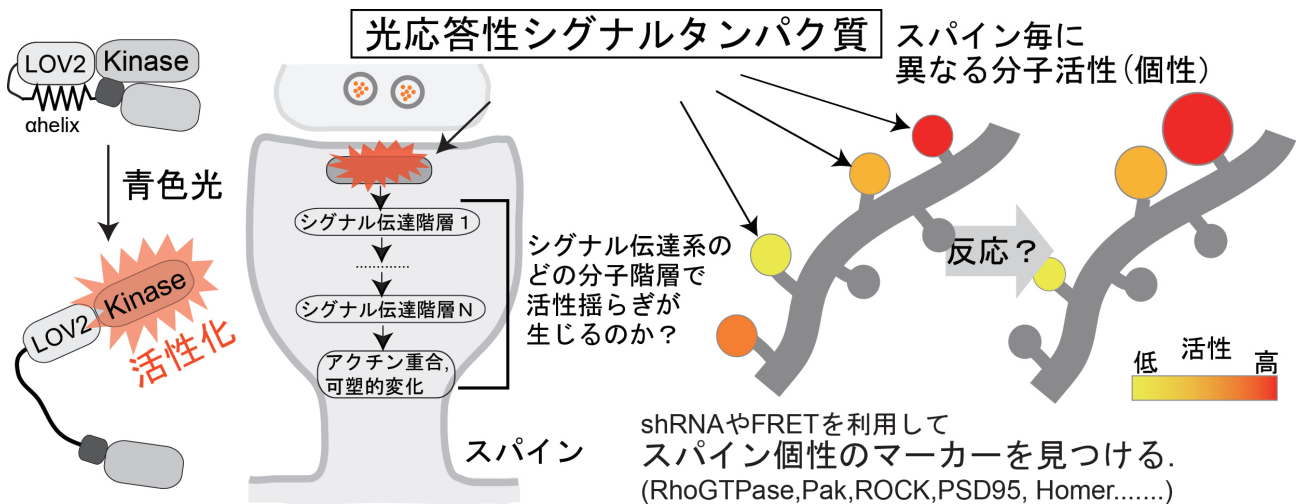


図 1 超微小チャンバーによるリン酸検出法, PBP: リン酸結合蛋白

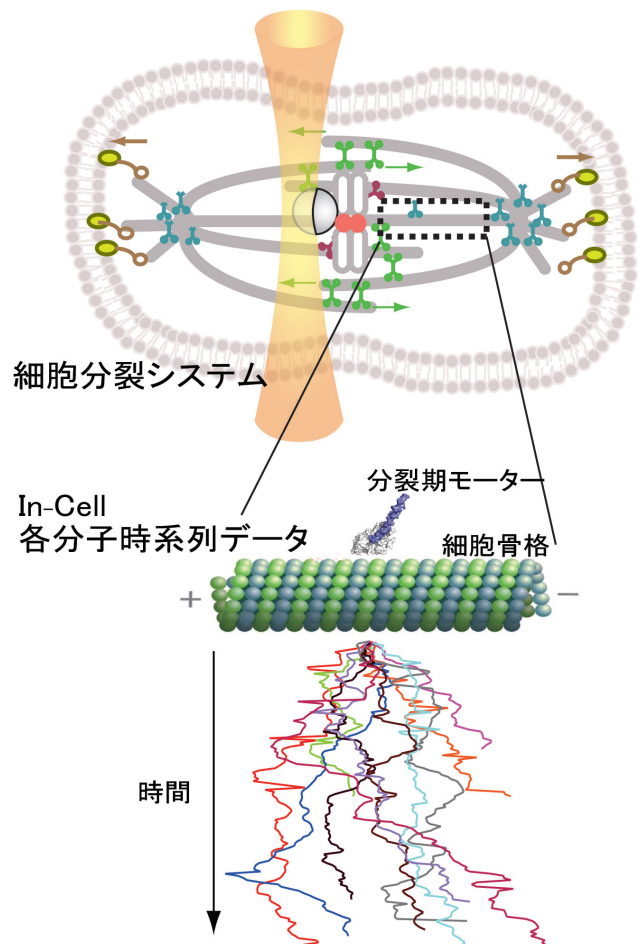
研究代表者：村越 秀治（生理学研究所・脳機能計測・支援センター）

記憶形成の最小単位であるシナプスの後端を形成するスパインの大きさは0.1 フェムトリッター程度の容積しかありません。これは、ある分子が細胞に100 nMの濃度で発現しているとする、1個のスパインには10分子程度しか存在しないことを意味しています。すなわち、このような微小領域では、各種分子数のゆらぎが機能に大きく影響している筈です。しかしながら、既存の方法ではシナプスに一定の入力を与えることができないため、入力に対する揺らぎ応答と機能を調べることはできませんでした。そこで本研究では、神経細胞シナプスの長期増強発現に必須のタンパク質に着目し、その分子活性を青色光照射で、“ミリ秒レベルの時間分解能”と“マイクロメートルの空間分解能”で制御できるように遺伝子改変します。この分子を用いて、様々なレベルの分子活性を示しているスパインを刺激し、反応性（スパイン体積増大や長期増強）の違いを2光子顕微鏡や電気生理学実験により調べます。さらに、2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡（2pFLIM; 2-photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscope）を組み合わせることで、神経細胞上のスパイン内で様々な組み合わせのシナプス分子間相互作用を可視化し、スパイン毎に異なる強度の分子間相互作用を示す分子の組み合わせを見つけます（シナプス個性）。このようにしてシナプス応答の個性を決める分子を同定し、さらに機能に与える影響を調べます。

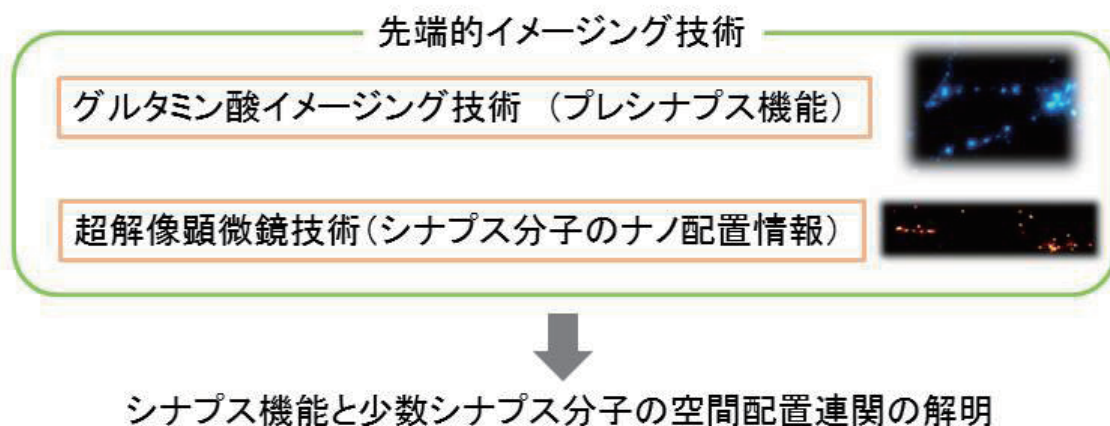


新規に光応答性のシグナル分子を開発
→ シナプスの入力に対する応答を調べる。

「生命に共通な現象をいくつか挙げてください？」と問うと、まず間違いなく「細胞や DNA が 2 つになること」という答えが返ってきます。この最も基本的な生命現象の一つである細胞分裂は、様々な生体分子の複雑なネットワークがダイナミックにその形態を変え、複製された染色体 DNA が正しく細胞の両極に分配される、精緻に制御された生命独自のシステムです。ここでは、細胞質溶液中を縦横無尽に拡散運動するタンパク質分子（例えばモータータンパク質）は、ATP の加水分解や（脱）リン酸化などの化学的なシグナルにより、相互作用するタンパク質との結合性が制御され（化学反応による制御）、同時に、集合体形成や結合タンパク質との物理的な接触やそれに伴う形態の変化により、運動特性が制御されています（力学的相互作用による制御）。この化学⇔力学反応の相互情報伝達により、細胞内でランダムに振る舞う個々のモータータンパク質や細胞骨格・染色体などが、適切な場所で特定方向への運動に変換され、双極性の紡錘体と呼ばれる分裂装置が生じます。そしてこの分裂装置が機能すると、染色体を確実に 2 つに分離・分配し、細胞質をおおよそ 2 つに分割します。しかしながら、「個々のモータータンパク質が如何に特定の運動方向性を獲得するのか?」、「染色体が如何に特定方向に運ばれるのか?」、「少数の制御タンパク質により如何に自律的に分裂装置が組み上がるのか?」、など細胞が二分する分子システムには、まだまだ分からないことが多数あります。本研究では、蛍光標識した少数の生体分子の振る舞いを‘いきのまま’ 3次元空間でイメージングできる技術に加え、染色体分離装置内の生体分子に対し、力学的な操作が可能な光ピンセット技術を統合した顕微システムの構築を目指します。そして、個々の分裂期モーターが特定の運動方向を獲得する分子機構を明らかにするとともに、染色体分離の各過程に力学的な摂動を外部から与え、そこでダイナミックに働く少数のタンパク質の応答を定量し、適度に動的不安定性（自律性・可塑性）を備えた細胞分裂システムの解明を目指します。



神経回路機能の調節においてはシナプス前終末の先端にあるアクティブゾーンと呼ばれる構造からのシナプス小胞からのグルタミン酸などの神経伝達物質の放出パターンが重要な役割を担っています。アクティブゾーンは $0.5 \mu\text{m}$ 程度と非常に微細な構造であり、そこに存在している分子やシナプス小胞の放出部位の個数は少数であることは自明です。シナプス小胞の放出部位の個数や放出確率はアクティブゾーン内の微少領域（ナノドメイン）での少数の制御分子が空間的に適切な調節を受けることによって制御されていると考えられているものの、未だその実験的な証明はなされていません。私たちは「ナノドメインにおいて少数の制御分子が空間的に調節されることによって、シナプス機能が可塑的な制御を受け、外部からの入力パターンに対応してシナプスの性質を決定している」という仮説の証明を目標として研究を推進します。本研究では放出部位の形成に必要な分子を同定し、同定した分子がナノドメインでどのような空間的調節を受けて放出部位の個数や放出確率を変化させているのかをグルタミン酸イメージング技術や超解像顕微鏡技術を駆使して明らかにします。加えて、神経入力のパターンに応じてシナプス可塑性を実現するためのシナプス小胞放出部位の個数や放出確率の制御が、ナノドメインにおける制御分子のどのような空間的調節によってなされているのかという点の理解を目指します。以上の成果を基に、シナプス機能の制御が少数の制御分子で行われることの重要性や意義を解明したいと考えています。



研究代表者：丹羽 達也（東京工業大学・生命理工学研究科）

タンパク質は細胞活動のあらゆる場面で様々な機能を発揮する分子であり、その種類は非常に多岐にわたりますが、機能だけでなく細胞内の存在量も非常に大きく異なることが知られています。私達は過去において、原核生物のモデルである大腸菌の全タンパク質（約4千個）を再構築型の無細胞タンパク質合成系を利用して分子シャペロンが全く存在しない条件で発現させ、その凝集性を調べるといった研究を行ってきました (Niwa et al, PNAS, 2009)。その結果の中で、私達は「タンパク質の凝集性と、細胞内の存在量は逆相関する」という知見を得ました (図1)。細胞内で大量に存在するタンパク質については、細胞内で機能を存分に発揮するため、または細胞内で邪魔にならないために凝集しないように進化してきたと考えれば説明が付きませんが、では細胞内の存在量が非常に少ないタンパク質が凝集しやすいという点について、この意味をどのように考えればよいのでしょうか。

細胞内での存在量は、遺伝子の発現だけでなくタンパク質のレベルにおいてもシャペロンやプロテアーゼ等によって制御されています。そのため細胞内での存在量が少ないタンパク質では、これらによる認識が他のタンパク質と比べて異なる可能性が考えられます。実際に私達は GroEL というシャペロンについて、その新規基質を質量分析によらない戦略を用いて探索することで、細胞内での発現量が非常に少ないタンパク質の中にも GroEL の助けを必要とするものが存在することを明らかにしました (図2)。またこれらの新規基質の多くは GroEL がないと細胞内で分解を受けやすいことも確認されました。このように発現量が少ないタンパク質の細胞内でのシャペロン・プロテアーゼとの関係性を調べることで、細胞内で少数しか存在しないものがどのように機能を発現しているかについて理解することを目指しています。

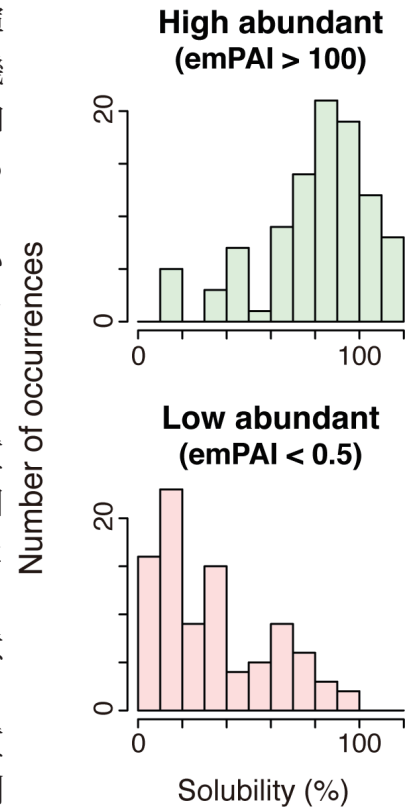


図1 細胞内の発現量とタンパク質の凝集性

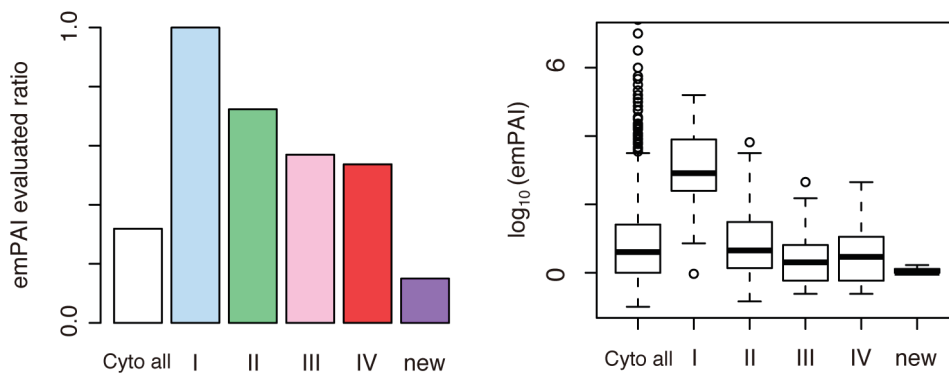


図2 新規 GroEL 基質と既存の基質との発現量などの比較

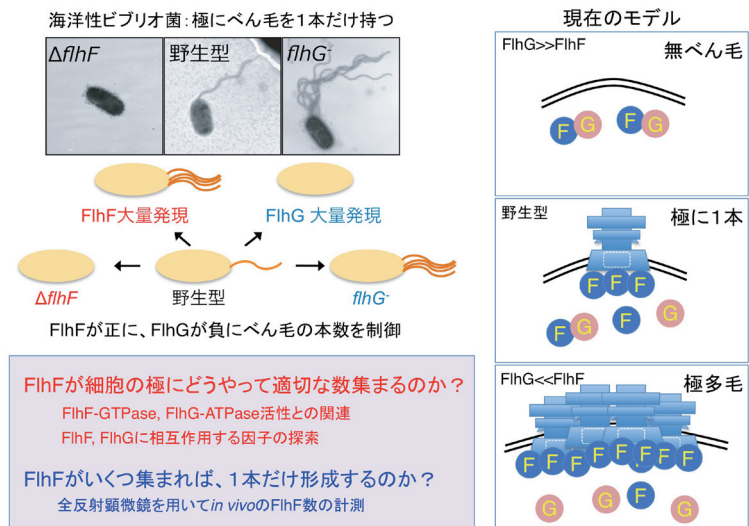
細胞の機能を担う超分子複合体は、細胞内の指定された場所に必要な数の分子が自己集合して機能しています。この現象は高等生物だけでなく構造の単純な細菌でも共通に見られます。細菌は効率良く運動するために、べん毛の形成位置と本数を厳密に制御していることが知られています。私たちは、細胞の極に 1 本だけべん毛を形成するビブリオ菌をモデル生物として、細胞における超分子の位置と数の制御機構を解析してきました。私たちはこれまでに、同一オペロン上に存在する GTPase の FlhF と ATP 結合モチーフを持つ FlhG がべん毛の本数と形成位置を制御していることを明らかにしました。

FlhF 自身は極に局在しべん毛数を正に制御し、FlhG は FlhF に作用し極局在を阻害することで負に制御しています。しかし、なぜ極に 1 本だけべん毛を形成できるのか、分子レベルでの詳細なメカニズムは分かっていません。本研究では FlhF と FlhG の生化学的活性が、本数・位置を制御するのか詳細に調べることを第 1 の目標としています。続いて

FlhF/FlhG と結合する因子の免疫沈降と質量分析による同定、及び欠失変異体からの抑圧変異の取得を行うことで、FlhF と FlhG の関わるネットワークを調べます。そして、蛍光標識した FlhF の細胞内動態観察を本領域で開発される少数分子可視化技術を用いて行い、何分子の FlhF が極に集合することで 1 個の基部体形成を開始するのかを明らかにしたいと考えています。

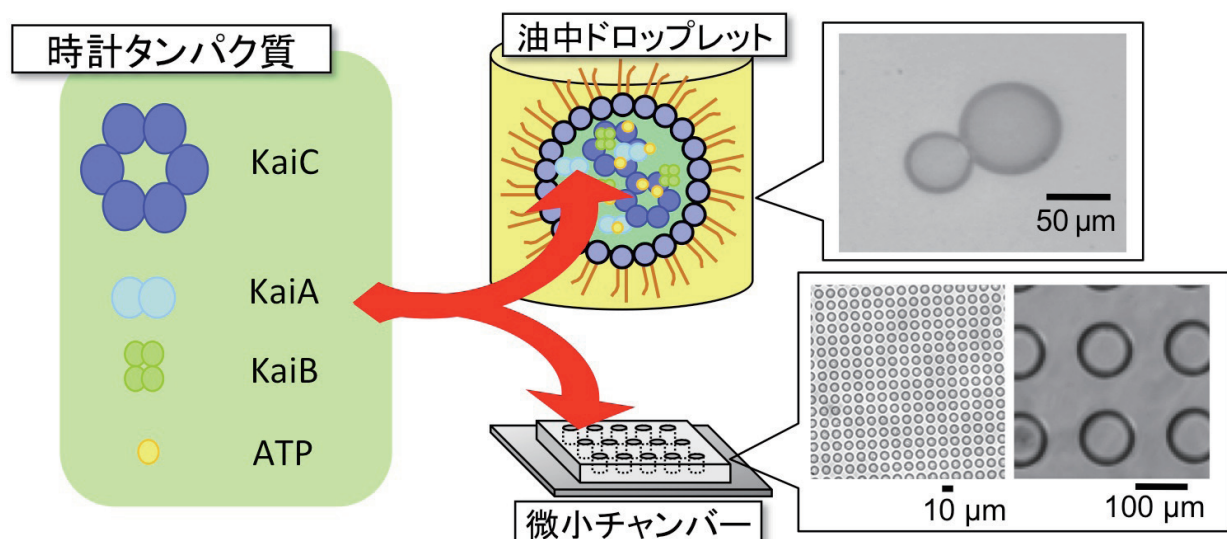
初年度は、FlhG による負の制御機構に着目して研究を進めました。FlhG は細胞分裂に関与する MinD に相同性を示し、MinD の機能には ATPase 活性が必須であることが分かっています。FlhG の ATPase モチーフ残基に変異を導入すると、べん毛本数や軟寒天培地上における運動能、および FlhG 自身の極局在に影響が現れ、FlhG の推定 ATPase モチーフがべん毛本数制御と関連があることが分かりました。FlhF は分泌蛋白質の膜へのターゲティングを担う FtsY/Ffh とホモロジーがあり、同じ GTPase ファミリーに属していることから、べん毛の本数・位置の制御が蛋白質輸送系と共通の機構で行われる可能性があります。高等生物にも一般化できる知見が得られると期待して研究を進めています。

FlhFとFlhGによるべん毛本数制御モデル



生物は生理的周期を維持するために体内に生物時計を備えています。例えば、高等動物から原核生物に至る、自然界で広く見られる昼夜の変化に対応したほぼ 24 時間の概日（サーカディアン）リズムは生物時計により制御されています。光合成を行う細菌であるシアノバクテリアも生物時計を備えています。驚くべきことに、シアノバクテリアの持つ、ほぼ 24 時間の概日リズムは、わずか 3 種類のタンパク質 KaiA、KaiB、KaiC と ATP によって生み出されており、この生物時計の発振機構を試験管内再構成することができるという特徴があります。再構成された生物時計は外環境の温度変化に対しても安定であり、このような頑強性を実現する機構の詳細は明らかになっていません。

本研究では、この唯一、試験管内再構成が可能なシアノバクテリア由来の時計タンパク質を脂質二重膜小胞による微小空間、またはマイクロ・ナノ微細加工技術に基づいて作製した微小空間（容積サブフェムトリットルのナノメゾサイズチャンバー）内に封入し、分子数を制御した上で環境条件を変化させ、外乱に対する時計活性の正確性、それらの分子数との関係を明らかにすることを目指します。これにより、生体機能の外環境の揺らぎに対する対応機構とその限界に迫る知見を得ることができないのではないかと期待しています。最初の段階として、リン脂質で被覆された油中ドロップレット中における時計の再構成実験を行っています。この試みと並行してマイクロチャンバー・微量作業用マイクロツールの作製も行っています。これらの技術を組み合わせることで、生物時計タンパク質の外環境への頑強性と分子数との関係を明らかにすることを目指します。



シアノバクテリア由来時計タンパク質を微小空間に封入再構成し、
時計活性を検出→正確性と分子数との関係を明らかに

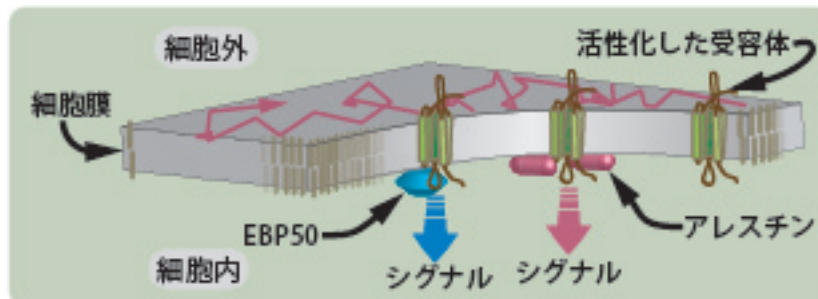
研究代表者：笠井 倫志（京都大学・再生医科学研究所）

細胞を形作っている細胞膜の上には、多種多様な受容体と呼ばれるタンパク質が存在しています。これらは、細胞外の様々なシグナル分子と特異的に結合した後に、下流のシグナル分子と相互作用することで、細胞外のシグナルを細胞内に伝える、という働きをしています。言い換えると、こうした一連のシグナル伝達の過程は、数個の分子同士についての結合と解離の巧みな制御であるので、それらの結合と解離を1つずつ直接に調べることができれば、複雑に入り組んだシグナル伝達経路であっても、順序立てて明解に説明できるはずです。

多くの受容体では、一つのシグナル入力に対して、細胞内でのシグナル伝達経路がひとつだけ活性化するのではなく、複数の下流のシグナル経路が同時に活性化すると考えられていますが、単一のシグナル入力が、どのようにして並存するシグナル経路を活性化しているのか、という、シグナル経路の分岐を説明する仕組みについては、よい説明がありません。そこで、三量体Gタンパク質を活性化するGPCRと呼ばれる受容体の一つ、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を例にとり、GPCRと、下流のシグナル分子とが細胞膜上で相互作用する様子をまず捉え、シグナル分子同士が結合解離の様子を捉えることにしました。

このような分子同士の相互作用を捉えるために、3つの異なる蛍光色素を別々のタンパク質に特異的にラベルして、受容体、受容体に結合するシグナル分子であるアレスチン、および、EBP50を同時に一分子ずつ可視化することで、3種類の分子の相互作用を一度に調べる方法を新たに開発して用います。そこで、3つの分子のうち、1) どれとどれが、2) どのような順番で結合し、3) どれくらいの時間結合し、4) どのような順番で解離するのか、またさらに、5) 分子複合体を構成する分子の個数の見積もりを正確に行うことで、シグナルが分岐する過程を完全に解明することを目指しています。

図 $\beta 2$ アドレナリン受容体のシグナル伝達過程の一部



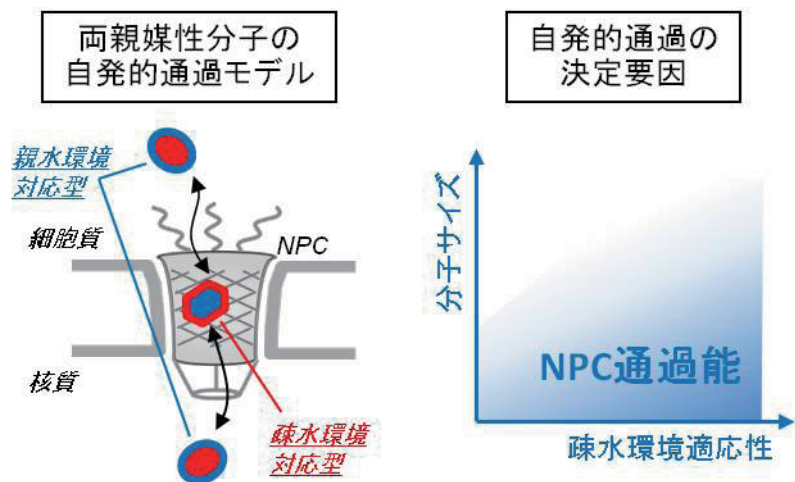
EBP50、およびアレスチンを経由し、異なるシグナルが細胞内に伝わる様子

研究代表者：桑田 昌宏（京都大学・生命科学研究科）

真核生物にとって、細胞核—細胞質間の物質輸送の適切な制御は、細胞の恒常的機能維持や適応的機能応答に必須な重要なシステムです。核膜においてその物質輸送を担う核膜孔複合体（Nuclear Pore Complex: NPC）は、約 30 種類のサブユニットの八量体からなる巨大分子複合体であり、一般的な動物細胞核には 3000~5000 個ほどが存在し、一 NPC あたり毎秒約 14MDa という膨大な量の分子通過を制御しています。これまでに、約 40kDa 以下の小さい分子が拡散により NPC を通過する「受動拡散」機構と、核輸送シグナルなどを持つ分子がインポーチンなどの輸送担体の仲介により通過する「能動輸送」機構が提唱されてきましたが、このどちらにも当てはまらない例は数多く存在し、何が通り何が通らないのか、という本質的理解には至っていません。

我々はこれまでに、インポーチンに加えてアクチニン・スペクトリン・βカテニンなど、上記二つの機構に当てはまらない形式で NPC を通過する分子に着目してきました。これらの分子は特徴的な両親媒性ヘリックス構造を持ち、疎水的溶媒中では分子表面の疎水性領域を有意に増加させることが分かりました。この疎水性領域の増加はヘリックス構造の増減によるものではないことから、分子構造（フォールディング）の変化によって親水的／疎水的の双方の環境に適応していると考えられます。これらの結果から我々は、“疎水的環境に容易に対応しうる分子ほど NPC 通過の敷居が低い”と考え、「自発的通過」モデルを提唱しました。我々は、NPC における分子選別はこれまで考えられていたほど厳密なものではなく、構成因子の少数性に起因する不安定なアウトプットがあると考えています。

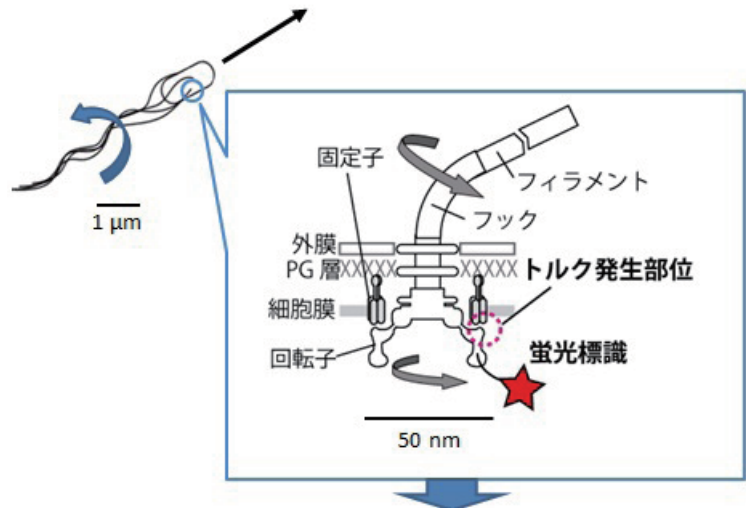
このモデルによる分子選別機構が正しければ、これまで蛍光顕微鏡観察などにより核内には存在しないと考えられてきた因子でも、その疎水環境適応性に依りてごく少数の分子集団が核内に到達していると考えられます。このような例として我々はアクチニンやケラチンの新規核内局在を報告したほか、近年多くの同様な報告がなされています。これらの核内成分は、少数集団ではあっても細胞の恒常的機能やシグナル伝達などにおいて必須の重要な役割を果たしているものもあり、NPC の機能的ゆらぎによる自発的分子通過が生物学的に意義のあるものであることを示唆しています。



研究代表者：曾和 義幸（法政大学・生命科学部）

多くの細菌は、細胞本体から突き出したらせん状のべん毛フィラメントをスクリューのように回転させて水中を自由に泳ぎ回ります（図）。べん毛フィラメントの回転は、その根元の細胞膜に埋まる直径約 50 nm のべん毛モーターによって駆動されます。このモーターは、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れ込むプロトンをエネルギー源として回転します。また、数十種類のタンパク質が自己集合して構築されること、1 秒間に 100 回転を越える安定な高速駆動が可能であること、回転方向をミリ秒以下で瞬時に切り替えるスイッチ機構を備えることなど、多くの優れた特徴をもつ回転ナノマシンです。べん毛モーターの本体はフィラメントにつながる回転子と回転子を取り囲むように配置される約 10 個の固定子から構成されます。回転子は 26 と 34 の 2 つの異なる構造周期性をもつリングが重なった複合体であり、その周期性ミスマッチが鍵となる協同的作用がモーター回転に重要な役割を果たしているのではないかと興味深い回転モデルも提唱されています。また、固定子はペプチドグリカン層とよばれる強固な網目構造に結合して回転子と相互作用します。興味深いことに、モーターに組み込まれている固定子が細胞膜上を漂っているものと交換されることが観察され、その名前から期待されるような静的なものではなく動的な振る舞いをする事が明らかとなりました。

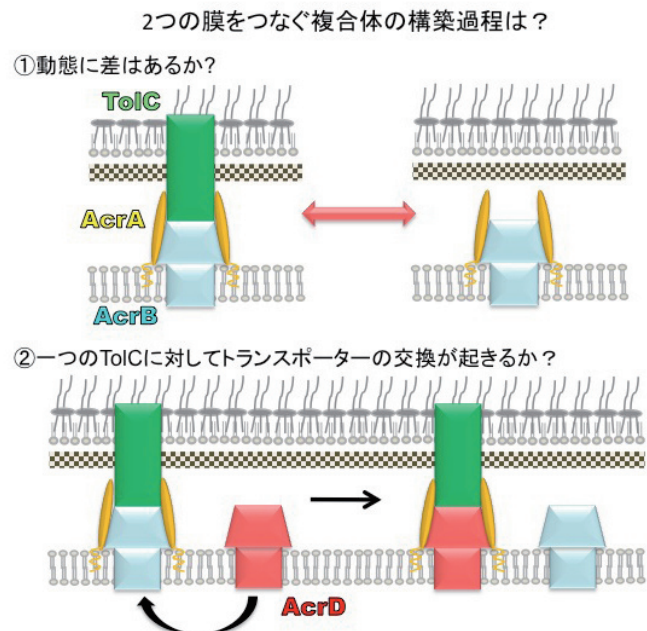
本研究課題では、モーター内の比較的少数個のタンパク質が協調してダイナミックに機能する様子の可視化を目指しています。しかしながら、従来のべん毛モーターの機能解析では、モーターが細胞質側でトルクを発生するにもかかわらず、細胞外に突き出したフィラメントの動きを詳細に計測するというアプローチが主たるものでした。そこで今回、モーター構成素子を蛍光標識して、回転トルクの発生時における個々の分子の動きを高精度に追跡したいと考えています（図）。現在、1 分子レベルで蛍光観察が可能な全反射蛍光顕微鏡の構築およびモーターの回転子・固定子タンパク質の蛍光標識法の検討をおこなっています。



モーター構成素子の動きを1分子レベルで追跡する

図. べん毛モーターの模式図および研究概要図

抗生物質や抗癌剤の使用に伴って、細胞が多剤耐性化して薬剤が効かなくなってしまうことが社会問題となっています。この多剤耐性能の主たる要因の一つは異物排出“ポンプ”の発現にあり、多剤排出能をもつポンプは原核生物から高等動植物まで広く分布しています。その細菌における代表格ともいえるのが RND 型と呼ばれる異物排出トランスポーター複合体です。この複合体は、細胞内膜に局在し、基質を捕獲・輸送する“内膜トランスポーター”、外膜に局在し、内膜トランスポーターから輸送される基質の輸送通路を構成する“外膜チャンネル”、両者をつなぐ“膜融合蛋白質”からなっています。モデル生物である大腸菌は、RND 型異物排出系内膜トランスポーターを 5 種類もっていますが、そのうち AcrB のみが常に発現しています。AcrB も、それと複合体を形成する外膜チャンネル 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 単量体に結合すると考えられています。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す。このような少数の要素分子から構成されるナノ装置がどのように“協同的”に作動するのでしょうか。本研究課題では、とくに細菌細胞中で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という点に着目しています。興味深いことに、大腸菌のもつ RND 型異物排出内膜トランスポーターはすべて TolC を外膜チャンネルとして利用しています。このとき、環境刺激により新たに合成された内膜トランスポーターは、すでに TolC と複合体を形成している内膜トランスポーターと置き換わり、新規複合体を構築するのでしょうか（トランスポーター交換モデル）。それとも、新たに合成された TolC と複合体を構築するのでしょうか（*de novo* 構築モデル）。また、基質薬剤の存在は複合体コンポーネントの会合・解離に影響するのでしょうか。このような異物排出系の構築過程は菌の多剤耐性化の鍵でもありますが、未だによくわかっていません。そこで、本研究課題では、異物排出ポンプ複合体の会合・解離のダイナミクスの解明を目指し、蛍光イメージングによる解析を行っています。



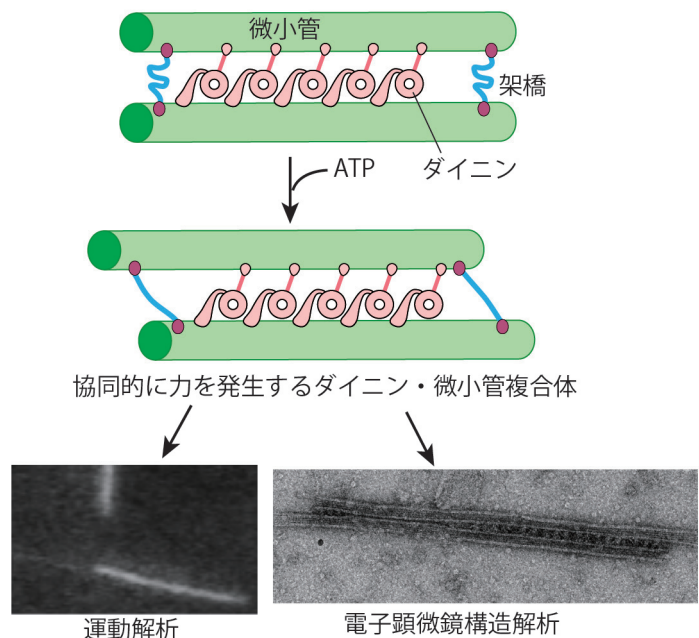
研究代表者：広瀬 恵子（産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門）

鞭毛・繊毛の波打ち運動は、その内部に規則的に配列した多数のダイニン分子によって駆動されます。ダイニンは、ATP の加水分解によって生じるエネルギーを利用して、微小管上を定められた方向に運動するタンパク質分子モーターで、鞭毛・繊毛内で隣り合う微小管の間の滑り運動を起こします。私たちは、一方向に進む分子であるダイニンが複数個で協同的に働くことにより、どのような新機能が生まれ、繊毛・鞭毛の波打ち運動を可能にするか、という問題に興味をもって研究を進めています。

複数個の分子が協同的に働く方法として、まず、分子同士の直接相互作用が考えられます。鞭毛・繊毛内のダイニンは、24 nm の周期で微小管上に配列しており、隣接するダイニンの間には直接の相互作用があります（図）。個々のダイニンの構造変化の情報は、このような相互作用によって他のダイニンに伝わり、他のダイニンの運動に影響を及ぼすと考えられます。

また、個々のダイニン分子の発生した力は、微小管を通じて他のダイニン分子に影響を及ぼします。鞭毛・繊毛内では、隣り合う微小管がネキシンという繊維状分子で架橋されており、微小管が滑り合うと負荷がかかります。したがって、ダイニン分子間の協調には、微小管を通じた力による制御も関わると考えられます。

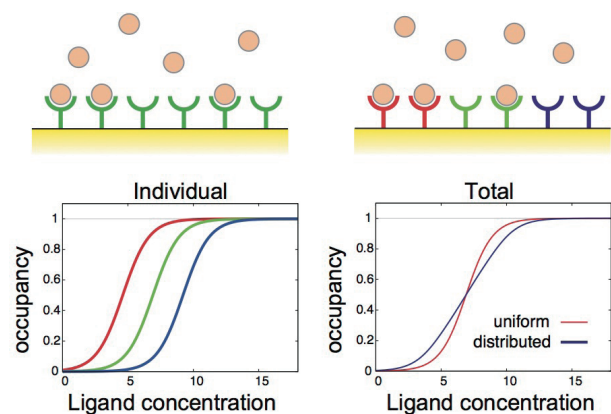
ダイニン分子の協調の仕組みを理解するために、私たちは、協同的に力を発生しているダイニンの電子顕微鏡構造解析を試みています。高分解能構造研究を可能にするために、2本の微小管の間に十～数十個程度のダイニン分子が配列した *in vitro* の系を作成します。2本の微小管を、ネキシンに対応する構造で架橋することにより、微小管が滑り合った時に負荷が生じます。このような少数個の分子から成る運動系を開発し、クライオ電子顕微鏡法をもちいて構造を解析することによって、ダイニン・微小管系の協同的力発生機構の理解を目指します。



多様に変わる環境のもとで、細胞は外部刺激を読み取り、適切な応答を示します。一方で、外部環境をセンスするレセプター自体、さまざまな要因からくる「ゆらぎ」や「ばらつき」を持ちます。このような分子間のばらつきは、本領域の表紙イラストを見たときに感じられる、「ひとつひとつの分子の個性」(molecular individuality)とも捉えられます。では、個性を持った分子の集合の協調は、どのような細胞機能が現れるのでしょうか？本研究は、情報処理の観点から分子間のばらつきの利点や限界を理論的に明らかにすることを目指します。

レセプター分子がばらつくことの利点として、細胞の外部刺激への応答能が上がる可能性が挙げられます。これは直観的には以下のように説明されます。もし膜上のレセプター分子がリガンド分子に対し全て同じアフィニティを持つならば、同じ強度の刺激に対し全てのレセプター分子が同じように応答すると考えられますが、細胞が応答できる刺激強度(ダイナミックレンジ)が規定されてしまうことから、これは外部環境のシグナル強度が大きく揺らぐ場合は得策ではありません。むしろ分子間でアフィニティをばらつかせ、分子間で異なる刺激強度に対応して応答を担わせた方が、ダイナミックレンジが広がり、応答能力を高くすることができます(いわば、個性があることで、分子間で「分業」が達成される)。タイムスケールも重要なパラメータです。強い刺激が来た時には、刺激の持つ情報の確度も大きく、素早い応答が好ましいと考えられますが、弱い刺激は相対的に揺らぎが大きく(情報確度も小さい)、しばらく時間を見てから(時間平均を取ってから)応答を開始した方がよいでしょう。したがって、アフィニティとともに、各分子が働くタイムスケールもばらつく方が良いと考えられます。

もちろん、分子数の有限性やゆらぎ・ばらつき自体は、応答能に好ましくない効果も与えるので、ばらつきの程度が問題になってきます。本研究では上で述べたアイデアを、情報理論を用いることで、細胞にとって有利なばらつきの大きさやタイムスケールの分布や限界、また分子的に妥当な実装を探っています。これまでの多くの研究では連続的・平均場的な描像に立った議論が行われてきましたが、分子の個性を考えることで、細胞内プロセスの新しい描像を出すことを目指しています。

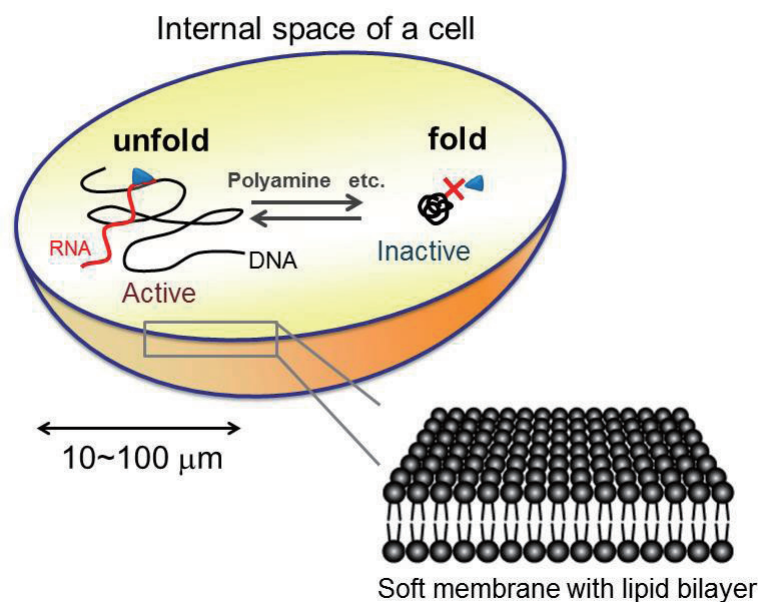


研究代表者：濱田 勉（北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科）

本研究課題では、DNA 分子を内部に含む細胞サイズ膜小胞を構築し、分子複合システムの微小空間特性（分子少数性および膜表面効果）を解明することを目的とします。従来行われてきた試験管内での生化学実験では、細胞がおかれている境界条件（マイクロメートルの微小空間）は無視されてきました。しかし、細胞サイズのマイクロな空間になると、試験管サイズでは現れてこなかった特異性（細胞内の分子数が少ない事による揺らぎの効果やサイズが小さい事による表面効果など）が顕在化します。我々は、細胞 1 個体レベルに相当する空間スケールでのモデル実験が可能な細胞サイズリポソームを用いて、膜の動的構造や内部での分子反応を解析し、細胞内での分子複合システムの特性を明らかにしてきました [1]。また、油中液滴をリポソーム前駆体として用いることで、目的の物質を効率的に細胞サイズ小胞内に封入する実験系を開発しています [2]。本研究課題では、遺伝子 DNA の高次構造転移に着目し、ソフトな脂質膜で囲まれた微小空間内での DNA 分子挙動を明らかにします。DNA は細胞内の代表的な少数分子であり、その高次構造は遺伝子発現反応と密接に関わっています。実験で得られた DNA 高次構造変化の微小空間特性を基に、細胞内の少数分子システムを記述する分子反応理論を構築します。

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

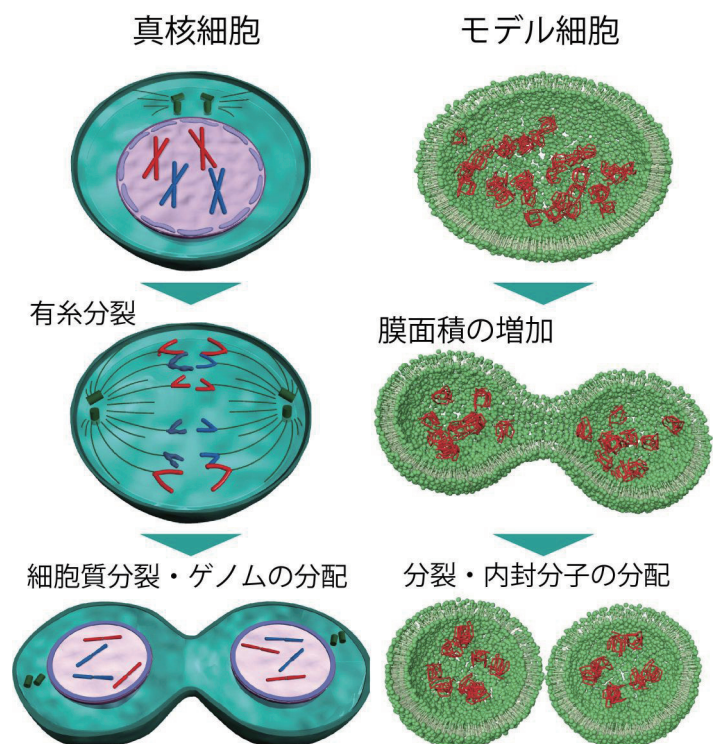
[2] T. Hamada, et al., *J. Phys. Chem. B*, 112, 14678-14681 (2008).



細胞は細胞質成分を含む膜の袋であり、ゲノムに代表される内封少数物質がその細胞の表現型を決定します。真核細胞は、有糸分裂において高度な蛋白質の制御を駆使して娘細胞にゲノムを分配しますが、原核細胞ではそのような機構がなくともゲノムが正しく分配されます (Kleckner et al., *PNAS*, 2004)。細胞膜中に存在する巨大物質が細胞膜分裂に伴って均一に分配され、1 個性を維持するメカニズムは蛋白質の働きにのみ帰せられるのでしょうか。自己組織化の観点から、より基本的な物理的効果の寄与はあり得るでしょうか。

我々は、細胞膜モデルである脂質二重膜小胞（リポソーム）を用い、その成長（融合による膜面積増加）や分裂が物理的過程によって連続的に起こり得ることを示しました (Terasawa et al., *PNAS*, 2012)。本研究ではこれを発展させ、リポソームの融合や分裂によってその膜構造が大きく変化する際に、少数内封物質の離散性がどのように変化し得るのかを実験的に検証します。リポソーム膜と内封物質の相互作用がなければ、リポソーム内の物質封入や分配はランダムであり、封入物質数はポアソン分布に従うはずですが、これらの物質間で物理的・化学的な相互作用が存在すれば、封入数はポアソン分布からはずれ、1 個の物質のみを含む確率が增加する条件があり得ると予想されます。内封物質の排除体積効果等の物理的要因が封入物質の 1 個性に寄与し得るとの仮説の下に、その条件を詳細に検証します。

本研究を通して、細胞の制御機構は、セントラルドグマの観点からだけではなく、実体を持つ物質としての物理化学的相互作用・自己組織化作用の側面も持ち合わせるということを議論したいと考えています。また、モデル細胞の性質を探る研究は、細胞を使ったバイオテクノロジーの代替技術や、自己複製や自己修復という特徴を持った工学技術にも、新しい設計概念やツールを提供すると考えています。



研究代表者：粟津 暁紀（広島大学・理学研究科）

研究の概要：細胞内の化学成分の中には、その数が「少ない」ものが少なからず存在すると言われています。しかしそのように言われますと、以下のような疑問も浮かびます。

- ・ 化学反応系において、分子の「小ささ」「多さ」の基準は何であるのか？
- ・ 細胞は「実効的」にどのような分子数的状況で、活動しているのか？

そこで本研究では、(i) 生体膜中・膜上など、空間的制約が強い2次元的な場、(ii) 細胞内小器官やその膜間領域、及び小器官間領域といった多様な形状の狭い空間、等といった典型的な細胞内環境において、このような空間的特徴ゆえに顕著となる分子の排除体積の影響と、それによる「実効的分子数」変化の影響を受けつつ進行する化学反応過程について、非線形動力学的・統計力学的な考察を進めます。

本研究における成果：GPCR シグナル伝達系の上流過程のような、細胞膜上で起こる生化学反応過程について、分子の排除体積を考慮したシグナル伝達系モデル（図 (a)(b)）を例に、理論的に解析しました [1]。その結果、膜上における分子混合いの効果により、シグナル伝達効率が分子密度に対し複雑な依存性を示す事（図 (c)）、この依存性が、反応過程と排除体積効果によって自発的に生じる分子分布の特徴的なパターン形成（図 (d)）に起因している事、等を見出しました。現在はこのモデルの解析と応用を進めると同時に、小胞等の狭い空間中における酵素反応に対する、基質や酵素の形状・変形の影響についての研究も進めています。

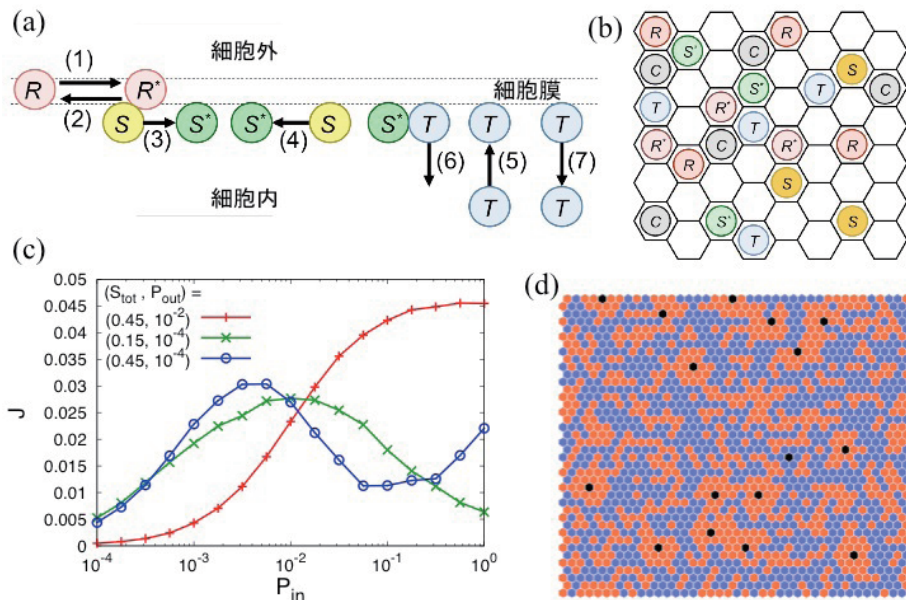
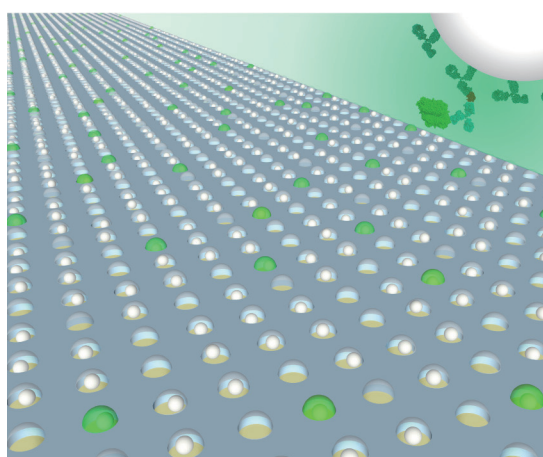


図 1 : (a) 膜上シグナル伝達系モデルの反応スキーム。
 (b) 空間の効果。
 (c) モデルにおけるシグナル伝達効率の膜上分子密度依存性。
 (d) 分子混雑時に形成される典型的な分子分布パターン。詳細は [1] を参照下さい。

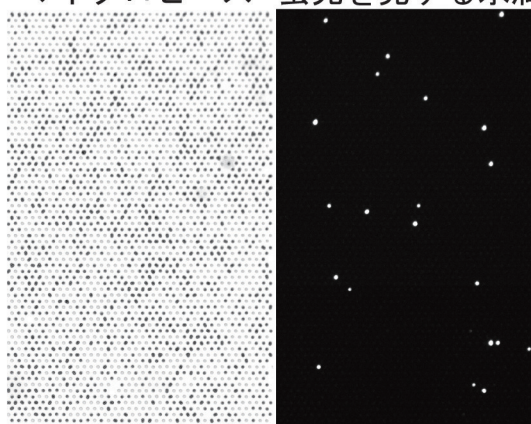
[1] M. Fujii, H. Nishimori, and A. Awazu (2013), PLoS ONE (inpress)

活動報告

本学術領域における我々のミッションは、1細胞に由来するタンパク質を定量する手法の確立です。特に、蛍光標識されていないタンパク質数を計測することを目的に、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を高感度化する研究を行っています。これまでの ELISA 法は、検出用抗体に結合した酵素の反応生成物量を定量することでターゲット分子量を見積もっています。これに対して、今回我々が開発したのは、1分子デジタル計数法に基づくデジタル ELISA 法です¹。この手法では、捕捉用抗体で表面修飾したマイクロビーズ上に確率的にターゲット分子を捕捉し、さらに酵素で標識された検出用抗体を結合させます。ターゲット分子の濃度が非常に低い場合、各ビーズは0もしくは1分子のターゲット分子と検出用抗体を結合します。このビーズを体積数フェムトリットル (10^{-15} l) の微小溶液チャンバー内に捕捉します。そして、この微小溶液チャンバー内で検出用抗体に結合した酵素（ここでは β ガラクトシダーゼ）の蛍光アッセイを行います。検出用抗体が存在する場合、溶液チャンバーは蛍光信号を発するため、光るチャンバーをカウントすることでターゲット分子の数を直接求めることができます。このように、信号を二値化することで分子を計数する手法を「デジタル計数法」と呼びます。本研究では、モデル反応として前立腺腫瘍マーカーである PSA に対する1分子デジタル ELISA を行いました。その結果、本手法の検出限界値は、比較対象として行った通常の ELISA の検出限界値 (14 pM) よりも 100 万倍高感度な 2 aM (10^{-18} M) という値を得ました。これは、 10μ l あたり僅か 12 分子しかなくても検出できることを意味します。現在、この手法を1細胞中のタンパク質計数法として応用を試みています。



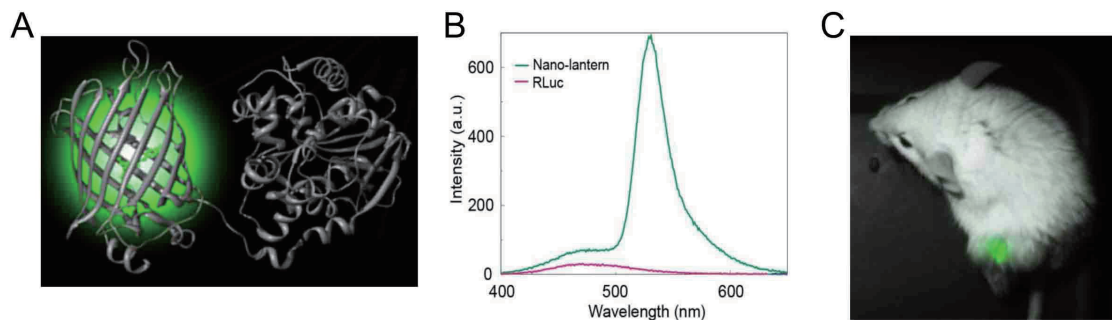
マイクロビーズ 蛍光を発する水滴



References

1. Kim, S. H.; Iwai, S.; Araki, S.; Sakakihara, S.; Iino, R.; Noji, H. *Lab Chip* 2012, 12, (23), 4986-91.

少数性生物学にアプローチするには生きた細胞内における生体分子の数や機能を操作しつつ、何が起きているのかを時空間的に可視化して解析することが重要になります。前者は近年発展が目覚ましい光遺伝学（オプトジェネティクス）により可能になってきました。一方、後者については蛍光プローブを利用するのが一つの手段として挙げられますが、蛍光プローブの励起波長がオプトジェネティクス分子の吸光波長と重なっていると、蛍光観察の度にオプトジェネティクス分子も活性化されてしまうという問題が生じます。これでは生体分子の数や機能をコントロールしながら可視化解析することはできません。そこで本問題を回避するために、我々は励起光照射の必要がなく、発光過程に ATP を要求しない発光タンパク質であるウミシイタケルシフェラーゼ（RLuc）に着目しました。しかし、RLuc の発光シグナルは蛍光に比べて圧倒的に暗いという弱点がありました。発光量子収率が 0.05 と極めて低いことが原因です。一方、多くの蛍光タンパク質は 0.5 以上の発光量子収率を有します。そこで我々は改変型 Rlu の励起エネルギーを発光量子収率の高い蛍光タンパク質 Venus に高効率に移動させることで、既存の RLuc に比べて 10 倍以上明るく発光する Nano-lantern を開発しました（図 A,B、論文 1）。培養細胞に Nano-lantern を発現させたところ、蛍光観察と遜色ない画像が得られただけでなく、自由に動き回るマウスの体内で光る癌細胞の様子をビデオレートで撮影することに成功し、その発光強度の高さを証明しました（図 C）。また、Nano-lantern の RLuc 部分に、 Ca^{2+} と結合して構造が変わるタンパク質配列を挿入する事で Ca^{2+} を検出することが可能な機能性プローブ Nano-lantern (Ca^{2+}) も開発しました。さらに、Nano-lantern (Ca^{2+}) と細胞内の Ca^{2+} 濃度をコントロールできるオプトジェネティック分子 ChR2 を神経様に分化させた PC12 細胞に発現させたところ、青色光照射による人為的な Ca^{2+} 濃度の上昇を捉える事ができました。今後、Nano-lantern をベースに多くの機能プローブが開発され、本領域内外で開発されるオプトジェネティック分子と組み合わせることで、様々な少数性生物学にアプローチが可能になるものと期待されます。本研究は堀川一樹、松田知己、新井由之班員らとの共同研究の成果です。



A. Nano-lantern の構造模式図
B. Nano-lantern および RLuc の発光スペクトル
C. Nano-lantern によるマウス体内の colon26 癌細胞の可視化

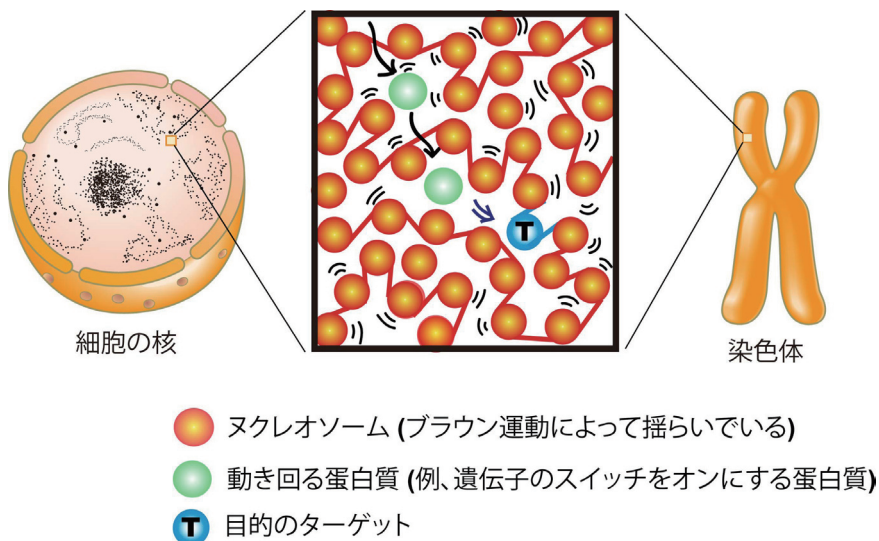
1. Saito K. et al., Nature Communications (2012) 3, 1262

私達の細胞は、わずか容量1ピコリットルの核の中に、全長2mのゲノムDNAが収納されています。このゲノム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は一般的に少数であるとされています。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でしょうか？これは「少数性生物学」の最も基本的な事例だと思われまます。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でしょうか？教科書では、DNAがヒストンに巻かれてヌクレオソームとなり、このヌクレオソームが規則正しく束ねられてクロマチン線維や、さらなる階層構造ができる様子が、定説として図示されていました。

「少数性生物学」のサポートを得て、先の研究で私たちは、定説のような規則正しいクロマチン線維は存在せず、ヌクレオソームが不規則（かなりいい加減!?)に細胞内に収められていることを突き止めました（論文1、2）。このいい加減な収納は、束縛がない分、ヌクレオソームの動きやすさにつながると思われました。

今回、「少数性生物学」領域の阪大・永井ら、理研・高橋らとの共同研究によって、細胞の中でヌクレオソームがダイナミックに揺らいでいることを見出しました（論文3）（図）。

いい加減な収納が「DNAの動きの自由度」を大きくしていたわけです。そして、このヌクレオソームの揺らぎのおかげで、タンパク質が細胞の核や染色体の中をより自由に動き、DNAとアクセスしやすくなることがわかりました（論文3）（図）。言い換えると、「揺らぎ」が遺伝情報の検索を助けていることが明らかになったのです。



1. Nishino, Y., et al., EMBO J. (2012) 31, 1644-53
2. Joti Y, et al., Nucleus (2012) 3, 404-410.
3. Hihara, S. et al., Cell Reports (2012) 2, 1645-1656

会議報告

新学術領域「少数性生物学」第1回国際会議

国際会議担当：前島 一博（国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター）

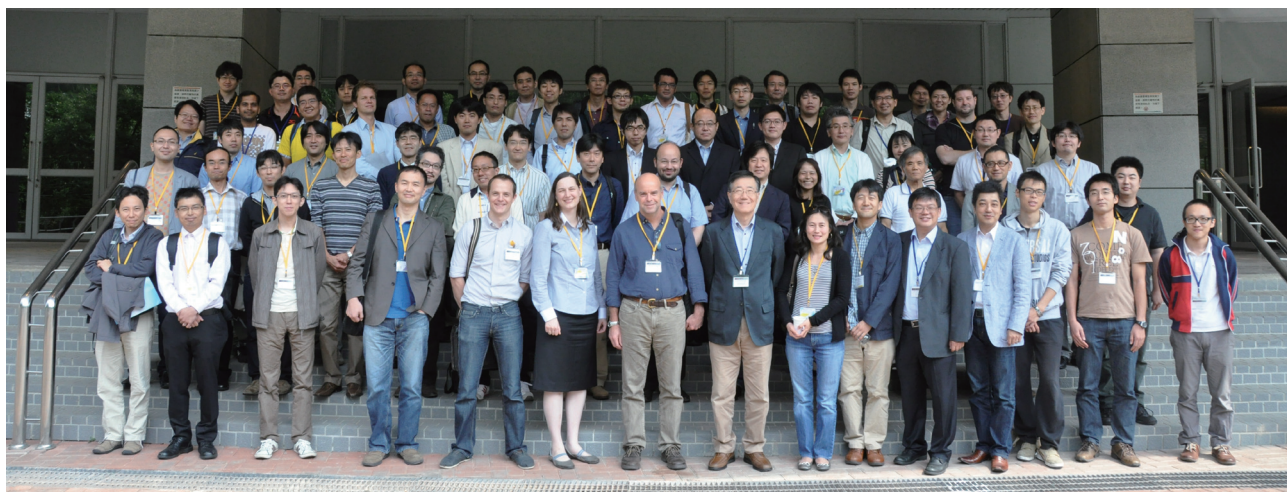
昨年10月16日(火)～10月19日(金)まで本領域国際会議 2012 Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking を台北の Academia Sinica で開催しました。領域代表の永井さんのもと、Academia Sinica の Peilin Chen さんと私が運営をさせて頂きました。海外招待演者7名、日本側からの演者13名を含む55名、Academia Sinica 側演者5名含む89名、総勢150名以上が参加し、活発な議論が行われました。Academia Sinica 側からの参加者は予想外に多く、この領域トピックスの国際的な関心の高さを示していました。

16日夕方は welcome party で盛り上がり、17日朝、永井さんの Opening remarks で会議が始まりました。午前中、理論関係のトークが6題、ランチとポスターセッションの後、テクノロジー関係が7題ありました。夜はバンケットで美味しい中華料理とお酒を頂き、議論が盛り上がりました。18日朝は、細胞生物関係が6題、ランチとポスターセッションの後、化学と生物が4題、再構成が3題あり、最後に Academia Sinica 側の所長 Tsai さんの話で幕を閉じました。夜は名所台北101やナイトマーケットで、参加者の皆さんとさらなる議論が夜遅くまで続きました。19日は議論の続きをしながら、エクスカージョンとして、故宮博物院を見学しました。さすが、台湾のひとが“much better than the one in China”と言うだけあり、珠玉の宝物が多数ありました。個人的には玉の「白菜」を間近で見られなかったのが心残りです（もう一度来たい）。

会議が開催される前、尖閣諸島問題が発生し、日本人観光客などが襲われる事件が発生しました。台湾渡航に関しても外務省から注意喚起が出ており、とても心配しましたが、会議は問題なく開催でき、Academia Sinica をはじめ多数の方と親交を深めることができました。概ね成功に終わったと思います。会議の準備に関しましては、「影の（本当の？）運営委員」である、阪大永井研究室秘書の酒井さんと助教の新井さんに深く感謝致します。お二人の貢献無くして会議の成功はありませんでした。

最後に、会場で受付をして下さった領域事務担当の笹部さんの言葉で締めくくろうと思います。「会場は受付場所も広くとれ快適でした。また、アレンジ面では、台湾側の秘書さんたちが名札作製やお弁当やコーヒー等の手配をしてくださっていましたが、日本からの参加者に気を使っていた感じで、『おもてなし』の心を強く感じました。日本では研究費の制約もあり、この『おもてなし』がなかなか実行できていないかもしれない・・・と思いました。」

Academia Sinica の人たちの「おもてなし」に感謝し、日本で開催する国際会議もこの「おもてなし」の心を大切にしたいと思います。参加者のみなさま、お疲れさまでした。



ご 紹 介

<設立の概要と目的>

新学術領域「少数性生物学」バイオナノフォトニクスコンソーシアム（以下、BNPC）は、日本発の学問領域「少数性生物学」の推進、普及に欠かせないバイオフォトニクス技術の共通利用施設および新技術開発のための産学連携活動の場として、2012年10月1日にアードール・テクノロジー PLC、オプトライン、システムブレイン、スペクトラ・フィジックス、ソーラボジャパン、中央精機、東海ヒット、ニコンインステック、日本ローパー、浜松ホトニクス、モレキュラーデバイスジャパン、という複数の企業の御協力により設立されました。BNPCの主な運営目的は以下の通りです。

- ◆少数性生物学についての議論の場
- ◆少数性生物学に係るバイオフォトニクス実験の場
- ◆少数性生物学トレーニングコース（年1回）の場
- ◆協賛企業主催のワークショップ・デモンストレーションの場

少数性生物学に興味があるものの自身の研究にどのように取り込めば良いか分からない方、細胞内の生理機能进行操作し、バイオイメージングを行うバイオフォトニクス実験のための設備が全くない、設備はあっても使い方がわからない、或いは単にバイオイメージングに適した対物レンズや光学フィルターがない、設備が老朽化して思うような操作や観察ができないなど少数性生物学とはおよそ関連がなくとも最先端のバイオフォトニクス施設を利用したい方はどなたでも利用が可能です。まずはぜひ設備の見学だけでもお気軽に当施設へお越しください。

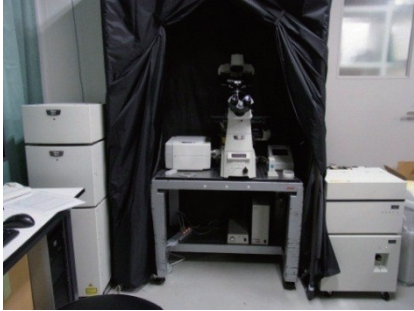
< BNPC のスタッフ >

代表	永井 健治（阪大・産研）
管理者	中野 雅裕（阪大・産研）
技術アドバイザー	
非線形光学	藤田 克昌（阪大・工学研究科）
バイオイメージング	岡田 康志（理研 QBIC）
超解像顕微鏡	渡邊 朋信（理研 QBIC）
超解像画像解析	Thomas Destinger（SOFast GmbH, Germany）
顕微鏡シミュレーター	高橋 恒一（理研 QBIC）
1分子解析	谷口 雄一（理研 QBIC）
画像解析	新井 由之（阪大・産研）
タンパク質動態解析	松田 知己（阪大・産研）

< BNPC の機材 >

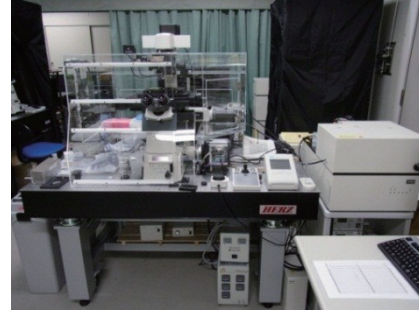
Station-1:高速共焦点顕微鏡

ニコン製の共焦点レーザー顕微鏡。高速スキャナも搭載されたため、超高速画像取得や、光刺激（405nm）と蛍光イメージングの同時実行が可能。顕微鏡上での長時間培養も可能（東海ヒット製,station2,3,4,5にも搭載）
ニコン：倒立顕微鏡Ti-E,
スペクトル共焦点システム,A1R



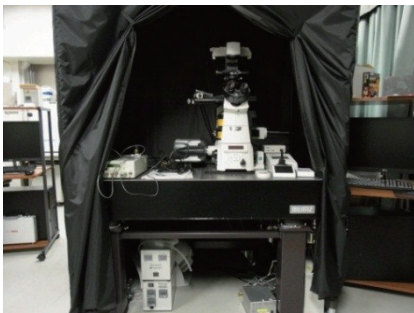
Station-2: 超解像顕微鏡

ニコン製の最新の超解像顕微鏡。空間分解能を従来の光学顕微鏡の約2倍（約100nm）まで向上させ、生細胞内の微細構造の超解像による可視化
ニコン：倒立顕微鏡, Ti-E
超解像顕微鏡システム, N-SIM



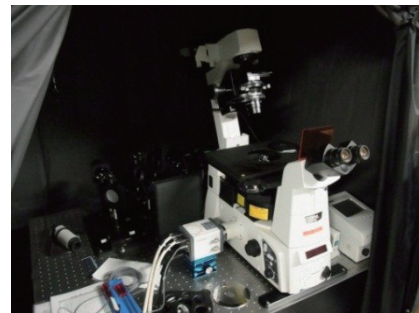
Station-3: 多点・多色・共焦点顕微鏡

全視野蛍光観察に加えてニポウディスク式共焦点システムも搭載可能。また細胞の長時間観察や多点観察も可能。
オプトライン：MESSIA,
中央精機：XYステージ,BIXYステージSTD,
日本ローパー：Zピエゾ,NanoScanZ,
アンドール：EM-CCDカメラ,ixon3,
モレキュラーデバイス：制御ソフトウェア,MetaMorph



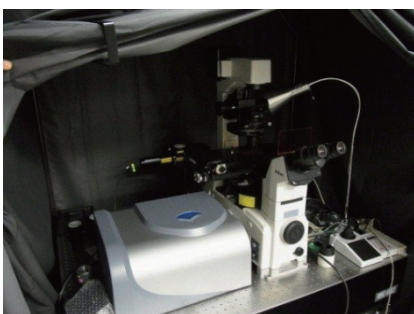
Station-4：全反射蛍光顕微鏡(TIRF)

1分子蛍光を観察可能なTIRF顕微鏡。405nmの光刺激も可能。最新のCMOSカメラを搭載。ビデオレート以上の高速イメージングも可能。
SP: CW laser, 405nm, 488nm, 561nm
浜松ホトニクス：CMOSカメラ, ORCAFlash4.0
制御ソフトウェア, HCLImage Analysis
ソーラボジャパン:全反射照明光学系セット



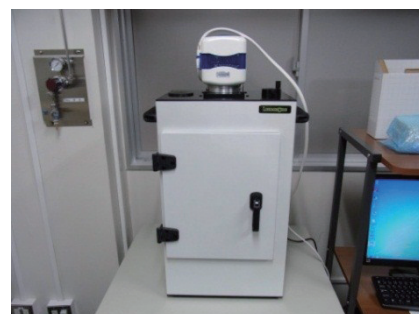
Station-5：白色光源共焦点顕微鏡

白色光源を用いた共焦点ユニットを搭載した顕微鏡。多点同時光刺激可能なMosaicシステムも搭載。
アンドール：白色光源共焦点ユニット, Revolution DSD
多点同時光刺激ユニット, Mosaic
モレキュラーデバイス：制御ソフトウェア, MetaMorph



Station-6:インビボイメージングシステム

生物化学発光を用いたイメージングに特化したシステム。in vivo観察により、極力、生体環境を変えずに、個体の標本にストレスをかけない状態で、経過をモニターする事が可能。高感度EM-CCDカメラを搭載。
日本ローパー:Lumazone CMS



光学フィルター

オプトライン：Semrock社製フィルター各種

解析用パソコン：2台（MetaMorph）

安全キャビネット、細胞培養用CO₂インキュベータ

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. 2

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

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