

「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成27年度終了研究課題—

研究総括 上田 泰己

1. 研究領域の概要

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

具体的には、

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

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 10件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「細胞機能の構成的な理解と制御」領域に設けた選考委員 20 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 先行方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 先行に当たっては、さきがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>) の他、以下の点を重視した。
①生命システムの設計・制御を通じてアドレスしようとする科学的な疑問の面白さ、②生命システムの設計・制御を実現・促進するような基盤的な技術(や枠組み)の重要さ、の 2 点(いずれかでも構いません)を重視します。これらの基準を満たすさきがけ個人研究の提案であれば、生命科学のみならず、物理学・化学・工学・情報科学・社会科学など、どのような分野からの提案も歓迎いたします。とりわけ、これまでの研究の単なる延長ではなく、世界的にみても実現されていない科学的、技術的な困難に果敢に挑戦する提案を待ち望んでいます。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			11件	内訳	3年型
対象数	186件	28件			11件
			5年型	0件(0件)	

()内は大挑戦型としての採択数。

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:



1)平成24年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・岡部 弘基研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2年間延長することが決まったため。

5. 研究実施期間

平成24年10月～平成28年3月(3年型)

6. 領域の活動状況

領域会議:7回

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

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

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

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

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

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

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

IBM 技術セミナー:1回

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

新学術合同シンポジウム:1回

平成27年2月1日(日) 北海道虻田郡留寿都村 ルスツホテル

生命動態合同シンポジウム:2回

平成27年3月16日(月)～17日(火)京都大学 稲盛ホール

平成28年3月25日(金)～26日(土)広島 シェラトンホテル広島

IBM、さががけ合同企画「生命科学を創る」パネラーによる討論会

平成27年7月14日(火)静岡県伊豆市 IBM 天城ホームステッド

H27年度 国際強化支援シンポジウム(米国)

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

JST4領域合同国際シンポジウム

平成27年11月5,6日 東京大 伊藤国際ホール

その他

研究者だけ参加の自主勉強会を年2回程度各地で実施。

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

(1)京都府立医大サイトビジット H25/3/20

・野村 真研究室

(2)京都大学、桂構内サイトビジット H25/3/20

・杉 拓磨研究室

・池ノ内 順一研究室

(3)東大本郷 サイトビジット H25/5/31

・岡部 弘基研究室

・別役 重之研究室

(4)名古屋大学サイトビジット H25/6/20

・井上 圭一研究室

(5)ロックフェラー大 サイトビジット H25/7/10

・島本 勇太研究室

(6)ジョンホプキンス大サイトビジット H25/7/12

・井上 尊生研究室

(7)理研 CDB サイトビジット H25/7/22

・戎家 美紀研究室

- (8)理研横浜サイトビジット H25/9/19
 - ・梅原 崇史研究室
- (9)理研和光サイトビジット H25/9/27
 - ・佐藤 正晃研究室
- (10)遺伝研サイトビジット H26/5/13
 - ・島本 勇太研究室
- (11)九州大学理学部サイトビジット H27/6/22
 - ・池ノ内 順一研究室

7. 事後評価の手続き

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

(事後評価の流れ)

- 平成 27 年 11 月 評価会開催
- 平成 28 年 1 月 研究総括による事後評価
- 平成 28 年 2 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1)研究課題等の研究目的の達成状況
- (2)研究実施体制及び研究費執行状況
- (3)研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4)・領域ごとの評価基準があれば、(4)以降に記載(複数可)
- (5)大挑戦型についてはさらに、大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展についても評価項目とした。(該当ない場合は削除)

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

9. 評価結果

細胞機能の再構成・設計と制御を試みることを通じて生命の本質に迫ろうとする研究課題を推進する新しい試みの領域ですが、昨年の一期生にも増して、全体的に、当初の想定以上に、大きな進展が見られたというのが印象的です。外部発表では、論文数 60 件(国際 60 件、国内 0 件)、口頭発表 181 件(海外 85 件、96 件)、その内、海外招待講演20件と、国際的にも積極的に活動した結果と思います。また、基礎研究に重点をおく当領域において、創薬やバイオ研究支援関連の特許出願件数2件(国内1件、国際1件)も、評価します。この二期生 10 名の内、池ノ内 順一研究者、井上 圭一研究者、井上 尊生研究者、戎家 美紀研究者、島本 勇太研究者の 5 名が、文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞しており、その他の研究者含め各団体からの受賞も多く、高い評価の証と言えます。

この領域を運営している中で特出すべきは、毎回の領域会議などで見られる活発なコミュニケーションです。それぞれが自らのフォーカスした技術、あるいは、日ごろから疑問を持っている事象であることからこそ、理解を深めることが出来たと言えます。人と人とのつながりの中で共同研究に発展し、ブレイクスルーがいろいろなところで起こっているところに、感銘を受けました。こういう新しい研究分野では、ジェネレーションとして、分野全体を伸ばしていく必要があります。研究を継続中の一期生 5 名、三期生とともに皆さんの団結した牽引力の賜物と、高く評価しております。もちろん、メンターの役割を果たして頂いたアドバイザーの先生方のご指導のおかげであることは、言うまでもありません。

いずれの研究課題も、領域にふさわしい成果を挙げられました。その内から1つ選ぶとすれば、井上 圭一研究者の「光で“創る”オプトジェネティクスへの挑戦」を挙げます。この短い期間に、この領域の趣旨に合致した合成生物学の素晴らしい成果を達成されました。

1. 池ノ内 順一 研究者「人工細胞作出に向けた人工脂質二重膜と生体膜の違いの解明」

細胞骨格タンパク質による細胞膜脂質の分布・動態の制御機構の解明において、微絨毛の構築に必要な脂質としてスフィンゴミエリンを同定し、スフィンゴミエリンと協働する膜タンパク複合体を同定し、タイトジャンクション領域の細胞膜脂質の解析を行い、特徴的な脂質組成であることを明らかにした。また、細胞膜 **β6b** を

安定に観察する細胞と方法論を確立し、Bleb の伸展や退縮の際に興味深い挙動を示す分子を複数同定するなど、このさきがけの期間中に多くの成果を出したことを高く評価します。

今後は、脂質と蛋白成分が膜の物性にどのように影響を与えているかを解明し、重要な構成因子の細胞内産生と膜領域への輸送機構を含めた膜の可塑的な構築の仕組みの解明を期待します。

平成26年度文部科学大臣表彰若手科学者賞、平成26年度 第7回 井上リサーチアワード、平成27年度 柿内三郎記念奨励研究賞を受賞し、今後、この分野の第一人者としての活躍が期待されています。また、最近、研究成果(特許出願)に基づき、企業との共同研究を開始して、新たな活動範囲を広げていることも特記します。

2. 井上 圭一 研究者「光で“創る”オプトジェネティクスへの挑戦」

細胞内 G タンパク質の光操作が可能なタンパク質分子ツールを開発するため、非視覚系の G タンパク質操作に向け、一般的に存在する G タンパク質のサブファミリーである Gi, Gs, Gq に共役した GPCR の細胞質ループを微生物型ロドプシンに組み込んだキメラタンパク質を創出した。Gi, Gs, Gq 共役型キメラのうち、in vitro で G タンパク質活性の評価が可能な Gi, Gs 共役型のものについて光照射によって G タンパク質の活性化が可能であることが示した。微生物型ロドプシン部分に活性化中間体の寿命を長くする変異を導入することで、さらに G タンパク質活性化能を向上させることに成功した。また、新たに Na⁺イオンを濃度勾配に逆らって、細胞外側へ能動輸送する光駆動型 Na⁺ポンプ型ロドプシンを新たに発見した。このように次々に計画通りに着実に成果を出してきたことから、本人のこの最先端分野の洞察の深さを知ることができ、大いに評価します。同領域の神谷厚輝研究者と、Na⁺ポンプロドプシンのイオン輸送メカニズムについての研究を実施している。

今後は、これらのツールを用いて、生物系の研究者と連携し、新しいオプトジェネティクスのカテゴリーを切り開いていってほしいと思います。

第8回分子科学会奨励賞、分子科学研究奨励森野基金(平成26年度)、平成26年度文部科学大臣表彰若手研究者賞などを受賞し、国内外で多くの招待講演を行っていることから、その業績に高い評価を受けていることが窺えます。

3. 井上 尊生 研究者「細胞走化性の再構築」

生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる摂動ツールを開発し、そのツールを用いて、走化性細胞による濃度勾配検出の分子機構解明を図り、その原動力が細胞膜構造の微細変化により局所の生化学反応を活性化することを明らかにしたことを評価します。

膜曲率がPIP3量という研究を進める一方で、その産生酵素であるPI3キナーゼが膜の曲率を認識しうる結果を得たのは、酵素の活性化から膜の変形が起こるのではなく、その逆が成り立ち得るのではないかという点が、予想外で大変興味深いと思います。細胞性粘菌では、同じ領域の澤井 哲研究者と共同研究を進めている点も楽しみです。

2013年度若手奨励賞(日本薬学会)、2014年度若手科学者賞(文部科学省)、R.R. Bensley Award in Cell Biology, American Association of Anatomists(2014)他国内外で多くの賞を受賞しており、国内外での学会発表の多さも抜き出ており、グローバルに活躍している。H27年度 国際強化支援シンポジウム(米国9/19-26)などのさきがけ研究者の国際活動を積極的にリードした点も評価致します。

4. 梅原 崇史 研究者「『エピヌクレオソーム』の精密な再構成による遺伝子発現制御解析」

ヒストン H3 などのタンパク質に任意の複数残基にモノメチルリジンを導入する技術を開発し、その技術を用いて、合成したタンパク質を抗原として、ヒストン H4 の Lys5 と Lys8 の両アセチル化を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発した。また、転写活性化に関わるヒストン H4 テイルの 4 個所のリジンをアセチル化したヌクレオソームコア粒子の構造・機能を解明したことにより、アセチル化「エピヌクレオソーム」およびそのクロマチン繊維が自己凝縮・自己脱凝縮する制御分子モデルを提唱している。このようにこの分野に化学合成の技術を取り入れ、独創的なエピヌクレオソームの構造解析研究を進展させていることを高く評価したい。タンパク質の任意の残基にトリメチルリジンを導入する技術開発では、後藤佑樹研究者と、また、真核遺伝子発現のリアルタイム解析系では、岡部弘基研究者との共同研究を積極的に行い、領域内を活性化させた功績も大きい。以上の成果である抗アセチル化ヒストン H4 抗体の特許出願して、その応用を企業と進めているとのこと、評価します。

今後は生命科学として重要性の高いエビジェネティックな生物現象を、生命科学の研究者と連携して、解明していただきたい。

5. 戎家 美紀 研究者「細胞間フィードバック回路による細胞運命の制御」

発生生物学の自発的細胞分化の仕組み、つまり、同じ種類の細胞からひとりでは異なる種類の細胞が生じるしくみに焦点を当て、Delta-Notch シグナルの側方抑制機構を哺乳類培養細胞上に再構成したことは、数理モデルの実証として科学的な意義が高いと思います。この人工側方抑制遺伝子回路を導入した細胞集団は、Delta 陽性細胞と Notch 活性細胞に自発的に分離して、元は均一な細胞間に違い(非対称性)を作り出すことに成功したことを高く評価します。当初目標を達成し、論文としても高い評価を得ています。

文部科学大臣表彰若手科学者賞(2013)を受賞し、国内外からの招待講演を受けるなど、今後、この分野の第一人者としての活躍を期待したい。

6. 佐藤 正晃 研究者「脳内情報を担う動的回路としての『細胞集成体』の計測と制御」

バーチャルリアリティ下で空間行動するマウスの海馬 CA1 野における細胞集成体様回路の活動をイメージングし、その行動状態依存的な短期的ダイナミクスと、経験依存的な長期的ダイナミクスを解明したことを評価します。また、細胞集成体活動からの動物の行動状態の再構成に関しては、イメージング画像の 2 次元相関に基づくクラスター解析で、神経回路活動の状態から動物の行動状態を、ある程度予測することができるようになったことは、大きな進歩と言えます。

その功績による招待講演も多く、その研究の今後が、注目されています。

今後は、「神経細胞の回路形成を細胞集成体として理解する」の当初からの課題に、どう向き合い、成果を出していくのか、を念頭に研究を進めて頂きたいと思います。

7. 島本 勇太 研究者「有糸分裂紡錘体におけるミクロな力学反応の再構成」

真核生物の微小管にある四量体分子モーター、キネシン5が隣接する微小管の間で発生する力を計測可能なインビトロ再構成システムを独自に開発し、これを用いて、微小管細胞骨格の幾何学的特徴に応じてキネシン5が多分子で協調的にその発生力を調節することを明らかにしたことを、高く評価します。この調節は、キネシン5が持つ分子の最適な弾性的硬さと微小管への親和性によって実現されていることを、初めて示唆しました。これらの成果を、一連の論文で発表し、完成度の高いさきがけ研究に仕上げられた。

この功績により 平成 27 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞、受賞し、招待講演も多く行われ、研究活動が活発に進められていることを評価します。

今後は、細胞分裂の全プロセスについて、同じ志をもつ研究者ネットワークをリードして、タンパク質分子の力学的な解析がなされることを期待します。

8. 杉 拓磨 研究者「記憶の具現化」

C. elegans の記憶を定量化する装置を独自に開発し、その装置を用いて、C. elegans の後ずさを指令する介在神経細胞 AVA と AVD を、記憶を担う細胞として同定した。さらに、神経活動をモニターする蛍光プローブを C. elegans の記憶細胞である AVA 神経細胞に導入した C. elegans を作製して、自由行動中の神経活動を長時間にわたり定量化するための装置の開発にも成功している。このように独自の解析ツールを次々に開発して、記憶操作に向けて着実な進展がみられ、大いに評価します。

今後、記憶形成過程から忘却過程に至るまでの神経活動状態の定量化を優先的に進め、これらの時系列データを利用し、最終的に、記憶の実体と考える一般法則の提案を期待しています。

これらの成果により、招待講演も多く、活躍の幅を広げている。

9. 野村 真 研究者「進化的・構成的アプローチによる哺乳類型大脳皮質層構造の再設計」

哺乳類と爬虫類の大脳皮質を構成する神経細胞の時間的・空間的な発生機構を比較し、さらに神経細胞の形態や配置を改変することにより、哺乳類型大脳皮質のフェノコピーを創出する研究で、独自に開発した爬虫類胚の個体遺伝子操作技術と、試験管内での大脳皮質再構築系を組み合わせ、哺乳類と爬虫類の神経細胞の移動様式の比較解析から、Wnt シグナルの制御機構の変化が脳構造の進化を引き起こしている可能性を明らかにした点を、大いに評価します。

今後は、この仮説を実験的に検証していき、哺乳類の大脳皮質の6層構造が、進化の過程で独自に獲得され、産み出される発生進化的機構を解明して頂きたい。

多くの招待講演や第 38 回日本神経科学学会大会でこの新しい領域のシンポジウムオーガナイザーを務めるなど、オピニオンリーダーとして、活躍している。

10. 別役 重之 研究者「細胞挙動の解析から構成的に理解するその集合体としての植物過敏感応誘

導機構」

耐病性に重要なホルモンであるサリチル酸(SA)が過敏感反応中心部で活性化し、その周囲では SA と拮抗するホルモンであるジャスモン酸(JA)が活性化していることを発見し、内側 SA-外側 JA という空間反応場がイメージでき、HR 誘導機構の基盤となる知見を得たことは大きな成果です。

今回の成果により注目され、多くの招待講演を行っている。

数理モデル化することですが、植物細胞の内部(シンプラスト)と外部(アポプラスト)がシグナル伝達と物質移動において異なった機能を持つことを勘案した時空間モデルを考えて頂きたい。

植物病害防除の根幹に関わる植物免疫システムの理解と解明に注力され、今後、この植物免疫システムの分野で、ネットワークを広げ、第一人者として活躍されることを期待します。

10. 評価者

研究総括

上田 泰己 東京大学 大学院医学系研究科・教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 28 年 3 月末現在)

上田 卓也 東京大学 大学院新領域創成科学研究科・教授/研究科長

岡田 清孝 自然科学研究機構・理事

影山 龍一郎 京都大学 ウイルス研究所・教授

菅 裕明 東京大学 大学院理学系研究科・教授

杉本 亜砂子 東北大学 大学院生命科学研究科・教授

竹内 昌治 東京大学 生産技術研究所・教授

永井 健治 大阪大学 産業科学研究所・教授

西田 栄介 京都大学 大学院生命科学研究科・教授

野地 博行 東京大学 大学院工学研究科・教授

水島 昇 東京大学 大学院医学系研究科・教授

(参考)

件数はいずれも、平成28年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	60	60
口頭	96	85	181
その他	17	2	17
合計	113	147	260

(2)特許出願件数

国内	国際	計
1	1	2

(3)受賞等

・池ノ内 順一

平成26年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H26年 4月 15日)

平成26年度 第7回 井上リサーチアワード(H26年 12月 10日)

平成27年度 柿内三郎記念奨励研究賞 (H27年 12月 5日)

・井上 圭一

平成 26 年度 第 8 回分子科学会奨励賞(H27年 9月 16日)

日本化学会 第 95 春季年会 優秀講演賞(H27年 5月 1日)

平成 26 年度 分子科学研究奨励森野基金(H26年 9月 18日)

平成 26 年度 文部科学大臣表彰・若手研究者賞(H26年 4月 15日)

平成 25 年度 光科学技術研究振興財団 研究表彰(H26 年 2 月 13 日)

・井上 尊生

平成 25 年度日本薬学会 若手奨励賞 (H25 年 3 年 27 日)

R.R. Bensley Award in Cell Biology, American Association of Anatomists (H26 年 4 月 29 日)

平成 26 年度 文部科学省 若手科学者賞(H26 年 4 月 15 日)

Catalyst Award, Johns Hopkins University, Office of the Provost (H27 年 9 月 10 日)

Discovery Award, Johns Hopkins University, Office of the Provost(H27 年 9 月 10 日)

SPIE's Systems Biology Pioneer Award, International Society for Optics and Photonics (H28 年 4 月 17 日)

・梅原 崇史

平成 26 年度 理化学研究所 横浜事業所 所長賞(H26 年)

・戎家 美紀

平成 25 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H25 年 4 月 16 日)

・島本 勇太

平成 27 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H27 年 4 月 15 日)

(4)招待講演

国際 20件

国内 30件

別紙

「細胞機能の構成的な理解と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成28年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
池ノ内 順一 (兼任)	人工細胞作出に向けた人工脂質二重膜と生体膜の違いの解明 (九州大学理学研究院生物科学部門)	九州大学 理学研究院生物科学部門 准教授 (京都大学大学院工学研究科准教授)	44
井上 圭一 (兼任)	光で“創る”オプトジェネティクスへの挑戦 (名古屋工業大学大学院工学研究科)	名古屋工業大学 大学院工学研究科 助教 (同上)	41
井上 尊生 (兼任)	細胞走化性の再構築 (Johns Hopkins University, School of Medicine)	Johns Hopkins University, School of Medicine, Dept. of Cell Biology, Associate Professor (JHU, Assistant Professor)	48
梅原 崇史 (兼任)	「エピヌクレオソーム」の精密な再構成による遺伝子発現制御解析 (理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター)	理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター ユニットリーダー (理化学研究所生命分子システム基盤研究領域上級研究員)	40
戎家 美紀 (兼任)	細胞間フィードバック回路による細胞運命の制御 (理化学研究所 生命システム研究センター)	理化学研究所 生命システム研究センター ユニットリーダー (京大生命科学研究系キャリアパス形成ユニット グループリーダー)	40
佐藤 正晃 (専任)	脳内情報を担う動的回路としての「細胞集成体」の計測と制御 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (理化学研究所脳科学総合研究センター 研究員)	42
島本 勇太 (兼任)	有糸分裂紡錘体におけるミクロな力学反応の再構成 (国立遺伝学研究所 新分野創造センター)	国立遺伝学研究所 新分野創造センター 准教授 (ロックフェラー大学化学・細胞生物学研究室ポスドク)	45
杉 拓磨 (専任)	記憶の具現化 (京都大学 物質-細胞統合システム拠点)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (京都大学大学院工学研究科 研究員)	43
野村 真 (兼任)	進化的・構成的アプローチによる哺乳類型大脳皮質層構造の再設計 (京都府立医科大学 大学院医学研究科)	京都府立医科大学 大学院医学研究科 准教授 (同上)	35
別役 重之 (専任)	細胞挙動の解析から構成的に理解するその集合体としての植物過敏反応誘導機構 (東京大学大学院 理学系研究科)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (東京大学教養学部 特任助教)	45

研究報告書

「人工細胞作出に向けた人工脂質二重膜と生体膜の違いの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 池ノ内 順一

1. 研究のねらい

細胞を構成する要素の解明が進んだ現在、細胞の特定の機能に焦点を当てて、その機能に必要な要素のみを抽出し、細胞の機能を持たせた生命を模した構造物を試験管内で構成することが現実的になった。試験管内で人工的に細胞の機能を再現するのに成功した例として、限られたセットのタンパク質、核酸を人工脂質二重膜に内包させることにより、遺伝子の転写や mRNA の翻訳などの生命過程が試験管内で再構成された例が既に報告されている。しかしながら、細胞膜を舞台とする生命現象(細胞間接着や、細胞外からの機械的なシグナル、化学的なシグナル、電気的なシグナルの受容)については、機能的や形態的に生きた細胞の機能や構造を忠実に反映させた再構成は依然、非常に難しい課題として残っている。

その理由として、私は少なくとも2つあると考えた。まず水に溶けない膜タンパク質や脂質の取り扱いが実験技術的に困難であること、更に、細胞膜自体が、多様な脂質と多様なタンパク質からなる超分子複合体を形成しており、細胞膜構造の構築原理が未解明であることが挙げられる。

生きた細胞の細胞膜と再構成に用いられる人工脂質二重膜の間には、いくつか重要な違いが存在する。1つには、生きた細胞の細胞膜を構成する細胞膜脂質は多様であり、膜タンパク質と特定の細胞膜脂質が協調して機能を発揮したり、膜構造の形態形成に関わる可能性がある。2つ目には、細胞膜は恒常的に細胞骨格に裏打ちされており、細胞骨格によって、膜タンパク質や細胞膜脂質の分布や動態が変化している可能性がある。

本研究では、生細胞を用いた解析と人工脂質二重膜を用いた解析を組み合わせることによって、上述した生細胞の細胞膜が持つ性質の生物学的な意義を明らかにし、生きた細胞膜の構築原理を解明することを目的とした。本研究提案の実用的な側面としては、精緻な細胞膜機能を持たせた人工組織材料の実用化や新たなドラッグデリバリーシステムの開発において重要な基盤技術の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、生きた細胞の生体膜と人工脂質二重膜の違いに着目して、1)膜タンパク質と脂質の協調による細胞膜構造の形成メカニズム、2)脂質の多様性の生理的意義、3)恒常的に細胞膜を裏打ちする細胞骨格が生成される仕組みや細胞骨格の機能の解明という3つの課題に取り組んだ。それぞれ、1)については微絨毛と呼ばれる細胞膜の突起構造、2)については細胞間接着装置のタイトジャンクション、3)については細胞膜の Blebbing に着目して解析を進めた。

微絨毛の解析においては、微絨毛にスフィンゴミエリンが高度に濃縮することを見出し

た。微絨毛でスフィンゴミエリンと協働する細胞膜タンパク質としてポドカリキシンを同定した。ポドカリキシンは、細胞質において EBP-50 を介して PI(4,5)P2 産生酵素の PIP5K β と複合体を形成することを見出した。以上より、細胞膜外層のスフィンゴミエリンが集積した領域で微絨毛形成に必要な PI(4,5)P2 が細胞膜内層で生成される仕組みを明らかにした(文献[1])。

タイトジャンクションの解析においては、タイトジャンクション領域の脂質組成の解析を行い、他の形質膜領域と比べて長鎖スフィンゴミエリンやプラズマローゲン型ホスファチジルエタノールアミンが多いことを見出した(投稿準備中)。現在、その生理的意義について解析中である。また本研究の過程で、CaMKII 阻害剤で細胞を処理すると、タイトジャンクションがラテラル膜まで拡大することを見出した。タイトジャンクションを構成する要素については既に多くの先行研究が為されているが、細胞内のタイトジャンクションの形成量を制御する仕組みについてはほとんど明らかになっていないため、この部分については論文に纏めた(文献[2])。

生きた細胞の細胞膜は常にアクチン細胞骨格に裏打ちされている。細胞膜を裏打ちしている細胞骨格が細胞膜から外れて、細胞膜のみが突出した構造を Bleb と呼ぶ。細胞の遊走など様々な現象で Bleb が形成されることが知られているが、その分子機構は良く解析されていない。細胞は如何に細胞骨格に裏打ちされていない細胞膜を感知するのか、あるいは細胞骨格が裏打ちすることで細胞膜に対してどのような質的な変化をもたらすのかについてはほとんど明らかになっていない。さきがけ研究において、私は Bleb の形成・退縮を理解する上で Key となる分子をいくつか同定することに成功した。現在、Bleb の膜動態を説明するモデルを検討している(投稿中)。

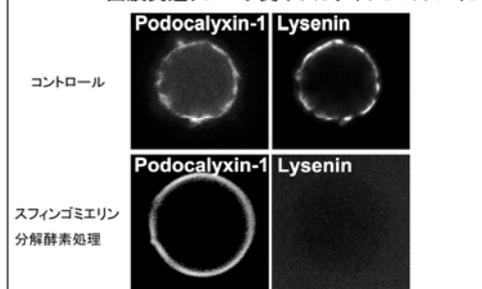
(2) 詳細

研究テーマ A「膜タンパク質と脂質の協調による微絨毛の形成メカニズム」

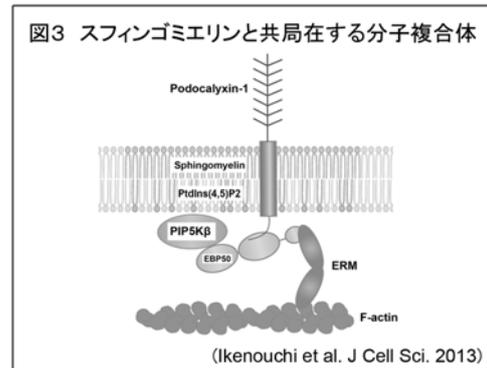
微絨毛は、上皮細胞のアピカル膜に存在する細胞膜構造で、細胞外との物質の交換にかかわる細胞膜の表面積を増加させる役割を担う。近年、微絨毛には TRP チャネルや ABC トランスポーターなどの機能性膜タンパク質が選択的に濃縮していることがわかり、シグナル情報伝達の重要な膜ドメインとして着目されている。微絨毛は、アクチン細胞骨格に裏打ちされた細胞膜の突出した構造であるが、その形成メカニズムについては不明な点が多い。微絨毛の形成に必要なタンパク質として、Ezrin/Radixin/Moesin や Epsin、Villin などのタンパク質が既に同定されているが、いずれもアクチン細胞骨格の制御因子であり、微絨毛の細胞膜脂質に関する先行研究は殆ど報告が無い。

私は本研究提案において、細胞膜脂質のシマミズの体腔液中に含まれるスフィンゴミエリン結合タンパク質の Lysenin(ライセニン)を用いて、微絨毛にスフィンゴミエリンが濃縮していることを見出した。さらに、アピカル膜のスフィンゴミエリンをスフィンゴミエリン分解酵素で処理す

図2 スフィンゴミエリン依存的に形成される一回膜貫通タンパク質ポドカリキシンのドメイン



ることにより消失させると、微絨毛が消失することを報告した (Ikenouchi et al. J Cell Sci. 2013) (図1)。微絨毛の形成に必須であるタンパク質としてポドカリキシンという 1 回膜貫通型のタンパク質が知られているが、形質膜からリポソームを形成すると、ポドカリキシンはスフィンゴミエリンと同じ膜ドメインに存在し、スフィンゴミエリンを消失させるとポドカリキシンのドメイン状の分布も解消されることから、スフィンゴミエリンとポドカリキシンは協調して膜ドメインを形成する性質を持つことを明らかにした(Ikenouchi et al. J Cell Sci. 2013) (図2)。さらにポドカリキシンの結合相手として、EBP-50とPIP5Kbetaを同定し、微絨毛のアクチン細胞骨格の形成に必要な PIP2 を供給する分子機構としてスフィンゴミエリン/ポドカリキシン/EBP-50/PIP5Kbeta からなる分子複合体を同定した(図3)。また、強制的にこの分子複合体をFKBPシステムなどに用いて多量体化すると、アクチンを含む突起構造が形成されることから、微絨毛の形成におけるスフィンゴミエリンの機能は、この分子複合体をクラスター化することであると予想される。



研究テーマB「タイトジャンクションに存在する多様な細胞膜脂質の機能解析」

タイトジャンクション(TJ)は上皮細胞のバリア機能を担う細胞膜構造である。バリア機能の破たんは慢性的な抗原や病原菌の体内への侵入を許し、アトピー性皮膚炎や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の原因となる。このため、TJ のもつバリア機能を人為的に制御する方法論を開発することは医学的に重要な課題である。また TJ は、体内の水やイオンが体外に漏出することを防ぐ上でも必須の構造であり、生体の恒常性維持に重要である。

TJ の主たる細胞接着分子は 4 回膜貫通タンパク質のクローディンである。マウスのゲノム上に存在する 27 種類のクローディンは、特定の器官の上皮組織に発現し、そのノックアウトマウスは、脳血管関門(クローディン 5)、セルトリ細胞による精巣血管関門(クローディン 11)など各器官の恒常性維持に重要な上皮組織のバリア機能の破たんによる表現型を示す。また逆に L 線維芽細胞にクローディンを強制的に発現させると TJ を異所的に形成することから、クローディンが形質膜に存在することが TJ の形成に必要なかつ十分であると理解されている。生細胞には、数千種類という多様な脂質分子が存在することを考えて、私は、タイトジャンクションにおいて特に豊富に存在する脂質が存在するかどうかについて、本さがけ研究で検証を行った。本さがけ研究に先立って、私は、細胞膜を単離して、質量分析によって、細胞膜の脂質組成を解析する方法論を確立した (Ikenouchi et al. J Biol Chem 2012)。この手法を用いて TJ の細胞膜領域を単離して脂質組成の解析を行った結果、興味深いことに特定の脂質分子種が

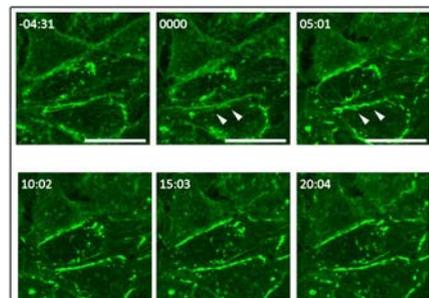


図4 培地中への脂質添加によるタイトジャンクションの形成回復過程

TJ の細胞膜に集積することを見出した。この脂質分子種の量を遺伝子操作により低減させた細胞では、TJ の形成が消失する(投稿準備中)。また逆に、培地中にこの脂質分子種を添加すると20分程度でTJ構造が回復する様子が観察された(図4)。このような知見は、TJの形成において細胞膜脂質が関与すること、および、その形成が脂質によって制御することが可能であることを示す知見である。

またさきがけ研究の過程で、タイトジャンクションの形成を促進する小分子化合物のスクリーニング法を開発した。約400種類の化合物スクリーニングの結果、予想外に CaMKII キナーゼの阻害剤で処理するとタイトジャンクションの形成が促進されることを見出した(図5)。この知見を踏まえて、増額措置を受けて、より大規模なスクリーニングを実施する準備を進めている(増額申請課題)。

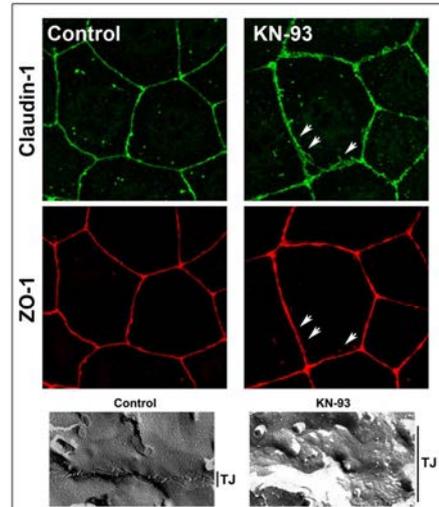


図5
CaMKIIの阻害によりTJがラテラル膜に拡大する
このときZO-1の局在は変化しない(矢印)

研究テーマC「細胞膜 Bleb における細胞骨格と細胞膜の相互作用」

生きた細胞の細胞膜は、人工脂質二重膜と異なり常にアクチン細胞骨格に裏打ちされている。生きた細胞において、細胞骨格に裏打ちされない細胞膜領域が一過性に形成されると、細胞膜が自由に拡張して突き出した構造をとる。これを Bleb と呼ぶ。Bleb は始原生殖細胞の遊走過程や細胞質分裂などの生理的な過程で見られる構造である。恒常的に細胞膜を裏打ちする細胞骨格が生成される仕組みや細胞骨格の機能を明らかにするために、細胞骨格が細胞膜から外れることによって形成される細胞膜 Bleb に着目して、Bleb の形成や退縮に関わる分子の機能解析を行った。その結果、いくつか非常に興味深い挙動を示す分子を同定し、細胞骨格と細胞膜の相互作用に関して、動的なネットワークの解明に取り組んだ(投稿中)。

3. 今後の展開

「細胞に膜タンパク質や細胞膜脂質が存在していること」と、「細胞膜構造が形成されること」の間には大きな理解のギャップが存在する。本研究の成果を踏まえて、今後さらに構造的なアプローチを研究に取り入れることで、細胞膜の構築原理の解明を目指したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

細胞膜の構造形成に関する研究(微絨毛・タイトジャンクション)について、脂質に着目して構造形成の原理の解明を着実にいった。特に、微絨毛に関してはデザイン通りに微絨毛様の形態を示す細胞膜構造形成を制御することが可能になった。またタイトジャンクションの研究では、予想外にタイトジャンクションの形成を増大させる化合物を見出した。この発見は、特許取得や企業との共同研究へと発展した。現在、増額措置を受けて、更に一層多くの化合物に対

してスクリーニングを展開している。Bleb に関する研究では、これまで分子生物学アプローチによる解析が為されてこなかった領域であるが、世界に先駆けて、Bleb の形成や退縮に関わるいくつかの重要な分子を同定することができた。Bleb の形成や退縮を分子のネットワークで説明できるモデルを現在投稿中である。このように、細胞膜構造の形成メカニズムの理解が進み、一部に関しては人為的な制御も可能になったという点を鑑みて、研究は順調に進捗したと考えている。

さきがけ研究期間の2年目に、独立した研究・教育ポジションに異動することができた。現所属に異動後、さきがけ最終年度の2015年には研究室の設備のセットアップが整い、学生の数も9名まで増加し、修士課程の学生を筆頭著者とする原著論文を研究室から報告することができた。また特許出願の内容を元に、企業との共同研究を2016年より開始するに至った。また本領域内の他のさきがけ研究者との共同研究についても現在進行中であり、活発な交流を行った。

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

(研究総括)

細胞骨格タンパク質による細胞膜脂質の分布・動態の制御機構の解明において、微絨毛の構築に必要な脂質としてスフィンゴミエリンを同定し、スフィンゴミエリンと協働する膜タンパク複合体を同定し、タイトジャンクション領域の細胞膜脂質の解析を行い、特徴的な脂質組成であることを明らかにした。また、細胞膜Blebを安定に観察する細胞と方法論を確立し、Blebの伸展や退縮の際に興味深い挙動を示す分子を複数同定するなど、このさきがけの期間中に多くの成果を出したことを高く評価します。

今後は、脂質と蛋白成分が膜の物性にどのように影響を与えているかを解明し、重要な構成因子の細胞内産生と膜領域への輸送機構を含めた膜の可塑的な構築の仕組みの解明を期待します。

平成26年度文部科学大臣表彰若手科学者賞、平成26年度 第7回 井上リサーチアワード、平成27年度 柿内三郎記念奨励研究賞を受賞し、今後、この分野の第一人者としての活躍が期待されています。また、最近、研究成果(特許出願)に基づき、企業との共同研究を開始して、新たな活動範囲を広げていることも特記します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ikenouchi J., Hirata M., Yonemura S., Umeda M., “Sphingomyelin Clustering is essential for the formation of microvilli.” *Journal of Cell Science* **2013**,126,3585–92.
2. Shiomi R., Shigetomi K., Inai T., Sakai M., Ikenouchi J., “CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier” *Scientific Reports* **2015**, 8, 13262
3. Arita Y, Nishimura S, Ishitsuka R, Kishimoto T, Ikenouchi J, Ishii K, Umeda M, Matsunaga S, Kobayashi T, Yoshida M. “Targeting cholesterol in a liquid-disordered environment by

theonellamides modulates cell membrane order and cell shape.” *Chemistry and Biology* **2015** 22(5):604–10

4. Ohoka A, Kajita M, Ikenouchi J, Yako Y, Kitamoto S, Kon S, Ikegawa M, Shimada T, Ishikawa S, Fujita Y. “EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells.” *Journal of Cell Science* **2015** 128(4):781–9.

5. Oda Y, Otani T, Ikenouchi J, Furuse M. “Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42.” *Journal of Cell Science* **2014** 127:4201–12.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 池ノ内 順一、塩見 僚

発明の名称: タイトジャンクション形成促進を評価するための細胞およびタイトジャンクション形成促進剤

出 願 人: 国立大学法人九州大学

出 願 日: 2015/4/13

出 願 番 号: PCT/JP2015/061374

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1.主要な学会発表

・2013 年 12 月 3 日 第36回日本分子生物学会年会 (神戸)「細胞骨格タンパク質による細胞膜脂質の分布・動態の制御機構の解明」

・2013 年 6 月 21 日 第 65 回日本細胞生物学会大会(名古屋)、“Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli.”

2.受賞

2014 年 4 月 15 日 平成26年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞

2014 年 12 月 10 日 平成26年度 第7回 井上リサーチアワード

2015 年 12 月 5 日 平成27年度 柿内三郎記念奨励研究賞

研究報告書

「光で“創る”オプトジェネティクスへの挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 井上 圭一

1. 研究のねらい

ヒトなど高等動物の細胞内ではヘテロ三量体Gタンパク質が、光や味物質、臭い物質、ホルモンなど細胞外からの刺激に応じて、様々な細胞の生理活動を制御し、環境の変化に細胞が適応する上で重要な役割を果たしている。この時細胞外刺激を受容し、その情報をGタンパク質へ伝達するのが G タンパク質共役型受容体(GPCR)である。GPCR と G タンパク質が関与するシグナル伝達経路は細胞の生理活動を制御する最も主要なものの一つで、大部分の薬剤のターゲットとなっており、そのメカニズムの理解は医学・薬学の両分野においても重要なものとして注目されている。

しかし細胞内に複数種が存在する G タンパク質の各サブファミリーが関与するシグナル伝達経路が細胞活動をどのように制御するのか、そのメカニズムには不明な点が多い。その理由として挙げられるのが特定の G タンパク質の関与するシグナル伝達経路のみを高い精度で活性化させることが困難なためである。通常 G タンパク質の活性化には特定の GPCR に結合するリガンドを細胞に添加し、GPCR を活性化させ、それを通じて G タンパク質を活性化する方法がとられる。しかし多くの GPCR は複数の G タンパク質と共役しており、また生体内では特定の細胞に投与するリガンドの濃度の正確な制御が困難なことから、それぞれの G タンパク質の関与するシグナル伝達経路のみを適切な強さで活性化することは極めて難しい。

そこで本研究では従来のリガンドを用いる方法とは大きく異なる、光を使ったGタンパク質制御法の創出を目指す。光は極めて高い時空間分解能のもと、任意の強度で照射することが可能であることから、光でGタンパク質を操作することができれば、従来法よりも簡便かつ正確にシグナル伝達経路を活性化し、その役割を調べることが可能になる。しかし網膜に存在するロドプシンと G タンパク質のサブファミリーの一つである G_t のような特殊な例を別にして、GPCR や G タンパク質は光に応答しない。従って本研究では新たに光応答性のタンパク質である微生物型ロドプシンに光依存的なGタンパク質活性化能を持たせることで、それを用いた細胞内 G タンパク質の光制御法の開発を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

ヘテロ三量体 G タンパク質はヒトなどの細胞中において、様々な信号伝達カスケードの制御に関わり、また生体機能の調節に重要な役割を果たす。従ってそれぞれの G タンパク質が関与するシグナル伝達を任意に操作することができれば、細胞の生存に関わる役割やそれに関連する疾患のメカニズム解明、さらには薬剤開発につながることを期待される。また G タンパク質のシグナルカスケードを利用することで、任意のタンパク質を細胞内に発現させるこ

とも可能となる。そしてその際に光を用いて G タンパク質を活性化することができれば、従来のリガンド結合による GPCR の活性化を介した手法では困難だった、ミリ秒・サブマイクロメートル程度の高時空間分解能での制御が可能となる。そこで本研究では細胞内 G タンパク質の光操作が可能なタンパク質分子ツールの開発のため、光受容膜タンパク質である微生物型ロドプシンに GPCR の細胞質側ループを組み合わせた、キメラタンパク質の構築に取り組んだ(図 1)。

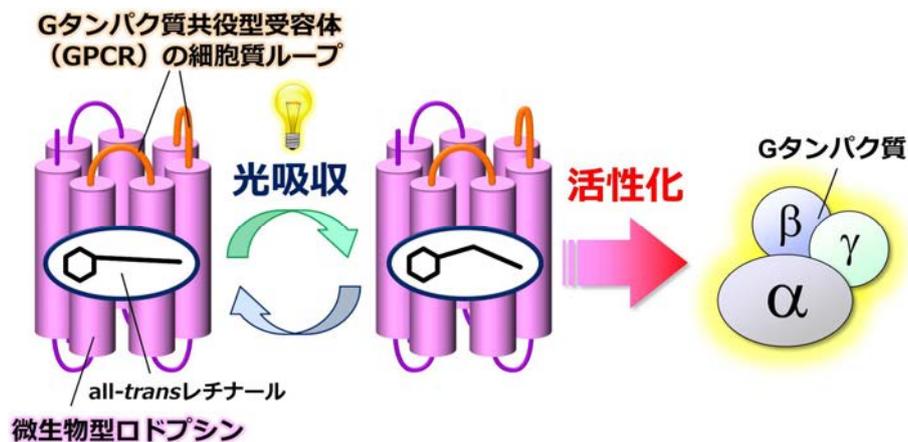


図 1. 微生物型ロドプシンと GPCR 細胞質ループのキメラタンパク質を用いた
ヘテロ三量体 G タンパク質の活性の光操作

その結果、GPCR の一種であるウシロドプシンの細胞質ループを組み込んだキメラタンパク質を作製したところ、*in vitro*において G タンパク質のサブファミリーの一つである G_t の光依存的な活性化を達成した。そしてさらに β_2 -アドレナリン受容体 (β_2 -AR) の細胞質ループを導入したところ、より多様な細胞種に普遍的に存在し、細胞内の cAMP 産生に関与する G_s タンパク質の光操作にも成功した。そしてこのキメラタンパク質をホ乳類細胞に導入したところ、細胞内に内在的に存在する G_s を活性化し、cAMP 濃度を上昇させ、さらに Ca^{2+} の流入を引き起こすことに成功し、実際に構築したキメラタンパク質が細胞内で機能することを実証した。これらの詳細について以下に記す。

(2) 詳細

研究テーマ(A):新規キメラタンパク質作製

本研究ではまず GPCR で最も活性が高い視覚受容体であるウシロドプシンの細胞質ループを微生物型ロドプシンに導入してキメラタンパク質を構築し、網膜内でウシロドプシンによって活性化される G_t タンパク質の光依存的な活性化能を評価した。その結果シアノバクテリアの持つ H^+ ポンプ型の微生物型ロドプシンである GR を用いることで、*in vitro*において G_t を活性化し、GDP/GTP 交換反応を起こさせることに成功した(論文発表リスト2)。

これにより微生物型ロドプシンと GPCR のキメラタンパク質を用いることで G タンパク質が活性化可能であることが示されたが、 G_t はもともと動物型のロドプシンを介して光依存的に活性化するタイプのサブファミリーであり、生体内でも視細胞にしか存在しないことから、キメラタンパク質による光操作の持つ応用に向けた重要性はそれほど高くない。そこで非視覚系の G タンパク質操作に向け、多様な細胞種に普遍的に存在する G タンパク質のサブファミリーである

G_i , G_s に共役した GPCR(それぞれウシロドプシン、 β_2 -AR)の細胞質ループを微生物型ロドプシンに組み込んだキメラタンパク質を新たに作製した。

このとき鑄型となる微生物型ロドプシンについて、様々なタイプのものを検討したが、GR を用いることで、最も高い発現が達成されることが明らかとなった。一方でウシロドプシンのループを用いた場合、複数の GPCR のループを導入したタンパク質の発現に成功したが、それ以外の GPCR については一つ以上のループを微生物型ロドプシンに導入して発現させることは非常に困難であることが明らかになった。

また今回鑄型となる微生物型ロドプシンについて、メタゲノム解析で新たに明らかとなった様々な分子の性質を調べたところ、その中に Na^+ イオンを濃度勾配に逆らって、細胞外側へ能動輸送する光駆動型 Na^+ ポンプ型ロドプシンが存在することが明らかとなった(論文発表リスト1)。そしてこのロドプシンを神経細胞に発現したところ、光照射にともなって高い神経活動抑制能を示すことが明らかになり、今後の新たなオプトジェネティクスツールとなることが期待される(論文発表リスト4、5)。

研究テーマ(B):キメラタンパク質物性・性能評価

研究テーマ(A)で作製した G_i , G_s 共役型キメラについて、*in vitro* で G タンパク質活性を評価したところ、有意な G_i および G_s の光依存的な活性化が確認された。また微生物型ロドプシン部分に活性化中間体の寿命を長くする変異を導入することで、さらに G タンパク質活性を向上させることに成功した。

続いてホ乳類細胞内 G タンパク質の活性化の評価のため、新たに HEK293T 細胞と Fura2 を用いた Ca^{2+} イメージング系を構築した。この時、細胞内に cAMP 依存性カルシウムチャンネル(CNGA2)を共発現させ、活性化された G_s による cAMP の上昇によって引き起こされる CNGA2 の Ca^{2+} イオンの取り込みを見ることで、細胞内における G_s 共役型キメラによる光依存的な G_s 活性化を検出することができる。このようなアッセイ系を用いて光依存的な Ca^{2+} の流入を見たところ、予想に反して GPCR ループを持たない微生物型ロドプシンのみでも Ca^{2+} の取り込みが確認された。詳細な検討の結果、これは鑄型に用いたロドプシンの H^+ 輸送によって、細胞内 pH が変化したことによる内在性 Ca^{2+} チャンネルの開放によるものだということが明らかになった。この問題についてはロドプシン部分に変異を加えて、 H^+ 輸送を阻害することで解決された。そしてさらにシグナル配列を最適化することにより、キメラタンパク質の膜移行効率を上昇させた結果、光依存的な細胞内 G_s タンパク質の活性化を示す Ca^{2+} の取り込みを観測することに成功した(図2)。

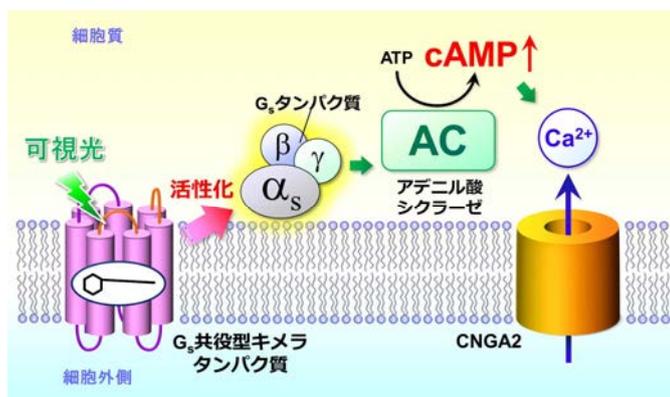


図2. G_s 共役型キメラタンパク質による細胞内 G_s の活性化と増加した cAMP が引き起こす CNGA2 を介した Ca^{2+} 流入

またキメラタンパク質が G_s を光依存的に活性化した事による Ca^{2+} の流入量を、 β_2 -AR にアゴニストを結合させた場合のものと比較したところ、およそ 1/10 程度の大きさの Ca^{2+} 流入が引

き起こされることが分かった。これによりキメラタンパク質を用いて、ホ乳類細胞中の G タンパク質を光によって活性化することにより、細胞の状態を操作できることが可能であることが証明された。

3. 今後の展開

本研究において微生物型ロドプシンと GPCR のキメラタンパク質を作製することにより、光依存的に細胞内の G タンパク質を活性化できる事が示された。しかし現時点ではその活性は本来の GPCR と比べるとそれ程高くない。これについては GPCR と G タンパク質の相互作用に重要と考えられる GPCR の細胞質側ループをより多くキメラタンパク質に導入することが求められる。しかし第2および第3ループのそれぞれを単独で導入したキメラタンパク質については細胞内に発現させることができたが、複数のループを同時に導入したものについてはタンパク質の発現が確認されなかった。これについては今後他の GPCR のループを検討することで、複数を導入したものが発現可能なコンストラクトを開発する必要がある。

一方で今回の研究において G_t 、 G_i 、 G_s については、これらを光依存的に活性化するキメラタンパク質の作製に成功したが、 G_q や $G_{12/13}$ などのサブファミリーについてはそれらに共役した GPCR を用いた新たなキメラタンパク質の作製が求められる。これらについても今後本研究で培われた分子デザイン技術をもとに開発に取り組む。

そして将来的には本研究で開発を行ったキメラタンパク質を生体に導入することによって、生体中での G タンパク質の光操作法の確立を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では微生物型ロドプシンと GPCR のキメラタンパク質を用いたオリジナリティの高い手法を用いることによって、 G_t や G_i 、 G_s 三種類の G タンパク質の光操作に成功した。そして G_s については細胞内の G_s を光依存的に活性化し、cAMP を上昇させ、CNGA2 チャネルを解放し、 Ca^{2+} の流入を誘起することにも成功した。これらのことから本研究によって、キメラタンパク質を用いることで細胞内の G タンパク質の操作が可能であることが実証されたことは極めて意義深いことであると考えられ、研究目標の主要な部分については達成されたといえる。

G タンパク質は様々な生理現象に関与し、医学・薬学的な観点からも重要な分子であることから、その光操作技術の実現は幅広い分野に大きな波及効果があると期待される。今後はさらに高機能な分子デザインを行い、またより多様な G タンパク質サブファミリーの活性化が可能な分子を構築することで、応用に向けた可能性が高まると考えられる。さらにマウスなどの生体に導入することによって、G タンパク質の関与する生命現象の解明に向けた研究への応用が期待される。

また本研究で様々な微生物型ロドプシンの性質について検討を行う中で発見された Na^+ ポンプ型ロドプシンについては、すでに神経細胞に発現させると、高い光依存的な神経発火の抑制機能を持つことが示されており、昨今高い注目をもたれているオプトジェネティクス分野への応用が期待される。

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

(研究総括)

細胞内Gタンパク質の光操作が可能なタンパク質分子ツールを開発するため、非視覚系のGタンパク質操作に向け、一般的に存在するGタンパク質のサブファミリーであるGi, Gs, Gqに共役したGPCRの細胞質ループを微生物型ロドプシンに組み込んだキメラタンパク質を創出した。Gi, Gs, Gq共役型キメラのうち、in vitroでGタンパク質活性性能の評価が可能なGi, Gs共役型のものについて照射によってGタンパク質の活性化が可能であることが示した。微生物型ロドプシン部分に活性化中間体の寿命を長くする変異を導入することで、さらにGタンパク質活性化能を向上させることに成功した。また、新たにNa⁺イオンを濃度勾配に逆らって、細胞外側へ能動輸送する光駆動型Na⁺ポンプ型ロドプシンを新たに発見した。このように次々に計画通りに着実に成果を出してきたことから、本人のこの最先端分野の洞察の深さを知ることができ、大いに評価します。同領域の神谷厚輝研究者と、Na⁺ポンプロドプシンのイオン輸送メカニズムについての研究を実施している。

今後は、これらのツールを用いて、生物系の研究者と連携し、新しいオプトジェネティックスのカテゴリーを切り開いていってほしいと思います。

第8回分子科学会奨励賞、分子科学研究奨励森野基金(平成26年度)、平成26年度文部科学大臣表彰若手研究者賞などを受賞し、国内外で多くの招待講演を行っていることから、その業績に高い評価を受けていることが窺えます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表(15件中主要5件)

1. Kengo Sasaki, Takahiro Yamashita, Kazuho Yoshida, **Keiichi Inoue**, Yoshinori Shichida, Hideki Kandori*. “A light-driven sodium ion pump in marine bacteria” (2013) *Nat. Commun.*, **4**, 1678
2. **Keiichi Inoue**, Hikaru Ono, Rei Abe-Yoshizumi, Susumu Yoshizawa, Hiroyasu Ito, Kazuhiro Kogure, Hideki Kandori*. “Chimeric Proton-Pumping Rhodopsins Containing the Cytoplasmic Loop of Bovine Rhodopsin” (2014) *PLoS ONE*, **9**, issue 3, e91323
3. **Keiichi Inoue**, Takashi Tsukamoto, Kazumi Shimono, Yuto Suzuki, Seiji Miyauchi, Shigehiko Hayashi, Hideki Kandori, Yuki Sudo*. “Converting a Light-driven Proton Pump into a Light-gated Proton Channel” (2015) *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, issue 9, 3291-3299
4. Hideaki E. Kato, **Keiichi Inoue**, Rei Abe-Yoshizumi, Yoshitaka Kato, Hikaru Ono, Masae Konno, Toru Ishizuka, Mohammad Razuanul Hoque, Shoko Hososhima, Hirohumi Kunitomo, Jumpei Ito, Susumu Yoshizawa, Keitaro Yamashita, Mizuki Takemoto, Tomohiro Nishizawa, Reiya Taniguchi, Kazuhiro Kogure, Andrés D. Maturana, Yuichi Iino, Hiromu Yawo, Ryuichiro Ishitani, Hideki Kandori*, Osamu Nureki*. “Structural Basis for Na⁺ Transport Mechanism by a Light-Driven Na⁺ Pump” (2015) *Nature*, **521**, Number 7550, 48-53
5. **Keiichi Inoue**, Masae Konno, Rei Abe-Yoshizumi, Hideki Kandori*. “The Role of the NDQ-motif in Sodium Pump Rhodopsin” (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, issue 39,

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

国内会議受賞講演(1件)

1. 物理化学的アプローチによる新奇光駆動型 Na⁺/H⁺ハイブリッドポンプロドプシンの研究
井上圭一 日本化学会第 93 春季年会(2013)・若い世代の特別講演会 2013 年 3 月 25 日
草津 (受賞講演)

国際会議基調講演(1件)

1. Microbial rhodopsins of marine bacteria: Nano-scale biological light-driven ion pumps
Keiichi Inoue, 25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, November, 12, 2014, Nagoya, Japan (基調講演)

国際会議招待講演(6件)

1. Function and mechanism of sodium pump rhodopsin
Keiichi Inoue, 16th International Conference on Retinal Proteins, October, 7, 2014, Nagahama, Japan (招待講演)
2. Spectroscopic study on the dynamics and structure of sodium pump rhodopsin
Keiichi Inoue, 日本化学会第 95 春季年会(2015)・アジア国際シンポジウム 2015 年 3 月 27 日 船橋 (招待講演)
3. Microbial rhodopsins: Light-driven biological proton, chloride and sodium transporters
Keiichi Inoue, BIT's 4th Annual World Congress of Advanced Materials-2015, May 29, 2015, Chongqing, China (招待講演)
4. The role of proton on the function of sodium pump rhodopsin
Keiichi Inoue, The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, September 14, 2015, Kanazawa, Japan (招待講演)
5. Infrared spectroscopic study on the structure and dynamics of sodium pump rhodopsin
Keiichi Inoue, SCIX 2015, The Great Scientific Exchange Meeting, September 28, 2015, Providence, USA (招待講演)
6. Photochemistry of sodium pump rhodopsin

Keiichi Inoue, DFG-Rundgespräch Photoreceptors, October 12, 2015, Frauenchiemsee, Germany (招待講演)

国内会議招待講演(4件)

1. 光駆動ナトリウムポンプの発見と展開

井上圭一, 分子研研究会「ロドプシン研究の故きを温ねて新しきを知る」2013年11月18日 岡崎 (招待講演)

2. 海洋性細菌から発見された光駆動ナトリウムポンプ型ロドプシン

井上圭一, 日本生体エネルギー研究会 第39回討論会 2013年12月19日 静岡 (ブレイクスルー講演)

3. 分光学者と微生物型ロドプシン:分子の基礎研究と応用への路

井上圭一 第45回分子病態医学セミナー 2013年7月10日 東温 (招待講演)

4. H⁺ポンプとNa⁺ポンプ:2つのロドプシンから見えるもの

井上圭一, 分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」2015年4月21日 岡崎 (招待講演)

受賞

1. 第8回分子科学会奨励賞(平成26年度)
2. 日本化学会第95春季年会(2015) 優秀講演賞(学術)
3. 分子科学研究奨励森野基金(平成26年度)
4. 平成26年度 文部科学大臣表彰・若手研究者賞
5. 平成25年度 公益財団法人 光科学技術研究振興財団 研究表彰

研究報告書

「細胞走化性の再構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 井上 尊生

1. 研究のねらい

細胞走化性は、細胞外の化学物質の濃度勾配を検知して、細胞が濃度の高い、もしくは低い方へ遊走する性質である。血管新生、胚発生、創傷治癒、免疫防御と神経回路形成を含む様々な生理現象を担う。その障害は、上記の生理現象に異常をきたすだけでなく、癌や関節炎などの進行も促す。近年の確立された遺伝学的手法により、走化性に関わる分子はほぼ全て同定されたと考えられている。また蛍光イメージングの発展に伴い、それらの分子が非常にダイナミックな挙動を細胞内で示すことが明らかとなった。しかしながら、好中球などは非常に小さな濃度勾配(細胞の大きさで1%の勾配)も検知できることが知られており、その分子機構の解明は、細胞遊走の研究分野で最難関かつ最後の課題の一つと認識されている。この濃度勾配検出の分子機構に関しては、数理モデルから、活性化・不活性化による単純な一次線形シグナル様式だけではなく、フィードバック、クロストーク、時空間制御といった、速く複雑な高次/非線形様式を含む事が示唆されている。しかしながら、従来の遺伝学的手法(遺伝子ノックアウト、RNAi、タンパク過剰発現など)は、時間解像度が細胞内シグナル伝達の速度と比べ遅いため、与えられた摂動に対して細胞が2次的、3次的な反応を引き起こした後の状態を観察をすることが多々ある。そのため、途中の時間的な情報が失われ、非線形過程を実験的に検証することが難しい。

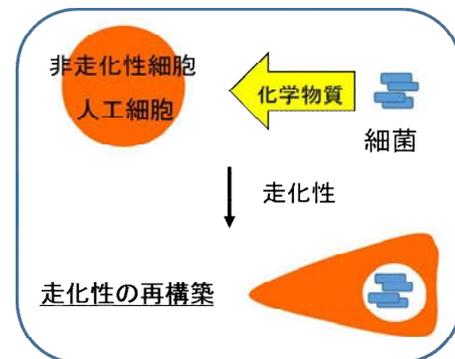
私達は近年、こうした速く複雑なシグナル伝達系をリアルタイムに制御できる摂動ツールの開発を行ってきた。本手法は生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる新規かつ独創的な摂動ツール(CRISP)である。本研究においては、CRISP を用いて好中球の濃度勾配検出機構を分子レベルで解明する。その際の主要仮説は「フィードバックの原動力は、細胞膜構造の微細変化が局所の生化学反応を活性化すること」である。CRISP を用いて実験的に仮説を検証した後に、常微分・偏微分方程式を用いて、直感的に理解が難しい非線形過程を数理モデル化し、*in silico* で細胞走化性の再構築を行う。これらの知見を総合し、最終的には人工巨大小胞膜を用いて、*in vitro* で細胞遊走・走化性を再構築することを目指す。その際に、人工膜の局所構造を時空間特異的に自在に操作する技術の開発も行う。

2. 研究成果

(1) 概要

「フィードバックの原動力は、細胞膜構造の微細変化が局所の生化学反応を活性化すること」という仮説を検証するために以下の3つの課題を設定した。好中球の濃度勾配検出機構の分子レベルでの解明(研究テーマA)、走化性の *in silico* および *in vitro* 再構築(研究テーマB)、

およびそれぞれのテーマを加速させる基礎技術の最適化(研究テーマ C)である。具体的には、速く複雑な情報伝達系をリアルタイムに制御できる**摂動ツールの開発**を行い、生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる一連の技術開発に成功した。続いてこれらの摂動ツールを用いて、走化性細胞による濃度勾配検出の**分子機構解明**を目指し、その原動力が細胞膜構造の微細変化により局所の生化学反応を活性化することを示した。最後にこれらの研究から得られた技術および知見を総合し、非走化性細胞や人工細胞を用いて、**試験管内での走化性の再構築**(右図参照)を目指した。



(2) 詳細

- 研究テーマ A 好中球の濃度勾配検出機構の分子レベルでの解明

走化性において、細胞内の分子極性が仮足形成を促すように、細胞の形態変化は常に細胞内の生化学的反応の産物として起こると考えられている。しかしこの逆の関係に関してはあまり研究がされていない。すなわち細胞膜の構造変化が、生化学反応の効率に影響を与えるだろうか。私はこの機構こそが、濃度勾配の検出に不可欠な正のフィードバックの根源なのではないかと考えた。この仮説を検証するためには、分子活性を変えことなく細胞の膜構造変化を引き起こす必要がある。従来は細胞外から増殖因子などの生理作用リガンドを加えて、情報伝達系を介して細胞膜の構造を変化させてきたが、これでは細胞内の生化学的反応がすでに影響を受けているため、それに引き続くフィードバックによる変化の定量的評価が難しい。物理的な作用をもって細胞膜の構造変化を促す方法として、ガラスピペットを用いて吸ったり、押し下げる方法があるが、これは侵襲性が高く、また細胞遊走の際に見られる膜構造変化を模倣しているとは考えにくい。そこで私は、非侵襲的で、より生理的に近い方法で、かつ分子活性によらず膜構造を変化させる方法を探索した。

BAR ドメインは約 250 アミノ酸で構成され、酵素活性がなく、細胞膜と相互作用し、膜を裏打ちしたり、楔モチーフを膜に挿入したりすることで膜を曲げるドメインで、小胞輸送、細胞骨格の再編成に寄与している。そこで、私は BAR ドメインを CRISP プローブ(詳細は下記参照)として使い、BAR ドメインを細胞膜に移行させることで、膜構造変化を瞬時に誘発させることができるのではないかと考えた(図1A)。FKBP と BAR ドメインのひとつ、NBAR の融合タンパク質(FKBP-NBAR)を膜局在の FRB と共に発現し、ラパローグを加えると細胞膜の構造が変化し、仮足のような突起を形成することを確認した(図1B、C)。さらに FKBP-NBAR に対する免疫電顕像を取得し、ラパローグ添加後に FKBP-NBAR が確かに細胞膜にあること(図1D)、そしてその部位の膜が肥厚している様子が観察された(赤矢頭)。FKBP-NBAR がいないところでは膜の肥厚はみられない(黒矢頭)。続いてこの膜構造プローブを用いて、生化学反応の活性に影響があるかを調べた。PIP₃ は細胞走化性において、細胞前部で多く見られる膜脂質である。以前に私達と他のグループにより、正のフィードバックに重要な役割をしていることが示されている。そこで PIP₃ に特異的に結合する蛍光バイオセンサーを用いて、PIP₃ の生成を全反射顕微鏡下

で観察した。すると、ラパローグ添加後 1 分以内に PIP₃ の量は膜で増加し始め、5 分後にはピークに達することが観察された(図1E)。ラパローグの代わりに DMSO を加えた場合、また楔モチーフ(N 末の 25 アミノ酸)を除いた CRISP プローブを用いた場合には PIP₃ の増加は見られなかった。この結果は膜構造の微小変化が細胞内の生化学反応に影響を与える直接的な証拠として、非常に価値がある。

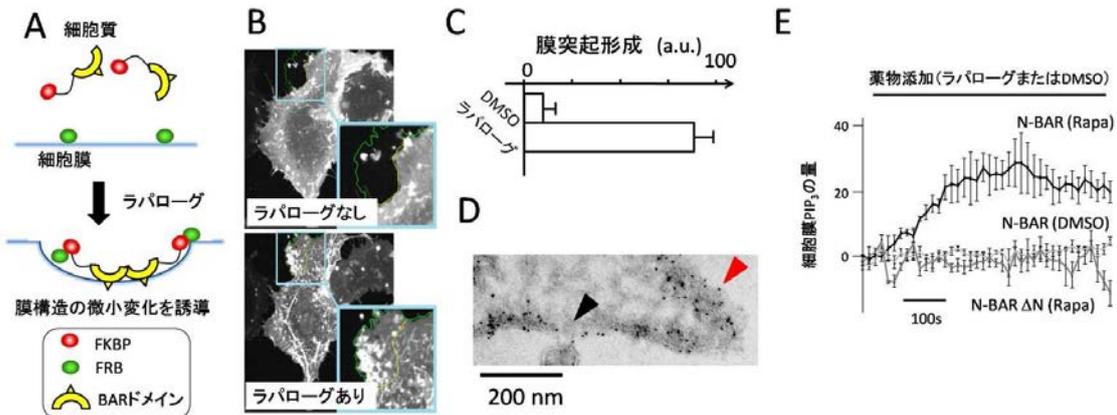


図1 BAR ドメインの強制膜移行は膜構造の変化とその後の PIP₃ 生成を促す。

● 研究テーマB 走化性の in silico および in vitro 再構築

上記の実験による定性・定量的な解析に基づいて、ヘルフリッヒ自由エネルギーと微分方程式を用い、細胞膜の曲率、BAR タンパク質と PI3 キナーゼのフィードバックをもとにすることで、PIP₃ の極性化を達成できることを示した。また *in vitro* での走化性再構築に関しては、膜工学で多用されている人工巨大小胞膜(GUV と呼ばれる)を用いた。人工巨大小胞膜は、人工的に作製された脂質二重膜で、タンパク質や脂質が膜構造に与える影響を精査する上で非常に有用なモデルシステムである。人工膜の脂質組成は自在に変えることができ、またタンパク質の導入も膜タンパク質を含めて確立された技術である。特に BAR ドメインによる膜の構造変化に関する研究で多用されている。そこでまず第一段階として、FRB を人工膜へ局在させるために脂質修飾の最適化を行い、人工膜上で CRISP プローブが適切に機能するか確認した。人工膜の大きさは好中球と同程度の 20 ミクロメートル前後とした。本研究において、細胞の極性化とは初期の膜構造の微小変化とそれに伴う協同的な膜構造の大きな変化(仮足形成)と定義される。この現象に必要な最小限の分子群(Rac、PIP₃、アクチンとその結合タンパク質群など)は先の実験結果とシミュレーションモデルおよびアクチン重合の *in vitro* 再構築の前例などをもとに選択した。これらの分子群を個々に精製されたものを購入した。今後、これらを人工膜内に導入することを計画している。そしてこのような人工細胞を用いて、CRISP による膜構造変化が膜の極性化及び遊走を誘発するかを確認する。最終的にはできる限りシグナル分子を導入せずに細胞遊走を再構築する。そのためには PIP₃ などのシグナル分子によって担われている協同性を、他の同等のシグナルで達成しなくてはならないかもしれない。BAR ドメインは多量体を形成することが知られているため、この多量体形成を協同的になるよう操作できれば、CRISP プローブにより膜移行した FKBP-NBAR が、更なる BAR ドメインを協同的に膜にリクルートし、大きな膜構造変化を引き起こすと予測される。そこで BAR ドメインの構造解析などをもとに、アミノ

酸側鎖に変異を加え、BAR ドメインの相互作用・結合様式を解析する。最終的にはラパローグへの走化性を達成するため、人工巨大小胞膜をマイクロ流路系に導入し、ラパローグを勾配状に加え、人工膜の運動を経時的に蛍光観察する予定である。

● 研究テーマ C それぞれのテーマを加速させる基礎技術の最適化

CRISP (Chemically-triggered, Rapidly-Inducible, and compartment-Specific Perturbation) の原理は、二種類のタンパク質 (FKBP と FRB) の会合を一つの小さな分子 (ラパマイシン) により誘導するものである (図2A)。私はこの原理に基づき、多面的に改良を加えることで、生きた細胞内で、任意のタンパク質の活性を秒のオーダーで、任意の細胞内局所で制御できる手法 CRISP を構築した。改良点は

1. 新規ラパマイシン誘導体 (以下ラパローグ) の有機合成
2. 遺伝子工学を利用したタンパク質相互作用及び局在の最適化
3. 光応答性ラパローグの有機合成
4. 顕微鏡、光路系、マイクロ流路系のカスタマイズである。図2Bに示すように、CRISP においては細胞内に FKBP (濃青色) と任意のタンパク (灰色) との融合タンパク、そして細胞膜に局在する FRB (赤色) を使用する。

ラパローグ添加により FKBP と FRB との会合を誘導すると、結果として CRISP プローブが細胞膜へと移行する。多くの細胞内シグナル分子は、細胞膜の受容体刺激に伴い細胞内シグナル分子が細胞膜に移行すること

で、情報伝達系を開始させるが、ラパローグによる強制的な CRISP プローブの膜移行は、受容体を介さずに任意の細胞内情報伝達系を活性化することができる。また FRB の局在を変えることで、ミトコンドリア、ゴルジなど様々な細胞内小器官に標的タンパク質を高速移動させることができる。CRISP の最大の特徴は、速い摂動 (<10 秒) を生きた細胞内で達成できる、そして一般性が高い、すなわち様々なタンパク質への応用が可能なことである。例えば、Rac などの小分子 G タンパク質活性を素早く制御することにより、細胞骨格が直接影響を受け、迅速に細胞の形が変化することを示した (図2C)。私は近年さらに CRISP を改良し、新規に合成した光応答性のラパローグを用いて、任意の細胞局所で分子活性を制御したり、さらにはラパローグの系とは完全に独立した、新しい CRISP の系を植物ホルモンであるジベレリンの新規誘導体とその結合タンパク質を用いて開発した。これにより、2 種類の分子活性を同時、または異なるタイミングで、そして 2 つの場所特異的に制御できるようになった。さらにマイクロ流路系をデザイン、工作し、流路内においてラパローグの任意の濃度勾配を形成することに成功している。細胞を流路内に閉じ込め、仮足形成に重要な Rac タンパクを細胞内で勾配を形成するように活性化することで、細胞がラパローグの濃い方へ遊走することを示した。これはラパローグという非生理的化学物质に対する走化性を再構築した極めて珍しい例である。

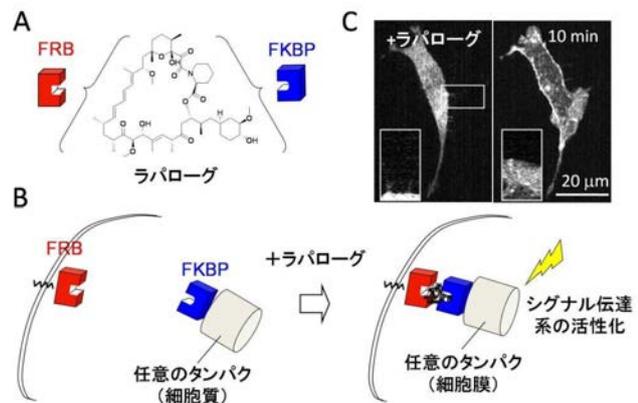


図2 生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる CRISP の原理

3. 今後の展開

細胞膜構造の微細変化を引き起こす分子の同定、そして人工細胞を用いた走化性の再構築の完了を目指す。こうした時空間的に複雑なシグナル伝達は、細胞走化性だけでなく、細胞分裂、小胞輸送、神経可塑性などの細胞機能においても重要な働きをしていると考えられている。すなわち本研究によりもたらされる知見や技術は、様々な生理現象の理解を深め、またその病態モデルとなる癌や免疫疾患の治療戦略にも貢献することが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

現時点で、目標の9割を達成したと理解している。また目標外の成果もあった。当初は、膜の曲率はBARたんぱく質のみが認識できると仮定していたが、その後のPI3キナーゼ専門の構造生物学者との議論から、PI3キナーゼそのものが膜の曲率を認識できる可能性が生じたため、現在生化学的、細胞生物学的手法を駆使して検討中。もしこれが事実であれば、フィードバックの分子機構は非常に単純に記述できることになる。また好中球や細胞性粘菌などの速い遊走細胞で同様の原理が成り立つか確認するために、細胞性粘菌に関しては、同さきがけ領域の澤井研究者と共同研究を開始した。

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

(研究総括)

生きた細胞内で、任意の情報伝達系を特定の細胞内局所で瞬時に制御できる摂動ツールを開発し、そのツールを用いて、走化性細胞による濃度勾配検出の分子機構解明を図り、その原動力が細胞膜構造の微細変化により局所の生化学反応を活性化することを明らかにしたことを評価します。

膜曲率がPIP3量という研究を進める一方で、その産生酵素であるPI3キナーゼが膜の曲率を認識する結果を得たのは、酵素の活性化から膜の変形が起こるのではなく、その逆が成り立ち得るのではないかという点が、予想外で大変興味深いと思います。細胞性粘菌では、同じ領域の澤井 哲研究者と共同研究を進めている点も楽しみです。

2013年度若手奨励賞(日本薬学会)、2014年度若手科学者賞(文部科学省)、R.R. Bensley Award in Cell Biology, American Association of Anatomists(2014)他国内外で多くの賞を受賞しており、国内外での学会発表の多さも抜き出ており、グローバルに活躍している。H27年度国際強化支援シンポジウム(米国9/19-26)などのさきがけ研究者の国際活動を積極的にリードした点も評価致します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Lin B., Wang J., Ueno T., Harwell A., Inoue T.* and Levchenko A.* “Synthetic spatially graded Rac activation drives directed cell polarization and locomotion” *PNAS* (2012) 109, E3668-E3677
2. Thevathasan, J.V., Tan E., Hui Z., Lin Y.C., Li Y., Inoue T.* and Fivaz M.* “The small GTPase HRas shapes local PI3K signals through positive feedback and regulates persistent membrane extension in migrating fibroblasts” *Molecular Biology of the Cell* (2013)24, 2228-2237
3. Lin YC, Nihongaki Y, Liu T-Y, Razavi S., Sato M., and Inoue T.* “Rapidly Reversible Manipulation of Molecular Activities Using Dual Chemical Dimerizers” *Angewandte Chemie* (2013) 52, 6450-6454
4. Suarez A., Ueno T., Huebner R., McCaffery J.M., and Inoue T.* “Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) family members bend membranes in cells” *Scientific Reports* (2014) 4 ,1-6
5. Lin B., Yin T., Wu Y.I., Inoue T.* and Levchenko A.* “Interplay between chemotaxis and contact inhibition of locomotion determines exploratory cell migration” *Nature Communications* (2015) 6, 6619

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

2013 年

- 4/3/13 7th INBT Nanobiotechnology Symposium, Baltimore, MD
- 4/29/13 Department of Physiology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX
- 5/4/13 ACS Regional Meeting, “Frontiers in Chemical Biology”, University of Maryland College Park, MD
- 8/2/13 NIH Seminar Series in Japanese, NIH, Bethesda, MD
- 9/8/13 246th ACS National Meeting, “Breakthrough” session, Indianapolis, IN
- 9/9/13 UC-Tomorrow Seminar Series in Japanese, University of Cincinnati, Cincinnati, IN
- 11/21/13 Department of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan
- 11/22/13 Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Osaka, Japan
- 12/9/13 Integrated Imaging Center Symposium, Johns Hopkins University, Baltimore, MD
- 12/14/13 2013 ASCB Annual Meeting, Subgroup “Molecular Sensors and Actuators”, New Orleans, LA

2014 年

- 2/17/14 58th Annual Meeting, Plat Form Session, Biophysical Society, Philadelphia, PA
- 3/12/14 Cell, Developmental and Integrative Biology, Hepato/Renal Fibrocystic Disease Center Seminar Series, University of Alabama, Birmingham, AL
- 4/16/14 3rd Japanese Life Science Seminar Series at University of Pennsylvania, Philadelphia,



PA

4/29/14 Award Lecture, Experimental Biology, San Diego, CA

9/4/14 Department of Pharmacology, University of Colorado, Denver, CO

9/6/14 JSPS Annual Meeting for US Fellowship Recipients, Washington DC

9/20/14 Department of Pharmacology, Retreat, Mt. Washington, MD

10/14 In-vivo Cellular and Molecular Imaging Center (ICMIC) Seminar Series, Baltimore, MD

11/6/14 Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Department of Cell Biology, NY

12/7/14 2014 ASCB Annual Meeting, Subgroup Session, Philadelphia, PA

2015 年

1/15/15 Department of Chemistry and Chemical Biology, University of New Mexico, NM

1/30/15 Gordon Conference, Directed Cell Migration, Galveston, TX

2/24/15 National Institute of Health, National Cancer Institute, Cellular and Molecular Biology Seminar Series, Bethesda, MD

3/2/15 Keynote Lecture, 15th International Membrane Dynamics Forum, Kyoto University, Japan

4/29/15 EB2015 ASBMB Annual Meeting, "Lipid Partners: Unusual Suspects", Boston, MA

4/6/15 Department of Chemical and Biomolecular Engineering, North Carolina State University, Raleigh, NC

4/28/15 New Jersey Institute of Technology, Department of Mathematical Sciences, Newark, NJ

5/27/15 Ulsan National Institute of Science and Technology, Department of Chemistry, Ulsan, Korea

5/28/15 Korea Advanced Institute of Science & Technology, Daejeon, Korea

5/29/15 Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB), Plenary Speaker, Seoul, Korea

6/9/15 University of Tokyo, Department of Chemistry, Tokyo, Japan

6/11/15 Kyushu University, Department of Biology, Hakata, Japan

6/16/15 Osaka University, Department of Engineering, Suita, Japan

6/10/15 Okayama University, Department of Engineering, Okayama, Japan

6/23/15 National Institute of Genetics, Mishima, Japan

6/24/15 University of Tokyo, Department of Pharmaceutical Science, Tokyo, Japan

6/25/15 National Tsing Hua University, Department of Medical Science, Hsinchu, Taiwan

6/29/15 BPS Thematic meeting, National University of Taiwan, Taipei City, Taiwan

7/2/15 East China University of Science and Technology, College of Bioengineering, Shanghai, China

7/3/15 Shanghai Jiao Tong University, Department of Biomedical Engineering, Shanghai, China

7/6/15 Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Tokyo,



Japan

- 7/7/15 Kobe University, Bio-Signal Research Center, Kobe, Japan
- 7/10/15 Institute of Transformative bio-Molecules, Nagoya University, Nagoya, Japan
- 9/21/15 JST-HMS Symposium on Systems and Synthetic Biology 2015, Boston, MA
- 9/23/15 JST-JHU Symposium on Systems and Synthetic Biology 2015, Baltimore, MD
- 9/28/15 Dutch Biophysics 2015, Plenary Speaker, Veldhoven, Netherland
- 9/30/15 Eindhoven University of Technology, Biomedical Engineering, Eindhoven, Netherland
- 10/1/15 Delft University of Technology, Bionanoscience, Delft, Netherland
- 10/13/15 Mayo Clinic Cancer Center, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Rochester, MN
- 11/4/15 In-vivo Cellular and Molecular Imaging Center (ICMIC) Seminar Series, Baltimore, MD
- 11/10/15 Chemical Biophysics Mini-Symposia Series, selected by students of the Chemistry, Biochemistry and Biophysics Departments, University of Pennsylvania, PA
- 12/7/15 Department of Neurobiology, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel
- 12/9/15 1st Pearl Seiden International Meeting in Life Sciences: From synthetic biology to discovery and applications, Haifa, Israel

受賞

- 2013 日本薬学会 若手奨励賞
- 2014 R.R. Bensley Award in Cell Biology, American Association of Anatomists
- 2014 文部科学省 若手科学者賞
- 2015 Catalyst Award, Johns Hopkins University, Office of the Provost
- 2015 Discovery Award, Johns Hopkins University, Office of the Provost
- 2016 SPIE's Systems Biology Pioneer Award, International Society for Optics and Photonics

研究報告書

『エピヌクレオソーム』の精密な再構成による遺伝子発現制御解析

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 梅原 崇史

1. 研究のねらい

ヒトをはじめとする真核生物の遺伝情報は、クロマチン構造で凝縮したゲノム DNA を鋳型として発現する。そのため、個体の発生・分化や環境変化に応じてゲノム DNA から遺伝子が適切に発現する過程において、個々の遺伝子の DNA 領域がそれぞれ異なるクロマチン凝縮状態におかれ、その変化を通じて遺伝子発現が制御される。このクロマチンの凝縮状態は、最も微視的には凝縮の最小単位であるヌクレオソームコア粒子の化学修飾状態の相違として検出・制御される。すなわち、ヌクレオソームを構成するコアヒストンの個々のサブユニット・残基における翻訳後修飾(アセチル化、メチル化等)およびヌクレオソーム DNA 上の CpG シトシンの修飾(メチル化、ヒドロキシメチル化等)の有無によってクロマチンの凝縮構造が変化し、その結果として遺伝情報発現の出力が規定される。クロマチン凝縮を制御する分子機構は、断片的な修飾ペプチドをヌクレオソーム中のヒストンテイル領域に見立てた構造生物学・生化学などで研究されているものの、純化した再構成ヌクレオソーム系において個々のエピジェネティック情報が果たす役割の定量的な解析はほとんど進んでいなかった。その理由は、エピジェネティック情報を精密に導入したヌクレオソーム(エピヌクレオソーム)を正確・均一・高純度・大量に再構成することが技術的に困難なことによる。

本研究は、このような「エピヌクレオソーム」の試験管内再構成技術を通して、生体内の修飾状態を反映した真正なエピジェネティック情報を含むヒトヌクレオソームの高次凝縮構造を試験管内で精密に再構成し、個々のエピジェネティック情報がクロマチンの高次凝縮構造の制御に果たす役割を定量的な検出を通して理解することを目指した。この目的のため、本研究では(A)「エピヌクレオソーム」の調製技術の開発、(B)「エピヌクレオソーム」の物性の理解、(C)「エピヌクレオソーム」の反応の理解、の3項目を解析課題に設定した。これらの解析により、ヌクレオソームコア粒子以上の階層性において、ヒトのクロマチン凝縮構造がエピジェネティックな化学修飾を通じて制御される分子機構の一端を定量的に理解するとともに、それらの「エピヌクレオソーム」の物性変化が遺伝子発現制御に至る分子機構を定量的に解析するための研究基盤を確立することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、ヒトをはじめとする真核生物のエピジェネティック情報がクロマチンの凝縮や遺伝子発現の制御に与える影響を定量的に理解するため、「エピヌクレオソーム」に関する(A)調製技術の開発、(B)物性の理解、(C)反応の理解、の3種類の観点から研究を行った。本研究の主要な成果として、遺伝子発現の活性化に関わるヒストン H4 テイルの 4 カ所のリジン

をアセチル化したヌクレオソームコア粒子の再構成とその構造・機能解析を通して、H4 テイルのアセチル化がコア粒子の構造には全く影響を与えずに、ヌクレオソームのビーズ同士のヒストンテイル・DNA 間の相互作用を特異的に弱めることを原子分解能で初めて明らかにした(論文1)。このクロマチンの物性に基づいて、真核生物の細胞核内におけるクロマチン繊維の自己凝縮・自己脱凝縮の制御分子機構モデルが提唱された。また、このヒストンの特定残基にアセチルリジンを経験的に導入する蛋白質の合成技術は、クロマチンの特定状態を特異的に認識するモノクローナル抗体の評価(論文2)や作製(特許出願1)にも応用可能であることを示した。蛋白質の合成技術については、ヒストン以外のエピジェネティクス制御蛋白質(論文3)やRNA転写酵素群(論文4)にも適用することで、技術上の有用性を示した。また、ヒストンの翻訳後修飾を標的としたエピジェネティクスの制御については、ヒストンのリジン残基のアセチル化修飾だけでなく、そのメチル化修飾による制御も重要である。本研究では、「エピヌクレオソーム」の調製技術開発の一環として、蛋白質の任意の複数残基にモノメチルリジンを残基特異的に導入する技術を開発した(論文5)。この技術は今後、様々なエピジェネティック情報を組み合わせた「エピヌクレオソーム」の再構成研究に展開できると期待される。さらに「エピヌクレオソーム」の反応の理解については、クロマチン DNA からの遺伝子発現を経時的かつ定量的に測定する技術基盤の確立がこれまで必要だった。本研究では、「エピヌクレオソーム」を転写反応の鋳型として、蛍光相関法により遺伝子発現産物の量を経時的に検出する新しいクロマチン転写解析系を確立した。

(2) 詳細

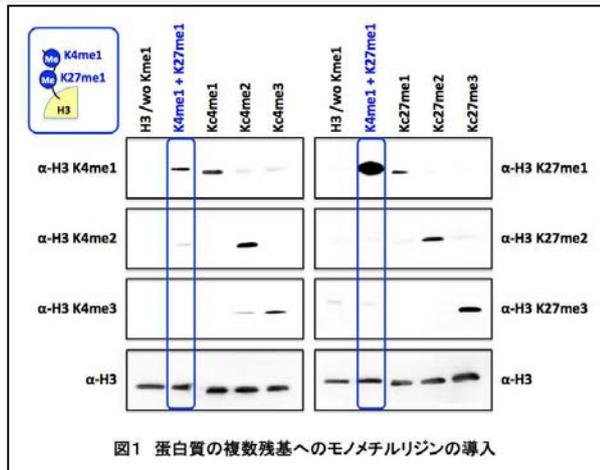
研究テーマA「エピヌクレオソームの精密な再構成技術の開発(調製技術の開発)」

真核細胞の核内においてゲノム DNA はヒストン八量体と 145-147 塩基対の DNA から構成されるヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造を形成している。このヌクレオソーム中のヒストンの N 末端テイル領域は外部から様々な翻訳後修飾を受け、クロマチンの凝縮に影響を与えることが知られている。そこで本研究では、このようなエピジェネティックな翻訳後修飾を残基特異的に導入したヒストンの合成技術を開発することにより、「エピヌクレオソーム」を利用したクロマチンの構造・機能研究に資することを目的とした。

(A-1) 蛋白質への残基特異的なモノメチルリジンの導入技術の開発

これまでの蛋白質工学の技術開発において、蛋白質の特定の複数の残基にアセチルリジンを経験的に導入する技術は開発できていたが、複数の残基にモノメチルリジンを経験的に導入する蛋白質合成は達成できていなかった。そこで本研究では、ヒストン H3 を標的としてエピジェネティックな制御を受ける Lys4 および Lys27 にモノメチルリジン(Kme1)を経験的に導入する技術を開発した。最初に全長ヒストン H3 をコードする遺伝子の Lys4 および Lys27 をアンバーコドンに置換した cDNA を鋳型として、この2残基に Boc-モノメチルリジンを経験的に導入する蛋白質合成を検討した。この際、転写翻訳反応は大腸菌の無細胞抽出液を用いた透析膜反応系で行った。各種条件検討の結果、翻訳終結因子 RF1 を欠失した大腸菌株由来の S30 抽出液を用いた系において Boc-モノメチルリジンを経験的に導入した全長ヒストン H3 蛋白質を最も効率よく合成することができた。この方法で H3 蛋白質の大量合成後に TFA 溶液で脱 Boc 反応を行い、目

的とする Lys4 と Lys27 の位置に残基特異的にモノメチルリジン(Kme1)が導入したヒストン H3 を合成したことを質量分析およびウェスタンブロット法により確認した(図1)。これらの解析により、ヒストン H3 等の蛋白質の複数残基にモノメチルリジンを残基特異的に導入する技術を確認した(論文5)。この技術開発を達成できたことから、研究テーマAはおおむね計画目標を達成した。



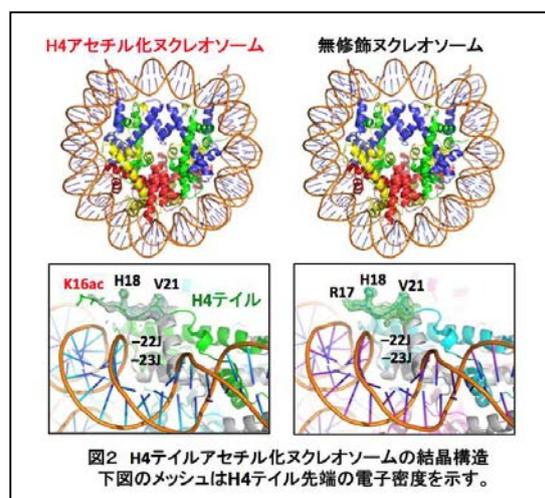
(A-2) アセチル化ヒストン蛋白質を利用したエピゲノム検出分子の開発

ヒストンH4 テイルの Lys5 および Lys8 の両リジンをアセチル化した H4 蛋白質を抗原として、両修飾リジンの存在を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を開発した(特許出願1)。この抗体の認識特異性は、修飾ヒストンおよび修飾ヒストンテイルペプチドに対する結合特異性のみでなく、抗体 Fab 断片の結晶構造解析においても検証した。この抗体を用いて ChIP-seq 解析(クロマチン免疫沈降・塩基配列決定)を行うことにより、がん細胞における活性エピゲノムの局在を特定化した。これらの結果から、「エピヌクレオソーム」の調製技術はエピゲノムモデルの再構成のみでなく、ChIP-seq グレードのモノクローナル抗体の開発にも寄与することを見出した。なお、蛋白質への修飾リジン導入技術については、特定の修飾パターンを認識するモノクローナル抗体群の評価にも有用であることを見出した(論文2)。このような抗体の評価や新規抗体の開発は当初計画から派生した研究成果であり、研究テーマAは予想外に進展した。

研究テーマB「エピヌクレオソームを利用したクロマチン物性の理解(物性の理解)」

[研究テーマA]で技術開発した生化学合成・再構成が可能な「エピヌクレオソーム」のうち、ヒストン H4 の N 末端 テイルの4箇所のリジン(Lys5/Lys8/Lys12/Lys16)をアセチル化したヌクレオソームコア粒子を再構成してその物性を解析した。解析手法は、1) X 線結晶構造解析、2) 生化学的な自己凝縮アッセイ、3) 生化学的な結合アッセイの3種類を用いた。

X 線結晶構造解析については、上記の H4-Lys5/Lys8/Lys12/Lys16 アセチル化ヌクレオソームと無修飾ヌクレオソームをそれぞれ3結晶ずつ解析を行い、それぞれ 2.4 Å および 2.2 Å 分解能で立体構造を決定した(図2)。この構造を比較した結果、H4 のテイルアセチル化はヌクレオソーム形成に影響を与えず、ヌクレオソームの再構成に用いた 147 塩基対



DNA の全長の電子密度が検出できた。またヒストン八量体の構造についても、そのテイル領域を含めて、無修飾ヌクレオソームと基本的に同様であることが判明した(図2)。このことから、ヒストン H4 のテイルアセチル化はヌクレオソームの形成・維持に関して構造的には影響を与えないことが示唆された。また、後成的な翻訳後修飾を予め導入する本法による再構成ヌクレオソームが、細胞核内における後成的修飾ヌクレオソームの状態を反映していることが示唆された(論文1)。

次に、解析した N=3 の結晶構造群について、原子レベルでの安定性を比較することを目的として、ヌクレオソーム DNA の各塩基、およびヒストンの各残基における温度因子を比較した。その結果、ヒストンについては、ヌクレオソーム同士のヒストンテイル・ヒストン酸性パッチ間の結合領域を含めて有意な影響を受けた残基がN末端およびC末端の一部の残基を除いて存在しないことがわかった。その一方、ヌクレオソーム DNA については、自己の H4 のヒストンテイルに近接する領域(superhelical location; SHL -1.5)および隣接するヌクレオソームの H4 テイルに近接する領域(SHL +5.5)において、H4- Lys5/Lys8/Lys12/Lys16 アセチル化ヌクレオソームで有意に高い温度因子が観測された(図3)。また、生化学的な自己凝縮アッセイから、H4 テイルのアセチル化の数に依存して自己凝縮が妨げられることを見出した。さらに、アセチルリジン結合蛋白質の1種である TAF1 プロモドメインとの結合解析から、TAF1 プロモドメインはアセチル化に依存しない基礎的なヌクレオソーム結合能を持つことを見出した。これらの成果から、クロマチン繊維が束形成・解離する過程において、ヒストン H4 テイルのアセチル化はヌクレオソームコア粒子のビーズ構造に全く影響を与えないこと、ヒストンテイル・DNA 間の相互作用を特異的に弱めること、アセチル化認識蛋白質の TAF1 プロモドメインが、無修飾のヌクレオソームコア粒子に結合してアセチル化修飾の認識前に前段階の相互作用を形成しうることを見出した。このことにより、アセチル化「エピヌクレオソーム」およびそのクロマチン繊維が自己凝縮・自己脱凝縮する制御分子モデルの一端を提唱することができた(論文1)。この結果、研究テーマBは計画目標を完全に達成した。

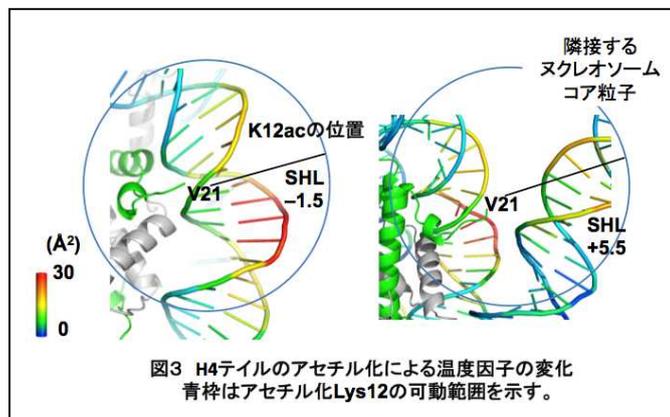


図3 H4テイルのアセチル化による温度因子の変化
青枠はアセチル化Lys12の可動範囲を示す。

研究テーマC「エピヌクレオソームを利用した遺伝子発現制御機構の理解（反応の理解）」

ヒストンのアセチル化やメチル化等の翻訳後修飾は、クロマチンからの遺伝子発現の活性化・不活性化を規定するが、従来の転写解析では細胞由来の修飾混合ヒストンが用いられるなど、クロマチンの個々のアセチル化修飾やその組合せの意義を定量的に解析することが困難だった。そこで本テーマでは、残基特異的にアセチル化を導入したヒストン H4 を含むヒストン八量体と、5S 遺伝子カセットを含む DNA を用いることで、精密なりジンアセチル化を含む di-nucleosome を試験管内再構成した。さらに転写産物の経時的な定量検出を目的として、蛍光相関法による転写産物の検出技術開発を進めた(岡部弘基博士との共同研究)。

蛍光プローブがハイブリダイズできる人工配列を 5S 遺伝子の塩基配列中に挿入することにより、再構成「エピヌクレオソーム」からのクロマチン転写産物量を蛍光相関法によってリアルタイム検出する系を確立した。本テーマについては現在も進行中であるが、研究計画に沿った研究成果が得られる見通しが立った。

3. 今後の展開

本研究成果のうち、[研究テーマA]については、開発した「エピヌクレオソーム」の調製・再構成技術を用いてエピジェネティクス制御蛋白質の機能評価や新規のエピゲノム検出分子の開発への展開が期待される。また、エピジェネティクスの組合せ修飾を持つ「エピヌクレオソーム」の調製技術開発など、エピゲノムを精密に再構成する技術基盤の確立が期待される。[研究テーマB]については、今回明らかにしたアセチル化ヌクレオソーム構造の実データを用いた分子動力学計算との連携や、クロマチンの 30nm ファイバー様構造などの上位階層のクロマチン繊維を創る研究への展開等が期待できる。[研究テーマC]は現在も技術開発中のテーマであるが、本さがけ領域内の研究者やデバイス開発グループとの連携を通して、ヒトのエピゲノムを鋳型とする反応の定量的な理解を目指した中・長期的な新分野の確立が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

本研究で設定した3テーマのうち、[研究テーマA]の「調製技術開発」については、おおむね計画目標を達成できた。本テーマでは、ヒストン H3 等の蛋白質の任意の複数残基にモノメチルリジンを導入する技術を開発して、さがけ研究期間内に論文発表した。本テーマで当初計画の予想外に進展した成果としては、合成した蛋白質を抗原としてヒストン H4 の Lys5 と Lys8 の両アセチル化を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発・出願した点が挙げられる。この抗体を利用することにより、疾患細胞のエピゲノムの新たな局面の解析に展開することができた。[研究テーマB]の「物性の理解」については、当初予想していなかった研究成果が得られたが、計画目標としてはこれを完全に達成した。本テーマでは、ヒストンのアセチル化でクロマチンがどのように脱凝縮するのか？の疑問について結晶構造解析と生化学解析を組み合わせることで明確な結論が得られ、この成果をさがけ研究期間内に論文発表した。[研究テーマC]の「反応の理解」については、ほぼ計画した研究成果が得られる見通しが立った。特に本さがけ領域内での共同研究を通して、蛍光相関分光法で試験管内における遺伝子発現反応をリアルタイム測定する新規技術の開発につながった点に意義があると考えられる。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究実施体制としては、さがけ研究者と1-2名の研究補助者および大学院学生1名の体制で行った。研究開始から終了までこの体制に変更はなく、研究補助者も適宜補充できて遅滞なく研究を行えたことから、ほぼ計画通り実施できた。研究費の執行については、大型機器の購入計画・実施はなく、主に研究の遂行に必要な消耗品費と研究補助者の謝金に計画通り充てることができた。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

近年、エピゲノムの個々の修飾異常はがんや生活習慣病をはじめとする様々な疾患と関連することが示唆されている。本研究のうち、精密な「エピヌクレオソーム」の調製技術(研究テーマA)はエピゲノムの生化学的な解析基盤を提供する点でライフサイエンスの応用分野への波及効果が期待される。本研究でも特許出願を1件実現しているが、当該技術はエピゲノムの「再現」だけでなく、その「検出」にも有用性が期待されており、開発した抗体はエピゲノム関連疾患の原因の究明やその診断等に利用されることが期待される。このような「エピヌクレオソーム」の再構成研究は世界的に見ても研究例が少なく、エピゲノム制御蛋白質の評価や創薬のための基盤技術としても社会的に波及効果があると期待される。一方、本研究のうち、「エピヌクレオソーム」の物性と反応の理解については、ヒトのクロマチンや染色体の制御機構の再構成を通して理解するための基礎的な研究である。これらの研究は、主として基礎生物学上の発見を通して国民の知の向上に資することが期待される。

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

(研究総括)

ヒストンH3などのタンパク質に任意の複数残基にモノメチルリジンを導入する技術を開発し、その技術を用いて、合成したタンパク質を抗原として、ヒストンH4のLys5とLys8の両アセチル化を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発した。また、転写活性化に関わるヒストンH4テイルの4個所のリジンをアセチル化したヌクレオソームコア粒子の構造・機能を解明したことにより、アセチル化「エピヌクレオソーム」およびそのクロマチン繊維が自己凝縮・自己脱凝縮する制御分子モデルを提唱している。このようにこの分野に化学合成の技術を取り入れ、独創的なエピヌクレオソームの構造解析研究を進展させていることを高く評価したい。タンパク質の任意の残基にトリメチルリジンを導入する技術開発では、後藤佑樹研究者と、また、真核遺伝子発現のリアルタイム解析系では、岡部弘基研究者との共同研究を積極的に行い、領域内を活性化させた功績も大きい。

以上の成果である抗アセチル化ヒストンH4抗体を特許出願して、その応用を企業と進めているとのこと、評価します。

今後は生命科学として重要性の高いエピジェネティックな生物現象を、生命科学の研究者と連携して、解明していただきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Wakamori, M., *Fujii, Y., Suka, N., Shirouzu, M., Sakamoto, K., #Umehara, T., #Yokoyama, S. Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation. **Scientific Reports** 5: 17204. doi: 10.1038/srep17204, 2015.
2. Hayashi-Takanaka, Y., Maehara, K., Harada, A., Umehara, T., Yokoyama, S., Ohkawa, Y., Obuse, C., Nozaki, N., Kimura, H. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. **Chromosome Res.** 23 (4): 753-766, 2015.

3. Nagaoka, K., Hino, S., Sakamoto, A., Anan, K., Takase, R., Umehara, T., Yokoyama, S., Sasaki, Y., Nakao, M. Lysine-specific demethylase LSD2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. **Mol. Cell. Biol.** 35 (7): 1068–1080, 2015.
4. Higo, T., Suka, N., Ehara, H., Wakamori, M., Sato, S., Maeda, H., Sekine, S.I., Umehara, T., Yokoyama, S. Development of a hexahistidine-3 × FLAG-tandem affinity purification method for endogenous protein complexes in *Pichia pastoris*. **J. Struct. Funct. Genomics** 15 (4): 191–199, 2014.
5. *Yanagisawa, T., *Takahashi, M., Mukai, T., Sato, S., Wakamori, M., Shirouzu, M., Sakamoto, K., #Umehara, T., #Yokoyama, S. Multiple site-specific installations of *N*^ε-monomethyl-L-lysine into histone proteins by cell-based and cell-free protein synthesis. **Chembiochem** 15 (12): 1830–1838, 2014.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表:

1. Umehara, T. et al. Structure-based development of epigenetics-regulating inhibitors and ‘Epi-nucleosomes’. 7th International Conference on Structural Genomics. Sapporo, Japan. July 31, 2013.
2. Umehara, T. et al. Synthesis of histone proteins containing multiple and site-specific monomethyl-lysines. FASEB Science Research Conference on Biological Methylation: Regulation of Chromatin, Epigenetics, and Disease. Nassau, Bahamas. July 07, 2014.
3. Umehara, T. et al. Functional and structural analyses of H4-acetylated nucleosome core particles. 11th EMBL Conference of Transcription and Chromatin. Heidelberg, Germany. August 24, 2014.
4. Umehara, T. et al. Effect on nucleosomal structure by lysine acetylation of the histone H4 tails. 40th Naito Conference on Epigenetics – From Histone Code to Therapeutic Strategy. Sapporo, Japan. September 16, 2015.
5. Umehara, T. Structure-based development of inhibitors for epigenetic targets. Cambridge Workshop Series: Epigenetics in Drug Discovery. Cambridge, UK. January 26, 2016.

受賞:

平成 26 年度 理化学研究所 横浜事業所 所長賞

研究報告書

「細胞間フィードバック回路による細胞運命の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 4 月～平成 28 年 3 月

研究者: 戎家 美紀

1. 研究のねらい

本研究を開始するにあたって、多細胞生物の発生原理の再構成を目指した。発生生物学や分子生物学の発展によって、発生に必要な遺伝子群の同定は大きく進んだが、実際にそれらの遺伝子を組み合わせれば機能を再現できるかはわからないからである。さらには、作ることで見えてくる発見や新たな疑問があると期待した。再構成する対象としては、発生生物学の最重要原理の一つである、自発的細胞分化を選んだ。つまり、元は同じ種類の細胞からひとりで異なる種類の細胞が生じるしくみの再構成である。具体的には、Delta-Notch シグナルの側方抑制機構を模した人工遺伝子回路を哺乳類培養細胞上に作製し、隣接細胞間に違いを作り出せるか検討することにした。またその際、側方抑制機構によって作り出される2種類の細胞の比率がどのように決まるのか調べた。さらに、側方抑制機構は生体内で細胞の空間パターンを形成できることが知られているため、細胞パターンの再構成にも取り組んだ。

2. 研究成果

(1) 概要

Delta-Notch シグナルの側方抑制機構を模した最小限の人工遺伝子回路を、こういったしくみを持たない哺乳類培養細胞上に再構成した。その結果、遺伝的に均質な隣接細胞を、異なる2種類の細胞(Delta 陽性細胞と Notch 活性細胞)へ非対称化することに成功した。この再構成によって、側方抑制機構が、非対称分裂などの助けがなくても細胞間に一から違い作りだすのに十分なほど強力なしくみであることを実証した。また予想外の発見として、側方抑制遺伝子回路に *Lfng* 遺伝子を含むサブ回路を加えると、2種類の細胞の比率が変化することを、シミュレーションから発見し実験的にも証明した。以上の結果は、2015 年に *Nat Commun* 誌上で発表した(成果論文1)。また本研究を通じて、今後発生のしくみをどんどん作っていくための基礎技術やプロトコルを確立できた。

次に、側方抑制機構を用いて細胞パターンの再構成を目指した。細胞集団中で Delta 陽性細胞と Notch 活性細胞が約 1 対 2 の比率で交互に現れるところまでは達成できたが、明確に空間パターンと呼べるものは形成できなかった。パターン形成も発生生物学の最重要原理の一つであるので、引き続き再構成に挑戦する予定である。

(2) 詳細

研究テーマA「隣接細胞間に違いを生むしくみの再構成」

多細胞生物の発生の基本原理の一つは、自発的な細胞分化である。均質な細胞間に違いを生むしくみとして最も有名なものが、Delta-Notch シグナルによる側方抑制機構である(図1A)。側方抑制とは、隣り合う細胞間で Delta の転写を抑え合うことであり、これが細胞間の(ダブル

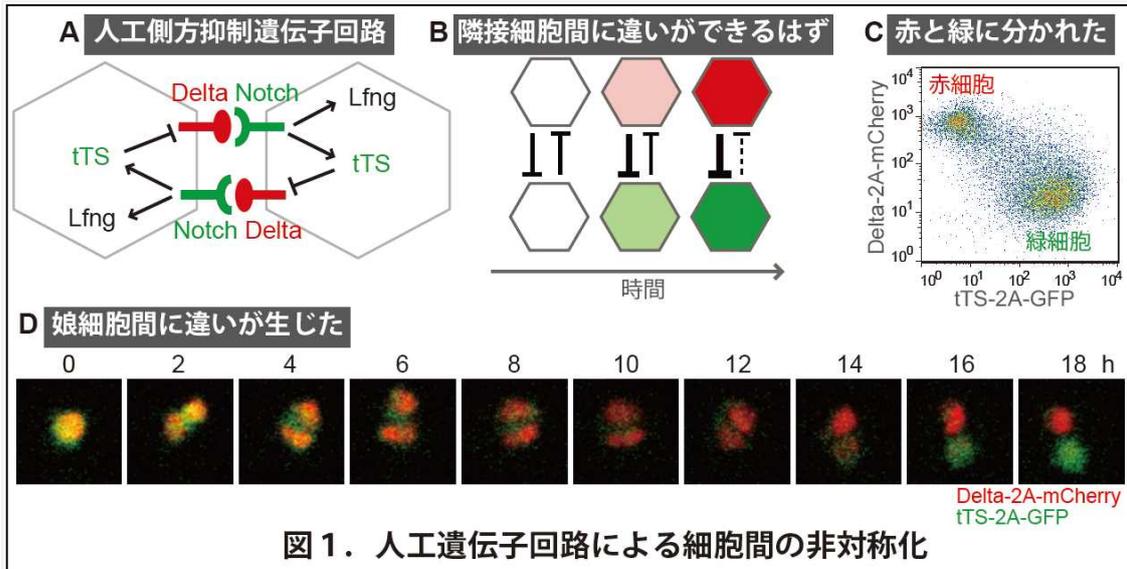


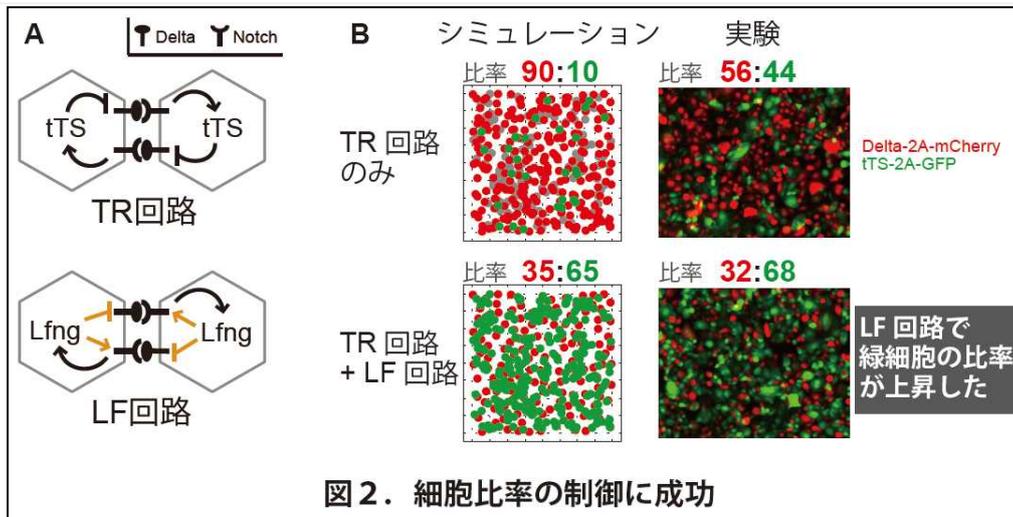
図1. 人工遺伝子回路による細胞間の非対称化

ネガティブ) ポジティブフィードバックループとして働く。ポジティブフィードバックによって、細胞間の偶然の小さな差を増幅していき、隣接細胞間に安定な差を作りだせると考えられている(図1B)。しかし、側方抑制機構だけで細胞間の非対称化に十分なものは作ってみなければわからない。特に、細胞分裂時に特定の因子が非対称に娘細胞間に分配されるという、非対称分裂の助けなどがなくても十分な違いを作りだせるのかが不明であった。

そこで、側方抑制機構を持たない哺乳類培養細胞である CHO 細胞上に、側方抑制機構を模した人工遺伝子回路を作製した(図1A)。この人工側方抑制遺伝子回路は、Delta(リガンド)、Notch(受容体)、tTS(人工的な転写抑制因子)、Lfng(Notch の糖鎖修飾酵素)という、たった4つの遺伝子部品からできている。すると人工側方抑制遺伝子回路を導入した細胞は、二峰性の分布を示した(図1C)。つまり、再構成した側方抑制機構によって、遺伝的に均質な細胞集団が、赤細胞(Delta 陽性細胞)集団と緑細胞(Notch 活性細胞)集団に分かれた。さらに、1つの細胞が分裂してできた2つの娘細胞間でも、片方の細胞が赤色になり、もう片方が緑色になる過程を捉えることができた(図1D)。これらの結果から、最小限の側方抑制遺伝子回路が細胞間の非対称化に十分であることが示せた(成果論文1)。

また再構成を行う中で予想外の発見もあった。人工側方抑制遺伝子回路に用いた Lfng 遺伝子は、Notch の糖鎖修飾酵素であり、Notch が活性化すると Lfng の発現が誘導されることが知られている。私達はこの Lfng に、赤細胞と緑細胞の比率を変化させる役割があることを発見した。私達の実験系において Lfng は、Notch に対しては正の効果を示し、Delta に対しては負の効果を示した(図2A)。すなわち、今回の人工側方抑制遺伝子回路では2つのサブ回路が同時に働いており、ひとつが転写抑制因子 tTS を介した Delta の転写抑制回路(TR 回路)、もうひとつが Lfng を介したフィードバック回路(LF 回路)である。そこで TR 回路と LF 回路を組み合わせさせてシミュレーションを行ったところ、LF 回路の存在によって、緑細胞(Notch 活性細胞)の比率が上昇すると予測された(図2B、シミュレーション)。実際の細胞を用いて実験を行ったところ、TR 回路だけを用いた細胞では赤 56: 緑 44 だった比率が、TR 回路と LF 回路の両方を用いた細胞では赤 32: 緑 68 に変化し、予測が確認された(図2B、実験)。

さらに LF 回路の能力を調べるため、doxycycline という薬剤で TR 回路を特異的に阻害したところ、LF 回路単体でも赤細胞と緑細胞を生じさせることができた。これまで側方抑制といえば

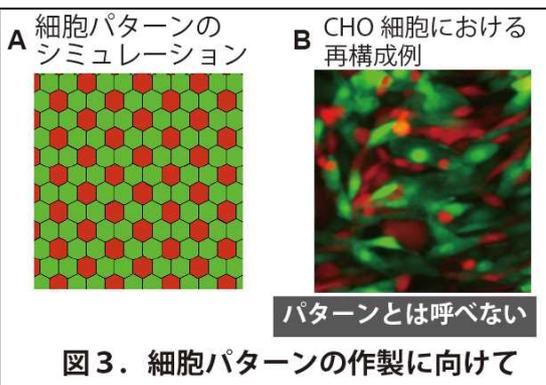


細胞間での Delta の転写抑制、すなわち TR 回路のことだと考えられてきたが、本研究で Lfng という糖鎖修飾酵素のフィードバック回路にも細胞間を非対称化させる能力があることが示された。

研究テーマB「細胞パターンの再構成」

多細胞生物の発生の特徴の一つは、細胞集団が自己組織化で空間パターンを形成することである。側方抑制機構も2次元の細胞集団上に構築した場合には、Salt-and-pepper パターンを形成すると考えられており(図3A)、こういった Salt-and-pepper 細胞パターンは内耳の有毛細胞と支持細胞のパターンなど自然界にも観察される。そこで第2の目標として、Salt-and-pepper 細胞パターンの再構成に取り組んだ。

まず CHO 細胞上に、様々なバージョンの人工側方抑制遺伝子回路を作製し検討した。もっとも Salt-and-pepper 細胞パターンに近いものでは、赤細胞と緑細胞が理論値の1対2に近い比率で交互に出現した(図3B)。しかし、2種の細胞の空間配置は規則的ではなく、空間パターンと呼べるものは形成されなかった。これは主に、CHO 細胞は細胞の形が不規則できれいに並ばないためと考えられた。そこで、より規則的な形を持つ哺乳類培養細胞を用いて細胞パターンの形成を目指した。MDCK 細胞など複数種類の上皮細胞を試したが、どれも CHO 細胞に比べて Delta-Notch シグナルの伝達効率が悪く、細胞間の非対称化が起こらなかった。次に、ES 細胞上に人工側方抑制遺伝子回路を作製し、適切な細胞種へ分化させることを試みた。しかし、ES 細胞においては Delta-Notch シグナルの伝達がほとんど起こらず、人工遺伝子回路の作製ができなかった。



以上のように Salt-and-pepper 細胞パターンの再構成は本研究期間中に達成することはできなかった。しかしパターン形成は発生の最重要原理の一つであり、今後私達がより高次のしきみを作るためにも必要である。よって、側方抑制機構とは別の原理を用いた細胞パターンの再構成にも取り組み始めた。さきがけ期間終了後も継続して挑戦する予定である。

3. 今後の展開

上述のように、悲願である細胞パターンの作製に取り組む。また本さがけ研究において、人工遺伝子回路を作製し解析する基礎技術やプロトコルを確立できたので、今後は発生の他の重要原理もどんどん再構成していく。具体的には現在、細胞パターンに加えて遺伝子発現の同調振動や組織の変形機構の再構成も行っている。最終的には人工組織や人工多細胞生物と呼べるものの再構成が可能であるのか、挑戦したい。

再構成をどんどん進める一方で、多細胞生物の発生に関する新たな発見や予想外の展開も目指している。そのためには再構成系と比較できる vivo の実験系を持つべきだと、本さがけ領域において多くの助言をいただいた。よって、現在行っている再構成プロジェクト達から得られた知見を検証できるような vivo の実験系を、共同研究を中心に習得中あるいは摸索中である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究開始時に目標に挙げていた、Delta-Notch シグナルの側方抑制機構を再構成し細胞間の非対称化を起こすという課題は、完全に達成できた。LF 回路による細胞比率の制御や、LF 回路だけで非対称化に十分など、作中での発見があったのもよかった。これらは、私が合成生物学分野への転向を決めて初めて取り組んだプロジェクトの集大成であり、そこで得られた基礎技術やプロトコルはこれから再構成研究を行っていく上で大きな財産になると思う。細胞パターンが再構成できなかったのは残念であるが、これは近い将来に実現させたい。また私は、本さがけ期間中に理化学研究所にユニットリーダーとして着任し、ラボのセットアップを行った。特に、良いラボメンバーをリクルートできたのは幸運であった。

本さがけ領域には、多様な分野の研究者が揃っていたのと、交流しやすい雰囲気が意図的にうまく作られていたので、非常に多様な助言やマテリアルをいただけた。特に、細胞の機械的な制御や個体の操作は、今後自分達の再構成研究と組み合わせたいと思っていた分野であり、専門家に相談できたのは貴重な機会だった。加えて、構成的理解を目標とする研究者が集まる珍しい領域だったので、作ることの意義やどうすれば発見に結びつきやすいかなどについて議論できたのも有意義だった。今後は本さがけ期間で得られた経験をもとに、発生原理の再構成と発見を目指した研究を進めていきたい。

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

(研究総括)

発生生物学の自発的細胞分化の仕組み、つまり、同じ種類の細胞からひとりでは異なる種類の細胞が生じるしくみに焦点を当て、Delta-Notchシグナルの側方抑制機構を哺乳類培養細胞上に再構成したことは、数理モデルの実証として科学的な意義が高いと思います。この人工側方抑制遺伝子回路を導入した細胞集団は、Delta陽性細胞とNotch活性細胞に自発的に分離して、元は均一な細胞間に違い(非対称性)を作り出すことに成功したことを高く評価し

ます。当初目標を達成し、論文としても高い評価を得ています。

文部科学大臣表彰若手科学者賞(2013)を受賞し、国内外からの招待講演を受けるなど、今後、この分野の第一人者としての活躍を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Matsuda M, Koga M, Woltjen K, Nishida E & **Ebisuya M.**
Synthetic lateral inhibition governs cell-type bifurcation with robust ratios.
Nat. Commun., 6, 6195, doi:10.1038/ncomms7195 (2015).
2. Koga M, Matsuda M, Kawamura T, Sogo T, Shigeno A, Nishida E & **Ebisuya M.**
Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process.
Nat. Commun., 5, 3197, doi:10.1038/ncomms4197 (2014).

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<主要な学会発表>

1. Quan Tissue meeting "Computational approaches to networks, cells and tissues"
スペイン バルセロナ、2013年4月10日、招待講演
2. The 61st NIBB Conference "Cellular Community in Mammalian Embryogenesis"
岡崎カンファレンスセンター、2013年7月10日、招待講演
3. 日米数理生物学会合同大会
大阪国際会議場、2014年7月31日、招待講演
4. JSPS Japan-China Scientific Cooperation Program China-Japan-Korea Joint Symposium on
Developmental Biology
中国 北京、2014年10月22日、招待講演
5. The 29th Annual Symposium of the Protein Society
スペイン バルセロナ、2015年7月22日、招待講演

<受賞>

「文部科学大臣表彰 若手科学者賞」(2013)

<プレスリリース>

文献1に関して、理化学研究所のプレスリリース(2015年2月)
「均一な細胞集団に自発的に違いを生み出す仕組みを再構成—隣り合う細胞がひとりで異なる種類の細胞へ—」

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150205_1/

また、化学工業日報 2015年2月6日朝刊に掲載

研究報告書

「脳内情報を担う動的回路としての『細胞集成体』の計測と制御」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者： 佐藤 正晃

1. 研究のねらい

脳における情報表現を担う動的回路として、カナダの心理学者 Donald Hebb (1904-85) は「細胞集成体 (cell assembly)」と呼ばれる、協調的に働く神経細胞の集団が随時形成する機能的回路の概念を提唱した。本研究は、Hebb の提唱した「細胞集成体」様回路の時空間的活動パターンを、生きた動物の脳内の多数の神経細胞の位置と活動を高解像度で記録できる in vivo イメージング実験と、バーチャルリアリティ (VR) 技術により顕微鏡下に頭部固定したマウスの環境を自在に操作できる空間学習パラダイムを用いて可視化・制御することで、その動作原理の理解と検証を行うことをねらいとする。

脳で記憶の形成に中心的な役割をもつ海馬の錐体細胞は、動物が空間内のある場所に存在するときのみ発火する「場所細胞 (place cell)」としての活動を示すことが知られている。さらに過去の電気生理学的研究では、動物にある空間を探索させると、覚醒時にみられた海馬の神経活動の時間的パターンが、その後の睡眠時に再現される「リプレイ (replay)」と呼ばれる現象が起こることが報告されている。このことは、動物の覚醒時の経験が、海馬において、複数の細胞からなる「細胞集成体」様回路の活動パターンとして記録されることを示している。このような過去の知見から、本課題では場所情報に関連した海馬の「細胞集成体」活動を研究の対象とする。顕微鏡下に作り出された VR 環境を探索するマウスから、海馬の回路活動の時系列イメージングデータを取得した後、このデータから動物が実際に歩行した軌跡の再構成を行うことで、「神経回路活動」と「個体行動」という異なる階層の知見を統合的に理解する。さらにイメージング中の動物の置かれた環境を VR 技術により操作することで、特定の外界の情報に対応した「細胞集成体」活動を制御し、その形成に関する原理を実験的に検証する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、空間行動中のマウスの海馬 CA1 野における細胞集成体様の機能回路をイメージングするために、蛍光カルシウムセンサータンパク質 G-CaMP7 発現トランスジェニックマウス、ウインドウ埋込による海馬 in vivo イメージング手技、マウス用 VR システム、および大規模イメージングデータの自動解析プログラムなどの技術を総合的に用いて、マウスが VR 環境内に設定された仮想直線路を探索するとき海馬の錐体細胞が示す場所特異的な活動に注目して研究を行った。一つ目の具体目標である細胞集成体活動の計測に関する研究では、脳内で場所情報を表現する細胞集成体様回路の活動ダイナミクスが、短期的には動物の行動が歩行時から安静時へ切り替わる際に、互いに近い場所受容野をもつ細胞同士の活動の相関が高いモードから、離れた場所受容野をもつ細胞同士が同期的活動を示すモードへと切り替わることを明らかにした。また長期的には、行動訓練の初期には変化しやすい場所細胞

地図が、訓練の繰り返しにより次第に安定化されることを見いだした。二つ目の具体目標である細胞集成体活動からの動物の行動状態の再構成に関する研究では、画像データのクラスター解析や線形判別分析を行うことで、CA1野の神経回路の活動状態から動物の行動状態を高い精度で推定できることを明らかにした。三つ目の具体目標である細胞集成体活動の制御に関する研究では、報酬または視覚の手がかりが存在する場所のそれぞれに反応する場所細胞の数が他の場所に比べて増加すること、さらにこのような行動上重要な場所の過剰表現(overrepresentation)が、これらの場所に対して反応する細胞の活動が他の場所に対して反応する細胞よりも選択的に安定化されることで起こることを明らかにした。この結果は、行動に重要な外界の情報が、より持続的に海馬の神経回路に貯蔵されていることを示すものである。

(2) 詳細

具体目標 1: VR環境で空間学習する動物の「細胞集成体」活動の計測

VR空間を探索するマウスの海馬CA1神経回路活動をイメージングすることにより、場所情報を担う細胞集成体活動を可視化してその時空間的なパターンを解析することをねらいとした。ステンレス製のヘッドプレートと皮質下の海馬をイメージングするためのウインドウを頭部に埋め込んだ蛍光カルシウムセンサータンパク質G-CaMP7 発現トランスジェニックマウスを、二光子レーザー顕微鏡下のフレームに固定し、動物の前におかれたモニターに映し出される仮想直線路を探索するときの海馬CA1野錐体細胞層の蛍光画像を10分間程度取得して神経回路活動のイメージングを行った。画像解析は、非負行列因子分解に基づいた解析プログラムを用いて、個々の細胞の輪郭と蛍光強度変化を自動的に抽出した。

解析では、得られた活動時系列データからVR環境における場所特異的活動を計算し、これらの場所細胞が形成する細胞集成体様回路の行動状態依存的な短期ダイナミクスと、経験依存的な長期ダイナミクスの両者を明らかにすることを目指した。その結果、脳内で場所情報を表現する細胞集成体様回路の短期ダイナミクスは、動物の行動が歩行時から安静時へ切り替わる際に、互いに近い場所受容野をもつ細胞同士の活動の相関が高いモードから、離れた場所受容野をもつ細胞同士が同期的活動を示す別のモードへと切り替わることを見出した。また、異なるセッション間の画像から同一の細胞を検出して、その反応性の変化を追跡する解析手法を用いることで、場所細胞地図が長期的には繰り返し訓練により次第に安定化されることを見いだした。

具体目標 2: 「細胞集成体」活動からの動物の行動状態の再構成

具体目標1のイメージング実験で得られた場所細胞活動の時系列データを用いて、動物の行動の状態を計算論的に再構成することをねらいとした。計算に用いる細胞数を変化させて実測の軌跡との誤差を評価し、精度の良い再現に必要とされる細胞数と、それらの細胞群のCA1野内での相互の位置関係などを解析した。イメージング画像の2次元相関に基づくクラスター解析では、動物が歩行しているか、または静止しているかという行動状態を、神経回路活動の状態から最大90%程度の正確さで予測することができた。またフィッシャーの線形判別法を用いて解析すると、ある特定の面積の神経回路に含まれる細胞の活動を考慮した場合

に 2 つの行動状態が最も良く分離できるという結果が得られた。今後はベイズ推定を用いた細胞レベルでの神経情報解読を行っていく予定である。

具体目標 3: VRによる「細胞集成体」活動の制御

海馬には「場所」に関する空間情報と、そこに存在する手がかりなどの非空間情報が共に貯蔵されることが考えられる。そこで、VR環境内に設定した直線路に、報酬として水が得られる地点と、視覚的な目印として緑色の大きなゲートをくぐる地点を設定し、これらの特徴が海馬の場所表現に与える効果を調べた。このような直線路を探索するマウスの海馬の場所細胞地図をイメージングすると、報酬または視覚手がかりが存在する場所のそれぞれに反応する場所細胞の数が他の場所と比べて増加することが明らかになった。このような海馬における行動上重要な場所の過剰表現 (overrepresentation) には、(1) 非場所細胞が場所細胞に変化するときにより多くの場所細胞が形成される(2) もともと別の場所に対して反応していた細胞が、訓練によって重要な場所に対して反応するようになる(3) 重要な場所に対して反応する細胞は、他の場所に対して反応する細胞よりも安定して同じ場所に対して反応するために、訓練によりその数が蓄積する、という3つの可能性がある。そこで同一の細胞の場所表現が連続するセッションでどのように変化するかを解析したところ、(1) または(2) のメカニズムではなく、(3) の選択的安定化により上記の過剰表現が起こっていることが示された。この結果は、行動上重要な外界の情報が、より持続的に海馬の神経回路に貯蔵されていることを示すものである。

3. 今後の展開

内嗅皮質第3層 (EC3) または海馬 CA3 野から海馬 CA1 野への神経入力を操作することで、本研究が明らかにした行動状態依存的な CA1 神経回路の動作モードの切り替えメカニズムを明らかにすると同時に、CA1 回路活動の短期的かつ行動依存的なダイナミクスが、より長期的かつ経験依存的な場所表現の安定化に果たす役割を明らかにする。例えば、EC3 あるいは海馬 CA3 野特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと G-CaMP7 トランスジェニックマウスのダブルトランスジェニックマウスに、Cre 依存的に光感受性イオンポンプを発現するアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入し、この動物が仮想直線路を探索するときの海馬 CA1 野の活動を、それぞれの領野からの神経入力を光抑制した条件下でイメージングする。この行動下のイメージングを繰り返し行い、CA3 野または EC3 からの神経入力の抑制によって安静時の同期活動が消失するか、また訓練による場所細胞の数の増加と場所地図の安定化に変化がみられるかを検討する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

海馬における細胞集成体様神経回路活動の計測と制御を目指した本研究では、特に計測に関する部分については、その短期的なダイナミクスと長期的なダイナミクスの両方を明らかにするなどの成果を上げることができた。しかし、計測実験で得られたデータの解析に予想外

に多くの時間がかかってしまったために、制御に関する部分で研究を十分に進めることができなかった。従って、今後は VR の特徴をより生かした行動パラダイムを用いた実験や光遺伝学などの神経活動操作技術と組み合わせた実験を行うなど、特に制御ということを念頭においた研究へと発展させることを課題としたい。また将来的にはこのような研究の延長線上として、脳疾患の病態解明と治療につながる成果や、ブレインマシンインターフェースの開発などに応用される成果を得ることを目指したい。

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

(研究総括)

バーチャルリアリティ下で空間行動するマウスの海馬 CA1 野における細胞集成体様回路の活動をイメージングし、その行動状態依存的な短期的ダイナミクスと、経験依存的な長期的ダイナミクスを解明したことを評価します。また、細胞集成体活動からの動物の行動状態の再構成に関しては、イメージング画像の 2 次元相関に基づくクラスター解析で、神経回路活動の状態から動物の行動状態を、ある程度予測することができるようになったことは、大きな進歩と言えます。その功績による招待講演も多く、その研究の今後が、注目されています。

今後は、「神経細胞の回路形成を細胞集成体として理解する」の当初からの課題に、どう向き合い、成果を出していくのか、を念頭に研究を進めて頂きたいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Sato, M., et al., Generation and imaging of transgenic mice that express G-CaMP7 under a tetracycline response element. PLoS One. 2015, 10 (5), e015354 |
| 2. Manita, S. et al., A top-down cortical circuit for accurate sensory perception Neuron 86(5), 1304-1316, 2015 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Masaaki Sato, Kotaro Mizuta, Masako Kawano, Takashi Takekawa, Tanvir Islam, Hiroshi Yamakawa, Yoko Yamaguchi, Tomoki Fukai, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. "Hippocampal CA1 network dynamics during locomotion in virtual reality" Society for Neuroscience 43rd annual meeting, 2013 年 11 月、米国サンディエゴ

招待講演

1. 佐藤正晃 「生きた脳のはたらきを細胞レベルで見る-海馬セルアセンブリ動態の in vivo



イメージング」第60回脳の医学・生物学研究会、2016年1月、名古屋

2. Masaaki Sato “Hippocampal neural circuit dynamics imaged during spatial behavior in mice” 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会・合同大会シンポジウム「各種モデル動物における記憶過程の可視化」、2015年3月、神戸
3. 佐藤正晃 「バーチャル環境下のマウス脳活動イメージング: 記憶回路の動作原理の解明と疾患研究への応用可能性」 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム「新学術領域研究「マイクロ精神病態」「記憶ダイナミクス」2領域合同若手シンポジウム」、2014年12月、東京
4. Masaaki Sato “Spatial behavior of mice in virtual reality” 第37回日本神経科学大会シンポジウム「脳の現実感を操作する - げっ歯類の神経科学におけるバーチャルリアリティの可能性」、2014年9月、横浜
5. 佐藤正晃「二光子カルシウムイメージングを用いた行動中の海馬神経回路活動の可視化」第87回日本薬理学会年会シンポジウム『最先端技術による神経回路網の多次元解析と脳内微小環境構造の可視化; 脳疾患の原因解明を目指して』、2014年3月、仙台
6. Masaaki Sato “Visualizing the dynamics of hippocampal circuit activity in vivo” Neuro2013(第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会 合同大会) 企画シンポジウム「海馬-嗅内皮質系における認知記憶情報のダイナミクス」、2013年6月、京都
7. 佐藤正晃 「バーチャルリアリティ環境下におけるマウス深部脳神経回路活動のイメージング」計測自動制御学会 システム・情報部門 学術講演会 2012、2012年11月、名古屋

著作物

1. 佐藤正晃 「深部脳イメージング」医学書院 生体の科学 65(5), 418-419, 2014年10月号

研究報告書

「有糸分裂紡錘体におけるミクロな力学反応の再構成」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者： 島本 勇太

1. 研究のねらい

有糸分裂紡錘体は、複製された遺伝情報を正確に娘細胞に分配するために真核生物が備えた染色体の分配装置である。微小管を基礎としたこの細胞骨格装置の異常はがんや遺伝病と関連し、早急かつ本質的な動作原理の解明が必要とされている。近年の網羅的な分子生物学的アプローチによって紡錘体の集合と機能を制御する因子の解析は本質的に完了し、さまざまな分子が同定され、またその機能が推定されてきた。しかしながら、これまでの研究は一分子の生化学・構造解析、もしくは細胞の動態観察に特化したものがほとんどであり、分子レベルの特性からいかにシステムレベルの機能が生み出されているかはほとんど分かっていなかった。紡錘体形成のキープレイヤーとなるのは、微小管ベースの分子モーターである。そこで本研究では、特にキネシン5と呼ばれる有糸分裂に必須のモータータンパク質に注目し、*in vitro* 再構成系による定量的な力学計測と数理モデルによって、この分子がいかに発生力を調節しながら紡錘体の微小管を集団で運動させるかを明らかにすることを目標とした。力学的観点から紡錘体システムの動作原理を理解することで、有糸分裂の論理的な動態制御の基盤を確立することをねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

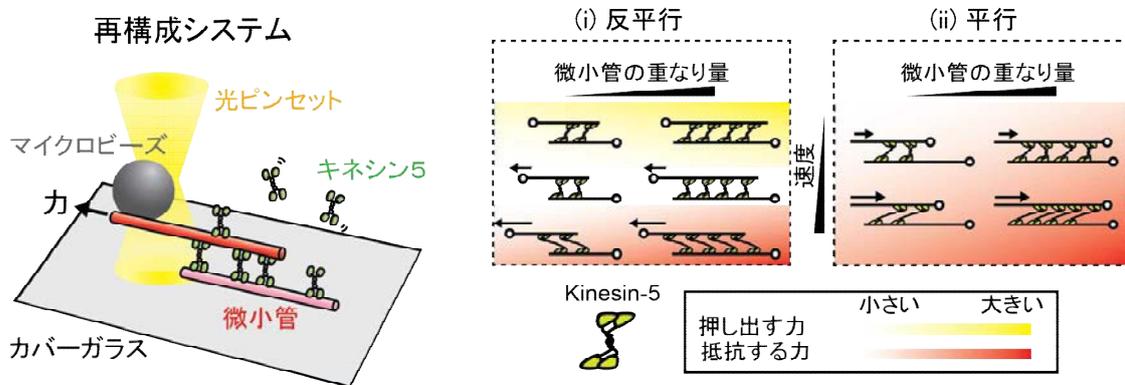
キネシン5は、真核生物に高度に保存された微小管ベースの四量体分子モーターであり、有糸分裂紡錘体の形成に必須である。本研究は、再構成手法と力計測技術、数理解析を用いて、この分子モーターが紡錘体の形態を安定に維持するための本質的な力発生特性を持つことを明らかにした。具体的には、2本の微小管とキネシン5からなる‘小さな紡錘体’が出す力を定量解析できる再構成システムを開発し、微小管の幾何学的配置や運動速度に応じてキネシン5が集団で発生する力を自律的に調節する様子を捉えることに成功した。さらに、これらのデータを数理モデルに統合することによって、紡錘体の構造を安定に維持するために重要と考えられている力の可算性がキネシン5のいかなる分子物性に起因するかを明らかにした。また、これまで知られていなかった、もしくは不明瞭であったキネシン5の新しいいくつかの機能について、*in vitro* 計測によってその存在を実証することができた。以下に成果の詳細を記述する。

(2) 詳細

2-1) キネシン5が2本の微小管を架橋しながら発生する力がいかに制御されているかを明らかにした

光ピンセットと一分子蛍光イメージングを融合した計測系を開発し、2本の微小管とキネシン5から再構成した‘小さな紡錘体’において、キネシン5の集団が細胞骨格の幾何学的情報に応

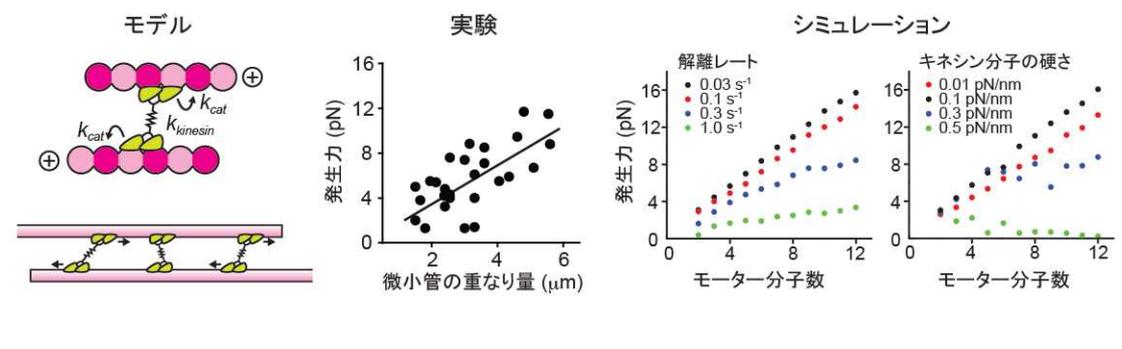
じていかに発生力を調節するかを明らかにした。具体的には、紡錘体の赤道面付近で見られるような反平行の微小管束においては、キネシン5は隣接する微小管の重なり量にスケールされた可算的な力を発生し、紡錘体の極間距離を制御する特性を持つことが明らかとなった。一方、相互作用角度が 180° 異なる平行微小管束では、分子数に依存しない一定の力を出しながらも微小管同士を安定に架橋することがわかった。さらに、隣接する微小管が高速で運動すると、キネシン5はその運動速度に応じた抵抗力を発生する分子ブレーキとして機能することが明らかとなった。すなわち、キネシン5は多機能モーターであり、微小管の幾何学的特徴や運動動態に応じて多分子で出す力の大きさと方向を自律的に調節し、構造コンテキストに応じてその機能を使い分けられることがわかった。下章に述べる数値シミュレーションの結果と合わせて、一連の結果を論文発表した。研究提案の内容は全て達成され、さらにアッセイ系を改良することによって当初は予測していなかった新たな分子機能の発見につながった。



2-2) 微小管運動と重合に対するキネシン5の制御機能を解析するためのアッセイ系を開発した

顕微鏡下で微小管の重合ダイナミクスを再現し、重合活性を保持した微小管上でキネシン5が発生力をいかに制御するかを解析可能なアッセイ系を構築することを目指した。はじめに、確立された方法によって微小管の重合ダイナミクスをインビトロ再構成した。具体的には、観察用フローセルに精製したチューブリンと GTP を共存させ、温度チャンバーを用いて反応系を 32°C まで暖めることで、GMPCPP によって形成した安定な重合核を種としたダイナミックな微小管の重合を実現した。これにキネシン5と ATP を共存させることで重合活性を持った微小管が定常的に運動することが確かめられた。さらに、キネシン5存在下で微小管の重合活性がコントロールと比べて有意に変化することが観察され、この分子モーターが微小管の重合動態を制御する因子としての機能も持ち合わせていることが示唆された。しかしながら、重合・脱重合を繰り返す微小管を光ピンセットで安定に捕捉して発生力を計測することが難しく、従って当初目標としていた上記の‘小さな紡錘体’システムとの融合は実現されなかった。微細加工によって作成した溝に微小管を衝突させ、その曲げの量から力を計測する方法が報告されており、光ピンセットとは異なる方法を使って解決することを考えている。

2-3) 数値シミュレーションによってキネシン5の集団的力発生の制御メカニズムを解析した。キネシン5が多分子で発生する力を自律的に調節する様子を解析可能な数理モデルを作成し、シミュレーションを用いて分子メカニズムを定量的に明らかにした。モデルは、二量体分子モーターに一般的な負荷依存的酵素活性と微小管との親和性(結合・解離速度)を仮定し、これを線形の弾性バネで結合して四量体分子を構成することで、キネシン5の力発生を再現可能なモデルを構築した。これにより、キネシン5が反平行微小管を架橋したときに示す力の加算性は、キネシン5が持つ分子の硬さと微小管への親和性に依存することが示された。さらに、平行・反平行微小管における力学特性の変化は、各キネシン5がそれぞれの発生する力を集団の中で積算、相殺することで実現されていることが示された。計画は順調に進展し、この成果は上述の力計測実験の結果と合わせて論文成果発表を行った。



3. 今後の展開

本研究から、分子モーターキネシン5が、細胞生物学で長年に渡って提唱されてきた紡錘体のサイズ決定メカニズムに必須の力発生機能を持つことが示された。高等生物の初期胚発生において、細胞のサイズは分裂ごとに指数関数的に減少するが、このとき紡錘体のサイズは細胞サイズに正確にスケールされる。発生が進行するにつれて、キネシン5や微小管には翻訳後修飾を初めとしたさまざまな生化学的変化が生じることが知られている。今後は、キネシン5が微小管や細胞質環境の生化学状態をいかに認識して力の出力を調節し、紡錘体の集合と機能に寄与しているかを、開発した再構成系を中心として明らかにしていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究で提案した再構成力計測法の開発については、当初の目的を達成することができ、微小管の幾何学的配置や運動動態を制御しながらキネシン5の発生力を定量的に解析する方法を確立することができた。この方法を用いて得られた結果の一つは、紡錘体研究において長年提唱されてきたモデルを実証したものであり、細胞生物学的にも意義のある研究となったと考えている。さらに当初の計画からアッセイ系に改良を加えることでキネシン5の新たな微小管運動制御機能を発見し、生物学に対する示唆を与えることができた。一方で、キネシン5が微小管の重合動態に与える効果については、予備データは得ていたものの、論文発表には至らなかった。さらに、鍵となる結果が他のグループに先行して報告された。研究機関の移動

によりアッセイ系の再セットアップに時間を費やしたことが一因と考えている。今後は、論文をまとめるタイミングや情報収集の方法も含めて、より包括的に研究を進めていきたい。

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

(研究総括)

真核生物の微小管にある四量体分子モーター、キネシン5が隣接する微小管の間で発生する力を計測可能なインビトロ再構成システムを独自に開発し、これを用いて、微小管細胞骨格の幾何学的特徴に応じてキネシン5が多分子で協調的にその発生力を調節することを明らかにしたことを、高く評価します。この調節は、キネシン5が持つ分子の最適な弾性的硬さと微小管への親和性によって実現されていることを、初めて示唆しました。これらの成果を、一連の論文で発表し、完成度の高いさきがけ研究に仕上げられた。

この功績により平成27年度文部科学大臣表彰若手科学者賞、受賞し、招待講演も多行われ、研究活動が活発に進められていることを評価します。

今後は、細胞分裂の全プロセスについて、同じ志をもつ研究者ネットワークをリードして、タンパク質分子の力学的な解析がなされることを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shimamoto, Y., Forth, S., Kapoor, T. M. Measuring pushing and braking forces generated by ensembles of kinesin-5 crosslinking two microtubules. *Dev Cell* 34, 669–681 (2015)
2. Takagi, J., Itabashi, T., Suzuki, K., Kapoor, T. M., Shimamoto, Y., Ishiwata, S. Micromechanics of the vertebrate meiotic spindle examined by stretching along the pole-to-pole axis. *Biophysical Journal*;106(3):735–40. (2014)
3. Takagi, J., Itabashi, T., Suzuki, K., Kapoor, T. M., Shimamoto, Y., Ishiwata, S. Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size. *Cell Rep.* 5, 44–50 (2013)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 受賞

平成27年度文部科学大臣表彰若手科学者賞

受賞テーマ:「有糸分裂紡錘体の集合と機能を制御する細胞内物理化学の研究」

2. 招待講演

1) Yuta Shimamoto, “Motor protein mechanics and spindle size regulation” Japanese Society for Quantitative Biology (Japan Q-Bio Week), NIG International Symposium (Mishima symposium), Mishima, Japan. 2016年1月12日

- 2) 島本勇太 「有糸分裂紡錘体の自己組織化メカニズム」 生命動態システム科学四拠点合同シンポジウム:生命動態の分子メカニズムと数理 京都大学 2015年3月16日
- 3) 島本勇太 「力計測から見えてきた分裂期紡錘体の可塑性と安定性」 自然科学研究機構プロジェクト合同シンポジウム「機能生命科学における揺らぎと決定」、生理学研究所明大寺キャンパス 2015年3月11日
- 4) 島本勇太 「力計測から見えて来た紡錘体の可塑性と安定性」 理研和光キャンパス 2015年3月4日
- 5) Yuta Shimamoto, “Examining the micromechanical properties of the vertebrate metaphase spindle” The 38th Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan. 2014年11月25日
- 6) 島本勇太 「紡錘体のマイクロメカニクス計測」 第90回日本生理学大会 タワーホール船堀 2013年3月27日

3.学会発表

- 1) Yuta Shimamoto, Scott Forth and Tarun M. Kapoor. Examining mitotic functions of bipolar kinesin Eg5 in a reconstituted minimal microtubule network. The 52nd Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, Sapporo, Japan. 2014年9月25日
- 2) Yuta Shimamoto, Yusuke Maeda, Albert Libchaber, Shin'ichi, and Tarun M. Kapoor. Insights into the micromechanical properties of the metaphase spindle. Biophysical Society 50th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2013年2月5日

4.著作物

- 1) 島本勇太 「モータータンパク質 kinesin-5 が隣接する微小管を架橋しながら集団で発生する力の制御」 ライフサイエンス新着論文レビュー(オンラインジャーナル)
- 2) 石渡信一、福田紀男、島本勇太 「横紋筋のメカノバイオフィジックス:マクロからマイクロへ」メカノバイオロジー 曾我部正博編 第12章 p.159-171 化学同人
- 3) 島本勇太、高木潤 「分裂期紡錘体のマイクロメカニクス」生物物理 55, p.255-258
- 4) 島本勇太 「紡錘体の力学特性」細胞工学、細胞分裂131年目の真実:分子から動態へ 杉本亜砂子編 Vol. 32, p.275-279 学研メディカル秀潤社

研究報告書

「記憶の具現化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 杉 拓磨

1. 研究のねらい

これまで、記憶に関わる多くの分子が同定されてきたが、「記憶の分子実体は何か？」という問いに明確な解答は得られていない。過去の多くの研究から、長期記憶の形成には多数の遺伝子の発現調節が関わっていることが示されてきた。これらの遺伝子の中から、対象とする遺伝子やその挙動が、真の記憶実体であることを証明する最も直接的な方法は、記憶を担う神経細胞を同定し、その細胞そのもので、対象とする遺伝子の発現を操作し、人為的に記憶を創ることである。しかし、実際には、記憶を担う神経細胞は、膨大な数の神経細胞のネットワーク内に存在するため、*In vivo* で記憶を担う神経細胞の位置情報・形態情報を得ることは容易ではない。また、その位置情報・形態情報を保存(標識)しながら、記憶を担う神経細胞のみを遺伝子発現操作することはさらに困難を極める。これらの技術的障壁が、記憶の実体を捉えることを妨げていると考えた。

本研究では、線虫 *C. elegans* が示す、機械刺激に対する馴化学習・記憶現象に着目した。*C. elegans* は他のモデル動物にさきがけ、神経細胞間のコネクトームが電子顕微鏡レベルで明らかにされ、その結果得られる位置情報・形態情報を頼りに、非侵襲に *In vivo* で特定の神経細胞の分子操作が可能なモデル生物である。本研究では、このような *C. elegans* の利点を活かし、その神経回路内の記憶細胞を同定し、それを分子操作することで人工的に記憶を構築し、記憶の実体に迫ることを目的とした。さらに、構築の指標として、記憶過程の分子状態および神経活動状態の非侵襲な定量化法を開発し、構築原理を模索することとした。そして、このような記憶の再構築の試みは、同時に、多細胞生物への構成的アプローチの試金石になりうると考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、線虫 *C. elegans* のシンプルな神経回路をもとに、その分子遺伝学的手法の利点を最大限に活かし、記憶を操作・再構築することを目的とする。そのため、神経回路が完全に明らかにされている *C. elegans* の機械刺激に対する馴化学習・記憶現象に着目し、3つの研究テーマのもとに解析を進めた。

[研究テーマA] 記憶を担う細胞の同定とその操作による記憶の人為的構築では、まず、本研究提案の準備段階から取り組んでいた *C. elegans* の記憶の定量化装置の開発に成功した(図1)。そして、同装置を用い、記憶を担う神経細胞として、*C. elegans* の後ずさりを指令する介在神経細胞AVAとAVDを同定した(Sugi* et al. *PNAS*, 2014)。現在、これらの結果をもとに、次に記載の[研究テーマB]と[研究テーマC]の結果を合わせ、記憶状態の分子操作と再構築を図っている。

[研究テーマ B] 記憶過程の神経活動状態の定量化では、まず、自由行動中の *C. elegans* の神経活動を非侵襲に長時間計測するためのシステムの構築を試みた。神経活動をモニターする蛍光プローブとしてカルシウムインディケーターG-CaMP を *C. elegans* の記憶細胞である AVA 神経細胞に導入した *C. elegans* を準備した。そして、自由行動中の神経活動を長時間にわたり定量化するための装置の開発に成功した。現在、この装置を用い、記憶過程の神経活動状態の解析を行っている。

[研究テーマ C] 記憶過程の分子状態の同定・定量化とその操作ツールの確立では、まず、*C. elegans* の馴化学習・記憶に関わる分子の同定を試み、その結果、記憶細胞である AVA と AVD 神経細胞において、興奮性神経伝達を促進する AMPA 受容体と MAP キナーゼ p38 の間にフィードバック制御が存在し、これが馴化学習・記憶の成立を導く可能性を得た。さらに、その操作を細胞特異的に行うため、最新の遺伝子発現制御技術であるゲノム編集技術を導入し、標的とする AMPA 受容体のゲノム・エピゲノムを、細胞特異的に操作する方法の確立を行った。

以上の 3 つの研究テーマによる成果をまとめると、本研究では、記憶細胞の同定と様々なツールの開発に成功した。また、その記憶細胞において記憶の実体を担う分子の時間情報も得た。今後は、これらの集大成としての、記憶の操作・再構成をさらに推進する。

(2) 詳細

[研究テーマ A] 記憶を担う細胞の同定とその操作による記憶の人為的構築

C. elegans は通常、振動や接触などの物理刺激に対し、後ずさりの逃避行動を示す (図 1 上段左)。一方、約 6 時間定期的に物理刺激によるトレーニングを経験すると、刺激に馴れて記憶し、24 時間後に再び刺激を受容しても、後ずさり距離の減少・消失が見られる (図 1 上段中央)。つまりトレーニングの有無における後ずさり距離を計測することにより、行動の可塑的变化 (記憶) を定量化することが可能という、馴化学習・記憶のパラダイムが知られていた (Bozorgmehr et al. *Front Physiol*, 2013)。一方、この行動パラダイムは 20 年以上前から知られていたが、本さきがけ研究を開始する時点において、ほとんど研究が進んでいなかった。その理由は、特定の時間間隔で振動刺激を精度よく加え、またその後ずさり距離をハイスループットに定量化する手法が確立されていないことに起因すると考えられた。そこで、本研究では、この実験系の整備から着手した。まず、シリンダーのピストン運動を利用し、9 つの線虫飼育プレートに同時に振動刺激を加えられるように設計し (図 1 下段左)、振動刺激のタイミングも自動化し、任意のプロトコル (図 1 下段右) で *C. elegans* のトレーニングを行えるようにした。そして、後ずさりを記録・定量化するソフトウェアも開

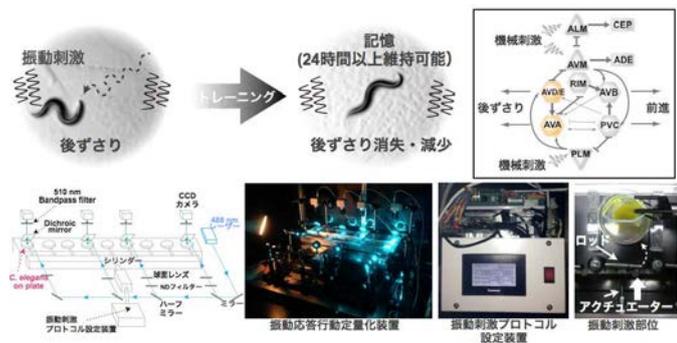


図 1. (上段) 機械刺激に対する行動の可塑的变化の系と神経回路。(下段) 機械刺激応答行動のハイスループット定量化装置。振動刺激プロトコル設定装置により、振動刺激のタイミング(トレーニングのプロトコル)を設定し、自動で *C. elegans* へ刺激供与。

発した。動物の行動は、一般的に非常に個体差も大きく、恣意性を排除し、慎重に実験を進めることが要求されることから、本装置開発では、ほぼ全ての実験過程を自動化した。以上の装置開発により、再現よくハイスループットに *C. elegans* の馴化学習・記憶を定量化する実験系の整備に成功した。

次に、哺乳類の記憶形成の目印とも言える転写因子 CREB のリン酸化を指標に、振動刺激の記憶が刻まれた神経細胞を同定することを試みた。図 1 上段右に示すように、*C. elegans* の振動刺激への応答行動を支配する神経回路は既に明らかにされていたことから、この神経回路内の各細胞に特異的に CREB のリン酸化を阻害する遺伝子を発現させ、それぞれのトランスジェニック線虫株の記憶を、開発した装置により定量化した。その結果、後ずさりを指令する介在神経細胞 AVA と AVD の CREB のリン酸化を同時に阻害した場合に、記憶に異常が見られた (図 2)。この結果から、AVA と AVD が記憶を担う神経細胞であるという結論を得た (Sugi* et al. *PNAS*, 2014)。

記憶を担う神経細胞の実体が得られたことから、次に、その神経細胞における分子レベルの記憶の実体を捉える必要がある。研究テーマ C に詳細に記載するように、分子実体と予想される結果が得られつつあり、現在、記憶の操作・再構築を進めている。

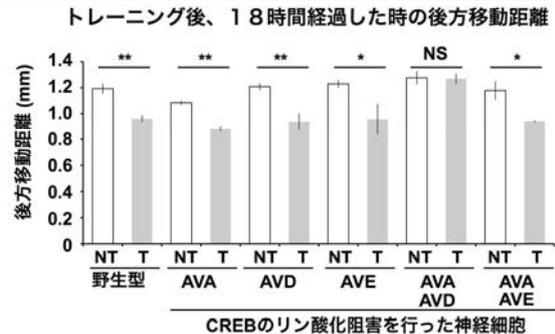


図 2. CREB のリン酸化阻害による記憶を担う神経細胞の同定

[研究テーマ B] 記憶過程の神経活動状態の定量化

まず、カルシウムインディケーター G-CaMP を AVA や AVD を含む少数の神経細胞のみに特異的に発現させた *C. elegans* 株を準備した。記憶過程という 5 時間以上の長時間にわたり、G-CaMP の蛍光シグナルを定量化するためには、(1) その蛍光の褪色を避けるため、一定時間間隔でシグナルを取得し、さらに(2) 個体の動いている状態を維持した非侵襲的な計測が必要となる。そこで、まず、(1) と(2) の条件を満たす装置の開発を行った。原理としては、電動ステージ上に *C. elegans* 個体を飼育したプレートを精置し、取得した画像を LabVIEW により処理しながら、個体の蛍光輝点を常にカメラの視野中央に配置するように電動ステージが動作するためのプログラムを作成した。この装置を用いて、AVA 神経細胞の神経活動を定量化した結果、後ずさり行動に伴い、AVA 神経細胞が活性化の様子が定量化された(図 3)。さらに、この装置に、2 波長の蛍光輝点の同時計測を行うための W-View システムを搭載し、G-CaMP 由来の 509 nm の蛍光の計測と、同じ細胞にレファレンスとして発現させた TagRFP 由来の 583 nm の蛍光の計測を同時に行えるように装置を改良した。現在、この装置を用いて、記憶過程における細胞特異的な長時間の神経活動定量化を行っている。

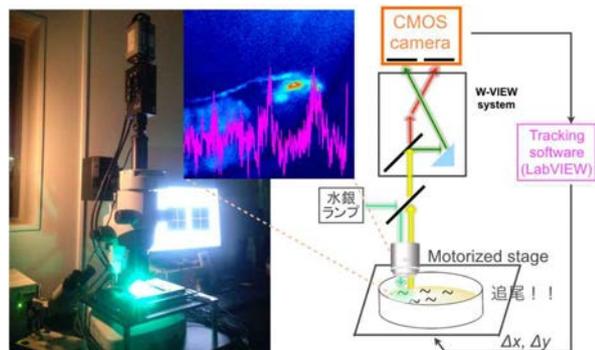


図 3. 自由行動中の神経活動計測装置の開発。中央写真は、後ずさりに伴い、AVA が活性化の様子を定量化。

さらに、この装置に、2 波長の蛍光輝点の同時計測を行うための W-View システムを搭載し、G-CaMP 由来の 509 nm の蛍光の計測と、同じ細胞にレファレンスとして発現させた TagRFP 由来の 583 nm の蛍光の計測を同時に行えるように装置を改良した。現在、この装置を用いて、記憶過程における細胞特異的な長時間の神経活動定量化を行っている。

[研究テーマ C] 記憶過程の分子状態の同定および定量化とその操作ツールの確立

記憶を担う神経細胞として同定した AVA と AVD には、興奮性神経伝達を担う AMPA 受容体が高発現しており、*C. elegans* のトレーニング過程で、その発現量が減少することが知られていた(Bozorgmehr et al. *Front Physiol*, 2013)。そこで、本研究では、まず、この AMPA 受容体のプロモーター解析とその制御因子の同定を行った。その結果、AMPA 受容体と、MAP キナーゼの1つである p38 の間にフィードバック機構が存在する可能性が示された。具体的には、生化学的に p38 のリン酸化を確認した結果、振動刺激によるトレーニングによりリン酸化が減弱し、AMPA 受容体の遺伝子発現を減少させる変異を導入すると、p38 のリン酸化量はトレーニングの有無に関係なく低下が見られた。下流の AMPA 受容体に変異を導入して、上流の p38 のリン酸化に影響が及んでいることから、この制御機構はフィードバックの関係にあると考えた。

この結果をもとに、記憶を担う神経細胞 AVA と AVD を特異的に、AMPA 受容体の遺伝子発現量を人為的に操作すれば、p38 のリン酸化状態と記憶状態を同時に操作することが可能と考えた。そこで、本研究では、広島大学の山本卓教授の研究室と共同で、最新の遺伝子発現操作技術であるゲノム編集技術を

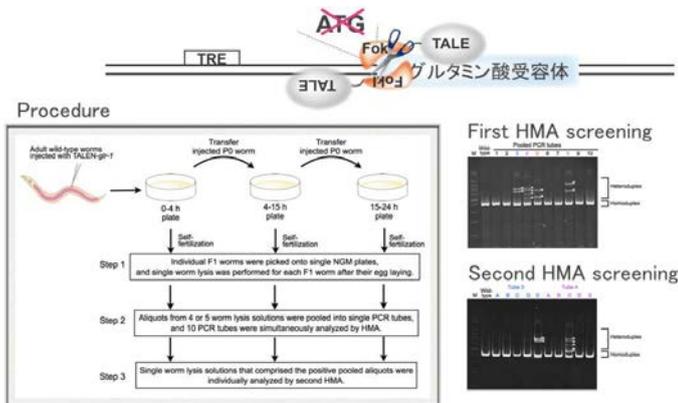


図 4. AMPA 受容体遺伝子座に結合する TALE を用いた遺伝子破壊

導入した。*C. elegans* では細胞特異的な遺伝学的手法を利用できるため、これにゲノム編集技術を融合することにより、新たな技術として、細胞特異的な標的遺伝子座の発現制御法の確立を目指した。まず、パイロット実験として、AMPA 受容体のプロモーター領域に結合し、ゲノム配列特異的な変異を導入するための TALEN を作製し、*C. elegans* に導入した。その結果、6.5%の確率で、変異体を得ることに成功した(図 4; Sugi* et al. *Dev Growth Differ*, 2014)。次に AMPA 受容体のプロモーターに結合する TALE 型 DNA 結合ドメインに、転写活性化因子 VP64 を連結した cDNA を作製し、*C. elegans* の少数の神経細胞にのみ導入した。その結果、通常、AMPA 受容体の発現の見られないグリア細胞 AMsh 細胞において、AMPA 受容体のレポーター DsRed を人為的に異所発現誘導することに成功した。今後、このようなツールの種類をさらに拡げ、さらには、Koner mann et al. 2013 の報告をもとに、光刺激により、記憶を担う細胞 AVA と AVD 特異的に遺伝子発現操作を行う予定である。

3. 今後の展開

今後は、細胞特異的な AMPA 受容体の遺伝子発現操作ツールの光刺激誘導型化と拡充とともに、それらを用いた人為的な記憶状態の創出・消去を実現することが急務である。具体的には、記憶形成を促す振動刺激トレーニングの代わりに、光刺激により、あたかも振動刺激を経験したような記憶状態を導くことや、またそれに伴う p38 のリン酸化の減弱が観察されるかどうかを検証する。一方、振動刺激によるトレーニングを行った直後の *C. elegans* に対し、人為的なエビ

ゲノムの消去から、記憶を忘却へと導くことも目指す。いずれの研究においても、重要なことは、p38 と AMPA 受容体からなるフィードバック制御機構が記憶の本体である可能性を検証することである。また、効率的な操作・再構築には、神経活動状態の指標にした光刺激のタイミングの検証が必要不可欠であることから、研究テーマBで開発した装置により、記憶形成過程から忘却過程に至るまでの神経活動状態の定量化を優先的に進める予定である。これらの時系列データを利用し、最終的に、記憶の実体と考える一般法則を提案したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

多くのモデル生物の中でも、驚くほどシンプルな神経回路を持つ線虫 *C. elegans* においては、記憶の実験・解析系はそれほど多く確立されておらず、その実験系を確立できたことは、今後、オリジナルな研究を行うための重要な下地となった。また、その実験系を利用し、細胞レベルにおける記憶の痕跡として AVA と AVD 神経細胞を明らかにした。そして、従来の分子遺伝学的手法のみならず、これまで *C. elegans* の行動遺伝学の分野であまり多用されなかった生化学的手法と生物物理学的手法を積極的に導入したことにより、記憶の媒体と期待される分子機構も見えてきた。一方、このような分子機構は、現時点ではこれまで神経科学分野で同定されてきた多くの分子機構の中の1つに過ぎない。本さがけ研究の「記憶の実体を捉える」という目的を達成するためには、同定した記憶細胞その場で分子機構を人為的に操作・再構築することが必要不可欠であるが、これまで得た知見・ツールをもとに、今後、目的を達成することは十分可能であると考えている。

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

(研究総括)

*C. elegans*の記憶を定量化する装置を独自に開発し、その装置を用いて、*C. elegans*の後ずりを指令する介在神経細胞AVAとAVDを、記憶を担う細胞として同定した。さらに、神経活動をモニターする蛍光プローブを*C. elegans*の記憶細胞であるAVA神経細胞に導入した。*C. elegans*を作製して、自由行動中の神経活動を長時間にわたり定量化するための装置の開発にも成功している。このように独自の解析ツールを次々に開発して、記憶操作に向けて着実な進展がみられ、大いに評価します。これらの成果により、招待講演も多く、活躍の幅を広げている。

今後、記憶形成過程から忘却過程に至るまでの神経活動状態の定量化を優先的に進め、これらの時系列データを利用し、最終的に、記憶の実体と考える一般法則の提案を期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sugi T*, Ohtani Y, Kumiya Y, Igarashi R, Shirakawa M (2014) High-throughput optical quantification of mechanosensory habituation reveals neurons encoding

memory in <i>Caenorhabditis elegans</i> . <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 111, 17236–17241.
2. <u>Sugi T*</u> , Ohtani Y (2014) Simplified method for cell-specific gene expression analysis in <i>Caenorhabditis elegans</i> . <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 450, 330–334
3. <u>Sugi T*</u> , Sakuma T, Ohtani Y, Yamamoto T (2014) Versatile strategy for isolating transcription activator-like effector nuclease-mediated knockout mutants in <i>Caenorhabditis elegans</i> . <i>Dev Growth Differ</i> 56, 78–85

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

原著論文

- 1) Yoshinari Y, Mori S, Igarashi R, Sugi T, Yokota H, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M
Optically detected magnetic resonance of nanodiamonds *in vivo*; Implementation of selective imaging and fast sampling
J Nanosci Nanotechnol Vol. 15 No.1, 1014–1021, 2015
- 2) Igarashi R, Yoshinari Y, Yokota H, Sugi T, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M
Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds *in vivo*
Nano Letters Vol. 12 No.11, 5726–5732, 2012

学会発表

- 1) Takuma Sugi
Neural circuit encoding mechanosensory habituation in *C. elegans*
5th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology 2015, Nanjing, China, 2015
(招待講演)
- 2) 杉 拓磨
「生物学的アプローチによる記憶の実体解明への挑戦」
京都府立医科大学 2015年4月(招待講演)
- 3) Takuma Sugi
Transcription activator like effector nuclease-mediated knockout mutants in *C. elegans* to study neural circuits
International Single Molecule & Genome Engineering/Editing Europe, University of Cambridge, UK, 2014(招待講演)
- 4) 杉 拓磨
「線虫の記憶を刻むリズムとエピジェネティクス」
理化学研究所、和光、2014年(招待講演)
- 5) 杉 拓磨
「線虫 *C. elegans* のゲノム編集による個体機能の再構成への試み」
第3回ゲノム編集研究会、広島大学、2013年(招待講演)

受賞

なし

総説

1) 杉 拓磨

メカニカルな刺激の馴化学習・記憶現象の実験系確立とその神経基盤
細胞工学 Vol. 34, No. 4, 1-4, 2015

2) 杉 拓磨

私の学会聞き歩き (The First Annual Winter q-bio Meeting) : 構成 (合成) 生物学の
最前線にて
細胞工学 Vol. 32, No. 6, 727-728, 2013

著書

1) Takuma Sugi (分担執筆)

Book Title: Targeted Genome Editing Using Site-specific Nucleases: ZFNs, TALENs,
and the CRISPR/Cas9 System

Chapter 4: Genome editing in nematode

Springer 71-80, 2015 (担当ページ 71-80 ページ/全ページ数 205 ページ)

2) 杉 拓磨 (分担執筆)

今すぐ始めるゲノム編集 (TALEN を用いた線虫の遺伝子改変法)

実験医学別冊 122-129, 2014 (担当ページ数 122-129 ページ/全ページ数 205 ページ)

プレスリリース

1) Sugi T*, Ohtani Y, Kumiya Y, Igarashi R, Shirakawa M

High-throughput optical quantification of mechanosensory habituation reveals
neurons encoding memory in *Caenorhabditis elegans*

Proc Natl Acad Sci USA Vol. 111 No. 48, 17236-17241, 2014

JST と京都大学の共同プレスリリース「嫌いな刺激に馴れる仕組みを線虫で発見」

活動

1) 2016 年 2 月 マックスプランク研究所より PhD コース学生のインターンシップ (2 週
間) の受け入れ

研究報告書

「進化的・構成的アプローチによる哺乳類型大脳皮質層構造の再設計」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 野村 真

1. 研究のねらい

我々ヒトを含めた哺乳類の大脳皮質は感覚、随意運動、記憶学習、認知機能を司る最上位中枢として機能している。哺乳類大脳皮質は胎児期の細胞分裂によってその表面積を拡大し、かつ多種類の神経細胞を産み出すことにより6層の層構造を形成する。大脳皮質の6層構造は他の脊椎動物には決して見られないことから、哺乳類進化の過程で独自に獲得された形質であると考えられる。こうした哺乳類型大脳皮質構造を産み出した発進進化学的機構については多くの説が唱えられているが、その実験的な裏付けは未だになされていない。哺乳類大脳皮質はよりシンプルな形態を示す爬虫類型大脳皮質から進化してきたと推測されている。そこで本研究提案では、申請者が独自に開発した爬虫類胚の個体遺伝子操作技術と、試験管内での大脳皮質再構築系を組み合わせることにより、爬虫類の大脳皮質を哺乳類型に改変・再設計することを目指した。申請者のこれまでの解析により、哺乳類大脳皮質を構築する細胞構成要素は、ほぼすべて爬虫類型皮質にも存在することが明らかとなっている。しかしながら、神経細胞を産み出す頻度とタイミング、また神経細胞の分化の時空間的制御機構が、爬虫類と哺乳類では大きく異なっており、これが爬虫類型のシンプルな皮質形態をもたらしている主要な要因であると予測された。そこで本研究では、哺乳類と爬虫類の大脳皮質を構成する神経細胞の時間的・空間的な発生機構を比較し、さらに神経細胞の形態や配置を改変することにより、哺乳類型大脳皮質のフェノコピー創出実験を試みた。こうしたアプローチを導入することで、大脳皮質進化の過程において生じた発生プログラムの修飾・改変箇所を同定することを本研究提案の最終目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

今回の研究成果により、1) 哺乳類大脳皮質の各層を構成する神経細胞に発現する遺伝子(転写因子)は、爬虫類や鳥類の大脳にも発現していること、しかしながらその発現制御メカニズムが哺乳類とは大きく異なっていることが明らかとなった。さらに、2) 哺乳類型大脳皮質の発生過程では、大脳皮質原基を移動中する神経細胞が多極性から双極性の形態に変化し、この特徴的な形態変化が哺乳類型層構造の形成に必須であるが、この神経細胞の形態変化が爬虫類皮質では起こらないことを発見した。さらに、哺乳類と爬虫類の皮質の発生過程を比較したところ、この哺乳類型の神経細胞の形態変化に特定の細胞外シグナルが関わっていることを見出した。この結果を踏まえて、爬虫類胚におけるこのシグナルの人為的操作を行ったところ、爬虫類の神経細胞の形態に大きな変化が生じ、多極性から双極性の形態へと

転換することを発見した。これらの結果は、神経細胞という「要素」の多様化、さらに構成要素を「配置」する機構の変化が、皮質層構造の進化の過程で重要な役割を果たしたことを示唆している。また今回の成果から、哺乳類独特の皮質層構造をもたらした遺伝学的背景として、哺乳類独特の遺伝子抑制機構を同定することに成功した。従って、哺乳類進化の過程で、恐らくすでに存在していた遺伝子の転写調節機構に大きな変化が生じ、時間的・空間的に厳密にコントロールされた遺伝子の活性化機構が確立されたことが、哺乳類に独特の脳構造の進化に大きく貢献したと推測された。

(2) 詳細

研究テーマ A: ヤモリ大脳皮質神経幹細胞の幹細胞クローン解析と神経細胞の移動様式の解析

哺乳類大脳皮質は多種類の神経細胞で構成されているが、これらの神経細胞は単一の神経幹細胞から産生されることが明らかとなっている。一方、爬虫類型の皮質にも多種類の神経細胞が存在するが、これらが単一の神経幹細胞から産生されるのか否かは明らかとなっていなかった。この問題を明らかにするため、GFP を発現するレンチウイルスベクターを用いて、爬虫類(ヤモリ)、鳥類胚の大脳皮質(ニワトリ背側外套)の神経幹細胞の系譜解析を行った。現在までにニワトリ胚 10 クローン(N=49 細胞)、ヤモリ 5 クローン(N=11 細胞)を解析し、少なくとも1つの神経細胞クローン集団が2つ以上の転写因子を発現するヘテロな神経細胞サブタイプから構成されていることを確認している。従って、爬虫類・鳥類皮質(外套)も哺乳類の皮質と同様に単一の神経幹細胞から多種類の神経細胞が産生されていることを同定した。次に、哺乳類と爬虫類の皮質を構成する神経細胞に発現する転写因子の発現様式を比較した。その結果、哺乳類では BCL11B (CTIP2) と SATB2 の2つの転写因子は層ごとに排他的な発現を示すのに対し、爬虫類、鳥類では多くの細胞がこれらの転写因子を同時に発現していた(図1)。さらに、bcl11b のゲノム領域の比較を行ったところ、転写の抑制に必要なシス制御領域である MAR (Matrix Attachment Region) の数と分布が動物ごとに大きく異なり、哺乳類 bcl11b のゲノム領域に存在する5'側の MAR が爬虫類、鳥類には存在しないことが明らかとなった(図2)。また個々の MAR の転写活性を比較したところ、哺乳類に比べて爬虫類、鳥類の MAR の転写抑制活性が低いことが明らかとなった。以上の結果から、哺乳類進化の過程で bcl11b のゲノム配列に変化が生じ、2つの転写因子を排他的に発現させる機構が獲得されたことにより、層を構成する神経細胞の形態的・機能的特異化が進んだことが予測された。さらに、皮質原基を移動する神経細胞の移動様式についても種間比較解析を行った。その結果、哺乳類皮質の構築過程で見られる神経細胞の多極性から双極性への形態変化が、爬虫類、鳥類皮質では観察されないことが明らかとなった。すなわち、神経細胞が双極性に転換することで、先に移動した神経細胞の集団を後から産まれた神経細胞が乗り越え、常に皮質の最外部へと到達することで皮質6層構造が形成されると考えられ、この神経細胞の形態変化が哺乳類型層構造獲得の鍵革新の一つであることが予測された。

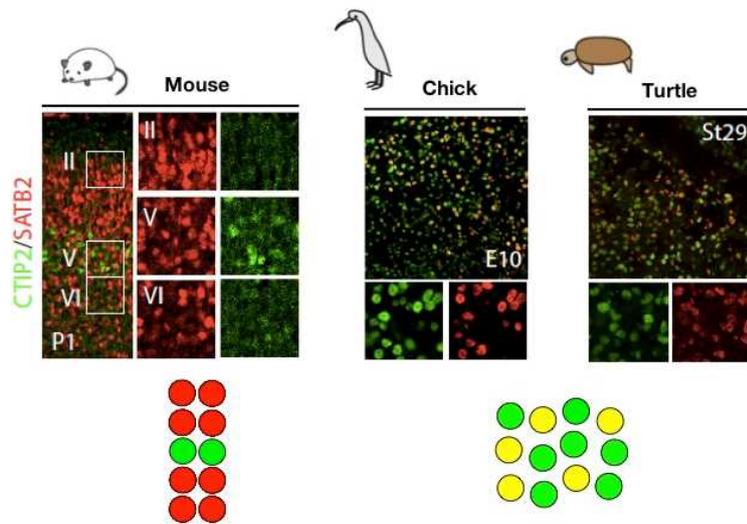


図1: 神経細胞サブタイプを決定する転写因子 BCL11B (CTIP2) と SATB2 の発現を様々な羊膜類の大脳皮質騒動領域で比較した結果。哺乳類(マウス)ではこれらの転写因子は層ごとに排他的な発現を示すが、鳥類(ニワトリ)、爬虫類(カメ)では2つの転写因子は1つの神経細胞で同時に発現している。下の丸は発現の様式を模式的に表したものの。

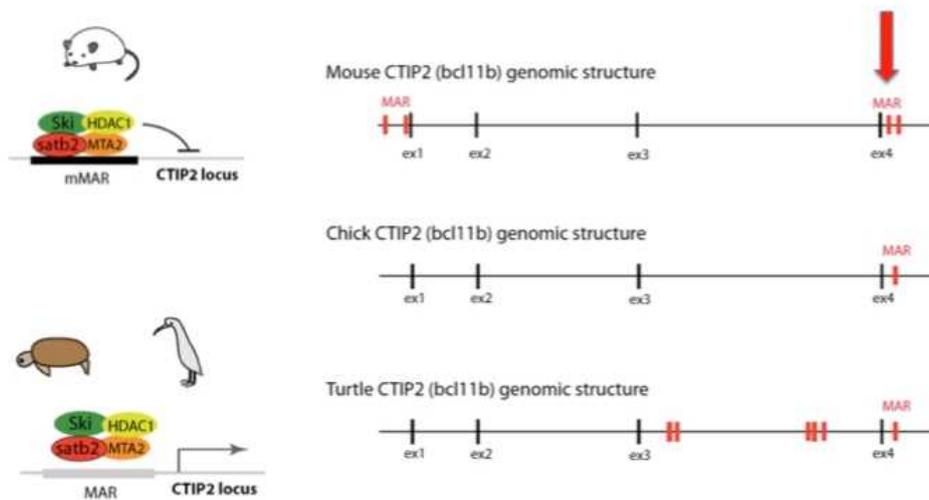


図2: 様々な羊膜類の *bcl11b* (CTIP2) 遺伝子のゲノム領域における転写抑制に必要な調節領域の比較結果。MARと呼ばれるシス制御領域の数と分布が種間で大きく異なっており、特に5'側のMARは哺乳類にしか存在しないことが明らかとなった。また3'側のMARの転写抑制活性は鳥類や爬虫類では低いことも、これらのMARを組み込んだベクターによるルシフェラーゼアッセイにより確認している。

研究テーマ B 「In vitro, in vivo におけるヤモリ大脳皮質の改変による哺乳類型皮質層構造の作製」

研究テーマ A の結果を踏まえて、試験管内および発生する胚において爬虫類皮質の発生過程を改変することで、哺乳類型の層構造を持つ大脳皮質の表現型模写実験を試みた。まず、試験管内での再現について、ヤモリ大脳皮質から神経幹細胞を単離し、qSFEB 法を用いて脳再凝集体を作製し、凝集体内での層構造の再構築を試みた。様々な条件を検討した結果、低濃度のマトリゲル存在下で幹細胞培地から分化培地に移行した場合に、多種類の神経細胞を効率的に誘導できることを見出した。また特に細胞外分泌シグナルを阻害した場合に、神経細胞が凝集体の外側に集積することも見出しており、今後神経細胞の配置のコントロールが可能かどうかを検討する予定である。一方、in vivo において、どのようなシグナル分子が神経細胞の形態変化に関わっているかを検討した結果、特定の細胞外分泌シグナルの活性化が哺乳類と爬虫類の皮質発生過程で大きく異なっており、哺乳類では多極性から双極性への神経細胞の形態変化が起こる過程で特定の細胞外シグナルの活性が減少するが、爬虫類ではこの減少が見られないことを明らかにした。また、爬虫類の神経細胞を哺乳類皮質に移植した場合、爬虫類神経細胞は多極性の形態を保持し、脳外側への移動を停止するが、哺乳類皮質においてこのシグナルの下流経路を恒常的に活性化した場合も同様の表現型が得られることが明らかとなった。またこのシグナル分子の下流経路を爬虫類皮質で阻害した場合、爬虫類の神経細胞の形態が多極性から哺乳類皮質で見られるような双極性の形態に変化した(図3)。従って、このシグナルの活性化のコントロール機能の変化が哺乳類型大脳皮質の層構造の獲得に大きく貢献したことが推測された。

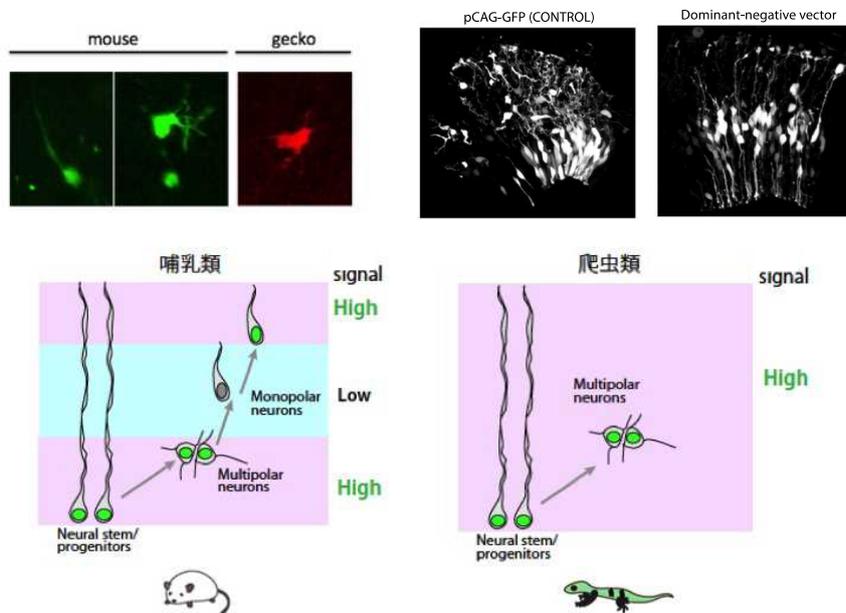


図3 左上: マウスとヤモリの神経細胞の形態の違い。マウス皮質の神経細胞は双極性の形態をとるのに対し、ヤモリでは多極性の形態を維持している。右上: 細胞外シグナル経路を阻害するとヤモリの神経細胞の形態を双極性に変化させることができる。下: 今回明らかになった哺乳類と爬虫類の皮質構築過程の違い。

研究テーマ C「生殖系列ゲノムに外来遺伝子が挿入されたトランスジェニックヤモリの作製」

本研究で使用しているマダガスカル産地上性ヤモリ(ソメワケササクレヤモリ)を爬虫類のモデル実験動物として確立するために、トランスジェニック動物の作製が可能かどうかを検討した。爬虫類胚は産卵時にすでに神経胚まで発生が進行しているため、両生類や鳥類で行われている初期胚への遺伝子導入が困難である。そこで、成体オスの精巣に電気穿孔法で遺伝子を導入することにより、精子幹・前駆細胞を介してトランスジェニックヤモリの作製を試みた。成体ヤモリの麻酔下での手術と遺伝子導入は全く報告例が無かったが、哺乳類での手順を応用・改変することで、爬虫類の精巣への遺伝子導入法を確立することができた。遺伝子導入個体を複数のメスと交配させ、産卵された卵から胚を採取しジェノミック PCR によるスクリーニングを行ったが、残念ながら現在までに外来遺伝子が導入された個体を得ることができていない。精細管への遺伝子導入には成功しているため、今後どの程度の精子幹細胞に遺伝子が実際に導入されたかの定量的な解析が必要である。また、メスの産卵数が期待よりもはるかに少なかったため、十分な胚を得ることができなかった。従って、より大きな動物コロニーを持つ繁殖施設との共同研究も必要であると考えている。

3. 今後の展開

研究テーマ A に関してヤモリゲノム配列情報を基にしたシス制御領域の同定、さらにニワトリ BAC クローンを用いたトランスジェニックマウスの作製を計画している。また、研究テーマ B に関しては、ヤモリ大脳皮質において、シグナル分子の抑制による神経細胞の移動と配置様式を解析し、ヤモリの皮質に新たな層構造が形成されるかを検討する。研究テーマ C に関しては、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を検討するとともに、より大きなコロニーを維持している施設との共同研究を行うことも視野に入れている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は、爬虫類皮質の再構成による哺乳類型皮質への転換という挑戦的なテーマを掲げた。実際には、このような表現型模写実験を通じて、脳の進化の過程で起ったはずの発生プロセスの変更箇所を同定し、これまでにない新しい脳進化の説を提唱することが本研究の大きな目標であった。この目標を達成するために、3つの研究テーマを遂行したが、そのうちの A に関しては大枠において達成できたと考えている。B に関しては、未だ爬虫類脳に完全な哺乳類型の層構造の構築には至っていないが、層構造を形成する上での基盤となる細胞の形態変化を誘導することに成功した。特に、A、B のテーマに共通して、哺乳類独自の発生プロセスの変更箇所を同定できたことは大きな成果であったと考えている。一方 C に関しては未だ研究の途上であるが、爬虫類をモデル実験動物として確立するために重要なテーマであることから、今後方法論的な改善とともに、繁殖動物数の大幅なスケールアップも必要であると考えている。

さきがけの期間中に上記の研究計画を遂行するにあたり、2名の研究補助者を雇用し、実質3名の研究体制で研究を行った。研究代表者の所属する講座(医学部教養部)の特性上、

学部生や大学院生の参画がほとんど期待できないため、大学業務と並行して研究計画を遂行するために上記2名の研究補助者には多大な貢献をして頂いた。3年半の研究実施期間において、研究費はすべて研究遂行に不可欠な備品(培養装置、電気穿孔装置、超低温フリーザー等)、消耗品、旅費、そして研究補助者への給与として使用し、適切に執行された。

3年半のさきがけ研究の期間中に、本研究テーマに関連した3本の原著論文、3本の英文総説、2本の和文総説(すべて筆頭および責任著者)を発表し、そのうち2本の原著論文に関しては JST と共同でプレスリリースを行い研究成果の社会に向けた発信を行った。その波及効果として、NHK スペシャル「生命大躍進・第3週・ついに知性が生まれた」の企画アドバイザーの依頼(2015 年夏放映)、さらに 2016 年にシュプリンガーから刊行予定である英文書籍「Brain Evolution by Design」のエディター依頼を受けている。また、さきがけ期間中に様々な国際学会シンポジウムのオーガナイザー、ヨーロッパやアジアでの国際学会や国内研究会での招待講演、新たに申請する脳進化関連の新学術の計画班としての参画、Neuroscience Research のゲストエディター、サイエンスカフェの講師など、さきがけ研究に関連した脳進化の研究成果を広く学会や社会に向けて発信できる機会を得た。現在遂行中の研究成果を論文として公表する際はこれまでと同様に積極的なプレスリリースを計画しており、社会への研究成果の還元を図るとともに、脳進化研究を積極的に推進する若手研究者の育成を目指す。

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

(研究総括)

哺乳類と爬虫類の脳皮質を構成する神経細胞の時間的・空間的な発生機構を比較し、さらに神経細胞の形態や配置を改変することにより、哺乳類型脳皮質のフェノコピーを創出する研究で、独自に開発した爬虫類胚の個体遺伝子操作技術と、試験管内での脳皮質再構築系を組み合わせ、哺乳類と爬虫類の神経細胞の移動様式の比較解析から、Wntシグナルの制御機構の変化が脳構造の進化を引き起こしている可能性を明らかにした点を、大いに評価します。

今後は、この仮説を実験的に検証していき、哺乳類の脳皮質の6層構造が、進化の過程で独自に獲得され、産み出される発生進化学的機構を解明して頂きたい。

多くの招待講演や第38回日本神経学会大会でこの新しい領域のシンポジウムオーガナイザーを務めるなど、オピニオンリーダーとして、活躍している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. T. Nomura, C. Ohtaka-Maruyama, W. Yamashita, Y. Wakamatsu, Y. Murakami, F. Calegari, K. Suzuki, H. Gotoh, K. Ono. The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. Development in press.
2. T. Nomura, W. Yamashita, H. Gotoh, K. Ono. Genetic manipulation of reptilian embryos: toward an understanding of cortical development and evolution. Frontiers in Neuroscience

2015, 9, 45, 1–11.

3. T. Nomura, Y. Murakami, H. Gotoh, K. Ono. Reconstruction of ancestral brains: exploring the evolutionary process of encephalization in amniotes. *Neuroscience Research* 2014, 86, 25–36.

4. T. Nomura, H. Gotoh, K. Ono. Changes in the regulation of cortical neurogenesis contribute to encephalization during amniote brain evolution. *Nature Communications* 2013, 4, 2206.

5. T. Nomura, M. Kawaguchi, K. Ono, Y. Murakami. Reptiles; a new model for brain evo–devo research. *Journal of Experimental Zoology partB, Molecular and Developmental Evolution* 2013, 320, 52–73.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際学会(海外)招待講演】

“Changes in progenitor dynamics during amniote brain evolution” 7TH Conference of Developmental Neurobiologists in Korea, Dec 18–19th 2015.

“Regulation of neural stem cells and brain evolution in amniotes” GSCN Satellite symposium, Neural Stem Cells in Evolution, Dresden July 8th, 2014.

【シンポジウムオーガナイザー】

第 38 回日本神経科学学会大会シンポジウム「脳の構造と機能の創出原理:細胞間相互作用から個体間相互作用・環境ストレスまで」2015 年 7 月 28 日 神戸

Neuro2013 シンポジウム”Evolution of the mammalian cerebral cortex–new research strategies” 2015 年 6 月 20 日 京都

Neuro2013 サテライトシンポジウム”Molecular and Cellular Mechanisms of Brain Development and Evolution” 2013 年 6 月 19 日 京都

【国際シンポジウム・セミナー口頭発表】

“Evo–devo approach to explore the origin of the neocortex” JST–JHU Symposium on systems and synthetic biology, Sep 23 2015, Johns Hopkins University, Baltimore, USA.

“Conserved and derived mechanisms of cortical neurogenesis during amniote brain evolution” Neurogenesis 2013, Matsushima, Oct 16–18, 2013.

“Beef or Chicken? No, I need a Gecko!” 3rd German–Japan bilateral event on neural stem cells in mammalian neurogenesis. Miyagi, Oct 13–15, 2013.

“Changes in the regulation of neurogenesis contributed to parallel encephalisation during amniote evolution” CDB Symposium 2013, March 6, 2013, Kobe, Japan.

【国内学会・セミナー招待講演】

「羊膜類脳進化における神経幹・前駆細胞の動態の変化」異種間比較が解き明かす生命システムの普遍性と多様性 日本分子生物学会年会 2015年12月2日 神戸

「胚操作技術を用いた羊膜類大脳皮質進化過程の解明」細胞を創る研究会8.0 2015年11月13日 大阪大学

“Evolution of progenitor dynamics and transcriptional regulation in amniote brains” Symposium “Vertebrate Brains, Structure, Function and Evolution”, 48th Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba, June 5, 2015.

「哺乳類型大脳皮質の進化をもたらした発生機構の解明」第1回発生発達基礎医学研究会 2014年11月28日 東北大学

「羊膜類胚操作による大脳皮質進化機構の解明」シンポジウム・終脳発生研究の進歩」第118回日本解剖学会総会 2013年3月28日 香川

【プレスリリース】

「ヒトの進化の記憶を鳥の脳から解き明かす～哺乳類大脳の進化過程の一端を明らかにする論文が掲載」2016年1月

「爬虫類の脳はスローペースで作られる～哺乳類脳の巨大化の進化起源に迫る～」2013年7月

研究報告書

「細胞挙動の解析から構成的に理解するその集合体としての植物過敏反応誘導機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 別役 重之

1. 研究のねらい

植物の持つ耐病性機構の中でも最も強力で効果的なものは過敏反応(HR)である。HR は、植物免疫センサーである抵抗性(R)タンパク質が病原菌由来の非病原性エフェクター(Avr)タンパク質を特異的に認識することで誘導され、局所的なプログラム細胞死や防御応答遺伝子群の発現を伴う。HR 誘導機構解明は植物の生存戦略解明や農業への応用のためにも非常に重要であり、これまでも主に遺伝学的、生化学的に数多くの研究が行われてきたが、いまだ不明な点が多い。

そもそもHRとは植物細胞が病原体感染を認識した場所で一過的に起きる、時間的・空間的なダイナミクスを内包する事象である。実際、HR を起こした組織中の細胞の状態は一様ではなく、死細胞、生細胞が混在している。また、感染部位を中心とした細胞死領域周縁部にのみ、防御応答関連遺伝子の活性化が見られることが多く報告されており、HR 組織では Avr 認識細胞を中心とした何らかの極性に対してそこに位置する細胞の状態が一定の秩序をもって決定されている。しかし、主に HR を起こした組織や個体全体からの抽出物を用いて行われてきたこれまでの研究ではこのような植物免疫反応場とも言える「場」の形成機構に関する知見はほとんど得られておらず、この植物免疫反応場における極性形成機構の解明は、HR 誘導機構全体像の解明に向けた新しい切り口になり得る。

そこで本研究においては、HR という現象を HR 組織中の細胞タイプごとの相互作用として捉え、組織レベルではなく個々の細胞の挙動に注目した細胞レベルからのアプローチを行う。植物防御応答を可視化して”HR 細胞タイプ”を分類し、セルソーター等を用いて細胞タイプ毎に経時的な組織内局在および遺伝子発現プロファイルを解析する。これら情報を元に、既知の各種防御応答変異体を用いてそれら原因遺伝子の HR 空間的制御機構における役割を明らかにする。また、赤外線レーザー照射システム IR-LEGO を用いて標的一細胞での Avr 誘導発現による最小単位での HR 再構成実験系を構築し、一細胞での R-Avr 認識がその周辺細胞に細胞死や防御応答を誘導するのかどうかを実験的に検証する。イメージングと再構成系によって病原体感染実験では困難であった HR 細胞間シグナル伝播パターンの定量的解析を行い、これまで漠然とした定性的評価法しかなかった HR を再定義する。さらに、観測データをもとに HR 誘導過程を数理モデル化し、そのモデルと HR 再構成実験系を用いて、HR 誘導システムの構成的理解を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、モデル植物シロイヌナズナを用いて時空間的な観点から HR という植物免疫

応答場の形成機構に迫ることを目的とした。具体的には以下の研究を行った。

- 1) 防御応答に関与する遺伝子群の活性化パターンを植物個体中で可視化し、その動態を定量的に追跡できる実験系を構築して詳細な解析を行うことで HR に伴う植物免疫反応場の細胞タイプを定義する。
- 2) 植物免疫反応場に対する既知の防御応答変異体の影響を解析することにより、植物免疫反応場の形成機構に迫ろうとした。
- 3) 標的一細胞での Avr 誘導発現による最小単位での HR 再構成実験系を構築し、プロモーターレポーターと組み合わせ、HR シグナル伝播機構を定量的に解析する
- 4) 上記 1)および 2)のデータをもとに時空間的な HR 誘導機構を数理モデル化し、3)の再構成系での検証を通してモデルを最適化し、HR という現象を理解する。

(2) 詳細

1) 防御応答可視化系の構築と HR 組織における細胞タイプ定義

およそ 40 種の植物防御応答に関わる遺伝子群に関してプロモーターレポーター植物を作成した。特に、植物免疫応答に重要である植物ホルモンであるサリチル酸(SA)に関係する遺伝子群(合成酵素、下流 SA 応答性マーカー遺伝子など)には特に注目した。また、ここではルシフェリンが SA アナログとして機能し、植物防御応答を誘導するという報告があったことから、核局在型 YFP を用いた。核局在型 YFP を用いることで、プロモーター活性化細胞一つ一つを区別でき、かつ、植物イメージングで問題になる自家蛍光との区別も容易になった。さらに、様々な条件検討を経て、HR を誘導する細菌を接種することで、免疫反応時におけるこれらプロモーター活性の時空間的動態を解析することができるライブイメージングシステムを構築した。本システムは、「生きたままの植物葉で各種プロモーター活性を観測できる」という点で画期的である。これにより様々な防御応答関連プロモーター活性の時空間的動態を捉えることが可能となり、構築した各種プロモーターレポーター植物を用いて HR 誘導時のプロモーター活性化パターンを解析したところ、プロモーター毎に様々な時空間的活性化パターンを示すことが見出された(図 1)。しかし、細かな違いはあるにせよ、それら各プロモーターの活性化パターンとそれら遺伝子の既知の機能とを照らし合わせた結果、HR 組織においては、感染領域を中心とした SA 活性化領域とその外周部の領域というように、大きく二つの領域に機能的に分類されることが見出された。



40種ほどの防御応答関連遺伝子のプロモーターレポーター植物を作成

生きた状態の病原体感染植物葉で1細胞レベルでの防御応答時空間的動態の解析が可能となった。

図1. プロモーターレポーター植物

また、本イメージング系は非切断葉でのイメージングを目指したために電動制御の実体顕微鏡をベースに構築したが、その解像度では 1 細胞レベルでの詳細な定量的観測は非常に困難である。そこで、非切断葉を用いた高解像度でのイメージング系確立を目指し、さきがけの増額支援を受け共焦点ユニットを導入し、現在、高解像度イメージング系をセットアップ中である。

当初、各細胞タイプを分類したのち、代表的なプロモーターレポーターを用いて、蛍光を指標にセルソーターを用いて各タイプの細胞を分取し、細胞タイプごとのマイクロアレイ解

析を行い、HR 遺伝子発現マップを構築する予定であったが、上記の外周部において植物の傷害応答に関わるホルモンであるジャスモン酸(JA)経路の活性化が見出されたため、細胞をバラバラにするという刺激が混入する当初の手法は不適だと考えられ、細胞タイプごとのマイクロアレイ解析は断念した。現在、代替手法を各種検討中である。

2) 植物免疫反応場の形成機構

〈HR における SA 濃度勾配の検証〉

HR において防御応答が秩序立って感染細胞周辺部のみに誘導される機構としては、植物ホルモンである SA が感染細胞で合成されることで、感染細胞を中心とした SA 濃度勾配が形成され、その濃度に応じて細胞死、防御関連遺伝子発現、といった異なる細胞応答が誘導されるという、モルフォゲン濃度勾配による形態形成を説明するフレンチフラッグモデルのような仮説が提唱されていた。そこで、1)で構築したイメージング系を用いてまずこの仮説を検証することから植物免疫反応場の形成機構に迫ろうと考えた。SA 応答性防御応答のマーカーとして広く用いられている *PR1* 遺伝子のプロモーター(*pPR1*)レポーターの HR 誘導時の時空間的動態を解析したところ、感染細胞(その後プログラム細胞死を起こす領域)とその周辺数細胞でのみ、一過的な *pPR1* 活性の上昇が見出された(図1)。特にプログラム細胞死領域に接する生細胞群で強い活性が見られた。そこで、細胞死を起こす直前に *pPR1* 活性化領域と非活性化領域の組織をサンプリングし解析したところ、*pPR1* 活性化領域のみで SA が大量に蓄積し、その周縁部の *pPR1* 非活性化領域ではほとんど蓄積してないことが明らかとなり、SA は感染細胞を中心として非常に急峻な濃度勾配を形成して蓄積することが示唆された。

〈HR における SA の役割〉

SA の役割を遺伝学的に解析したところ、SA を蓄積しないような変異体(*NahG*)では *pPR1* 活性やプログラム細胞死が見られず、SA 蓄積レベルが減少した変異体(*sid2*)では細胞死誘導が遅れ、*pPR1* 活性が細胞死領域に接したごく狭い生細胞領域のみで弱く長時間見られることが明らかとなり、HR 時の SA の高濃度蓄積が、広範囲での強く一過的な防御応答誘導に必要なことがわかった。

〈細胞間 SA シグナル伝播機構〉

さらに、*pPR1* レポーター植物に高濃度 SA を部分投与したところ、まず非投与部分において、投与領域に近接した部分から始まる *pPR1* 活性の波が誘導され、その後、投与部でも *pPR1* 活性が上昇することがわかった。この非投与部での *pPR1* 活性の波は SA 合成経路変異体(*sid2*)において完全に喪失することから、投与部から SA が拡散しているのではなく、何らかの細胞間 SA 合成誘導シグナルが細胞間を伝播することで非投与部での SA 合成を介して誘導されることが示唆された。このように植物組織を構成する各細胞は、組織内で秩序立った細胞間 SA 合成シグナルリレー機構を用いて、波のように防御応答シグナルを拡散していくことがわかった(図2)。



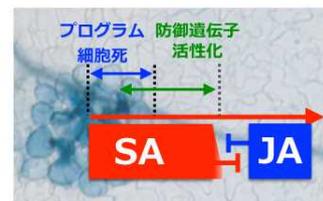
SA自身が細胞間移行するのではなく、何らかの細胞間シグナルにより、組織内の個々の細胞がそれぞれ秩序立って順にSA合成を行うことで組織内で波のようなSA応答が観測される。

図2. 細胞間SAシグナルリレー機構

〈HRにおける局所的防御応答領域形成機構〉

感染細胞を中心とする HR 中心部では SA を高蓄積するにも関わらず、*pPR1* 活性は中心部から波のように伝播せず、細胞死領域近傍でのみ見られる。このことは何らかの SA シグナルリレー阻害因子が HR 外側で機能していることを示唆している。SA の阻害因子として最も知られているものは JA である。絶対寄生性病原体への防御応答に必要な SA に対し、JA は昆虫による食害や腐生性病原体、もしくは傷害に対する防御応答に必要なホルモンである。通常、SA と JA の間には相互拮抗作用が観察され、このことは、植物は SA もしくは JA による防御応答どちらかひとつしか選択できないという植物防御応答機構におけるトレードオフの存在を示唆していた。しかし、植物は自然界で多様なストレスにうまく対処しており、こういったトレードオフの影響は薄いようにも見える。また、近年では SA が JA の影響を凌駕するケースが報告されたり、SA が重要な HR においても JA 系の活性化を示唆するデータが報告されたりし、混沌とした状態にあった。

私は 1) のイメージング系において、JA 応答性マーカー遺伝子 *VSP1* プロモーター (*pVSP1*) レポーターも構築しており、HR におけるその詳細な時空間動態を観測したところ、HR 誘導に伴い、早い時間にまずは葉全体で弱い *pVSP1* 活性が観察され、続いて、*pPR1* (≡ SA) 活性化領域の外側で一過的な強い *pVSP1* 活性が観測された。これにより、これまで謎であった、相互拮抗関係にあるはずの SA および JA シグナル系が HR 時に同時に活性化するという現象が、実は HR 組織の異なる細胞領域で起きていることで明快に説明出来ることがわかった。また、この外部での JA 系活性化によって、細胞間 SA シグナルリレーが感染中心周辺のみ限定されることが想定された。そこで、JA シグナル系変異体である *myc2* 変異体を用いて HR 時の *pPR1* 活性の時空間的動態を観測したところ、野生型に比べ、*pPR1* 活性誘導が早くなり、またその活性化領域も広がることが確認され、上記仮説が正しいことが支持された。このように、HR における局所的な SA 依存型防御応答系の活性化は、緩やかな SA 濃度勾配のみに依存したフレンチフラッグモデルによって説明されるというよりも、むしろ HR 外側で JA シグナル系が活性化することにより、SA 活性化領域と JA 活性化領域の空間的な拮抗作用を通して、SA シグナル系の活性化が HR 内部のみに限定されることで説明できることが明らかとなった(図 3)。以上、上記の 1) および 2) を一つの論文として投稿しようとしている。



HR時には感染部位でSAが高蓄積するがそのすぐ外側で、ジャスモン酸(JA)シグナル系(SAと拮抗作用する)が活性化することでSAシグナルリレーを抑制し、局所的な免疫応答形成を可能としている。

図3. HRにおける植物免疫反応場形成機構

3) 標的一細胞での Avr 誘導発現系構築

病原菌由来の Avr 因子を植物内で発現させることで植物 R タンパク質を活性化し、細胞死を伴う HR を誘導することができる。ここでは、熱ショック誘導型 CRE 組換え酵素発現植物を用いて Cre/loxP システムにより、熱ショック特異的に Avr 因子を発現させる系を構築した。さらに、標的 1 細胞のみを赤外線レーザー照射により温めることができる IR-LEGO 装置と組み合わせることで、標的 1 細胞での Avr 発現を誘導し、1 細胞での最小 HR 再構成系を構築することを目指した。これまで多数の動植物において IR-LEGO と熱誘導型 Cre/loxP を用いた遺伝子発現誘導系は報告されており、植物では根組織において成功

報告がある。本研究でも根における GFP マーカー遺伝子発現は容易に達成できた。しかし、*Avr* 遺伝子発現には困難が伴った。*Avr* 因子は少しでも発現してしまうと細胞死を誘導し、植物の成長を著しく抑制するという特徴があることで、ほとんどの形質転換植物が矮性を示し、その中でも得られた矮性を示さない植物を用いたことでそもそも誘導系に何らかの問題を抱えた形質転換個体を選んでいった可能性が高い。また、本研究ではシロイヌナズナで広く用いられてきた *HSP18.2* プロモーターを採用したが、このプロモーターは実は非熱処理状態でも維管束で活性を示すことが大きな原因であると考えられた。そこで、新たな熱誘導特異的プロモーターの探索からやり直し、新規熱誘導特異的プロモーターを用いて実験系を再構築している段階である。

4) HR 誘導機構数理モデル化

本研究においては、(当たり前ではあるが)当初の想定を超えて研究が進んだ部分と想定していなかった困難にぶつかり、予定を変更した部分があった。数理モデル化も当初予定していた形ではなかったが、上記 3) で SA-JA の空間的な拮抗作用という HR における免疫反応場の形成原理と考えられる事象を見出したため、現在、この拮抗作用によるモデルをさきがけ研究期間内に構築しようとしている。

3. 今後の展開

今回、HR における植物免疫反応場形成機構として SA-JA 拮抗作用による免疫反応空間的限定システムを見出した。今後、どのようにして HR 時に JA 系が活性化するのか、どのように SA/JA 境界面が形成されるのかなど、植物免疫反応場での各細胞の位置情報決定機構や、SA 系抑制のみにとどまらない JA の植物免疫に対する機能の解析などの研究展開が期待される。また、本研究で構築したシステムは、今回の細菌病に対する HR だけでなく、他の様々な病原性微生物や食植性昆虫などに対する様々なレベルの免疫応答の空間的制御機構の解析にも応用可能である。そもそも、SA や JA は非常に重要な植物ホルモンであるが、どのように細胞間でシグナル伝達するかなどわかっていないことも多く、また他にもまだ免疫に関与するホルモンが存在する。本研究成果を土台として、個体という細胞社会の中での植物免疫反応場の形成機構を解析することで、植物免疫システムをさらに深く理解することができる。その成果は、基礎研究のみにとどまらず、農業での植物病害防除への応用利用、さらには植物という生き物の生存戦略の理解にも貢献しうるのであると期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究においては、予想を超える進展や問題もあったが、時間がかかりつつも適切に対応できた。その結果、HR における植物免疫反応の局所的限定機構に迫るという当初の目的に対しては、本研究で構築したライブイメージング系を中心とした解析により「拮抗する二つの植物ホルモン相互作用」という原理の一つを示すことができ、現在投稿準備中の本内容を記した

論文が受理されれば、当初の目的の重要部分は概ね達成できたと考えている。特にイメージングを用いて時空間的観点から植物免疫機構にアプローチするという手法は、植物免疫研究分野内でも斬新なものであった。このさきがけ研究のおかげで新たな切り口を示すことができ、本研究成果に記載できたこと、できなかったことも含めて、今まで想定されたこともなかったような多くの新しい現象を見出すことにつながった。これらは、植物免疫システムや植物生存戦略を理解する上で非常に重要な鍵となりうるものである。その意味では本さきがけ研究は一定の評価に値すると考えている。是非、続けて研究を行い、論文として世に出していきたい。本研究内容は、農業上重要な植物病害防除の根幹に関わる植物免疫システムの理解と解明であるため、その成果は基礎研究への貢献だけでなく、将来的な農業的な応用利用も期待されるものでもある。

ただ、このさきがけ領域のキーワードの一つである「構成的に理解する」という部分に関しては、実験系の再構築することになったために、研究期間内に「最小 HR 再構成系」を実現できなかったことは非常に悔やまれる。それでも、ようやく問題を解決した新たな実験系を準備できたので、さきがけ研究終了後にはなるが是非挑戦していきたいと考えている。それら今後の研究においては、本さきがけ研究領域に参加できたことで得られた有形無形の”財産”が生かされるであろうと確信している。

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

(研究総括)

耐病性に重要なホルモンであるサリチル酸(SA)が過敏感反応中心部で活性化し、その周囲では SAと拮抗するホルモンであるジャスモン酸(JA)が活性化していることを発見し、内側 SA-外側JAという空間反応場がイメージングでき、HR誘導機構の基盤となる知見を得たことは大きな成果です。今回の成果により、注目され、多くの招待講演を行っている。

数理モデル化するとのことですが、植物細胞の内部(シンプラスト)と外部(アポプラスト)がシグナル伝達と物質移動において異なった機能を持つことを勘案した時空間モデルを考えて頂きたい。

植物病害防除の根幹に関わる植物免疫システムの理解と解明に注力され、今後、この植物免疫システム分野で、ネットワークを広げ、第一人者として活躍されることを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Endo S., Betsuyaku S., Fukuda H.: Endogenous peptide ligand-receptor systems for diverse signaling networks in plants. *Curr Opin Plant Biol.* (2014) 8;21C:140-146.
2. Tamaki, T., Betsuyaku, S., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H. and Sawa, S. SUPPRESSOR OF LLP1 1-mediated C-terminal processing is critical for CLE19 peptide activity. *The Plant Journal.* (2013) 76(6):970-81.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件



(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<主な招待講演>

1. 別役重之、「視ることで識る植物免疫反応場の形成機構」、BMB2015 ワークショップ「ライブイメージングから迫る植物科学」、(神戸、2015年12月2日)
2. 別役重之、「温故知新からはじめる植物病理学」、日本植物病理学会創立100周年記念大会記念シンポジウム「植物病理学:新たな100年への羅針盤」、(東京、2015年3月30日)
3. Betsuyaku S., “Watching plant immune response towards spatiotemporal dissection of plant immunity”, Georg-August-Universität Göttingen, Department of Plant Cell Biology (Department Seminar), (Göttingen, Germany, 2014年11月27日)
4. Betsuyaku S., “Watching plant immune response towards spatiotemporal dissection of plant immunity”, 5th NIBB-MPIPZ-TLL symposium “Horizons in Plant Biology”, (Max-Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany, 2014年11月26日)
5. 別役重之、「植物免疫反応場の極性形成機構」、奈良先端科学技術大学院大学植物グローバル平成26年度シンポジウム「植物の中をめぐる多様なシグナル分子」、生駒、2014年11月18日)
6. 別役重之・加藤新平・佐藤昌直・福田裕穂。「視(み)ることで識(し)る植物免疫応答」、平成26年度日本植物病理学会植物感染生理談話会(仙台,2014年8月7日)
7. 別役重之、「植物免疫応答を視る」、岩手生物工学研究センター第207回公開セミナー、(北上、2014年2月28日)
8. 別役重之、浦和博子、亀井保博、岡田清孝、福田裕穂、「植物過敏感反応(HR)の時空間的解析~IR-LEGOを用いたHR再構成系~」、新学術領域「植物の環境感覚」ワークショップセミナー、(岡崎、2012年10月19日)

<受賞>

2013年6月 第13回東京大学生命科学シンポジウム ポスター賞