

生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO・QBiC
合同シンポジウム 2017

“生命動態の分子メカニズムと数理”

2017.3.17 (金) ~ 18 (土)
理化学研究所 生命システム研究センター

主催：国立研究開発法人 理化学研究所 生命システム研究センター (QBiC)
共催：国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
国立研究開発法人 科学技術振興機構 CREST「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」研究領域
国立研究開発法人 科学技術振興機構 さきがけ「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域

お問い合わせ：理化学研究所 生命システム研究センター シンポジウム事務局
565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3
qbic-symposium@riken.jp



ご挨拶

本年も生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO・QBIC合同シンポジウムを開催できることを大変嬉しく思います。

新たなライフサイエンス研究である生命動態システム科学では、定量計測と理論・計算を組み合わせた総合的な研究により、生命の動的システムとしての理解を目指しています。この目標に向け、我が国では2011年度から様々な施策を強力に実施してきました。結果として多くの研究成果が発表されると共に、拠点形成・人材育成の両面について多大な進展を得ることができ、当該分野における我が国の貢献は世界をリードするものとなったと言えます。

これらの有形無形の資産を次世代の生命科学研究に最大限活用するためには、生命科学のみならずその他の分野におけるこの間の発展を取り入れながら、研究の方向性を適時正していくことが不可欠であります。細胞内システムのダイナミクスを詳細に計測する技術は飛躍的に発展しましたが、まだ得られる情報には偏りもあり、網羅的な動的計測には困難が伴います。また、膨大な計測データから有効な情報を取り出すための情報技術として、帰納的な統計解析と演繹的なシミュレーションの両面からの取り組みが必須ですが、これらは急速に発展する途上です。

本シンポジウムにおいては、これらの状況を踏まえた上で、各拠点・領域における最先端の研究成果を共有すると共に、生命動態システム科学のさらなる発展について議論する事を目的としたいと思います。参加者の皆様との有意義な相互作用を楽しみにしております。

柳田敏雄

シンポジウム大会委員長
理化学研究所 生命システム研究センター

－プログラム－

3月17日(金)

- 13:00 ~ 13:10 開会挨拶
柳田敏雄 (理化学研究所 生命システム研究センター)
- 13:10 ~ 13:20 開会挨拶
善光龍哉 (国立研究開発法人 日本医療研究開発機構)

【セッション1 広島大学 クロマチン動態数理研究拠点】

座長：栗原裕基 (東京大学大学院 医学研究科)

- 13:20 ~ 14:00 Stagnant, itinerant chromatin dynamics
菅原武志 (広島大学 クロマチン動態数理研究拠点)
- 14:00 ~ 14:40 クロマチン動態と構造をつなぐ数理
新海創也 (広島大学 クロマチン動態数理研究拠点)
- 14:40 ~ 15:00 休憩

【セッション2 理化学研究所 生命システム研究センター】

座長：楯真一 (広島大学大学院 理学研究科)

- 15:00 ~ 15:40 高速超解像・1分子イメージング顕微鏡の開発と細胞生物学研究への応用
岡田康志 (理化学研究所 生命システム研究センター)
- 15:40 ~ 16:20 細胞内1分子イメージング解析の自動化とシグナル伝達系への適用
上田昌宏 (理化学研究所 生命システム研究センター)
- 16:20 ~ 16:40 休憩

【セッション3 東京大学 生物学と数学の融合拠点】

座長：古澤力 (理化学研究所 生命システム研究センター)

- 16:40 ~ 17:20 細胞運動特性と遺伝子転写制御の連携に基づく血管新生機構の解明
栗原裕基 (東京大学大学院 医学系研究科)
- 17:20 ~ 18:00 Dynamic chromatin movement in stimulated endothelial cells suggested by interactome analysis
和田洋一郎 (東京大学 アイソトープ総合センター)
- 18:00 ~ 18:40 ポスターセッション紹介 Short Talks
座長：澤井哲 (東京大学大学院 総合文化研究科)
- 18:40 ~ 20:30 意見交換会

3月18日(土)

【セッション4 科学技術振興機構 CREST 生命動態領域】

座長：井原茂男 (東京大学大学院 数理科学研究科)

- 9:00 ~ 9:40 1細胞分泌動態計測による細胞不均一性の解析
上村想太郎 (東京大学大学院 理学系研究科)
- 9:40 ~ 10:20 線虫の中枢神経系全体のカルシウムイメージングによる神経回路メカニズムの解析
石原健 (九州大学大学院 理学研究院)
- 10:20 ~ 10:40 休憩

【セッション5 東京大学 複雑生命システム動態研究教育拠点】

座長：富樫祐一 (広島大学 クロマチン動態数理研究拠点)

- 10:40 ~ 11:00 分裂酵母における複製老化
中岡秀憲 (東京大学大学院 総合文化研究科)
- 11:00 ~ 11:20 細胞性粘菌における集団的細胞運動の動態解析
藤森大平 (東京大学大学院 総合文化研究科)
- 11:20 ~ 11:40 Lag, Stationary Phase の細胞モデル
姫岡優介 (東京大学大学院 総合文化研究科)
- 11:40 ~ 12:00 パターン形成ダイナミクスにおける進化・発生対応
香曾我部隆裕 (東京大学大学院 総合文化研究科)
- 12:00 ~ 13:00 集合写真撮影 昼食
- 13:00 ~ 14:00 ポスターセッション

【セッション6 科学技術振興機構 さきがけ 細胞構成領域】

座長：松田道行 (京都大学大学院 医学研究科)

- 14:00 ~ 14:40 精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態
篠原美都 (京都大学大学院 医学研究科)
- 14:40 ~ 15:20 機械的な力による上皮形態形成制御機構
杉村薫 (京都大学 物質-細胞統合システム拠点)
- 15:20 ~ 15:40 休憩

【セッション7 京都大学 時空間情報イメージング拠点】

座長：近藤滋 (大阪大学大学院 生命機能研究科)

- 15:40 ~ 16:20 ERK MAP キナーゼによる細胞増殖と集団細胞運動の制御
青木一洋 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター)
- 16:20 ~ 17:00 神経軸索における誘引・回避の切り替えとトポグラフィックな神経回路の配線
本田直樹 (京都大学大学院 医学研究科)
- 17:00 ~ 17:10 閉会挨拶
山本雅 (科学技術振興機構 CREST 生命動態領域)

—ポスター発表者リスト—

- P01 清水 義宏 …… 理化学研究所 生命システム研究センター
- P02 鶴飼 英樹 …… 理化学研究所 生命システム研究センター
- P03 藤田 恵介 …… 理化学研究所 生命システム研究センター
- P04 小川 泰策 …… 理化学研究所 生命システム研究センター
- P05 古澤 力 …… 理化学研究所 生命システム研究センター
- P06 Fu-Lai Wen …… RIKEN Quantitative Biology Center
- P07 礪波 一夫 …… 東京大学大学院 医学系研究科
- P08 和田 洋一郎 …… 東京大学 アイソトープ総合センター
- P09 比留間 英 …… 東京大学大学院 医学系研究科
- P10 山内 峻平 …… 東京大学大学院 総合文化研究科
- P11 杉山 友規 …… 東京大学 生産技術研究所
- P12 Siyang Leng …… Institute of Industrial Science, The University of Tokyo
- P13 平島 剛志 …… 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
- P14 近藤 洋平 …… 京都大学大学院 情報学研究科
- P15 榎本 将人 …… 京都大学大学院 生命科学研究科
- P16 今吉 格 …… 京都大学大学院 生命科学研究科
- P17 寺井 健太 …… 京都大学大学院 生命科学研究科
- P18 今村 博臣 …… 京都大学大学院 生命科学研究科
- P19 粟津 暁紀 …… 広島大学大学院 理学研究科
- P20 上野 勝 …… 広島大学大学院 理学研究科

—ポスター発表者リスト—

- P21 堀越 保則 …… 広島大学 原爆放射線医科学研究所
- P22 栃尾 尚哉 …… 広島大学大学院 理学研究科
- P23 難波 利典 …… 広島大学 クロマチン数理研究拠点
- P24 富樫 祐一 …… 広島大学大学院 理学研究科
- P25 磯村 彰宏 …… JST CREST「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」研究領域
- P26 東 純平 …… 大阪大学大学院 生命機能研究科
- P27 加納 初穂 …… 大阪大学大学院 生命機能研究科
- P28 井手 隆広 …… 理化学研究所 多細胞システム形成研究センター
- P29 小林 健司 …… 京都大学大学院 理学研究科
- P30 Kakeru Itoh …… Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto University
- P31 瀧ノ上 正浩 …… 東京工業大学 情報理工学院
- P32 篠原 美都 …… 京都大学大学院 医学研究科
- P33 猪股 秀彦 …… 理化学研究所 多細胞システム形成研究センター
- P34 Masakazu Agetsuma …… The Institute of Scientific and Industrial Research,
Osaka University
- P35 Tadashi Nomura …… Developmental Neurobiology,
Kyoto Prefectural University of Medicine
- P36 杉 拓磨 …… 滋賀医科大学 神経難病研究センター
- P37 Prabhat Shankar …… RIKEN Quantitative Biology Center

参加者の皆様へ

1. シンポジウム会場

大阪府吹田市古江台 6-2-4
理化学研究所 生命システム研究センター
生命システム研究棟 B 棟 1F 大会議室およびロビー

2. 参加手続き

■受付
講演会場前にて受付をお願いいたします。
会場内では名札のご着用をお願いいたします。

■意見交換会
参加ご希望の方は、受付時に参加費をお支払い下さい。
日時：3月17日(金) 18:40-20:30
会場：生命システム研究棟 B 棟 1F ロビー
会費：学生 2000 円 その他 4000 円

3. Wi-Fi

・SSID：QBIC-B
・KEY：symposium

4. クローク

荷物を置くスペースをご用意いたしますが、引き換えなどの管理はございません。
また、貴重品につきましては各自でお持ち下さい。

5. 写真撮影

開催記録として写真撮影を行います。ご了承くださいませようお願いいたします。

6. 禁止事項

■撮影・録音
講演者や座長の承諾を得ていない講演会場およびポスター会場でのカメラ・ビデオ・携帯電話などによる撮影・講演音声録音は禁止させていただきます。

■携帯電話
講演会場内での携帯電話による通話は禁止させていただきます。
会場内では電源をオフにするかマナーモードにいただき、公演中に呼び出し音が鳴らないようご注意ください。

■禁煙
会場内・館内は禁煙です。

座長・講演者の皆様へ

1. 座長の皆様へ

講演会場内右前方に「進行席」を用意いたしますので、セッション進行をお願いいたします。計時はタイムキーパーが行いますので、タイミングなどをご指示下さい。特段のご指示がない場合には、次のタイミングでベルを鳴らします。

1回目：発表時間終了5分前
2回目：発表時間終了、質疑応答
3回目：質疑終了、講演者の持ち時間終了

2. 講演者の皆様へ

■講演時間
40分講演の場合：プレゼン30分、質疑10分
20分講演の場合：プレゼン15分、質疑5分

■講演方法
ご自身のノートパソコンをご持参ください。接続はD-subに対応しております。Macなど専用の出力変換ケーブルが必要な場合は必ず持参してください。バックアップとして発表データをUSBメモリにて持参してください。

■接続確認
講演前の休憩時間を利用し、動作確認の試写をお願いいたします。

ポスター発表者の皆様へ

■ポスター作成要領

ポスター使用言語は日本語あるいは英語とします。
タイトル・名前・所属については、日英併記としてください。
ポスターパネルサイズは縦 210cm X 横 90cm です。
発表者の顔写真を右上部分に表示いただくことを推奨いたします。

■ポスター掲示・撤去時間、発表・討論時間

ポスター掲示会場は講演会所に隣接するロビーです。

【添 付】 3/17 (金) 12:00 から 16:40 までの時間帯に添付してください。

【掲示期間】 3/17 (金) 12:00 ~ 3/18 (土) 15:40

【ポスターセッション】 3/18 (土) 13:00 ~ 14:00

コアタイム：奇数番号 13:00 ~ 13:30 偶数番号 13:30 ~ 14:00

【撤 去】 3/18 (土) 17:30 までにポスターを撤去してください。

17:30 以降に残置のポスターは事務局で廃棄します。

■掲示場所

パネルに演題番号を表示いたします、ご自身のポスター番号 (p6-7) をご確認の上で所定の位置に掲示ください。

■ポスターセッション紹介 Short Talks (3/17 (金) 18:00 ~ 18:40) について

予めご提供いただいたスライド (1 演題につき 1 枚) を 1 分間の Short Talk でご紹介いただきます。スライドは事務局 PC にて映写いたしますのでご自身の PC をご持参頂く必要はございません。時間厳守・整列の上でのスムーズな演者交替にご協力をお願いします。

◆ 口頭発表 ◆

Stagnant, itinerant chromatin dynamics

[Memo]

菅原武志

広島大学クロマチン動態数理研究拠点

take.sugawara@icloud.com

ヒトなどの高等生物では、間期染色体は互いに絡まらず区画化された「染色体テリトリー」構造をとり、一部の植物細胞や酵母では、セントロメアとテロメアが核表層の対極に固定された「ラブル構造」をとることが知られている。これらの染色体の大域的構造はクロマチンの動きを物理的に制約し、ゲノム上の各遺伝子を細胞核内の制限された領域に位置づける。他方、活性遺伝子はそのような染色体大域的構造による物理的制約から逃れ、転写ファクトリーや核膜孔付近に局在することが示唆されるが、遺伝子座が細胞周期をつうじてどのように核内配置を維持・変化させるのかについては未解決のままである。我々は間期クロマチン動態を研究するため、分裂酵母*S. pombe*の複数の遺伝子座を可視化しタイムラプス観察を行った。核表層上に局在するspindle pole body (SPB, 中心体に相当) から各遺伝子座までの物理的距離を核内配置の指標とした定量的解析から、遺伝子座は複数の過渡的局在配置間を移動し、「遺伝子テリトリー」間を遷移することが示唆される。統計的推定手法(隠れマルコフモデル)を用いた解析を行い、そのような「動きが停滞した(stagnant)」複数の配置状態を「遍歴する(itinerant)」挙動を統計的に妥当化した。さらに、上記stagnant/itinerantクロマチン動態の細胞周期依存性を調べるため、細胞成長に応じて変化する細胞形態とクロマチン動態の相関解析を行った(図1)。これらの解析結果から、観測されたクロマチン動態はこれまで報告されているような高分子単純拡散とは異なる、新奇なダイナミクスであると示唆される。本講演では上記の結果を紹介し、最近の数理モデリングの結果と合わせ、クロマチン動態が細胞周期進行の間果たす機能的役割について議論する。

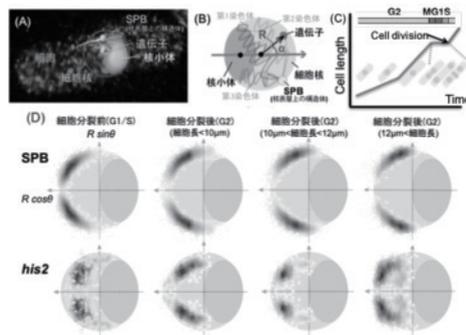


図1 遺伝子(*his2*)とSPBの各細胞周期の核内配置(極座標)の定量化

クロマチン動態と構造をつなぐ数理

[Memo]

新海創也

広島大学クロマチン動態数理研究拠点

soya@hiroshima-u.ac.jp

核内ゲノム情報は単なる1次元DNA配列ではなく、3次元的なクロマチン高次構造に埋め込まれ制御されている。近年の染色体構造捕獲法の派生技術によって、哺乳類ゲノムはTopologically Associating Domain、ループドメイン、コンタクトドメインと呼ばれるサブMbサイズのクロマチン領域に分割されていることが分かってきた。しかし、その描像は数億個の細胞から回収されたDNA断片を解析する方法に基づくため、一細胞内ゲノムの正確な姿を捕えているとは言えない。

一方で、生細胞イメージング技術は一細胞内での動的なクロマチンの姿を明らかにしてきた。特に、共同研究者である前島一博教授(国立遺伝学研究所)のグループの観測から、ヌクレオソームはブラウン運動のようなランダムな動きを示すことがわかった。その時空間スケールは数秒で数百nmの範囲である。

本講演では、上記の生きている状態のヌクレオソーム動態と静的なクロマチン構造の間を橋渡しする数理モデルについて紹介する。その数理によって浮かび上がってくる生きている状態の動的なクロマチン構造の物理的なリアリティを強調したいと考えている。また、そのリアリティを説明できる数理モデルを得ることができたからこそ可能になったクロマチン動態シミュレーションの新規方法についても紹介する。

参考文献

Shinkai S, Nozaki T, Maeshima K, Togashi Y (2016) Dynamic Nucleosome Movement Provides Structural Information of Topological Chromatin Domains in Living Human Cells. PLoS Comput Biol 12(10): e1005136.

高速超解像・1 分子イメージング顕微鏡の開発と 細胞生物学研究への応用

[Memo]

岡田康志

理研・生命システム研究センター

東大・理・物理

y.okada@riken.jp

生命動態の分子メカニズムの解明および数理モデル化のためには、細胞内で生命現象を担う分子および超分子複合体の構造と動態を定量的に計測することが重要である。そのために私たちは、高い時間分解能・空間分解能で細胞内の微細構造および分子動態を計測するための顕微鏡及び周辺技術の開発を行ってきた(1-4)。

本講演では、時間分解能10ミリ秒、空間分解能100 nm でのライブセルイメージングを実現した高速超解像顕微鏡(4)と、ミリ秒程度の時間分解能で細胞内の蛍光一分子3次元イメージングを実現した高速一分子イメージングシステムについて、主に細胞生物学的応用に関する最新の結果を紹介し、議論に供したい。

- 1 Uno S, et al., A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. Nat Chem 6: 681-689, 2014
- 2 *Okada Y, Nakagawa S. Super-Resolution Imaging of Nuclear Bodies by STED Microscopy in Nuclear Bodies and Noncoding RNAs (Nakagawa S, Hirose T ed), Methods in Molecular Biology 1262: 21-35, 2015
- 3 Takai A, et al., Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 112:4352-6. 2015
- 4 Hayashi S, *Okada Y. Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics. Mol. Biol. Cell., 26:1743-51, 2015

細胞内1分子イメージング解析の自動化と シグナル伝達系への適用

上田昌宏

理化学研究所・生命システム研究センター QBiC、大阪大学大学院・生命機能研究科、大阪大学大学院・
理学研究科・附属基礎理学プロジェクト研究センター

masahiroueda@riken.jp, masahiroueda@fbs.osaka-u.ac.jp

細胞内1分子イメージング解析法は、細胞内の1分子の振る舞いから分子集団の統計的な挙動まで、詳細かつ幅広い知見を得ることができる。実際に、生きた細胞内において分子運動・分子反応を規定する拡散係数、拡散状態数、多量体サイズ、分子間相互作用の結合・解離反応速度などの各種パラメータを定量的に計測・解析できる。そのため、細胞レベルでの複雑な現象を定量的に記述し、その結果を数理モデル化することも可能となってきた。しかし、生命科学分野において必ずしも主要な実験手法となり得ていない。その要因として、初期の開発以来15年以上経った現在においても、職人的実験技術と統計解析のための専門的知識が必要とされ、汎用性のある技術になっていないことが挙げられる。このために、膨大な分子種からなる細胞内分子反応ネットワークについて網羅的に知見を取得することが困難となっている。

最近我々は、細胞内の1分子イメージングからデータ解析に至るまでのプロセス全てを自動化し、多様な設定条件下で分子動態の大量計測を行うことができる顕微鏡システムの開発に成功した。この自動1分子イメージング装置は、1) 自動フォーカス機能、2) 自動細胞選択機能、3) 対物レンズ自動オイル供給機能、4) 細胞試料自動搬送機能、5) 自動溶液添加機能を有しており、コンピュータにより一括制御が可能となっている。現在の装置では、96穴プレートに播種された細胞を1つ1つ自動的に識別し、各細胞について自動で焦点を合わせて1分子イメージングが可能である。細胞の自動認識はディープラーニング等の機械学習を利用している。これまでにCHO細胞に発現したEGF受容体の自動1分子イメージングに成功しており、細胞膜上でのシグナル伝達の様子を1分子レベルで自動的に解析することが可能となった。1日あたり600細胞、10万分子のデータを取得できる。今回の発表では、この自動化システムの概要とEGF受容体のシグナル伝達に応用した結果について紹介したい。

[Memo]

細胞運動特性と遺伝子転写制御の連携に基づく血管新生機構の 解明

[Memo]

栗原裕基^{1, 4, 5} 和田洋一郎^{2, 4, 5} 時弘哲治^{3, 4}

東京大学大学院医学系研究科¹ アイソトープ総合センター² 数理科学研究科³
生物医学と数学の融合拠点 (iBMath)⁴ CREST 科学技術振興機構⁵
kuri-ky@umin.net

血管新生は、胚発生をはじめ様々な生理的あるいは病的状態において生じる現象で、既存の血管から発芽や嵌入によって樹枝状の管腔構造を発達させる過程と定義される。我々はこれまで、血管新生の過程での細胞動態を解析し、発芽伸長が特定の先端細胞によって先導されるという従来の説とは異なり、個々の細胞が速度を変え、追い越したり逆方向へ遊走したり、先端細胞も常に入れ替わりながら全体として秩序ある樹状構造を形成することを明らかにしてきた。この細胞動態に基づいたセルオートマトンによる数理モデルにより、血管伸長が根元における細胞供給に依存していることとともに、時間とともに2/3乗のべきで伸びてゆくスケール則が導かれ、実験データからもほぼ矛盾しない結果が得られた。この血管伸長の素過程にあたる細胞間の運動協調性を調べたところ、内皮細胞に特徴的な動態として、細胞接触による運動能の亢進、逆方向移動による2細胞の回転運動などが明らかになり、これが血管新生過程でどのように働いているか現在検討を進めている(講演、ポスター発表)。一方、血管新生過程で発現が変動する遺伝子を明らかにするため内皮細胞株による発芽モデルを用いて単一細胞遺伝子発現解析を行ったところ、特定の転写因子を中心とする遺伝子クラスターの存在が明らかになった。シンポジウムでは、これらの知見に基づき、血管新生において細胞動態と遺伝子転写制御の連携機構がどのように働いているか、今後の展望も含めて議論したい。

参考文献

1. Sugihara K, Nishiyama K, Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, Kurihara H. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep.* 13(9):1814-1827, 2015.
2. Matsuya K, Yura F, Mada J, Kurihara H, Tokihiro T. A discrete mathematical model for angiogenesis. *SIAM J. Appl. Math.* 76(6):2243-2259, 2016.
3. 間田潤, 松家敬介, 由良文孝, 栗原裕基, 時弘哲治. 血管新生の数理モデル 日本応用数理学会論文誌 26(1): 105-123, 2016.

Dynamic chromatin movement in stimulated endothelial cells suggested by interactome analysis

[Memo]

Youichiro Wada

Isotope Science Center, Laboratory for Systems Biology and Medicine, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Japan

ywada-ky@umin.ac.jp

Since chronic inflammation of endothelial cell is the first stage of atherogenesis, we stimulated endothelial cells using a representative inflammatory stimulant, tumor necrosis factor- α (TNF α), and observed it regulates the induction and reduction of more than 500 genes in a orchestrated time course manner. To obtain a comprehensive view of a single transcription cycle caused by TNF α , we switched on transcription of five long human genes (>100 kbp) with TNF α and monitored (using microarrays, RNA fluorescence in situ hybridization, and chromatin immunoprecipitation) the appearance of nascent RNA, changes in binding of RNA polymerase II (Pol II) and two insulators (the cohesin subunit RAD21 and the CCCTC-binding factor CTCF), and modifications of histone H3. Activation triggers a wave of transcription that sweeps along the genes at approx. 3.1 kbp/min; splicing occurs cotranscriptionally, a major checkpoint acts several kilobases downstream of the transcription start site to regulate polymerase transit, and Pol II tends to stall at cohesin/CTCF binding sites. 3C data revealed transcription of one of the five big genes is accompanied with smaller TNF α responsive genes on the same chromosome. These results suggested that transcription of TNF α responsive genes is performed by a single transcription complex, which provides a platform for both transcription and splicing. By identifying special proximity of TNF α responsive genes by 3C-based technique and by proteomic approach combined with chromatin immunoprecipitation, we are trying to elucidate the identity of transcription complex in TNF α stimulated endothelial cells.

Keywords: endothelial cells, inflammation, insulator, RNA polymerase II

1 細胞分泌動態計測による細胞不均一性の解析

[Memo]

上村想太郎

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

uemura@bs.s.u-tokyo.ac.jp

細胞は外部の刺激に応答することで時々刻々と細胞の表現型を変化させることが一般的に知られている。特に免疫細胞の一部では刺激応答によって細胞間相互作用に必要なシグナルとしてインターロイキンなどの炎症性サイトカインなどを細胞内から細胞外へ分泌することが特徴的である。近年、1細胞計測の進歩により同種の免疫細胞に対して一様に刺激を与えても分泌応答が個々の細胞毎に大きくばらつくことがわかってきた。

我々は全反射照明による局所蛍光検出とサンドイッチ蛍光イムノアッセイを組み合わせ、生きた1細胞から分泌された分子をリアルタイムに検出することが可能な分泌実時間動態観測可能な実験系(図1)を構築・改良し、これらの現象を高分解能のシグナルで長時間生きたまま、さらに1つのチップにおいて4つの条件で同時に計測することに成功した。我々は今回、理化学研究所の茂呂和世らにより発見された全く新しい免疫細胞(Moro K *et al.*, *Nature*, 463, 540-544 (2010))である2型自然リンパ球(Group 2 innate lymphoid cells(ILC2s))を用いた。その結果、分泌開始時間は刺激後30分から数時間に及び、非常にばらつくことがわかった。この結果から分泌応答は細胞毎に分泌量だけでなく、分泌開始時間、分泌回数など様々な点で不均一性があることが明らかとなった。一様に刺激を同じタイミングで与えているのになぜこのような不均一性が生まれるのかを調べるために我々は個々の細胞の分泌応答を観察し、分泌開始直後の細胞のみを選択的に回収した場合と刺激開始から一定時間後の細胞を回収した場合で分泌タンパク質をコードしているmRNAの量をRT-qPCR法によって比較定量した。その結果、分泌開始直後に細胞を回収した場合のみmRNA量と分泌量との間の相関を見出すことができたことから、細胞内情報の時間変動が非常に速いことを示唆することができた。本講演ではこれらのmRNA量と分泌動態との関係性について紹介し、さらに我々の技術の応用の可能性についても議論する。

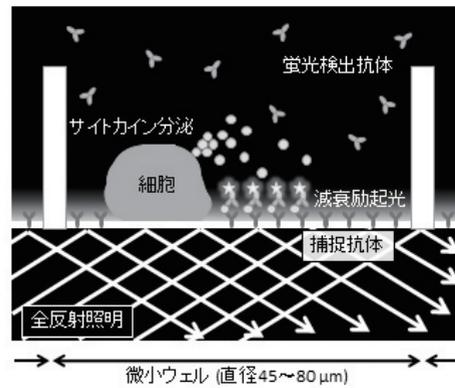


図1 1細胞実時間分泌測定

線虫の中枢神経系全体のカルシウムイメージングによる神経回路メカニズムの解析

【Memo】

○石原健^{1,7} 寺本孝行¹ 豊島有² 徳永旭将⁴ ステファン・ウー³ 広瀬修⁵ 大江紗¹
ジャン・ムンソン² 佐藤博文² 滝沢拓己² 久下小百合^{1,7} 岩崎唯史^{6,7} 吉田亮^{3,7}
飯野雄一^{1,7}

¹九州大学大学院理学研究院 ²東京大学大学院理学系研究科 ³統計数理学研究所、
⁴九州工業大学大学院情報工学研究院 ⁵金沢大学理工研究域 ⁶茨城大学工学部 ⁷CREST
ishihara.takeshi.718@m.kyushu-u.ac.jp

動物は、様々な感覚情報を中枢神経において適切に処理することによって、行動を制御している。このような情報処理の全貌を明らかにするために、線虫*C. elegans*の頭部中枢神経系全体のカルシウムイメージングを進めている。線虫の頭部には約170個の神経細胞があり、その神経回路構造が電子顕微鏡による解析によって明らかにされていることから、良いモデル系であると考えている。私達は、スピニングディスク共焦点顕微鏡と対物レンズの高速移動とを組合せ、同時に3波長の共焦点画像を立体的に取得するシステムを確立した。このシステムで得られた画像を処理するための画像処理パイプラインを作成し、約170個の神経細胞の個々の神経活動を測定することができるようになっている。また、神経活動を測定する線虫個体に、細胞同定用の蛍光タンパク質を発現させることによって、一部の神経細胞を同定することができる。

このシステムを用いて、麻酔をしていない線虫の中枢神経細胞の活動を測定したところ、刺激をしていなくても、線虫の中枢神経系には同期した周期的な活動があることを見いだした。この同期した活動は、線虫の体の動きと相関があることが分かってきた。また、刺激に依存して神経活動がどのように変化するかについても解析を進めており、本研究を進めることによって、中枢神経回路における感覚情報処理の神経回路メカニズムを明らかにできると考えている。

Toyoshima et al. "Accurate Automatic Detection of Densely Distributed Cell Nuclei in 3D Space." PLoS Comput Biol. 12:e1004970 (2016)
Tokunaga et al. "Automated detection and tracking of many cells by using 4D live-cell imaging data." Bioinformatics. 30:i43-51 (2014)

分裂酵母における複製老化

中岡秀憲

東京大学 若本祐一研究室

cnakaoka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

微生物における複製老化は「分裂回数を重ねるごとに世代時間と死亡率が増大すること」と定義されている。非対称分裂によって増殖する種においては母細胞と娘細胞の区別が形態的に明確であり、母細胞系列は老化することが知られている。しかし、対称分裂を行う種でも同様に老化が起きるかどうかについては議論が続いている。

細胞の成長率は比較的容易に測定できるのに対して、死亡率は一般に低いために、その精確な推定には多数の細胞系列を長期間観察せねばならないという技術的な難しさを伴う。そこで本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて分裂酵母の old-pole cell 系列を長期間ライブイメージングできる系を開発した。この系では温度および培地環境を定常に保ちながら、1,500以上の細胞系列を同時に数十世代にわたって観察でき、細胞の成長率のみならず死亡率の推定が可能となった。

ストレスを明示的に与えないような環境下での複製老化の有無を調べるために、分裂酵母の至適培養温度近傍で複数の温度条件を設定し、完全培地および最少培地で培養した場合の細胞成長率と死亡率を測定した結果、いずれの環境においても成長率・死亡率共に観察期間を通じて(数十世代)一定であることが分かった。即ち、少なくとも分裂酵母の old-pole cell 系列では複製老化が起きないことが強く示唆された。また、興味深いことに成長率と死亡率の間にはシンプルな正の相関が見出され、成長と死の間のトレードオフが存在することが示唆された。

これらの「老化しない細胞系列」において細胞老化や細胞死との相関が知られている分子マーカーはどのような挙動を示すのであろうか？本研究ではその一例として蛋白質凝集体に着目し、分子シャペロンである Hsp104のGFP融合体を発現する株を観察したところ、old-pole cellで形成された蛋白質凝集体が平均的には7-8世代に一度の割合で細胞分裂に際してnew-pole cellに分配されることが分かった。また、細胞の分裂間隔時間については蛋白質凝集体の大きさや保持世代数と無相関であることが示された。一方、凝集体の保持世代数と死亡率は無相関であったものの、細胞死の直前には平均よりも大きな凝集体が存在することが分かった。即ち、死亡直前に蛋白質の凝集が加速されることが示唆された。これらの結果は、分裂酵母における蛋白質凝集体は漸進的な細胞老化過程のマーカーとは言えないことを示している。

【Memo】

細胞性粘菌における集団的細胞運動の動態解析

[Memo]

藤森大平¹ 中島昭彦^{1,2} 澤井哲^{1,2}

¹ 東京大学大学院総合文化研究科 ² 複雑系生命システム研究センター

tfujimori@physbio.c.u-tokyo.ac.jp

細胞集団が方向を揃えて動く様子は集団的細胞運動と呼ばれ、特に多細胞生物の発生過程において不可欠な性質である。集団全体の動きを理解するためには、個々の細胞の運動様式を明らかにする必要がある。我々は集団的細胞運動の原始的なモデルとして細胞性粘菌に注目し、集団運動を実現する細胞動態を一細胞レベルで明らかにすることを試みた。細胞性粘菌は飢餓を引き金に集合し、多細胞体形成を行う。集合初期は細胞外に分泌したcAMPへの走化性運動によって集まる一方、集合後期になると細胞は前端・後端での接着を保ったまま運動する。これは追従運動(contact following)と呼ばれているが、その仕組みや動態については理解に乏しい。我々は、集合期の密な細胞外環境を模したマイクロ流体デバイスを作製し、追従運動の形態的・分子的特徴を捉えることを試みた。

細胞の運動形態に注目した解析から、追従運動時は細胞極性が増強されるとともにcAMP濃度勾配に対する応答性が低下する様子が観察された。蛍光プローブを用いて分子動態を可視化したところ、細胞間接着領域においてSCAR複合体の活性化と樹状F-actin形成が持続的に誘起されていることがわかった。以上から、細胞間接着領域における絶え間ないF-actin形成により、強い細胞極性を維持していることが示唆された。また、追従運動は細胞間接着分子TgrB1とTgrC1のヘテロフィリックな相互作用に依存することが示唆され、これらが追従運動を促すシグナルとして働いていると考えられる。

集合し終わった細胞塊はしばらく回転運動を続けた後、以降の形態形成過程に入る。回転運動中の細胞において、SCAR複合体の活性化は進行方向の細胞間接着領域に強く生じている様子が観察された。これに対し、tgrB1欠損株は進行方向以外の領域にも活性化が見られ、運動方向の制御様式に変化が生じていると考えられる。より多細胞的に振る舞うこの過程で走化性運動と追従運動をどのように組み合わせているのかを理解するため、現在回転運動する細胞集団の解析を進めている。

Lag, Stationary Phase の細胞モデル

[Memo]

姫岡優介

東大総合文化研究科

himeoka@complex.c.u-tokyo.ac.jp

Monodが細胞集団の成長曲線に関する研究を行って以来、細胞成長の定量的理解には多くの研究者が関心を注いできた。特に、細胞数が時間に対して指数関数的に増加するExponential Phaseにおいては多くの実験、理論的な結果が得られている[1-3]。しかし細胞は貧栄養条件でStationary Phaseと呼ばれる成長を停止した状態になることが知られており、またStationary Phaseの細胞を富栄養環境に移した際には成長を再開するまでに一定の時間、Lag timeを要することが報告されている。これらのPhaseにおける定量的法則の研究は殆どなされていないため、我々は単純な細胞のモデルを構築し、その性質を調べた[4]。

本研究で我々が用いたモデルは 栄養、自己触媒するタンパク質群、タンパク質群と複合体を形成して触媒能を阻害する抑制因子 の3種類の化学物質からなる、粗視化された細胞モデルである。この細胞モデルは供給される栄養量を変化させることによって、Exponential Phase や Stationary Phaseなどに対応する3種類の成長モードを示す。

モデル細胞のLag timeを数値計算することによって、Lag timeが貧栄養条件に晒された時間の長さの平方根に比例すること、またLag time最大成長速度に逆比例することが分かった。また、Lag timeの分布としては従来のモデルで予測されていた、正規分布に比べて長い裾を持つ分布が得られた。これらの結果は近年高精度の実験で得られた結果と良く一致する。

さらに、我々のモデルはLag timeが栄養の減少する時間スケールに極めて強い依存性を持つことが分かった。この現象は実験的に確かめられてはいないが、モデルの妥当性を検証するための良い指標となり得ると考えられる。

本講演では、上述の結果とそのメカニズムに関して議論する。

[1]. Monod J (1949) Annual Reviews in Microbiology 3(1):371–394.

[2]. Scott M et al. (2010) *Science* 330(6007):1099–1102.

[3]. Kaneko K et al. (2015) *Physical Review X* 5(1):011014.

[4]. Y. H. and Kunihiko Kaneko. (2016) *arXiv:1607.03246*.

パターン形成ダイナミクスにおける進化－発生対応

[Memo]

○香曾我部隆裕 金子邦彦

東京大学総合文化研究科

kohso@complex.c.u-tokyo.ac.jp

多細胞生物は発生を通じて1つの細胞から成体になる。発生は主として遺伝子同士の相互作用からなるネットワークによって制御されている。形態進化は遺伝子制御ネットワークへの突然変異の蓄積による発生過程の変更によって生じる。このように発生と進化とは遺伝子制御ネットワークないしはそれが制御する発生過程によって結びついている。

発生と進化との間に法則を見出し、そこから多細胞生物の進化史を明らかにしようとする試みは古くからなされてきた。特に興味深いのは反復と呼ばれる現象である。反復とは発生過程で見られる胚の形態の時間変化と進化との間に並行関係が見られる現象のことである。反復現象の確認は19世紀になされているが、その仕組みの解明は進んでこなかった。

今回我々は遺伝子ネットワーク、反応拡散系に基づいた進化シミュレーションを行うことで反復の起こる仕組みを明らかにした。進化シミュレーションでは遺伝子制御ネットワークによって形成される遺伝子発現の空間分布に対して特定の空間構造に近づくように進化させた。このような適応度条件下での進化シミュレーションの結果、多くの場合で遺伝子発現の反復を確認できた。仕組みを調べたところ発生において遺伝子ネットワークは遅く変化する変数によって多段階に時間制御されており、各段階でのネットワークの状態が進化での段階における遺伝子ネットワークとよく重複するということがわかった。ネットワークレベルにおけるこのような相似的拡張は、力学系的には細胞の状態遷移を遅く変化する変数を分岐パラメーターとしたアトラクターの分岐として捉えることができ、反復を進化と発生で生じる分岐の対応としても理解することができた。更に、異なったモデルでの進化シミュレーションにおいても遅く変化する遺伝子発現の出現、進化での重要性を確認した。

以上のことから、今後反復に代表される進化と発生の間に見られる諸現象は遅く変化する変数に基づいて進化する力学系と適応度条件との相互作用とから理解できるのではないかと期待される。

参考文献

Kohsokabe T, Kaneko K. 2016. Evolution-development congruence in pattern formation dynamics: bifurcations in gene expression and regulation of networks structures. J. Exp. Zool.(Mol. Dev. Evol.) 326B:61–84.

精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態

[Memo]

篠原美都

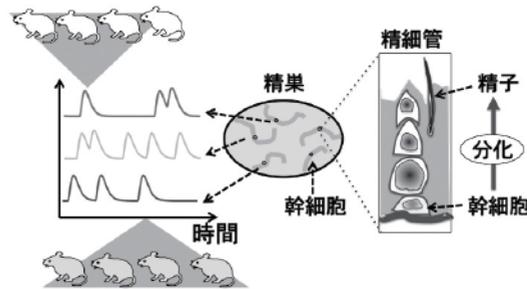
京都大学大学院・医学研究科・分子遺伝学分野

mshinoha@virus.kyoto-u.ac.jp

精子形成の源である精子幹細胞は、一生にわたって分裂し、毎日膨大な数の精子を作り続ける。幹細胞は精巣に多数あり、精子は複数の幹細胞から産生されるが、個々の幹細胞がその構成にどのように寄与しているかは不明であった。今回、我々の研究グループは、マウスの精子幹細胞にウイルス遺伝子を導入して特異的に標識したのち精巣に移植し、ホストマウスから生まれるそれぞれの仔がどの幹細胞から生まれているかを長期にわたって調べた。

その結果、幹細胞の機能的寿命(精子形成できる期間)は平均124日、最も長い例では482日と極めて長いことが分かった。また、それぞれの幹細胞が精子形成に寄与するパターンを数理解析により調べたところ、同じ幹細胞から重複して仔が生まれる頻度は有意に高く、一部の幹細胞が偏って使われていることが分かった。また、幹細胞が精子を作る活性には周期があることが分かった。

そこで、なぜ幹細胞の活性に偏りがあるかを調べた。造血系では幹細胞そのものが分裂せず休止することが知られているが、分裂によって蛍光タンパク質の発現が半減する変異マウスを用いて幹細胞の分裂速度を測定したところ、精子幹細胞は休止することなく、常に分裂していることが分かった。一方、精子幹細胞の分化の途中で高い頻度でアポトーシスが起きているため、これまで考えられてきたように幹細胞自体の分裂活性が精子形成の効率を決めているのではなく、幹細胞から精子へと分化する過程で、細胞死によって精子形成する幹細胞と、しない幹細胞の選択が起きている可能性が示唆された。



参考文献

Kanatsu-Shinohara M., Naoki H., Shinohara T. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. *Dev Cell* 38 (3): 248-61 (2016)

機械的な力による上皮形態形成制御機構

[Memo]

杉村薫

京都大学物質-細胞統合システム拠点、JST さきがけ

ksugimura@icems.kyoto-u.ac.jp

個体発生とは、体の前後軸などの空間情報をもとに、細胞が増殖・分化し、組織が変形することで、生き物が形づくられる過程である。このとき、体を引きのばす、曲げるなどのダイナミックな変形を駆動するのが機械的な力である。個体発生を制御する主要なシグナル伝達経路が同定された今、「機械的な力がいかにして生き物の形づくのか？」という問いに注目が集まっている。このような問いは、一般に力学という学問で扱われる。物質に力をかけたときにどれくらい変形するのかは、それぞれの物質の機械物性により決まり、この力と変形、機械物性の関係を理解するのが力学である。生体組織でこの三者の関係を調べることは難しく、研究が進んでいなかった。

力の生体内計測が困難であるという技術的困難を解決するために、我々は、非侵襲的に力を定量できる力のベイズ推定法を開発した¹⁻³。そして、力のベイズ推定法と共同研究者が開発した変形の定量手法を統合することで、上皮組織の力と変形を一元的に定量する強力なパイプラインを構築した⁴。さらに、組織の力と変形の時空間動態の実験データと対応可能な新しいクラスの連続体理論を構築した⁵。これらの変形を駆動する物理量としての力の役割の解析に加えて、機械的な力が上皮形態形成を司る空間情報をコードすることを示した⁶。さらに、この過程で、細胞のメカノセンシングを担うアクチン細胞骨格制御を同定した⁷。本シンポジウムでは、我々の最新の研究成果をもとに、分子や細胞などの個々の構成要素の振る舞いから多細胞組織の秩序だった形が生まれるメカニズムについて議論したい。

参考文献

1. Ishihara and Sugimura. J. Theor. Biol., 2012
2. Ishihara et al. Eur. Phys. J. E, 2013
3. Sugimura et al. IEEE Eng. Med. Soc., 2013
4. Sugimura and Ishihara. Development, 2013
5. Guirao et al. eLife, 2015
6. Ishihara, Marcq, Sugimura. Submitted (<https://arxiv.org/abs/1611.05707>)
7. Ikawa and Sugimura. In prep.

ERK MAP キナーゼによる細胞増殖と集団細胞運動の制御

【Memo】

青木一洋

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 定量生物学研究部門

k-aoki@nibb.ac.jp

細胞は様々な環境からの刺激を「入力」として感知し、その情報を細胞の中で処理し、最終的に細胞の増殖や分化といった「出力」を行う。その情報処理を担う「システム」が細胞内シグナル伝達系である。その中でもERK MAPKシグナル伝達系は細胞の増殖や分化、細胞運動といった多様な生命現象に関与することが知られている。ERK分子がこのような多様な生命現象を創発するのは、ERK活性化の時間パターンに情報がコードされているからだと考えられている。しかし、1細胞レベルでERK活性のどのように制御されているのか、またそれがどのような表現型と結びついているのかは直接的に調べられていなかった。

我々は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理に基づくバイオセンサーを用いてERK活性を生きた細胞で可視化し、その動態を定量化してきた。本発表では、FRETバイオセンサーの原理とその応用法の紹介、ERK活性の振幅ではなく周波数が細胞の増殖に重要であること、ERK活性の細胞間伝搬が細胞集団運動の方向性を決めること、の2点について主に紹介したい。

参考文献

Aoki K, Kumagai Y, Sakurai A, Komatsu N, Fujita Y, Shionyu C, Matsuda M. Stochastic ERK activation induced by noise and cell-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Molecular Cell*, 2013, 52; 529-40

神経軸索における誘引・忌避の切り替えとトポグラフィックな神経回路の配線

【Memo】

本田直樹

京都大学大学院 医学研究科 時空間情報イメージング拠点
n-honda@sys.i.kyoto-u.ac.jp

神経回路の発生において軸索が目的の脳部位へと投射する過程は、軸索末端に存在する成長円錐の走化性によって担われている。興味深いことに、成長円錐は一般的な走化性細胞とは異なり、同じ細胞外分子の濃度勾配に対して誘引と忌避を状況に応じて切り替える。しかしながら、成長円錐の誘引と忌避の切り替えメカニズムやその神経回路網形成における役割は良く分かっていない。そこで本研究では、成長円錐を含む走化性細胞で共通するシグナル伝達の構造に着目することで、一般的な数理モデルを構築し、走化性応答を統一的に記述する理論を導出した。その結果、誘引と忌避が切り替わる条件や一般的な走化性細胞と成長円錐におけるメカニズムの違いを明らかにすることができた。またこの数理モデルにより、成長円錐はCa²⁺濃度の変化に応じて忌避-誘引-忌避といったtri-phasicな走化性応答を示しうることを理論的に予測し、さらには成長円錐の走化性アッセイおよびCa²⁺イメージングにより実験的検証を行った。さらにこの数理モデルを拡張することで、視覚系領野で顕著に見られるトポグラフィックな軸索投射の発生メカニズムを提案する。

参考文献

Multi-phasic bi-directional chemotactic responses of the growth cone.
Naoki H*, Nishiyama M, Togashi K, Igarashi Y, Hong K* and Ishii S
Scientific Reports 6, 36256 (2016)

◆ポスター発表◆

再構成型無細胞タンパク質合成システムの大規模全成分計算機シミュレータによる反応動態解析

松浦友亮¹ 谷村直樹² 細田一史³
四方哲也⁴ ○清水義宏⁵

¹ 大阪大学大学院工学研究科 ² みずほ情報総研 ³ 大阪大学未来戦略機構
⁴ 大阪大学大学院情報科学研究科 ⁵ 理化学研究所生命システム研究センター
yshimizu@riken.jp

タンパク質合成反応は多数の成分が協奏的に働くことによって進行する生化学反応の集合体である。このような複雑な反応ネットワークを理解するため、様々な数理モデルの構築が行われているが、これらは近似モデルであり、個々の成分濃度と反応のダイナミクスの関係性を明らかにすることは困難である。全成分モデルを構築することができれば、こうした関係性を明らかにできるばかりでなく、全ての中間体の動的情報を得ることにより、モデルと実験の整合性の検証も可能となる。

そこで、我々は大腸菌由来の再構成型無細胞タンパク質合成システムであるPURE systemの数理モデル化を行い、これを元にした大規模全成分計算機シミュレータの構築を行った。このモデルでは、PURE systemに含まれる成分を出発物質としてMet-Gly-Glyからなるトリペプチドを合成し、様々な中間体を含む241成分と968反応を元にした常微分方程式から構成されている。様々な文献から得られた反応速度情報に基づきシミュレーションを行った結果、反応開始から数十秒の遅れの後、PURE systemによるペプチド合成と同様の合成速度でのペプチド合成が観測され、実際のタンパク質合成反応の特徴をよく反映した実験結果を得た。系内の構成要素の70%程度は数分で定常状態に達することが明らかになったが、これらの濃度変化情報を詳細に解析すると様々な構成要素が様々なタイミングでquasi-stationary state (QSS: 準定常状態) を経ることが明らかとなった。QSSにある構成要素は時間の経過とともに多様なクラスターを形成し、成長または崩壊を繰り返した後、最終的に単一の巨大なクラスターへと成長し、クラスターの崩壊や成長のタイミングは実際のタンパク質合成反応の成長段階と密接にリンクすることが明らかとなった。これらの観察結果から、大規模な反応ネットワークのダイナミクスを理解し、相転移情報などの特徴抽出を行うためには、QSSに着目した解析を行うことが有効であることが示唆された。

参考文献

Matsuura, T. *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. doi: 10.1073/pnas.1615351114

遺伝子導入マウス個体高速作製法を用いた概日時計周期長制御機構の解明

○鶴飼英樹¹ 大出晃士² 洲崎悦生² 上田泰己^{1,2}

¹ 理化学研究所生命システム研究センター細胞デザインコア合成生物学研究グループ
² 東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻
hideki.ukai@riken.jp

個体レベルで観察される高次生命現象をシステム生物学的に解明していくためには、個体を用いた仮説検証サイクルを高速かつ並列に回す技術が必要である。そこでまず、ゲノム編集技術とESマウス作製技術を組み合わせる事によって、仮説に基づいてゲノムDNAの情報を改変したゲノム改変マウス個体を高速・並列に作製する次世代型遺伝学手法を確立した。さらに、この手法の有効性を示すために、マウス概日時計システムをモデルシステムとして採用し、変異型遺伝子導入マウス個体を多数作製し、概日時計周期長制御機構の一端を解明した。

生物の多くは24時間周期のリズムを持って行動している。こうした行動リズムは細胞が持つ概日時計と呼ばれる時計機能によって生み出される。哺乳類概日時計は複数の転写制御因子が形成する転写翻訳フィードバックループにより自律振動子が形成されると考えられているが、その周期長を24時間に規定する機構はまだ明らかでは無い。概日時計の自律発振を担う中心的なタンパク質の一つであるCRY1はPER1やPER2とヘテロ二量体を形成して転写抑制因子として働き、自らの転写を抑制する負のフィードバック回路を形成する。CRY1による概日周期長制御機構を理解するために、我々はリン酸化修飾に着目し、まず質量分析計を用いてCRY1のリン酸化修飾部位を包括的に決定した。次にそれらの修飾が概日時計周期長に及ぼす影響を、網羅的なCRY1リン酸化修飾部位変異体シリーズを用いて検証するために、Cry1^{-/-};Cry2^{-/-}細胞およびマウス個体へのCry1遺伝子補完実験を行った。その結果、概日時計発振の安定性には、CRY1とPER2の親和性が重要であること、周期長に関しては、これまで考えられていたCRY1の分解速度だけではなく、CRY1に存在する特定の領域 (P-loop, C-lid) がタイマーとして働き、領域内に生じる複数のリン酸化が加算的に概日時計の周期長を制御している可能性が示唆された。

Ode K.L., Ukai H., Susaki E.A., *et al.*, *Molecular Cell*, 65, 1-15 (2017)
Sunagawa G.A., *et al.*, *Cell Reports*, 14, 1-16 (2016)
Kiyonari H. *et al.*, *Genesis*, 48, 317-327 (2010)

DNA 上の RNA ポリメラーゼの渋滞が細胞の個性を作る

○藤田恵介^{1,2} 岩城光宏^{1,2} 柳田敏雄^{1,2}

¹ 理研 QBIC 細胞動態計測研究グループ ² 大阪大学大学院生命機能研究科

keisuke.fujita@riken.jp

遺伝的に同じでかつ環境が同じでも、細胞には個性が現れる。細胞個性はバクテリアの意思決定から哺乳類の発生まで、さまざまな生命現象に必須であることが近年明らかとなってきた。転写頻度のゆらぎ(転写バースト)は細胞個性を生むことで注目されているが、なぜ転写頻度のゆらぎが起こるのかについてはよく分かっていない。今回、私たちはバクテリアの転写反応を細胞外で再構築しmRNAを1分子イメージングすることで、転写頻度のゆらぎはRNAポリメラーゼ(RNAP)とDNAによって内因的に引き起こされることを発見した。また、RNAPの1分子イメージング、原子間力顕微鏡画像撮影、セルオートマトンモデルを用いたRNAPの運動シミュレーションを行うことで、「転写頻度のゆらぎはDNA上で起こるRNAPの“渋滞とその緩和”によって引き起こされること」を明らかにした。本シンポジウムでは、細胞内でこの仮説を検証するための実験系についても議論したい。

参考文献

A Transcriptional bursting is intrinsically caused by interplay between RNA polymerases on DNA, Fujita K, Iwaki M, Yanagida T, *Nat. Commun.*, 7:13788, 2016

造血系細胞を DECODE して、細胞分裂と分化の関連機構を探る ～細胞顕微鏡イメージングと 一細胞デジタル RNA シークエンシングの融合～

○小川泰策¹ 伊川友活² 城口克之^{1,2,3}

¹ 理研 QBIC ² 理研 IMS ³ JST さきがけ

taisaku.ogawa@riken.jp

多細胞生物は、もとはたった1つの細胞が、分裂と分化を繰り返すことで1つの個体を形成している。細胞分裂と分化の関連を精密に制御することは、多細胞生物にとって非常に重要で、細胞内の遺伝子発現変動によりその制御を行っていると考えられる。近年、一細胞RNAシークエンシング技術の発展により、細胞分裂と分化それぞれの過程における遺伝子発現変動が詳細にわかるようになってきた^{1,2,3}。しかし、分裂と分化における遺伝子発現変動を同時に計測する研究はほとんど報告されていない。その原因は、一細胞レベルでの細胞分裂と分化の同時同定と一細胞RNAシークエンシングを組み合わせることが非常に難しいからである。そのため、細胞はどのようにして分裂と分化の関連を保っているのか明らかになっていない。

本研究の目的は、DECODE プロジェクトの一環として、顕微鏡イメージングにより単一細胞の分裂・分化を同時同定し、画像記録した単一細胞内の全遺伝子発現をデジタル RNA シークエンシング⁴⁾により網羅的に調べる手法を開発することで、細胞分裂と分化の関連機構を探ることである。解析対象としては、表面マーカーによって詳細な分化スキームが決められている造血系の細胞を用いる。分化をコントロールできる造血前駆細胞のセルライン⁵⁾を使って、造血細胞の分裂・分化にかかわる遺伝子発現変動を解析するアプローチを紹介する。

参考文献

- 1) Tanenbaum, M.E., et al. (2015) *Elife* 4. DOI:10.7554/eLife.07957
- 2) Petropoulos, S., et al. (2016) *Cell* 165, 1012-1026.
- 3) Macaulay, I.C., et al. (2016) *Cell Rep* 14, 966-977.
- 4) Shiroguchi K, et al. (2012) *PNAS* 109, 1347-1352.
- 5) Ikawa, T., et al. (2015) *Stem Cell Rep* 5, 716-727.

大腸菌進化実験と細胞シミュレーションを用いた 適応進化ダイナミクスの解析

○古澤力^{1,2} 堀之内貴明¹ 前田智也¹

¹ 理化学研究所・生命システム研究センター (QBiC) ² 東京大学理学系研究科・生物普遍性研究機構
chikara.furusawa@riken.jp

生物システムは様々な環境下で安定に増殖することが可能であり、一方で適応進化のダイナミクスに見られるようにその状態は高い可塑性を持つ。分子生物学が生物システムの各要素過程の詳細を次々と明らかにした一方で、それらの要素のネットワークによって、どのようにしてシステムの安定性と可塑性の両立が実現しているかは明らかではない。細胞モデルを用いたシミュレーションと理論解析からは、適応進化ダイナミクスの安定性には、ゲノムの変異に依らない表現型可塑性が重要な役割を果たしていることが示唆され、ゆらぎ・環境適応から進化まで、異なる時間スケールを持つダイナミクスの絡み合いの理解が必要とされている。そこで本研究では、大腸菌の人工進化実験を用いて、その進化ダイナミクスにおける表現型と遺伝子型の変化を定量し、その対応を解析した[1,2]。様々な抗生物質をそれぞれ添加した環境下で進化実験を行った。得られた薬剤耐性株について、超並列シーケンサにより突然変異を同定し、マイクロアレイ解析によって遺伝子発現量の変化を定量した。さらに、ある薬剤への耐性能の獲得が、他の薬剤への耐性・感受性をどのように変化させるかを網羅的に解析した。これらの表現型・遺伝子型データの関係を解析したところ、遺伝子発現プロファイルの変化と薬剤耐性能の変化は強く相関をしている一方で、突然変異は耐性能の変化と必ずしも高い相関を示さなかった。その進化ダイナミクスの詳細な解析から、耐性能の獲得の一部はゲノム変異に依らず、数十世代以上の比較的長い時間スケールを持つ適応ダイナミクスが存在することが強く示唆された。これらの結果と細胞シミュレーションの結果[3,4]を統合することにより、適応進化ダイナミクスの安定性がどのように理解できるか、そして細胞状態遷移を記述するマクロ状態論がどのように可能かを議論する。

参考文献

- [1] Shingo Suzuki, Takaaki Horinouchi, Chikara Furusawa, **Nature Communications** 5:5792 (2014)
 [2] Takaaki Horinouchi, et al., **BMC Evo. Biol.** 15:180 (2015)
 [2] Kunihiro Kaneko, Chikara Furusawa, Tetsuya Yomo, **Physical Review X**, 5(1), 011014 (2015)
 [3] Chikara Furusawa and Kunihiro Kaneko, **Jour. Royal Soc. Interface**, 12(109):20150482 (2015)

Mechanical mechanisms of epithelial sheet folding

○Fu-Lai Wen¹ Yu-Chiun Wang² Tatsuo Shibata¹

¹Laboratory for Physical Biology, RIKEN Quantitative Biology Center

²Laboratory for Epithelial Morphogenesis, RIKEN Center for Developmental Biology
fulai@cdb.riken.jp

The folding of epithelial cell sheets plays a crucial role in developing tissues and organs, such as neural tubes, optic cups, and branches of lungs. While many efforts are devoted to identifying the molecular machineries underlying epithelial folding, far less is understood about how forces deform individual cells to sculpt the overall sheet morphology. Using a simple mathematical model, we show that mechanical modulation at the basal-lateral as well as the apical cell surface is capable of inducing fold formation. The different modulation mechanisms sculpt epithelia into distinct fold morphology. The correspondence between the modulation mechanisms and the resultant folded shape remains unchanged when subject to mechanical perturbations from the surroundings, suggesting that these tissue-autonomous folding mechanisms can robustly work in various environmental conditions.

細胞の協調動態の観察とモデリング

○礪波一夫¹ 金井政宏² 戸澤英人¹ 牛島俊征¹ 田久保直子¹ 内島泰信¹
時弘哲治² 栗原裕基¹

¹ 東京大学大学院医学系研究科代謝生理化学分野 ² 東京大学大学院数理科学研究科
aal23820@nyc.odn.ne.jp

血管新生では、血管内皮細胞が出芽・伸長・分岐・管腔形成を行い新しい血管網が形成される。近年の解析から、血管新生において血管内皮細胞は伸長先端の細胞を含め停止、逆行、U-ターンなど様々な速度や方向性により、互いの位置関係を入れ替えながら、血管を伸長形成する様子が明らかとなった(参考文献)。この複雑な運動パターンは血管伸長を担う多細胞運動として注目されるが、その仕組みについては不明な点が多い。そこで、本研究では血管内皮細胞の1細胞から細胞集団における運動の特性を解析することにより、血管新生に働く細胞の協調動態を明らかにしようと考えた。血管内皮細胞のモデルとしては細胞外マトリックス中で血管新生に類似した出芽・伸長・分岐現象および遺伝子発現動態を示すマウス臍臓毛細血管由来の内皮細胞株MS-1を、間葉系細胞のモデルとしてはマウス胎児線維芽細胞由来のNIH3T3細胞を、上皮系細胞のモデルとしてイヌ腎臓尿管上皮細胞由来のMDCKを用い1細胞から多細胞における動態の比較を試みた。方法としては、共焦点タイムラプス撮影装置を用いて一定時間の細胞の動態を透過像および核染色(MS-1細胞にはSYTO16を、NIH3T3細胞およびMDCK細胞にはHoechst 33342を用いた)によるイメージング像から観察した。さらに、核染色像からその重心を検出することにより、細胞運動を追跡し、観察細胞の速度やPersistence(運動方向の持続性を表す指標)、平均二乗変位(MSD)などを求め、統計的性質の違いを解析した。その結果、MS-1細胞は他の細胞種と比較して直線的性質の運動を好むこと、また2細胞以上においては細胞の運動性を亢進し、そこには回転運動を含む足場依存性の協調運動が重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究で観察された回転運動に象徴される内皮細胞特有の細胞動態が多細胞になった時にすれ違い運動として血管伸長の推進力となり得るのか、モデリングを用いたアプローチ方法も含めて議論したい。また、本研究で観察された内皮細胞特有の運動において働く分子の役割についても最近の研究結果を紹介したい。

参考文献

Sugihara K, et al. (2015) *Cell Rep.*, 13(9):1814-27.

高時間分解能を達成する検体調整自動化装置

○和田洋一郎^{1,2} 三木陽太¹ 加藤大輔¹ 大橋一昌¹ 土屋正年¹ 大田佳宏^{2,3}
井原茂男^{2,3,4}

¹ 東京大学アイソトープ総合センター ² 東京大学 生物医学と数学の融合拠点 iBMath
³ 東京大学大学院数理科学研究科 ⁴ 東京大学先端科学技術研究センター
ywada-ty@umin.ac.jp

我々は、刺激応答性に変動する、トランスクリプトーム・ゲノム・エピゲノムデータを取得し、これを用いた数理モデルを通して新しい転写メカニズムを見出すことを目的としている。既に、7.5分間隔のマイクロアレイデータから、転写の波を、30分間隔のクロマチン相互作用解析データから、クロマチン構造変化を見出してきた。しかしながら、転写は分速3kbpで移動するため、これらの知見は100kbpを越える巨大遺伝子上に限られ、10kbp程度の多くの遺伝子群における転写メカニズム解析には、より高い時間解像度が必要とされた。

シーケンシングおよびライブラリー作成は自動化が年々進み、スループットの向上が進む一方、細胞の培養や解析検体の調整は研究員の手によって実施されており、再現性や実験時間などに置いて制約がある。そこで、高分解能データの数理工学的処理による新しい転写メカニズムを発見することを目的として、細胞の刺激とクロスリンク及び回収までのクロマチン免沈前処理を自動化する装置を作成した。

双腕ロボットによって生命科学で使われる汎用品を扱い、現在転写解析データの蓄積を行っているが、開発の経過において得られた種々の要素技術は、当施設が行っているバイオハザード研究、 α 線医薬品開発、放射性物質分析に応用されている。

転写の数理モデリング

○比留間英¹ 高村正志² 中田庸一²
中村伊南沙² 児玉大樹² 和田洋一郎^{3,4} 井原茂男^{2,3}

¹ 東京大学 医学部医学科 ² 東京大学 大学院数理科学研究科 ³ 東京大学 先端科学技術研究センター システム生物学 ⁴ 東京大学 アイソトープ総合センター

hiruma.ei@lsbm.org

転写は生命現象の最も基本的な現象であるが、その分子レベルの機構に関しては詳しく説明されていない。従来では大腸菌におけるRNA polymeraseがDNA上を滑りながら転写を行う線形モデルがヒトにも適用できると考えられてきたが、近年、組織化されたRNA polymerase (RNAPII)を含む転写ファクトリーにDNAが取り込まれて転写が行われるというファクトリー仮説[1]が提唱されている。ファクトリーの機能や構造、動力学に関しては未知の部分が多く、RNAPIIのDNA上の結合部位やクロマチンの相互作用の時間変化についてゲノムワイドな解析をする必要がある。本研究では、ChIA-PET[2]や次世代シーケンスを用いて、従来では得られなかった高時間分解能の実験データを元に以下の数理解析を行った。

- ・実験から得られた高分解能の時系列データを元に、クラスタリング解析を行って転写因子の振る舞いを分類した。
- ・より精細な時系列データを元に、実験データを説明することができるRNA polymerase (RNAPII)の活性を考慮に入れたダイナミクスを記述する数理モデルを作った。
- ・ループ形成に関与するCTCFとRAD21のChIA-PETデータを元に、粗視化の単位である粒子モデルの粒度を変えてコードダイアグラムの変化から構造を推定した。

参考文献

1. Cook PR. The organization of replication and transcription. Science. 1999. June 11;284(5421):1790-5.
2. Fullwood MJ, Han Y. Chromatin interaction analysis using paired-end tag sequencing. Curr. Protoc. Mol. Biol. 2010;Chapter 21:21-25.

大腸菌の長期 1 細胞計測デバイスの性能評価

○山内峻平¹ 中岡秀憲¹ 若本祐一^{1,2}

¹ 東京大学大学院総合文化研究科 ² 複雑系生命システム研究センター

shunpei_yamauchi@cell.c.u-tokyo.ac.jp

環境変動に対する適応応答は生物の重要かつ基礎的な性質である。一般に、同じ遺伝情報を持った細胞が同一環境下にあったとしても、細胞ごとに大きさや成長の速度、遺伝子の発現量などの表現型が大きくばらつくことが知られている。この細胞の表現型のばらつきが適応応答に与える影響を理解するには、環境変動に伴う細胞の振る舞いの履歴依存性や可逆性、細胞系列に注目した細胞状態の遷移過程などを1細胞レベルで計測することが重要であると考えられる。さらに、同じ遺伝情報を持った大腸菌の定常環境下での成長には、様々な外部環境にわたって世代時間とその分散に線形関係があることが示唆されており、このような定常環境下での成長則と適応応答の関係を知ることも重要な課題である。しかし、集団計測ではばらつきのある細胞群の平均的な性質しか計測できないため、表現型のばらつきに注目した計測を行うには不適切である。したがって、同じ遺伝情報を持った細胞の細胞ごとの表現型の変化過程を計測するためには、集団計測ではなく1細胞でレベルで計測できる計測系を用いることが必要である。

本研究では、1細胞ダイナミクスの高精度情報取得を実現するダイナミクスサイトメーターと呼ばれる流体デバイスとマザーマシンと呼ばれるデバイスの構造を参考にした流体デバイスを作製し、環境の定常環境下での大腸菌の1細胞計測を行うことで、両計測技術の評価を行うことを目的とした。その結果、ダイナミクスサイトメーターでは、観察溝から排出された細胞が増殖し、細胞を排出するための溝に詰まりやすく、安定に計測できる時間が限られるという問題が認められた。一方、マザーマシンを参考にしたデバイスでは、ダイナミクスサイトメーターに比べ、安定した計測を長く行える傾向があった。しかし、ダイナミクスサイトメーターを用いたときに比べ、マザーマシンの中では同一環境下で計測された細胞と比べての平均世代時間が長く、細胞の大きさがより小さくなった。このことは、細胞への栄養供給という点で問題があることを示唆する。以上の問題の解決に向け、定常環境かで長期化安定いして計測ができ、かつ細胞に与えるストレスの少ない新たな流体デバイスの作製を検討している。

集団増殖系における SST 構造

杉山友規 小林徹也

東京大学生産技術研究所

yuki.sughiyama@gmail.com

多数のヘテロなタイプ(表現型・遺伝型)を持った個体により構成される集団(例えば、病原性細菌や癌細胞)の集団としての増殖率(集団増殖率)を評価することは科学的にも社会的にも重要な課題となっている。特に、変動環境下における集団増殖率の評価は、定常環境下におけるそれ(定常増殖率)よりも、環境の切り替わり時に余剰な増殖(余剰増殖率)が生じるため、難しい問題となる。本研究は、非平衡統計物理学の分野で培われた定常状態熱力学(SST)の手法を用いて、この余剰増殖率を評価するための“理論”を構築することを目的とする。

SSTにおけるエッセンスは、定常状態間の遷移において生じる熱を、定常状態を維持するために必要な部分(housekeeping heat)とそれ以外(excess heat)に分離し、後者に対してClausius不等式を構築することにある。本研究では、この手法を集団増殖系に輸入し、余剰増殖率をSSTにおける余剰熱(excess heat)に読み替える事により、集団増殖系にClausius不等式を構成し、熱力学の枠組みの中で集団増殖率を評価することを試みる。結果としては、熱力学におけるエントロピーに対応する量が“lineage fitness”と呼ばれる観測可能量で評価できることが示される。このため、余剰増殖の上限を環境変動の始点と終端におけるlineage fitnessを観測することにより計算できるようになる。さらに、準静的環境変動においてこの上限が達成されるため、この場合に対しては上記の手法を用いて余剰増殖を正確に評価できることが示される。

参考文献

[1] Y. Sughiyama, T. J. Kobayashi, K. Tsumura and K. Aihara, Phys. Rev. E **91**, 032120 (2015).

[2] Y. Sughiyama and T. J. Kobayashi, Phys. Rev. E **95**, 012131 (2017).

Distinguishing Direct Causal Relations in Complex Networks by Partial Cross Mapping

○ Siyang Leng¹ Huanfei Ma² Wei Lin³ Luonan Chen^{1,4,5} and Kazuyuki Aihara¹

¹Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Tokyo 153-8505, Japan

²School of Mathematical Sciences, Soochow University, Suzhou 215006, China

³School of Mathematical Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

⁴Key Laboratory of Systems Biology, Innovation Center for Cell Signaling Network, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, University of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

⁵School of Life Science and Technology, Shanghai Tech University, Shanghai 200031, China

syleng1990@gmail.com

Successful identification of causal networks from a set of variables is an important task in many fields of science and engineering ranging from neuroscience and climatology to economics and sociology. For a long time, lots of efforts have been focused on how to predict causality from observational time series. However, due to the transitivity of causation, most of the existing causation detection methods cannot distinguish the direct and primary causal links from the indirect ones, which leads to a dense and meaningless network especially when facing a large-scale one. In this work, we articulate a novel framework called Partial Cross Mapping (PCM) which can successfully distinguish direct causal relations from indirect links. This method combines the idea of the causal delayed spectrum with partial correlation and characterizes the causal relation between two variables by eliminating all the other indirect information flows. Benchmark network models and several real-world network examples are used to demonstrate the effectiveness and show a broad applicability of this method. We anticipate the Partial Cross Mapping method to be a powerful tool in building direct causal networks.

[References]

[1] Ma, H., Aihara, K. & Chen, L. Detecting causality from nonlinear dynamics with short-term time series. Scientific reports 4, 7464 (2014). [2] Sugihara, G. et al. Detecting causality in complex ecosystems. science 338, 496–500 (2012).

[3] Takens, F. Detecting strange attractors in turbulence. In Dynamical systems and turbulence, Warwick 1980, 366–381 (Springer, 1981).

[4] Zhao, J., Zhou, Y., Zhang, X. & Chen, L. Part mutual information for quantifying direct associations in networks. Proceedings of the National Academy of Sciences 113, 5130–5135 (2016).

[5] Hirata, Y. et al. Detecting causality by combined use of multiple methods: Climate and brain examples. PloS one 11, e0158572 (2016).

管形態の恒常維持に働く細胞の力学応答システム

○平島剛志 安達泰治

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 バイオメカニクス分野

hirashima@frontier.kyoto-u.ac.jp

生物の発生・成長過程において、多細胞組織の形態(かたちや大きさ)は、組織を構成する細胞の協調的な振る舞いにより制御されている。多細胞組織の形態制御を支える仕組みのひとつに、細胞が力を受容し応答する機能に基づくものがあり、その仕組みを支える関与分子や細胞の機能同定は、これまでに精力的に進められてきた。しかし、受容した力に対する細胞応答がどのようなダイナミクスを通して多細胞組織の形態制御に寄与するのかについては、未だ未解明な点が多い。

われわれは、生体組織の基本構造である管の形態形成過程に着目し、蛍光イメージングを基盤とした定量と数理モデル解析を組み合わせて、管の形態制御に関わる細胞力覚機構の解明を目指している。マウス胎仔の精巣上皮において観察される、細胞増殖する単層上皮管の径長が一定に保たれる現象を具体的な研究題材とし、3次元管組織における細胞のかたちや動きを蛍光イメージングし、得られた画像を定量解析した。これらの解析により、管径の増大に寄与する円周方向に沿った細胞分裂と管径の縮小に寄与する細胞の配置換えが均衡していることが明らかとなり、管径を恒常的に維持するための組織局所的な細胞群の振る舞いを見出した。さらに、多細胞動態を表現する力学シミュレーション解析や異方的な圧力負荷に対する細胞応答の測定により、管組織内の細胞は、たとえば細胞分裂のような組織内で発生する力に応答するようにミオシン活性を亢進させることがわかった。本ポスターでは、これらの実験と数理シミュレーションにより得られた結果を統一的に議論し、恒常的な管径維持に働く多細胞動態システムを提案する。

Rescaling of Spatio-Temporal Sensing in Eukaryotic Chemotaxis

○近藤洋平¹ 神野圭太²

¹ 京都大学大学院 情報学研究科

² FOM Institute AMOLF, Amsterdam, Netherlands

ykondo@sys.i.kyoto-u.ac.jp

多くの生物は化学物質濃度の勾配に対して方向性のある運動を行う能力を持っている。真核細胞においては、特定の細胞外分子濃度の空間勾配を反映して細胞内にシグナル活性レベルの勾配がつくられ、それをもとに運動が制御される。この振る舞いを担っているシグナル伝達系のモデルシステムとして最もよく使われているものの一つが細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) である。例えば、誘引物質である細胞外cAMPからGタンパク質共役受容体を介したRasタンパク質の活性化などが定量的に調べられてきた。そういった研究を通して最近、次の2種類の「相対変化検出 (Fold-change detection)」性が示唆されている:(1) 時間的に定常な細胞外空間勾配に対する応答は入力勾配の相対的強度、つまり細胞前部のcAMP濃度に対する細胞後部の濃度の比、によって決まる。(2)空間的に一様な細胞外cAMP濃度のある時点でステップ的に変化させると、下流のシグナルは過渡的な応答を示すが、その際の応答強度はステップ変化前後の濃度の比によって決まる。そこで我々は一般的に使われるモデリングの枠組みであるLEGI (local excitation, global inhibition) を用いて、性質1および2の両方を持つモデルを作成した。そしてモデルの数理解析を通して性質1と2の関係、例えばLEGIの枠内では性質2を持つシステムは性質1も同時に持つことなど、を示した。さらに、性質1と2を同時に持つことは誘引物質濃度の伝播波に対しても同様の相対変化検出を可能にするため、いわゆる“Wave chemotaxis”を行う細胞にとって有用であろうこともわかった。

Kamino K and Kondo Y, PLoS ONE 11(10): e0164674 (2016)

細胞間コミュニケーションによるがん進展制御

○榎本将人¹ 本田直樹² 武本花奈美³ 竹本大策¹ 井垣達吏^{1,3}¹ 京都大学大学院・生命科学研究所・システム機能学分野² 京都大学大学院・医学研究科・時空間情報イメージング拠点³ 京都大学大学院・薬学研究科・生理活性制御学分野

menomoto@lif.kyoto-u.ac.jp

近年、がん組織の多くはポリクローナルな細胞集団で構成されていることが分かってきた。このような腫瘍内部の不均一性のがん進展を促していると考えられるが、その分子機構はまだまだ不明な点が多い。そこで我々はシヨウジョウバエ上皮をモデルとして、異なるがん遺伝子を活性化させた細胞集団をモザイク状に誘導し腫瘍形成・悪性化能を誘発する因子をスクリーニングした。その結果、シヨウジョウバエ複眼眼基の上皮組織においてRas活性化細胞クローンとSrc活性化細胞クローンが近接すると互いにその性質を変化させて隣接組織へと浸潤・転移能を獲得することがわかった。そのメカニズムを遺伝学的に解析した結果、Src活性化細胞ではNotchシグナルが活性化し、それによってSrc活性化細胞が腫瘍悪性化能を獲得することが分かった。さらに、Notchシグナルは炎症性サイトカインUnpaired (Upd; IL-6ホモログ) の発現を誘導し、これが細胞非自律的にJAK-STAT経路を活性化することでRas活性化細胞クローンの浸潤・転移能獲得に寄与することが分かった。これらの知見は、異なるがん原性細胞が相互作用を介してNotchシグナルとJAK-STATシグナルの持続的な活性化を引き起こすことで相利共生の悪性化腫瘍へと変化していくことを示唆している。

遺伝子発現の光操作技術と幹細胞研究への応用

○今吉格¹¹ 京都大学 生命科学研究所

iimayosh@virus.kyoto-u.ac.jp

近年、光作動性のイオンチャンネルやイオントランスポーターをニューロンに発現させる事により、ニューロンの神経活動を光照射によりコントロールする技術(オプトジェネティクス、光遺伝学)が開発され、神経回路研究において爆発的に普及してきている。オプトジェネティクスの適応により、神経回路の作動原理の解明が次々と進んでいる。しかしながら、これらの光作動性のイオンチャンネルやイオントランスポーターの開発や普及に比べて、光作動性の転写因子の開発や生命科学への応用は大きく遅れている。光照射の有無や条件により、遺伝子発現を自在にコントロールする事が可能になれば、様々な遺伝子の機能や、その発現動態の意義について、より詳細な解析が可能になると考えられる。

2013年にYangらのグループによって、光吸収によって構造が変化するLOVDドメイン(light, oxygen, voltage domain)を持つ、アカバカンビ(*Neurospora crassa*)由来のVVDたんぱく質を光活性化に利用した、Photo-activatable Gal4/UASシステムが報告された。Photo-activatable GAL4/UASシステムでは、二量体化能を減弱したGAL4のDNA結合ドメイン、LOVDドメインを持つVVD、そして転写活性化因子p65の転写活性ドメインがタンデムに連結された人工転写因子(GAVPO)を用いる。シスエレメントとしてGAL4の結合配列(5xUAS)にTATAボックスを連結し、その下流に発現させたい遺伝子を配置し、両者を細胞に導入する。すると、GAVPOたんぱく質は、VVDを介して青色光照射依存的に二量体化を起こす。その結果、GAL4部分の二量体化によりDNA結合活性が増加し、5xUASに結合する。次に、GAVPOのp65を介して転写複合体がTATAボックス上に形成され、下流の遺伝子の転写が促進されるという仕組みである。重要な点は、外因性の薬剤や補助因子を投与する事なく、遺伝子発現を強力に制御する事が可能である点である。我々は、この遺伝子発現の光操作システムを用いることで、神経幹細胞におけるbHLH型転写因子の振動発現の意義について検証を行ったので、紹介したい。

また、二次元培養細胞における単一細胞の光遺伝子操作を実現させるために、デジタルミラーデバイスを用いて、単一細胞レベルでの光照射条件の検討を行った。照射光源の種類や対物レンズの開口径を詳細に検討することによって、二次元培養細胞における単一細胞レベルの光遺伝子操作が可能になった。この技術の開発により、例えばタイムラプス観察中に、任意の細胞や細胞集団を、任意のタイミングにて遺伝子発現を操作する事が可能になった。また、生体組織など三次元に細胞が折り重なった細胞集団の中から、特定の狙った細胞に光照射するために、二光子レーザーを用いたGAVPOの光活性化条件の検討を行った。今後、長波長の蛍光タンパク質を用いて三次元組織を構成する個々の細胞のふるまいを可視化しつつ、狙ったタイミングで特定の細胞を光照射し、遺伝子発現動態を人工的に操作する実験系の確立を目指す。

生体組織における細胞ごとの形態と分子活性を網羅的に解析する技術の開発

今西彩子¹ 佐藤雅也² 寺井健太¹ 隅山健太³ 堀田一弘² 松田道行¹

¹ 京都大学大学院生命科学研究所 ² 名城大学理工学部電気電子工学科 ³ 理研 QBIC
terai.kenta.5m@kyoto-u.ac.jp

組織学・形態学により得られる情報は、生命現象を理解するうえで重要な要素である。癌の診断や、炎症の評価などは、現在でも形態学を基本に行われている。また、形態学と分子生物学の融合により、発生時の形態形成に関わる分子や、病的な形態変化を引き起こす分子などが同定されている。近年、生体イメージングを用いて、個体内の細胞や分子の動態を解析する事が可能になりつつある。しかしながら、これらの情報を形態学に紐付けする事は、個別のマーカーに依存しており、網羅的な解析は行われてこなかった。

我々は4次元の組織学・形態学を解析する目的で、細胞形態マーカーを開発した。個々の細胞形態を認識するため、核・細胞質・細胞膜の可視化を行った。このマーカーをNuCyM(Nucleus, Cytosol, Membrane)と名付けた。また、分子活性の変化をモニターするFRETバイオセンサーと同時に使用することで、4次元において、細胞分裂と分子活性を同時に検出可能にした。更に、トランスジェニックマウスを作製し、個体内における分子活性と、個々の細胞識別を自動化した。これにより、網羅的な解析が可能となる。これらの手法により細胞・組織間のシグナル伝達に基づくコミュニケーションの理解が進むことが期待される。

アポトーシスにおける単一細胞内 ATP 動態のイメージング

○今村博臣¹ 坂本修一朗¹ 吉田有希¹ 垣塚彰¹

¹ 京都大学生命科学研究科
imamura@lif.kyoto-u.ac.jp

生物はその活動に必要なエネルギーを外部から取り込んでいる。取り込まれたエネルギーは、主にアデノシン三リン酸(ATP)内の高エネルギーリン酸結合という形に細胞内で変換されたのち、代謝反応や物質輸送など様々な目的に利用される。そのため、細胞が正常に活動するためには、十分なATP濃度が維持されている必要がある。一方、死んだ細胞にはATPがほとんど含まれていない。しかし、細胞が死ぬ際に細胞内ATP濃度が減少する時間スケール、仕組み、意義はほとんどわかっていない。

我々は、以前に、生きた細胞内ATP濃度をイメージングするための蛍光バイオセンサー ATeamを報告した(Imamura et al. 2009)。今回、このシステムを用いて細胞死のひとつであるアポトーシスにおける個々の細胞内のATP動態を調べた。ATeamを発現した培養哺乳類細胞にアポトーシスを誘導してイメージングしたところ、実行型カスパーゼであるカスパーゼ3の活性化とほぼ同時に細胞内ATP濃度の減少が始まり、30分～2時間程度で枯渇する様子が観察された。そこで、カスパーゼ3のターゲットのひとつであるPANX1に着目した。PANX1は細胞膜に局在する陰イオンチャンネルであり、カスパーゼ3による部分切断によって活性化し、細胞外にATPを放出することが報告されている。阻害剤やsiRNAノックダウンによってPANX1の活性を抑制したところ、アポトーシス細胞におけるATP濃度の減少が観察された。一方、PANX1を過剰発現すると、アポトーシス細胞におけるATP濃度の減少は著しく加速された。これらの結果は、アポトーシスにおいて、細胞はPANX1を介して積極的に細胞内ATP濃度を減少させている事を示唆している。細胞内ATP濃度が減少すると、細胞の代謝反応が低下する。実際、アポトーシスを誘導した細胞では、徐々に培地中のグルコースの消費量が低下する。それに対し、PANX1を阻害した細胞にアポトーシスを誘導すると、グルコース消費の低下が観察されなかった。すなわち、アポトーシスした細胞はPANX1を通して積極的に細胞内ATP濃度を低下させることで、内部の代謝反応を抑え、環境中の栄養の浪費を抑えていると考えられた。

Imamura et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, p15651-15656.

公共データベース解析及び現象論モデルによる核内クロマチンの局所的及び大域的構造・動態・機能相関の解析

○栗津暁紀^{1,2} 坂本尚昭^{1,2} 谷角怜¹ 高宮一徳¹ 池谷淳¹ 亀田健¹
山本貴証¹ 松島佑樹¹ 高尾和孝¹ Zhao Yan¹ 西森拓^{1,2}

¹ 広島大学大学院理学研究科数理分子生命専攻

² 広島大学核内クロマチンライブダイナミクスの数理研究拠点

awa@hiroshima-u.ac.jp

例えば人の細胞内では、全長にして2mにもなるDNAが、ヒストンや様々なタンパク質と結合し階層的な構造を形成する事で、直径10 μ m程度の核内に染色体として収納されている。そしてこの染色体は決してひとつの構造として取まっているのではなく、様々な時空間スケールで動的に変形しており、それによって転写、複製、損傷修復といった様々な生命活動に必須の機能が制御されている。そこで我々のグループでは染色体の局所的及び大域的構造と動態について、現象論的モデルと公共データベースの解析を通じ、以下のような考察を行った。

1) データベース解析による遺伝子制御とその遺伝子座力学特性との関係の考察

1~4塩基対からなる配列の反復からなる単純反復配列は、ヒトゲノム中のコード領域の2倍の領域を占め、転写制御や遺伝病との関連が示唆されている。ヒトゲノム中の単純反復配列のゲノム内分布とその周辺でのヌクレオソーム分布について、公共データの網羅的解析を行い、その配列特異的な分布とその周辺における特異的なヌクレオソーム分布について考察した。また様々な生物種における遺伝子の発現量とその遺伝子座の力学的特性(力学的柔軟性)の関係を調べ、その間の相関とその生物種依存性を考察した。(谷角、池谷、亀田)

2) 粗視化モデルによるヌクレオソーム形成・排他配列の動態・機能性の考察

ヌクレオソーム形成配列と排他配列の特性を、配列自身の特徴、及び配列依存的な力学特性に基づく解析より考察した。またヌクレオソーム排他的な長い配列が、遺伝子制御やゲノム構造化におよぼす影響について、考察した。(Zhao、松島)

3) 分裂酵母の間期及び減数分裂期染色体の自発的構造形成

真核生物の中で最も単純な染色体構造でありつつ、染色体テリトリーやTopologically associated domainと似た構造を持つ、分裂酵母の核内染色体の構造と動態について、ソフトマター物理的な知見をベースにした現象論的高分子モデルのシミュレーションを通じて考察した。そして間期分裂酵母核内の染色体テリトリー及び核小体-SPB(Spindle pole body)間の核内位置関係形成とその安定性を考察した。また、核膜の動態も考慮した減数分裂時分裂酵母示すホーステイル運動のモデルを構築し、相同染色体対合形成のメカニズムを考察した。(山本、高宮、高尾)

分裂酵母のテロメアとセントロメアの動きを制御する要因の探索とその意義の解明

○上野勝^{1,2} 伊藤寛朗¹ 鈴木沙弥香³ 菅原武志² 難波利典² 新海創也²
Hossain Mohammad Shamim¹ Satoshi Mizukawa¹ 楯真一^{2,3}

¹ 広大・院先端物質・分子生命 ² 広大・クロマチン動態数理研究拠点 ³ 広大・院理学・数理分子生命
scmueno@hiroshima-u.ac.jp

染色体は細胞核の中で規則性のある配置をとると考えられている。分裂酵母では、体細胞分裂間期の細胞核では、セントロメアは核膜の外層にあるスピンドル極体(SPB)の近傍にクラスターし、染色体末端(テロメア)はセントロメアと反対側の核膜上にクラスターする。また、SPBとセントロメアは細胞骨格の微小管依存的に細胞長に沿って往復運動することが報告されている(参考文献1、2)。

我々は分裂酵母を用いて、セントロメアとテロメアの動態を解析するために、セントロメアの標識として、SPB構成因子であるSid4-GFPを発現させ、一箇所のテロメアを標識するために、テロメアから約80キロ塩基離れたsod2遺伝子近傍にlacOリピートを導入した株を用いた。さらに、セントロメアやテロメアの動きを評価するために、あまり動かないと考えられる核小体をGar2-mCherryで標識した。この株を用いて、生細胞の蛍光顕微鏡観察を行い、観察データをトラッキング解析し、Sid4-GFP、Sod2-GFP、Gar2-mCherryの輝度中心の3次元座標を数値化し、それぞれの輝度中心間の距離から平均二乗変位(Mean Square Displacement; MSD)を算出することで、各輝点の核内動態を定量化した。

高グルコース(10%)培地、および低グルコース(0.04%)培地などを用いて観察・解析を行ったところ、セントロメアのMSDは高グルコースに比べて、低グルコースで著しく低下した。このことからセントロメアの運動は、細胞外グルコース濃度に依存することを発見した。一方で、テロメアのMSDは高グルコース、低グルコースでもほぼ同じ値を示した。セントロメアのMSDはATP阻害剤で著しく低下したのに対して、テロメアのMSDはATP阻害剤の影響を部分的にしか受けなかった。これらのことから、テロメアとセントロメアの動きは、それぞれ独立に制御されていることがわかった。さらに栄養豊富な培地に比べて、栄養が乏しい合成培地のほうが、セントロメアとテロメアのMSDが大きいことも発見した。本発表ではこれらの運動の意義について議論したい。

参考文献

1. Tran PT, et al. J. Cell Biol. 153, 397-411. (2001).
2. Kim KD, et. al. J. Cell Sci. 126, 5271-83. (2013).

ゲノム修復におけるクロマチン動態

○堀越保則^{1,2} 福戸敦彦¹ 田代聡^{1,2}

¹ 広島大学原爆放射線医科学研究所 細胞修復制御研究分野

² 広島大学 核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点

holy@hiroshima-u.ac.jp

染色体DNAは、内的要因・外的要因を問わず、常に損傷の危険に晒されている。染色体DNA損傷のなかでも、放射線などによって誘発されるDNA二重鎖切断は、最も重篤なDNA損傷のひとつであり、修復されない場合は細胞死が誘導される。真核生物には、相同組換え修復機構や非同末端融合機構などのDNA二重鎖切断の修復機構が備わっている。しかしながら、DNA二本鎖切断の修復機構と、クロマチン動態や細胞核高次構造の関連については、未だ不明な点が多い。そこで我々は、

1. DNA二重鎖切断の相同組換え修復と細胞核高次構造の関連

2. DNA二本鎖切断部位におけるクロマチン再構成

上記二点に着目し、解析を進めた。

ゲノム修復機構に関与するタンパク質は、染色体DNA損傷部位周辺に順次集積し、核内フォーカスと呼ばれる核内高次構造体を形成することが広く知られている。我々は、相同組換え修復機構で重要な役割を果たしているRAD51が、染色体DNA二本鎖切断部位に集積してフォーカスを形成するメカニズムについて検証を進め、本研究拠点の成果として報告してきた[1-3]。さらに、超解像顕微鏡を用いた核内超微細構造の解析を行い、RAD51が構築する核内フォーカスが損傷クロマチンの構造と密接な局在関連があることを見出した。

一方、DNA修復においてクロマチン再構成は重要な役割を果たす。我々は、ヒストンH2AのバリエーションあるヒトH2A.Z-2に関して、DNA二本鎖切断部位で交換反応が認められること、さらにRAD51のフォーカス形成に関与していることを報告している[4]。そこで、DNA損傷依存的なH2A.Z-2交換反応の制御メカニズムの解明に関して提案型研究を立案し研究を進めた結果、興味深い知見を得ることができた。

これらの知見をもとに、相同組換え修復機構と細胞核高次構造・クロマチン再構成の関連について報告し、今後の細胞核構造研究の方向性を視野に入れた討論を行いたい。

参考文献

[1] Shima H, *et al.*, *J Cell Sci.*, 2013

[2] Liu, NA, *et al.*, *FASEB J.* 2015

[3] Okimoto S, *et al.*, *Genes Cells*, 2015.

[4] Nishibuchi I, *et al.*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 2014

クロマチン動態プローブ開発

○栃尾尚哉¹ 川崎亮祐² 青木大将² 梅原康平² 吉村優一¹ 上脇隼一¹

Holger Flechsig² 富樫祐一¹ 楯真一^{1,2}

¹ 広島大学大学院理学研究科 RcMcD ² 所属広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻

naoya-tochio@hiroshima-u.ac.jp

遺伝子発現制御には、エピゲノム情報制御のような化学修飾による制御だけではなく、クロマチン構造、ヌクレオソーム構造制御が大きく関わっていることが近年の高解像度顕微鏡による研究で明らかになりつつあります。我々はゲノム編集技術として知られるTALENのDNA結合領域に着目して研究を進めています。TALENは、植物の非病原性細菌由来の転写因子(TALEタンパク質)がもつDNA認識領域を利用しています。TALEタンパク質のDNA認識機構は、DNA認識領域を構成する34個のアミノ酸からなるリピート(TALリピート)が4種のDNA塩基のうち1つを特異的に認識するといったもので、ターゲットとなるDNA配列に対応するようTALリピートを組み合わせることで目的の配列にあったTALENを設計することができます。また、TALEタンパク質はDNAと結合するとき分子全体が顕著に縮むのも特徴です。我々は従来型より精密なゲノム編集能を獲得した改良型TALEに関して分子動力学シミュレーションと物理化学的な実験を用いることで、TALEタンパク質のDNA認識領域の柔軟性向上が、高効率なゲノム編集を達成するという新しいメカニズムを提唱しました(1)。

また、能動的にクロマチン構造またはヌクレオソーム構造に摂動を与える分子プローブの開発も同時に目指しており、ヌクレオソームのフレキシブルなテイル領域における異性化を通して転写制御に関連するプロリン異性化酵素Pin1の特異な分子認識機構、ヒストンシャペロンFACTの天然変性領域におけるリン酸化に対する超高感度応答メカニズム、ヒストンのリフォールディングを助ける分子シャペロンHSP70の基質認識領域の動的挙動、に関しても研究を進めています。これらに関する研究経過についても併せて報告します。

参考文献

(1) Tochio, N., Umehara, K., Uewaki, J., Flechsig, H., Kondo, M., Dewa, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Saitoh, T., Togashi, Y., and Tate, S. "Non-RVD mutations that enhance the dynamics of the TAL repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy." *Sci. Rep.*, **6**, 37887 (2016).

分裂酵母クロマチンの網羅的動態解析

○難波利典¹ 鈴木沙弥香² 菅原武志¹ 丁大橋⁴ 平岡泰^{4,5}
富樫祐一¹ 上野勝^{1,3} 植真一^{1,2}

¹ 広島大学クロマチン数理研究拠点 ² 広島大学大学院数理分子生命理学専攻

³ 広島大学大学院先端物質科学研究所分子生命機能科学専攻 ⁴ 未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室

⁵ 大阪大学大学院生命機能研究科

nmb@hiroshima-u.ac.jp

DNAの複製や転写など遺伝子機能は、一次元の遺伝子配列だけでなく、高次の構造や動態が密接に関連していると考えられている。近年、核内で空間的に近接しているゲノム領域を特定するchromosome conformation capture法(Hi-Cなど)[1]により、ゲノム全体の構造を定量化することが盛んになっている。しかしながら、これらの技術は構造のゆらぎを直接評価することが難しい。実際に、蛍光プローブをつけた遺伝子座のライブ観察をおこなうと、核内で大きく動いており、染色体は構造的な多様性を持っていることが窺える。

そこで我々はゲノム全体の構造及び動態を定量化するために、間期の分裂酵母の3本の染色体(全長12.5Mb)を対象に、約100kb間隔で蛍光標識した遺伝子座の3Dライブ観察をそれぞれ行い、三次元座標をトラッキングにより収集した。クロマチン構造が平均構造からランダムにずれているのではなく、複数の取りやすい構造があった場合、Hi-Cのような平滑化された情報では見えなくなってしまう。しかしながら、各遺伝子座の時系列データを定量的解析することで、平滑化されると見えなくなるクロマチン構造を抽出することを可能とした。本発表では、この時系列分析がどのように染色体の構造や動態を理解する手がかりとなるかを紹介します。

[1] Mizuguchi et al. (2014) *Nature*, 516(7531), 432-435.

生体高分子の構造・反応クロストークと少数性問題 — 酵素反応と動的クロマチン構造を例に

Romain Amyot^{1,2} 中川正基^{1,2} ○富樫祐一^{1,2}

¹ 広島大学 大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻

² 広島大学 クロマチン動態数理研究拠点

{romain-amyot, togashi}@hiroshima-u.ac.jp

反応拡散系は細胞内の諸過程のモデルとして広く用いられている。しかし、無数の・自由拡散する・内部状態のない分子を仮定する通常の反応拡散方程式は、そうした過程において必ずしも成り立たない。

我々は以前より、反応系・反応拡散系に少数個・低密度しか存在しない分子(特に触媒・鑄型)が系の振舞いに与える影響について議論してきた[1]。反応に対して拡散が遅い系では、分子の総数だけでなく配置も無視できない。特に、各要素が自由拡散するのではなく、配置に何らかの構造的制約がある(例えば2つの酵素がリンカーを介してつなぎ止められている)場合には、動きや反応の相関を考慮する必要が生ずる。複雑な構造を持つ高分子・分子複合体が集積した細胞においては、これは例外的な状況ではないと考えられる。本発表では、特に下記の2つの例について議論する。

1. 複数の基質結合部位を持つ酵素(例えば、プロリン異性化酵素Pin1は酵素活性を持つPPaseドメインと、酵素活性はないが基質と結合するWWドメインからなる)と、その酵素により反応する部位を複数持つ基質(Pin1の例では反応の対象となるpSer/Thr-Proモチーフを複数持つタンパク質)との間の反応。各部位間の位置関係により反応の様相が変わる一方で、反応が位置関係を変える(上のPin1の例ではプロリンのcis-trans異性化がタンパク構造に影響を与える)ことが想定される。
2. 核内クロマチン構造と、その上で働く酵素や転写因子などの分子との相互作用。クロマチン構造(DNA鎖の形状)が分子の拡散運動、ひいては結合や反応の頻度を変調する一方で、分子の結合解離や機能が鎖の構造を変化させることが想定される。反応サイクル[2]に依存した構造変化を取り入れた高分子鎖モデルを構成して、反応が構造を介して反応頻度を与えるフィードバックの可能性を示す。

参考文献

- [1] M. Nakagawa, Y. Togashi, "An Analytical Framework for Studying Small-Number Effects in Catalytic Reaction Networks: A Probability Generating Function Approach to Chemical Master Equations", *Front. Physiol.* 7, 89 (2016).
- [2] Y. Togashi, V. Casagrande, "Spatiotemporal Patterns Enhanced by Intra- and Inter-molecular Fluctuations in Arrays of Allosterically Regulated Enzymes", *New J. Phys.* 17, 033024 (2015).

遺伝子発現リズムの細胞間位相同期の再構成

○磯村彰宏^{1,2,3} 小串典子^{1,4} 郡 宏^{1,4} 影山龍一郎^{1,3}

¹CREST 生命動態 ²JST さきがけ ³京大 ウイルス・再生研 ⁴お茶大 情報
aisomura@virus.kyoto-u.ac.jp

多細胞生物において遺伝子発現の細胞間相互作用はリガンドとレセプターによる送受信機能によって実現されるが、細胞がパルス振動などの動的状態を自分以外の細胞にどのように伝達しているのかは十分に明らかになっていない。例えばマウスの発生期の体節形成過程ではNotchシグナルが23時間周期で振動して細胞集団レベルで位相が同期していることが知られている。この同期現象の存在は、細胞が振動情報の送受信機能を備えており、細胞同士がお互いの位相情報を交換して自分の位相を合わせていることを示唆している。この情報伝達機構を明らかにするため、これまで遺伝子のノックアウトや阻害剤などを使った破壊実験によって位相同期に重要な生体分子の数々(必要条件)が探索・提案されてきた。しかし、細胞がそれらの生体分子を使って実際に動的情報を隣接細胞に伝達し、さらに周期や位相などの時間情報を解読できるのかどうかは十分明らかではない。

今回、Notchシグナルに関係する生体分子の振動ダイナミクスを光制御によって人工的に誘導・再構築し、同時に細胞の応答を1細胞イメージングによって定量計測を行った。遺伝子発現の振動情報が細胞間で送信・解読されるための情報処理機構の解明を試みた結果について発表する。

椎骨の外形状に対する外力依存的な3次元形態形成モデル

東純平¹ 川本敦史² 野村壮史² 松森唯益² ○近藤滋¹

¹大阪大学 ²豊田中央研究所
junpeast@fbs.osaka-u.ac.jp

骨には皮質骨と海綿骨の2種類が存在する。大腿骨の関節部では海綿骨による骨梁構造が3次元の複雑な形状として見られる。この骨梁構造が応力線に沿っていることから骨の内部構造が外力に対し最適化されているのではないかという議論がされてきた。この問題に対し、骨芽細胞と破骨細胞の生理学的な反応をモデル化し計算することで骨梁構造のような形状が得られることが知られている[1]。骨の内部構造のみではなく、外形状もまた骨芽細胞や破骨細胞によって造られる。それならば、骨の外形状も同じような計算モデルで再現することができるのではないかというのが我々の関心である。

そこで我々はZebrafishの椎骨の形態変化を観察し、それをもとに椎骨の外形状の成長についてシミュレーションを行った。Zebrafishの稚魚では椎骨は脊索を包む単純な円筒型である。成長とともに円筒の縁は放射状に付け加わり、同時に椎体の側面には梁構造が出現する。この梁構造には個体差や左右差があり、我々はこの梁の形状が力に依存しているのではないかと考えた。そこで、実際に円筒の縁が伸び椎体同士の関節部に圧がかかっている条件について骨芽細胞と破骨細胞の反応について計算モデルを構築した。この計算によってZebrafishのみられるような椎体の側面にみられるような梁構造が再現できた。また、パラメータを変えることで他の魚類の椎体で見られるような梁構造のパターンを再現することもできた。この計算モデルによって、魚類の生体内において椎骨の形態がModeling、Remodeling、Growthの反応によりどのように外力依存的に形成されているのかを検討することが可能となった。

参考文献

[1] R HUISKES. If bone is the answer, then what is the question? Journal of Anatomy, 2000.

マウス気管多繊毛上皮細胞の繊毛基底小体の整列原理への 長時間高解像度ライブイメージングシステムによるアプローチ Basal bodies of airway multiciliated cells align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton

○加納初穂^{1,2} Elisa Herawati¹ 小西聡史¹ 立石和博¹ 矢野智樹¹ 千葉秀平¹
田村淳¹ 月田早智子¹

¹ 大阪大学生命機能研究科・医学研究科 ² 京都大学生命科学研究科

h-kanoh@biosci.med.osaka-u.ac.jp

気管多繊毛上皮細胞シートでは、アピカル面で多数の繊毛が協調運動をすることで、肺から口側に向かう粘液流が起こる。繊毛の根元には基底小体 (Basal Body : BB) と Basal foot (Basal foot : BF) が存在し、BFがBBに対して口側に配置するようにBBの方向性が揃うことが知られている。このようなBBの一方方向性と平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity : PCP) との関連についての研究は盛んであるが、BB自体が整列することはあまり注目されていない。本研究では、BBが細胞内において、規則正しく整列していくメカニズムとその生物学的重要性を明らかにすることを旨とし、初代培養でのマウス気管上皮細胞 (mouse trachea epithelial cells : MTEC) を用いたライブイメージング法を開発した。

1. 約200nmに近接するBBを分解する高解像性、2. 5日間という長時間に及びBB整列過程を記録する、光毒性・蛍光退色を最小限に抑えたシステム、3. 細胞分化のためフィルターを用いた特殊な培養状態を要するMTECに最適化した、新しいサンプルのセットアップ法、このことにより、BBのダイナミクスを高分解能・長時間記録することが可能になり、整列過程のモデリング結果との検討から、BB配列構築原理にアプローチすることができた。さらに整列過程における多繊毛上皮細胞アピカル側に特有の細胞骨格配列を、蛍光抗体顕微鏡、超高圧電子顕微鏡トモグラフィーにより明らかにすることが可能になり、BB整列機構における細胞骨格の役割について検討をすることができた。

また、BBの方向性と整列過程の相関を解析するため現在検討中の、複数チャンネルのライブイメージングについても議論を進める。

Herawati, E., Taniguchi D., Kanoh H., Tateishi K., Ishihara S., Tsukita S. Multiciliated cell basal bodies align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 214, 571–586 (2016).

マウス胚におけるノード特異的なダイニン腕の構築機構

○井手隆広¹ Wang Twan^{1,2} Nicole Henninger² 白鳥秀卓² 濱田博司^{1,2}

¹ 理研 CDB 個体パターンニング研究チーム ² 大阪大学大学院生命機能研究科

takahiro.ide@riken.jp

マウス胚における左右軸形成は、発生初期に一時的に形成される「ノード」で決定する。ノードの細胞には長さ2~5μmのノード繊毛が1本ずつ生えており、それらが時計回りの回転をすることで水流が発生し、左側特異的な遺伝子の発現を誘導する。この回転運動は、気管や卵管、精子の繊毛・鞭毛の運動と比較して非常にユニークであり、繊毛の内部構造の違いが関与している。この内部構造の違いは、どのような仕組みで起こるのか？ 私たちは、*Cfap53/CCDC11* (flagellar associated protein 53; Coiled-Coil Domain-Containing Protein 11) に注目している。*Cfap53*は、ヒトにおいて内臓位置異常や先天性心疾患を引き起こす遺伝子として同定され、単細胞緑藻からヒトまで保存されている。

*Cfap53*の発現パターン解析により、*Cfap53*は初期胚のノード、成体の気管・脳室・卵管など運動性繊毛を持つ細胞で発現していることが分かった。また、*Cfap53*のノックアウトマウスを作製したところ、水頭症や内臓逆位が観察された。さらにCFAP53-Venusを発現するトランスジェニックマウスの作製により、CFAP53-Venusは繊毛内に局在することが明らかになった。これらの結果は、他の「繊毛病(Ciliopathy)」を引き起こす遺伝子と同様であり、*Cfap53*は繊毛関連遺伝子であることが強く示唆された。

興味深いことに*Cfap53*ノックアウトマウスでは、ノードの繊毛運動が完全に失われるのに対し、気管上皮細胞や脳室の繊毛運動は失われていない。電子顕微鏡と間接蛍光抗体法による観察により、ノックアウトマウスのノード繊毛では繊毛運動の原動力となる外腕ダイニンが構築されないことが明らかになった。一方でノックアウトマウスの気管上皮細胞の繊毛には外腕ダイニン重鎖DNAH5が構築されていた。この結果、ノード繊毛と気管上皮繊毛では外腕ダイニン構築仕組みに違いがあることが示唆され、その仕組みには*Cfap53*が強く関与していることが明らかになった。

「リンケージ・ロジック」理論の実験的検証：ホヤ胚の遺伝子制御ネットワークへの適用

○小林健司¹ 前田一貴^{2,3} 徳岡三紀¹ 望月敦史² 佐藤ゆたか¹

¹ 京都大・院理・生物科学・動物発生学研究室 ² 理研・望月理論生物学研究室

³ 関西学院大・理工・数理科学科

kobaken@ascidian.zool.kyoto-u.ac.jp

海産無脊椎の脊索動物であるホヤを用い、胚発生過程における遺伝子制御ネットワーク(GRNs)の研究を進めてきた。現在までに明らかにされているGRNsはホヤのオタマジャクシ幼生の各組織の細胞分化についてよく説明することができる。しかしながら、一般的に、制御ネットワークの構造とそれが作り出すダイナミクスとの関係についてはほとんど分かっていない。リンケージ・ロジック(LL)はネットワークの構造とそのダイナミクスとを直接的に連結する新しい構造理論である。LLによると、ネットワークにより作り出される定常状態はFeedback vertex set(FVS)と呼ばれる少数の因子のセットにより決定される。

80遺伝子からなるホヤ胚のGRNsにLLを適用したところ、最小のFVSの遺伝子数は5つであった。LLによるとFVSのみでネットワーク全体のダイナミクスが規定される。そこで、5つのFVS遺伝子(*Foxa.a*, *Foxd*, *Neurogenin*, *Zic-r.b*, *Fgf9/16/20*)を選び、これらを実験的に操作した。細胞質分裂を阻害した多核1細胞期胚を用い、7つの主要な幼生組織の分化についてqRT-PCRを用いて調べた。全て($2^5 = 32$ 通り)のFVS遺伝子のオンオフの組み合わせについて調べた結果、7つの内の6つの組織の分化を引き起こすことができた。この結果はLLがGRNsの実験的な操作とダイナミクスの理解において有用であることを示している。

Imai et al., *Science* 312: 1183-1187 (2006)

Satou & Imai, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 91: 33-51 (2015)

Mochizuki & Saito, *J. Theor. Biol.* 266, 323-335 (2010)

Fiedler et al., *J. Dyn. Diff. Equat.* 25, 563-604 (2013)

Mochizuki et al., *J. Theor. Biol.* 335, 130-146 (2013)

Role of 3'UTR methylation of a clock-related kinase transcript on the regulation of the circadian rhythms

○Kakeru Itoh¹ Jean-Michel Fustin¹ Asami Oji² Saki Nishioka²
Masahito Ikawa² Hitoshi Okamura¹

¹Department of Systems Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

²Animal Resource Center for Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

ito.kakeru.24e@st.kyoto-u.ac.jp

The methylation at the N-6 position of adenosine nucleotides in the 3'-UTR of messenger RNA is widespread in the transcriptome yet specific to a subset of genes, for which the exact function of this epitranscriptomic modification is unknown. We have identified m6A sites within transcripts involved in the molecular oscillator of the circadian clock, but the specific role of these sites in the control of the circadian clock is unknown.

Here, we show that the 3'-UTR of an mRNA coding for a kinase essential for the circadian clock function, as well as for the control of cellular metabolism, has one of the highest methylation levels among clock-related transcripts. In a novel approach in m6A research, we specifically blunted the methylation levels of this transcript in vivo by CRISPR-Cas9-mediated deletion of a 43 nucleotides segment of the 3'-UTR. This non-coding mutation was sufficient to cause a change in the circadian behaviour of the animal: the period of the locomotor activity rhythm became longer. This phenotype was associated with an increase in the expression of this kinase.

DNA マイクロカプセルによる人工細胞構築

○ 瀧ノ上正浩¹¹ 東京工業大学 情報理工学
takinoue@c.titech.ac.jp

近年、細胞のような自律的に機能を発現するシステムである「人工細胞」の構築が進んでいる[1]。人工細胞の研究では、生体分子等を用いてボトムアップ的に細胞ライクなシステムを創ることを目指しており、生命の起源や原始生命の研究とともに、物質が物理法則・化学法則の下で実現できる、自律的な自己組織化システムの可能性や限界を探ることができる。実在する生細胞を細胞生物学的・生化学的に詳細に調べて、そのメカニズムを探索する分析的な手法と相補的な関係にある手法である。このような研究では、細胞サイズの微小な機能性膜カプセルを構築することが必要とされるが、そのためのマイクロ/ナノテクノロジーは未だ発展途上の段階にある。

本発表では、近年、我々のグループで実現した人工細胞構築のためのDNAナノ/マイクロテクノロジー[2]に関して報告し、人工細胞構築に利用されるソフトマター（リポソーム[3]、マイクロエマルジョン[4]、ハイドロゲル、DNA[2]等）を操作するマイクロ流体技術について説明する。特に、マイクロ液滴界面でのDNAの自己組織化を利用したマイクロカプセルの生成の原理の解明と人工細胞構築の応用について発表する。このような研究は、人工細胞の構築に留まらず、微小なスケールにおける物理学・化学・生命科学の研究や開発にも応用でき、汎用的な知見や応用技術が得られると考えている。

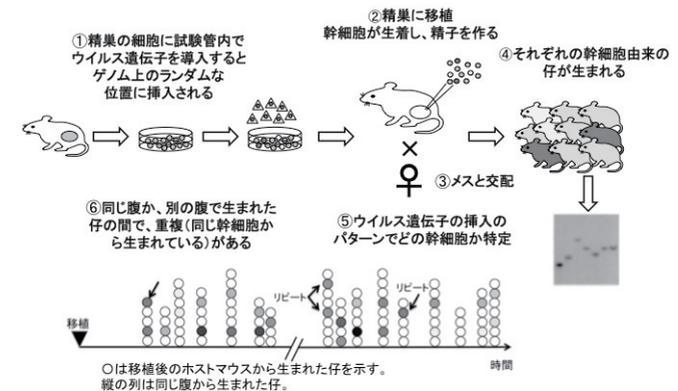
[1] M. Takinoue, S. Takeuchi, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1705 (2011).[2] D. Ishikawa, Y. Suzuki, C. Kurokawa, M. Ohara, M. Morita, M. Yanagisawa, R. Kawano, M. Endo, M. Takinoue, *Proc. microTAS*, 116-117, (2016).[3] M. Morita, H. Onoe, M. Yanagisawa, H. Ito, M. Ichikawa, K. Fujiwara, H. Saito, M. Takinoue, *ChemBioChem* 16, 2029 (2015).[4] H. Sugiura, M. Ito, T. Okuaki, Y. Mori, H. Kitahata, M. Takinoue, *Nature Commun.* 7, 10212 (2016).

精子幹細胞の寿命と精子形成への寄与の動態

○ 篠原美都^{1,2} 本田直樹³ 篠原隆司¹¹ 京都大学大学院医学研究科・遺伝医学講座・分子遺伝学分野 ² PRESTO³ 京都大学大学院医学研究科・生命動態システム科学推進拠点

mshinoha@virus.kyoto-u.ac.jp

精子形成の源である精子幹細胞は、一生にわたって分裂し、毎日膨大な数の精子を作り続ける。幹細胞は精巣に多数あり、精子は複数の幹細胞から産生されるが、個々の幹細胞がその構成にどのように寄与しているかは不明であった。今回、我々の研究グループは、マウスの精子幹細胞にウイルス遺伝子を導入して特異的に標識したのち精巣に移植し、ホストマウスから生まれるそれぞれの仔がどの幹細胞から生まれているかを長期にわたって調べた。本発表では産仔のゲノムDNAをサザンブロットングにて調べ、同一の幹細胞から仔が生まれる頻度や間隔を数理解析して明らかになった、精子幹細胞の精子形成活性の周期性について紹介する。



参考文献

Kanatsu-Shinohara M., Naoki H., Shinohara T. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. *Dev Cell* 38 (3): 248-61 (2016)

発生場の変形に伴う体液動態と分泌蛋白質の分布

○猪股秀彦¹ 新實香緒里¹ 若林真樹²

¹ 理化学研究所 多細胞システム形成研究センター (CDB) 体軸動態研究チーム

² 京都大学 大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野

hideino@cdb.riken.jp

発生過程において、胚は複雑な組織パターンを再現性よく形成する。このようなパターン形成に寄与する制御システムは複数存在するが、モルフォゲン濃度勾配もその一つである。胚の局所から産生・分泌されたモルフォゲンは、細胞間隙を拡散し濃度勾配を形成する。その結果、胚を構成する細胞はモルフォゲンの濃度依存的に異なる細胞へと分化し、組織パターンを構築する。従って、モルフォゲン濃度勾配は胚に空間情報を付与する働きをもつ。また、濃度勾配依存的なパターン形成は、様々な擾乱に対して頑強性を有することが知られている。例えば、アフリカツメガエル胚を人為的に半割(胚サイズの縮小)にすると、胚のサイズに応じて濃度勾配の形状が再構築され、相似形を保った胚が発生する(スケーリング)^(a)。このように、発生過程におけるモルフォゲン濃度勾配の生理的機能に関しては多くの知見が得られている。

しかし、モルフォゲンが溶解している細胞外体液の動態に関しては不明な点が多い。発生過程における体液動態の機能として、繊毛の回転運動が作り出すノード流が左右軸決定に重要な役割を果たしていることが知られている^(b)。また、心拍によって駆動される血流は、複雑な血管網の形成に寄与する^(c)。このように、繊毛・心臓などの特殊な器官が作り出す体液の動態に関しては多くの知見が得られている。一方、発生過程において胚は変形することが知られているが、このような発生場の変形が細胞外体液にどのような影響を与えるか知られていない。

本研究では、発生場の変形によって駆動される細胞外体液の動態に注目して研究を行っている。タイムラプスイメージングの解析結果から、発生場の変形が細胞外体液に一方方向の流れを駆動することが明らかとなった。また、この流れはモルフォゲン分子の分布にも大きな影響を与え、発生過程におけるパターン形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

(a) Inomata H, et al. (2013) Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals. *Cell* 153(6):1296-1311

(b) Okada Y, et al. (2005) Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121(4):633-644

(c) Yashiro K, et al. (2007) Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch. *Nature* 450(8):285-289

Parvalbumin-positive interneurons regulate spatio-temporal network dynamics for population coding in mouse primary visual cortex

○MASAKAZU AGETSUMA^{1,2,3} J. HAMM³ I. SATO⁴ R. YUSTE³

¹The Inst. of Scientific and Industrial Research, Nagai lab, Osaka Univ., Ibaraki, Japan; ²Presto, Japan Sci. and Technol. Agency, Kawaguchi, Japan; ³Biol. Sci., Columbia Univ., New York, NY; ⁴Dept. of Complexity Sci. and Engineering, Grad. Sch. of Frontier Sciences,, The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan

ms9@sanken.osaka-u.ac.jp

For efficient information processing in the brain, neural circuit dynamics must be spatially and temporally regulated with great precision. Although parvalbumin-positive (PV) interneurons are known to control network synchrony, how their activity contributes to spatio-temporal activity patterns remains unclear. We investigated this using *in vivo* two-photon Ca²⁺ imaging from populations of neurons in mouse visual cortex with simultaneous optogenetic inactivation of PV cells. As expected, network synchrony in visual cortex was locally sustained by PV interneurons. But interestingly, the reliability of multineuronal activity during visual stimulation was specifically disrupted by PV-cell suppression. Machine-learning based decoding confirmed the importance of PV cells in population coding, and further correlation analyses suggested the link between distance-dependent regulation of network synchrony by PV cells and the underlying computation. Our study indicates that interneurons can control the spatio-temporal dynamics of cortical information, and therefore are critical for building a population code.

Species-specific mechanisms of neuron subtype specification reveal evolutionary plasticity of amniote brain development

○Tadashi Nomura¹ Wataru Yamashita¹ Hitoshi Gotoh¹ Katsuhiko Ono¹

¹Developmental Neurobiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto
tadnom@koto.kpu-m.ac.jp

Highly ordered brain architectures in vertebrates consist of multiple neuron subtypes with specific neuronal connection. However, the origin and evolutionary changes in the regulatory mechanisms of neuronal specification remain unclear. Here we report divergent mechanisms of neuron subtype specification in the developing reptilian and avian brains. In the mammalian neocortex, transcription factors (TFs) *Ctip2* and *Satb2* are differentially expressed in layer-specific neurons, while these TFs are simultaneously expressed in reptilian and avian neurons. We demonstrate species-specific dependency in fate restrictions of progenitors and the activity of *cis*-regulatory elements on *Ctip2* locus, which account for unique expression patterns of TFs in reptilian and avian brains. Furthermore, we identified that expression patterns of TFs and neuronal connections are not strictly conserved among amniotes. Our findings suggest that regulatory mechanisms of neuronal specification were not tightly associated with specific neuronal characters in ancestral amniotes, and the establishment of mammalian-specific regulatory elements provided novel neuronal subtypes during neocortical evolution.

[References]

Nomura et al. Changes in the regulation of neurogenesis contribute to encephalization during amniote brain evolution. *Nature Communications* 4 2206 (2013).
Nomura et al. The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development* 143, 66-74, (2016).

ナノスケール力学刺激による動物個体の記憶・学習機構の解析

○杉拓磨¹

¹滋賀医科大学 神経難病研究センター
tsugi@belle.shiga-med.ac.jp

力学的刺激は、動物個体のメタボリズムや発生などの生理機能に大きな影響を及ぼす。したがって、この力学的刺激を効率よく処理する1つの戦略として、動物個体は過去の刺激を記憶し、その行動を変化させることで自らの生存の確率を高める。これまで、我々は、シンプルなモデル動物として知られる線虫 *C. elegans* を用いて、力学的刺激の1つである振動刺激への応答行動と可塑的な変化(記憶)の機構を明らかにすることを目指してきた。しかしながら、一般的な力学刺激方法では、力学刺激そのものの振動特性を精密に制御できない、つまり、動物個体に与える力学刺激の振動特性を定量的に振れないという問題があった。

本研究では、この問題を解決するため、ピエゾスピーカーシステムを用い、自由にナノスケールの変位を持つ振動刺激を制御し、線虫 *C. elegans* の応答行動と記憶を定量化するシステムを実現した。本方法はナノスケールの力学刺激方法であるにも関わらず、その開発費はわずか2万円という極めて安価なシステムであり、多くのラボで容易に複製することが見込める。現在、本方法を用い、1) どのような力学刺激が動物個体のどのような応答行動とその記憶を導くのかを明らかにすること、また、2) 自由行動中の線虫 *C. elegans* における1神経細胞レベルの活性検出装置への組み込みを試みている。本発表では、これらの研究についても紹介したい。

参考文献

Sugi T* et al. PNAS, 2014
Sugi T* et al. Anal Sci, 2016

Inference of Regulatory Network from Expression Data

○ Prabhat Shankar¹ Hitoshi Niwa² Tatsuo Shibata¹

¹RIKEN QBIC, Kobe ²Kumamoto University

pshankar@cdb.riken.jp

The pluripotent state of the ES cells is regulated by a number of signaling molecules and transcription factors. The interactions among these factors are not properly understood. In this work, we develop an algorithm to reverse engineer transcription regulatory network in terms of a Boolean network using steady state gene expression profile data. We apply this algorithm to the system of mouse pluripotent ES cells, and obtain a set of candidate networks underlying pluripotency maintenance. Subsequently, we studied the dynamical properties including the fixed point and limit cycle attractors of these networks. In the Boolean networks obtained, the pluripotent state has a large basin of attraction, implying robustness to perturbations in the expression profile. Our study reveals the core set of regulatory interactions which are implied in the maintaining the pluripotent state. Using our model, we also make predictions for the hitherto unknown experimental perturbations. We hope this study will yield some insight into the maintenance of pluripotency.