

図1 分節時計の超高感度イメージング

(a) 分節化の模式図。ゼブラフィッシュ胚の体節(矢じり)は未分節中胚葉から30分周期でつくり出される。未分節領域を構成するすべての細胞が時計遺伝子を振動発現している。

(b) 分節形成ごとくり返される転写因子Hairyの同調した転写サイクル。振動の位相状態は *hairy* mRNAの細胞内局在により、転写抑制(シグナルなし)、転写(核内でのドット状の検出)、翻訳(細胞質での検出)、という3つの状態に分けられる。未分節領域の細胞での転写サイクルは同調している。ピンク色で染色されているのは核。

とした遺伝子発現の周期的なON/OFFを検出することはそう簡単なことではない。遺伝子組換え動物の作出には多くの手間と時間を要するのにくわえて、生細胞イメージングには超高感度カメラなどの高級なデバイスを必要とするからである。ところが、転写・翻訳で駆動される振動体のリズムならば、実に簡単な方法で可視化することが可能である。それは、実験生物学者にはなじみの深い *in situ* ハイブリダイゼーション法である。この方法では、アンチセンスオリゴヌクレオチドをプローブとして特定の遺伝子のmRNAの分布パターンを判別できる。ただし、固定サンプルを用いるため、時間に関する情報の大部分は失われてしまう。よって、なんらかの工夫により時系列データを再構築する必要がある。通常の *in situ* ハイブリダイゼーション法では、mRNAの空間分布はOFFないしONの強弱とし

て検出されるが、ここから遺伝子発現の時間変化を再構築することは容易ではない。そこで、操作方法を工夫して高感度蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を行なうと振動状態を3つの位相に分離でき、時系列データの再構築が可能となる⁴⁾。時計遺伝子のひとつで自らの転写を抑制する転写因子をコードする *hairy* 遺伝子を例にすると、そのmRNAの細胞内局在は、検出されない、核内にドット状に検出される、細胞質に検出される、の3つの状態に分けられ、それぞれ、転写抑制因子Hairyによる自らの転写抑制状態、転写抑制が解除され核内で *hairy* mRNAが転写される状態、*hairy* mRNAが細胞質に移行し翻訳が可能になっている状態、に対応する(図1b)。遺伝子発現はセントラルドグマにしたがって進行するので、それぞれのスナップショットをこの順列で時系列データとして再構築できることが

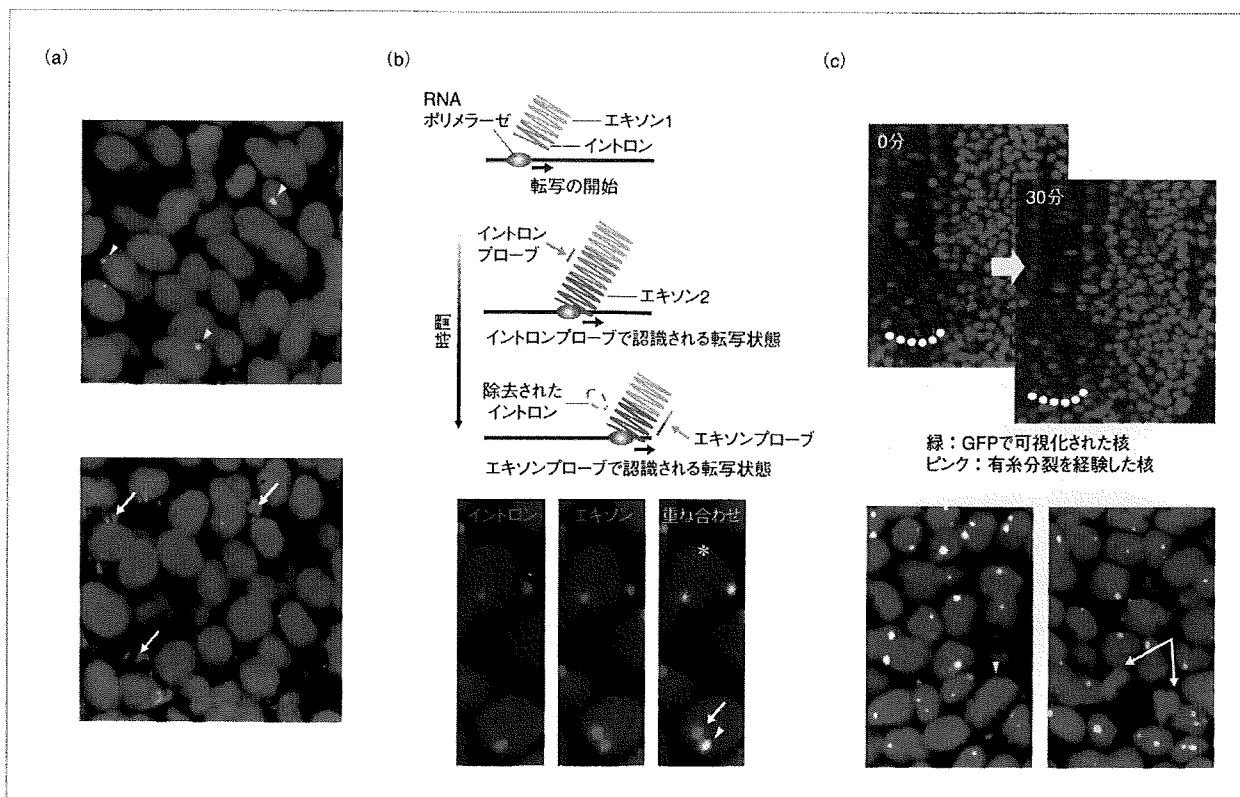


図2 分節時計の位相のずれ

(a) 転写が抑制された細胞集団に検出されたわずかに位相が進んだ細胞(矢じり, 核内のドット状シグナル)と位相が遅れた細胞(矢印, 細胞質のシグナル)。(b) 遺伝子座レベルでの転写のタイミングのずれ。イントロンおよびスプライシングののちに生じるエクソンを特異的に認識するプローブによるmRNAの検出。*で示された細胞ではイントロンプローブおよびエクソンプローブで二重陽性となるシグナルのあることから、両親に由来する2つの遺伝子座で転写中であることがわかる。別の細胞では、片方の遺伝子座からの転写はすでに終了しており(矢印, エクソンプローブでのみ陽性)、もう片方の遺伝子座からだけ転写が起こっている(矢じり, 両方のプローブで陽性)。(c) GFP融合ヒストンのタイムラプス観察で明らかになった有糸分裂を経験した核の分布パターン(上)。凝集中の染色体と有糸分裂を経験した核を疑似カラーで表示。時計遺伝子を転写中の細胞集団内においても、有糸分裂の前期(矢じり)や後期(矢印)の染色体では転写シグナルは検出されない(下)。

わかる。失われる情報がほとんどない生細胞イメージングが動画なら、この方法で得られる情報はパラバラ漫画かもしれない。しかし、その順列さえ再構成できれば、むしろ、エッセンスだけを抽出した有用な情報といえる。

この方法を用いることで、生物時計の刻む時間はどれくらい正確かを定量することができる。実は、ほとんどの生物時計はさまざまなノイズに対する感受性がとても高く、それほど安定に振動しているわけではない。振動をつくり出すのは遺伝子の転写、翻訳、または、活性修飾などの化学反応であるが、分子スケールでみるとこれらはすべて確率的な反応である。さらに、個体ごとの遺伝的な差異や環境要因なども含め、生物時計をとりまく環境は非常に“noisy”であることから、生物時計の振動がゆらぎやすいことは簡単に想像できるだろう⁵⁾。

分節時計の振動もノイズの影響をうけているのかを明らかにするため、約150個の細胞において振動子の位相状態、つまり、*hairy* mRNAの細胞内局在パターンを単一細胞の分解能でイメージングしたところ、位相状態にはばらつきがあり、集団としての同調性は約80%であることがわかった⁴⁾。図2にその一例を示す。*hairy* mRNAの転写状態が周囲よりも進んだり遅れたりする細胞が孤立して存在することは、細胞ごとに振動パターンがわずかに異なることを意味している(図2a)。また、こうした細胞間での位相のずれにくわえて、細胞内においても別の“ずれ”、つまり、遺伝子座レベルで転写のタイミングが異なっているようすも観察された(図2b)。これらはいずれも化学反応の確率的な性質を反映したものと考えられるが、発生中にはもっと厄介なノイズの存在することがわかった。それは、細胞増殖

である。同調振動領域での細胞分裂パターンをくわしく調べたところ、30分という1回の分節周期のあいだだけでも約15%という、まったく予想しなかったほどたくさんの細胞が有糸分裂を経験しており(図2c)、有糸分裂の完了には平均15分も要していることがわかった⁴⁾。これは、時計遺伝子の正確な振動にとっては危機的な状況である。なぜならば、分裂期にはほとんどの遺伝子の転写や翻訳が止まることが知られているからである⁶⁾。30分という振動周期のなかで15分のあいだ“振動を駆動する化学反応”が止まるなら、振動パターンに大きな影響をあたえるはずである。実際、時計細胞集団のなかには位相のずれを共有するペアが見つかり⁴⁾、有糸分裂中の凝縮したクロマチンには *hairy* 遺伝子の転写シグナルは観察されない(図2c)。これらの結果から、生体内で分節時計が刻むリズムは化学反応の確率性や細胞増殖などの影響を受け、細胞周期や位相にずれが生じていることがわかった。

2. 振動子間相互作用による位相の同期

ノイズの影響で時計細胞集団における振動の同調性が脅かされる一方、実際の時計細胞集団では全体として約80%の同調性が保たれていた⁴⁾。これは、分節時計が位相のずれを補正している可能性を強く示唆している。分節時計にかぎらず、生体システムはすべからずノイズと切り離すことのできない存在であり、システムパフォーマンスを安定化させるための戦略が要求される。現在、多くの研究者がこうした問題の解明に取り組んでいるが、筆者らも分節時計の安定化戦略の解析を行なった。その結果、時計細胞間で機能する Notch シグナルがノイズの影響を緩和するために中心的な役割を担っていることがわかった。

一般に、互いの位相を補正できるような振動子系は、相互作用依存的に同調することができる。現象としての同調の最初の記載は、300年以上も前のホイヘンスによる振り子

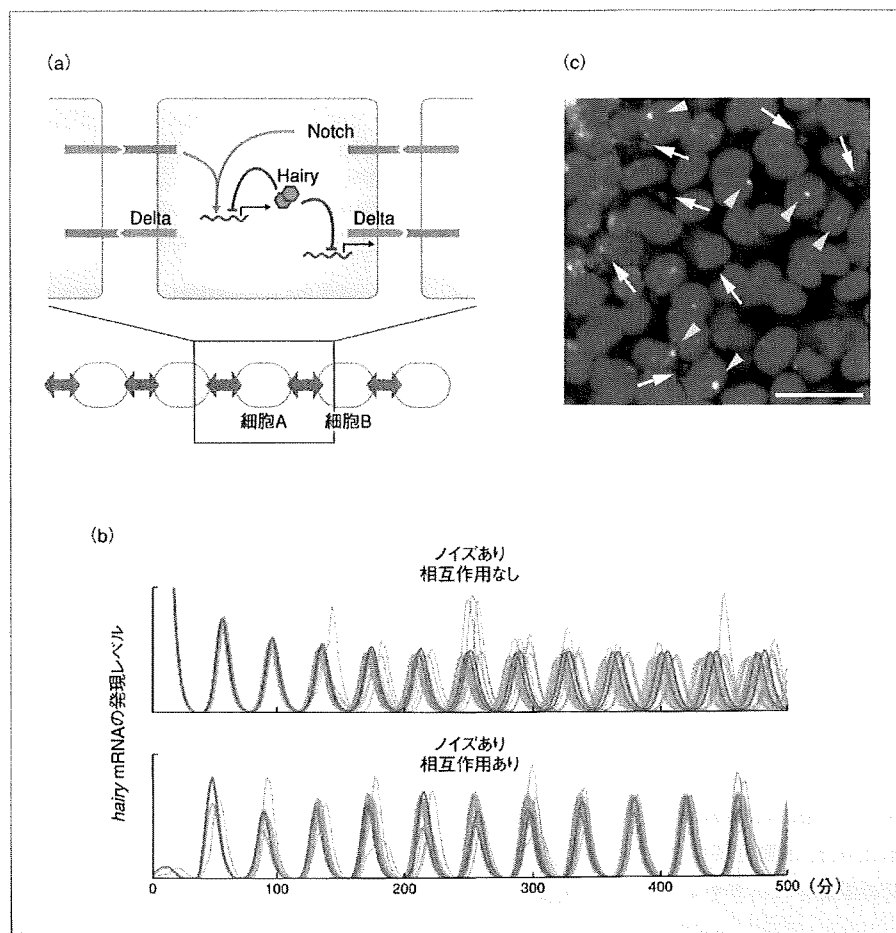


図3 振動子間相互作用を介したリズムの同調

(a) 分節時計の振動子間相互作用における遺伝子ネットワーク構造。Hairyは自らの転写を抑制することで周期的に発現する(青)。Deltaの発現もHairyに制御されているので振動する(緑)。Deltaにより活性化されたNotchの細胞内ドメインは核内に移行し、*hairy* 遺伝子の転写を活性化する(ピンク)。

(b) (a)の遺伝子ネットワークにもとづいた固有の振動数がわずかに異なる細胞15個の振動シミュレーションの結果。振動子間に相互作用がない場合、集団の同調はノイズの影響によりすみやかに解消される(上)。振動子間に機能的相互作用のある場合、集団の同調性は維持される(下)。

(c) 振動子間相互作用シグナルであるNotchシグナルを一過的に阻害すると、細胞集団における時計遺伝子発現の同調性がなくなり、あらゆる位相状態の細胞が混在する。矢印：細胞質のシグナル、矢じり：核内のシグナル。スケールバー：20 μm 。

時計の同調までさかのぼり⁷⁾、身近な例としては、ホタルの集団発光やコンサート会場での拍手などがあげられる。分節時計の振動は *hairy* 遺伝子における転写の活性と抑制とのバランスの変化で駆動されているが、Delta-Notch 複合体を介した細胞間相互作用はこのバランスを変化させることで位相を補正することができる。単純化のために、細胞 A と細胞 B という2つの振動する細胞を例に考えてみたい(図3a)。細胞 A が細胞 B に対して Notch のリガンドである Delta を提示する。すると、細胞 B では Notch の細胞内ドメインが切断され核内に移行したあと、*hairy* 遺伝子の転写を活性化しようとする。このとき、細胞 B では *hairy* 遺伝子の活性化と抑制のバランスが変化するので、時計の進みが少しだけ変化する。細胞 B の位相の変化は、分節時計に制御される Delta の発現を変えることで細胞 A の位相を変化させ、再帰的に同じことがくり返される(図3a)。このように、互いに位相補正しようというシステムが時間発展のちどんな状態になるかを直感的に理解することはむずかしいが、多くの細胞結合振動子系と同様、同調する可能性が考えられた。実際に Notch シグナルを介して位相を補正し同調性を保っている可能性を、シミュレーションと実験の両方で検討するため、つぎのような検証を行なった。まず、ノイズの影響を考慮した確率モデルで集団の振動パターンを計算すると、相互作用なしでは振動の同調性はあつというまに失われることが予測された(図3b)。同様のことを生体内でも検討するため、いちど同調振動が確立したあと阻害剤を使って Notch シグナルを一過的に切断した。すると、数サイクル後の細胞集団ではさまざまな位相状態の細胞が混在することから、同調振動を維持するには Notch シグナルによる細胞間カップリングが必須であることがわか

った(図3c)。振動子1個の分解能で100個をこえる振動子の位相分布をシステムティックに計測することで、分節時計がもつマイクロレベルでのノイズ感受性とマクロレベルでのノイズ解消機構とが明らかとなった。

II 超高感度大規模 Ca²⁺イメージング

動的遺伝子ネットワークを研究する場合、生細胞イメージングが最適な手法であることに疑いの余地はない。いまだ簡単ではないと紹介したこの技術も、いくつかの重要なポイントをおさえさえすれば、さまざまな現象に適用が可能である。ここでは、細胞結合振動子ネットワークの自発的な活動を最大10万個の細胞集団でも同時に計測することを可能にする、超高感度大規模 Ca²⁺イメージング法を紹介する。

1. 超高感度 Ca²⁺指示薬の開発

Ca²⁺はシグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーのひとつであり、その濃度変化は神経や筋肉などの興奮性細胞の発火にとどまらず、さまざまな細胞における生理活動をひき起こす。Ca²⁺イメージングには、Fura2などの小分子化合物性指示薬と遺伝子にコードされた指示薬の2種類が用いられる。Cameleonは遺伝子にコードされた Ca²⁺指示薬のひとつで、センサー部分であるカルモジュリン-M13 (CaM-M13) 融合ペプチドがCFPとYFPの2つの蛍光蛋白質にはさまれた構造をもつ^{8,9)}。CaM-M13融合ペプチドに Ca²⁺が結合すると、Cameleonはその立体構造を大きく変化させるが、このとき、CFP-YFP間のFRET量が変化する。FRETとは、それぞれエネルギーの供与体および受容体で

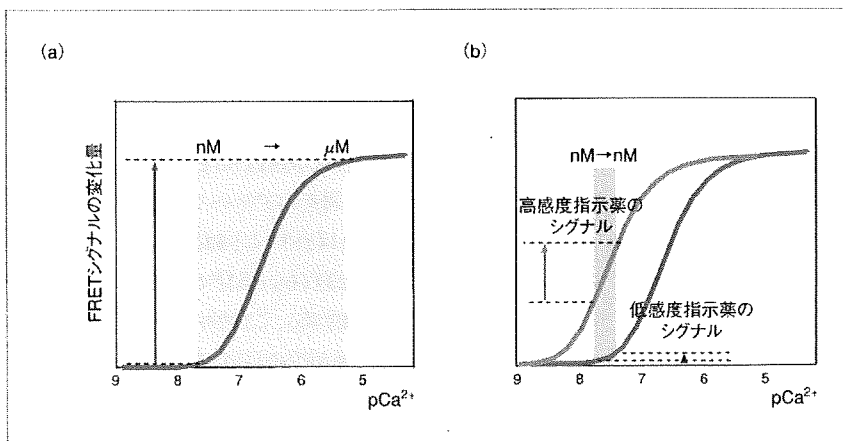


図4 Ca²⁺指示薬の感度と *in vivo* での Ca²⁺濃度変動レンジの関係

FRETシグナルの変化量をCa²⁺濃度の関数としてプロット。

(a) 人為的刺激へのCa²⁺濃度変動レンジ。人為的刺激に対しては細胞内Ca²⁺濃度はnMからμMまで大きく変動するので、既存の指示薬でもシグナル変化として十分に検出できる。

(b) 自発活動でのCa²⁺濃度変動レンジ。生理的条件下での刺激や自発活動に対しては細胞内Ca²⁺濃度はnMレンジの微小変化にとどまるので、従来の指示薬では微小なCa²⁺濃度変動は検出が困難である(青)。新たに開発した超高感度指示薬(ピンク)なら十分に大きなシグナル変化として検出が可能である。

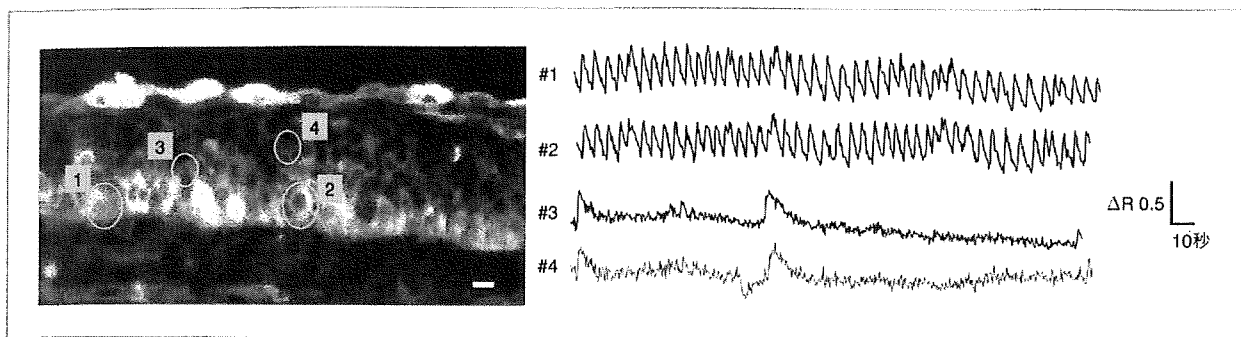


図5 超高感度指示薬により検出されたゼブラフィッシュ胚における神経細胞の自発的活動パターン

微弱なCa²⁺発火を最大200個の神経細胞から、同時に、1 Hzで数時間、記録することができる。スケールバー：20 μm。

あるCFPとYFPのあいだで起こるエネルギー移動のことで、FRET量（簡単には、CFPとYFPの蛍光量の比率）を計測することでCa²⁺濃度やその変化を知ることができる。小分子化合物性指示薬が非常に簡単に使えるという利点をもつものに対し、遺伝子にコードされた指示薬には、細胞内ならどのコンパートメントでも、また、多細胞ネットワーク内なら特定の回路だけに自由に局在化させることができ、かつ、持続的な計測が可能である、という小分子化合物性指示薬にはないメリットがある。さらに、Cameleon (YC3.60) はシグナル変化量がずばぬけて大きいという特長をもつため⁹⁾、これを細胞結合振動子システムにおけるネットワーク活動の計測に利用しない手はない。培養細胞でのイメージングは枚挙にいとまがないほど報告されているので簡単かと思いきや、*in vivo*での成功例となるとその数は大きく減る。さらに、ネットワークダイナミクスを研究するには、人為的な刺激への応答ではなく自発的な活動パターンを計測する必要があるのだが、その検出例は数えるほどしかなかった。その原因を探るべく試行錯誤を重ねた結果、自発活動時におけるCa²⁺濃度の変動レンジが指示薬の感度レンジと大きく乖離していることがわかった。

一般に、細胞内のCa²⁺濃度は50 nM以下といわれ、これが人為的な刺激応答時にはμMオーダーまで上昇する。こうした大きなCa²⁺濃度の変動は、YC3.60など既存のCa²⁺指示薬を用いることで大きなFRETシグナル変化として検出できる(図4)。一方で、神経ネットワークをはじめとする*in vivo*細胞結合振動子システムにおける自発活動時のFRETシグナルの変化は、仮に得られたとしても微々たるものだった。つまり、*in vivo*での自発活動時に起こる細胞内のCa²⁺濃度変動はnMレンジにおいてほんのわずかしが変化していないと推測された。事実、多くの自発的な細

胞活動はOregon greenBAPTA488などの比較的高感度のCa²⁺指示薬で報告されることが多いこともこの仮説を支持していた。では、どうすればよいか？ 微弱なCa²⁺濃度の変動を効率よく検出するには、指示薬の検出感度を上げること以外に方法はない(図4)。そこで、筆者らは*in vivo*における細胞の自発活動にともなう微弱なCa²⁺濃度変化を検出できる程度にCameleonのCa²⁺親和性を向上させるべく、センサー部分に改良を施した。その結果、K_a=100 nMをこえていた既存のCa²⁺親和性を最大K_a=20 nMにまで段階的に上昇させることができた(筆者ら：論文準備中)。*in vivo*生細胞イメージングにおける効果はてきめん、これまで遺伝子にコードされた指示薬でのイメージングがほとんどうまくいっていなかった細胞性粘菌やゼブラフィッシュの神経ネットワークなど、さまざまな対象での自発活動にともなうCa²⁺濃度の変動をロバストに計測することができている(図5)。

2. 大規模ライブイメージング

社会性アメーバ(*Dictyostelium Discoïdum*)はその体制を単細胞相から多細胞相へと切り替えることのできる興味深い生物である。1万個~10万個の細胞からなる多細胞体を形成するため、その移行過程では、ミリメートルからセンチメートル四方に散在する細胞が自己組織的に走化性による集合流を形成する。個々のアメーバは走化性物質であるcAMPの濃度が高いほうへと向かって遊走するが、cAMPに反応した細胞は自らもcAMPを合成・放出し新たなcAMP濃度勾配を形成する。このサイクルがくり返されることで脈動的な集合流が生み出されるのだが、そのメカニズムはシグナル伝達の観点だけではなく、数理研究の対象としても注目されている。集合流の形成機構の理解を目

的とした従来のイメージングは暗視野照明像の時間差分強調処理による間接的な手法で行なわれてきたが、この方法では細胞ひとつひとつの情報は平均化されてしまい、単一細胞の情報を得ることができなかった。しかし、今回、開発したCa²⁺指示薬なら、1細胞の分解能で走化性シグナルへの細胞応答を直接に検出できる。この方法がどれくらいの時空間スケールにまで拡張できるか調べたところ、最大で10万個の細胞を同時に視野におさめられる空間スケールでのイメージングが可能で、走化性シグナルの空間パターンを長時間にわたって計測することができることがわかった。

社会性アメーバの自己組織的な集合流形成については、シグナル伝達機構など多くのことが理解されているにもかかわらず、集合をトリガーする最初のイベントがなんであるかというもっとも重要な問題が明らかになっていない。集合流形成は走化性シグナルのリレーにはほかならないので、集合を開始するためには集団内の細胞のいずれかが自発的に走化性物質を放出しなくてはならない。これは、1細胞のスケールで起こる非常に稀なイベントであると考えられるので、集団の情報を平均化してしまう既存のイメージング法や、少数の細胞にだけフォーカスしたようなイメージングでの検出は期待できない。しかし、筆者らの開発したCa²⁺イメージング法なら話は別で、長年の謎とされてきた集合をトリガーする走化性物質の自発的放出だけでなく、その時空間パターン変化を計測できるようになった。1細胞の分解能をもつ大規模イメージングがいかに有効であることを示す格好の例である。

おわりに

あらゆる遺伝子ネットワークは観測のスケールに応じて2つの相反する姿をみせる。つまり、マクロスケールでのアウトプットは往々にして安定である一方で、ミクロスケールでのダイナミクスはノイズの影響をうけるので不安定である。すべての生化学反応は確率的なプロセスであるし(反応

ゆらぎ、熱ゆらぎ)、ときには関与する分子数の離散性が顕在化する(分子数ゆらぎ)ので、ノイズの影響はさけられないからである。したがって、遺伝子ネットワークが高い信頼性をもって機能するには、ノイズに対するなんらかの対応機構が存在しなくてはならない。その機構を理解するには、ノイズの影響やその解消機構といった“隠れた姿”を可視化しなくてはならないが、ミクロとマクロの両方の空間的階層をまたぐ単一細胞レベルの分解能を備えた大規模イメージングはこうした問題にアプローチするほぼ唯一の有効な手段といえよう。こうした研究により、長い進化の過程で洗練されたさまざまな遺伝子ネットワークにねむる隠れた姿が少しずつと明らかになることが期待される。

分節時計の研究は東京大学の武田洋幸教授と大阪大学の近藤 滋教授との共同研究である。関係者に深く感謝します。

文 献

- 1) Cooke, J., Zeeman, E.C.: *J. Theor. Biol.*, 58, 455-476 (1976)
- 2) Pourquie, O.: *Science*, 301, 328-330 (2003)
- 3) Masamizu, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1313-1318 (2006)
- 4) Horikawa, K. et al.: *Nature*, 441, 719-723 (2006)
- 5) Raser, J. M., O'Shea, E. K.: *Science*, 309, 2010-2013 (2005)
- 6) Prescott, D. M., Bender, M. A.: *Exp. Cell Res.*, 26, 260-268 (1962)
- 7) Pikovsky, A., Rosenblum, M., Kurths, J.: in *Synchronization*, pp.357-361, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2001)
- 8) Miyawaki, A. et al.: *Nature*, 388, 882-887 (1997)
- 9) Nagai, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554-10559 (2004)

堀川一樹

略歴：2002年 京都大学大学院理学系研究科博士課程 修了，東京大学大学院理学系研究科 ポスドク，同 助手を経て，2006年より科学技術振興機構さきがけ 研究員および北海道大学電子科学研究所 特任准教授。

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header.

Main body of handwritten text, consisting of several lines of cursive script.

Handwritten text in the middle section of the page.

Handwritten text in the lower section of the page.

Handwritten text at the bottom of the page, possibly a signature or date.