

ア 研究の目的

個々の要素と全体の間のダイナミックな相互関係として生命システムを理解する「複雑系生命科学」を、構成的生物学実験と相互作用力学系理論をふまえて打ちあげていくのが目的である。

この 50 年、分子生物学は数々の成果をもたらし、それによって生命の各要素過程の詳細が次々と明らかにされている。それにより、生命現象の因果の連鎖をさかのぼり、それに関連する分子を見出し、重要な機能と関係する遺伝子を見出し、さらにはゲノム、プロテオームなど膨大なデータベースを作成していくことが求められている。その結果各要素を組合せた「機械的な」生命観に至っている。

しかし、実際は生物は、かなりコントロールした条件のもとでも機械的振る舞いからのずれをもたらすさまざまな不安定性を示し、以下のような性質を持っている。

- (i) 分子（遺伝子）の役割は多様であり、原因結果を一对一に求められない。
- (ii) さらに役割自体、その状況、たとえば発生過程のどの時点ないしどの場所か、によって変化する。
- (iii) 原因と思われたある遺伝子や分子をとりのぞくとしばしば別なものがそのかわりをする。
- (iv) 分子は歯車や論理回路とちがってすごくゆらぎが多いのに、全体としては生命現象はそれなりの安定性を持っている。
- (v) たくさんの要因が絡みあっているにもかかわらずその総体として生命はうまくいっているようにみえる。

(図 1)

たとえばある機能単位として見出された分子が周りの状況に応じて異なる機能を持つケースが近年、次々で見出されている。浅島によってその重要性が見出されたアクチビンにおいても、その濃度を変えることで様々な分化を引き起こす。また、細胞内には複数の潜在的情報伝達経路があるが、その時々の伝達経路が主役かは状況に依存する。ある役割をになった遺伝子を求めてそれをロックアウトすると別な遺伝子がかかわりを果たす。などなどである。そこで動的かつ状況に依存した機能が要素間の関係性を通してあらわれてくる仕組みをさぐらねばならない。

そこで、上の、(i)–(v)のような「印象」を「科学」として扱えるようにする方法論を確立し、新しい分野をつくりあげるのが長いスケールでの当プロジェクトの目標である。つまり、「生命をいろいろな機械のくみあわせとし、その各機械の因果関係を分子に求めていく」という「分子」生命観に対抗しうる、「生命がダイナミックなシステムとして働いている」という見方をつくるという目標である。むしろ全体論の方向に持って行って生命を理解しようという試みが不毛であったのは生物学の歴史が示すとおりである。その点、ここでは部分と全体の循環に着目する複雑系の立場で、還元論と全体論それぞれの欠陥を乗り越えようとする（図 1 参照）。

こうした、個々の要素と全体のダイナミックな循環をもとに生命の基本問題に挑むべく複雑系生命科学は構想されている。これを実験科学として具体的に遂行するために 3 つの柱を考えている。



- 1) 構成的生物学
- 2) 多様な要素の相互作用、個と全体の中の動的関係性の研究
- 3) 発生、進化のような、順次ダイナミクスが重なっていく過程の研究

(1)はルールが進化によって与えられた生命を調べるのではなく、我々の側からいくつかの条件を設定して、生命の基本的複製過程や発生過程がいかにあられるかを調べるものである。従来の研究ではそれを取り除くとシステムが働かなくなる重要な分子を探っていた。つまり、生物機能の「必要条件」を探求しているのである。この立場では、当然、生物が生物たる所以の「十分条件」は求められない。それを求めるには、こちら側で作りあげた条件でシステムを構成し、それによってどのレベルの生物機能があらわれるかを探求するのが望まれる。この研究が構成的生物学である。むろん、この背景には、「非常にうまく色々な過程を組み合わせなくても生命過程のプロトタイプはあらわれるだろう」という前提がある。生命には、進化を通してチューンアップされてはじめて成立する「非常によく出来た機械」という面もあるにせよ、ここではそれとは相補的な立場として、むしろ生命システムについて何が必然であり、何が不可能であるかを探っていく。以下のように換言してもよい。

いま存在する生物は進化という歴史をになっているために、どこまでが生命システムが必然的に満たすべき性質か偶然そうになっているだけなのか明らかではない。そこで、むしろ現在の生物に必ずしもこだわらずに、生命システムのプロトタイプをこちら側から設定し、それを通して、安定に増えつづけていくシステムの一般的特性を明らかにしよう、と。

具体的な例としては、多様な化学反応系を膜の中に封入し増殖させるシステム、遺伝子、酵素の集合からなる増殖系を構築し、その発展を通して多様性と再帰性（くりかえしほぼ同じものが再生産されること）がどのようにあらわれていくかをみるなどである。当プロジェクトでは更に表に掲げたテーマを扱う。

テーマ	実験	理論	普遍的問題、論理
I 複製系の構築	DNA 合成酵素等を用いた人工複製系構築	少数分子増殖系の理論	情報の起源 進化可能性条件
II 細胞系の構築	内部でタンパクや DNA を合成しつつ増殖するリポソーム系の構築	増殖可能な反応 ネットワークの進化	再帰増殖条件 ネットワーク進化条件
III 発生の構築	アクチビン濃度を制御パラメータとした発生過程構築	細胞内反応、相互作用と増殖に基づく発生理論 分化、再生	発生の安定性と不安定性 分化の不可逆性
IV 多細胞生物の構築	大腸菌等の相互作用による役割・増殖の分化	位置情報生成 細胞集団の再帰増殖理論	集団の再帰性と 個体の起源
V 細胞記憶の構築	神経細胞等を用いた動的記憶と学習	力学系の持つ メモリー構造	動的操作としての 記憶、学習
VI 進化、共生の構築	大腸菌、粘菌の進化での相互作用の意義の検証	相互作用誘起表現型 分化の遺伝型固定理論	多様化分化の固定化 シンボル化

(2)決まった役割を持った分子や遺伝子からなる 1 対 1 の因果関係を追うのではなく、多くの要因のネットワークの動的な特性をみていくのが我々の立場なので多数の細胞の性質を破壊せずに多くの要素の性質を動的に測りつづける手段を開発し、それを通して多種類の分子の性質の変化を追うことが必要である。濃度の時間的変動（振動）、そのときの細胞間の相関、細胞内の分子の多様性と細胞の性質の関係などの研究である。つまり、何かの役割をになう分子や遺伝子を見出すのではなく多種類の分子の動的関係を探る。例えば未分化の細胞から順に決定されていく度合いを細胞内の成分の多様性、そして動的な変動の度合いなどと関連して調べる。この際、(1)で構成された生命システムをこの手法で調べることで、生命システムが普遍的にもつ論理を動的なネットワークの特性として表現する。

(3)細胞生物学の主流研究では、個々の上手く制御された、遺伝子発現の組合せとして多細胞生物

の発生過程を捉える。「IF シグナル分子の濃度が多い THEN ある遺伝子が ON」という「if then」型の論理の連鎖として、あたかも「プログラム」のように発生が語られる。しかし、シグナル分子といってもせいぜい数千個程度の数しかないことが多く、その意味で濃度といってもそこには大きなゆらぎは避けられない。つまり、コンピュータと違って、「間違わない」発生ルールが与えられているのではなく、むしろダイナミックな変化を通して、状況に依存して安定に働く発生のルールがあらわれると考えられる。このしくみを考える上では、うまくいった発生過程だけを調べるのではなく、むしろこちら側で設定した状況においた細胞集団が互いの関係を通してどのような発生過程を作るかを調べるべきである。ここでは、単細胞生物の集団のように普通の意味では多細胞生物としての発生過程を持たない集団の「多細胞的発展」を追うことも重要である。

具体的な例としてはアクチビン分子の濃度を変えて通常とは大きくはずれた状況に実際の細胞集団を追い込み、その中で起きうる過程を追跡することが挙げられる。この際の目標は既存の組織をアクチビンの濃度を変えてつくり出すだけでなく、むしろ、アクチビンの濃度によって安定な組織が形成されない場合にはどのような細胞集団の変化が生じるかまでを含めて、アクチビン-時間の2つの軸での細胞集団のダイナミックな性質を描き出し、部分と全体の関係を明らかにすることである。ここで行なおうとしているもう1つの例は、大腸菌集団などからの発展過程を追って、いかに安定な発生過程の原型があらわれるか調べていくことである。

なお、以上(1)-(3)で強調しておきたいのは、生命システムを「魔術のように」作るのが目的ではなく、作ることをとおして生命システムのみたすべき基本的論理を求めるという点である。それゆえ、対応して理論モデルを考え、その結果から普遍的論理を探っていく。これらの3つの研究グループ(図2参照)、更に実験-モデル-理論の協同作業として生命システムの理解を進めるのが目的であり、表には各構成的実験に対し、何を問い、どんな理論を作るかが掲げられている。



(図2)

イ 進捗状況

* 研究の現状

目標に挙げられた(1)–(3)に対応して、3つの班の構成で研究が進められている。
より具体的な「構成生物学」でのテーマの実験に対しては

- I 複製系構築 ————— 四方、菅原
- II 細胞系構築 ————— 菅原、四方、安田
- III 発生構築 ————— 浅島
- IV 多細胞系の構築 ——— 四方、安田
- V 細胞記憶の構築 ——— 金子、安田、川戸、四方
- VI 進化の構築 ————— 四方

が中心になってあたっており、それぞれの問題への理論構築は

理論 ————— 金子、池上、佐々

を中心に行なっている。

また複雑系生物学の実験手法としての微細加工技術の応用や計測技術の開発は安田を中心に進められている。

現時点で、各グループ、ほぼ計画にそって順調に研究を進めている。

また、発生生物学、細胞生物学、生物物理、有機化学、理論物理にまでまたがるグループでの共同研究であるので、意志の疎通が肝腎である。そのためにほぼ毎月全グループ共同での発表会を行い、今後のプロジェクトの進め方を議論している。更に、新分野では若手育成も重要な課題であり、若手の研究発表の会を隔週程度で定期的に行っている。

現状を簡単に各班ごとにまとめると以下のとおりである。これまでの結果の詳細は「成果」の章に譲る。

・人工複製系構築班：

化学反応系からの人工生命構築に向けて、試験管内で DNA 合成酵素などを用いた複製系を構築に成功、その際に再帰的な増殖での少数の遺伝子の意義を明らかにしている。これに対応して複製系での情報を担う分子の出現がゆらぎの多い増殖系の一般的性質であるという理論を提唱している。

ついで構成的手法により、細胞複製系の原型を創る実験では人工生命へ向けて、リポソーム内で DNA → mRNA → たんぱく質の反応系を構築し、その成功を蛍光によってこれを確認した。これによりリポソーム内の RNA 合成系が完成した。一方で複製する膜系を進めるためにジャイアントベシクルの新しい脱水縮合型自己増殖系を構築し、増殖過程をリアルタイムで顕微鏡下で観察することに成功した。また、2種類のベシクルの動的構造形成の競い合いという、動的挙動を見出している。今後、こうした増殖系とリポソーム内反応系を組み合わせ、「内部で反応をしながら増殖していく膜」としての細胞プロトタイプ構築を目指している。そのような増殖–淘汰系をたちあげていくには、一様粒径のジャイアントベシクルの作成が望まれ、そのために微細加工技術を用いてオリジナルマイクロストラクチャー基板を用いた、安定した一様粒径ジャイアントベシクルの作製法を開発中である。

また、理論としては膜、細胞内反応の増殖系がいかにかたがいに同期して再帰的増殖系を構成できるか、その際の反応ネットワークの特質は何か、またそこで遺伝情報を担う部分が現れるかが重要課題でありそれに向けてのモデル数値計算が進行中である。

・発生過程制御班

これまで大腸菌が相互作用を通して、異なった酵素活性を持つタイプに分化することを確認し、また、その動的性質をあきらかにしてきた。更に大腸菌の集団からの多細胞生物の原型を構築す

るために、大腸菌内に細胞分化の指標となるミニネットワークを持った遺伝系構築を完了した。プラスミドにより相互抑制ネットワークをうめこんだものであり、これにより、この大腸菌集団が相互作用によっていかに状態を分化させ、「多細胞生物のプロトタイプ」をつくりうるかを研究中である。

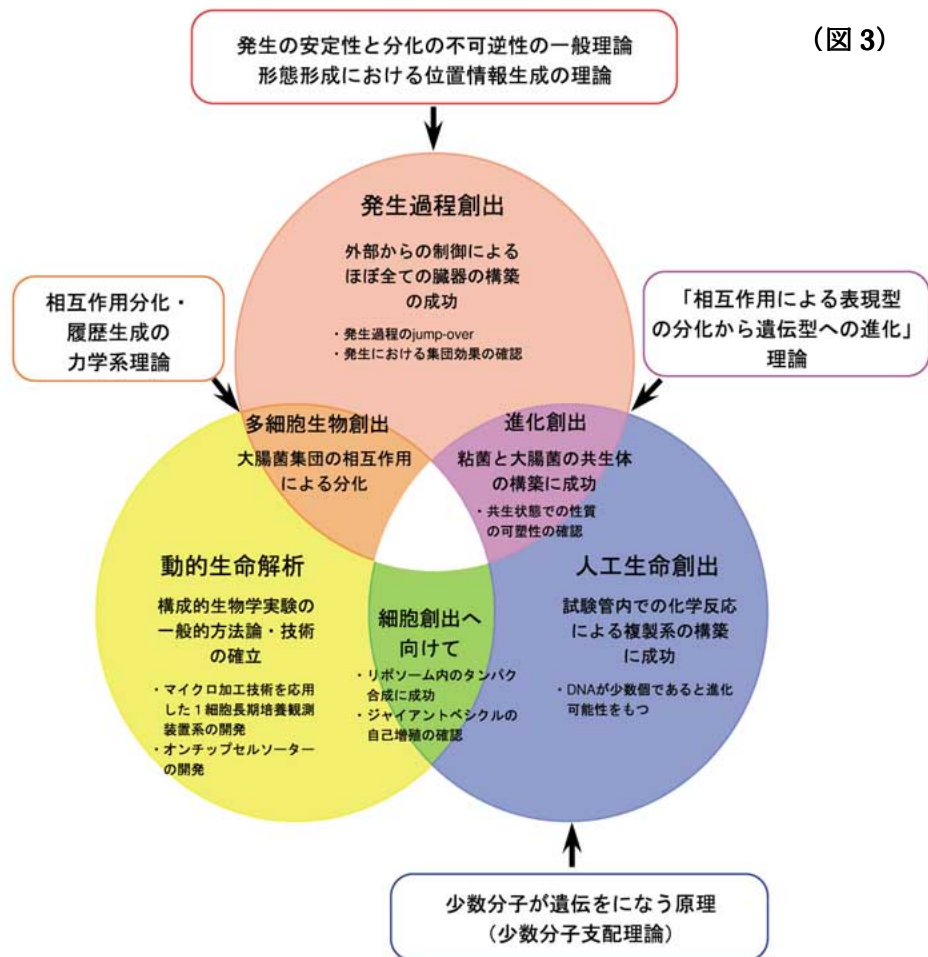
一方、アニマルキャップの未分化細胞から、アクチビン分子の濃度、レチノイン酸、con-A の濃度とそのタイミングの違いにより、ツメガエルの組織のほぼすべてをつくり出すことに成功した。特に、アクチビンの濃度、細胞数を制御パラメータとして各臓器形成の頻度がどう変化するかを明らかにしつつある。これは細胞集団全体の各細胞への影響という複雑系としての性質を抽出する方向の研究である。これに対応して、理論では細胞内部のダイナミクスの不安定性と細胞間相互作用を利用して細胞分化、組織形成が普遍的におこることを示した。その発生過程の安定性、更には、細胞が全能性を失い、順次決定されていく段階の不可逆性がいくつかのモデルで明らかになった。さらにこうした安定性と不可逆性の一般理論を模索中である。一方、このような実験と理論の関係を明確につけていくには細胞の性質をセルソーターで分離し、細胞の性質の分布の変化を定量的に追う必要があり、そのために新たなオンチップセルソーターの開発も含めて研究が進められている。

また、相互作用による表現型の分化が遺伝型の進化を促すという種分化の理論を完成し、発表した。交配でのえりごのみ過程を前提とせず、安定した同所的種分化をおこすはじめての一般的理論である。この理論の実験室での検証に向けて、まず大腸菌人工進化系での細胞間相互作用が進化に対して重要な役割を担うことを確認した。更に実際に相互作用分化の遺伝的固定へ向けた実験を進めている。その一方で粘菌と大腸菌の共生関係形成に際しての新たな化学成分の合成を明らかにし、共生が世代を越えて伝わっていく過程を明らかにしようとしている。

・ 動的生命的解析班

マイクロ加工技術を応用した1細胞長期培養観測装置系を開発し、また光ピンセットと組み合わせることで、容器内の細胞数を制御したり、特定の細胞を相互作用させ、「細胞相互作用」の計測を行う技術をたちあげた。さらにセルソーターを改良して、各細胞の性質をこちらで判定しながら、ダメージをあたえずに分離し培養、解析する実験技術を開発している。現在これらの技術の基本は完成し、それを用いて大腸菌1匹、集団、未分化細胞からの発生過程の解析などを行いつつある。

また、細胞の持つダイナミックなメモリー構造の探索の準備として、神経細胞の培養系や上記技術での制御培養操作系の準備を進めている。一方、理論では、異なる時間スケールの要素が結合した力学系を用いて動的記憶の生成過程の条件を求めている。



* 成果

まず、各項目での特筆すべき成果は以下である。

I 人工複製系をつくる

- 試験管内での 化学反応による 複製系 の 構築に成功
- DNA が少数個であると進化可能性を持つことの発見
- 少数分子が遺伝をになう原理(少数分子支配理論)の発表

II 細胞をつくる

- リポソーム内のタンパク合成に成功
- ジャイアントベシクルの自己増殖を確認

III 発生をつくる

- 外部からの制御によるほぼ全ての臓器の構築の成功
- 発生過程の **jump-over** に成功
- 発生における集団効果の確認

発生の安定性と分化の不可逆性の一般理論の提唱
形態形成における位置情報生成の理論の提唱

IV 多細胞生物をつくる

- 大腸菌集団の相互作用による分化の確認

VI 進化をつくる

- 粘菌と大腸菌の共生体の構築に成功
- 共生状態での性質の可塑性の確認

「相互作用による表現型の分化が遺伝型の進化を促す」という進化理論の発表
→ 同所的種分化、発生-進化関係の理論

VII 構成的生物学実験の一般的方法論・技術の確立

- マイクロ加工技術を応用した 1 細胞長期培養観測装置系の開発
- オンチップセルソーターの開発

以下、これらの結果を中心に項目ごとに成果を述べていく。

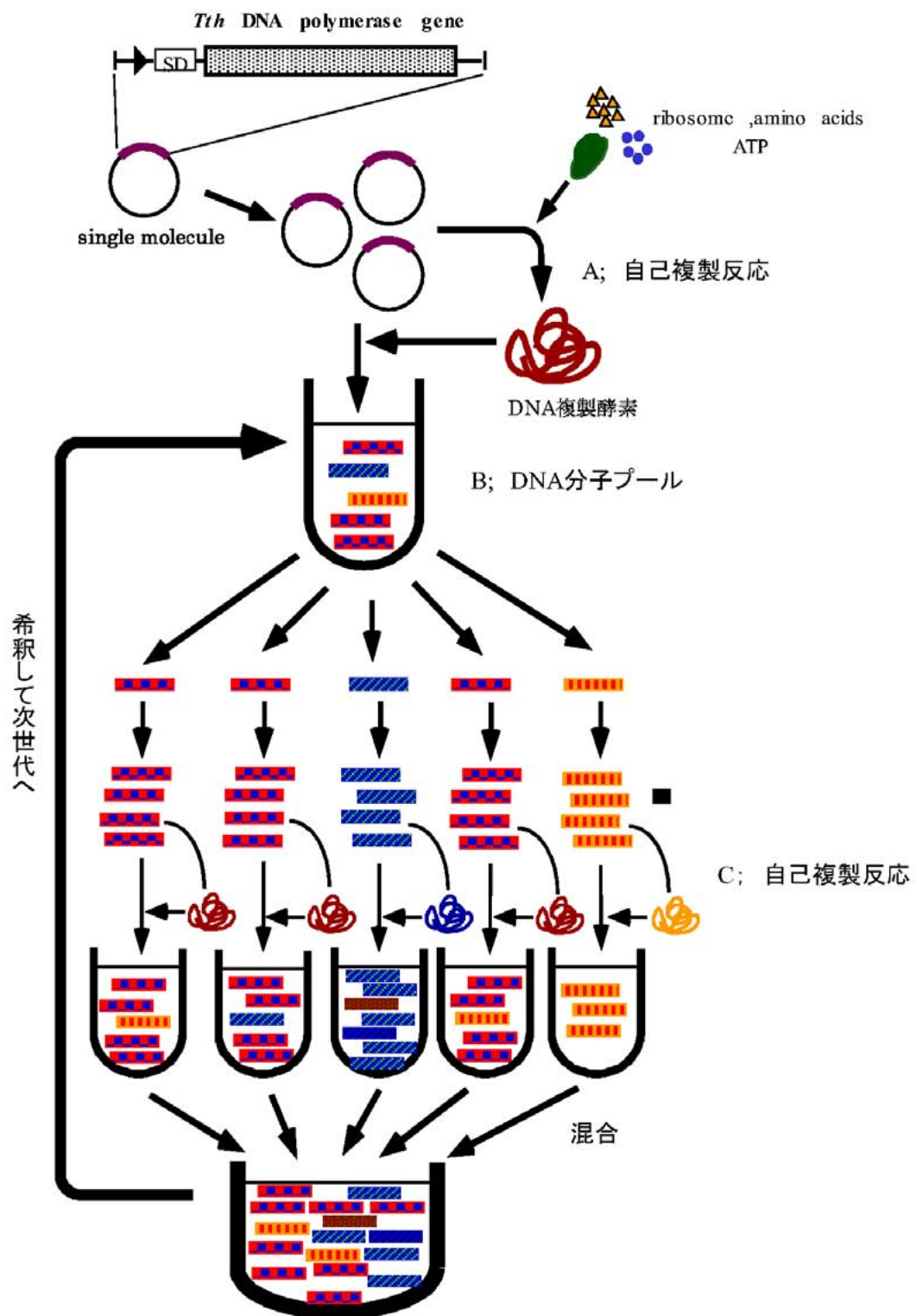
I 複製系をつくる

I-A 無細胞自己複製系の構築

DNA 複製酵素とその遺伝子からなる無細胞自己複製系を立ち上げた。この系は、生物が DNA によって、様々なタンパク質を合成し、そして、代謝を行い、最後に元の DNA を複製する自己複製を模倣して構築した。具体的には、DNA 複製酵素の遺伝子を試験管に入れ、そこに必要なアミノ酸やエネルギーを加える。すると、DNA 複製酵素が合成され、そうして合成された DNA 複製酵素が元の遺伝子を増幅する。つまり、最も簡単な自己複製反応が行われる。(図 4、A)。1 回の自己複製反応でおよそ $2^{30\sim 40}$ 程度の DNA 複製が起こる。この自己複製反応中に合成された DNA 分子のいくつかは突然変異によって配列が変わっている。これで、1 世代目の DNA 分子プールが出来上がる(図 4、B; DNA が横棒で表され、その色が配列の違いを表す)。これらの DNA 分子を 1 分子ずつ 10 本の試験管に分ける。そして、再び自己複製反応を行う(図 4、C; コイル状のひもが DNA から合成された DNA 複製酵素、その色の違いは酵素活性の差を表す)。ここで、それぞれの試験管に含まれる DNA の配列が違うので合成されてくる DNA 合成酵素の活性も異なる。結果として、各試験管で複製される DNA 分子数にばらつきができる。ある DNA 分子は多くの子孫を残し、ある DNA 分子は少ない数の子孫を残すといってもよい。このように各試験管で複製された DNA 分子を混ぜ合わせ、希釈し、次世代の DNA 分子プールとして使う。このプールには前世代でより多く複製した DNA 分子とその複製反応中にできた変異型 DNA 分子が高頻度で存在する。この自己複製系の 1 世代の中には、突然変異と選択の過程が含まれることになる。当然の結果として、この自己複製系は数世代で自立的に進化することがわかった。

対照実験として、1 本の試験管に 1 分子の DNA ではなく、100 分子の DNA をいれて、同じ条件で実験を行ってみた。これは、100 コピーのゲノムをもつ細胞を模倣している。すると、たった 4 世代で自立複製能を失ってしまった。このことは、ひとつの自己複製単位には遺伝情報を担う分子は少数個でなければならないことを示している。多数の情報分子が存在すると自己複製能が減衰する理由は、以下のようなものである。まず、ひとつの複製単位にある多数の DNA に独立に変異が入る。そして、その複製単位の自己複製能は多数の変異型 DNA 分子からつくられる酵素の平均となる。平均であるため、各複製単位の示す複製能は同レベルになり、自然選択がかからなくなる。その結果、有害変異が集団に溜まってしまい、自己複製能を失う。別の言い方をすると、細胞などの複製単位の中で DNA が少数であるからこそ、自然選択が働き、遺伝情報が統計法則から守られている。

(図 4)



試験管内自己複製システム

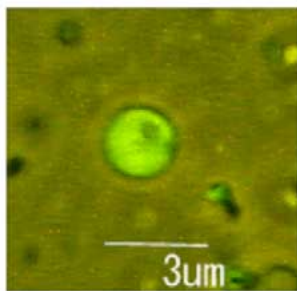
I-B 理論

I-Aの実験に呼応して、触媒ネットワークからなる自己増殖系の理論モデルを考え、互いに触媒する分子が増殖を維持して行く際に、合成が遅く結果として少数しかない分子がその増殖系の振舞を支配していくという少数分子支配の理論を提唱した。ここでは、互いに触媒をして増えて行くシステムでは少数個しかない分子が、そのシステムの性質を主に決め、さらにこうした分子はゆらぎの中でもよりよく保存されるようになってくる。これは、細胞がどのように遺伝を示すようになるかを与えたものであり、実際これをもとに、情報をにう分子と代謝をにう分子がどう役割分化するよう進化して来たかを考えることができる。そして、この少数支配の性質は実験で示された、少数個の分子があったほうが進化性をもちうるという事実に対応している。

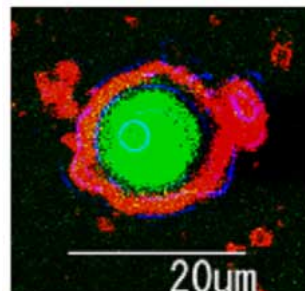
II 細胞をつくる

II-A リポソーム内での RNA 複製とタンパク質合成

自然界に存在しているほぼすべての自己複製単位の構造が細胞形態、つまり脂質2重膜に包まれた形を取っている。そのことによって、細胞内外の区別、細胞間の相互作用が可能となっている。細胞型生命の特性を研究するために、それを人工的に再構成することを最終目的とする。この系では、RNA合成酵素遺伝子から、RNA合成酵素を作り、その酵素が元のRNAを複製する自己複製システムをリポソームに埋め込む。現在までに、RNA合成酵素遺伝子の改良によって酵素の高度大量調整法を開発した。このことによって、脂質2重膜でできたリポソーム内でRNAの複製反応(図5)に成功した。その複製効率は高く、リポソームをセルソータによる分離が可能になった。よって、リポソームの安定性などを指標にRNAの進化実験が可能になった。また、無細胞タンパク質合成系の最適化を行い、初めてリポソーム内で機能性タンパク質(GFP)を合成することに成功した(図6)。



(図5)



(図6)

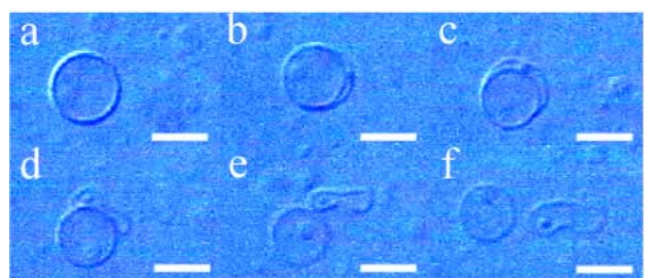
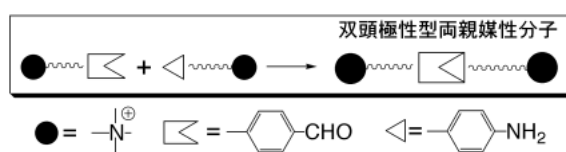
II-B 複製するベシクルの構築

両親媒性分子で構成されるジャイアント・ベシクル(半径1 μm以上の袋状2分子膜)を用いて複製する細胞系の構築を目指している。これまでに得られた主な研究成果を以下に示す。

II-B-1 【膜分子前駆体の取り込み・脱水反応により分裂するジャイアント・ベシクルの創成】

人工細胞モデル複製系として、ジャイアント・ベシクル膜そのものが、膜分子変換反応を触媒する系の構築を行った。アルキル鎖末端にホルミルフェニル基を組み込んだジャイアント・ベシクル型両親媒性分子と、アルキル鎖末端にアミノフェニル基を組み込んだミセル型両親媒性膜分子を混合すると、前者の疎水的な膜内でホルミル基とアミノ基が脱水縮合反応を起こし、双頭極性型両親媒性分子が生成されることを明らかにした。さらにこの脱水反応過程に伴い、母ジャイアント・ベシクルから新たな娘ベシクル膜が生成し、娘ベシクルが分裂する過程をリアルタイム観察することに成功した。

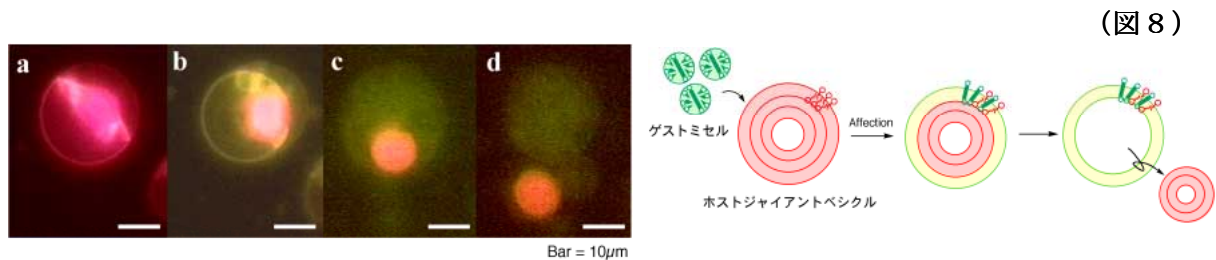
(図7)



Bar = 10 μm

II-B-2 【 多重ベシクルとミセル型両親媒性分子が示す膜ダイナミクス：内層ベシクルの飛出 】

このように顕著な膜分子ダイナミクスを詳細に検証するために、膜分子蛍光プローブを新たに合成し、蛍光顕微鏡法によるダイナミクスの追跡を行った。反応部位を持たない同心型リン脂質ジャイアント・マルチラメラ・ベシクルに対し、先の双頭極性型両親媒性分子を取り込ませると、二種の膜分子が融合と相分離とを繰り返しつつ、ハイブリッドしたベシクル膜が、段階的に外側の膜から内膜へと形成されていき、ついには内部のリン脂質ジャイアント・ベシクルが外へ飛び出すという現象を発見した。飛び出したリン脂質ジャイアント・ベシクルは、再び同じダイナミクスを繰り返す。



両親媒性分子システムの示すダイナミクスは、非線形系での再帰的ダイナミクスにつながる可能性を有し、「Lipid ワールド」とも呼べる反応系を構成することが示された。情報伝達にあずかる分子群（「RNA ワールド」）が示すダイナミクスとの結合は今後の予定である。

II-C 理論

互いに触媒しあっている化学反応系が、境界でかこまれた領域を形成し、その領域内での反応を通して、その領域自体が複製していく数理モデルが構築された。こうした細胞の原型が分化していく反応ネットワークの例も求められた。ただし、こうした反応ネットワークの一般的条件は現在探求中である。

III 発生をつくる

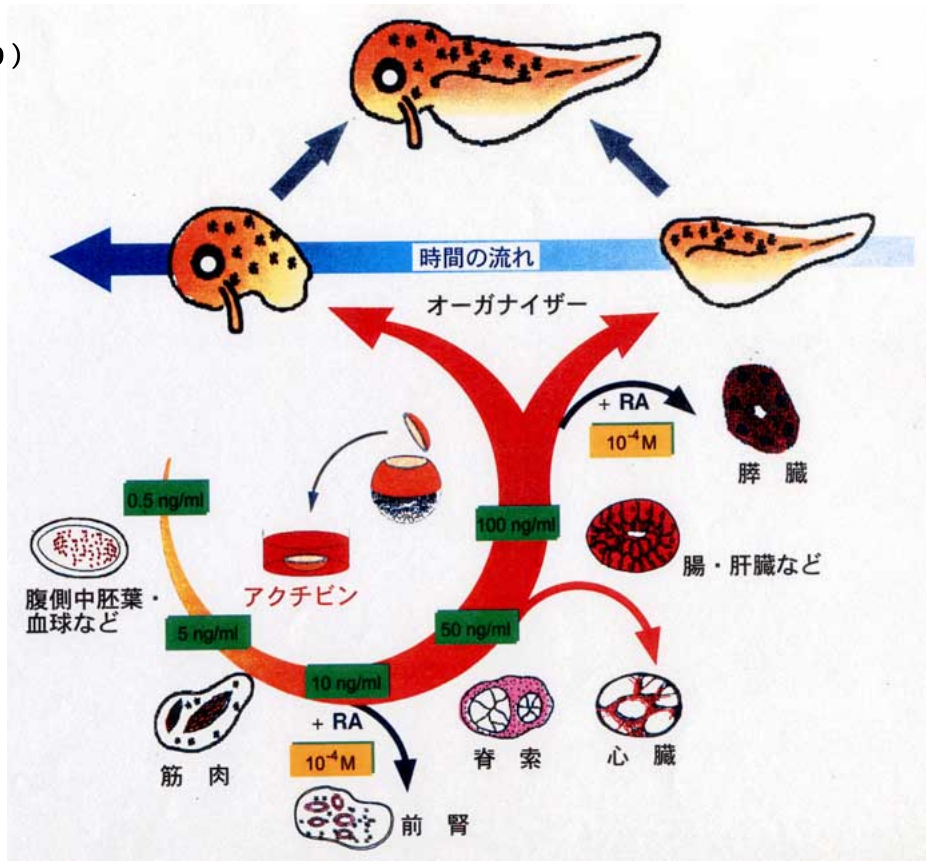
III-A アクチビン等の制御による未分化細胞からの臓器の構築

これまでに未分化細胞（アニマルキャップ）にアクチビンを処理するとその濃度によって、心臓、脊索など異なる臓器が形成されることを示していたが、さらに制御方法を変えてほぼ全臓器の構築に成功した。まず未分化細胞にアクチビンとレチノイン酸を同時に処理すると、腎臓（腎管）が形成される。これに対して、アクチビンを処理した後、5時間おいてからレチノイン酸を処理すると膵臓が形成される。この時間差処理によって新しい臓器形成を可能にした。一方、発生の理論を考えるためには、その処理の記憶が細胞の状態の中に維持されているという点は重要である。

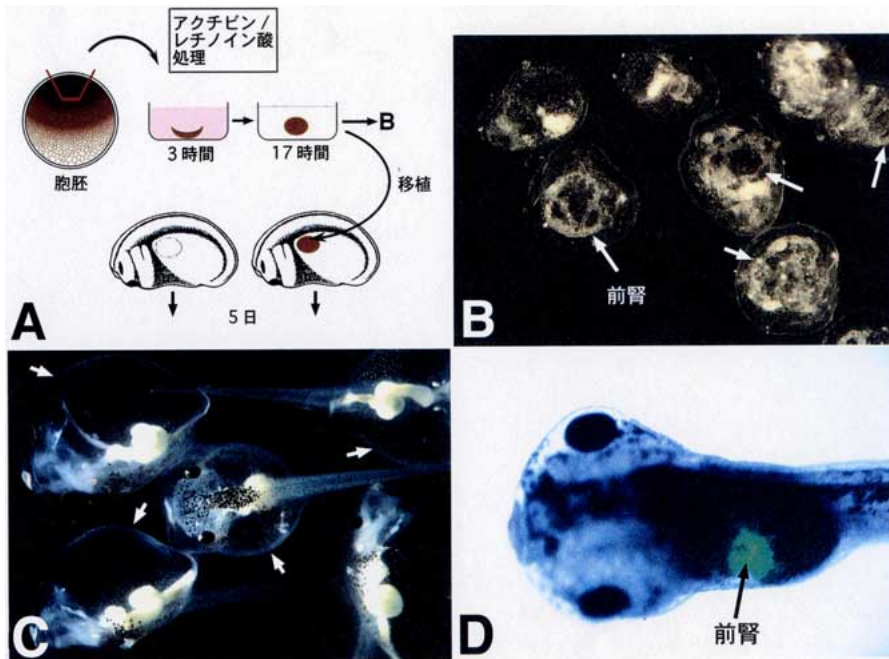
次に、正常な発生過程の順序をとばし（**jump-over**）ても、臓器が形成されることが示された。正常な発生過程では未分化細胞からまず筋肉や脊索などの中胚葉ができ、その後、中枢神経系ができる。その中枢神経系ができた後、目や耳の感覚器官ができる。しかしながら **Con. A**（コンカナバリン A）とレチノイン酸の濃度を変化させることによって未分化細胞から途中の段階をとばして（**jump over** して）目や耳をつくることに成功した。これは必ずしも、正常の発生過程どおりに制御されていないなくても、最終的な臓器に到達するという、構成的生物学としての成果である。

さらに、アクチビンの濃度、細胞数を制御パラメータとした心臓形成頻度を測定し、そこで合成した組織（心臓）が機能をもつことをも確認した。この時、細胞数が少なすぎても多すぎても正常な臓器ができない。これは、化学物質の濃度のしきい値でスイッチがオンオフされるという見方では説明できない現象であり、細胞全体の数の情報が各細胞にうめこまれて、部分と全体の間の相補的關係がつけられていることを示唆する。このことは以下の理論に対応している。

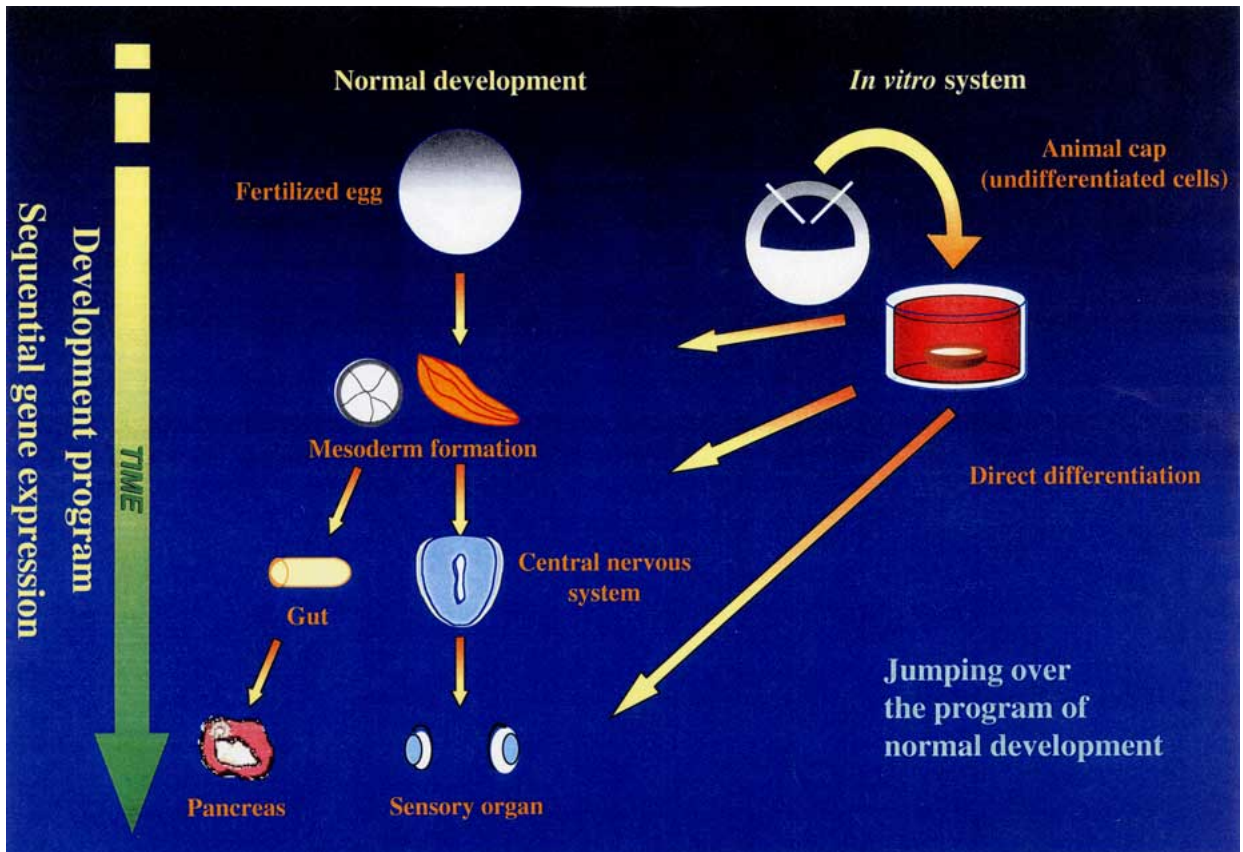
(図 9)



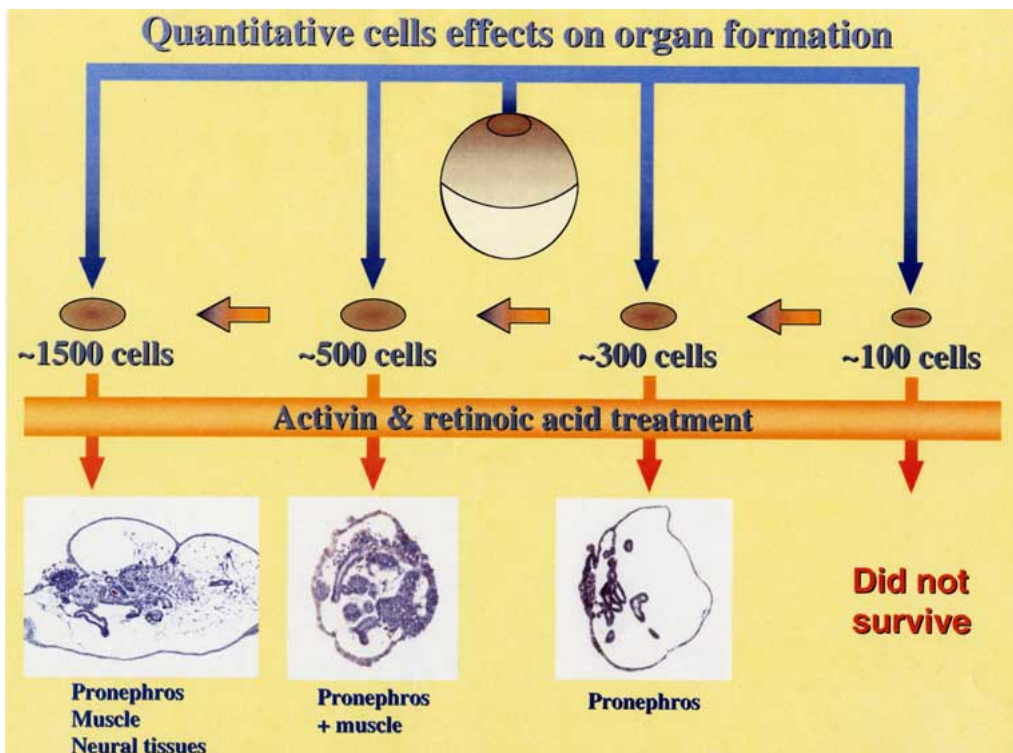
(図 10)



(图 11)



(图 12)



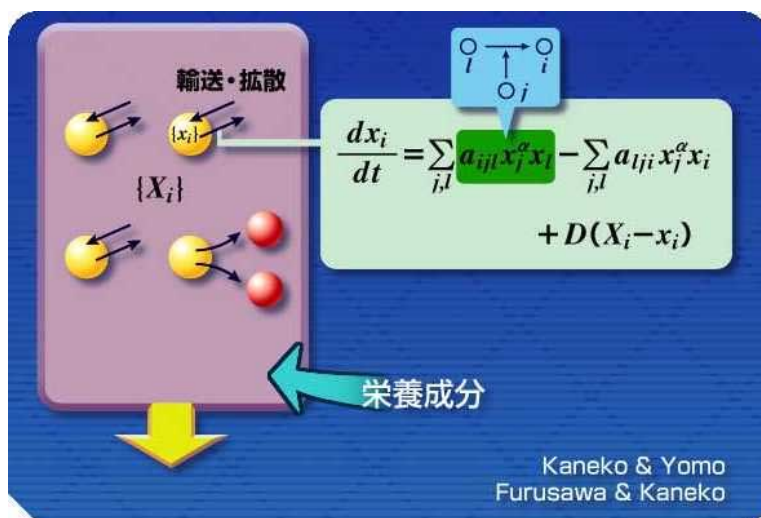
III-B: 理論

細胞分化があるクラスの系の普遍的性質であり、それから発生過程の安定性や分化の不可逆性が一般に説明できることを示した。まず、細胞内部の生化学反応、細胞の体積の増加に伴う分裂、そして化学物質のやりとりによる細胞間相互作用を最低限とりいれたモデル (図 13) のさまざまな数値計算から、以下を示した。

- (1) 細胞の数が増えるに従い、同一の化学状態を保つが不安定化し、分化を始める。
- (2) 異なる化学状態で表現された細胞タイプが形成される。ここで、分化した細胞は連続的ではなくいくつかの離散的なタイプに収斂する。(図 14)
- (3) 各タイプの形成、各タイプの細胞数の分布は、ゆらぎに対して安定している。これは、各タイプが相互作用により互いに安定化しているためであり、そこからずれると不安定になるので、もとの状態への吸引が働くからである。
- (4) 各細胞の状態の決定には他の細胞との相互作用が重要である。実際、このモデルにおいて幹細胞からの分化はほぼ確率的におこるが、その「確率」は内部状態と相互作用より決まるので、各細胞タイプの比率によって分化確率は変わる。その確率の「自動制御」によって各細胞タイプの比率は、揺らぎや擾乱に対して安定している。この分化確率の制御は、各細胞状態に細胞全体の性質が埋めこまれたために自発的に生成される。
- (5) 最初は細胞は色々な種類の細胞に分化できる可能性を持っていたのが分化とともに全能性を失い、さらに順次多能性を失っていく。この不可逆的な分化が、内部自由度を持ってふえていく系の普遍的な性質であることが示され、さらにその多能性の喪失が、化学成分 (遺伝子発現) の多様性の喪失、化学成分の変動の減少として記述された。これをもとに実験で検証可能な予言を行った。
- (6) このように細胞が増えて分化していくにつれ、細胞の内部状態から化学成分の勾配が生成され、その勾配がまた細胞の状態を安定化して相互に強めあうことで形態形成が起きる。外から勾配を与えなくても位置情報が自発的に生成され、それによって、ゆらぎに対して安定した形態形成が可能になる。(図 15)

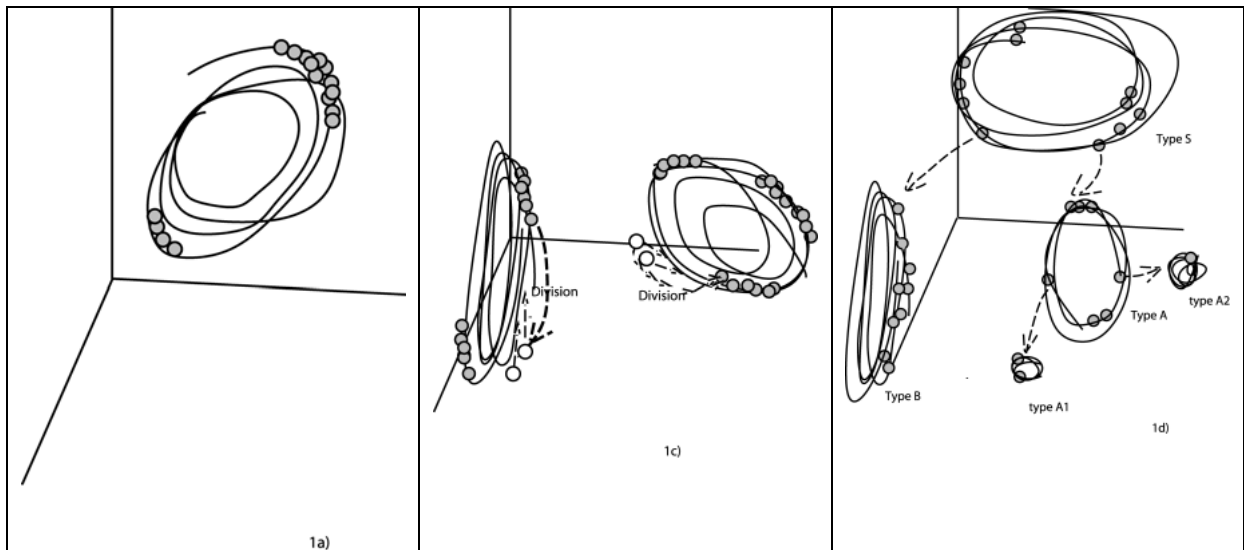
以上は、分化、幹細胞からの不可逆な決定過程、発生過程の摂動に対する安定性、位置情報の生成など発生過程での基本的な現象が、精密に遺伝子で制御しなくても普遍的に生じるものである。また、それが増えていくシステムがみだすべき性質であるという理論が展開されている。これらの結果は、上記の発生過程構築実験での、**jump-over** や部分-全体の関係が起こりうるための論理的基盤を与えている。

こうした発生過程が、どのような反応ネットワーク系で起きるかの条件を求めるのは今後の課題であるが、そのために膨大なネットワーク系を調べて、分化を起こす場合は始めに、可塑的な状態があること、さらに分化していくと細胞集団としての増殖が維持されることなどを確認している。

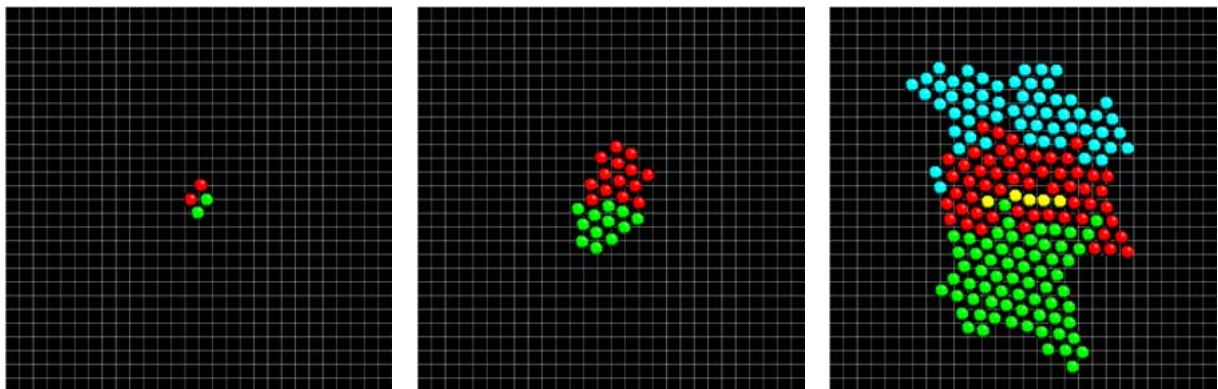


(図 13)

(図 14)



(図 15)

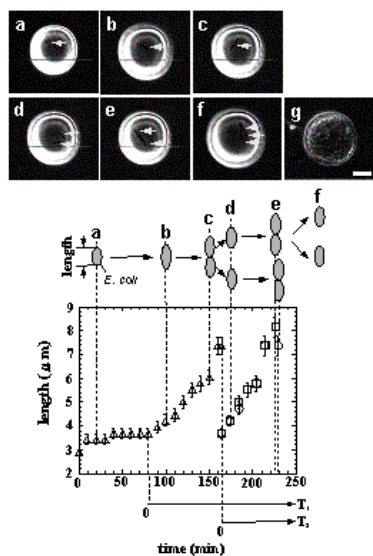


IV 多細胞生物をつくる

IV-A 制御された相互作用下での大腸菌の分化および「1細胞計測」技術を用いた「細胞のゆらぎ」計測

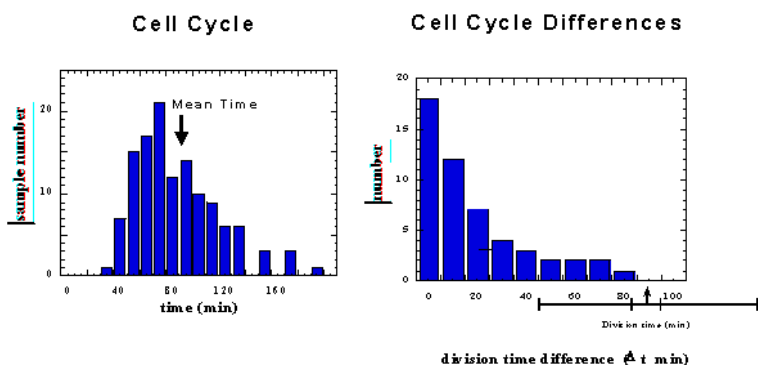
これまでに相互作用によって大腸菌の酵素活性が分化することを確認して来たが、その分化の性質、また細胞密度に対する依存性などをあきらかにした。これは多数が高密度である場合の分化であるが、逆に大腸菌1匹を単離長期培養して個体観察を進めている。具体的には後述VII-Aで開発した「1細胞計測」技術を用いて、特定の1細胞の直系子孫の成長速度、分裂長さ、分裂時間などについて、1細胞孤立状態で連続培養した姉妹比較、世代間比較を行った。その結果、細胞の状態の分布幅(差)は、全く同一の遺伝子を内在し、全く同一の細胞質成分を継承している(量は不等分裂のため異なる)にもかかわらず、非常に大きいことが判明した。

(図 16)



大腸菌のオンチップ1細胞培養

(図 17)



大腸菌1細胞の同世代細胞間比較統計

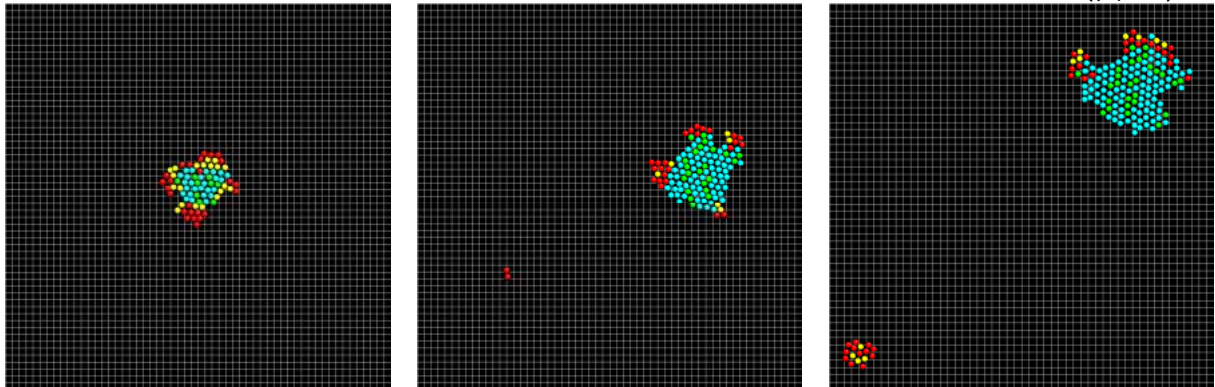
IV-B 大腸菌の細胞分化系の構築

細胞の生理、特に発生過程は分子生物学的に現在までに多くの知見を得られている。そこでは、様々な分子が結合解離反応によって巧妙に発現制御され、最終形態に到達することが説明されている。そのような分子機構とは別に、細胞内の非線形ネットワークと細胞間の相互作用によって細胞分化が可能であることがIII-Bの理論においてもまた大腸菌の実験でも示されている。そこで、負のフィードバック制御を2重に持つネットワークを大腸菌の中に構築した。この系では分子の結合解離による情報伝達によらず、むしろ、複数の力学的安定状態からの選択と言う形で代謝適応が進むことが期待され、大腸菌集団から多細胞生物のプロトタイプの構築のためのステップとなると考えられる。

IV-C 理論

III-B で挙げた細胞分化の理論をもとに、安定した分化の比率制御などを議論した。さらに多細胞生物の理論としては細胞集団がその発展を通して、その一部の細胞だけを次世代に安定して伝える再帰的過程を形成するか、さらにその際、一部の種類の細胞だけが子孫を残すという生殖系列の分離が生じるかを議論しなければならない。そこでIII-Bでの理論モデルに細胞の接着性をさらに考慮したモデルを調べた。その結果、III-Bで述べた細胞分化の後で、その一部のタイプだけが放出され次世代の祖先となる場合が見出された。これは生殖系列の原型とも考えられるが、ただし、生殖系列を分離して次世代をつくるという「狭いパス」を通ることが細胞集団の再帰性を保つために必然かという問いへの完全な答えにはまだ至っていない。

(図 18)



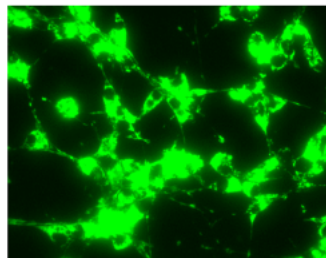
V 記憶をつくる

V-A 制御された少数神経系による履歴の構築実験

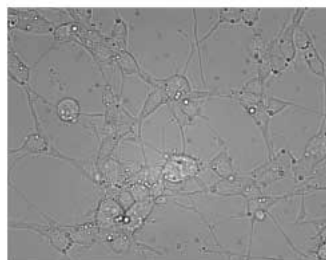
多くの脳研究では複雑な脳をそのまま研究しているが、ここでは少数の神経を連結することによって履歴現象や学習過程の原型を構築することを目的としている。そのために神経を少数で長期にこちらで設定した条件で培養する方法を開発中である。さらにこの系に設定した条件での電気刺激を与える系を立ち上げるべく、まず顕微鏡ステージにのる8チャンネルの入出力基盤を作成した。

また、脳視床よりクローン化した不死化細胞GT1を用いて、均質な出発細胞系を作成し、これを無血清培地で2日程度かけて分化させることで、細胞がアクソンや dendrite を伸ばし、少数神経細胞系からなるネットワークが構築できるような培養条件を探索した。カルシウム指示薬で染色し自発的なカルシウム振動をデジタル顕微鏡で測定して最初細胞ごとにばらばらだったカルシウム振動の位相が、分化後2日程度たつとネットワークを構築した全ての細胞でカルシウム振動の位相がそろふことを確認した(図19参照)。ただし、目的のためにはこちらで設定した条件に制御できる培養系が必要であり、それは構築中である。

(図 19)



GT1のミトコンドリア蛍光染色図



GT1の透過光図

V - B 理論

一方で、どのようなシステムが記憶を可能にできるのかに答えるために理論研究を進めている。記憶において重要なことは、速く変動スケールする現象が、それよりもずっと長い時間スケールの状態にどう埋め込まれるかである。そのために、異なる時間スケールの要素が結合した力学系を用いて、動的記憶の生成がどのような場合に可能かを示した。こうした、長時間スケールへの埋め込みの理論はVIの進化理論とも関係している。

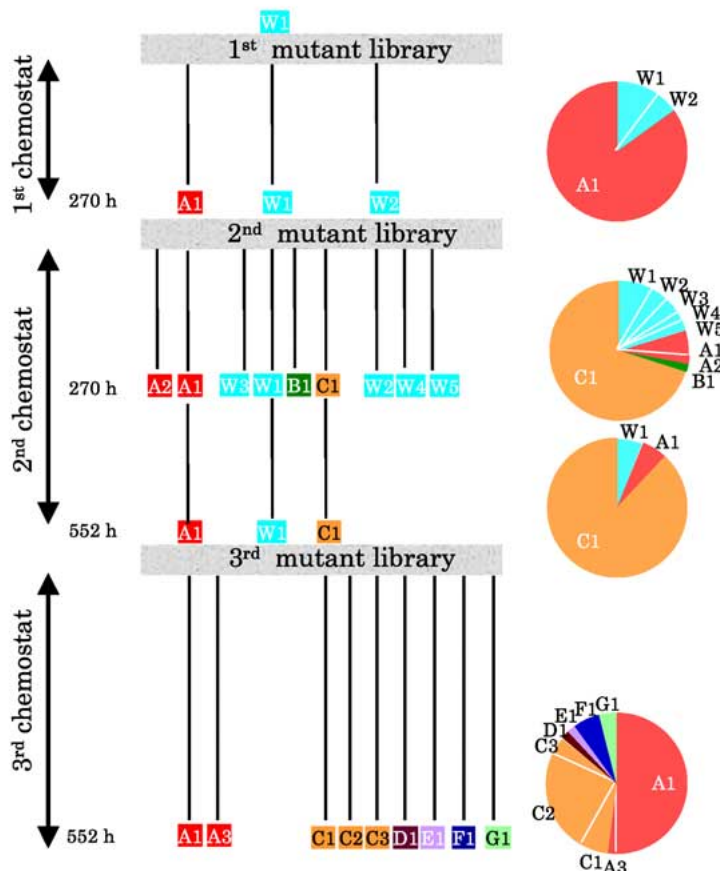
VI 進化をつくる

VI-A 大腸菌人工進化系での細胞間相互作用の効果

大腸菌内の一遺伝子に変異を導入し、その遺伝子のみが異なる変異体大腸菌集団を連続培養する実験室内進化系を構築した。実際には、大腸菌の窒素代謝において重要なグルタミン合成酵素遺伝子の一部にPCR法によってランダム変異を導入することにより、グルタミン合成酵素遺伝子配列のみが異なり、それ以外の遺伝子的背景は同じである変異体大腸菌集団を取得した。変異体はグルタミン合成酵素活性が異なるために、グルタミン酸を窒素源とした最少培地では違った増殖速度を示す。200~300種類の変異体集団をグルタミン酸が窒素源の最少培地を用いて連続培養する。この系ではグルタミン合成酵素に選択がかかる。この変異と選択のサイクルを3回繰り返すことにより、実験室内進化系でのグルタミン合成酵素遺伝子に対する分子系統樹と個体群動態を得た(図20)。その結果、選択のかかる条件であるにもかかわらず、より適応した遺伝子をもつ個体が勝ち残るのではなく、共存しながら、分子進化が進むことを示している。

集団構造に依存して、個々の大腸菌が増殖速度を変えることは、細胞間相互作用が重要であることを示唆する。そこで、培養液中のグルタミン濃度を測定したところ、外部から導入していないグルタミンが1.7 μM程度存在していることがわかった。このことは、菌体内でグルタミン合成

(図20)



成酵素によって合成されたグルタミンが培養液中に漏れ出していることを示している。次に、このグルタミンを培地の窒素源として多く含まれるグルタミン酸に変換する酵素であるグルタミナーゼを培養液に加えて競争実験を行った。その結果、グルタミナーゼを含まない条件においては安定な共存を示す複数種の菌体を用いたにもかかわらず、グルタミナーゼを含む条件では単一株のみが検出された。以上の結果より、個体から漏れ出したグルタミンによる個体間相互作用によって、個々の大腸菌がその増殖速度を変化させ、複雑なダイナミクスを作り出していることがわかった。

There is a coexistence of some mutants at each chemostat culture even under a strong selection pressure.

VI-B 実験室内共生系の構築

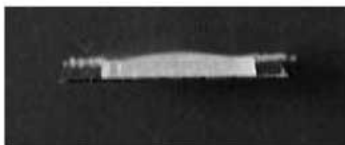
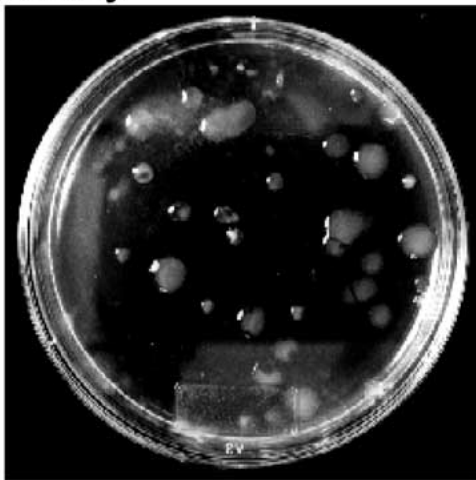
本来、捕食関係にある二種の生物が、長期に渡って安定的に共存する共生関係へと移行する実験系を構築するのに成功した。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* と大腸菌 *Escherichia coli* は捕食-被食者の関係にあり、この二種を完全栄養培地上で培養すると、大腸菌は粘菌に食べ尽くされ、粘菌は飢餓状態に陥ることが知られている。ところがこの二種を最小培地上で培養すると、大腸菌が表現型の著しく変化したコロニーを形成し、粘菌はこのコロニー中では大腸菌を食べ尽くさず安定的な系を形成することが分かった。このコロニーは形態的には完全培地上で培養した大腸菌に見られる黄色っぽい平板なコロニー（図 21 右）と異なり、半透明ゼリー状の盛り上がった粘性の高いコロニー（図 21 左）であり、粘菌はその中で分散して存在している。粘性共生コロニーの形成機序は以下の様である。

- 1) 粘菌と大腸菌を最小培地上に植えると始めに分裂速度の速い大腸菌が培地上を占める。
- 2) 続いて粘菌細胞が大腸菌を捕食しつつ分裂する。この時、肉眼観察では培地上の粘菌が増殖している部分は粘菌が食べ尽くされ、透明なコロニー状のスポットとして観察される。
- 3) 大腸菌がほぼ食べ尽くされた培地上から半透明の粘性大腸菌コロニーが出現し、その内で粘菌が分散して生存しているのが観察される。
- 4) 粘性大腸菌コロニーはそのサイズを増長させつつ、捕食者粘菌と安定的に共存する。

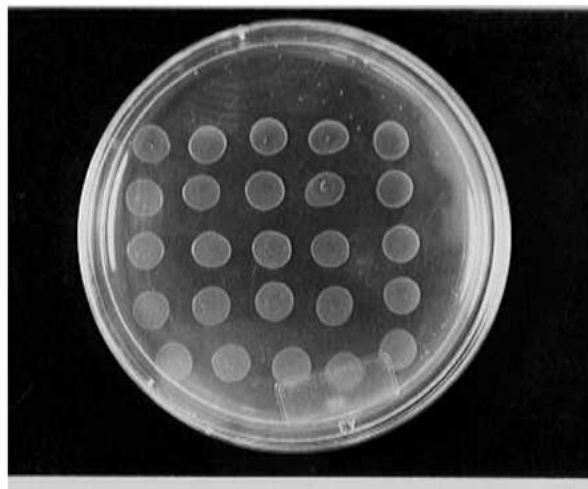
こうして形成された共存コロニーは植え継ぎ可能で、新たな培地に移しても安定して成長することが可能である。また、一度共存コロニーを経験した大腸菌は、粘菌との培養を再び開始した時に、共存コロニーを経験していない大腸菌に比べて共存コロニー形成の速度が速くなっている。このことは共存コロニーを経験することで大腸菌の履歴に何らかの変化が起こったことを示唆している。この粘性物質を分析した結果、通常の大腸菌の細胞外基質より高分子物質が多く、多糖成分の糖鎖の種類が異なっていることが分かった。

(図 21)

Co-existing mucoidal colony



E. coli alone

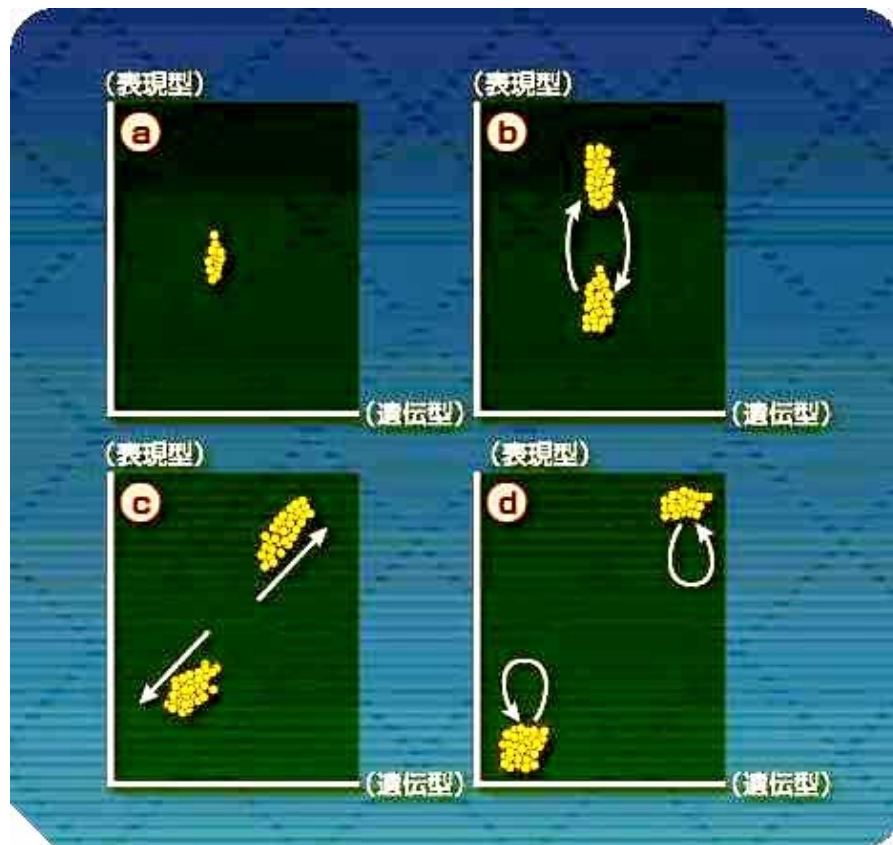


Side views

VI-C 理論

発生過程で展開された理論を1個体にあてはめると、同じ遺伝子と初期状態をもった2個体が相互作用を通して表現型の異なる状態を持ちうるということを意味する。では、これは進化に対してどのような意味を持つだろうか。つまり、発生過程、表現型の可塑性が、遺伝情報が変化する進化的なスケールでどういう意義を持つかである。そこで、相互作用による表現型の分化を示すIII-Bでのモデルに、遺伝型の突然変異と淘汰過程を(通常の進化理論に従って)加えたモデルを調べた。その結果、まず同じ遺伝型を持った個体が相互作用により、異なるタイプの表現型を持つように分離した後、この表現型の違いが遺伝型の差異に固定されることが示された。この結果、遺伝型と表現型の1対1対応が回復し、この段階ではそれぞれのグループの子孫は親と同じ遺伝型/表現型を保つようになる。その意味で遺伝的にも分離した種の分化が完成する。これは安定した同所的な種分化を示す一般的な理論である。さらに、ここでの分化は雑種の不稔性を与えることが示された。その結果交配相手の選択に関しての生殖前隔離も進化してくる。これまでは種分化理論は交配相手の選択を工夫することで議論されて来たが、この理論はむしろそれは結果として自動的に進化することを示している。また、発生過程の可塑性が進化を促進させるという点で、発生-進化の関係を考える上での大きなステップと考えられる。

(図 22)



VII 構成的生物学実験の一般的方法論・技術としてのマイクロ加工技術を応用した1細胞長期培養観測装置系の開発

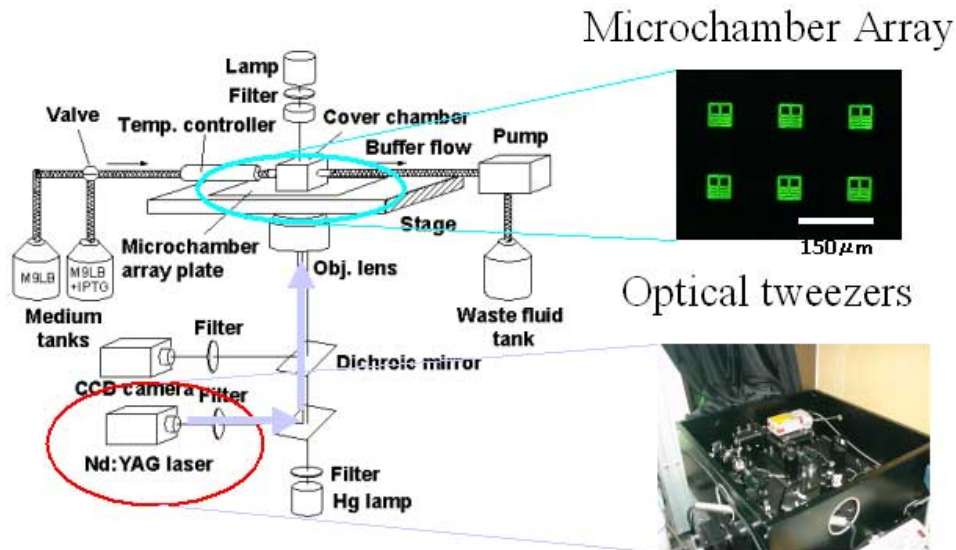
VII-A 孤立した大腸菌等の「1細胞計測」技術の開発

細胞集団を構成する各1細胞が、蛋白質の発現、成長、分裂などに関して実際どの程度のゆらぎを持っているのか、そして集団化することによってそのゆらぎがどのように変化するか明らかにする目的で、1細胞単位で環境を完全に制御しながら(長期連続培養+連続観察)する技術を開発した。既存のマイクロ加工技術にアビジン・ビオチン等の生物由来の素材を巧みに組み合わせることで、ハードマテリアルのみを基礎とした既存のマイクロファブリケーションには無いハードマテリアルとソフトマテリアルが融合した新たなマイクロチップを初めて実用化した。

VII-B 「オンチップ・セルソーティング」技術の開発

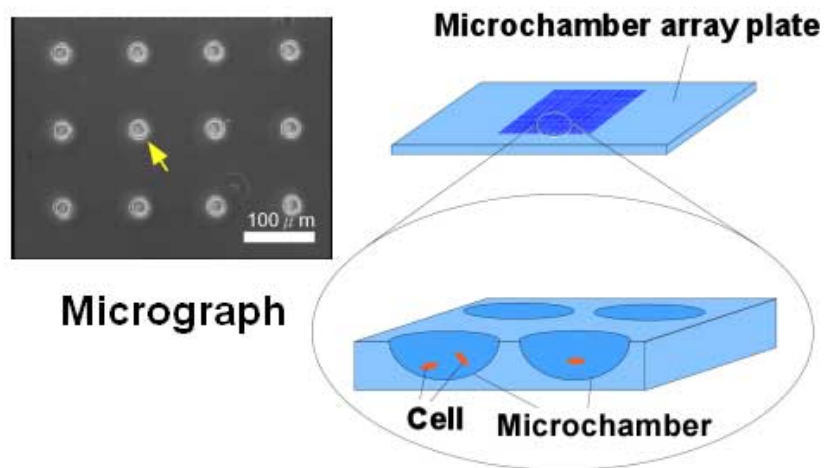
特定の「1細胞計測」「1細胞培養」を行うため、各細胞の微細構造を顕微観察しながら細胞集団を分離・精製する技術を開発した。マイクロ加工技術と誘電電気泳動力を組み合わせることで、実際に血球細胞の分離、緑色蛍光・赤色蛍光を発現した大腸菌の分離に成功している。

(図 23)



オンチップ1細胞培養システム

(図 24)



マイクロチャンバ・アレイ

*今後の計画 及び目標

当初目的どおりに「構成的生物学」研究により、生命システムの普遍的な論理を明らかにし、発生や進化の本質的理解を目指す。基本方針のもと、主に以下のような研究テーマの遂行を計画している。

(I、II)人工複製系、細胞システムのプロトタイプの構築

試験管内での DNA ポリメラーゼ等を含む化学反応に系からの増殖する分子集団システムの構築は完成したので、この中から遺伝情報のような他をコントロールする分子群の出現の条件を探っていく。

一方ベシクルを用いた複製できる膜の構築にほぼ成功したので、これをもとにして安定した複製系の構築をまず目指す。このために(i)均一な大きさのリポソーム合成系の確立、(ii)制御できる安定した複製系の構築、(iii)多種の成分を用いたリポソーム複製系の構築を行う。ここから **Combinatorial Chemistry** と進化的な手法(増殖-淘汰)を組み合わせることで、多様な化学成分を持つ、膜系の構築を目指していく。

次に、この増殖できる膜の中に人工複製系を注入し、多様な化学成分を持ったプロト細胞が増殖し分化する系を構築する。既に(I)でリポソーム内での RNA 合成には成功したので、この系と増殖リポソーム系を組み合わせることで内部の自律的反応により増殖していく細胞のプロトタイプを構築する。一方、以下の微細加工技術により こうしたプロト細胞の相互作用を制御することで、それが分化し、パターンを形成する系の構成を目指す。その段階ができれば、その後はこの人工細胞系を多様化、分化、進化させる方向へ進めていく。

理論では、多様な化学成分が反応している要素が増殖とともに分化し、多細胞生物の原型をつくる様子が見出されているので、どのようなダイナミクスや反応ネットワークがこうした再帰的増殖を可能にするのか、さらに、このような増殖する細胞の中で、一部の化学成分が他をコントロールし、複製のための情報を形成するための論理を明らかにする。

(III)大腸菌集団からの多細胞生物のプロトタイプの構築

反応系を埋め込んだ大腸菌の相互作用による分化を用いて、まず、「幹細胞」としてふるまう大腸菌を形成し、大腸菌集団での細胞分化規則の生成をみる。ここで細胞間相互作用をとりこむことにより、制御された情報伝達にたよらずに大腸菌を分化させるのが次の段階である。そして、この集団を与えられた空間的制約の中で増殖させることにより、分化した大腸菌の形態形成を構築し、多細胞生物のプロトタイプを構築する。既に進んでいる細胞分化、形態形成の理論と比較することで、多細胞生物形成の論理を明らかにする。さらに、1細胞長期培養観察装置を用いて大腸菌の相互作用を制御して観測し、こうした大腸菌の分化機構を1細胞レベルで明らかにしていく。

(IV)構成された発生過程での分化ダイナミクスの解析と発生過程の理論

アニマルキャップからの未分化細胞がアクチビンの濃度によりどのように分化するかをセルソーターおよび開発中のオンチップセルソーターで解析していく。細胞の性質を指標化し、その空間での細胞の分布が発生過程を通してどう変化するかについて、定量的に明らかにする。これにより、未分化細胞から順に決定されていく度合いがどのような細胞の性質やダイナミクスで表現されるかを求める。一方で、アクチビンなどの濃度の時間的コントロール、集団効果などを通して、発生での、時間順序と制御可能性の関係を調べる。こうした実験を考慮しながら、これまでに提出した発生分化のモデルをふまえて、一般的に発生と進化をつなぐ理論を構築する。これにより、発生の安定性や不可逆な分化過程をあらわす普遍的な論理を抽出するのが目標であり、たとえば、ある組織はなぜ再生され他のはできないのか、いったん分化が決定された細胞の多能性を回復する操作の限界は何か、などの問いに答えることをめざす。

(V)細胞集団への記憶の構築

電極基板上に、こちら側の設定した細胞ネットワークを構築し、さらにこちらで設定した状況のもとで電気刺激をあたえることで、細胞集団の中に、記憶が蓄えられるかを明らかにする。このために再現性のよい神経ネットワークの培養系を現在たちあげようとしている。それをふまえ、

まず、細胞の状態の履歴現象をとらえ、ついで刺激により、細胞集団としての記憶を生成する。いうなれば、細胞に対する「強化学習」や「条件反射」(パヴロフの犬)実験である。細胞については、神経細胞を主に用いて細胞集団の記憶、発達過程を実験的に明らかにする。これと対応して、力学系理論から、どのようにして状態への記憶形成が可能か、短期/長期の区別の起源、学習の形式を明らかにし、実験への指針を与える。

(VI)表現型分化からの進化、実験室内共生系の構築

相互作用による表現型の分化が遺伝型の進化を促すという進化理論を一般化して、発生の可塑性と進化の関係、さらには多様性増加のための条件を求めるとともに、この理論の進化一般への意義を探る。一方でこの理論を実験室で検証するために、(III)での相互作用による大腸菌の表現型分化を用いて表現型の分化が遺伝型の進化を加速させるかを検証して行く。

表現型の可塑性の起源としての共生系構築については、これまでに創った大腸菌と粘菌の共生体の相互作用、ダイナミクスの実態を明らかにする。この二種の生物間の、捕食関係から共生系への関係性の変化が起こる時、ふたつの遺伝子ネットワーク間に如何なる相互作用が見られるのか、ジーンチップを用いて解析する予定である。

(VII)構成的生物学実験の一般的方法論の確立

構成的手法として細胞システムをこちらでおいた状況に置き、それに対し外からコントロールした刺激を与えるための基板を自由に製造できる施設を完成させる。さらに、細胞集団の中から細胞状態に応じて1細胞を操作し、指定した条件で培養し、測定するためのオンチップセルソーターを完成させ、大腸菌のみならず、カエルの未分化細胞から ES 細胞など多くの系に適用できるシステムを構築する。また、1細胞レベルで細胞内の遺伝子発現や化学成分の変動、細胞間の相関を、非破壊で測定できる装置を開発する。一方で、この装置を大腸菌相互作用系、細胞分化過程に応用し、複雑系生命科学の実験技術を確立させる。