

## 論文要旨

論文題目 オンチップ1細胞培養観察系を用いた後天的に獲得された細胞情報の解析  
Direct Measurement of Epigenetic Information in Individual *Escherichia coli* Cells  
Using On-chip Single-cell Cultivation System

氏名 井之上 一平

### はじめに

生命の中に保存されている情報が持つ意味を理解することは、生命の持つ特徴の一面を理解する上で非常に重要なことである。生命が持つ遺伝性に着目し、その情報を保持・伝承する構成成分 DNA の発見は、一連のゲノム計画として様々な網羅的な遺伝情報マップを人類にもたらすところまでに発展してきた。ゲノムの比較解析によって、進化などの不可逆的な情報変化を理解することが可能となっている。しかし、例えば、個体発生において、細胞は全く同じ遺伝情報を持つにも関わらず、増殖・分化・形態形成を行い、受精卵という単純な状態から様々な器官が組み合わさった個体という複雑な状態へと発展し、その状態で安定化する。あるいは、「カルス状態」等の未分化状態へと可逆に戻っていく。このような過程ではどのようにして情報は細胞間で伝承され、保持され、変化していくのであろうか。

私は、細胞が持つ生命活動に必要な情報を、①遺伝子配列そのものに依存した不可逆に変化するゲノム情報、②遺伝子配列そのもの以外に保持された環境や他の細胞との相互作用によって変化する情報、という2種類に分け、前者を“先天的遺伝情報”、後者を“後天的情報”と考えることとした。

本研究の目的は、上記“先天的遺伝情報”が、どの程度細胞表現を制御しているのか、また、“後天的情報”がどのように細胞内で情報として保持・伝承されていくのかを理解することで、生命の持つ「順応」などの柔軟性、進化の過程で起きたであろう「多様性」の

根源を探ることにある。

### オンチップ1細胞培養観察系の構築

細胞の“先天的遺伝情報”の理解、“後天的情報”の獲得などを理解するためには、特定の1細胞に着目し直系子孫の継続的観察、あるいは特定の細胞に特定の刺激を厳密に加える技術が必要となる。これを実現するため、微細加工技術の特長を利用して、1細胞単位で細胞を孤立条件で培養し、各細胞の環境を完全に制御しながら細胞表現変化を経時計測を行うことができるシステム“オンチップ1細胞培養観察系”を開発した。オンチップ1細胞培養観察系の構成は、①マイクロチャンバアレイ基板、②培養液循環系、③光ピンセット、を組み込んだ位相差・蛍光顕微鏡システムである。マイクロチャンバアレイ基板は、容積が数plの微細な構造物（マイクロチャンバ）をガラス基板上に $m \times n$ のマトリクス状に構築したものである。このマイクロチャンバに蓋となる半透膜をはりつけ細胞を閉じこめ特定の1細胞を連続培養観察することに成功した。この半透膜を介して新鮮な培地を常時循環させることで一定環境を維持し、特定の化学刺激を特定の期間のみ与えることが可能となっている。また、近赤外レーザー（1064 nm Nd-YAG レーザー）集束光を光学顕微鏡光路に導入して光ピンセットとして用いた。この光ピンセットによって、細胞を非接触に特定の培養マイクロチャンバから別のマイクロチャンバに動かしたり、光を照射し続けることで細胞分裂能や運動能を阻害することで、特定の細胞の世代間比較を可能にした。

本研究では、以下に述べるように、オンチップ1細胞培養観察系を用いて、大腸菌1細胞の培養結果を従来方の培養結果と比較して問題ないことを明らかにしたうえで、①同一細胞から生まれた姉妹細胞の表現型比較解析、②細胞内の蛍光蛋白質標識された蛋白質空間局在の連続計測、③運動特性変化の実時間計測、④培養環境の制御、を行った。

### 大腸菌の1細胞培養

細胞情報の性質を明らかにするために大腸菌をモデル生物として用いた。

モデル生物として大腸菌を用いた理由は以下の2点である。

- ① 細胞分裂によりクローンを生み出す分化しない細胞であり、母細胞を細胞分裂させることで同じ遺伝情報を持つ2つの姉妹細胞を得ることができる
- ② 全ゲノム配列が解読されており遺伝子操作可能であるため、各実験に適した細胞を人為的に作り出せる

オンチップ1細胞培養観察系の特徴を理解するため、大腸菌の1細胞培養計測を行った。

- ① オンチップ1細胞培養観察系を用いて培養された細胞は、従来法で培養された細胞と同じ培養結果を示すか？すなわち、両培養条件で違いは無いか？
- ② オンチップ1細胞培養観察系を用いて、従来法では得ることのできなかった知見を得ることができるか

を検討した。

オンチップ 1 細胞培養系で培養された大腸菌 JM109 の細胞周期平均±標準偏差は 88±37 分 (n = 202) であった。他方、試験管培養された細胞周期平均±標準偏差は 84±17 分 (n = 6) であった。1 細胞培養における細胞周期平均と試験管培養における細胞周期平均の間には有意な差がみられなかった ( $p = 0.05$ )。1 細胞培養における細胞周期と試験管培養における細胞周期が同じであったことから、オンチップ 1 細胞培養観察系と従来の培養方法とは同じ環境であると考えられた。そして、1 細胞培養系での観察結果は、従来の培養法で得られた結果と同様であり、1 細胞計測が特殊な条件下での特殊な結果ではないことが確認できた。また、オンチップ 1 細胞計測では、着目した 1 細胞を直接計測し続けることができるため、細胞分裂直後の細胞長さ (初期長さ、平均値 3  $\mu\text{m}$ 、n = 202) や細胞分裂直前の細胞長さ (終長さ、平均値 6  $\mu\text{m}$ 、n = 202) を計測でき、初期長さとの相関係数 (0.5) も初めて計算できた。1 細胞培養することで初期長さ分布・終長さ分布、初期長さとの相関関係という従来法では得ることのできなかつた知見を得ることができた。

### 姉妹細胞の相同性比較

次に、遺伝情報が細胞表現をどの程度決定しているのかを調べるために、同じ環境で培養され同じゲノム・同じ過去の履歴を持つ 2 匹の姉妹大腸菌の細胞周期を比較計測した。具体的には、オンチップ 1 細胞培養観察系を用いてマイクロチャンバ内に孤立化され、1 細胞培養された大腸菌 JM109 を培養し続け、細胞分裂によって生まれた遺伝情報および後天的情報が同一な各姉妹細胞における細胞周期の違いを比較計測した。

姉妹細胞における細胞周期差が細胞周期平均の 10 %以内の組は全体の 32 %しか存在せず、細胞周期差が細胞周期平均より離れている細胞の組も全体の 4 %存在した。また、等分裂により生まれた姉妹細胞における細胞周期差分布と不等分裂により生まれた姉妹細胞における細胞周期差分布は同じ傾向を示した。

以上の結果から、同じ遺伝情報を持つ細胞組のうち、細胞周期の違いが各平均値の 10 %以内であった細胞組は、全細胞組中の 40 %にも満たないことが分かった。すなわち、同じゲノムと同じ過去の履歴を持つ 2 つの細胞を同じ培養条件で培養した場合でも、2 つの細胞の細胞周期には違いが現れる事が確認された。また、等分裂により生まれ、細胞体積に差を持たない姉妹細胞の間にも細胞周期の違いが計測された。このことは、先天的遺伝情報が細胞状態を完全に制御しているのではなく、むしろ細胞の表現は、細胞自体が持つ大きな「ゆらぎ」あるいは「環境からの影響」を受け易いことが強く示唆された。

### 細胞運動と細胞内タンパク質ダイナミクスの同時計測

遺伝情報がどの程度細胞の表現に影響を与えるか調べた後に、環境との相互作用により細胞にどのように後天的に情報が獲得され、保持された情報が変化するかを理解するための実験を行った。具体的には、環境変化による大腸菌の運動能変化とアスパラギン酸 (以

下 Asp) 受容体タンパク質 Tar の状態変化を同時に計測し、運動能と Tar 状態の相関を、オンチップ 1 細胞培養技術を用いて世代間比較と組み合わせ連続観察した。

大腸菌 AW539/pTarGFP に特定の濃度の Asp による化学刺激を時間的に制御して与え Tar 局在の変化とタンブリング頻度の変化を 1 細胞計測した結果、Tar-GFP が細胞極へ局在している大腸菌に対して 1 mM Asp 刺激を与え 80 分経過したところで Tar 局在が消失する現象を、その過程を含めてはじめて観察することができた。Tar 局在の消失直後、化学刺激を止め、Tar 局在の回復過程を観察した。そして化学刺激停止後 250 分 (3 世代) かけて徐々に再度形成する素過程も初めて経時計測することができた。各 Tar 局在状態における運動特性も調べた。Tar 局在を持つ細胞に対して 10  $\mu$ M Asp 刺激を 4 分間与えたところ、タンブリング頻度は 10  $\mu$ M Asp を加える直前の 70 % までに減少した。しかし、Tar 局在が消失したその子孫細胞に対して 10  $\mu$ M Asp 刺激を 4 分間与えたところ、タンブリング頻度は加える直前の 90 % までにしか減少しなかった。さらに Tar 局在が回復した細胞に対して 10  $\mu$ M Asp 刺激を 4 分間与えたところ、加える直前のタンブリング頻度の 70 % まで減少した。

以上の結果から、大腸菌において環境変化により Tar 局在状態が変化し、その Tar 局在回復過程は、3 世代をまたがって継続的に回復してゆくことが観察された。すなわち Tar 局在回復過程において、環境との相互作用により獲得された細胞膜上でのタンパク質の局在情報として世代間に伝承していくことが直接可視化され、かつ、Tar 局在状態の違いを反映して細胞の Asp への応答が変化することが観察された。

## まとめ

同じ遺伝情報を持つ姉妹細胞組のうち、細胞周期と終長さの違いが各平均値の 10 % 以内であった細胞組は、全細胞組中の 40 % にも満たないという結果は、遺伝情報のみで全ての細胞表現が決定されているわけではなく、遺伝情報以外の要因によって細胞表現が大きく変化する可能性があること、すなわち先天的遺伝のみでは、細胞の表現は決定できないことが強く示唆された。

環境変化によって生じた Tar 局在変化というタンパク質の細胞膜への空間配置情報変化が子孫細胞に伝承され、継続的にその情報が変化し続けることで、徐々に化学刺激への応答性などの表現に影響を与えるという結果は、後天的情報の保持・変化ダイナミクスの一例を初めて可視化できたという点で重要であると考えている。このことは、タンパク質の細胞膜上の空間配置情報などのゲノムと直接関係無い構成要素を後天的に獲得され数世代に渡って子孫細胞の表現に影響を与える情報として扱うことのできる可能性を示唆している。