

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 井之上一平

本論文は、微細加工技術を生物学研究に応用することで、従来存在していなかった一連の 1 細胞レベルセロミクス計測のための要素技術を開発した研究に関して報告したものである。本論文では、一般の細胞が外部環境の変化に対して応答し適応や分化などの独特の現象を起こすとき、この変化がゲノム情報だけで説明できるものではなく、むしろ後天的な外部環境との相互作用の履歴を反映するものであることに着目し、細胞間での情報のやりとりを、従来の生物学的アプローチではなく、構成的に精製した細胞を組み合わせることで、1 細胞が蓄える後天的情報の解明を目指している。

本論文の第 1 章では、本研究に至った背景と上記目的を、ゲノム科学の発展の歴史を踏まえて述べている。また、本論文の構成について総説している、

第 2 章では、本研究全般で用いられたマイクロ加工技術について、その技術の位置付けと、本研究で用いられた手法の詳細な説明がなされている。特に、本研究において論文提出者が新たに開発し確立した「オンチップ 1 細胞培養観察系」について、その作成技術の開発、この性能について詳解している。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が、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として構築したのが、「オンチップ 1 細胞培養観察系」である。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  $m \times n$  のマトリッ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ため、従来、困難であった培養中の刺激に対する応答を特定の細胞について連続して計測することが可能となった。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。

第 3 章では、第 2 章で述べた「オンチップ 1 細胞培養システム」について、それを実際に大腸菌 1 細胞培養に用い、このシステムで培養した大腸菌の振る舞いが、分散培養で培養し

た細胞の振る舞いに対して大きな違いが無かったことを確認したことを報告している。具体的には、オンチップ1細胞培養観察系で培養された大腸菌 JM109 の細胞周期平均±標準偏差は  $88 \pm 37$  分 ( $n = 202$ ) であり、他方、試験管培養された細胞周期平均±標準偏差は  $84 \pm 17$  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  $3 \cdot \mu\text{m}$ 、 $n = 202$ )や細胞分裂直前の細胞長さ(終長さ、平均値  $6 \cdot \mu\text{m}$ 、 $n = 202$ )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った知見を得ることができた。この実験結果を踏まえて、考察において、本技術の細胞培養技術としての妥当性、その技術の持つ課題について議論しており、結果として下記4章以降の実験で、本システムを利用することは問題ないことを結論している。

第4章では、「オンチップ1細胞培養観察系」を用いて、大腸菌姉妹細胞の成長・細胞周期の相同性比較を行った研究について述べている。具体的には、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。すなわち、オンチップ1細胞培養観察系の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。結果は、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。このことから、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。

第5章では、同様に、オンチップ1細胞培養観察系を用いて、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  $10 \cdot M$  Asp 刺激を 4 分間与えたところ、タンブリング頻度は  $10 \cdot M$  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  $10 \cdot M$  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  $10 \cdot M$  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。

第 6 章では、総合考察として、上記「オンチップ 1 細胞培養観察系」を用いて得られた大腸菌 1 細胞の培養観察結果に基づいて、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を初めて実際に可視化できたことがまとめられている。また、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ことが述べられている。

いずれの技術も半導体微細加工で利用されてきた技術を独自の研究によってバイオ用に最適化し、1 細胞単位でスクリーニングすることに初めて成功したものである。また、観察した大腸菌 1 細胞の世代間にまたがる振る舞いの伝承機構の観察は、新たな生物学の研究手法を提案するものであり、このこと自体が、その研究水準の高さを示すものと考えられる。

したがって本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。