

論文内容の要旨

大腸菌を用いた 1 細胞レベルでの非遺伝的表現型の機能解析

“ Analysis of the non-genetic phenotypes of *Escherichia coli*
based on the on-chip single-cell observation ”

綾野 賢

1. 序論

生命は分子・細胞・個体、どのレベルにおいてもまったくランダムな振る舞いをするわけではなく、なんらかの規則性や恒常性をもっている。これは乱雑さ、すなわちエントロピーを低い状態に保っているとみることができる。「情報」という観点からみた場合、生命にとって重要な情報とはエントロピーを減少させる作用をもつもの、変化の方向性のある程度規定するものであると考えることができる。

以上のことを考え合わせたくて生命にとっての情報として、まず最初に挙げられるのが「遺伝情報」であろう。遺伝情報は細胞から細胞へ、あるいは個体から個体へ、DNA を媒体として受け渡され、細胞内のタンパク質ネットワークや環境に対する応答機構の基本的な枠組み・設計図としてはたらく。その結果生物は遺伝型の発露として表現型をしめす。

しかしながら表現型は遺伝型によって一意的に決定されるかといえば、必ずしもそうとは言えない。もちろん表現型は周囲の環境からの影響を強くうけるが、環境を一定にしたとしてもばらつきをしめす。そしてそのばらつきが完全にランダムとは言えない場合、そこには遺伝型以外になんらかの情報の寄与が含まれているのではないだろうか。本研究ではこのような遺伝型以外の要因によって決定されていると考えられる表現型を「非遺伝的表現型」と呼び、遺伝型が同一である大腸菌細胞を用いて、環境による影響を厳密に制御

しながら表現型の計測を行うことで、その存在と性質を明らかにすることを目的とする。それは生命がどのように秩序を形成しているかを理解するひとつの手がかりともなるのではないだろうか。

2. 実験系の概要及び評価・検討

本研究では 1 細胞とその子孫細胞の表現型を直接比較観察するために「オンチップ 1 細胞培養システム」(図 1)を用いた。にシステムの全体を模式的に示す。当システムは大別して四つの要素技術からなっている。マイクロチャンバとよばれる微細加工技術によって作成された構造物が細胞観察用のスライドガラスにアレイ状に並んだ「マイクロチャンバアレイ基板」、培地成分や温度などを制御しながら顕微鏡下で細胞を長期間培養することができる「連続培養システム」、細胞の状態を画像データとしてとりこむ「画像取得部」、細胞を非接触にトラップして操作する「光ピンセット」、以上四つの要素技術について評価・検討を行った。マイクロチャンバアレイ基板については基板の特徴と実験の目的にあわせて 3 つの作成方法を採用した。光ピンセットについては姉妹細胞の成長速度・分裂時間の相同性という知見を利用して、従来の研究で行われてきたよりも小さなレーザー強度について細胞への影響を見積もることが出来た。以後「オンチップ 1 細胞培養システム」において細胞へダメージを与えることなく操作する場合、3mW のレーザー強度で 1.5 分以内、あるいは 6mW のレーザーパワーで 30 秒以内のトラップという条件で行うことが望ましい。また逆に 20mW 以上のレーザー強度、あるいは 10 分以上のトラップによって細胞の成長・分裂を人為的に停止させることもできることがわかった。

3. 方向転換頻度の解析

大腸菌はタンブリングと呼ばれる方向転換と直進を繰り返しながら溶液中を移動している。このタンブリング頻度はたとえ同一環境下で同一の遺伝子を持つ集団であっても各個体で異なっている。このようなタンブリング頻度のばらつきは「非遺伝的な個性 "Non-genetic individuality"」のあらわれであるとして以前から注目されていた。本章はこの「非遺伝的な個性」が本当にあるとするならば、その個性が次の世代になんらかの影響をおよぼすということはないのだろうか、という疑問を明らかにするため、ドライエッチング法によって作成したもので、幅 1.5 μm 、深さ 1.0 μm 、長さ 5mm の溝が 40 本 10 μm の間隔で並んだマイクロチャンバアレイ基板を用いて、大腸菌の運動を 1 次元的に制御し(図 2)、計測を行った。その結果細胞は固有の方向転換頻度を持っていることがわかった。またその方向転換頻度は分裂によって生じた二つの姉妹細胞にも等しく継承されていることがわかった。

4. 細胞の極性

細胞の極性(非対称性)は非遺伝的な表現型のひとつであると考えら得る。そこで本章では大腸菌の持つ二つの極を常に区別しながら観察し続けることができる溝状マイクロチャンバアレイ基板を用いて、細胞の運動方向の偏りと、それが次の世代にどのように影響するのかということについて調べた。その結果、大腸菌の進行方向はときに偏りをしめすが、その度合いは進行方向がランダムに決定されているとした場合起こりえないほどのものであ

ることがわかった。実際にタンブリング後の進行方向選択には偏りが見られ、その偏りは分裂によって大きくなる傾向があった。また分裂によって運動能を失う細胞も見られた。しかし運動能を失った細胞も成長・分裂に関しては正常であった。

5. 誘引物質に対する応答

大腸菌は誘引物質の濃度が増加するとタンブリング頻度を低下させ、直進する時間が長くなるが、誘引物質濃度が保たれていても、一定時間経過後またもとのタンブリング頻度へと戻る(適応する)ことが知られている。「細胞の個性」を調べた先行研究では、たとえ遺伝子が同一であっても、誘引物質刺激に対する応答時間は各細胞で異なった値を示し、それぞれの応答時間は何度刺激してもほぼ同じ値を示すと報告されている。本章では溝状マイクロチャンバを用いて大腸菌の直進時間を計測し、アスパラギン酸(誘引物質)刺激に対する大腸菌の応答を解析した。その結果同じ刺激に対しても細胞によって応答時間は異なり、応答時間は方向転換頻度(タンブリング頻度)と相関があることが示唆された。姉妹細胞で誘引物質応答時間は若干異なっていたが、濃度増加に対する応答時間の増加傾向で見ると姉妹細胞はよく似た傾向を示した。

6. タンパク質の局在

大腸菌の走化性に関わるタンパク質 Tar(アスパラギン酸受容体)の局在に着目した。GFP 標識された Tar タンパク質の細胞極における局在の様子について、細胞の「古い極」と「新しい極」を区別しながら解析をおこなった。実験に用いたマイクロチャンバアレイ基板はウェットエッチング法を用いて作成した。実験の結果 Tar-GFP は分裂直後の偏りを解消するように新しい極へより多く集まることがわかった。またこのような方向性の決定は細胞質内ではなく細胞膜上で行われていることが示唆された。

7. 総合考察

まず本研究全般にわたって使用した「オンチップ 1 細胞培養システム」について、実験系の妥当性についていくつかの検証を行った。マイクロチャンバアレイ基板をそれぞれの特長にあわせて使い分けることで、細胞の様々な表現型を計測することが可能になり、姉妹細胞を直接比較観察することができた。光ピンセットの影響については、姉妹細胞の相同性を利用してこれまでの報告よりも詳細なレベルで検討を行った。

次に大腸菌の方向転換と誘引物質応答については、大腸菌の運動を一次的に制御し、方向転換の頻度、あるいは直進時間を定量的に求める方法を確立した。先行研究で指摘されていたような運動の非遺伝的個性を、方向転換頻度の計測によっても見ることができた。さらにそのような個性は分裂後も維持されていることが示唆された。今後は本実験系の特長を生かして、モデルによる予測と実験による証明というアプローチで非遺伝的表現型の維持・伝承について調べていくべきであろう

大腸菌の極性については、運動方向の偏りと運動能分配の不均等(運動能を持たない細胞が出現する)という現象が観察された。Tar 分子が膜上を方向性をもって移動しているという示唆と考え合わせると、運動方向・運動能の偏りの維持は興味深い。

ここまで解析を行ってきた非遺伝的表現型からどのような「情報」の担い手の存在が予測されるだろうか。なんらかの性質を世代間で維持させるもの、変化の方向性を規定するものが「情報」となりうると思うならば、例えば方向転換頻度を世代間で維持させるタンパク質ネットワークそのものが「情報」を担っていると言える。あるいは細胞膜のもつ流動性・方向性も情報の担い手と考えることが出来る。このような観点からのアプローチによって、生命がどのように秩序を形成しているか理解するひとつの手がかりが得られることが期待される。

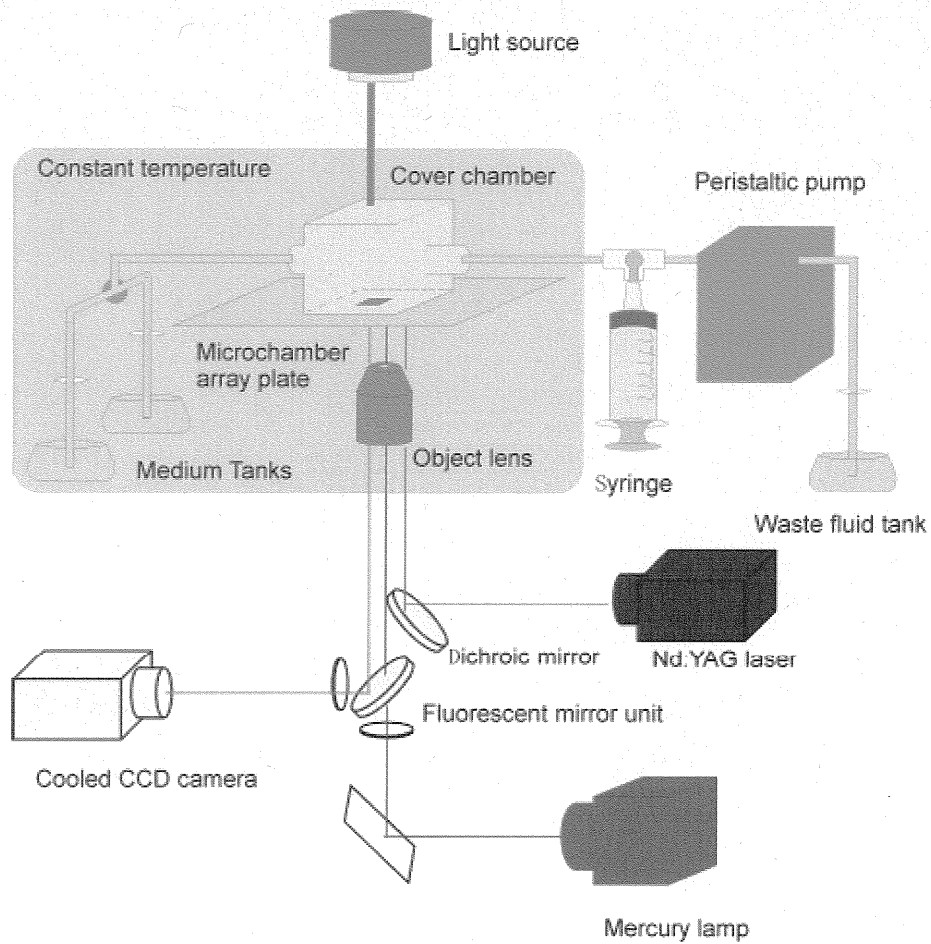


図 1: オンチップ 1 細胞培養システム



図 2: 溝状マイクロチャンバによる大腸菌の運動方向の一次元制御