

第5期 第2回創発セミナー

第6回酵母コンソーシアム（オンライン開催）

「細胞の状態を計測する～新たな技術とその応用」報告

九州大学大学院農学研究院 教授
竹川 薫

大隅基礎科学創成財団は、2021年11月19日午後4時から、「細胞の状態を計測する～新たな技術とその応用」という統一テーマのもと、オンライン方式で創発セミナーを開催しました。

冒頭、大隅良典理事長が「酵母研究の活性化のために本コンソーシアムが役割を果たすことを期待しています」と挨拶、続いて本セミナーの世話人である千葉大学大学院理学研究院教授 松浦彰氏からテーマについての説明がありました。約80人の登録参加者との間で2時間にわたって講演と討論がおこなわれました。以下にその要旨を報告します。

講演1

「細胞内 ATP 濃度の可視化から見てきた ATP の予想外の役割」

吉田 知史

早稲田大学国際学術院 教授、大隅基礎科学創成財団フェロー

講演者の吉田氏は、モデル真核生物である酵母を利用して、細胞が環境変化や老化にどのように応答しているのか、その分子機構の解明に取り組んでいる。本セミナーでは、全ての生物にとって最も重要なエネルギー物質であるアデノシン三リン酸(ATP)を可視化することにより、個々の生細胞内のATP濃度を定量的に測定することでATPの細胞における新たな役割の解明を目指した。

ヒト体内には60-120グラムのATPが存在しており、ヒトが摂取する2500キロカロリーがATPとして消費されると仮定した場合、170kgのATPを毎日消費している計算となる。このように重要なATPの機能を詳細に解析するため、シンプルなモデル生物である酵母を用いて、新しい技術を利用して代謝産物のイメージングを行った。

京都大学生命科学研究科の今村博臣博士が開発したATPの特異的な蛍光バイオセンサーである「QUEEN」を用いて、酵母細胞内のATP濃度の測定を行った。具体的には、蛍光タンパク質であるEGFPにFOF1ATP合成酵素のεサブユニットを融合させ、細胞内のATPが結合すると励起スペクトラムが変化することを利用して細胞内のATPを測定した。その結果、酵母細胞内には通常2-4mM程度のATPが存在しており、解糖系の阻害剤である2-デオキシグルコースを添加すると、細胞内のATPは急速に枯渇することがわかった。また酵母細胞内では、培地のグルコース濃度が0.02%でもATP濃度は高く保たれているが、アンチマイシンを添加してミトコンドリア内の酸化的リン酸化を阻害すると、完全にATPが消費されることを見出した。さらに酵母を窒素飢餓条件にして胞子を形成させた場合には、胞子の中と外でATP濃度が異なっている現象も見出した。これらの結果から、酵母細胞内ではATPを一定に保つ未知のメカニズムが存在することを明らかにした。

そこでこの現象をさらに解析するため、酵母の変異株を利用することにした。ATP細胞内の濃度が野生株(4mM)よりも低い(3mM以下)変異株としてすでに報告されている、AMP-キナーゼ活性化タンパクキナーゼをコードする*SNF1*遺伝子破壊株や、ATPの消費に伴って生じるAMPの再利用に関わるアデニル酸キナーゼをコードする*ADKI*遺伝子破壊株を用いた。これらの変異株は野生株より細胞内ATP濃度が低いため、これらの遺伝子と関連のある遺伝子を調べたところ、タンパク質の



折りたたみ(フォールディング)に影響がある遺伝子(タンパク質)との関連が示唆された。そこで実際に2-デオキシグルコースを添加してATPを枯渇させると、酵母細胞内でタンパク質が凝集する現象が見られた。

細胞内の低ATP環境ではタンパク質の不溶化が起こる現象については、Tony Hymanらがすでに報告しており(ATP Hydrotrope 仮説)、タンパク質の凝集体が細胞内で増加することにより細胞毒性を起こすことが予想された。興味深いことにATP濃度が低い酵母変異株では、個々の細胞でATP濃度のばらつきが大きく、細胞周期でATP濃度が変動していることが示唆される結果を示した。

以上のように吉田氏は、酵母細胞内のATPを測定することで細胞のエネルギー状態を可視化する実験系の開発に成功した。そしてATP濃度の恒常性が維持できない場合には、動物の神経変性疾患などにも関与するタンパク質の凝集が見られるという興味深い現象が見られることを報告した。

質疑応答では窒素源を枯渇した際に酵母細胞内でATP濃度は変化するのか、ATPとADPの濃度比が生物にとって重要であるがADP濃度は測定しているか、局所的な酵母細胞内におけるATP濃度は測定可能か、など多くの質問が視聴者からなされ、活発な議論が行われた。

講演 2

「画像活性細胞選別法と酵母応用への展開」

合田 圭介

東京大学大学院理学系研究科 教授

「セレンディピティの計画的創出」を目指した異分野融合プロジェクトを推進されている合田氏の経歴が紹介され、物理分野の研究者であった合田氏が分光技術を生命科学分野へ応用展開できないかと考えて、これまで研究してきた経緯について説明された。個々の細胞を分析する過程は、人が入り乱れた絵の中からウォーリーを探し出すことと同じで、無数の細胞の中から特殊な細胞を見つけ出すのは非常に困難である。これまで伝統的な手法としては、細胞1つ1つを顕微鏡で調べて特定の細胞を分離・同定することが行われてきたが、網羅的な調査が必要となり時間と手間のかかる地道な作業であった。一方、時間を節約するためにFACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting)のように細胞の特定の領域や集団を選択する高スループットな評価系もこれまでに報告はあるが、空間分解能を持たないFACSでは顕微鏡観察で得られるような細胞内の微細情報を得ることができないなど問題もある。



そこで分析操作の高速化と詳細な細胞情報による分取技術の両方が必要となっており、この問題を解決するために、合田氏はインテリジェント画像活性細胞選別法(IACS)の開発に成功した。IACS法では、1秒あたり1,000細胞以上の速度で解析する技術が必要であり、具体的には32ミリ秒以内に個々の細胞の情報を処理する。また深層学習を実装したAIで、それらの画像をリアルタイムに判別して特定の細胞を選抜する。極めて迅速に細胞情報を解析するという問題を解決するためには、多面体のミラーを回転させるモータを組み合わせたポリゴンスキャナーを用いることで、目的の細胞を効率良く選別することも可能にしている。2018年にIACS法を「Cell」誌に発表した論文では、51名の共著者で物理学・化学・生物学・情報科学・機械工学・電気工学・微生物学・医学などの超異分野にわたる研究者が一緒に開発した技術であることを示している。

合田氏の開発した IACS 法は非常に汎用性の高い基盤技術であり、現在世界中の研究者と 20 件以上の共同研究が実施されている。多種多様な細胞への応用展開の例として、(1)バイオ燃料に活用可能な脂質を生産するユーグレナで、特に脂質生産能の高い細胞のみを選抜する技術、(2)がんの転移を引き起こす血中循環がん細胞(CTC)を細胞サイズ、形状、表面抗原の有無などを同時に IACS で検出・分取する技術、(3)T 細胞などのリンパ球が病原体との接触領域に構築するリング状構造（免疫シナプス）の局在や強さを評価して免疫反応が高い T 細胞のみを分取する技術などが紹介された。

酵母細胞を用いた IACS の応用例として、ビール酵母各細胞の生理状態を酵母形態から発酵前に判定して、その後の発酵への影響を予測することが可能であり、新たなビールを選抜した酵母細胞を用いて開発していることも報告された。また形態的に特徴を持つ酵母を遺伝子改変株の中から効率的に IACS 法を用いてスクリーニングすることで、ゲノムワイドな研究を効率良く実施できる例も紹介された。

IACS 法を用いた今後の研究では、従来の細胞の形状や機能を事前に学習させる「教師あり」研究から、AI 科学者らとの共同研究により事前学習させない「教師なし」研究を実施することで、生物における 1 つの細胞が持っている機能の包括的な理解を目指していることも話された。

なお本セミナー終了後も、吉田先生、合田先生には視聴者との交流会に参加していただき、さらに白熱した議論が行われた。両先生ともに海外で研究室を主催した経験があり、特に東京大学・カリフォルニア大学・武漢大学の 3 カ国で研究を実施している合田先生が、日本・アメリカ・中国の研究スタイルや学生の考え方の違いなどについて話をされた。さらに、競争的な研究資金制度の現状について、最近ノーベル賞を受賞したアメリカの研究室の多くが、プライベートの財団から研究費を支給されている現状を紹介された。また、研究を支援している慈善団体のトップ 50 位までに日本の団体が存在しないことなど、科学研究を推進するための研究費に財団が果たす役割にも言及され、大変有意義なセミナーとなった。

以上