様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年 　５ 月 ２９ 日現在

機関番号： １２６０１
研究種目： 若手研究(A)
研究期間： 2013～2017
課題番号： ２５７１１００８

研究課題名（和文）細胞世代時間の平均-分散関係と環境に依存しない固有成長性質の抽出

研究課題名（英文）Extracting environment-independent cellular growth properties based on phenomenological growth laws

研究代表者
若本　祐一（Wakamoto, Yuichi）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：３０５１７８８４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　20,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、大腸菌、分裂酵母、白血球系がん細胞を対象に、定常環境下における分裂や死の定量計測を行い、細胞生理の現象論的法則を明らかにすることを目指した。研究の結果、大腸菌では世代時間の平均と分散が線型に関係することを見出し、この関係があらゆる定常環境下での成長率の原理的上限を与える可能性を示唆した。さらに、分裂酵母の長期1細胞計測により、定常環境下での分裂率と突然死の発生率が線型に関係することを見出した。この関係から、分裂率を上げるとそれ以上に死亡率が大きくなるというトレードオフを明らかにした。また白血球系がん細胞の1細胞計測を実現するマイクロ流体デバイスを開発した。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we aimed to unravel the phenomenological laws that impose the constraints on growth and death of individual cells under constant culture conditions, using E. coli, S. pombe, and L1210 lymphocytic leukemia cells as model organisms. The study revealed the linear relation between the means and the variances of E. coli generation time, which might determine the maximum bound of growth rate of this organism in any constant environments. Long-term single-cell measurement of S. pombe revealed the linear relation between division rate and death rate in constant environments, which demonstrates the trade-off that faster growth is linked with even higher death rates at the single-cell level. We also developed a new microfluidic device for long-term single-cell measurements of L1210 cells.

研究分野： 生物物理学

キーワード： 1細胞計測　細胞情報・動態　成長・分裂

１．研究開始当初の背景

(1) 基本的背景

成長・分裂は細胞の最も基本的な生理現象である。細胞の成長動態に見られる規則や定量法則、およびその背景機構を理解することは、自己複製系としての細胞に課されている制約の解明につながる可能性がある。

細胞の成長能力は、細胞種によって大きく異なる。しかし、ある特定の細胞種の絶対的な成長能を評価しようとしても、培養液の種類やそこに含まれる栄養源の種類の違いなどによって成長率が大きく変化するため難しい。したがって「大腸菌と酵母、どちらの成長能力が高いか？」といった細胞の成長能力の絶対比較は不可能に思える。たとえ同じ培養条件で両者を培養し、大腸菌の方が速く成長できたとしても、それはたまたま大腸菌がその条件に適していただけかもしれない。他の条件を用意すれば酵母の方が速く成長できる可能性を否定できない。

一方で、実際に細胞培養を行っている多くの研究者は、大腸菌の方が絶対的な成長能力が高いという経験的感覚を持っているであろう。どんなに適した培養条件を用意できたとしても、大腸菌と同じように、酵母を 20 分に 1 回の頻度で分裂させることは不可能に思える。しかし無数に可能性がある培養条件の全てを探索することはできない。ではやはり、異なる細胞種の絶対的な成長能力を評価する方法はないのだろうか？

(2) 予備的実験による着想

この問題に対し、我々の研究グループでは、本研究課題の着想につながる予備的実験結果を得ていた。

我々は、微細加工技術を用いて作製したマイクロ流体デバイスと、多点タイムラプス顕微鏡技術を組み合わせ、細胞の成長や遺伝子発現量などの時間変化情報を 1 細胞レベルで高精度に取得できる「ダイナミクス・サイトメーター」と呼ばれる独自の計測技術を開発していた（特許第 5231684 号）(図 1)。この計測技術を用いれば、実験者側が厳密に制御した培養条件下で 100 世代以上にわたる細胞の状態変化を 1 細胞レベルで連続計測できる。計測で得られるタイムラプス顕微鏡画像を解析すれば、 1 細胞レベルの巨大な系統樹（図 2) や細胞サイズの時間変化などの情報を取り出せる。また、これらの情報を一度の実験で多数の細胞から同時に取得できるため、統計的に信頼性の高い成長動態の定量解析が可能となる。

我々は本研究課題の申請以前に、このダイナミクス・サイトメーターを用いて様々な定常環境条件下で大腸菌の 1 細胞計測を行っていた。その計測の結果から、同じ遺伝型を持つクローン集団内の細胞の世代時間分布（分裂から次の分裂までにかかる時間の分布) が、培養条件に依存して大きく変化することを明らかにしていた。さらに、その分布を比較すると、世代時間の平均 (E) と分散 (V) は独立には変化できず、両者のあいだには、V=a (E-b)という線型関係があることを示唆する予備的実験結果を得ていた。

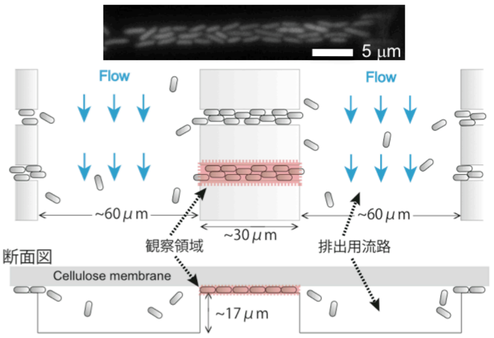


図 1. ダイナミクス･サイトメーターの概要図. 観察領域中の細胞を長期間観察し続けることができる.

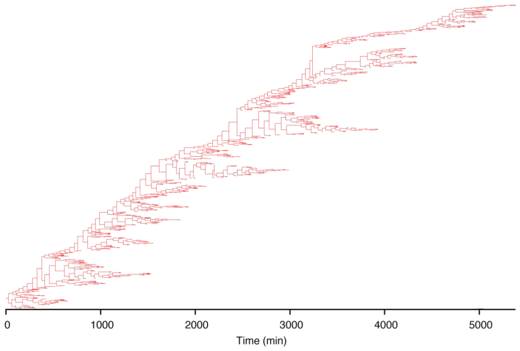


図 2. ダイナミクス・サイトメーターにより取得された 1 細胞系統樹.

この線型関係は、炭素源や培養温度、培地組成など、複数の環境パラメーターを変化させて見出されたものであり、具体的な環境の変化のさせ方に依存しない。この線型関係が正しいとすると､成長率を上げるためには（言い換えると平均世代時間を小さくするためには）世代時間のばらつきを小さくする必要があるという、重要な現象論的ルールを示している。またパラメータ a, b も重要な意味を持つ。特に b は、分散が 0 になる極限での最小平均世代時間に対応している。したがって、あらゆる環境のなかでこの細胞種がとりうる成長率の原理的上限をパラメーターb が規定することになる。つまり、この b の値を知ることで、環境条件に依存しない細胞の絶対的な成長能力の高さの評価が可能となる。もし他の細胞種でも同様に、固有の最大成長能力を評価できれば、環境条件や成長・分裂の背景にある分子機構の違いに拠らない、絶対的な成長能力の差を比較・議論できることになる。

また世代時間だけでなく、細胞の他の生理的なパラメーターの変化にもこのような現象論的な制約が存在すれば、それを利用して環境条件に依存しない細胞の固有性質を抜き出せる可能性がある。

２．研究の目的

以上の背景のもと、本研究課題では以下の研究目的を設定した。

(1)　大腸菌における世代時間の平均-分散線型関係の実験検証

様々な定常環境条件で大腸菌の 1 細胞計測を実行し、予備的実験により示唆されていた世代時間の平均と分散の線型関係を検証する。

(2)　大腸菌以外の細胞種の 1 細胞計測を実現する計測技術の確立

大腸菌だけでなく、他の細胞種においても同様の関係や、他の生理パラメーターの変化に制約が存在するかを明らかにする。これを実現するため、大腸菌以外の細胞種の 1 細胞計測技術を確立させる。具体的には分裂酵母や白血球系がん細胞の 1 細胞計測技術を構築する。

(3)　確立した 1 細胞計測技術を用いた細胞生理パラメーターの現象論的法則の解明

上記(2)によって構築した計測技術を利用して、細胞生理パラメーターの現象論的法則を理解するとともに、それをもとに最大成長率などの細胞固有性質を評価する。

３．研究の方法

(1)　大腸菌における世代時間の平均-分散線型関係の実験検証

ダイナミクス・サイトメーターを用いて多数の環境条件で 1 細胞計測を実行した。大腸菌 W3110 株を用いた計測では炭素源、温度、培地組成が異なる 9 環境を用意した。また、細胞株依存性を評価するため、細胞分裂の研究で古くから用いられてきた大腸菌 B/r 株についても 1 細胞計測を行った。計測によって得られたタイムプラス画像を解析することにより、図 2 で示した形式の細胞系統樹を取得し、この情報から細胞の世代時間分布を評価した。

(2)　大腸菌以外の細胞種の 1 細胞計測を実現する計測技術の確立

大腸菌以外の細胞種を対象とした 1 細胞計測を実現するため、Wang らによって報告されている Mother machine と呼ばれるマイクロ流体デバイス（引用文献①）のデザインを参考にして、分裂酵母および白血球系がん細胞 L1210 用のデバイスを設計、作製した。具体的には、PDMS と呼ばれるシリコーン樹脂を利用し、細胞観察用のチャネルと細胞排出用のチャネルの構造を微細加工技術により構築した。細胞観察用のチャネル内では細胞が一列に連なる形で成長・分裂し、細胞排出用チャネルまで押し出された細胞は、培養液の流れに乗ってデバイス外に自動で排出される設計とした。細胞観察用チャネルは、一つのデバイス内に 1000 個以上用意されており、このチャネル内の細胞を多点タイムラプス計測により観察することで、一度に多数の細胞系列を計測できるようにした。

得られたタイムラプス画像は、新たに開発した独自の画像解析ソフトで解析し、細胞の状態変化の時系列情報を取得した。

(3)　確立した 1 細胞計測技術を用いた細胞生理パラメーターの現象論的法則の解明

上記(2)で開発したデバイスを用いて 1 細胞計測を行い、得られた細胞の状態変化ダイナミクスから、各環境条件での世代時間の情報を抽出した。また、この計測を行うことで、分裂酵母や L1210 細胞では、好環境条件であっても低頻度で細胞死が起こることが明らかになった。この結果を受け、死亡率の時間変化についても合わせて評価した。

この研究項目を進める中で、分裂酵母において細胞死と細胞内のタンパク質凝集体の関係について述べた研究が、他研究グループから報告された（引用文献②、③）。この報告を受け、我々の研究においても細胞死と凝集体の関係を調べる必要が生じ、その解析もおこなった。

４．研究成果

(1)　大腸菌における世代時間の平均-分散線型関係の実験検証

大腸菌の世代時間の平均と分散の線型関係について、実験条件を追加し、少なくとも W3110 株については線型関係が成立することを確認した（図 3）。B/r 株については、平均世代時間が同じになる条件で比較すると、世代時間の分散が W3110 株よりも小さくなることが分かった。このことから、B/r 株は W3110 株とは異なる関係にしたがうことが予想された。またこの結果は、細胞株によって内因的な分裂間隔時間のゆらぎやすさが異なる可能性を示唆している。これらの一連の結果は、PNAS 誌に論文として発表した（5.[雑誌論文]

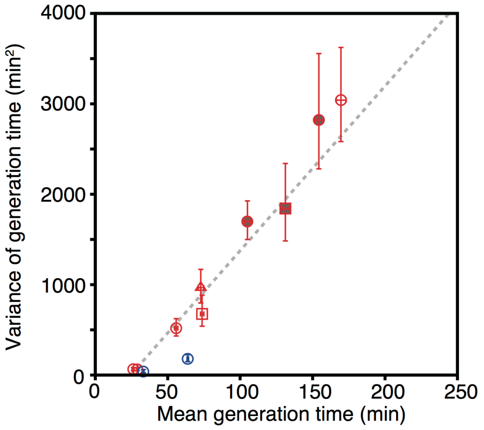


図 3. 定常環境下での世代時間の平均と分散の関係. 赤は W3110 株群、青は B/r 株を表す。

④)。
　この計測を進める中で我々は、細胞レベルでの世代時間のゆらぎが大きいと、世代時間の細胞間差に基づく集団内部の自然選択の効果により、集団全体の増殖率が増加することも明らかにした。より正確に述べると、細胞の世代時間の平均を E、これら細胞によって形成される細胞集団内の細胞数が 2 倍になるのに要する時間（ダブリングタイム）を Td とするとき、世代時間にばらつきがあると Td<E が成り立つ。これはクローン集団内の表現型ゆらぎが集団の増殖を速くするという、表現型ゆらぎの適応的意義を示している。
　さらに、ここで明らかになった細胞と集団の増殖率の差は、増殖過程を先祖細胞の立場に立って見るか、子孫細胞の立場に立って見るかで変化する世代時間の統計差と直接関係していることを理論的に明らかにした。この新たな視点に着想を得て、我々は 1 細胞計測で得られる細胞の系譜情報と、その上で観察される、注目する細胞表現型の時間変化ダイナミクスから「適応度地形」や「選択強度」の情報を抽出できることを明らかにした。これを実現する解析フレームワークを構築することにも成功し、論文として発表した（5.[雑誌論文]③）。

(2)　大腸菌以外の細胞種の 1 細胞計測を実現する計測技術の確立
　分裂酵母、および白血球系がん細胞 L1210 の長期 1 細胞計測を実現するマイクロ流体デバイスを構築した（図 4）。構築したこのデバイスを用いることで、分裂酵母、L1210 細胞、ともに定常環境下では分裂率と死亡率が一定に保たれることを明らかにした。この結果は、構築したデバイスにより定常成長条件を実現できることを示す。さらにこの結果は、これらの細胞種において定常環境下では Aging が起きないことも示している。

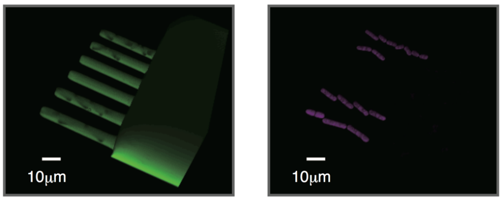


図 4. 分裂酵母の長期 1 細胞計測を実現するマイクロ流体デバイスの 3 次元像. 左の写真は流路内に蛍光分子を含む溶液を流して、流路形状を可視化したもの. 右の写真は、分裂酵母由来の蛍光シグナルを利用して、流路内の細胞を可視化したもの.

(3)　確立した 1 細胞計測技術を用いた細胞生理パラメーターの現象論的法則の解明
①　分裂酵母における成長と死の関係
　上記のマイクロ流体デバイスを利用し、分裂酵母の成長動態を 7 つの定常環境下で定量計測した。この観察を通じて、分裂酵母では、好環境条件下であっても 1 世代あたり 1-2%の頻度で、細胞が突然死を起こすことを明らかにした。当初、好環境条件下での死亡発生は想定していなかったため、分裂率と死亡率の関係を明らかにする解析をおこなう必要が生じた。解析の結果、分裂率と死亡率のあいだには、線型関係が成り立ち、分裂率が大きくなるとそれ以上に死亡率が大きくなり、細胞の寿命が短くなることを明らかにした（図 5）。つまり速く成長すると突然死も起きやすくなるというトレードオフを見出した。
　またこの分裂率と死亡率の線型関係は、定常的に増殖できる最も低い分裂率を規定する可能性が示された。一方で、世代時間の平均と分散の関係を調べると、用いる培養液が栄養培地か最小培地かに依存して異なる線型関係が現れる可能性が示唆された。栄養培地の線型関係から判断すると、世代時間の最小値は 75 分程度であると予想される。

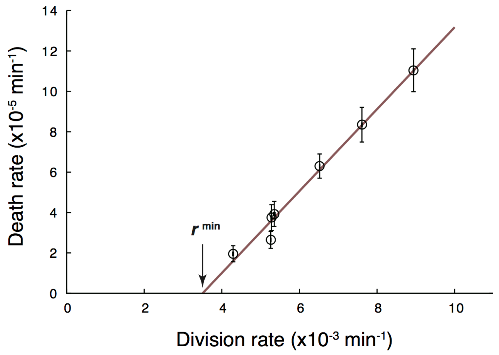


図 5. 分裂酵母で見出された分裂率と死亡率の線型関係.

　定常環境下で生じる突然死の背景機構を探るため、細胞内に生じるタンパク質凝集体の挙動を 1 細胞レベルで計測する実験を行った。その結果、従来広く受け入れられていた結果と反し、タンパク質凝集体の量や保持時間と、細胞の世代時間、死亡率のあいだに相関がないことを明らかにした。さらに、ストレス環境下では一過的に凝集体量が大きく増加するが、その凝集体を引き継ぐ細胞系列上でも、ストレス除去後速やかに分裂率が回復することを見出した。その結果、従来の定説に反し、タンパク質凝集体の量がある閾値を超えることで、細胞に負荷がかかり死亡するという描像は、少なくとも分裂酵母では成り立たないことが明らかになった。これら一連の研究結果は、PLoS Biology 誌に論文として発表した（5.[雑誌論文]①）。

② L1210 細胞における成長状態の世代間相関
　上記(2)で構築したマイクロ流体デバイスを利用した 1 細胞計測によって、L1210 細胞の定常環境下での世代時間の分布や世代間相関を計測した。その結果、これまで調べた大腸菌や分裂酵母と異なり、世代時間にエピジェネティックな正の相関があることが明らかになった。また、世代時間の相関次元の解析

をおこない、世代時間のゆらぎが決定論的なダイナミクスに駆動されていることを主張する最近の報告（引用文献④）と相反する結果を得た。さらに観察された世代時間の相関は、集団の成長率を増加させる効果があることを数値シミュレーションにより示した。

＜引用文献＞


① Wang P, et al. (2010) Robust growth of Escherichia coli. Curr Biol 20(12):1099-103.
② Coelho M, et al. (2013) Fission yeast does not age under favorable conditions, but does so after stress. Curr Biol 23(19):1844-1852.
③ Coelho M, Lade SJ, Alberti S, Gross T, Tolić IM (2014) Fusion of Protein Aggregates Facilitates Asymmetric Damage Segregation. PLoS Biol 12(6):e1001886.
④ Sandler O, et al. (2015) Lineage correlations of single cell division time as a probe of cell-cycle dynamics. Nature 519:468-471.


５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計８件）

① Nakaoka, H., Wakamoto, Y. Aging, mortality, and the fast growth trade-off of Schizosaccharomyses pombe. (2017) PLoS Biology 15(6): e2001109, 査読有, doi: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001109
② 中岡秀憲，梅谷実樹，若本祐一．１細胞レベルの環境応答と選択の計測．(2017) 化学と生物．55(4): 263-268, 査読有, doi: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.263
③ Nozoe, T., Kussell, E., Wakamoto, Y. Inferring fitness landscapes and selection on phenotypic states from single-cell genealogical data. (2017) PLoS Genetics. 13(3): e1006653, 査読有, doi: 10.1371/journal.pgen.1006653
④ Hashimoto, M., Nozoe, T., Nakaoka, H., Okura, R., Akiyoshi, K., Kaneko, K., Kussell, E., Wakamoto, Y. Noise-driven growth rate gain in clonal cellular populations. (2016) Proc Natl Acad Sci USA. 113: 3251-3256. 査読有, doi:10.1073/pnas.1519412113
⑤ Pleška, M., Qian, L., Okura, R., Bergmiller, T., Wakamoto, Y., Kussell, E., Guet, C. C. Bacterial autoimmunity due to a restriction-modification system. (2016) Curr Biol. 26(3): 404-409, 査読有, doi:10.1016/j.cub.2015.12.041
⑥ 若本祐一．細胞表現型ゆらぎの適応的意義と１細胞統計．(2015) 顕微鏡．50: 86-91, 査読有．
⑦ 野添嵩，橋本幹弘，若本祐一．１細胞計測で明らかになる集団の増殖と適応．(2013) 実験医学．31(8): 1209-1216, 査読無．
⑧ Santi, I., Dhar, N., Bousbaine, D., Wakamoto, Y., McKinney, J. D. Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria. (2013) Nature Communications. 4: 2470, 査読有, doi:10.1038/ncomms3470

〔学会発表〕（計１０件）

① Wakamoto, Y. Constraints and limits in the growth of microbial cells. Physical Approaches for Growing and Evolving Population. 2017/02/11. 東京大学生産技術研究所.
② Wakamoto, Y. Techniques for measuring and analyzing single-cell histories and lineage trees. 日本顕微鏡学会第 59 回シンポジウム. 2016/11/18. 帝京平成大学池袋キャンパス.
③ Wakamoto, Y. Growth and adaptation at the single-cell level. QBiC Symposium 2015: High-Dimensional Data for the Design Principles of Life. 2015/8/24. 理化学研究所生命システム研究センター.
④ Wakamoto, Y. Fitness and gene expression from the viewpoint of single-cell lineages. QBio NIG International Symposium. 2016/01/11. 東京大学生産技術研究所.
⑤ 若本祐一. 細胞の増殖と死に見られる定量法則. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015/12/01. 神戸ポートアイランド.
⑥ 若本祐一. １細胞統計学 - 長期１細胞計測で得られるデータの特性とその解釈について. 日本顕微鏡学会研究会. 2014/11/22. 帝京平成大学.
⑦ Wakamoto, Y. Single-cell analysis on microbial persistence and clonal proliferation. 2nd Annual Single Cell and Transcriptomics Asia Congress. 2014/10/08. Singapore EXPO.
⑧ Wakamoto, Y. Single-cell lineage statistics reveals fitness and selection strength for heterogeneous phenotypic states. BSJ2014. 2014/9/26. 札幌コンベンションセンター.
⑨ Wakamoto, Y. Quantifying cost and

benefit of heterogeneous phenotypic states in clonal populations using single-cell lineage trees and the associated dynamics. JSMB/SMB 2014 Osaka, 2014/07/29. 大阪国際会議場.

⑩ 若本祐一. 1細胞レベルの系統樹ビッグデータから解き明かす増殖法則. 2014年度人工知能学会全国大会. 2014/05/13. ひめぎんホール.

〔産業財産権〕

○出願状況（計１件）

名称：トランスクリプトーム推定装置およびトランスクリプトーム推定方法
発明者：若本祐一、小林鉱石
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許
番号：特願2017-234164
出願年月日：2017/12/06
国内外の別： 国内

○取得状況（計５件）

名称:細胞培養装置、細胞培養長期観察装置、細胞長期培養方法、および細胞培養長期観察方法
発明者：若本祐一、橋本幹弘
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：特許
番号：2,842,923（カナダ）
取得年月日：2017/02/28
国内外の別： 国外

名称:細胞培養装置、細胞培養長期観察装置、細胞長期培養方法、および細胞培養長期観察方法
発明者：若本祐一、橋本幹弘
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：特許
番号：EP2,733,199B1（欧州）
取得年月日：2016/06/29
国内外の別： 国外

名称:細胞培養装置、細胞培養長期観察装置、細胞長期培養方法、および細胞培養長期観察方法
発明者：若本祐一、橋本幹弘
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：特許
番号：US9,139,807B2（USA）
取得年月日：2015/07/22
国内外の別： 国外

名称:細胞培養装置、細胞培養長期観察装置、細胞長期培養方法、および細胞培養長期観察方法
発明者：若本祐一、橋本幹弘
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：特許
番号：CN103649302B（中国）
取得年月日：2015/04/15
国内外の別： 国外

名称:細胞培養装置、細胞培養長期観察装置、細胞長期培養方法、および細胞培養長期観察方法
発明者：若本祐一、橋本幹弘
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：特許
番号：1391679（韓国）
取得年月日：2014/04/28
国内外の別： 国外

〔その他〕
ホームページ等
① 若本研究室ホームページ
http://webpark1706.sakura.ne.jp
② プレスリリース「1 細胞レベルの成長ゆらぎがクローン集団をより速く成長させる」
http://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/20160308133646.html
③ プレスリリース「分裂酵母における成長と死のトレードオフ」
http://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/files/20170622pressrelease.pdf

６．研究組織
(1)研究代表者
若本　祐一（WAKAMOTO, Yuichi）
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：　３０５１７８８４