

学位論文 博士（理学）

人工細胞系を用いた
細胞内反応拡散波形成原理の解明

2024 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

高田 咲良

目次

第1章 序論	1
1.1 細胞内における分子配置の時空間制御	1
1.2 反応拡散共役によるパターン形成	2
1.3 細胞内反応拡散波による生命現象の時空間制御	3
1.4 従来の細胞内反応拡散波の解析方法：細胞の解析と理論モデル	5
1.5 人工細胞内再構成系による生命現象の理解	6
1.5.1 生命システムの人工細胞内再構成	6
1.5.2 細胞内反応拡散波の解析における細胞サイズ空間効果をもつ人工細胞系の重要性	7
1.6 大腸菌の細胞分裂位置を制御する Min 波	9
1.7 Min 波の人工細胞内再構成系	10
1.8 人工細胞内における Min 波の特徴と課題	11
1.8.1 人工細胞内 Min 波の条件変化に対する安定性	11
1.8.2 人工細胞内 Min 波が示す動き方のモード、波長、および周期	12
1.9 本研究の目的	13
図	14
第2章 人工細胞内における反応拡散波のモードの制御原理	17
2.1 はじめに	17
2.1.1 細胞内反応拡散波の種類	17
2.1.2 動的な細胞内反応拡散波の standing wave と traveling wave	17
2.1.3 本章の目的	18
2.2 実験	18
2.2.1 Min タンパク質の発現および精製	18
2.2.2 msfGFP および mCherry の発現および精製	19
2.2.3 人工細胞の作製および人工細胞内における自己組織化の解析	20
2.2.4 人工細胞内および試験管内における PURE system によるタンパク質合成	20
2.2.5 MinD の ATPase 活性の評価	21
2.2.6 人工細胞間におけるタンパク質濃度のばらつきの評価	21
2.3 結果	22
2.3.1 MinE 濃度による Min 波の優勢なモードの制御	22
2.3.2 MinE 濃度による Min 波の初期遷移の変化	24
2.3.3 MinDE 濃度による Min 波の優勢なモードの制御	25
2.3.4 Min タンパク質の活性による Min 波のモードの制御	25
2.3.5 同一人工細胞内における Min 波のモードの遷移	27

2.3.6 人工細胞内における MinE の合成による Min 波のモードのヒステリシスの検証	27
2.4 考察	28
2.4.1 Min 波のモード選択原理	28
2.4.2 生細胞内の Min 波と人工細胞系の比較	29
2.4.3 Min 波以外の反応拡散波のモード選択	31
図	32
 第 3 章 人工細胞内における反応拡散波の周期・波長・形状の制御原理	42
3.1 はじめに	42
3.1.1 細胞内反応拡散波の周期および波長の制御	42
3.1.2 細胞内反応拡散波の条件変化に対する適応	43
3.1.3 本章の目的	44
3.2 実験	44
3.2.1 Min 波の空間サイズに対するスケーリングの原理	44
3.2.1.1 MinE 変異体のプラスミドの作製と発現および精製	44
3.2.1.2 人工細胞内における Min 波の再構成実験	45
3.2.1.3 平面膜の作製および平面膜上における Min 波の再構成	45
3.2.1.4 Min 波の性質の画像解析	46
3.2.1.5 拡散速度の解析	47
3.2.2 2 種類のエネルギー源を用いた Min 波の制御	47
3.2.2.1 dATP を用いた人工細胞内における Min 波の再構成実験	47
3.2.2.2 MinD と脂質小胞の共沈降アッセイ	48
3.2.2.3 MinD による ATP または dATP の加水分解活性の評価	48
3.3 結果	48
3.3.1 Min 波の空間サイズに対するスケーリングの原理	48
3.3.1.1 Min 波のスケーリングのパラメータ依存性	48
3.3.1.2 波長のスケーリング	50
3.3.1.3 人工細胞内における波の数が 1 の Min 波の塩濃度安定性	52
3.3.1.4 人工細胞内における波の数が複数の Min 波の塩濃度変化への応答	53
3.3.2 2 種類のエネルギー源を用いた Min 波の制御	54
3.3.2.1 dATP による Min 波の発生	54
3.3.2.2 dATP/ATP 濃度比による Min 波の周期の制御	55
3.3.2.3 Min 波の発生における dATP の機能	57
3.3.2.4 Min 波の周期に対するエネルギー分子濃度および観察時間の影響	58
3.3.2.5 Min 波の周期による ATP/dATP 濃度比の推定	59
3.4 考察	60

3.4.1	人工細胞内における波の数が 1 の Min 波のスケーリングの原理	60
3.4.2	スケーリングの原理の一般性と生物学的意義	61
3.4.3	スケーリングによる波長問題の解釈	62
3.4.4	Min 波の塩濃度安定性の原理	62
3.4.5	ATP/dATP 濃度比による Min 波の周期の制御	63
図		66
第 4 章 総括		89
4.1	結果のまとめおよび結論	89
4.2	本研究の展望	90
4.2.1	Min 波の形成および制御機構の解明	90
4.2.2	生物学的側面における貢献と課題：様々な反応拡散波の形成原理の理解と位置情報制御の原理	92
4.2.3	物理学的側面における貢献と課題：動的な反応拡散波と定常パターン	93
4.2.4	分子ロボティクスへの貢献	95
4.2.5	本研究の展望のまとめ	96
図		97
参考文献		99
謝辞		112
付録 研究業績		116

図目次

Fig. 1-1. 細胞内反応拡散波の解析手法の比較	14
Fig. 1-2. 大腸菌における Min システム	15
Fig. 1-3. 本研究の目的	16
Fig. 2-1. Min 波の動きの 2 つのモードの MinE 濃度依存性	32
Fig. 2-2. 人工細胞間のタンパク質濃度のばらつきおよび Min 波のモードの 人工細胞サイズ依存性	33
Fig. 2-3. Min 波のモードの初期遷移への MinE 濃度の影響	34
Fig. 2-4. Min 波のモードへの MinD 濃度の影響	35
Fig. 2-5. MinDE 比によって決定される Min 波のモードの相図	36
Fig. 2-6. Min 波のモードへのカリウムイオン濃度の影響	37
Fig. 2-7. Min 波のモードへの MinDE 複合体の ATPase 活性の影響	38
Fig. 2-8. 温度シフトによる Min 波のモードの遷移	39
Fig. 2-9. 人工細胞内における MinE 合成に伴う Min 波の変化	40
Fig. 2-10. Min 波のモード選択原理	41
Fig. 3-1. 人工細胞内における Min 波の時空間特性のスケーリング	66
Fig. 3-2. 様々な物理化学パラメータ条件における人工細胞内の Min 波の波幅の スケーリング	67
Fig. 3-3. 様々な物理化学パラメータ条件における人工細胞内の Min 波の速さの スケーリング	69
Fig. 3-4. 人工細胞の膜上における msfGFP-MinD の拡散係数	70
Fig. 3-5. 実験条件の変更による Min 波の人工細胞系の反応拡散パラメータの調節	71
Fig. 3-6. MinE 変異体を用いた人工細胞内における Min タンパク質の挙動	72
Fig. 3-7. 波の数が 1 つの Min 波の波長の空間サイズによる制御	73
Fig. 3-8. 人工細胞内における Min 波の ζ と平面膜上における Min 波の ζ の比較	75
Fig. 3-9. Min 波の波幅の塩濃度依存性	77
Fig. 3-10. Min 波の速さの塩濃度依存性	78
Fig. 3-11. 人工細胞内における Min 波の波の数に対する塩濃度の影響	79
Fig. 3-12. ATP または dATP による人工細胞内における Min 波の発生	80
Fig. 3-13. ATP/dATP 濃度比による Min 波の周期の調節	81
Fig. 3-14. Min 波の周期の人工細胞サイズ依存性	82
Fig. 3-15. ATP または dATP により発生した Min 波の空間特性	83
Fig. 3-16. ATP または dATP 条件における MinD の膜結合力および加水分解活性	84
Fig. 3-17. ATP および dATP の混合溶液により形成される Min 波の周期に対する 観察時間およびヌクレオチド濃度の影響	85

Fig. 3-18. Min 波の周期による ATP/dATP 濃度比の推定	86
Fig. 3-19. 様々な ATP/dATP 比の人工細胞の混合溶液における Min 波の周期の 同時測定	88
Fig. 4-1. 細胞内反応拡散波における主要な未解決課題	97

略語

本論文で使用した化合物や実験材料、実験手法等に関する略語とその名称を **Table 1** に記す。

Table 1. 本論文で用いる化合物や実験材料、実験手法等の略語および名称。

Abbreviation	Name
ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CK	creatine kinase
CP	creatine phosphate
dATP	deoxyadenosine triphosphate
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOPG	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
GTP	guanosine triphosphate
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
MLVs	multilamellar vesicles
MTS	membrane-targeting sequence
OD ₆₀₀	optical density at 600 nm
Pi	inorganic phosphate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SLBs	supported lipid bilayers
SUVs	small unilamellar vesicles

第1章 序論

1.1 細胞内における分子配置の時空間制御

生物の細胞では、様々な生体分子の働きにより細胞分裂や極性形成、運動などの生命現象が引き起こされる。その中で分子は均一化を目指す自由拡散に逆らって細胞内の定められた場所に局在することで生命現象を時空間的に制御し、細胞内の時空間秩序を生み出している。分子が不均一に分布した分子配置を生み出す原理の基礎となるのは分子間の反応と分子輸送であり、これら単体の働きや両者が組み合わさることで、細胞内の分子配置が制御される¹⁻³。

生命現象の中心となるタンパク質は、リン酸化や加水分解による状態変化や基質との特異的な結合、多量体や複合体の形成、重合などの相互作用や生化学反応により分子の状態が変化し、その局在を調節している³。リン酸化は多くのタンパク質の状態変化のスイッチとして利用されており、たとえば真核細胞の極性を制御する PAR タンパク質の膜結合と膜解離を制御している⁴。NTPase は、ヌクレオシド三リン酸 (NTP) とヌクレオシド二リン酸 (NDP) の結合により活性化状態を転換する。たとえば、GTPase Ran は染色体付近に局在するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) RCC1 の作用により GTP (guanosine triphosphate) 結合型に転換されることで活性型 Ran の濃度勾配を形成し、紡錘体の形成に関与する⁵。より直接的に分子の局在を変える例もある。大腸菌の細胞分裂面の決定に関わる ATPase MinD は ATP (adenosine triphosphate) との結合により膜結合が可能になるなど、NTPase に結合する基質の種類が分子配置の制御の鍵となっている⁶。このようなタンパク質の反応は、液液相分離 (liquid–liquid phase separation, LLPS) により形成される液滴のように、自己集合により集団としての分子の局在を制御することも可能である^{7,8}。この液体状の集積体は膜なしオルガネラと呼ばれ、分子の濃縮による反応の促進や分子を選択的に分離し細胞質での機能を抑制するなどの機能があり⁹、転写調節^{10,11}やタンパク質の品質管理の機構¹²として重要な役割をもつ。分子の反応や相互作用は液滴という不均一局在の形成を担うだけではない。オートファジーの場の形成の起点となるプレオートファゴソーム構造体と呼ばれる Atg13 の液滴の形成において、Atg13 のリン酸化状態によって相分離するかが制御されるように、分子の反応による状態変化は液滴形成の可否の制御にも関与している¹³。そのほかにも、リン酸化やメチル化、SUMO 化などの反応が生体分子の液滴形成を制御する例は多く存在しており、細胞内の分子配置制御に大きく関与している⁷。

細胞内の分子配置を変えるもう一つの重要な要素が、分子の輸送である。これは自由拡散だけではなく、細胞骨格と分子モーターによる能動的な輸送や、細胞質や細胞皮質の移流による輸送なども含まれる^{2,3}。細胞骨格や移流による分子輸送は自由拡散に逆らって特定の場所に分子を集めさせることができ、分裂酵母では微小管により Tea1 などが細胞膜へと輸送されることで細胞極性が形成される¹⁴。また、細胞皮質におけるアクトミオシンの収縮により発生する細胞皮質の流れは、線虫初期胚において細胞質へ細胞分裂環の構成要素であ

るミオシンやアニリンを集積させ¹⁵, ホヤの卵母細胞においては母性 mRNA や myoplasm の植物極への濃縮を引き起こす¹⁶. これらの分子輸送に大きな役割を果たす細胞骨格自体のもつ特徴であるトレッドミルも, 2つの末端の脱重合と重合の非対称性により方向性を持ってフィラメントが伸長されることから, 一種の分子輸送といえる^{3,17,18}. トレッドミルを起こす細胞骨格と細胞骨格結合分子の自己組織化により形成されるラメリポディアやフィロポディアなどの構造物は, 細胞の運動や変形などを引き起こし, 細胞の時空間制御の一端を担っている¹⁸.

反応と分子輸送のそれぞれが不均一な分子配置をつくることができるが, これらが組み合わさることでより複雑で精密な構造が形成される^{13,19}. 複数種類の分子が形成する反応ネットワークと細胞質中や膜上における分子の拡散が共役すると, 分子の自己組織化により時空間に周期構造をもつ波状のパターンから, 定常状態であるものの空間的には不均一な時空間パターンまで, 様々な散逸構造が出現する²⁰. このような反応と拡散の共役(反応拡散共役)により形成される時空間パターンは, 周期構造の大きさや時間軸における周期の長さが精密に定められているという特徴をもち, 細胞内において分裂位置⁶や運動方向, 変形²¹, 細胞極性⁴などを制御していることが明らかになってきている. 周期的な時空間パターンの精密さと可塑性は, 異なる細胞においても相対的に同じ位置に細胞内の座標を決定できる利点があり, 細胞分裂位置や細胞極性のような高い再現性で位置決めが必要な生命現象の制御に適している.

1.2 反応拡散共役によるパターン形成

生物では動物の体表模様^{22,23}や指紋²⁴, 魚類の鰓や動物の指の骨格²⁵⁻²⁷など, 様々なパターン形成が見られる. これらのパターンは全て, 反応拡散共役による自己組織化により形成される. そのコンセプトは, 1952年に数学者である Alan Turing により生物の形態形成を制御するモルフォゲンの安定的な濃度勾配の形成原理として提唱された²⁸. 通常, 分子はエントロピーの増大に向かって拡散し, 均一になろうとする. しかし, Turing はその拡散が不均一なパターンの形成に寄与していると考えた. 活性化因子とその濃度に依存して活性化因子の分布の拡大を抑制する阻害因子から構成される化学反応ネットワークに, 活性化因子が自身の濃度に依存して増加するというフィードバックを加えると, 分子が拡散により均一になるのに逆らい, 局所的に活性化因子が増大するようになる. この状態では活性化因子が阻害因子によって抑制されることで活性化因子の高濃度領域が波のように移動するため, 安定した濃度勾配とはならない. 活性化因子の不均一分布の伝播を止めるため, 阻害因子の拡散が活性化因子の拡散速度に比べて十分速いという制約を加えると, 阻害因子は活性化因子の拡散に先回りして系全体に広がり, 活性化因子の拡散を広く阻害する. 結果として, 活性化因子は自己增幅が起きた場所から分布を広げることができず, その場でのみ局所的に増幅する^{23,29}. このようにフィードバック制御を含む化学反応ネットワークが, 分子の状態や種類によって異なる速さで広がる分子拡散と共にすることで, パターン形成が起こる.

Turing モデルにおいては、モルフォゲンの濃度勾配の形成の観点から空間的に不均一な定常パターンが注目された。しかし、活性化因子と阻害因子の相互作用やポジティブフィードバックが存在する系においては、(i) 一様状態、(ii) 空間一様な振動運動、(iii) salt-and-pepper pattern のような極めて波長が短い定常波、(iv) 有限波長の定常波、(v) 有限波長の振動波、(vi) 極めて波長が短い振動波の 6 種類の状態が出現し得る^{23,28}。このような一様状態が不安定化した時空間に周期的な散逸構造は反応拡散波と呼ばれ、そのダイナミクスは反応ネットワークの形状や反応定数、拡散速度によって様々に変化する。前述のように阻害因子の拡散が活性化因子に比べて非常に速い場合は、個々の分子は拡散するもののマクロな構造は定常的な(iv) の Turing pattern と呼ばれる斑点模様や縞模様が形成される。この Turing pattern は動物の体表模様^{22,23} や指紋²⁴、四肢の骨格²⁵⁻²⁷ など細胞間相互作用により出現する生物のパターン形成の原理として知られている。一方、拡散条件の厳しい制約がない場合、(v) のような空間だけではなく時間軸にも周期性をもつ動的な波が形成される。たとえば、二次元展開された Belousov-Zhabotinsky 反応 (BZ 反応) では、同心円状に伝播していく進行波や螺旋状の波が観察される^{30,31}。このような反応拡散波は空間サイズに依存しない固有波長や周期を内在の性質として有するため、反応拡散共役は時空間的によく制御された構造を形成することができる。

反応拡散共役によるパターン形成は非平衡下で出現する非線形な物理現象であるため、その理解は容易ではない。しかし、セリウム塩と臭化物イオンを触媒としてマロン酸をプロモ化する BZ 反応やその派生系を用いた実験、および BZ 反応のエッセンスを抽出した Brusselator モデル³² や二変数に単純化した Oregonator モデル^{33,34} などの理論解析を用いて、反応拡散波の理解が進められてきた。実験においては、拡散速度や温度、実験系の空間条件や体積が BZ 反応により形成される反応拡散波のダイナミクスに影響を与えることが実証されてきた³¹。たとえば、BZ 反応に必要な要素と Aerosol OT (AOT) から構成される油中水滴を混合した BZ-AOT 反応のような BZ 反応の派生系を用い、要素濃度により螺旋状の波から定在波、定常的な Turing pattern まで様々な時空間パターンが形成されることが示されている³⁵。理論解析においても、様々なダイナミクスの波の出現条件の解明や^{36,37}、Turing pattern が出現可能な反応ネットワークの探索³⁸、曲面における Turing pattern の新規特徴の発見³⁹、理論における反応拡散波が出現する不安定性の新たな解析方法の提案⁴⁰ などが行われている。このように、BZ 反応を中心とした実験や単純化した理論モデルを用い、反応拡散波の多様なダイナミクスや出現条件が明らかにされている。

1.3 細胞内反応拡散波による生命現象の時空間制御

反応拡散波はエネルギーの流入と散逸がある非平衡開放系に出現する散逸構造に属している。しかし近年、物理的に閉鎖された微小空間である細胞内においても時空間特性が精密に制御された反応拡散波が形成されることが明らかになってきた⁴¹。このように細胞内において反応拡散共役により形成される時空間パターンは細胞内反応拡散波と呼ばれ、非平衡

開放系の現象であるにも関わらず、要素濃度が保存されること、空間的な周期条件があることから、通常の反応拡散波とは異なる振る舞いを示す。このような複雑な特性を持つにも関わらず、細胞内反応拡散波は真核細胞や原核細胞問わず幅広い生物種において細胞分裂⁶や極性形成^{4,42}、運動^{21,43}など様々な生命現象の制御に利用されている。

真核細胞において様々な構造体を形成するアクチンは、その制御因子と共に反応拡散波も形成する^{44,45}。動物細胞では、Lamellipodium や Filopodium などのアクチンの構造体とは異なり、Hem1 や Rho, Rac などによるアクチンの重合促進と F-アクチン依存的なネガティブフィードバックが組み合わさることで、これらの分子が膜上に空間周期的な高濃度領域のパターンを形成し、個々の分子は膜局在と細胞質への拡散を繰り返しながら分子集団の高濃度領域が膜上を移動する^{21,46,47}。このような反応拡散方程式により説明可能な分子の高濃度領域の不均一なパターンが細胞内反応拡散波である。アクチン波は細胞の運動方向や変形⁴⁴、細胞質分裂位置⁴⁸などの制御に関わっていることが示唆されているが、その生物学的な意義は完全には明らかではない。細胞性粘菌では、相互抑制の関係にある脂質分子 phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃) とその分解酵素 phosphatase and tensin homolog (PTEN) の形成する反応拡散波がアクチンの時空間パターンを誘導する⁴⁹⁻⁵²。PIP₃はアクチン重合を促進するため、結果的にアクチン波も形成され、細胞膜を押し出すことで粘菌の細胞変形とそれに伴う運動を引き起こす⁴³。また、原核細胞においては細胞分裂面を制御する Min 波と呼ばれる反応拡散波が発生する^{53,54}。この波は細胞極間を往復することで細胞中心面を決定するが、ATPase MinD とその活性を誘起する MinE が ATP 依存的な膜結合と ATP の加水分解と細胞質中と膜上における拡散を繰り返すことで形成される^{6,55}。アクチン波や PIP₃/PTEN 波は traveling wave、Min 波は standing wave が主流であるが、細胞の種類や変異株によっては化学モデル系や理論で知られているような様々なタイプの波が発生することが報告されている。

反応拡散共役は時間軸に周期性をもつ動的な波だけではなく、Turing pattern のようにマクロには定常的なパターンも形成する。細胞内においても Turing-type mechanism により定常的なパターンを作り出す現象として、線虫初期胚における PAR 系^{4,42}や出芽酵母における Cdc42 のクラスター形成⁵⁶が知られている。PAR 系はポジティブフィードバックにより自身を細胞皮質ヘリクルートする aPAR と pPAR と呼ばれる 2 種類のタンパク質群の相互阻害の反応ネットワークにより構成され、細胞膜上において aPAR と pPAR が分極したドメインを形成することで細胞の前後軸を制御する^{4,42,57}。出芽酵母の Cdc42 は、GEF Cdc42 による Cdc42 の活性化、活性型の GTP-Cdc42 のポジティブフィードバックによる膜へのリクルート、および GTPase 活性化タンパク質 (GAP) Bem3 による Cdc42 の不活性化と、細胞質中および細胞膜上における異なる速さの分子拡散が共役し、細胞膜上で一箇所に集合したクラスターを形成する^{56,58,59}。このクラスターが収縮環を形成するセプチンなどをリクルートし、出芽位置を制御する。これらの定常パターンは、Turing pattern の形成に必要な側方抑制 (lateral inhibition) と同等の効果を持つ空間全体における分子の枯渇 (global depletion) と局

所的な活性化 (local activation) による Turing-type mechanism により定常パターンが形成されることが理論により示されている^{59,60}. しかし、これらのパターンの構成因子は移流または細胞骨格による分子輸送の影響を受けるため^{2,61}、純粋な反応拡散系としてのメカニズムの全容は明らかではない.

このように反応ネットワークや反応拡散条件の違いにより、動的な波から定常的なパターン、分子の高濃度領域の数が複数の波から 1 つの波まで、異なるダイナミクスの細胞内反応拡散波が形成されている. 生体分子の集団が形成する細胞内反応拡散波は、分子間相互作用による情報伝達や機械的な力を生み出すことにより、細胞内の位置情報を決定する. したがって、細胞内の時空間秩序の理解のためには、細胞内反応拡散波の形成および制御原理の解明が必要である.

1.4 従来の細胞内反応拡散波の解析方法：細胞の解析と理論モデル

細胞内反応拡散波の分子メカニズムや特性を明らかにする手法として最もよく行われているのが、細胞の観察である. 遺伝子組み換えされた細胞株における反応拡散波の挙動と標的分子の対応から、細胞内反応拡散波を形成する分子や分子間相互作用のネットワークが明らかにされてきた. また、FRAP（光褪色後蛍光回復法）による膜上の分子の拡散速度の測定^{61–63} や *in vitro* の生化学的な解析^{55,64,65} も、反応拡散波の理解に重要な分子間の相互作用、反応速度、拡散速度の知見の蓄積に貢献してきた. しかし、夾雑因子の多い細胞の観察では未知因子の影響を排除できないため、細胞内反応拡散波の形成に必要な最少因子の同定は困難であった (Fig. 1-1A).

この点を解決する手段の一つとして、細胞内反応拡散波を細胞内において再構成することでより詳細なパターン形成原理が解明してきた. 細胞内再構成とは、本来は細胞内反応拡散波が形成されない細胞内において細胞内反応拡散波を形成させることである. たとえば、通常は波が発生しないアフリカツメガエルの未成熟卵母細胞にポジティブフィードバックを担う Ect2 およびネガティブフィードバックを担う RGA-3/4 を発現させることで興奮性の Rho とアクチンの波が出現したことから、これらの因子によるフィードバック制御が波の発生に十分であることが実験的に示されている⁴⁷. PAR 系の極性形成においても、ヒトの非分極細胞や出芽酵母における PAR タンパク質の過剰発現^{66,67}、人工的に設計されたクラスター化タンパク質によるドメイン形成を利用した PAR タンパク質の局在制御⁶⁸などによりパターンの細胞内再構成が盛んに行われ、パターン形成における標的分子の機能や分子間相互作用の原理の解析が行われている.

細胞の観察と並行して理論による理解も進められてきた. 反応拡散系は活性化、阻害、ポジティブフィードバック、ネガティブフィードバックから構成される反応ネットワークの構造を表した反応拡散方程式により記述できる (Fig. 1-1B). そこで、細胞の解析により明らかになった分子ネットワークを元にした反応拡散モデルにより、細胞内で見られる時空間パターンとの対応が解析してきた^{46,59,69–73}. さらに、*in vivo* 実験に対応するパラメータを理

論モデルにおいても摂動させることで、細胞内と同じ挙動を示すか検証されている^{47,61,74-76}。このように、*in vivo* 解析により示された反応ネットワークの理論的な妥当性を確かめることで、パターン形成原理の理解が試みられてきた。

反応拡散波を生命現象と捉えた細胞解析による検証と、細胞内反応拡散波を物理現象と捉えた理論による解析を組み合わせることで、細胞内反応拡散波の形成に関わる因子の一部が明らかになってきている。しかし、細胞内における反応拡散波の再構成の場合でさえも、細胞を用いた研究では内在因子の影響を排除できず、下流因子の作用と標的分子の作用を区別できないことから、反応拡散系をその他の現象と切り離して解析することは困難である。分子間相互作用だけではなく、細胞質の流動¹⁷や空間形状^{31,77}、ATP や細胞膜などの共通資源の奪い合いも分子拡散や生化学反応ネットワークに影響するため⁷⁸⁻⁸⁰、パラメータ変化に対して敏感な反応拡散系の挙動を正確に捉えるのは困難である。これらの細胞内の複雑さ故に、細胞の実験結果と理論解析を精度良く対応させることは難しく、パターン形成原理の全容の解明は困難である。この課題を克服し細胞内反応拡散波のパターン形成原理を理解するには、反応拡散系を構成する分子以外の因子の影響が排除され、理論との対応が可能な実験系を用いた検証が必要である。

1.5 人工細胞内再構成系による生命現象の理解

1.5.1 生命システムの人工細胞内再構成

生体分子をエマルションやリポソームなどの細胞を模倣した膜構造に内包した人工細胞系を用いることで、生命現象の原理を明瞭に解釈することができる⁸¹ (**Fig. 1-1C**)。脂質二重膜により区画化されたリポソームは、実際の細胞に類似した構造をしているが、作製条件の制約や安定性の低さから内包物を自由に選択できること、およびリポソーム間のばらつきがあることから、系統化された解析は容易ではない。一方、脂質の単層膜に覆われた液滴であるエマルションは、構造が非常に安定で容易に調製できるため、後述する細胞サイズ空間効果の検証に適した実験系である⁸²。実験者が分子を組み合わせてつくる人工細胞系は、要素濃度や物理化学パラメータ、空間サイズの制御が容易であるため、標的分子や反応パラメータなどの影響を直接的に検証できる⁸³。試験管内反応や平面膜とバルクから構成される系などの開放系を利用した試験管内再構成系もあるが、人工細胞系であれば、微小閉鎖空間の閉じ込めの効果や界面の効果などの細胞サイズ空間そのものの影響が反映された現象を解析可能である⁸² (**Fig. 1-1C,D**)。人工細胞系の実験条件の高い制御性や空間の特徴を利用して、生細胞を用いた解析では理解が困難な非線形・非平衡現象の原理の解明や、細胞サイズ空間がもたらす効果の解明が可能になる。

これまでに、人工細胞系を用いて生命現象を物理の視点から理解する試みが多く行われてきた。アクチンの自己組織化構造物の解析はその代表例である。人工細胞にアクチン、Arp2/3、ミオシンなどの精製タンパク質や細胞抽出液を内包すると、自己組織化によりアクチンの様々な構造物が形成される⁸³。生細胞とは異なり細胞質の分子組成の変化や細胞のサ

イズや形状の変化などの条件の変動がないため、実験条件とアクチンの動態の直接的な対応付けが可能である。このようなシンプルな実験系を用いて、人工細胞内における自発的なアクチンのリング構造の形成⁸⁴や、アクチンの膜局在と人工細胞と基盤の接着による人工細胞の運動の誘導⁸⁵、アクトミオシンネットワークの収縮の力と界面の相互作用のバランスの重要性⁸⁶、細胞サイズ空間におけるアクトミオシンの自発的な対称性の破れ⁸⁷など、アクチンとその関連分子のみが自発的に示す機能が明らかになった。さらにアクチン以外の分子についても、LLPS の液滴界面の機械的作用による微小管とキネシンの渦流の発生⁸⁸や、バクテリアの細胞骨格分子 MreB の重合による人工細胞の変形に対する膜上の分子混雑の重要性⁸⁹、アフリカツメガエルの卵母細胞の細胞抽出液を内包した油中水滴における紡錘体サイズのスケーリングの原理^{90,91}などが解明されている。

人工細胞系を用いて生命現象を追求した先行研究が示すように、人工細胞系は実験者の手で任意のタイミングで生命現象をつくり出すこと、そして定義された要素から構成されることから、現象が平衡に達した状態ではなく現象の開始および進行過程の観察や、観察される現象と要素濃度の対応、界面の効果の検証が可能である。さらなる展開として、再構成系の改変による未知の生命現象の発見や、複数の再構成系同士の相互作用も解析できる。これらの人細胞系の特性から、人細胞系は要素と現象、あるいは現象同士を直接対応付け、夾雜因子の多い系では解釈が困難な現象の物理的視点からの理解を可能にする有用な手法であるといえる。

1.5.2 細胞内反応拡散波の解析における細胞サイズ空間効果をもつ人工細胞系の重要性

これまでに様々な生命現象の原理解明に貢献してきた人工細胞系は、非平衡下における非線形現象である細胞内反応拡散波においても、その形成原理を解明するための優れた材料である。人細胞系は物質の流入出が限られた閉鎖系の一種であるが、細胞内反応拡散波形成におけるエネルギー分子が十分量存在する場合は暫定的な開放系と同様に一時的には散逸構造である反応拡散波が形成可能である。しかし、細胞サイズ空間の微小性や閉じ込め効果、空間形状などの特殊性は、反応拡散波の動態や速度、波長などの特徴を決定付ける反応速度パラメータや分子配置を変化させるため、これらの細胞サイズ空間の効果の検証を行う点でも、人細胞系は有用な検証手段となる⁸² (Fig. 1-1D).

細胞サイズ空間は微小さゆえに、膜面積/体積比が大きく、要素数が限られる。そのような空間に膜結合分子が存在する場合、ほとんどの分子が膜に結合し、細胞質中の分子が枯渇する。一方、膜に対しバルクが無限に存在する開放系の空間においては、膜上の分子が飽和するため、バルクに分子が豊富に存在する。このような細胞サイズ空間における細胞質中の分子の枯渇により細胞質中の実効濃度が制限されるため、分子枯渇が Cdc42 や PAR 系のパターン形成の鍵となっていることが示唆されており^{1,60,61,92-94}、反応拡散波の形成原理の理解において十分考慮する必要がある。

膜面積/体積比は反応速度パラメータにも影響を及ぼす。ここで、閉鎖空間において膜結合および膜解離の反応を起こす分子の振る舞いを考える^{73,95}。空間が小さく膜面積/体積比が大きな空間においては、一度膜から解離し細胞質中を拡散した分子はすぐに膜と出会い、膜結合する。一方、空間が大きい、つまり膜面積/体積比が小さい場合、膜から解離した分子は近傍の膜と出会う確率が低くなるため、分子の内在の性質としての膜結合速度および膜解離速度は同じにもかかわらず、膜結合が起こりにくくなる。この膜面積/体積比による膜結合の頻度の変化は、楕円形やロッド状のように界面の曲率が一様ではない空間において大きな影響を及ぼす。曲率の大きい極近傍（長軸方向の末端）では、局所的な膜面積/体積比が大きくなるため分子は膜結合しやすくなり、曲率の小さい細胞中央付近（長軸の中央）においては、局所的な膜面積/体積比が小さくなるため分子は膜結合しにくくなる。つまり、その分子に固有の膜結合速度と解離速度を有していても、楕円のような曲率が不均一な空間では極への膜結合が促進される。このような非対称な空間における分子の状態遷移の不均一性は、PAR系のパターンの軸方向の制御⁷³や、楕円形の細胞空間におけるシロイヌナズナのMinDの双極性パターンの形成⁹⁵を説明可能であることが示されており、反応拡散波の形成に大きな影響を与える。

分子拡散速度も細胞サイズ空間の影響を受ける。細胞サイズ空間では空間サイズによって分子の拡散速度が変化することが知られている。希薄溶液を内包した油中水滴中における拡散速度は空間サイズによらず一定であるのに対し、高濃度のポリエチレングリコール(PEG)溶液を用いると、PEGの構造の不均一性の影響により空間サイズが小さいほどGFPの拡散速度が速くなる⁹⁶。一方で、PEG溶液中における低分子Rhodamine 6Gの拡散、および高濃度BSA溶液中におけるGFPの拡散は、空間サイズが小さいほど遅くなることが報告されている⁹⁷。微小空間において拡散が遅くなる現象は、水分子と脂質膜の相互作用により内部の高分子同士の相互作用が変化するという、膜と分子間の間接的な長距離相互作用によると考えられている。同様の理由により、球状の油中水滴をディスク型にすると、油中水滴の高さが減少し閉じ込め効果が強くなるため、拡散速度が低下する。空間のサイズや形状、内包される分子の種類によって分子が細胞サイズ空間から受ける影響が変わり、分子拡散の応答も異なるため、反応拡散系も実際の細胞を模倣した空間における実験が必要である。

細胞サイズ空間が影響を及ぼすのは、個々の分子の反応パラメータや拡散速度だけではない。細胞サイズ空間のもつ閉鎖性と微小性は、反応拡散波という分子集団の振る舞いの理解をより一層困難にする。閉鎖空間は自己重なり合いの周期境界条件であるため、反応拡散波の時空間の周期性と組み合わさった場合、どのような性質を示すのかは実験なしには理解が難しい。また、これまで反応拡散波の多くの研究が行われてきた開放系における実験では、空間サイズが波の波長に対して非常に大きく、空間サイズによらず一定の固有波長をもつ波が出現していた^{30,31,98}。しかし、細胞サイズ空間は細胞内反応拡散波の波長と同程度であるため、波が離散的な性質を示す。微小閉鎖空間の空間サイズが固有波長の整数倍となることは稀であるため、波長や微小空間全体に形成される分子の高濃度領域の数がどのように

決定づけられるのかという疑問が生じる。細胞のような周期性をもつ空間において反応拡散波が形成された例はなく、微小閉鎖空間において反応拡散波の周期性がどのような影響を受けるかは未知である。

これらの知見から、細胞サイズ空間そのものが反応拡散波の分子配置、反応速度、分子拡散、周期性などに大きな影響を及ぼすと考えられる。細胞サイズ空間の効果は使用している分子やそれらの組み合わせなどにより変化するため、細胞の観察から得られた知見や理論解析、*in vitro* 系における分子単体の振る舞いなどからは予測が困難である。細胞内反応拡散波に対する細胞サイズ空間の効果を解明するには、細胞サイズの効果を再現可能であり、空間サイズを自由に変更できる人工細胞系を用いた解析が必須である。

1.6 大腸菌の細胞分裂位置を制御する Min 波

細胞内の時空間パターンのうち、*in vivo* と *in vitro* の実験および理論の両方で研究が進んでいるのが、大腸菌において細胞分裂位置を決定する Min 波である⁹⁹。細胞極間を往復する波は MinD と MinE の 2 種類のタンパク質の反応拡散共役によって形成されるが、細胞分裂位置の決定には細胞分裂開始因子 FtsZ の重合を阻害する MinC が必要である⁶。Min 波により細胞極で高濃度、細胞中央で低濃度となる Min タンパク質の濃度勾配が形成されると、MinC により細胞極でのみ FtsZ の重合が阻害される^{54,100}。結果として、MinC 濃度の低い細胞中央で FtsZ により Z リングが形成され、細胞分裂面が細胞中央に規定される (Fig. 1-2 右)。

1999 年に GFP 融合型の Min タンパク質の観察により Min 波が初めて観察されて以降^{53,54}、細胞内における Min 波の挙動と生化学解析、そして反応拡散方程式を用いた理論解析により、その分子メカニズムが明らかにされてきた (Fig. 1-2 左)。細胞質中の ADP 結合型 MinD が ATP 型に変換されると、二量体化する。MinD は膜結合領域をもつが、二量体化により膜結合するのに十分な親和性を有するようになるため、ATP 依存的に細胞膜に結合する^{101,102}。明確な相互作用領域は明らかではないものの、MinD 二量体同士の側方相互作用によるポジティブフィードバックを介した MinD の膜への蓄積が重要であることが示されている^{103,104}。MinE は細胞質中で 6β-close 構造と Membrane Targeting Sequence (MTS) と呼ばれる膜結合配列が露出した 6β-open 構造の平衡状態にあり、6β-open 構造になると細胞膜に結合する¹⁰⁵。細胞膜上で MinD と MinE が相互作用すると MinE は 4β 構造に変化し、MinD の ATPase 活性を誘起する^{106,107}。MinD が自らに結合している ATP を加水分解すると单量体に戻り、MinD が細胞膜から解離する^{55,108,109}。ここで MinE は MinD と共に膜から解離する場合と、単体で細胞膜に残りさらなる MinD の膜結合を阻害する linger 効果と呼ばれる現象を示す場合がある^{110,111}。ATP の加水分解を経て細胞質に拡散した MinD が反対側の細胞極に結合するという周期を繰り返すことで、細胞極間を振動する。細胞分裂を阻害する MinC は時空間パターンの形成には不要であり、MinD と結合し共局在することで振動運動を示す。

Min 波は、細胞内反応拡散波の中で唯一精製因子により再構成されている。2008年にLooseらにより、MinDE および ATP を脂質平面膜上に添加すると時空間の周期性をもつ Min 波が出現することが報告された⁹⁸。この再構成実験により、Min システムの分子メカニズムが示すように、MinDE, ATP および細胞膜が Min 波形成の最少因子であることが示された。さらに、Min タンパク質濃度や変異体^{98,112}、分子拡散速度^{113,114}や脂質組成¹¹¹、塩濃度¹¹¹などのパラメータにより Min 波の波長や速度が変化したことから、反応拡散パラメータが Min 波の特徴の制御に重要であることが明らかにされてきた。

しかし、平面膜上において再構成された Min 波の研究により、生細胞内と開放系における Min 波の性質には差異があることが明らかになった。大きな違いの一つは、Min 波の動き方である。生細胞内においては standing wave が発生するが、平面膜上においては膜上を連続的に伝播する traveling wave が出現する上に、波長が *in vivo* の Min 波の 10 倍程度の大きさであるという差異もあった^{98,110,111,115}。Min 波の動き方については、MinD の膜結合を増強した変異体の使用した条件¹¹⁶や、フローセルを用いてバルクの MinD 濃度を低濃度に制限した特殊条件下¹¹⁷では平面膜系でも standing wave が発生することが報告されており、開放系と細胞サイズ空間では standing wave の発生条件が異なることが示唆された。生細胞と平面膜系とともに、空間条件に着目した解析は多く行われており、生細胞の形状を模倣した微細構造上に張られた平面膜における standing wave の出現^{118,119}や、バルクの厚みを制限した開放系における膜面積/体積比による波の種類や波長の変化^{120,121}、形状やサイズが様々に操作された大腸菌細胞における Min 波の挙動や振動の軸方向の制御^{77,122}からも、細胞サイズ空間という微小体積、および大きな膜面積/体積比を持つ空間が Min 波に開放系とは異なる効果を与えることが示してきた。これらの空間条件が反応拡散波に影響するという実証から、精製因子による再構成であっても平面膜系における検証だけでは、細胞内における Min 波の形成原理の理解には不十分であるといえる。

1.7 Min 波の人工細胞内再構成系

平面膜上において Min 波が再構成されてから約 10 年後、人工細胞内においても精製因子を用いて Min 波が再構成されたことが報告された^{123–125}。この系では、精製した MinD および MinE, ATP をリン脂質で覆われた油中水滴やリポソームに内包することで、細胞内と同様に MinD の単一の高濃度領域から成る Min 波が出現する。注目すべき点として、大腸菌極性脂質で形成された人工細胞内において Min 波を安定的に発生させるには、細胞内の分子混雑環境を模倣するため高濃度 (10–100 mg/mL) のウシ血清アルブミン(BSA) の添加が必要であった¹²⁵。人工細胞系では、生細胞内の MinDE の濃度と同様に MinD と MinE が等モル濃度に近い限られた濃度条件でしか発生しない¹²⁶。無細胞タンパク質合成系 PURE system により人工細胞内において MinDE を発現させることによっても Min 波が発生可能であり、Min 波出現の MinDE 濃度依存性を利用することで同一の人工細胞内において要素濃度の変化により Min 波の発生と消失が制御可能であることも示された¹²⁷。

精製因子という定義された要素を用いた Min 波の人工細胞内再構成系が構築されたことで、その形成原理の検証が行われてきた。たとえば、細胞サイズ空間と開放系では波の発生条件が異なることが示されている。開放系とは異なり人工細胞内において Min 波を発生させるために必要な高濃度 BSA は、単体では細胞質に局在するはずの MinE の膜への非特異的な吸着を複数種の分子の競合効果 (multimolecular competition) により抑制し、生細胞内と同様の分子配置にする効果があることが明らかになった⁷⁹。生細胞には Min 波の分子メカニズムとは無関係の因子が大量に存在するが、それらの夾雑因子が膜面積/体積比が大きい細胞サイズ空間の膜と Min タンパク質の相互作用を調節しているという新たな視点が提示された。人工細胞系は要素を選択できることも特徴の一つであり、特に致死的な条件において検証できることは人工細胞系の大きな利点である。実際に、野生型に対して膜結合力や MinD との相互作用が変化した MinE 変異体を生細胞において発現させると Min 波が消失するため分裂異常が起きるが¹⁰⁵、人工細胞系においては変異体濃度を変えると Min 波が発生可能であった¹²⁶。この結果により、MinE の状態そのものではなく、要素濃度と反応速度定数により決定する反応速度が Min 波の発生を決定づけており、異なる活性を持つ分子を用いても濃度を調節することで波が形成されることが明らかになった。

これまでに、人工細胞内再構成系では要素濃度や反応パラメータ、空間サイズを精密に制御できることを活用し、Min 波が発生しない条件から生細胞と類似した条件、波が発生するもののその振る舞いが特殊な条件まで様々な現象を解析することで、その形成原理が検証してきた。人工細胞系は幅広い条件において実験可能であるのに加え、定義された要素から構成されるため現象と実験条件の対応が明確であること、理論との対応も可能であることから、細胞内反応拡散波の形成原理の理解に大きく貢献可能である。

1.8 人工細胞内における Min 波の特徴と課題

細胞内反応拡散波は周期や速度、波長、波の形状、動き方などにより特徴付けられる。細胞内反応拡散波を構成する分子が分裂阻害や細胞骨格分子のリクルートを行うことにより生命現象を制御するため、細胞内反応拡散波のダイナミクスや時空間特性に注目した解析がこれまでに行われてきた^{47,51,74,128,129}。Min 波においても、MinC の局在そのものが細胞分裂が阻害される領域を決定するため、細胞分裂位置を決定するためには MinCD 高濃度領域の幅（波幅）や振動の周期などの性質が制御されていなければならない。そのような Min 波の時空間ダイナミクスの特徴に関して、人工細胞系と生細胞内の Min 波には共通点があると同時に、相違点や制御原理が未解明な点が存在している。

1.8.1 人工細胞内 Min 波の条件変化に対する安定性

人工細胞系と生細胞内の Min 波の共通点として、条件変化に対する安定性が挙げられる。生細胞は、成長や細胞分裂による細胞サイズの変化や、外部環境の塩濃度の変化など、様々な条件変化に曝されている。Min 波が環境変化の中で適切に細胞分裂位置を決定するには、

波が出現し続けるだけではなく、その時空間特性が維持される必要がある。細胞サイズ変化は細胞が生きている限り必ず起こる現象であるが、生細胞では細胞の成長に伴いサイズが大きくなる中でも Min 波の周期がほぼ一定に保たれると共に、細胞膜に対する波の被覆領域が細胞の成長とともに増大する¹³⁰。このサイズ変化への適応により、適切に細胞極における細胞分裂を阻害できるようになっていると考えられる。空間サイズ変化への Min 波の適応現象は、人工細胞系においても観察されている。人工細胞内において MinD 高濃度領域の数が 1 つの場合、MinD 高濃度領域の幅と Min 波の進む速度が人工細胞の直径に対して線形に増加するスケーリング現象が見出された¹³¹。以下、本論文では MinD 高濃度領域の幅を波幅と呼ぶ。波幅と速度のスケーリングは、人工細胞の膜面に対する波の被覆率と波が人工細胞断面を一周するのにかかる周期ともに、人工細胞サイズによらず一定になることを意味する。一般に、開放系の反応拡散波の特性は空間サイズに依存しないため、スケーリングは細胞サイズ空間特異的な現象である。

細胞サイズ変化以外に想定される環境変化への Min 波の応答として、人工細胞内の Min 波は塩濃度変化に対しても安定性を示した¹³¹。平面膜上で再構成された Min 波は、カリウムイオン濃度の増加に対し波幅と速度が大きく増加することが知られている¹¹¹。一方で、人工細胞内の Min 波は、波幅と速度の両方において平面膜上に比べ塩濃度に対する変化が小さいことが明らかになった。これも生細胞が外部環境変化によらず適切に細胞分裂を行うための何らかの仕組みが再現されていると考えられる。空間サイズ変化や塩濃度変化などの条件変化に対する開放系および人工細胞系における Min 波の応答が異なることから、細胞サイズ空間特異的に Min 波は環境変化への安定性を獲得していると考えられるが、そのメカニズムは不明である。

1.8.2 人工細胞内 Min 波が示す動き方のモード、波長、および周期

人工細胞系と生細胞内における Min 波には細胞サイズ空間特異的に現れる特徴に共通点があるが、動き方のモードや波長、周期には違いが見られている。生細胞内の Min 波は振動運動である standing wave を形成することで細胞極でのみ細胞分裂を阻害する。一方、人工細胞内における Min 波の最安定状態は traveling wave や細胞質局在と膜上の局在の振動を繰り返す pulsing であり、standing wave の発生割合は低い¹²⁵。そのため、人工細胞内で standing wave が安定的に発生する条件どころか、安定に発生可能か否かさえも不明である。この点において、平面膜上における Min 波のほとんどは traveling wave であるのに対し、桿菌の形状を模倣したチャンバーに張られた平面膜上においては standing wave が発生したことから¹¹⁹、standing wave 発生における空間形状の重要性が指摘されている。しかし、その制御原理の検証には空間形状や物理化学パラメータを制御可能な実験が必要不可欠であり、未解明である。

人工細胞内における Min 波は、波長が生細胞における Min 波よりも大きいという違いも存在する。細胞分裂阻害によりフィラメント状になった細胞における MinD 高濃度領域の数

が複数の Min 波の観察から、*in vivo* における Min 波の波長はおよそ 10 μm であることがわかっている⁵³。一方、人工細胞系においては円周 60 μm 程度の人工細胞内に MinD 高濃度領域の数が 1 つの Min 波が出現するため、*in vitro* における Min 波の波長は *in vivo* の 10 倍程度と非常に長い^{124,125}。平面膜上の Min 波の波長は分子混雑¹¹³ やイオン条件¹¹¹、膜面積/体積比¹²⁰などにより変化するものの、生細胞と同程度の短さの Min 波は観察されておらず、生細胞内において短い波長の Min 波が形成される原理は不明である。

Min 波の時間に関する特徴である周期も、人工細胞系と生細胞で差が生じている。Min 波が適切に細胞分裂位置を規定するには、細胞極間を振動する波が各細胞極に適切な時間滞在する必要がある。しかし、生細胞内の Min 波の周期は 40-120 秒であるのに対し⁵³、人工細胞系では周期が約 4 分と長い¹²⁵。細胞サイズ空間における周期の制御原理もまだ解明されておらず、検証が必要である。

1.9 本研究の目的

本研究では、Min 波の人工細胞内再構成系を用い、細胞サイズ空間における時空間パターン形成原理を理解することを目的とした (Fig. 1-3)。第 2 章では、細胞内反応拡散波の動きのモードの制御原理の解明を試みた。大腸菌細胞では Min 波の standing wave が発生するのに対し、人工細胞系では traveling wave が主流であったことに着目し、Min タンパク質濃度や塩濃度、温度などにより変化する反応速度が Min 波のモードを制御するか検証した。異なる条件下の人工細胞の比較だけではなく、パラメータによるモードの制御を利用することで、同一人工細胞内においてパラメータ変調に伴いモードの遷移が可能かを検証した。第 3 章では、反応拡散波の周期や速度、波幅、波長などの時空間特性の制御原理を解明するため、空間サイズによる Min 波の制御として知られていた速度と波幅のスケーリング¹³¹に着目した。スケーリングがパラメータ依存の現象か否かを調べるため、様々な条件下で Min 波を再構成することで解析した。波の空間的特徴のうち波幅だけではなく、空間内の MinD 高濃度領域の数が 1 つの場合に反応拡散波が本来もつ空間周期性の性質がどのように変化するかを、開放系において再構成された Min 波と比較することで検証した。スケーリング現象と開放系において Min 波の性質を大きく変える塩濃度に対する Min 波の応答を統合し、細胞サイズ空間において Min 波が空間サイズや塩濃度に対して安定性を示す理由を考察した。さらに、時空間特性の決定原理を解明するために、低分子化合物による单一パラメータの変調を行った。その過程で発見した dATP (deoxyadenosine triphosphate) が Min 波のエネルギー源となるという現象を利用し、周期の制御を試みた。dATP を用いた場合の Min 波のパラメータの変化の結果と合わせて、エネルギー源により Min 波の時空間パターンが変化する仕組みを考察した。最後に、第 4 章において本研究の結果を総括し、Min 波の形成原理の理解や、細胞内の時空間パターンの理解についての課題、反応拡散波の物理的視点からの理解に対する貢献などについて今後の展望を議論した。

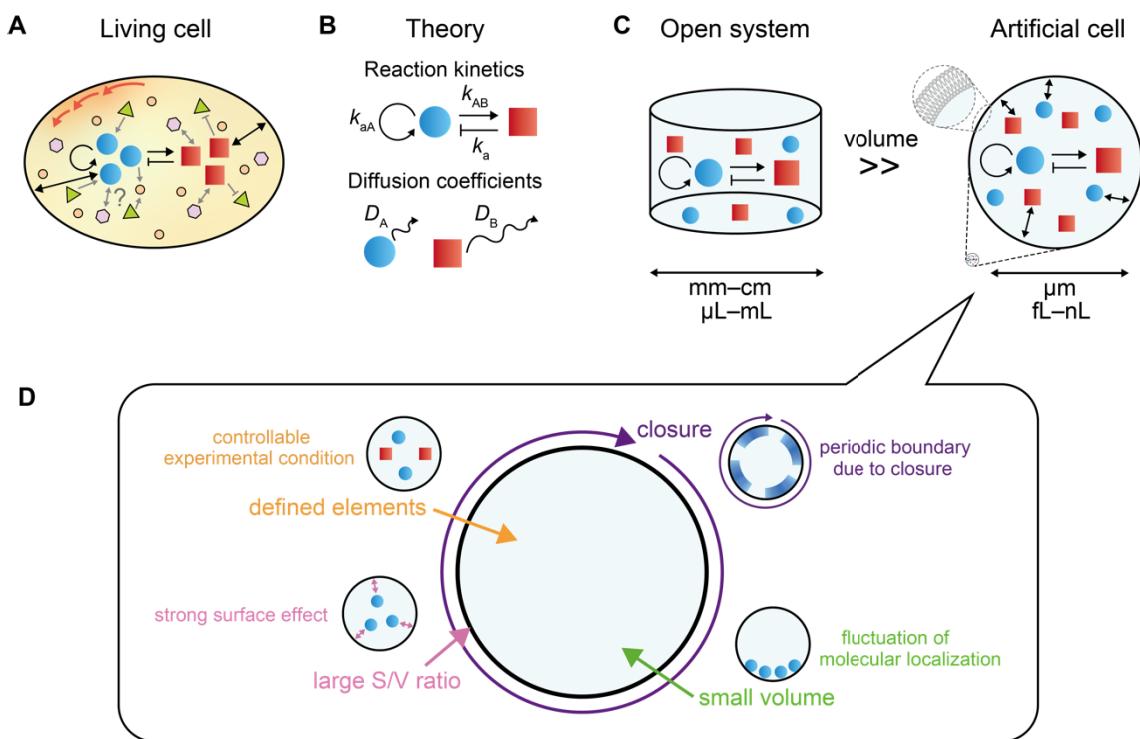


Fig. 1-1. 細胞内反応拡散波の解析手法の比較

(A) 生細胞を用いた細胞内反応拡散波の解析。生細胞内では、内在因子と細胞内反応拡散波の未知の相互作用(灰色の矢印)や細胞質の流れ(赤矢印)のような機械的な刺激の影響が生じる。(B) 理論解析。細胞内反応拡散波は反応拡散方程式により記述され、反応ネットワークの構造や反応定数、拡散係数により異なる振る舞いを示す。(C) *in vitro* 再構成系。細胞内反応拡散波の再構成系は開放系と人工細胞系の2つに分類される。両者とも定義された因子から構成可能であるが、実験系の空間サイズと閉じた空間であるか否かに違いがある。(D) 人工細胞系の特徴と細胞内反応拡散波への影響。細胞サイズ空間の閉鎖空間および微小体積、大きな膜面積体積(S/V)比はそれぞれ、細胞内反応拡散波の周期性への影響や分子濃度の揺らぎ、分子への強い界面の効果をもたらす。人工細胞系は定義された要素から構成されるため、要素濃度や反応パラメータの影響を直接的に検証可能である。

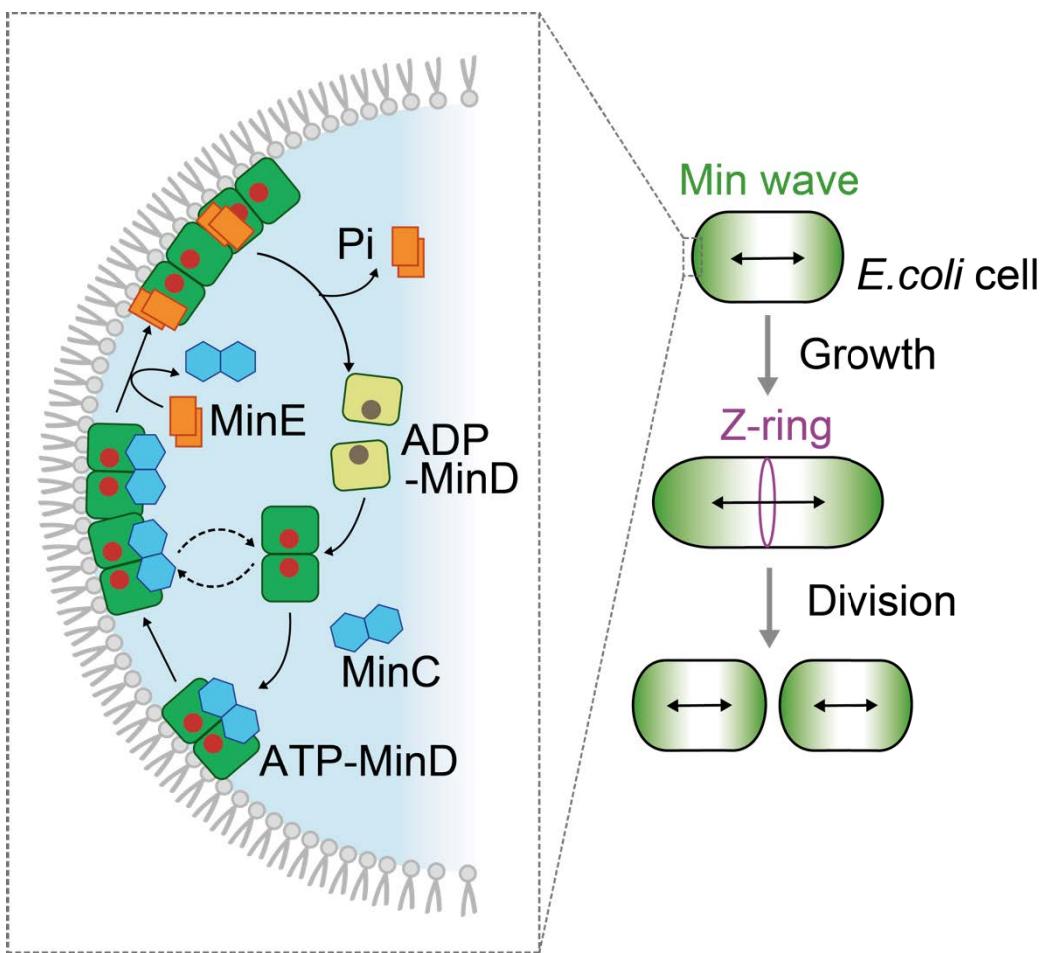


Fig. 1-2. 大腸菌における Min システム

大腸菌では MinD と MinE により細胞極間を振動する反応拡散波 (Min 波) が形成される。左 : Min システムの分子メカニズム。右 : Min 波の振動運動により MinC の時間平均濃度が細胞中心面において最小となる。Min 波が細胞極での Z-ring 形成を阻害することで、Z-ring 形成位置が細胞中心面に決定される。

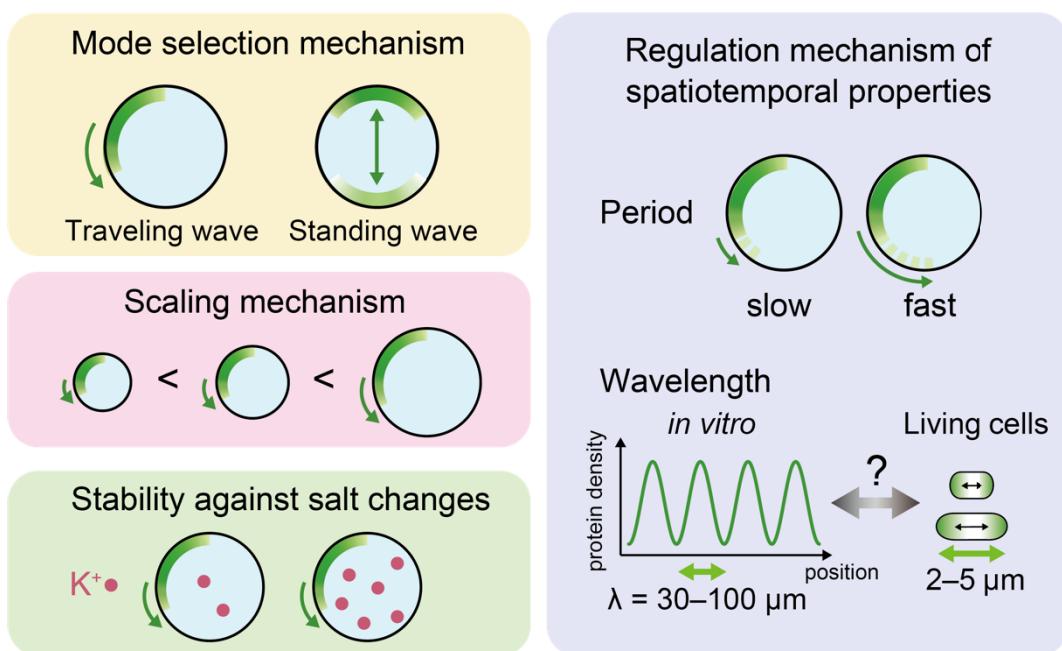


Fig. 1-3. 本研究の目的

本研究では、Min 波の人工細胞系を用い、細胞内反応拡散波の形成原理を解明することを目的とした。細胞内反応拡散波の形成原理として、Min 波の動きのモードの選択原理およびスケーリング現象、塩環境への安定性、周期や波長などの時空間特性の制御原理に着目し、これら個々の現象の解明を試みた。

第2章 人工細胞内における反応拡散波のモードの制御原理

2.1 はじめに

2.1.1 細胞内反応拡散波の種類

細胞ではアクチン波や Min 波, PAR 系, Cdc42 系などの反応拡散系が示す時空間パターンが生命現象の位置情報を生み出している。そのような細胞内反応拡散波は動的な波と定常的なパターンの 2 種類に分類できる。さらに、動的な波は連続的に伝播するような traveling wave と特定の領域間で振動運動をする standing wave の 2 種類のモードに分けられる。たとえば、細胞性粘菌や動物細胞におけるアクチン波は traveling wave であり^{43,44}, 大腸菌の Min 波は standing wave である⁵³。アクチン波であれば、膜上をアクチンが伝播することで細胞膜が押し出され、細胞の変形とそれに伴う運動を引き起こす^{44,45,49}。また、Min 波であれば、細胞分裂阻害因子 (MinC) が細胞極間を往復することで細胞極における分裂を阻害し、細胞分裂位置を規定する⁶。アクチン波において standing wave が出現すれば全く違う形に細胞変形が引き起こされ、Min 波において traveling wave が出現すれば細胞全体で細胞分裂が阻害されるため、細胞分裂異常が生じてしまう。このように動的な波のモードはその機能に直結しているため、細胞内反応拡散波のダイナミクスが制御される必要があるが、その原理は未だ明らかではない。

2.1.2 動的な細胞内反応拡散波の standing wave と traveling wave

精製因子を用いた再構成系が構築されている Min 波は、平面膜系と人工細胞系とともに standing wave と traveling wave の両方が観察されている。しかし、その制御原理は未解明である。たとえば、生細胞内において細胞分裂位置を制御可能な Min 波は standing wave であるのに対し、油中水滴の人工細胞内においては pulsing, standing wave, traveling wave の順に状態が遷移してしまうため、standing wave の発生割合は低く、traveling wave が最安定状態であった¹²⁵。さらには、リポソームを用いた系においては standing wave と traveling wave 共に最終的に pulsing に遷移してしまうことが報告されており¹²⁴、人工細胞中で standing wave が安定的に発生する条件どころか、安定に発生可能か否かさえも不明である。

反応拡散波のモードの制御因子として、空間形状の重要性が指摘されている。これは、平面膜上における Min 波のほとんどは traveling wave であるのに対し、大腸菌の桿菌の形状を模倣したチャンバーに張られた平面膜上においては standing wave が発生したことに由来する^{118,119}。しかし、細胞分裂の阻害や細胞骨格分子の欠損によりフィラメント状や球状になった細胞でも standing wave が見られていること^{132,133}や、平面膜系においても膜親和性を増強した MinD 変異体¹¹⁶ やバルク中の分子の枯渇を利用した実験系¹¹⁷ では standing wave が発生している。このように大腸菌生細胞のようなロッド状の空間形状でなくても standing wave の発生が確認されていることから、必ずしも空間形状が Min 波のモードを制御してい

るとは言えない。空間形状以外に波のモードを制御する因子があるか否かは未開拓であるため、モード選択原理の検証が必要である。

2.1.3 本章の目的

細胞内反応拡散波の一つである Min 波の人工細胞内再構成系を用い、反応拡散波のダイナミクスのモードの制御原理を解明することを本章の目的とした。動的な波である standing wave および traveling wave は、人工細胞系においてどちらも発生することが知られていたものの、生細胞内において発生する standing wave の発生割合が人工細胞系では非常に低かった。そこで、反応速度を変化させるパラメータを変更した Min 波の人工細胞系において波のモードを解析し、standing wave の発生率が増加する条件を探索した結果、MinDE の濃度比や MinE の膜結合速度、MinD の ATPase 活性などのパラメータによって優勢なモードが変化することを見出した。さらに、パラメータの変動によって同一人工細胞内においてモードの遷移を制御可能などを実証した。これらの結果より、MinD の膜結合と膜解離のバランスが Min 波のモードを制御していることが明らかになった。

2.2 実験

2.2.1 Min タンパク質の発現および精製

先行研究^{125,127}において構築されたプラスミド pET15-MinD, pET29-MinE, pET15-msfGFP-MinC を用いて大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を形質転換し、pET15 由来プラスミドの場合はアンピシリン、pET29 由来プラスミドの場合はカナマイシンを含む LB 培地 4 mL に植菌し、37°C, 200 rpm において一晩培養した。プラスミドに対応する抗生物質を含む LB 培地 250 mL に前培養した菌体を 2.5 mL 添加し、37°C, 200 rpm において培養した。波長 600 nm での濁度 (OD₆₀₀) が 0.8 に達した時点で isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるように添加することでタンパク質発現を誘導し、さらに 1.5 h 培養した。大腸菌を培養した LB 培地を 50 mL チューブに移し、4°C, 8000×g, 2 min で遠心することで集菌し、-80°C において保存した。

発現したタンパク質を精製するため、Lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.6), 300 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 20 mM imidazole, and 1 mM dithiothreitol (DTT)] を 5 mL 菌体に添加して懸濁し、MinD および MinE は Sonifier250 (Branson, Danbury, CT, USA), msfGFP-MinC は Sonifier SFX150 (Branson) を用いて超音波破碎した。His-MinD の場合は、0.1 mM ADP を Lysis buffer に添加したものを使用した。超音波破碎後、4°C, 20000×g, 30 min の条件で遠心し、上清を可溶性画分として取得し、HPF Millex HV (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) に通した。予め DTT を含まない Lysis buffer を用いて平衡化した Ni Sepharose 6Fast Flow (Cytiva, Tokyo Japan) 1 mL に可溶性画分を添加し、4°C において 30 min 振盪し、His タグを介して目的タンパク質を Ni 樹脂に結合させた。混合溶液を Poly-Prep Chromatography Column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に添加し、素通り画分を回収した。さらに 25 mL の

Wash buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.6), 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 25 mM imidazole, and 10% Glycerol] を添加することで Ni 樹脂を洗浄し, 2 mL Elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.6), 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 500 mM imidazole, and 10% Glycerol] を添加することで His タグ付きタンパク質を溶出した。msfGFP-MinC の場合は, 溶出したタンパク質溶液に 10 mL の 50 mM Hepes-KOH (pH7.6) を添加することで 5 倍希釈した。Poly-Prep Chromatography Column に予め添加し 50 mM Hepes-KOH (pH 7.6) により平衡化した 0.5 mL Q Sepharose High Performance (Cytiva) に, 希釈したタンパク質溶液を添加し, 素通り画分を回収した。洗浄バッファー [50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 50 mM KCl] を 4 mL 添加することで陰イオン交換樹脂を洗浄し, 溶出バッファー [50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 300 mM KCl] を 2 mL 添加することで目的タンパク質を溶出した。

得られたタンパク質溶液全量を AmiconUltra-0.5 3K (MinE), 10K (MinD および msfGFP-MinC) (Merk Millipore) に加え, 4°C, 14,000×g, 20 min 遠心することで濃縮した。ここに Storage buffer [50 mM HEPES-KOH (pH7.6), 150 mM GluK, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10% Glycerol] を溶液量が 500 μL になるように添加し, 再び遠心により濃縮した。His-MinD および His-msfGFP-MinD の場合は 0.1 mM ADP を添加した Storage buffer を使用した。元の溶液が 1/500 以下になるまで濃縮と Storage buffer の添加を繰り返すことでバッファー交換を行い, 最後に溶液量が 100–200 μL になるようにタンパク質溶液を濃縮した。精製過程における各画分を SDS-PAGE することで分子量ごとに分子を分離し, Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により精製を確認した。また, 濃度既知の BSA 溶液の希釈系列とともに精製タンパク質を SDS-PAGE した後に CBB 染色を行うことでタンパク質を検出し, Fiji ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いてバンドの強度を定量することでタンパク質濃度を定量した。精製タンパク質は-80°C において保存した。

2.2.2 msfGFP および mCherry の発現および精製

msfGFP の発現のため, pSUMO-msfGFP¹²⁷ を用いて大腸菌 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株を形質転換し, アンピシリン含有の LB 培地 4 mL に植菌し 37°C, 200 rpm で一晩培養した。前培養した培養液 2 mL をアンピシリン含有の LB 培地 200 mL に植菌し, 37°C, 200 rpm で OD₆₀₀ が 0.4 になるまで培養した。IPTG を終濃度 0.1 mM になるように添加し, さらに 37°C, 200 rpm で 3 時間培養した。集菌, 細胞の破碎, Ni 樹脂によるアフィニティ精製は 2.2.1 と同様に行った。ただし, バッファー中の NaCl 濃度は 500 mM とし, Ni 樹脂には Ni-NTA agarose (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いた。溶出後, SUMO タグを Ulp1¹²⁷ を添加することで切断し, 20 mM Hepes-KOH (pH 7.6) を用いて 20 倍希釈したタンパク質溶液を Ni 樹脂に添加することで, Ulp1 と切断した SUMO タグを除去した。素通り画分を HiTrap Q Sepharose (Cytiva) と混合した後, 20 mM Hepes-KOH (pH 7.6) および 125 mM KCl から成るバッファーにより目的タンパク質を溶出した。精製した msfGFP は AmiconUltra-0.5 10K を用いて 300 μM 程度になるまで濃縮し, 280 nm の吸光度により濃度

を定量した。mCherry は先行研究において精製されたものを使用した¹³⁴。精製した msfGFP および mCherry を -30°C において保存した。

2.2.3 人工細胞の作製および人工細胞内における自己組織化の解析

クロロホルム中に溶解された 25 mg/mL *E.coli* polar lipid (Avanti, Alabaster, AL, USA) 20 μL をガラスミクロチューブに添加し、アルゴンガスを穏やかに吹き付けることでクロロホルムを揮発させた。作製した脂質フィルムにミネラルオイル (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 500 μL 加え、Bransonic (Branson) を用いて 90 分間 60°C で超音波処置を行った。1 分間ボルテックスすることで脂質分子を分散させ、脂質溶液を調製した。

人工細胞内における Min 波の再構成の通常条件の場合、Reaction buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM GluK, 5 mM GluMg] 中に 0.1 μM His-msfGFP-MinC, 1 μM His-MinD, 1 μM MinE-His, 2.5 mM ATP および 100 mg/mL BSA を混合することで人工細胞の内液を調製した。ここで予め BSA (A6003, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を水に溶解し、AmiconUltra-0.5 50K (Merck Millipore) による限界濾過を用いて濃縮と Reaction buffer の添加を繰り返すことで、Reaction buffer に置換された BSA 溶液を調製した。BSA 濃度は、Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) または 280 nm の吸光度の測定により定量した。人工細胞の内液は、実験の目的に応じて各要素の濃度を設定し、任意の濃度になるように調製した。調製した内液 1 μL を 50 μL の脂質溶液に添加し、マイクロチューブを 15 回程度タッピングすることでエマルションを作製した。作製した人工細胞溶液 20–30 μL を、両面テープをスペーサーとして貼り合わせた 2 枚の Neo Micro cover glass 25 mm×36 mm および Neo Micro cover glass 18 mm×18 mm (Matsunami Glass, Osaka, Japan) の間に注入し、顕微鏡観察用サンプルを作製した。人工細胞内における Min タンパク質の挙動を蛍光顕微鏡 (AxioObserver Z1; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した。室温以外の温度で観察する場合、glass heating stage (Tpi- SQFTX; Tokai Hit, Shizuoka, Japan) を顕微鏡に取り付け、顕微鏡観察用サンプルの作製直後にサンプルを顕微鏡に置くことで観察を行った。また、Min 波発生の初期状態を観察する場合、人工細胞の内液の調製において ATP の代わりに 10 mM creatine phosphate (CP), 0.1 μM creatine kinase (CK) および 2 mM adenosine diphosphate (ADP) を加え、人工細胞作製直後の様子を観察した。蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス画像を撮像し、Fiji ソフトウェアを用いて解析した。

2.2.4 人工細胞内および試験管内における PURE system によるタンパク質合成

無細胞転写翻訳系として PUREfrex 1.0 (Gene Frontier, Chiba, Japan) を使用した。マイクロチューブ内において、低分子混合溶液 [20 mM Hepes-KOH (pH7.6), 30 ng/μL tRNA, 10 μg/mL 10-formyltetrahydrofolate, 20 mM creatine phosphate, 2 mM DTT, 180 mM potassium glutamate, 2 mM spermidine, and 14 mM magnesium acetate (いずれも終濃度)], 20 アミノ酸混合溶液、NTPs 混合溶液 [2 mM ATP, 2 mM GTP, 1 mM cytidine triphosphate (CTP), and 1 mM uridine triphosphate

(UTP)(いずれも終濃度)], および 1 nM *nanoLuc* DNA, PUREfrex 1.0 の solution II およびIIIを混合した。*nanoLuc* DNA は pSUMO-NanoLuc を鋳型として, T7_prom(DNA 配列 [5'から 3'] : CCCGCGAAATTAAATACGACTCAC) および T7_term プライマー (DNA 配列 [5'から 3'] : CAAAAAACCCTCAAGACCCGT) を用いて PCR することで調製した。タンパク質合成量を制御するため, 20 アミノ酸の濃度を任意の濃度に変更した。室温 (25°C) において 4 時間反応させた後, 合成された NanoLuc 濃度を Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) により定量した。

Min 波の人工細胞系において MinE を合成する場合, 0.1 μM His-msfGFP-MinC, 1 μM His-MinD, 0.7 μM MinE-His, 100 mg/mL BSA, 上記の低分子混合溶液, 20 アミノ酸混合溶液, NTPs 混合溶液, 1 nM *minE* DNA, PUREfrex 1.0 の solution II およびIIIを混合し, エマルション内に内包した。*minE* DNA は pET29-MinE を鋳型として, T7_prom および T7_term プライマーを用いて PCR することで調製した。2.2.3 と同様の方法で顕微鏡観察用サンプルを作製し, Min タンパク質の挙動の変化を蛍光顕微鏡により観察した。

2.2.5 MinD の ATPase 活性の評価

脂質小胞として Small Unilamellar Vesicles (SUVs) 溶液を調製するため, クロロホルム中に溶解した 25 mg/mL *E.coli* polar lipid 100 μL をガラスミクロチューブに添加し, アルゴンガスを穏やかに吹き付けることでクロロホルムを揮発させ, 脂質フィルムを作製した。室温において 3 時間減圧乾燥することで, 脂質フィルムをさらに乾燥させた。脂質フィルムに脂質の終濃度が 4 mg/mL になるように Reaction buffer を 625 μL 添加し, 一晩室温で静置した。1 分間ボルテックスをすることで Multilamellar Vesicles (MLVs) 溶液を作製した。この MLVs 溶液を Mini Extruder (Avanti) を用い, 孔径 1.0, 0.4, 0.05 μm のフィルター(Whatman polycarbonate Nucleopore filter discs; Cytiva) にそれぞれ 11, 11, 41 回ずつ順に通すことで SUVs 溶液を作製した。SUVs 溶液は室温で保存した。

MinD の ATPase 活性の温度依存性を評価するため, 1 μM His-MinD, 1 μM MinE-His, 2.5 mM ATP, and 1 mg/mL SUVs 溶液の混合溶液を調製し, 25°C, 29°C, および 37°C において反応させた。反応開始直後から 40 分後までの溶液を 10 分毎に分取し, 各時間において合成された無機リン酸 (Pi) 濃度を BIOMOL Green (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA) を用いて定量した。ATPase 反応速度を時間に対し Pi 濃度をプロットした回帰直線の傾きから算出した。

2.2.6 人工細胞間におけるタンパク質濃度のばらつきの評価

0.4, 1, 2, および 4 μM の等モル濃度の msfGFP および mCherry, 100 mg/mL BSA の混合溶液を 2.2.3 と同様の方法でエマルションに内包し, 顕微鏡観察用サンプルを作製した。人工細胞内における msfGFP および mCherry の蛍光シグナルを共焦点顕微鏡 (FV1000; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮像した。Fiji ソフトウェアの Analyze Particle method を用いて各人

工細胞における msfGFP および mCherry の蛍光強度を定量した。各濃度における平均蛍光輝度から作製した検量線を用いて、各人工細胞における msfGFP および mCherry の濃度を定量し、濃度比のばらつきを評価した。

2.3 結果

2.3.1 MinE 濃度による Min 波の優勢なモードの制御

先行研究における油中水滴を用いた人工細胞内再構成系により、Min 波はまず膜と細胞質間のパルス振動を示し、次に standing wave が出現し、最後に traveling wave へと遷移することが示されている¹²⁵。このような Min 波のモード遷移は、球形細胞では traveling wave が最安定に出現することを示唆している。しかし、大腸菌の生細胞は細胞壁合成の阻害により球状となった場合でも standing wave が発生することが報告されている¹³³。この違いが人工細胞内再構成系と細胞内条件の違いに由来するのであれば、MinDE の濃度比と MinDE に融合した蛍光タンパク質が、Min 波のモードの違いを生み出す要因の候補と考えられた。先行研究における再構成系では MinD と MinE が等モル濃度である一方で、生細胞では MinDE 濃度に差があり、MinD は MinE の 1.4 倍の濃度である¹³⁵。蛍光タンパク質を用いた Min 波の可視化方法も Min 波の挙動に影響することが考えられた。先行研究¹²⁵では Min 波の観察のために MinDE 両方に蛍光タンパク質を融合していたが、これによる分子量の増加は分子拡散速度を変化させるため Min 波を発生させる反応拡散共役に影響を及ぼすと推測される。さらに、先行研究では MinE の C 末端に蛍光タンパク質が付加された MinE-mCherry が使用されていたが、このような MinE の C 末端へのタンパク質の融合は MinE の機能を阻害することが示唆されている¹³⁶。そこで、本研究では蛍光タンパク質を融合していない MinDE を用い、MinD と結合する msfGFP-MinC を添加することにより人工細胞内の Min 波を可視化することにした。MinC は二量体化した ATP 型 MinD と結合し、MinE が MinD と相互作用すると MinD から解離するため、膜上の msfGFP-MinC は膜上の MinD の局在を示し、細胞質中に msfGFP-MinC が見られる場合は膜上の MinD が少ないことを示す。したがって、msfGFP-MinC により Min 波を追跡できる^{55,137}。ただし、MinD の MinC 結合領域と MinE 結合領域は重複しており、過剰量の MinC の添加は波の発生に阻害的となると考えられる⁹⁹。実際に、大腸菌生細胞では MinC の濃度は MinDE の 1/10 程度と低濃度になっている⁹⁹。実験において使用する蛍光顕微鏡による検出感度を考慮し、msfGFP-MinC を MinD 濃度の 1/5 以下で添加することにした。

上記の系を用い、先行研究¹²⁵と同様に MinDE をそれぞれ 1 μM の条件において人工細胞を蛍光顕微鏡観察すると、約 90% の人工細胞で Min 波が発生し、振動運動をする standing wave と膜上を伝播する traveling wave の両方が観察された (Fig. 2-1A)。standing wave では、膜上的一部分に MinD の高濃度領域が形成された後 MinD が膜から解離することで波が消失し、細胞質において均一に局在する状態を経て、人工細胞中の反対側の膜に再び MinD の高濃度領域が形成された。この膜上における不均一局在と細胞質局在を繰り返す振る舞いは、

生細胞における Min 波^{53,132} や人工細胞系の先行研究¹²⁵と同じであった。先行研究¹²⁵の条件ではほぼすべての人工細胞で traveling wave であったことから、この条件では standing wave が出現しやすくなっているといえる。Min 波の周期は traveling wave で 93 ± 9 s, standing wave で 54 ± 8 s であり、standing waveにおいては先行研究における周期 (~2 min)^{125,127}よりも速くなり、細胞内の周期^{53,132}と同程度になった。これらの変化は MinDE に融合していた蛍光タンパク質を除去した効果であると考えられる。

次に MinE 濃度が波のモードに与える影響を検証した。MinD 濃度を $1 \mu\text{M}$ に固定し、MinE 濃度を $0.7\text{--}2.5 \mu\text{M}$ の範囲で変え、MinC の局在から Min 波の発生を確認した。先行研究^{125,127}と同様に、MinC の局在は細胞質のみの局在、細胞膜のみの局在、細胞膜の一部への局所的な局在、膜と細胞質の往復振動 (pulsing), traveling wave, standing wave の 6 種類のパターンが観察されたが、その比は MinE の濃度によって大きく変化した (Fig. 2-1A)。MinE 濃度の上昇とともに Min 波の出現確率は減少し、 $2.5 \mu\text{M}$ の MinE 濃度ではほぼすべての人工細胞で MinC は細胞質局在となっていた。しかし、Min 波が発生している人工細胞においては、MinE の濃度が高いほど standing wave が多く観察された (Fig. 2-1B)。traveling wave と standing wave の 2 つのモードの出現条件に着目するため、Min 波 (traveling wave または standing wave) が発生している人工細胞における standing wave の割合を算出すると、MinE 濃度が $1.5 \mu\text{M}$ 以下の場合 30%以下であったが、 $1.7 \mu\text{M}$ 以上では 60%以上となり、 $2.2 \mu\text{M}$ MinE ではほぼ全ての Min 波が standing wave であった。

人工細胞を用いた実験では、Min 波の発生要素を含む $1\text{--}2 \mu\text{L}$ の液滴を脂質が分散した油中に分散させることで人工細胞を作製する。したがって、人工細胞間で要素濃度や要素の濃度比にばらつきが生じることで、Min 波のモードに影響を与える可能性および Min タンパク質濃度と Min 波のモードの関係を適切に評価できない可能性が考えられた。そこで、この実験系における人工細胞間によるタンパク質濃度のばらつきを評価するため、 $0.4, 1, 2, 4 \mu\text{M}$ の msfGFP および mCherry を共添加した人工細胞を作製し蛍光強度を定量し、msfGFP と mCherry それぞれの蛍光強度と濃度から作製した検量線をもとに、同一人工細胞内における msfGFP と mCherry の濃度比を算出した。その結果、各濃度条件における msfGFP と mCherry の濃度比の平均は $0.93\text{--}1.00$ とほぼ等しく、標準偏差は平均値の 5%以下であったことから、人工細胞間における要素濃度比のばらつきはわずかであると判断した (Fig. 2-2A)。また、MinDE 濃度が共に $1 \mu\text{M}$ の条件において traveling wave および standing wave それぞれを発生する人工細胞の直径の分布を解析したところ、standing wave は大きい人工細胞において発生する傾向にあった (Fig. 2-2B)。しかし、高 MinE 濃度条件では人工細胞サイズによらず standing wave が優勢となったことから、Min 波のモードのサイズ依存性は弱く、人工細胞サイズではなく人工細胞作製に用いた溶液の条件に依存すると言える。これらの結果から、Min 波のモードは MinE 濃度に依存して変化することが示唆された。

2.3.2 MinE 濃度による Min 波の初期遷移の変化

先行研究において、人工細胞内の Min 波は standing wave から traveling wave へ自発的に遷移することが観察されている¹²⁵。MinE 濃度によって Min 波の優勢なモードが変わるのであれば、この Min 波の発生初期におけるモードの遷移も同様に変化している可能性がある。この点を検証するため、人工細胞作製直後の Min 波を観察したが、蛍光標識をしていない MinDE を用いた本研究の実験系では顕微鏡サンプルの準備時間に対して Min 波の周期が短いため、通常の条件では初期遷移を観察できなかった。そこで Min 波の発生に必須である ATP の代わりに ADP を添加するとともに、creatine phosphate (CP) および creatine kinase (CK) による ATP 合成系 (CP-CK 系) を加え、顕微鏡サンプル作製後に人工細胞内において ATP を合成することで Min 波の発生の初期状態を観察することにした。

Min 波の優勢なモードが異なる 0.5, 1, 1.5 μM MinE の 3 条件に対して、人工細胞作成後に ATP を合成する新たな実験系の人工細胞を観察したところ、観察開始時点では msfGFP-MinC が細胞質に均一に局在し、Min 波は発生していなかった。しかし、人工細胞作製から 10–20 分後にパターン形成が自発的に起こる様子が見られた。そこで、パターン形成開始後のパターンの変化を 50 秒間隔毎に 6 種類のパターンに分類することで調べた (Fig. 2-3A)。その結果、0.5 μM MinE の場合はパターン形成直後は pulsing および standing wave が多くを占めたものの、先行研究とは異なり最初から traveling wave を示す人工細胞が 7.3% 存在した。そして 100 秒後には 60% 以上の人細胞で traveling wave が見られ、最終的にほとんどの人工細胞が traveling wave を示した。1 μM MinE の場合はパターン形成の直後はほとんどの人工細胞で standing wave が発生したもの、200 秒後には 70% 程度の人工細胞で standing wave から traveling wave への自発的な遷移が見られた。そして 1.5 μM MinE の場合、時間によらず 80% 以上の人細胞において standing wave が観察された。Min 波が発生した人工細胞における standing wave の割合の時間変化を算出した結果からも、0.5 μM MinE では 1 μM MinE よりも standing wave の割合が早く減少することが示され、MinE 濃度により Min 波のモードの初期遷移のタイミングに違いが生じることが明らかになった (Fig. 2-3B)。さらに、人工細胞の膜上のキモグラフにより Min 波のダイナミクスを解析した結果、1 μM MinE では standing wave が 4 回振動した後に traveling wave へ移行したのに対し、0.5 μM MinE では standing wave が出現するものの、1 回の振動のみという非常に早いタイミングで traveling wave へ遷移することが観察された (Fig. 2-3B 右)。このようなモードの初期遷移は ATP を用いた通常の条件でも見られることから¹²⁵、CP-CK 系による ATP 濃度の経時変化のアーティファクトではない。これらの結果から、MinE 濃度が低いほど standing wave から traveling wave への遷移時間が短いこと、そして MinE 濃度が高い場合は 30 分という観察時間の限りでは standing wave が安定して出現し、standing wave から traveling wave への遷移は生じない、あるいは非常に遅いことが示された。

2.3.3 MinDE 濃度による Min 波の優勢なモードの制御

Min 波は MinD と MinE の反応バランスによって形成されるため、MinE 濃度同様に MinD 濃度も波のモードに影響を与えることが想定された。そこで MinD 濃度の効果を検証するため、MinE 濃度を $1 \mu\text{M}$ に固定し、MinD 濃度を $0.5\text{--}1.5 \mu\text{M}$ の範囲で変更して msfGFP-MinC の動態を観察した。人工細胞内において再構成した Min 波を 6 種類のパターンに分類したところ、MinE の場合とは反対に MinD 濃度の減少に伴い standing wave の割合が増加することが観察された (Fig. 2-4A)。低濃度 MinD 条件 (0.5 および $0.7 \mu\text{M}$) では standing wave が $40\text{--}60\%$ を占め、 $1.2 \mu\text{M}$ 以上の条件では traveling wave が全体の 80% 以上を占めた。低 MinD 濃度条件では高 MinE 濃度条件と同様に、standing wave が発生していない人工細胞のほとんどは細胞質局在であった。Min 波が発生している人工細胞に占める standing wave の割合をプロットすると、低 MinD 濃度では standing wave が優勢であり、高 MinD 濃度では traveling wave が優勢となることが明確に示された (Fig. 2-4B)。したがって、Min 波のモードは MinD 濃度にも依存しており、MinD と MinE どちらか一方ではなく両者の濃度に依存して決定されることが示唆された。

MinDE 両者の濃度変化に対する優勢なモードの変化が反対の推移を示したことから、上記の結果はそれぞれの絶対的な濃度ではなく、MinD と MinE の濃度比が Min 波のモードの決定に重要なことを示唆している。この点を検証するため、MinDE 濃度を同時に変化させた条件で人工細胞内において Min 波を再構成し、MinDE 濃度に対する Min 波のモードの相図を作製した。MinD 濃度を $0.4\text{--}2.0 \mu\text{M}$ の範囲で、MinE 濃度を $0.4\text{--}2.2 \mu\text{M}$ の範囲でそれぞれ変更したところ、MinE 濃度が高いほど standing wave の発生にはより高濃度の MinD が必要であり、traveling wave の相と standing wave の相が MinDE の濃度に対して斜めに分離された (Fig. 2-5A)。この結果は、公立はこだて未来大学の義永那津人教授により構築された Min システムを反応拡散方程式により表した 3D 理論モデルによっても再現されている (Fig. 2-5B)。これらの結果より、MinD と MinE の濃度比が Min 波のモードを決定することが示された。

2.3.4 Min タンパク質の活性による Min 波のモードの制御

MinDE の絶対濃度ではなく濃度比が Min 波のモードを決定するメカニズムを明らかにする手掛かりとして、それぞれの濃度変化が Min システムの反応拡散共役に及ぼす影響に注目した。これまでの研究から、MinDE の濃度と関係する反応として、MinD の膜結合^{101,116}、MinD 同士の相互作用¹³⁸、MinE の膜への結合^{111,139}、MinDE の解離速度^{103,140}が挙げられる。前者 2 つは MinD 濃度により、後者 2 つは MinD と MinE 両方の濃度により変化する。MinDE 濃度比による Min 波のモード選択が単純な MinDE 量ではなく、MinD の膜結合と MinE によって引き起こされる MinDE の膜解離のバランスに由来すると考えると、Min タンパク質濃度ではなく反応定数の変化によっても Min 波のモードを制御できるはずである。この仮

説を検証するため、MinE の膜結合強度に影響することが知られている塩濃度¹¹¹、および MinDE 複合体の ATPase 活性に影響することが示唆されている温度^{103,140}に着目した。

まず、塩濃度変化が Min 波に与える影響を検証した。塩として用いているカリウムイオンの濃度により、脂質膜の負電荷と MinE の膜結合領域 (MTS) の正電荷の静電相互作用が調節され、MinE の膜結合強度が変化することが知られている¹¹¹ (**Fig. 2-6 上**)。塩濃度が高い条件では MinE の膜結合強度が小さくなり、同じ MinE 濃度であっても膜に結合可能な MinE の量が減るため、高塩濃度は MinE 濃度を減少させるのと同じ効果があることを意味する。そこで、塩として添加している GluK の濃度を 50 mM から 500 mM まで変化させたところ、塩濃度が低い条件では standing wave が優勢となり、塩濃度の増加に伴い traveling wave の割合が増え、300 mM 以上の条件ではほぼ全てが traveling wave となった (**Fig. 2-6A,B**)。すなわち、MinE 濃度と同様に、塩濃度により MinE の膜結合強度を変えることによっても Min 波のモードが変化することが示された。さらにこの結果は、MinE の膜結合強度を減少させる塩濃度の増加が Min 波のモードに対して MinE 濃度の減少と同じ効果を持つことを意味するため、Min 波のモード選択には MinE の膜結合速度が重要であることが示された。

次に、Min タンパク質の活性が Min 波のモードに影響するか検証した。温度変化は Min 波の反応拡散共役における様々なパラメータに影響すると考えられるが、先行研究において温度上昇により MinDE 複合体の ATPase 活性が高くなる可能性が指摘されている^{103,140}。そこで、これまで Min 波を観察していた室温条件 (25°C) と、それより高い温度である 29, 37°C の 3 段階の温度において MinD の ATPase 活性を測定した。その結果、ATPase 活性は温度に依存して上昇し、活性化エネルギーは 7.0 kcal/mol と算出された (**Fig. 2-7A**)。次に、温度変化による ATPase 活性の変化が Min 波のモードに与える影響を検証するため、29, 34, 37°C において Min 波を観察した。MinD 濃度を 1 μM に固定し、MinE 濃度を 0.3–2 μM の範囲で変化させ、温度と MinE 濃度に対する msfGFP-MinC の示すパターンの相図を作製した。その結果、温度により Min 波が発生する MinE 濃度範囲が変化し、温度が高い条件ではより低い MinE 濃度で波が発生した (**Fig. 2-7B,C**)。さらに、Min 波が発生している人工細胞に対する standing wave の割合を算出した結果、同一の MinE 濃度においては温度が高いほど standing wave の割合が増加した (**Fig. 2-7C**)。特に、1 μM MinE 条件では室温条件では 70%程度が traveling wave であったのに対し (**Fig. 2-1B**)、29°C で観察すると人工細胞全体の 90%以上が standing wave となった (**Fig. 2-7B,C**)。これらの結果より、温度変化により Min 波のモードを決める MinE 濃度の領域が変化することが示された。高温条件では低 MinE 濃度においても低温条件における高 MinE 濃度と類似した動態となったことから、MinDE 複合体の ATPase 活性の上昇のように MinE に誘起される MinD の膜解離を促進するパラメータも standing wave の増加に寄与することが示唆された。

2.3.5 同一人工細胞内における Min 波のモードの遷移

Fig. 2-3 に示したように、人工細胞内において Min 波は standing wave から traveling wave に自発的に遷移する。しかし、同じ条件で作製した人工細胞でも、観察時の温度によって Min 波の優勢なモードが変化したことから、自発的遷移によって traveling wave が発生している人工細胞でも温度変化により standing wave への遷移が生じる可能性が考えられた。そこで、温度変化により同一人工細胞内において Min 波のモードを制御可能か検証した。Min 波のパターンを分類した相図 (**Fig. 2-7C**) において低温 (29°C) では traveling wave、高温 (37°C) では standing wave が優勢に現れる $0.7 \mu\text{M}$ MinE 条件で Min 波を再構成した。29°C で観察を始めた状態では、traveling wave が多く見られた。約 5 分間の観察後に 37°C まで温度を上昇させると、61% の traveling wave が standing wave に遷移する様子が観察された (**Fig. 2-8**)。これは先行研究で観察された自発的な遷移とは逆方向の遷移である。さらに、温度を 29°C に戻すと再び traveling wave に戻る人工細胞が見られた (**Fig. 2-8 中央, 右**)。この結果より、同一人工細胞内において、温度条件を変化させることで traveling wave と standing wave の 2 つの Min 波のモードを制御できることが明らかになった。これらの結果は、MinDE 濃度が一定であっても、MinE による阻害効果が弱く MinD が膜結合しやすい条件では traveling wave、MinE による阻害効果が強く MinD が膜解離しやすい条件では standing wave が優勢になることを示す。すなわち、MinDE の濃度比や Min タンパク質の活性によって決まる MinD の膜結合と解離のバランスが Min 波のモードを制御していることが示された。ただし、温度を下げるによる traveling wave への遷移は半分程度の人工細胞でしか見られなかったことから (**Fig. 2-8 中央**)、Min 波のモード選択はヒステリシスの性質をもつことが示唆された。

2.3.6 人工細胞内における MinE の合成による Min 波のモードのヒステリシスの検証

前述のように、Min 波の観察中に温度変化させた実験において、温度上昇により standing wave に遷移した Min 波を再び低温にしても traveling wave に戻らない人工細胞集団が観察されたことから、Min 波のモードにはヒステリシスが関与する可能性が示唆された。そこで、MinE 濃度によって Min 波のモードが変化することを利用し、人工細胞中において MinE 濃度を変化させることで Min 波のモード選択がヒステリシスの性質をもつか検証した。MinE 濃度が高い条件下では standing wave が優勢となるため (**Fig. 2-1B,C**)、traveling wave が発生している人工細胞中の MinE 濃度を上昇させた際に standing wave への遷移が確認されるか否かにより、Min 波のモード選択にヒステリシスの性質があるかを判断することができる。この検証を行うため、Min 波を発生させるタンパク質群に加え、無細胞転写翻訳系の PURE system と MinE をコードした DNA を共に人工細胞内へ内包し、人工細胞内において MinE を合成することで MinE 濃度を上昇させることにした (**Fig. 2-9A**)。

先行研究において、人工細胞内において MinE が過剰に合成されると Min 波が消失し MinC の細胞質局在へと遷移することが示されているため¹²⁷、MinE の合成量を調節する必要があった。そこで、アミノ酸の添加量によりタンパク質の合成量を制御することにした。この実

験系の確認のため、定量性に優れた NanoLuc をレポーター遺伝子として使用し、試験管内において NanoLuc を合成し発光強度から合成量を定量したところ、添加するアミノ酸濃度によりタンパク質合成量が制御された (Fig. 2-9B). そこで、NanoLuc 遺伝子を MinE 遺伝子に置き換え、人工細胞内に Min 波の発生要素と PURE system, MinE をコードした DNA を内包し、アミノ酸濃度条件を振り、MinE の濃度変化が traveling wave に与える影響を解析した。人工細胞に内包する Min タンパク質濃度は、traveling wave が優勢となる $1 \mu\text{M}$ MinD および $0.7 \mu\text{M}$ MinE にした。 $1.25 \mu\text{M}$ および $1.5 \mu\text{M}$ の各アミノ酸を内包すると、MinE の合成に伴い次第に MinD の高濃度領域の幅（波幅）が短くなるという変化は観察されたものの、traveling wave が持続し、モードの遷移は見られなかった (Fig. 2-9C). そこで各アミノ酸濃度を $2 \mu\text{M}$ に増加させたが、traveling wave の波幅が次第に短くなった後、Min 波が消失して msfGFP-MinC は細胞質局在を示した (Fig. 2-9C). この過程において standing wave への遷移は見られなかった。ここまでパラメータによる Min 波のモードの制御を踏まえると、MinE の増加により traveling wave, standing wave, 細胞質局在の順にパターンが変化すると予想されたが、実際には standing wave を介さずに細胞質局在になったと言える。これらの結果は、MinE 濃度の初期条件により Min 波のモードが制御されるのにも関わらず、Min 波発生中に MinE 濃度を変化させても、初期条件に対応するモードの変化は見られないことを示している。したがって、Min 波のモードにはヒステリシスが存在し、Min タンパク質濃度だけでは決まらないことが示唆された。

2.4 考察

2.4.1 Min 波のモード選択原理

反応拡散共役により形成される動的な波には standing wave と traveling wave の 2 つのモードが存在するが、モード選択のメカニズムは明らかになっていなかった。生細胞内および再構成系において両方のモードが観察されている Min 波についても、そのモードの制御は達成されていなかった。そこで本章では、Min 波の人工細胞内再構成系において Min タンパク質濃度や塩濃度、温度のパラメータが波のモードに与える影響を検証した結果、条件により波のモードが変化することを見出した。具体的には、(i) MinE の効果が弱い条件 (低 MinE 濃度、高塩濃度、低温)、あるいは (ii) MinD の膜結合が強い条件 (高 MinD 濃度) において traveling wave が優勢となり、(iii) MinE の効果が強い条件 (高 MinE 濃度、低塩濃度)、あるいは (vi) MinD の膜解離が促進される条件 (低 MinD 濃度、高温)において standing wave が優勢となることが示された。したがって、Min 波のモードは MinDE 濃度の比や Min タンパク質の活性によって決定付けられる MinD の膜結合と膜解離のバランスによって制御されると結論付けた (Fig. 2-10).

このようなパラメータによるモードの制御を利用し、Min 波の観察途中に温度を上げることで人工細胞内において traveling wave から standing wave への遷移を制御することを達成した。さらに、温度を下げることで traveling wave に戻る人工細胞も数多く見られたことから、

反応拡散波はパラメータによってモードを遷移できる可塑性があると言える。しかし、Min 波のモードを制御可能な MinE を無細胞転写翻訳系により合成させても、モードの遷移は見られなかった。これはヒステリシスの影響により MinE 濃度の変化によるモードの遷移には他の経路が存在する可能性や、通常ならば standing wave が出現しやすい条件であっても Min 波のモードの multistability により MinE 合成のようにパラメータ変化が徐々に生じる場合は traveling wave に留まりやすくなった可能性が考えられる。このような非線形性に由来した性質は興味深く、今後ソフトマターやアクティブマターの視点から解析が進むことで物理的な意味合いの理解やさらなる制御方法が開発されることが期待される。

MinD の膜結合と解離のバランスにより traveling wave と standing wave が制御される理由として、それぞれの波が形成される際の MinE の局在に違いがあることが影響していると考えられる。Min 波の人工細胞系において MinE-mCherry の局在を観察した先行研究¹²⁵では、traveling wave の場合は MinD の高濃度領域の後方のみに MinE が多く局在する一方で、standing wave の場合は MinD の高濃度領域の両側に MinE が多く局在することが報告されている。生細胞や平面膜上における再構成でもこの傾向は同様であることが知られている。standing wave が発生する生細胞では、細胞中央付近の MinD 高濃度領域の縁全体に MinE が局在してリング状の構造を形成し、MinD を膜解離させながら細胞極へと MinE のリング構造が移動する¹⁴¹。平面膜上における traveling wave では、人工細胞系における traveling wave と同様に波の後方の MinE 濃度が高くなる¹¹⁰。MinE は MinD の膜解離後も MinE 単体で膜上に残る linger 効果により MinD の膜への再結合を阻害する性質があるため、MinD の高濃度領域に対する MinE の局在の違いにより、MinD の高濃度領域が膜上を一方向に伝播する traveling wave か、あるいは MinD 高濃度領域が形成されていた膜上の領域全体への MinD の再結合が MinE により阻害されることにより別の領域に再び高濃度領域を形成する standing wave となるかが決定する。Min 波形成時の MinE の挙動を踏まえると、standing wave の形成には MinD の高濃度領域の周囲の全体に結合するためにより多くの MinE が必要となると考えられることから、MinD の膜解離が強くなると standing wave が発生するといえる。また、standing wave では、MinD の高濃度領域が消失し人工細胞内の反対側の膜上に再び MinD の高濃度領域が形成されるまでの間は細胞質局在となる。常に Min 波が発生せず MinD が細胞質局在となる状態は MinD に対し MinE が過剰に存在する場合に見られることから、standing wave は波が形成されている状態と波が消失している状態を繰り返していると捉えることができる。したがって、Min 波が発生可能な条件の中でも波が発生しない細胞質局在に近い条件において standing wave が出現すると考えられる。

2.4.2 生細胞内の Min 波と人工細胞系の比較

本研究により Min 波のモードがパラメータにより制御可能であることが示された。さらに、MinE 濃度を変えると、油中水滴を用いた先行研究¹²⁵で示されていた Min 波の発生過程における pulsing, standing wave, traveling wave という自発的なモードの遷移も変化し、

MinE 濃度が低いと standing wave から traveling wave への遷移にかかる時間が短くなることや、Min 波観察中のパラメータ変化によりモードを可逆的に遷移可能であることも示した。また、モードの遷移については、リポソームを用いた Litschel らの先行研究¹²⁴では自発的に traveling wave から standing wave に遷移することが記述されている。このことから、Min 波のモードは再構成系の材料の違いや塩濃度、温度などわずかなパラメータの違いにより変化するということが言える。このような Min 波のモードのパラメータ感受性は、生細胞が多様な外部環境で standing wave を維持して正常に細胞分裂を行うには好ましくない。実際の生細胞では、温度変化によって standing wave の周期は変化するものの、温度を変化させても standing wave が発生し続けることが報告されている¹⁴⁰。再構成系とは異なり生細胞ではモードのパラメータ感受性が見られない理由として、形状の効果により standing wave が発生しやすくさせている可能性や、生細胞では外部環境に応じて各パラメータを変化することで適応している可能性が考えられる。

Min 波のモードのパラメータ感受性の高さだけではなく、standing wave が発生する条件そのものも人工細胞系と生細胞では違いが見られる。人工細胞系においては、MinDE がそれぞれ 1 μM の条件では traveling wave が優勢であり、MinE 濃度が多いほど standing wave が増加した。一方、生細胞内においては MinD 濃度が MinE 濃度の 1.4 倍であるにもかかわらず、standing wave が発生する¹³⁵。また、生細胞においてはむしろ traveling wave が出現することが稀であり、細胞分裂の阻害により長くなった細胞のような限られた条件でしか報告されていない⁷²。したがって、細胞内において standing wave が発生しやすくなっている理由の解明には、空間形状や膜上の拡散、未知の因子の効果など、さらなる検証が必要である。

人工細胞系と生細胞でこのような違いが存在するものの、本研究により明らかになった Min 波のモードのパラメータ依存性は、空間形状がモード選択の決定因子であるとする従来の考えでは説明できていなかった現象を説明できる可能性がある。たとえば、通常の大腸菌細胞は幅 1 μm 程度、長さ 2–4 μm 程度のロッド状であるが、フィラメント状や球形の生細胞では traveling wave だけではなく standing wave も観察されていた^{132,133}。この点において、空間形状だけではなくパラメータもモードを制御するという視点を踏まえると、観察条件や培地、変異体における内在性因子などの違いにより Min 波発生に関わる反応パラメータが変化し、ロッド状以外の生細胞では standing wave と traveling wave の両方が観察されてきたと考えられる。また、ロッド状の生細胞において standing wave しか観察されていない理由に関しても、反応パラメータの視点から理解できるようになる可能性がある。一般に、空間形状は局所的な膜結合速度に影響することが知られている。曲率の小さい場所においては局所的な膜面積/体積比が小さいため、膜から解離した分子が再び近傍の膜に出会い確率が低下する一方で、曲率の大きい場所においては、局所的な膜面積/体積比が大きいため、膜から解離した分子が再び近傍の膜に出会いやすくなり、膜結合量が増加する^{73,95}。このような空間形状によるパラメータの変化により、ロッド状の細胞における standing wave の選択的な発生が説明できる可能性がある。

2.4.3 Min 波以外の反応拡散波のモード選択

パラメータにより反応拡散波のモードが制御できるという発見は、Min 波以外の反応拡散波についても時空間パターン形成原理の理解につながると考えられる。Min 波の発生において MinD は活性化因子、MinE は阻害因子とみなすことができるため、MinD の膜結合と膜解離のバランスがモードを制御するという結論は、活性化因子と阻害因子のバランスがモードを制御すると一般化できる。そのため、細胞性粘菌や動物細胞におけるアクチンの波が standing wave ではなく traveling wave を形成するメカニズムにも、Min 波と同様に波を形成する分子とその阻害剤のバランスが影響している可能性がある。実際に、マスト細胞においてはアクチンの traveling wave が発生するが、細胞質中のカルシウムイオン濃度の振動に伴って生じる PI(4,5)P₂ の振動によりアクチンの standing oscillation も発生することが報告されており¹⁴²、このアクチン波の standing oscillation の発生にも Min 波と同様にパラメータの変化が影響している可能性がある。また、細胞性粘菌をラトランキュリン処理した細胞では、PIP₃/PTEN 波の traveling wave と standing wave の両方が現れること、さらには理論的解析では PIP₃ の反応バランスがモード選択に関与していることが示唆されている⁷⁴。これらの知見は、Min 波以外の反応拡散波も反応パラメータにより波のモードが制御される可能性を示唆しており、現状 standing wave が観察されていない Rho およびアクチンの波においても standing wave が発生する条件が存在する可能性がある。新たなモードの波の発見とモード選択条件の理解により、反応拡散波の生細胞における新たな役割が見出されることが期待される。

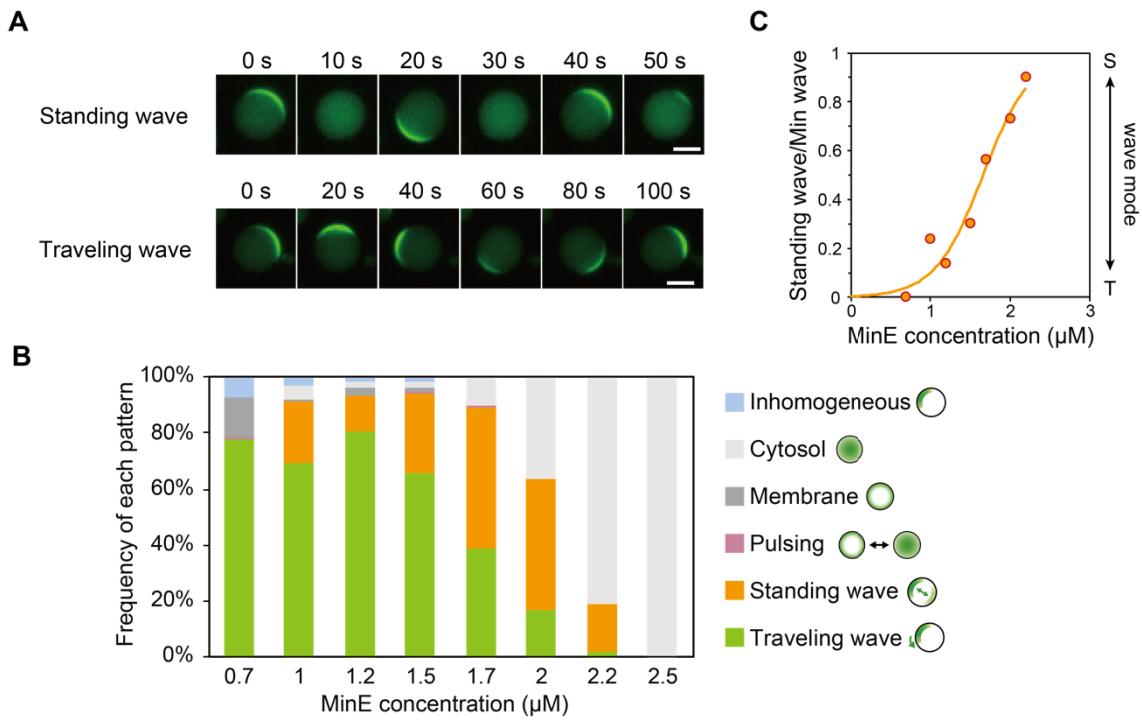


Fig. 2-1. Min 波の動きの 2 つのモードの MinE 濃度依存性

(A) 人工細胞内において形成された 2 種類のモードの Min 波。人工細胞は $0.1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinC, $1 \mu\text{M}$ MinD, $1 \mu\text{M}$ MinE および 2.5 mM ATP を 100 mg/mL BSA と共に内包したものである。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ である。(B) 様々な MinE 濃度における人工細胞中の Min タンパク質が示す振る舞いの割合 ($n = 160\text{--}217$)。 (C) (B)における Min 波が発生している人工細胞に対する standing wave の割合 (standing wave/Min wave 比)。曲線はシグモイド関数によりフィッティングしたものである。

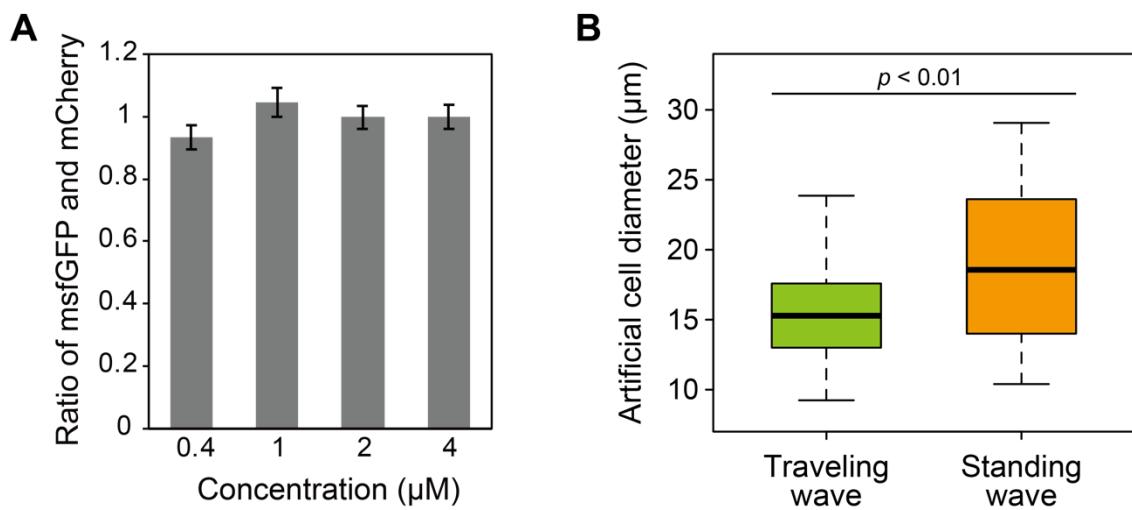


Fig. 2-2. 人工細胞間のタンパク質濃度のばらつきおよび Min 波のモードの人工細胞サイズ依存性

(A) 各人工細胞における msfGFP および mCherry の濃度比。人工細胞はこれらのタンパク質を $0.4\text{--}4.0 \mu\text{M}$ の範囲において等濃度で 100 mg/mL BSA と共に内包したものである。平均値 \pm 標準誤差 ($n = 106\text{--}373$)。 (B) Min 波のモードと人工細胞サイズの関係。MinD および MinE をそれぞれ $1 \mu\text{M}$ の条件で人工細胞内において Min 波を再構成し、traveling wave および standing wave それぞれのモードの波が発生した人工細胞の直径の分布を箱ひげ図で示した (traveling wave: $n = 84$, standing wave: $n = 24$)。p 値は不等分散における t 検定の結果を示している。

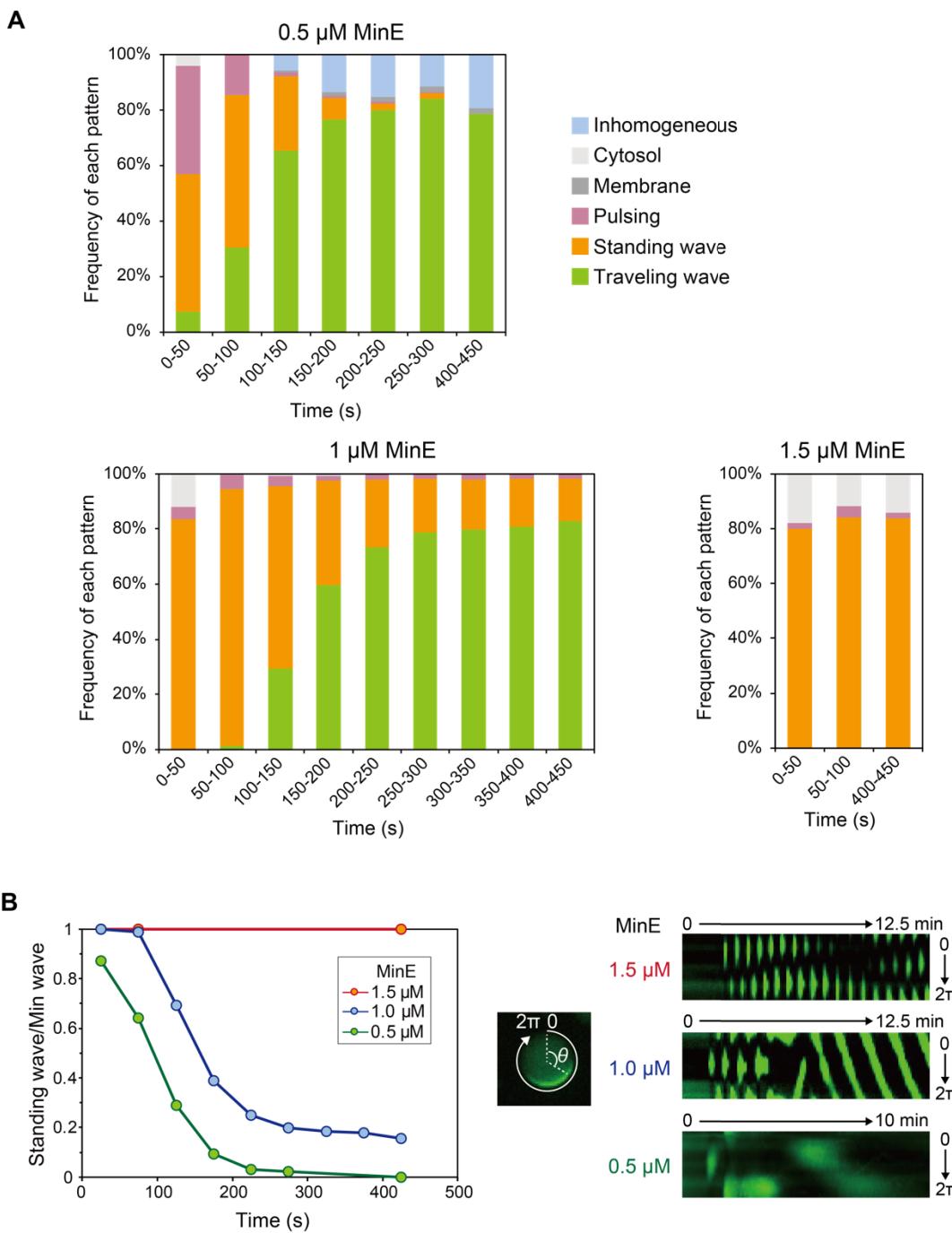


Fig. 2-3. Min 波のモードの初期遷移への MinE 濃度の影響

(A) 0.5, 1, 1.5 μM MinE 条件下で人工細胞内において Min システムが示したパターンの割合の時間変化 (0.5 μM MinE: $n = 150\text{--}165$, 1 μM MinE: $n = 218\text{--}332$, 1.5 μM MinE: $n = 90\text{--}99$). 人工細胞は各濃度の MinE および 0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD を ATP の代わりとして ADP および creatine kinase, creatine phosphate と共に内包したものである. (B) 左:(A) における standing wave/Min wave 比の時間変化. 右: 様々な MinE 濃度における人工細胞の膜上の msfGFP-MinC の蛍光シグナルのキモグラフ.

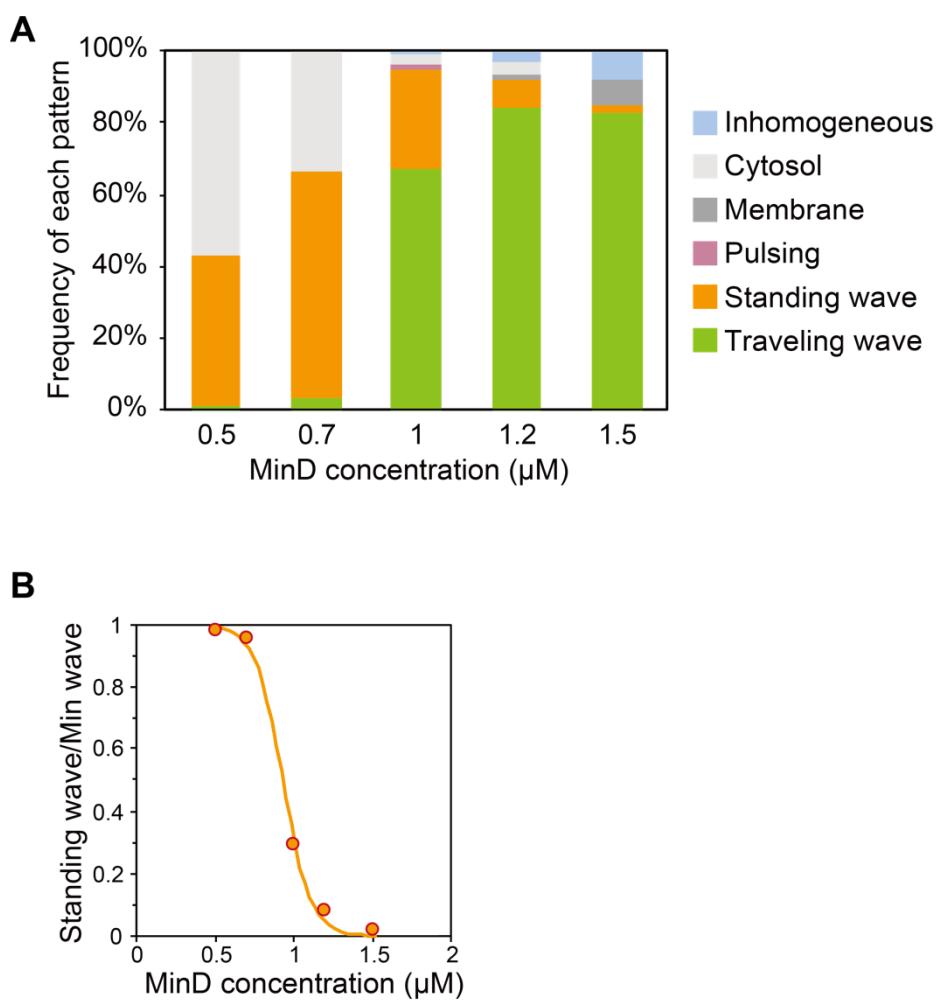


Fig. 2-4. Min 波のモードへの MinD 濃度の影響

(A) 様々な濃度の MinD および $0.1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinC, $1 \mu\text{M}$ MinE, 2.5 mM ATP, 100 mg/mL BSA を内包した人工細胞における Min システムが示した各パターンの割合 ($n = 158\text{--}249$).
(B) (A)において Min 波が発生した人工細胞に対する standing wave の割合. 曲線はシグモイド関数によりフィッティングしたものである.

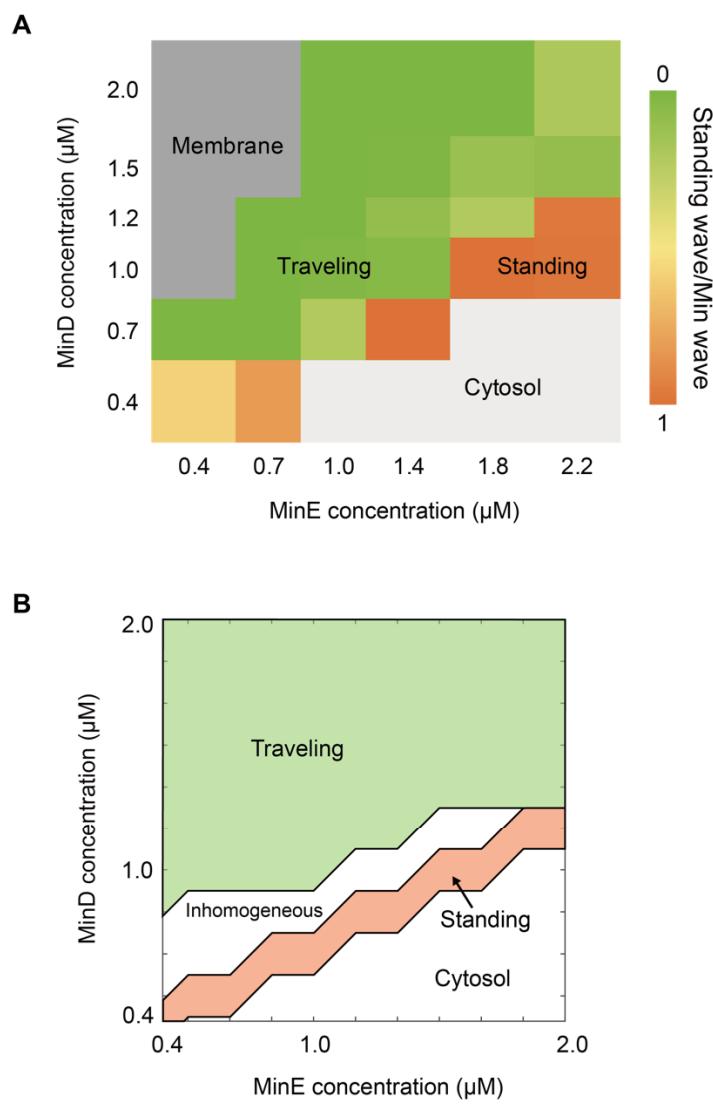


Fig. 2-5. MinDE 比によって決定される Min 波のモードの相図

(A) および (B) 様々な MinE および MinD 濃度における Min 波のモードの相図. (A) 実験における相図. 濃灰色および薄灰色の領域はそれぞれ膜局在 (membrane) あるいは細胞質局在 (cytosol) となり, Min 波が発生しない条件を示している. Min 波 (traveling wave および standing wave の合計) の発生率が 30%未満の場合, 膜局在あるいは細胞質局在と判断した. Min 波が発生する濃度条件においては, Min 波の発生した人工細胞に対する standing wave の割合を図中右のカラーコードにより示した. traveling wave または standing wave の発生領域においては 100–165 個の人工細胞が, 膜局在または細胞質局在の領域では 50–80 個の人工細胞が解析された. (B) Min 波の反応拡散モデルを 3 次元空間において解析した理論における相図. データは公立はこだて未来大学の義永那津人教授により計算されたものである. MinD および MinE 濃度はシミュレーションにおいて無次元化された値から変換されたものである. Inhomogeneous は MinD の静的な不均一局在が出現する領域を示している.

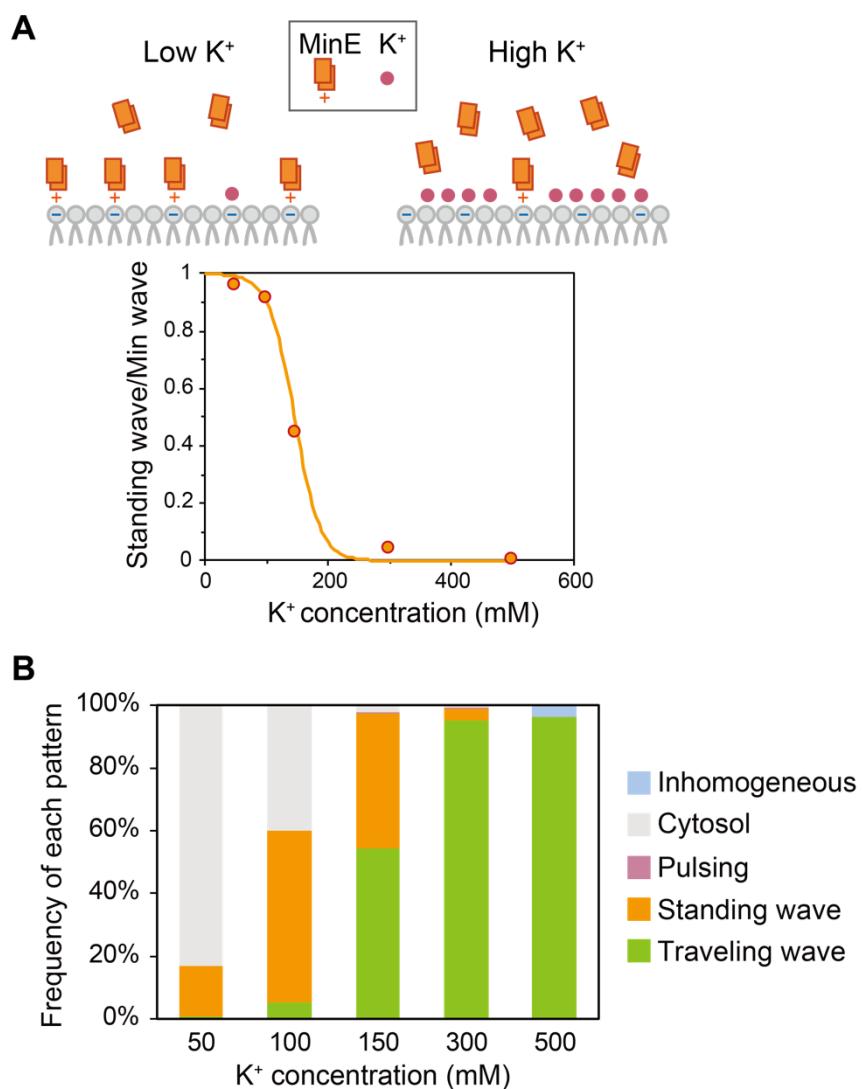


Fig. 2-6. Min 波のモードへのカリウムイオン濃度の影響

(A) 上：MinE の膜結合強度へのカリウムイオン濃度の影響の模式図。下：(B)における Min 波の発生した人工細胞における standing wave の割合のカリウムイオン濃度に対する変化。曲線はシグモイド関数によりフィッティングしたものである。(B) 様々なカリウムイオン濃度において $0.1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinC, $1 \mu\text{M}$ MinD, $1 \mu\text{M}$ MinE, 2.5 mM ATP および 100 mg/mL BSA を内包した人工細胞における Min システムの各パターンの割合 ($n = 130\text{--}213$)。

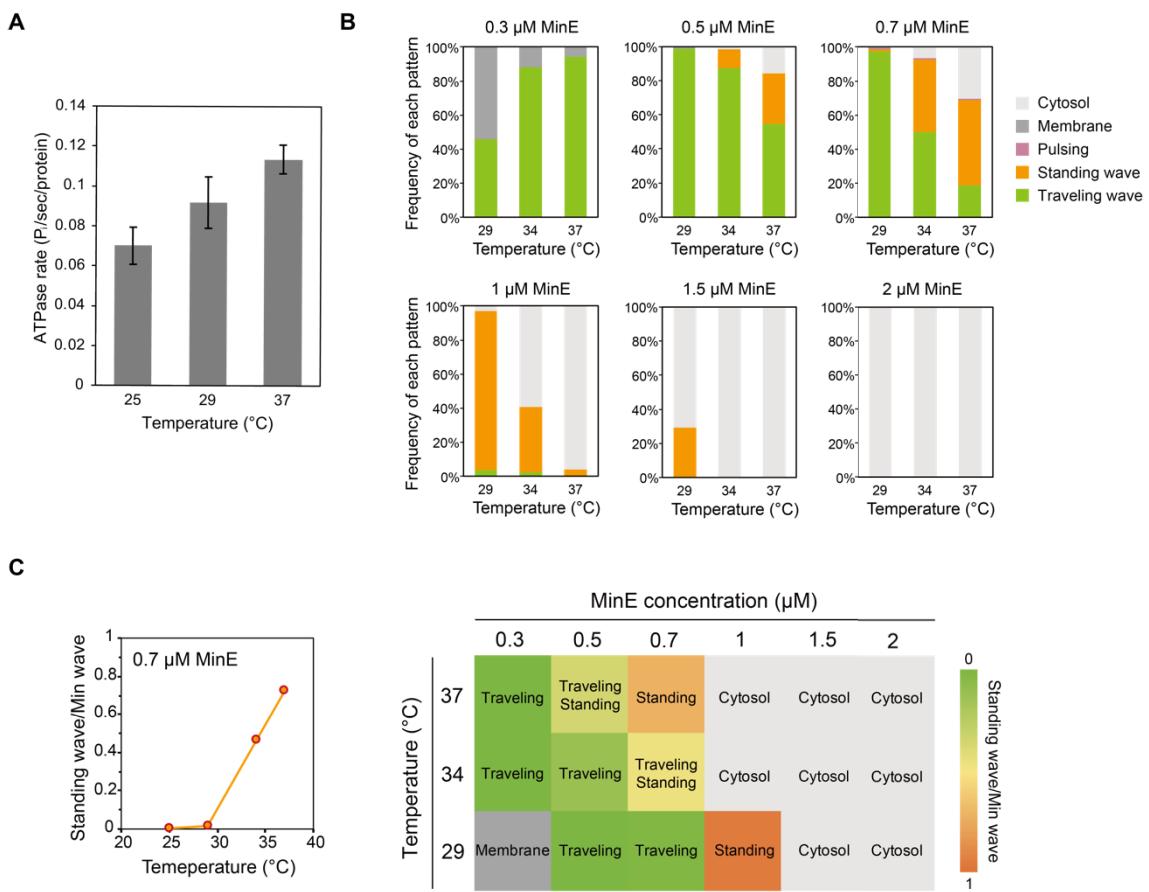


Fig. 2-7. Min 波のモードへの MinDE 複合体の ATPase 活性の影響

(A) 各温度における MinDE 複合体の ATP 加水分解速度. 平均値 \pm 標準誤差 ($n = 4$). (B) 様々な MinE 濃度条件で 29 および 34, 37 度において観察された人工細胞内の Min システムの各パターンの割合 ($n = 88\text{--}162, 37^\circ\text{C}$ における $0.7 \mu\text{M}$ MinE: $n = 280$). (C) 左: $0.7 \mu\text{M}$ MinE を用いて人工細胞内で再構成された Min 波の様々な温度における Min 波の発生した人工細胞に対する standing wave の割合 (standing wave/Min wave 比). 右: MinE 濃度と温度に対する msfGFP-MinC の挙動の相図. 各長方形は各条件において最も多かったパターンを示しており, 濃灰色は Min 波の発生しない膜局在, 薄灰色は同じく細胞質局在を示す. それ以外の色は, 右側のカラーコードにより定義された standing wave/Min wave 比に対応している. Traveling および Standing の両方の表記は, 両者が全体の半分程度を占めていたことを示す (0.35–0.65 standing wave/Min wave 比). 各条件における Min 波の各パターンの割合は (B) に示されている.

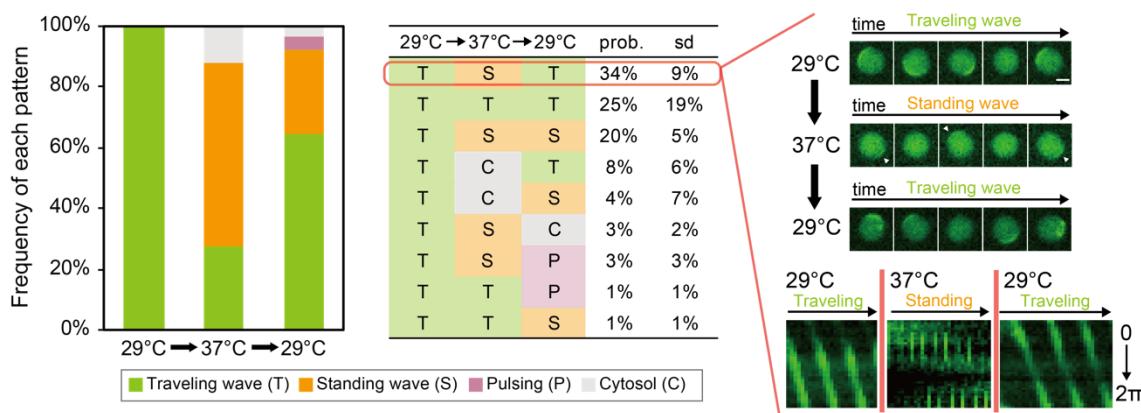


Fig. 2-8. 温度シフトによる Min 波のモードの遷移

左：0.2 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 0.7 μM MinE, 2.5 mM ATP, 100 mg/mL BSA を内包した人工細胞を 29°C, 37°C, 29°C の順に温度を変えて観察した場合の msfGFP-MinC の示す時空間パターンの割合 (3 回の試行において 50 個ずつ人工細胞を解析). 29°C における最初の観察で traveling wave が発生した人工細胞のみ解析された. 中央：同一人工細胞における Min 波のパターンの遷移の種類とそれぞれの割合 ($n = 3$). 右：最も多かったパターンの遷移を示した人工細胞のタイムラプス画像およびキモグラフ. Standing wave の波の位置は白矢印で示されている. タイムラプス画像の時間間隔は traveling wave では 20 s, standing wave では 10 s であり, スケールバーは 20 μm である.

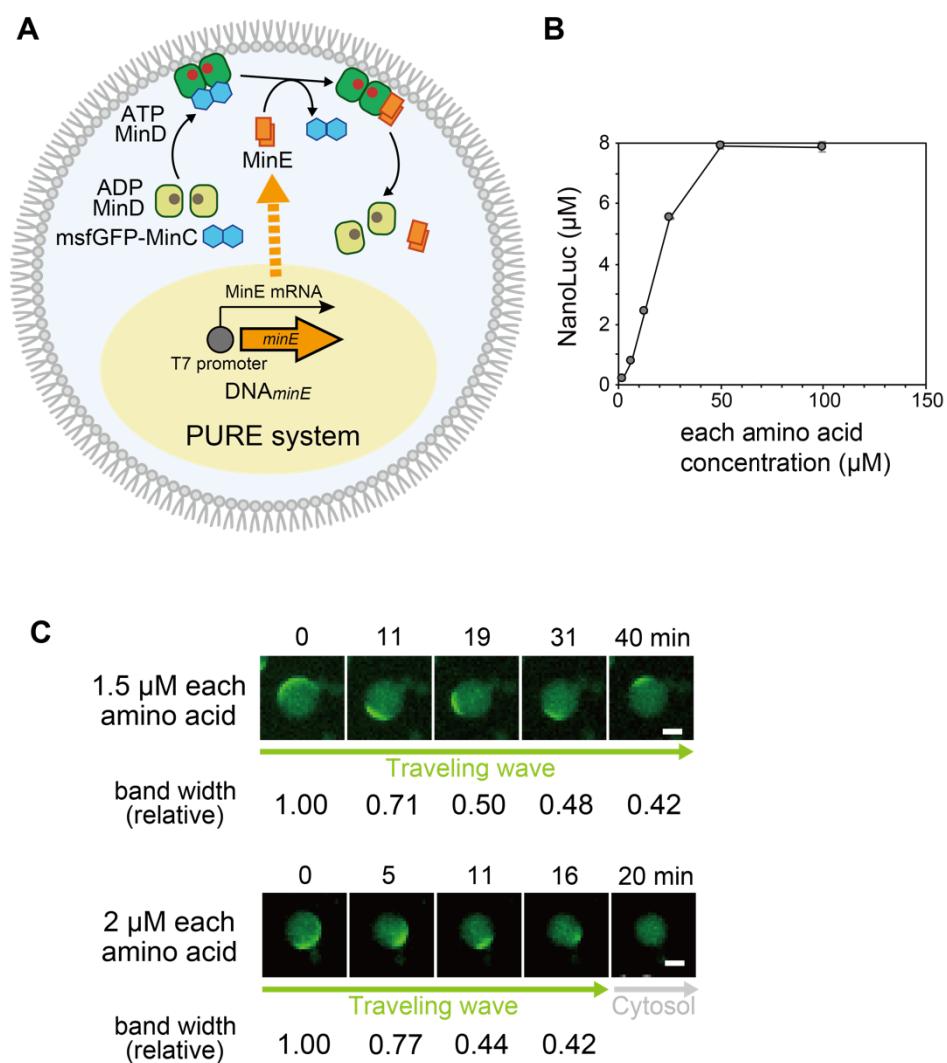


Fig. 2-9. 人工細胞内における MinE 合成に伴う Min 波の変化

(A) 実験系の模式図。精製した msfGFP-MinC および MinD, MinE と共に無細胞転写翻訳系 (PURE system) および *minE* をコードした DNA を人工細胞に内包した。(B) 様々なアミノ酸濃度における PURE system による NanoLuc の合成量。平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$)。(C) 人工細胞内における msfGFP-MinC のタイムラプス画像。0.1 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 0.7 μM MinE, 1.5 または 2.0 μM の各アミノ酸を内包した人工細胞内において、1 nM DNA_{minE} および PURE system により MinE を合成した。各時間における traveling wave の波幅は観察開始時の波幅に対する相対値が示されている。スケールバーは 10 μm .

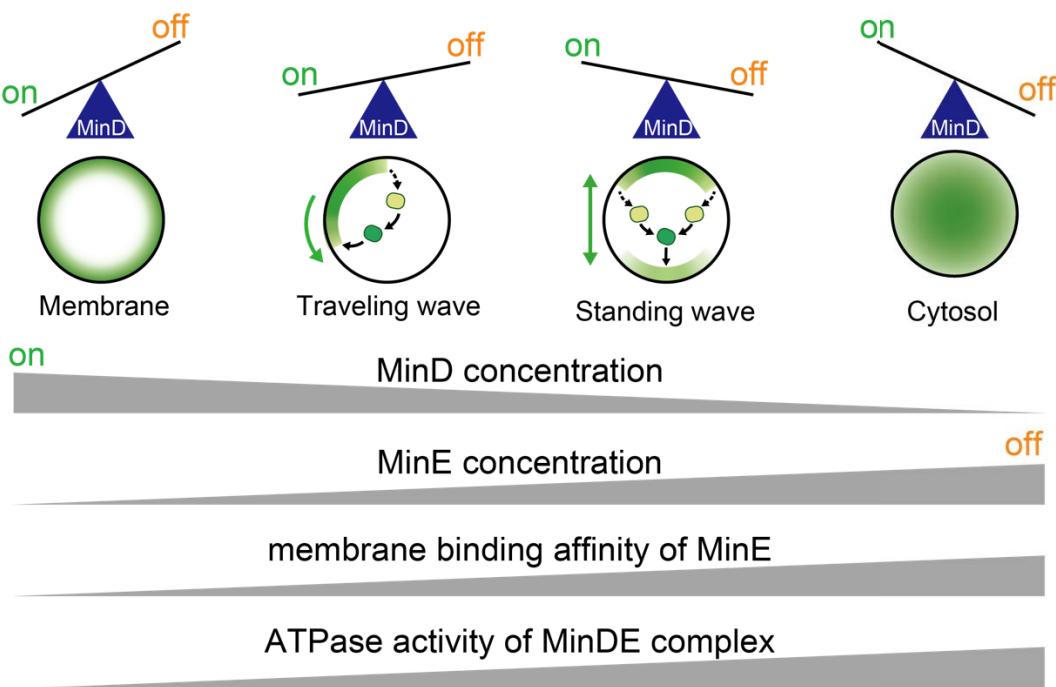


Fig. 2-10. Min 波のモード選択原理

本章の結果のまとめおよび Min 波のモード選択原理の模式図。“on” および “off” はそれぞれ MinD の膜結合と膜解離を示している。MinD の膜結合と膜解離に関わるパラメーターにより Min 波の動きのモードが制御される。

第3章 人工細胞内における反応拡散波の周期・波長・形状の制御原理

3.1 はじめに

第2章において、反応パラメータにより動的な細胞内反応拡散波のモードを制御可能であることを明らかにした。しかし、細胞内反応拡散波が適切に機能するには周期や波長、形状などの特徴も制御される必要がある。そこで本章では、細胞内反応拡散波のこれらの時空間的特徴の制御原理に注目する。

3.1.1 細胞内反応拡散波の周期および波長の制御

細胞内反応拡散波の周期の制御は、Min 波や細胞性粘菌、真核細胞、CHO 細胞のアクチノ波などの様々な反応拡散波にとって重要である^{44,53,129,143,144}。たとえば、真核細胞のアクチノ波は分裂溝の位置の決定に⁶、細胞性粘菌の PIP₃/PTEN 波は細胞の変形や運動方向の決定に関与する⁴³。CHO 細胞においては単一のアクチノ高濃度領域が出現するアクチノ波が形成されることで細胞膜の一部が突出し、変形を引き起こしている^{144,145}。これらの現象においては、波の周期が細胞の運動速度や細胞変形の周期を決定する。さらに、大腸菌の Min 波は振動運動により両細胞極における細胞分裂を阻害するため、細胞極に適切な時間滞在できるような周期でなければならない。Min 波の周期が短ければ細胞分裂を阻害するのに不十分な可能性があり、Min 波の周期が長い場合には、実際に細胞分裂異常が起こることが報告されている⁵³。この点から、波の周期は細胞内反応拡散波が適切に機能できるかを決定づける重要な指標であるといえる。しかし、非平衡下で非線形な相互作用により出現する反応拡散波において周期がどのように制御されているかは明確ではない。

細胞内反応拡散波の波長も種類により様々である。その中でも Min 波の波長については、生細胞内における波長と *in vitro* 再構成系における波長が大きく異なることが多くの論文において指摘されている^{98,110–112,119,146,147}。生細胞における Min 波の波長は、細胞分裂阻害によりフィラメント状になった細胞における MinD 高濃度領域の数が複数の Min 波の観察から、およそ 10 μm であることが明らかになっている⁵³。以下、本論文では空間内に存在する MinD 高濃度領域の数を波の数と呼ぶ。フィラメント状の生細胞と比較して、波の数が 1 の Min 波が発生する通常の大腸菌細胞の長さは 2–5 μm とさらに小さい。生細胞内における Min 波の standing wave の波長は細胞長の 2 倍と定義されることから⁹⁹、通常の細胞の Min 波は波の数が複数の Min 波の波長よりもさらに短いと考えられる。一方、平面膜上における Min 波の波長は 30–100 μm であり⁹⁹、人工細胞系においては円周 60 μm 程度の人工細胞内に波の数が 1 の波が出現するため、*in vitro* における Min 波の波長は *in vivo* の 10 倍程度と非常に長い^{124,125}。平面膜上の Min 波の波長は分子混雑¹¹³ やイオン条件¹¹¹、膜面積/体積比¹²⁰などにより変化することは示されてきたが、生細胞と同程度の短さの Min 波は観察されておらず、生細胞内ではどのように短い波長の波が形成されるのかは不明である。

3.1.2 細胞内反応拡散波の条件変化に対する適応

細胞内反応拡散波の理解には、タンパク質濃度や塩濃度などの分子組成の条件変化によりどのように波の特徴が変化するのかという、従来の *in vivo* 解析や開放系における実験および反応拡散モデルを用いた理論解析においてとられてきた視点だけではなく、細胞のような微小な閉鎖空間がもたらす影響を考慮する必要がある。たとえば、開放系である平面膜系と微小な閉鎖空間である人工細胞系では Min 波の出現条件が異なることが示されているよう¹²⁵、空間条件が異なれば反応拡散波も異なる振る舞いを示す。また、生細胞は分裂や成長に伴いサイズが変化するため、反応拡散波が空間サイズの変化の影響をどのように受け、その中でも適切に役割を果たすために波が出現し続けるだけではなく、どのように適応し時空間特性を維持しているのかを明らかにする必要がある。

大腸菌の生細胞では一度分裂した娘細胞が成長し次の細胞分裂を行うまでに、Min 波の周期がほぼ一定に保たれると共に、細胞膜面に対する Min 波の被覆領域が細胞の成長とともに増大する様子が観察されている¹³⁰。周期の安定性は、常に片方の細胞極にのみ局在する Min タンパク質が両細胞極における細胞分裂をバランスよく阻害するため、そして波の被覆領域の大きさは細胞中央以外での細胞分裂を阻害するために重要である。このような細胞サイズ変化に対する波の適応は、人工細胞系においても観察されている¹³¹。波の数が 1 の Min 波が発生している直径 25 μm 以下の人工細胞では、MinD 高濃度領域の幅（波幅）と速度が人工細胞の直径に対して線形に増加するスケーリング現象が見出された。スケーリングにより、人工細胞の膜面に対する波の占有角は人工細胞サイズによらずほぼ一定になった一方で、Min 波の波の数が複数になる直径 25 μm 以上の人工細胞では占有角ではなく波の幅が細胞サイズによらず一定になった。同様に、Min 波の traveling wave が人工細胞内を一周する周期も細胞サイズによらずほぼ一定になったが、人工細胞内に形成される波の数が複数の場合は速度が細胞サイズによらず一定になった。つまり、Min 波の波の数が 1 の場合と複数の場合とでは波の挙動に違いがあり、波の数が 1 の場合は人工細胞内においても生細胞と同様に細胞サイズに応じて Min 波の幅と速度を調節することで波の膜面に対する占有角と周期を一定に保っていることが示された。一般に、開放系の反応拡散波の特性は空間サイズに依存しないため、スケーリングは細胞サイズ空間特異的な現象である。

生細胞は空間形状だけではなく、外部環境の変化により物理化学パラメータも変化するため、反応拡散波はそのようなパラメータ変化にも適応する必要がある。この点において、平面膜上で再構成された Min 波の波幅と速度を大きく増加させるカリウムイオン濃度の増加に対し¹¹¹、人工細胞内の Min 波は安定性を示すことが明らかになっている¹³¹。平面膜上における Min 波の塩濃度依存性は、MinE の Membrane Targeting Sequence (MTS) 中の 10–12 番目のカチオン性アミノ酸残基 (RKK) と細胞膜による静電相互作用が、カリウム濃度の増加によって減少し、MinD を介さない MinE と脂質膜の直接的な相互作用の強さが変化することが影響していると考えられている¹¹¹。人工細胞内の Min 波も同様に塩濃度の影響を受けると考えられるが、波の幅と速度の両方において平面膜上に比べ塩濃度変化に対する感受

性が低下する理由は未解明である。大腸菌細胞では外部の塩環境に応じて細胞内のカリウム濃度が 100 mM から 900 mM 程度まで変化することが知られている¹⁴⁸。生細胞が様々な塩環境において細胞分裂を可能にするために Min 波を安定に存在させる仕組みが、人工細胞内の Min 波の塩濃度安定性に現れており、平面膜系とは異なり細胞サイズ空間においては Min 波の安定性を生み出す何らかのメカニズムがあると考えられる。

3.1.3 本章の目的

本章では、Min 波の周期や波長、波幅などの時空間特性の制御原理を解明することを目的とした。Min 波の時空間特性の制御原理として、先行研究¹³¹により報告されていた空間サイズ変化に対するスケーリングの原理を検証した。Min 波の波幅と速さのスケーリングのパラメータ依存性を検証するため、塩濃度や脂質組成、BSA 濃度など様々な条件を変えて Min 波を再構成したところ、すべての条件においてスケーリングが維持され、パラメータ非依存の現象であることが示唆された。このメカニズムを解明する手掛かりとして、反応拡散波が本来持つ空間周期性の性質が細胞サイズ空間において Min 波の数が 1 つの場合にどのように変化しているのか解析するため、人工細胞系と平面膜上における Min 波の形状を比較した。その結果、人工細胞内においては空間サイズが波の数が 1 の Min 波の波長に相当しており、波長も空間サイズによりスケールされることが示された。反応拡散波内在の周期は常に一定であることと波長が空間サイズによりスケールされることから、空間サイズが変化されると波全体が拡大縮小され、波幅と速さがスケールされると結論づけた。

空間サイズ以外にも Min 波の波長を制御する方法があるのか検証するため、低分子化合物による競合阻害を利用しパラメータを線形に制御することを試みた。ATP 依存的な MinD の膜結合を阻害することが報告されている dATP を競合阻害剤として用いたところ、Min 波が発生しないという予想に反して Min 波が発生した。さらに、dATP により発生する Min 波は ATP により発生する Min 波の半分程度の周期であり、dATP と ATP を混合すると、その混合比により周期を線形に制御可能であることを見出した。dATP を用いた場合の MinD の膜結合力や ATPase 活性の評価により、そのメカニズムの解明を試みた。さらに、dATP と ATP の混合比による Min 波の周期の制御を利用して、エネルギー分子濃度と Min 波の周期の情報を相互変換可能なことを実証した。

3.2 実験

3.2.1 Min 波の空間サイズに対するスケーリングの原理

3.2.1.1 MinE 変異体のプラスミドの作製と発現および精製

MinE の膜結合領域 (2–12 残基) を欠損した MinEΔMTS のプラスミド pET29-MinEΔMTS を作製した。pET29-MinEΔMTS-mCherry¹²⁶ を鋳型として KOD ONE DNA polymerase (TOYOB0, Osaka, Japan), pET29-F (DNA 配列 [5'から 3'] : AAAGGATCCCTCGAGCACCA) および MinE-pET29-R (DNA 配列 [5'から 3'] : GTGCTCGAGGGATCCTTCAGCTCTTGCT

TCCG) を用いて PCR 反応を行った。PCR 産物の DpnI 处理後, iVEC 法¹⁴⁹ を用いて目的のプラスミドを作製した。目的プラスミドがクローニングされた iVEC3 株のコロニーをカナマイシン含有 LB 培地 4 mL に植菌し, 37°C, 200 rpm において一晩培養した。遠心 (4°C, 13,210×g, 2 min) により菌体を回収し, QIA quick PCR Purification kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いてプラスミドを抽出した。回収したプラスミドの配列をユーロフィン DNA シーケンス受託サービス (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan) により確認した。MinE 変異体および mCherry 遺伝子が pET29 上にコードされたプラスミドを鋳型とし, 上記と同じプライマーを使用し, MinE^{I24N}ΔMTS, MinE^{D45A/V49A}, MinE^{D45A/V49A/I74M} の 3 種類の MinE 変異体のプラスミドを作製した。

作製したプラスミドを用いて大腸菌 BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL 株を形質転換し, 2.2.1 における野生型 MinE と同様の方法で MinE 変異体を発現および精製し, 濃度定量を行った。

3.2.1.2 人工細胞内における Min 波の再構成実験

2.2.3 と同様の方法で人工細胞内において Min 波を再構成した。MinD および msfGFP-MinC は 2.2.1 において精製したものを使用した。2.2.3 と同様に Reaction buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM GluK, 5 mM GluMg] 中に 0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD, 1 μM MinE, 2.5 mM ATP および 100 mg/mL BSA を混合した溶液を通常条件とした。塩濃度を変更する場合は, 5×Reaction buffer [125 mM Tris-HCl pH 7.6, 750 mM GluK, 25 mM GluMg] および 1.5 M GluK を用い, 任意の塩濃度の内液を調製した。KCl 濃度の影響を調べる際は, 5×KCl Reaction buffer [125 mM Tris-HCl pH 7.6, 750 mM KCl, 25 mM GluMg] および 1.5 M KCl を用いて KCl 濃度が 50–500 mM の内液を調製した。このとき, BSA 溶液は KCl Reaction buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM KCl, 5 mM GluMg] にバッファー交換したものを使用した。脂質組成の影響を調べる場合は, 2.2.3 で述べた *E.coli* polar lipid の脂質溶液の調製と同様の手法で 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) および 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DOPG) の混合脂質の脂質フィルムを作製した。このとき, DOPG 濃度を脂質分子全体の 10–40 mol% とし, DOPC と DOPG の終濃度の合計が 1 mg/mL となるようにした。脂質フィルム作製後, 1.5 時間減圧乾燥をした後, ミネラルオイルを添加し, Bransonic を用いて 60°C で 90 分間超音波処理をし, 1 分間ボルテックスをすることで脂質混合溶液を調製した。また, MinE 変異体を用いる場合は, 野生型 MinE の代わりに 0.2–5 μM の MinE 変異体を内液に添加した。

3.2.1.3 平面膜の作製および平面膜上における Min 波の再構成

先行研究¹⁵⁰ の手法を参考にし, 脂質平面膜をガラス上に作製した。2.2.5 と同様の方法で SUVs 溶液を作製した。この際, 乾燥させた脂質フィルムに Reaction buffer の代わりに TK150 buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.6 and 150 mM KCl] を脂質分子の終濃度が 4 mg/mL になるよう

に添加し、室温において一晩静置水和を行った。1分間のボルテックス後、エクストルーダーを用いて SUVs 溶液を作製し、TK150 buffer を用いて 2 mg/mL に希釈した。

平面膜作製用のチャンバーの作製のため、0.2 mL マイクロチューブの底 3 mm 程度と蓋を切り落とし、チューブの口の縁に紫外線硬化樹脂 (Norland UV Curing Adhesives 68; Norland Products, Cranbury, NJ, USA) を塗布し、Micro Cover glass 22 mm×32 mm (Matsunami Glass) の中央に置いた。紫外線を照射することでカバーガラスとマイクロチューブを接着させ、チャンバーを作製した。このチャンバーをプラズマイオンボンバーダ PIB-10 型 (Vacuum Device, Ibaraki, Japan) に静置し、HARD モードで 3 分間親水化処理を行った。

SUVs 溶液に終濃度 1 mM の CaCl₂ を加えた溶液を親水化処理後のチャンバーに 20 μL 添加し、室温で 5 分静置し平面膜 (Supported Lipid Bilayers, SLBs) を作製した。TK150 buffer 180 μL を加え 2–3 回ピペッティングし、150 μL の溶液を取り除いた。再び TK150 buffer 150 μL を加え、同じ操作を 4 回以上繰り返し、余剰した SUVs や CaCl₂ を除去した。Reaction buffer 150 μL を加え 2–3 回ピペッティングし、150 μL の溶液を取り除く操作を 5 回以上繰り返し、チャンバー中のバッファーを Reaction buffer に置換した。

チャンバー中の反応溶液量が 50 μL となるように Reaction buffer および msfGFP-MinC (終濃度 0.1 μM), MinD (終濃度 1 μM), MinE (終濃度 1 μM), ATP (終濃度 2.5 mM) を平面膜上に添加すると共に、塩濃度や BSA 濃度を任意の濃度に変更した。チャンバー作製時に切り落とした 0.2 mL マイクロチューブの蓋でチャンバーに蓋をし、室温で 2 時間以上静置した後、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000) を用いて Min タンパク質の挙動を観察および撮像した。

3.2.1.4 Min 波の性質の画像解析

Fiji ソフトウェアを用いて Min 波の波幅、波が膜面に占める占有角、速度、および周期の解析を行った。波の数が 1 の Min 波が発生している任意の人工細胞の直径および人工細胞内において観察断面に生じている Min 波の両端と人工細胞の中心が成す角度 (占有角) を、Fiji ソフトウェアの Straight line tool および Angle tool を用いて測定した。波幅は、(人工細胞の直径) × π × (占有角) / 360° により算出した。また、Min 波が人工細胞内を一周以上するのにかかった時間と、その時点で 360° を超えて進んだ角度を測定し、(時間) × 360° / (波が進んだ角度) により周期を算出した。(人工細胞の直径) × π / (周期) により速度を算出した。sfGFP-MinD と MinE-mCherry により再構成された Min 波の解析においては、光山博士 (東京大学) が取得した蛍光顕微鏡画像を解析した。

平面膜上において再構成した Min 波の解析においては、任意の波において波の進行方向に対して平行の方向に msfGFP-MinC の蛍光シグナルが観察された長さを波幅として、連続する 2 つの波の後縁間の長さを波長として測定した。同様に、連続する波の進行方向に対して平行方向に任意の 2 点を取り、2 点間の距離および 2 点間を波が移動するのに要した時間の平均値を用いて、波の速度を算出した。

3.2.1.5 拡散速度の解析

2.2.3 および 3.2.1.2 と同様の方法で *E. coli* polar lipids または DOPC と DOPG の混合脂質, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) (Avanti) と DOPG の混合脂質を溶解した脂質溶液を調製し、エマルションを作製した。DOPE と DOPG の混合脂質を調製する際、脂質分子の終濃度の合計が 1 mg/mL になるようにし、DOPG 濃度を脂質分子全体の 10 または 40 mol%とした。人工細胞の内液は、Reaction buffer 中に 1 μM msfGFP-MinD, 2.5 mM ATP および 100 mg/mL BSA を添加したものを使用した。エマルション内の msfGFP-MinD の蛍光を共焦点顕微鏡 (FV1200; Olympus) により観察し、FV1200 の tornade bleaching を用い膜上における msfGFP-MinD の一部を褪色させ、褪色領域の蛍光強度の経時変化を FRAP モードにより測定した。Axelrod 式¹⁵¹によりフィッティングカーブを算出し、msfGFP-MinD の膜上における拡散速度を求めた。

3.2.2 2種類のエネルギー源を用いた Min 波の制御

3.2.2.1 dATP を用いた人工細胞内における Min 波の再構成実験

Min タンパク質は 2.2.1 で精製したものを使用した。また、2.2.1 の MinD と同様の手法で msfGFP-MinD を発現および精製した。発現用プラスミドは pET15-msfGFP-MinD¹²⁶ を使用し、AmiconUltra-0.5 30K を用いて精製したタンパク質溶液の濃縮とバッファー交換をした。

Min 波の人工細胞内再構成のため、Reaction buffer 中に 0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD, 0.7 または 1 μM MinE, 100 mg/mL BSA、および 2.5 mM ATP または dATP, ADP を混合した溶液を用いて 2.2.3 と同様の手法でエマルションを作製した。ATP および dATP の濃度比の影響を検証するため、ATP および dATP の合計濃度を 2.5 mM に固定し、任意の濃度比で両者を混合した。蛍光顕微鏡を用いて Min 波のタイムラプス画像を撮像し、人工細胞の膜上のキモグラフを Fiji ソフトウェアを用いて作製した。波長の解析以外は、波の数が 1 の Min 波が発生している人工細胞のみを解析に使用した。

MinD の膜局在の解析のため、1 μM msfGFP-MinD および 100 mg/mL BSA, 2.5 mM ATP または dATP, ADP を内包した人工細胞を作製した。この人工細胞における msfGFP-MinD の局在を蛍光顕微鏡により観察した。

Min 波の周期を用いた ATP/dATP 比のデコーディング実験では、ATP 溶液および dATP 溶液として、事前に 2.5 mM ATP と 4 μM mCherry, 2.5 mM dATP と 10 μM TagBFP2 を混合した溶液を使用した。mCherry および TagBFP2 は、先行研究¹³⁴において精製されたものを使用した。これらの溶液を用い、0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD, 0.7 μM MinE, 100 mg/mL BSA および蛍光タンパク質と混合した ATP および dATP を任意の濃度比で混合し、人工細胞を作製した。mCherry および TagBFP2 の蛍光シグナルを蛍光顕微鏡により撮像した後、msfGFP-MinC の挙動を観察した。mCherry および TagBFP2 の蛍光強度を Fiji ソフトウェア

の Analyze Particle を用いて測定し、この値を各人工細胞の断面積の平方根により割った値を用いて、ATP/dATP 比を算出した。

人工細胞内において発生した波の数が 1 の Min 波のタイムラプス画像から、Min 波の周期として、Min 波が人工細胞内を一周するのに要する時間を測定した。Fiji ソフトウェアの Angle tool を用い、Min 波が人工細胞内を 360°以上進んだ時点において、360°を超過して進んだ角度を測定した。この角度と時間を用い、周期を算出した。

3.2.2.2 MinD と脂質小胞の共沈降アッセイ

MinD の膜親和性を定量的に調査するため、SUVs に結合する msfGFP-MinD 量を推定した。2.2.5 と同様の方法で SUVs 溶液を調製した。Reaction buffer 中に 0.5 μM msfGFP-MinD, 0.5 または 1.5 mg/mL SUVs、および 500 μM ATP または dATP, ADP を混合し、室温において 30 分間静置した。4°C, 30,000 $\times g$ の条件で 10 分間遠心し、上清を除去した。沈殿物を 10 μL の Reaction buffer を用いて懸濁し、懸濁液中の msfGFP-MinD の蛍光強度を GloMax Explorer (Promega, Madison, WI, USA) を用いて定量した。

3.2.2.3 MinD による ATP または dATP の加水分解活性の評価

Reaction buffer 中に 1 μM MinD および 1 μM MinE を 2.5 mM ATP または dATP と 1 mg/mL SUVs と共に混合した。また、dATP を用いる場合、MinD と MinE どちらか一方のみを含む反応溶液も調製した。混合溶液を 37°C において反応させ、反応開始直後から 40 分までの反応溶液を 5 分毎に 5 μL ずつ分取した。反応後の溶液に含まれる無機リン酸 (Pi) 濃度を BIOMOL Green を用いて定量し、Pi 濃度の増加速度から、ATP および dATP の加水分解速度を算出した。

3.3 結果

3.3.1 Min 波の空間サイズに対するスケーリングの原理

3.3.1.1 Min 波のスケーリングのパラメータ依存性

波のモードはパラメータにより制御されたが、本研究の人工細胞系では、同じ再構成条件下であっても個々の人工細胞のサイズは異なる。人工細胞のような閉ざされた系では空間サイズにより表面積/体積比が変化するため、空間的な特徴に違いが生じる。同じ条件下における異なるサイズの人工細胞内の Min 波を比較すると、人工細胞の直径が大きくなるほど Min 波における MinD の高濃度領域の幅（波幅）や速度が線形に増加するスケーリングの性質があることが先行研究¹³¹により明らかになっている (Fig. 3-1A 上, B 上)。波幅や速度の観点で比較すると空間サイズに依存して変化するが、波幅を波の形状と捉え、さらに速度を波が人工細胞内を一周するのにかかる時間（周期）に変換すると、波の形状と周期が空間サイズによらず一定になる (Fig. 3-1A 下, B 下)。このスケーリングのメカニズムの解明のため、平面膜上において再構成された Min 波の波幅や速度を変化させている

塩濃度や脂質膜の組成を変更した場合でもスケーリングが維持されるか検証した。ここで、第2章においてMin波のstanding waveは出現するパラメータ条件が狭いことが示されたため、本章においてはMin波のtraveling waveを解析の対象とした。また、MinDまたはMinCの高濃度領域のドメインの数を波の数と定義した。

カリウムイオン濃度やアニオン性脂質の割合により脂質膜とMinEの静電相互作用が変化するため、カリウムイオン濃度が高い、またはアニオン性脂質が少ないほど波幅が長く、速度は速くなる¹¹¹。Minタンパク質は先行研究¹³¹と同様に1μM sfGFP-MinDおよび1μM MinE-mCherryを用い、これまで150mMだったカリウムイオン濃度を50–300mMの範囲で変えて人工細胞の直径およびMinD高濃度領域の数（波の数）が1のMin波の波幅と速度を測定した。人工細胞の直径に対しMin波の波幅および速度をプロットした結果、カリウムイオン濃度によらず波幅と速度ともに比例関係にあり、空間サイズに対してスケーリングすることが示された（Fig. 3-2A, 3-3A）。同様にこれまで用いてきた*E. coli* polar lipid extractの代わりに中性脂質のDOPEとアニオン性脂質のDOPGの混合脂質を用い、DOPGの割合を10–40%の範囲で変えても、波幅および速度が人工細胞直径に比例し、スケーリングが維持されていた（Fig. 3-2A, 3-3A）。これらより、塩濃度や脂質組成に依らず空間サイズに対するスケーリングが維持されることが示された。

このように、開放系においては波幅や速度が反応パラメータの影響を大きく受けるのにも関わらず¹¹¹、人工細胞内においては塩濃度や脂質組成を変えても波幅と速度が空間サイズによってスケールするという制御が存在することがわかった。ここで、これまでにスケーリングを検証した実験系ではsfGFP-MinDおよびMinE-mCherryを用いていたため、MinDEに蛍光タンパク質を融合していることのアーティファクトである可能性を考えた。実際に、先行研究により蛍光タグがMinEの機能に影響を与えることが報告されている¹³⁶。そこで、生細胞内のMin波により近い条件にするため、第2章において用いたmsfGFP-MinC, MinDおよびMinEによりMin波の発生および観察を行うことにした。この実験系による波の数が1のMin波の波幅と速度を測定した結果、共に人工細胞の直径と比例したことから、Min波のスケーリングは蛍光タグのアーティファクトではないことが示された（Fig. 3-2B, 3-3B）。

次に、Min波のスケーリングのメカニズムを追求するため、スケーリングのパラメータ依存性を検証した。Min波の発生に関わるパラメータとして、細胞質中および膜上におけるMinDEの拡散係数、MinDEの膜結合、MinDEの膜からの解離、MinEによるMinDのATPase反応の誘導、MinEの構造変化が挙げられる。これらのパラメータのうち膜上の拡散係数は、msfGFP-MinDおよびATP, BSAを内包した人工細胞における膜上のmsfGFP-MinDの拡散係数をFRAPにより測定することで、脂質組成によって変化することが示された（Fig. 3-4）。*E. coli* polar lipidよりも拡散速度が低下するDOPEおよびDOPGの混合脂質でもスケーリングが維持されることは、蛍光タンパク質融合のMinDEを用いた実験により既に示されている（Fig. 3-2A, 3-3A）。そこで、拡散速度を増加させるような脂質組成の変更（拡散速度やMinDEの膜結合¹¹¹に作用）、より広い濃度レンジの塩濃度の変更（MinEの膜結合やMinDE

の解離に作用¹¹¹), BSA 濃度の変更(細胞質中の拡散に作用¹²⁵), MinE 変異体の使用 (MinE の膜結合や MinD との結合, ATPase 反応の誘導, MinE の構造変化に作用^{105,107,126})により, パラメータを変えて Min 波を発生させ, スケーリングが生じるかを調べた (Fig. 3-5). 通常条件は 0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD, 1 μM MinE, 100 mg/mL BSA, および 150 mM GluK のところ, 塩濃度を 50–500 mM, BSA 濃度を 50–200 mg/mL の範囲でそれぞれ変更した結果, 全ての条件において波幅および速度と人工細胞の直径が比例し, スケーリングが維持された (Fig. 3-2B, 3-3B). また, 膜を構成する脂質を *E. coli* polar lipid の場合よりも拡散速度が 2 倍程度に速くなる DOPC と DOPG の混合脂質に変更し (Fig. 3-4), DOPG の割合を 10–30% の範囲で変えて用いると, DOPG の割合が小さいほど波幅は長く, 速度は遅くなる傾向にある一方で, 各条件におけるスケーリングは維持された (Fig. 3-2B, 3-3B). さらに, 膜結合領域を欠損した MinEΔMTS および膜結合能や MinD との相互作用が異なる MinE 変異体¹⁰⁵ (MinE^{I24N}ΔMTS, MinE^{D45A/V49A}, MinE^{D45A/V49A/I74M}) を用いて同様にスケーリングを検証した. MinE 変異体を使用すると Min 波が発生する濃度領域が変化することから¹²⁶, msfGFP-MinC により Min 波を可視化する実験系において MinE 変異体の濃度を振り, Min 波が発生する各 MinE 変異体の濃度領域を調べた (Fig. 3-6). その中で Min 波が最も安定的に発生した MinE 変異体濃度における波幅および速度を測定した結果, 変異体により同じサイズの人工細胞における Min 波の波幅と速度が大きく変化するのにも関わらず, どの変異体においてもスケーリングが確認された (Fig. 3-2B, 3-3B). 以上より, Min 波の波幅と速度のスケーリングはどのパラメータ条件でも維持される, つまりパラメータ非依存であることが示唆された.

3.3.1.2 波長のスケーリング

ここまで検証により, 波の数が 1 の Min 波の波幅と速度がパラメータ非依存的に空間サイズに対してスケーリングすることが示唆された. 速度は Min 波の時間に関する指標であり, 波の数が 1 の場合は速度から Min 波が人工細胞内を一周し元の状態に戻るまでの時間を算出することで, 時間にに関する周期性を定義可能である. 一方, 波幅は Min 波の空間形状の指標に過ぎない. 反応拡散波の空間周期性を決定付けるのは波幅ではなく波長であるが, 波長も波幅と同様にスケーリングするかは明らかではない. このような空間サイズが波長に与える影響を検証するにあたり, そもそも波長は波と波の間の間隔のことを指すため, 波の数が 1 の Min 波の場合は空間的な周期性を定義できず, 波の数が複数の波と同じように波長を議論できないという問題がある.

波の数が 1 の Min 波の波長に相当する特徴には, 2 つの仮説が考えられる. 一つ目の仮説は Min 波が内在的な固有波長をもつという考え方である^{53,120} (Fig. 3-7A 上). この場合, 波長は開放系における複数の波の固有波長と同様に反応パラメータにより定義され, 空間サイズに関係なく一定になる. 二つ目の仮説は, 波長が空間サイズに対してスケールされるという考え方であり, この場合の波長は空間サイズによって決定される¹²² (Fig. 3-7A 下). つまり, 波の数が 1 の場合は人工細胞の断面の円周の長さが波長となる. この仮説は, 周期境

界条件が仮定されている場合、人工細胞を一周すると、見た目には同一の波であるものの再び波が現れるため、波の数が 1 の Min 波の場合でも周期構造をもつ波の数が複数の波と見なせることに基づく。

これらの仮説を検証するにあたり、先行研究¹¹¹で示されているカリウムイオン濃度に対する波長の感受性に着目した。*E. coli* polar lipid を用いて脂質平面膜 (supported lipid bilayers, SLBs) を作製し、GluK 濃度を 50–500 mM の範囲で変えて人工細胞系と同じ条件で Min 波を再構成すると、先行研究と同様に Min 波の波長 (Wl) と波幅 (Bw) はどちらも塩濃度の増加に伴い増加した (Fig. 3-7B–D)。ここで、波長と波幅それぞれに着目すると塩濃度感受性が高いにも関わらず、波の形状に相当する Bw と Wl の比 ($\xi = Bw/Wl$) は塩濃度増加に伴いわずかに大きくなるものの、ほぼ一定であることを見出した (Fig. 3-7E)。塩濃度に対する ξ の頑健性を利用し、波の数が 1 の Min 波の波長が空間サイズに依存しない固有波長なのか、空間サイズによりスケールされるかを検証した。波の数が 1 の Min 波の波長が固有のものであれば、人工細胞のサイズは波長とは無関係であるため、 Bw と空間サイズ (人工細胞の断面の円周, πd ; d は人工細胞の直径) の比 ($\zeta = Bw/\pi d$) は塩濃度に対して感受性を示すはずである。一方、波の数が 1 の Min 波の波長が Bw と同様に空間サイズによりスケールされる場合、 Bw と πd の比である ζ は平面膜系における Bw と Wl の比である ξ に比例するはずであるため、塩濃度に対して安定性を示すと考えられる。この仮説のもと、人工細胞系において 50–500 mM の範囲で GluK 濃度を変えて発生させた Min 波の ζ を解析した結果、 ζ は塩濃度の増加に伴いわずかに増加するのみでほぼ一定となり、開放系における ξ と非常に似た塩濃度変化に対する応答を示した (Fig. 3-7B,E)。したがって、波の数が 1 の Min 波の波長は空間サイズにより定義される、つまりスケーリングすることが示唆された。

ζ と ξ の比較により人工細胞内における波の数が 1 の Min 波の波長のスケーリングを検証したが、細胞サイズ空間における ζ が開放系における ξ と本質的に等しいか否か、つまり、 ζ と ξ が比例関係にあるか否かは不明である (Fig. 3-8A)。この点を検証するため、塩濃度変化に対する開放系における ξ のわずかな変化に注目した。 ξ は塩濃度変化に対して頑健であるものの、厳密には一定ではなくわずかに変化していることから、物理化学的条件を変化させると ξ も変化すると考えられる。実際に、MinE の TM 変異体 (MinE^{D45A/V49A/I74M}) を用いると、タンパク質のコンフォメーション変化に関する特性は野生型 MinE と類似しているものの^{105,126}、 ξ は野生型 MinE の場合よりも 1.29 倍高くなった (Fig. 3-8B)。また、MTS を欠損した MinEΔMTS 変異体の場合、 ξ は野生型 MinE の 1.72 倍になった (Fig. 3-8B)。 ξ と ζ の関係性を検証するため、人工細胞系においても MinE 変異体を用いた場合の Min 波の ζ を解析した結果、開放系の場合と同様に、TM 変異体の場合は野生型の 1.26 倍、MinEΔMTS の場合は 2.45 倍に増加した (Fig. 3-8B)。このように、平面膜系と人工細胞系ともに TM 変異体を用いると ξ または ζ がわずかに増大し、MinEΔMTS を用いると大きく増加したことから、 ξ と ζ はパラメータ変化に対して類似した応答を示すと言える。さらに、定量的な比較をするため、TM 変異体を用いて 150, 300, 500 mM GluK 条件下において

人工細胞系および平面膜系の両方の空間条件下において Min 波を再構成し、 ζ または δ を解析した。その結果、野生型 MinE を用いた場合と同様に、平面膜系における波長や波幅そのものは塩濃度の増加に伴い増大し、500 mM GluK における波長と波幅はそれぞれ 150 mM GluK 条件時の 2.30 倍および 3.25 倍になった (Fig. 3-8C)。一方、 ζ の変化は 1.40 倍に抑制された (Fig. 3-8D)。また、人工細胞系における ζ も塩濃度の上昇に伴いわずかに増加し、平面膜系における ζ と類似した推移を示した (Fig. 3-8D)。このデータと様々な塩濃度条件で野生型 MinE を用いて再構成した Min 波の ζ および ζ を併せ、 ζ に対して ζ をプロットすると、強い相関関係があることがわかった ($r = 0.98$) (Fig. 3-8E)。これらは、細胞サイズ空間における ζ が開放系における ζ と本質的に等しいことを示している。これらの結果を統合すると、波の数が 1 の Min 波の波長は空間サイズにより定義され、波長が空間サイズによりスケールされることで、波全体が拡大縮小の制御を受け、波幅や速度もスケールされることが示された。

3.3.1.3 人工細胞内における波の数が 1 の Min 波の塩濃度安定性

ここまで、Min 波のモード (第 2 章) や波幅および速度 (本章) はパラメータにより変化することを示した一方で、同一条件下における異なるサイズの人工細胞を比較すると空間サイズに対して波長、波幅、速度がスケーリングしており、これにより波の形状や周期が空間サイズによらず一定に保たれていることが明らかになった。このように Min 波の性質が安定性を示すのは空間サイズだけではない。先行研究により、Min 波の波幅に相当する波の ζ と速度に相当する周期が塩濃度変化に対して安定性を示すことが示されている¹³¹。平面膜系においては Min 波の波幅と速度は塩濃度感受性が強いため¹¹¹ (Fig. 3-7B,D)，これは細胞サイズ空間特異的な性質である。

先行研究では 50–300 mM GluK の濃度領域で塩濃度安定性が報告されていたが、より広い濃度領域においても安定性が見られるのか、そして msfGFP-MinC を用いて Min 波を可視化する生体内の条件に近付けた本研究の実験系においても塩濃度安定性があるかを確認するため、人工細胞系と平面膜系の両方において 50–500 mM の塩濃度条件下における時空間特性の安定性を検証した。人工細胞系の場合は人工細胞間の空間サイズの違いの影響を排除するために ζ および角速度を、平面膜系の場合は波幅および速度を測定し、塩濃度に対してプロットした。その結果、平面膜系では 50 mM GluK から 500 mM GluK にかけて波幅が 3.08 倍に増加し (Fig. 3-9A)，速度は最小値 (50 mM GluK 条件) と最大値 (300 mM GluK 条件) との間に 4.18 倍の差があるのに対し (Fig. 3-10A)，人工細胞系では ζ は 50 mM GluK から 500 mM GluK にかけて 1.28 倍増加し (Fig. 3-9B)，角速度は最小値 (500 mM) と最大値 (150 mM) の差が 1.99 倍であり (Fig. 3-10B)，より広い塩濃度領域において msfGFP-MinC を用いた系においても、平面膜系に比べて安定性が見られた。また、先行研究¹¹¹ では完全に電離する KCl を塩として用いているのに対し、本研究では電離度が低く塩としての効果の弱い GluK を用いていることが人工細胞系における塩濃度安定性の要因である可能性を考

え、KCl を用いて人工細胞内において Min 波を再構成し、塩濃度安定性を調べた。その結果、GluK の場合と同様に 50 mM から 500 mM に KCl 濃度が増加しても ζ の増加は 1.21 倍に留まり、ほぼ一定となった (Fig. 3-9B)。また、速度も最小値 (150 mM) と最大値 (400 mM) の差は 1.18 倍と小さかった (Fig. 3-10B)。したがって、人工細胞系における Min 波の塩濃度安定性は GluK を用いていることに由来するものではないと言える。

塩濃度変化に対して異なる応答を示す人工細胞内と平面膜上における Min 波の再構成系の大きな違いとして微小な閉鎖空間と開放系という空間的な差に加え、BSA の有無が挙げられる。人工細胞内では BSA との膜の競合を利用し MinE の分子配置を制御しなければ Min 波が発生しないが、平面膜系では BSA は添加されていない。もし人工細胞内における Min 波の塩濃度安定性に BSA が関与していた場合、BSA を減らすと塩濃度安定性が弱まり、BSA を増やすとより安定になると考えられる。この点を検証するため、通常 100 mg/mL の濃度で BSA を用いているところ、50 および 200 mg/mL にして人工細胞内で Min 波を再構成し、 ζ と角速度を解析した。その結果、 ζ の塩濃度安定性は BSA 濃度によらず同程度となった (Fig. 3-9B)。一方で、角速度は BSA 濃度が高いほど高濃度 GluK 条件で大きく增加了 (Fig. 3-10B)。BSA 濃度を低くした場合に塩濃度安定性は消失せず、さらに予想に反し BSA 濃度が高い場合に速度の塩濃度依存性が確認されたことから、BSA が塩濃度安定性の要因ではないことが示唆された。

さらに、平面膜系に BSA を添加することで平面膜上での Min 波にも塩濃度安定性が現れるか検証した。Min タンパク質に加え、50 または 100 mg/mL BSA を用いて平面膜上における Min 波の波幅と速度を解析した。その結果、BSA 非添加の条件と同様に Min 波の波幅は塩濃度に依存して増加した (Fig. 3-9A)。一方、BSA 非添加条件においては速度の最小値と最大値の間に 4.18 倍の差が生じたが、BSA を添加すると 50 mg/mL BSA の場合は速度の変化が最大 2.43 倍、100 mg/mL BSA の場合は最大 1.99 倍となり、BSA 濃度の増加に伴って塩濃度感受性が低下した (Fig. 3-10A)。人工細胞系において BSA 濃度を増加させた場合と反対の振る舞いを示したことから、速度の塩濃度安定性に対する BSA の影響は定かではない。しかし、波幅については BSA の影響は見られなかったことから、人工細胞内の Min 波の波幅の塩濃度安定性は BSA に起因するものではないことが示唆された。

3.3.1.4 人工細胞内における波の数が複数の Min 波の塩濃度変化への応答

これまで波の数が 1 の Min 波の塩濃度安定性を検証してきたが、直径がおよそ 25 μm 以上の人細胞では波の数が複数になり、人細胞の直径に対し波の数が線形に増加することが明らかになっている¹³¹。そこで、波の数が複数の Min 波が塩濃度変化に対してどのような応答を示すか調べることで、波の数が 1 の Min 波にのみ塩濃度安定性があるのか、あるいは閉鎖空間であれば塩濃度安定性が生じるのかを検証した。

これまで直径が約 10–30 μm の波の数が 1 の Min 波が発生している人細胞を観察していたが、人細胞を作製する際のタッピングの回数を減らすことにより大きな人細胞を

作製し、波の数が複数の Min 波を観察した。波の数が複数の Min 波は出現や消失を繰り返すなど不規則に振る舞い、波幅や波の形状が常に変化する様子が観察された。この不規則な振る舞いから、波の数が 1 の Min 波とは異なり波幅と速度の測定が困難であったため、波の数の人工細胞サイズ依存性を利用して波長が塩濃度によって変化するか調べた。波の数が複数の場合、波長は波同士の間の間隔であるため、人工細胞の断面の円周を波の数で割ることで平均波長を算出することができる。GluK 濃度を 150–500 mM の範囲で変えて様々なサイズの人工細胞内で再構成した Min 波の波の数の時間平均を解析した結果、GluK 濃度を変えて先行研究¹³¹と同様に波の数が 1 より大きい Min 波において波の数が人工細胞の直径に対し線形に増加した (Fig. 3-11)。このとき、時間平均の波の数が 1 より大きいデータのみを線形回帰した際の回帰直線の傾きが GluK 濃度の増加に伴いわずかに減少し、GluK 濃度が高いほど波の数が少なくなった。これは、塩濃度の増加により波の数が複数の Min 波の波長が長くなっていることを示している。回帰直線の傾きの逆数が波の数が 1 つ増えるのに必要な人工細胞の直径の増加分であることを利用して平均波長を算出すると、150 mM GluK の場合は 71.1 μm、300 mM GluK の場合は 83.8 μm、500 mM GluK の場合は 97.3 μm となつた。ここで 500 mM GluK 条件下における波長は 150 mM の場合の 1.37 倍である。BSA 非添加の平面膜系において、500 mM GluK の場合の波長は 150 mM GluK の場合の 1.51 倍であることを踏まえると、人工細胞系において波の数が複数の場合、波長の塩濃度依存性は平面膜系と大きく変わらない。また、波の数が 1 の Min 波が発生した人工細胞の直径の最大値は GluK 濃度が 150 mM では 29.1 μm、300 mM では 36.8 μm、500 mM では 39.1 μm であり、500 mM GluK での最大値は 150 mM GluK での最大値の 1.34 倍となつた。開放系における Min 波の波長と波幅は塩濃度が高いほど長くなること、人工細胞内における波の数が複数の Min 波の波長も塩濃度が高いほど長くなること、そして人工細胞系において波の数が 1 の場合はスケーリングにより人工細胞の断面の円周が波長となることから、この結果は塩濃度が高いほど波の数が 1 の Min 波の最大波長も長くなることを示している。さらに、この波の数が 1 の Min 波が発生する人工細胞サイズの最大値の塩濃度変化も平面膜系における波長の塩濃度依存性と同程度であることから、細胞サイズ空間であっても空間サイズが波長よりも大きい場合、波長は塩濃度により変化すると言える。これらより、Min 波の波幅の塩濃度安定性は、波の数が 1 の場合に特異的な現象であることが示唆された。

3.3.2 2 種類のエネルギー源を用いた Min 波の制御

3.3.2.1 dATP による Min 波の発生

前節において空間サイズが Min 波の空間周期性そのものである波長を規定することを明らかにしたが、Min 波の人工細胞系では直径 5 μm 程度、つまり円周 15 μm 程度の人工細胞が波が発生する人工細胞サイズの下限であり、生細胞と同程度の短さの波長の波は見られていない。したがって、細胞サイズ空間において空間以外にも波長を制御可能な因子があることが予想されるが、この点は明らかではない。実際に平面膜上における再構成研究におい

ては、Min 波の性質は反応サイクルに登場する分子濃度の変更^{112,116,117,126,127} や、塩濃度¹¹¹、温度¹⁴⁰、変異体^{112,116,138} や脂質膜の組成¹¹¹などの分子の種類を変更することで変化させることが可能である (Fig. 3-2, 3-3)。しかし、1つの要素の変動が複数のパラメータに影響を及ぼすこと、そして変異体や脂質の組成などは連続的な変化が不可能であり、非線形で複雑な振る舞いを示す反応拡散波の理解が困難であるという問題がある。そこで、連続的なパラメータ変化が可能で、単一のパラメータにのみ作用し得るものとして、低分子化合物を用いた競合阻害による活性調節に着目した。先行研究では ADP や dATP などの ATP の類似化合物が ATP 依存的な MinD の膜結合を阻害することが示されている^{55,108}。このうち ADP は、Min 波の発生において MinD が ATP を加水分解することで生じる分子であるため、ADP の添加は複数のパラメータに作用する可能性がある。そこで、dATP の添加により Min 波の時空間特性が変化するか検証した。

まず、dATP が ATP による Min 波の形成を阻害することを確認するため、ATP, ADP, dATP のいずれかを用いて 0.1 μM の msfGFP-MinC および 1 μM の MinD, MinE により人工細胞内において Min 波が発生するか検証した。その結果、予想通り ATP 条件ではほぼ全ての人工細胞において Min 波が発生し、ADP 条件では Min 波が発生しなかった ($n > 100$) (Fig. 3-12A)。しかし、驚くべきことに、ATP の代わりに dATP を用いた人工細胞において、ほぼ全ての人工細胞において Min 波が発生した (Fig. 3-12A)。さらに、人工細胞の断面の膜上における msfGFP-MinC の蛍光強度のキモグラフを作製したところ、dATP による Min 波の周期は ATP による Min 波の周期の半分以下であることが明らかになった (Fig. 3-12A)。

この dATP により Min 波が発生するという結果が、dATP に混入した ATP の影響ではなく、dATP が MinD と結合することによるものであるかを検証した。ここで使用した dATP は純度 99% であるため、2.5 mM dATP 条件中に最大 25 μM の ATP が混入している可能性がある。この 25 μM ATP により Min 波が発生した可能性を検証するため、2.5 mM dATP またはそこに混入し得る量の 2 倍量の 50 μM ATP それぞれの条件で、Min 波の残存率の時間変化を計測した (Fig. 3-12B)。50 μM ATP の場合、人工細胞作製直後は全ての人工細胞において Min 波が発生していたが、15 分後には波の発生率が 25%まで低下し、20 分後にはほとんどの人工細胞において Min 波が消失した。一方、2.5 mM dATP を用いた場合は波の発生率は 80%から 95%と ATP の場合 (100%) よりわずかに低くなつたが、人工細胞作製から 70 分後にも Min 波が発生し続けていた。これらの結果から、dATP による Min 波の発生は ATP の混入が原因ではなく、dATP そのものによって Min 波が発生することが示唆された。したがって、dATP は Min 波発生の阻害剤ではなく、ATP と同様のエネルギー源として機能することが明らかになった。

3.3.2.2 dATP/ATP 濃度比による Min 波の周期の制御

Min 波が ATP だけではなく dATP により発生可能であること、および dATP による Min 波は周期が短くなることが示された。この結果は dATP と ATP という 2 種類のエネルギー源

を使うことで、周期を細かく調節可能であることを示唆する。そこで、ATP と dATP を混合した場合に Min 波がどのような振る舞いを示すかを検証するため、ATP と dATP の合計濃度が 2.5 mM になるように等濃度で両者を混合した条件において Min 波が発生するかを観察した。ここでは traveling wave を安定的に発生させるため、MinD と MinE 濃度をそれぞれ 1 μM と 0.7 μM にした。その結果、ATP と dATP を混合してもほとんどの人工細胞で Min 波が発生した (Fig. 3-13A)。スケーリングにより人工細胞サイズの影響を受けない周期を解析すると、ATP のみの条件では Min 波の周期が 93 ± 12 s、dATP のみの条件では 46 ± 4 s と半分程度であった。一方、ATP/dATP 混合条件では 71 ± 9 s であり、ATP または dATP のみを用いた場合の周期の中間的な長さになった。この結果は dATP と ATP の濃度比によって Min 波の周期の変調が可能であることを示している。また、各条件における人工細胞の直径を測定した結果、3 条件ともほぼ同じ分布を示した (Fig. 3-14A)。また、解析した人工細胞の 46–50% を占める直径 17–22 μm の人工細胞における Min 波の周期と解析した全ての人工細胞 (直径 7–30 μm) における Min 波の周期を比較すると、相関係数は 1.00 であった (Fig. 3-14B)。これらの結果から、エネルギー種による周期の違いは解析した人工細胞のサイズの違いによるものではないといえる。

dATP により Min 波の周期を変調可能であることが示されたため、ATP と dATP の濃度比を変更し、周期が連続的に変調するか検証した。ATP による長い周期の Min 波と dATP による短い周期の Min 波のどちらかが一方を打ち消す場合は、ATP/dATP 濃度比によって周期が急激に変化すると考えられる。しかし、ATP と dATP の濃度比が 1:1 の条件における Min 波の周期の標準偏差が ATP や dATP のみの場合と同程度であることから、両者は共存しており、ATP/dATP 濃度比によって線形的な周期の変調が可能なことが想定された。そこで、ATP/dATP 濃度比を 1:1 以外にもより細かく変更することで、Min 波の周期の変調を試みた。ATP と dATP の合計濃度を 2.5 mM に固定し、9 種類の ATP/dATP 濃度比における Min 波の性質を調べた。膜上の msfGFP-MinC のキモグラフや膜上の定点における蛍光強度の時間変化の解析により、dATP が増加するほど一定時間に波が伝播する回数が増加することが示された (Fig. 3-13B,C)。さらに、波の周期を ATP と dATP の合計濃度に対する ATP の割合に対してプロットした結果、dATP の増加に伴い周期が線形に短くなった (Fig. 3-13D)。このとき周期という時間に関する性質ではなく、空間的な性質も同時に変化しているか確認した。まず波の数が 1 の Min 波において空間周期性を特徴付いている波のサイズ (波幅) を解析した。波幅を人工細胞の断面の円周に占める MinD ドメインの角度 (占有角) によって評価したところ、ATP/dATP 比により 121° から 154° の範囲で変化したものの、その濃度比によらずほぼ一定となった (Fig. 3-15A)。また、波の数が複数の Min 波の空間的特性として、2 つの波の間の間隔である波長を測定した結果、ATP のみと dATP のみの条件の間に有意な差は見られず ($p > 0.05$)、ほぼ同じ長さであった (Fig. 3-15B)。これらの結果より、dATP と ATP の混合により、Min 波の時空間的性質のうち周期のみを線形に変調可能であることが実証された。

3.3.2.3 Min 波の発生における dATP の機能

dATP により Min 波が発生し、さらに ATP/dATP 比により Min 波の周期を制御することができるメカニズムを解明するため、dATP が Min システムにおいてどのように機能しているか検証することにした。通常、ATP は Min システムにおいて MinD の膜結合および ATPase 活性の 2 つの反応に関わっている。そこで、dATP の存在下での MinD の膜結合力を検証した。Min 波の再構成に使用しているものと同じ油中水滴による人工細胞に $1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinD、分子混雑剤である 100 mg/mL BSA および 2.5 mM のヌクレオチド（ATP、dATP または ADP）を内包し、msfGFP-MinD の局在を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、ATP の場合は MinD が膜に多く局在し、Min 波が発生しない ADP の場合は膜上と細胞質の MinD 量の差はほとんど見られなかった（Fig. 3-16A）。そして dATP の場合、ATP の場合より少ないものの、MinD が膜に局在する様子が見られた。人工細胞の中心を通る直線上の蛍光強度を取得した結果からも、ATP を用いた場合は膜に相当する位置に強いピークが、dATP の場合は弱いピークが現れ、ADP の場合は膜上に蛍光強度のピークは見られなかった（Fig. 3-16A）。これらの結果より、dATP 型の MinD も膜に結合可能であることが示された。

dATP 型の MinD の膜との相互作用をより定量的に調べるために、遠心により SUVs (Small Unilamellar Vesicles) と共に沈降する MinD の量を測定する vesicle sedimentation assay を行った。 1.5 mg/mL SUVs、 500 nM msfGFP-MinD、 $500 \mu\text{M}$ ATP または dATP、ADP を混合し室温で 30 分間 MinD と脂質小胞を相互作用させた後、遠心により SUVs を沈殿させた。そして、上清を除去し、Min 波の再構成に用いる Reaction buffer により沈殿を懸濁した溶液の msfGFP-MinD 濃度を msfGFP の蛍光強度を測定することで定量した。その結果、人工細胞内における膜局在量の顕微鏡観察の結果と同様に ATP、dATP、ADP の順に SUVs と共に沈殿する msfGFP-MinD 量が多かった（Fig. 3-16B）。一方、反応液中の SUVs 濃度を 0.5 mg/mL に減らすと、dATP 条件において SUVs と共に沈殿する msfGFP-MinD 量が減少し、ADP 条件との差が小さくなつた（Fig. 3-16B）。これは、dATP 型の MinD は ATP 型よりも膜結合力が弱いため、SUVs が減ることで膜に結合しない方向へ平衡が偏ったからであると考えられる。これらの結果より、ATP 型、dATP 型、ADP 型の順に MinD は膜結合しやすく、dATP 型 MinD も膜結合可能であることが明らかになった。

次に、加水分解により合成されるリン酸の濃度を測定することで、dATP が MinD によって加水分解されるか検証した。SUVs、MinD および MinE を ATP あるいは dATP と共に混合し、40 分後のリン酸濃度を測定した結果、ATP の場合は $105 \pm 19 \mu\text{M}$ 、dATP の場合は $81 \pm 8 \mu\text{M}$ となった（Fig. 3-16C）。これまでの生化学解析により、MinD は ATP 型となると二量体化して脂質膜に結合し、この MinD と MinE が相互作用することで ATPase 活性が誘起されることが明らかになっている。つまり、脂質膜が存在しない場合や MinE が存在しない場合の ATPase 活性は弱くなる⁵⁵。この反応様式が dATP の場合でも同じかを確認するため、MinD のみあるいは MinE のみ SUVs と混合した場合のリン酸濃度を測定した結果、リン酸がほとんど検出されなかった（Fig. 3-16C）。この結果から、ATP の場合と同様に、dATP は膜に結

合した MinD に MinE が作用することより dATP が加水分解されたと言える。さらに、1 分子あたりの加水分解速度 (k_{cat}) は ATP の場合は $0.12 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$, dATP の場合は $0.10 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ であり、dATP は ATP と同程度の速さで加水分解されることが明らかになった。

これらの結果より、dATP 型 MinD は脂質膜に結合し、ATPase である MinD の基質となることが示された。ATPase 活性だけでなく dATPase 活性ももつ ATPase はこれまでに多く報告されているため、MinD が dATP を利用できることは特殊な事例ではない¹⁵²⁻¹⁵⁶。さらに ATP と比較すると、加水分解速度の差ではなく、dATP の使用により Min システムの反応拡散共役の中で主に MinD の膜結合強度のみが変更されることが示唆された。

3.3.2.4 Min 波の周期に対するエネルギー分子濃度および観察時間の影響

Min 波の人工細胞系では ATP あるいは dATP が常にそれぞれの反応速度で加水分解されるため、経時的に ATP/dATP 濃度比および ATP と dATP の合計濃度が変化し、周期に影響を及ぼす可能性がある。この点を検証するため、通常は人工細胞作製から 15 分以内に Min 波を観察しているが、顕微鏡サンプルを長時間静置後に測定した。その結果、30 分、2 時間、6 時間後に観察した場合も、ATP と dATP を等濃度混合した条件では ATP や dATP を単独で用いた条件における周期の中間的な長さを示した (Fig. 3-17A)。しかし、6 時間後では ATP のみ、dATP のみ、ATP と dATP の混合の全ての条件において周期が相対的に長くなったことから、MinD の膜結合を阻害する ADP や dADP の蓄積のような副次的な影響を受けている可能性がある。しかし、人工細胞の静置時間によらず、ATP/dATP 濃度比による Min 波の周期の制御は維持されることが示された。

ここまで検証では ATP および dATP の合計濃度を 2.5 mM に固定していた。ここで、ATP と dATP の合計濃度の影響を検証するため、4 種類の ATP/dATP 濃度比において、合計濃度をこれまでの 2.5 mM に加え 0.5 mM および 1 mM として Min 波の周期を解析した。その結果、合計濃度が 1 mM の場合は全ての ATP/dATP 濃度比において 2.5 mM 条件とほぼ同じ周期を示した (Fig. 3-17B)。一方、0.5 mM 条件では ATP/dATP 濃度比による周期の差が小さくなつたが、ATP と dATP の混合により中間的な周期が出現することは同じであった。MinD の ATPase 反応の K_m は 40 μM であることから¹⁰⁸、0.5 mM の (d)ATP は MinDE の反応スキームにおいて十分量であると言える。しかし、(d)ATP を消費する MinD の濃度は 1 μM であることと、その k_{cat} が 0.1–0.12 s⁻¹ であることを踏まえると、20 分間で消費される (d)ATP は 120 μM 分の量である。これは反応開始から 20 分後には (d)ATP の約 3 割の量の (d)ADP が蓄積することを意味している。(d)ADP は MinD と (d)ATP の結合を阻害するため、ATP と dATP の合計濃度が低い条件では、他の濃度と Min 波の挙動に差が生じたと考えられる。これらの点を踏まえると、Min 波の観察時間や ATP および dATP の合計濃度を極端に変化させると周期が変化するもののその影響は小さく、いずれの環境においても Min 波の周期は ATP/dATP 濃度比によって制御可能であると言える。

3.3.2.5 Min 波の周期による ATP/dATP 濃度比の推定

以上の検証により、ATP/dATP の混合比により Min 波の周期を制御できることが示された。そこで反対に、Min 波の周期を情報とし、そこから Min 波を発生させている ATP/dATP の濃度比を推定可能か検証した (Fig. 3-18A)。これを検証するため、ATP と dATP の濃度比が未知のサンプルの Min 波の周期から ATP/dATP 比を推定することにした。ATP/dATP 比の指標として、あらかじめ ATP と赤色蛍光タンパク質 (mCherry), dATP と青色蛍光タンパク質 (TagBFP2) をそれぞれ混合したものを ATP 溶液または dATP 溶液とし、検量線を用いて蛍光強度から ATP/dATP 比を見積もることができる実験系を構築した (Fig. 3-18B)。ATP と mCherry の混合溶液と dATP と TagBFP2 の混合溶液を合計 2.5 mM の ATP 類似化合物を含むよう 4 種類の濃度比 (20%, 40%, 80%, 100% ATP) で混合した後、Min 波の要素とともに人工細胞に封入した (Fig. 3-18C)。そこで測定された Min 波の周期と ATP と dATP の合計濃度に対する ATP 濃度の割合の関係を示した検量線を用意した (Fig. 3-18D)。この検量線により未知濃度のサンプルの ATP/dATP 比を算出することを試みた。第三者によって調製された ATP と dATP を任意の濃度比で混合した 2 つのサンプル (サンプル A と B) を用いて Min 波を人工細胞内において発生させ、周期を測定した。デコーディング用の Min 波の周期と ATP/dATP 比の検量線から ATP/dATP 濃度比を推定した結果、サンプル A は周期の平均値が 89 s で ATP/dATP 比が 0.70、サンプル B は周期の平均値が 71 s で ATP/dATP 比が 0.35 と推定された (Fig. 3-18E)。実際には ATP の割合の実際の値はそれぞれ 0.72 と 0.44 であるため、ATP/dATP 比が低い濃度領域における誤差は大きいものの、定量的にデコーディング可能であることが示された。同様に、mCherry および TagBFP2 の蛍光強度による ATP/dATP 比の推定と比較するため、前述の 4 種類の ATP/dATP 比のサンプルおよび dATP・TagBFP2 のみを含むサンプルの各人工細胞の mCherry および TagBFP2 蛍光強度を測定した。結果、サンプル A が 0.81、サンプル B が 0.46 と推定され、周期の場合と反対に ATP/dATP 比が大きい場合における誤差が大きかった (Fig. 3-18E)。このように蛍光強度からの推定と Min 波の周期からの推定は同程度の精度であった。ただし、人工細胞間における分散は蛍光強度による推定の方が大きく、サンプル数が少ない場合の精度は Min 波の周期による推定の方が高いと考えられる。

さらに、様々な ATP/dATP 濃度比の Min 波の人工細胞溶液が混在する場合でも周期により ATP/dATP 比を識別することができるのか検証するため、4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4 の 5 種類の ATP/dATP 比 (合計 2.5 mM) の Min 波の人工細胞溶液を等量ずつ混合し、Min 波を観察した (Fig. 3-19A)。その結果、mCherry 蛍光が強い人工細胞は Min 波が遅く、TagBFP2 蛍光が強い人工細胞は Min 波が速い様子が観察された。Fig. 3-18B の検量線を用いて mCherry および TagBFP2 蛍光強度から算出した ATP の割合に対し Min 波の周期をプロットすると、この 2 つは相関係数が 0.75 の線形関係にあることが示された (Fig. 3-19B)。一方で、5 種類の ATP/dATP 比の人工細胞を混合せずにそれぞれ観察した場合は、よりばらつきが小さくなり、Min 波の周期と ATP の割合は 0.87 と高い相関係数を示した (Fig. 3-18D)。これは複数種類

の人工細胞溶液を混合する過程で異なる ATP/dATP 比の人工細胞が融合した可能性や、人工細胞溶液混合時のピペッティング操作による物理的な刺激により Min 波の周期に影響が出た可能性を示唆している。しかし、Min 波の周期と ATP の割合が線形関係にあることから、様々な ATP/dATP 比の人工細胞が混合された集団となっても、各人工細胞の Min 波の周期から ATP/dATP 比を識別可能であることが示された。

3.4 考察

3.4.1 人工細胞内における波の数が 1 の Min 波のスケーリングの原理

細胞内反応拡散波は生細胞内の位置情報の決定機構であるが、細胞サイズへの閉じ込めにより生じるその特性は未解明であった。本章前半では、一般にパラメータに対して感受性の高い反応拡散波が、波幅や速度を空間サイズに対してスケールさせる、つまり異なる空間サイズにおいて波の形状や周期を一定に保つという先行研究¹³¹により明らかになった性質が生み出されるメカニズムを検証した。波幅と速度のスケーリングは反応および拡散のパラメータに関係なく維持されるパラメータ非依存の性質であったことから、細胞サイズ空間そのものが生み出していることが示唆された。さらに、反応拡散波の空間周期性を特徴づける波長に着目し、波の数が 1 の場合に波長に相当する特徴が開放系と同様に空間サイズに依存せず反応・拡散パラメータにより決定づけられる固有波長であるのか、それとも空間サイズによりスケールされるのかを検証した。平面膜系において波長と波幅が強い依存性を示す塩濃度変化に対し、平面膜系における Min 波の形状¹³² および人工細胞系における波の形状¹³³ がどちらも塩濃度安定性を示したことから、人工細胞系において波の数が 1 の場合、人工細胞のサイズが波長を規定し、スケーリングすることが示唆された。

波長のスケーリングは理論的には次のように解釈できる。長さ L の一次元空間を考えると、位置 x における分子濃度 $c(x)$ は、長さ L の閉鎖空間の周期境界条件により $c(x + L) = c(x)$ と表せる。同時に、反応拡散方程式が波長 λ の周期解を持つ場合、 $c(x + \lambda) = c(x)$ となる。波の数が 1 の場合、これら 2 つの条件を満たすには $L = \lambda$ となる必要がある。このとき、空間サイズである L は定数であるため、反応拡散方程式の解として現れる λ のみが変数となり可塑性を示すことができる。その結果、 λ は空間サイズ L によってスケーリングされる必要がある。この理論的説明は、空間サイズにおける反応拡散波の波長のスケーリングが、空間周期性を持つ反応拡散波に適用可能な普遍的な原理であることを意味する。

公立はこだて未来大学の義永教授による Min 波の理論解析によると、理論モデルにおいても波長および波幅のスケーリングが見られている。したがって、上記の理論的説明と実験結果、そして反応拡散モデルによるシミュレーションを踏まえると、波長のスケーリングにより波全体が空間サイズにより拡大縮小を受けることに起因すると考えられる。また、速度のスケーリングについては、スケーリングがパラメータ非依存である点、および空間サイズは空間条件の変化であるのに対し波の速度を決定づける周期は時間軸の周期性であることから、周期そのものが空間サイズに依存しない反応拡散波の内在的な性質であることに起

因すると考えられる。波の速度は(波長)/(周期)により表すことができる。ここで周期は空間サイズによらず一定であり、波長が空間サイズにより規定されるため、速度も空間サイズによりスケールされる。

3.4.2 スケーリングの原理の一般性と生物学的意義

本研究では人工細胞内における Min 波を用いてスケーリングの原理を検証したが、空間サイズに波のサイズや周期を適応させる性質は、実際の大腸菌細胞においても見られている。生細胞は成長とともに細胞サイズが大きくなり、分裂するとサイズが小さくなる。この細胞サイズの変化に合わせて、Min 波の被覆面は増大する一方、周期の変化は小さいことが知られている¹³⁰。Min 波は細胞中央を除いた両側における細胞分裂を交互に阻害することで細胞分裂位置を規定するため、この細胞サイズ変化への波の適応は重要である。人工細胞系は球形、生細胞はロッド状という形状の違いはあるものの、スケーリングは開放系における Min 波の固有波長よりも小さい空間に Min 波が閉じ込められることで、波長が空間サイズに規定されることに由来するため、波の数が 1 であるという条件を満たす生細胞内における Min 波も同じメカニズムにより波の性質を細胞サイズの変化に適応させていると考えられる。

また、スケーリングを示す細胞内の時空間パターンは Min 波だけではない。細胞性粘菌の PIP₃/PTEN 波は PIP₃ ドメインが 2 つ存在する際のドメイン間の距離、つまり波長が細胞サイズが大きいほど長くなり、波の伝播速度も細胞が大きくなるほど速くなる¹²⁸。また、Min 波とは異なり定常パターンではあるものの、反応拡散共役の関与が示唆されている線虫初期胚の PAR 系のパターン形成もスケーリングする¹⁵⁷。Min 波のスケーリングの原理は、各反応拡散系によってその影響に違いが生じると考えられる反応および拡散パラメータによる制御ではなく、細胞サイズ空間そのものによる制御である。さらに、義永教授の理論解析によると、3 变数のみから構成される単純化した反応拡散モデルにおいてもスケーリングが見られている。これらの点から、本研究により明らかにされたスケーリングの原理は、Min 波だけではなく反応拡散波一般に適応可能な原理であり、PIP₃/PTEN 波や PAR 系などの Min 波以外の反応拡散波も同様の原理によりスケーリングしていると考えられる。この点は、各反応拡散波の理論モデルや人工細胞内再構成系の構築により検証可能になると期待される。

この細胞内反応拡散波のスケーリング機構の一般性は、細胞がなぜ反応拡散波のような限られた条件でしか出現しない複雑なシステムを進化の過程で選択してきたのか、という問い合わせに対する示唆も与える。たとえば、反応拡散パラメータに依存しない空間条件由來の自発的なスケーリング機構は、相対的な位置情報を常に維持するのに有効である。ここで、細胞内反応拡散波に特徴的な波の数が 1 の波と、一般的に見られる波の数が複数の波を比較してみる。細胞サイズ空間においても Min 波は波の数が複数の波を形成可能であり、その場合もほぼ全ての人工細胞で波が発生することから、波の数が 2 や 3 などの場合も空間サイズによって波長が変化していると考えられる。しかし、波の数が複数の場合は常に波の数が

変化することから平均波長のスケーリングは波の数が1の場合より顕著ではなく、反応拡散波が創出する位置情報も常に変化すると推測される。一方、波の数が1の反応拡散波は位置情報を一意に規定できること、そしてスケーリングにより確実に個々の細胞に合わせた位置情報を規定できることから、Min 波や PIP₃/PTEN 波、PAR 系や Cdc42 系など多くの生命システムが利用していると考えられる。

3.4.3 スケーリングによる波長問題の解釈

大腸菌細胞における Min 波の波長は 4–10 μm と考えられているが、開放系における Min 波の波長は 30–100 μm と 10 倍程度のサイズである⁹⁹。このような細胞のサイズよりも大きな波長の反応拡散波が細胞サイズ空間に閉じ込められても出現可能な仕組みは、議論が続けられている。平面膜系における Min 波の再構成実験により、塩濃度や高分子混雑などの物理化学的要素や膜面積/体積比により波長が短くなることが指摘されているが^{111,113,120}、生細胞と同程度の短さの波が出現する条件は不明である。

本研究が明らかにした空間サイズに対する波長のスケーリングは、反応拡散波の固有波長が細胞サイズの空間に収まらない場合でも、微小な閉鎖空間においては波長が自発的に縮小されることを示している。つまり、細胞内反応拡散波が細胞サイズの空間で出現可能かどうかは、広い空間において細胞サイズの波を発生させられるかではなく、与えられたサイズの空間で周期的な波が出現可能な解が存在するかにより決定される問題であると言える。そして、生化学や物理化学の要素や膜面積/体積比などのパラメータは、規定された微小空間においてそのような解があり得るのかという点に関与している。このような空間サイズに合わせて波長が変調するという新たな視点は、長年未解決である Min 波の波長問題を解決するブレークスルーとなるだろう。

3.4.4 Min 波の塩濃度安定性の原理

3.3.2.3 および 3.3.2.4 において人工細胞内と平面膜上の Min 波の塩濃度変化に対する応答を様々な条件で検証した。平面膜上の Min 波は BSA の有無に関わらず塩濃度変化に対し波幅が大きく増加し、速度は BSA の添加により塩濃度に対する変化が抑制されたものの人工細胞系における塩濃度安定性には及ばなかったことから、平面膜系と人工細胞系の違いである BSA の有無が塩濃度安定性の要因ではないことが示唆された。また、波の数が1の Min 波の波幅の上限や波の数が複数の Min 波の波幅あるいは波長は、平面膜系における波長と同程度の塩濃度依存性があることが明らかになった。したがって、Min 波の塩濃度安定性は、空間サイズが波長よりも小さくなる波の数が1の場合にのみ現れる性質であることが示唆された。

これらの結果と Min 波のスケーリングの性質を踏まえると、波の数が1の場合に塩濃度安定性が生じる原理は、平面膜系において波幅 (Bw) と波長 (Wl) それぞれが塩濃度変化に依存して増加する一方で、その比 ($\xi = Bw/Wl$) は塩濃度変化に対して頑健であることが鍵と

なっていると考えられる。人工細胞系において波の数が1の場合は条件によらず波長が人工細胞の円周に規定され、塩濃度による内在的な波長の変化は打ち消される。そして、人工細胞系と平面膜系で波の形状(ζおよびδ)は本質的に同じ性質を示すことから、平面膜系においてδに塩濃度耐性があれば、人工細胞系においてもζは塩濃度耐性を示す。したがって、同じ大きさの人工細胞であれば異なる塩濃度条件でも波長が等しくなり、それに伴い波幅の長さもほぼ同じとなる。このようにMin波そのものが内在的に有する波の形状の塩濃度安定性と、人工細胞内における波の数が1のMin波のスケーリングにより、細胞サイズ空間において波の数が1のMin波が塩濃度安定性を獲得していると考えられる。一方、速度(周期)の塩濃度安定性は塩の種類やBSA濃度により異なる振る舞いを示したため、その原理の解明は今後の課題である。

人工細胞内においてMin波の数が複数の場合波長は塩濃度依存性を示したもの、平面膜系における依存性(1.51倍の変化)よりわずかに弱かった(1.34–1.37倍の変化)。この理由は、人工細胞系では波の性質が離散化していることや膜面積/体積比が平面膜系と異なることが考えられる。解析したMin波は波の数が複数であるが、波の数は2–6と開放系のMin波と比較すると波の性質が離散化されている状態である。また、人工細胞系において波の数が複数の場合でも波の発生率はほぼ100%であることから、開放系における固有波長と異なる波長であっても人工細胞内においてMin波は発生可能であると言える。これらの点から、波の数が同じ場合でも人工細胞のサイズによって波長は異なる大きさとなり、波の数が1の場合と同様に波の数が複数の場合も波長が人工細胞サイズによって変化すると言える。そのため、人工細胞系においては開放系における空間サイズ非依存の固有波長とは異なる波長の波が発生する。そもそも開放系と細胞サイズ空間では膜面積/体積比が大きく異なるため、分子濃度や拡散速度などの条件が一致していても人工細胞系と開放系では波長が同じ波は出現しない可能性がある。特に、塩濃度はMinEと膜の相互作用を調節するため、膜面積/体積比が大きい人工細胞系では、塩濃度変化に対するMin波の内在の波長の変化が平面膜と異なる可能性は十分考えられる。このようにMin波が微小な閉鎖空間に閉じ込められることで、Min波の波長そのもの、そして塩濃度依存性にわずかながら差が生じていると言える。

通常、大腸菌細胞内においては波の数が1のMin波が形成され、細胞分裂面を制御する。本研究で明らかにした波長のスケーリングにより、固有波長よりも小さいサイズの生細胞では細胞サイズが波長を規定するため、波長のパラメータ依存性は生細胞におけるMin波の機能に影響を与えない。一方、波幅は細胞内において細胞分裂が阻害される領域を規定するため、パラメータ変化に対する安定性が重要である。このような違いから、波長ではなく波の数が1の場合の波幅が塩濃度安定性を獲得したと考えられる。

3.4.5 ATP/dATP濃度比によるMin波の周期の制御

細胞内反応拡散波において、周期や波長、波幅などの時空間特性の制御は波の機能に大きく関わっている。細胞の分裂面や運動方向のような時空間情報を規定する細胞内反応拡散波

においても例外ではない。しかし、反応拡散波は非線形かつ非平衡な条件で波が形成されることから、1つのパラメータの変化によって多くのパラメータに影響が出ること、細胞のような夾雜系においては条件の摂動を補完するような現象が生じることから、細胞内反応拡散波の周期の制御は困難であった。本章後半において、人工細胞内再構成系を用い、ATP 依存的に出現する細胞内反応拡散波である Min 波が dATP によって周期が短い波を生じることを発見した。さらに、ATP/dATP 濃度比によって Min 波の周期を線形に制御することに成功した。Min システムにおける dATP の機能を検証すると、MinD は ATPase 活性と同程度の dATPase 活性をもつ一方で、dATP 型 MinD は ATP 型より膜結合力が弱いことが明らかになった。

MinD は C 末端に膜結合領域 (membrane-targeting sequence, MTS) と呼ばれる両親媒性ヘリックスをもつが、それ単体では膜への親和性が不十分であるため、単量体では膜結合しない¹⁰²。しかし、ATP 結合型となり MinD が二量体を形成すると、MTS が 2 つとなることで膜結合力が増強され、膜結合する。この膜結合のメカニズムと dATP 型 MinD の膜局在量が少ない点、そして dATP が脂質小胞および MinE 依存で MinD により加水分解される点を踏まえると、MinD が dATP と結合することで二量体化し膜結合するものの、dATP 型 MinD は ATP 型に比べて二量体化しにくい、あるいは (d)ADP から dATP への交換速度が遅くなっている、膜結合量が少なくなっていると考えられる。しかし、ATP は MinD 同士の相互作用面に結合しており、dATP に存在しないリボース環の 2' 位の OH 基は MinD 分子の内部ではなく外側に配置されているため (PDB: 3Q9L¹⁵⁸)、dATP 型 MinD と ATP 型 MinD でコンフォメーションに大きな違いが生じるとは考えにくい。したがって、ATP に比べて dATP は MinD と相互作用しにくいことが膜結合量の低下の要因だと考えられる。

MinDE による ATP や dATP の分解速度は、MinD の膜への結合、MinD への MinE の結合、それに付随して誘起される MinD の加水分解活性の全ての速度の和である。このうち MinD の加水分解活性は他の反応時間スケールと比較して十分短いため、無視できると考えられる。それゆえ、dATP の場合、MinD の膜への結合量が半分程度になることから、MinD への MinE の結合が倍程度の速さになることで、MinDE による ATP と dATP の加水分解速度が同程度になっていると考えられる。この考えは、MinE は膜面に存在する MinD のみと相互作用することから、MinD の膜結合量が低下することにより相対的に MinE 濃度が上昇していくことで説明できる。MinD が十分量存在し絶えず膜に結合していると考えると、MinE が MinD と相互作用する速度が Min 波の周期を決めているといえる。これらの視点から、ATP/dATP 濃度比が MinD の膜結合量と比例することで、相対的な MinE 濃度を調節し、結果として Min 波の周期を変調可能であることが示唆された。このように ATP/dATP 濃度比により周期が制御された一方、波幅や波長などの空間特性は変化しなかった。したがって、ATP/dATP 濃度比による MinD の膜結合量の線形な制御は周期にのみ影響を与えるパラメータであると考えられる。しかし、周期の制御原理、および ATP/dATP 比が周期のみに影響を与える理由はまだ完全には理解されていないため、さらなる検証が必要である。また、実際

の大腸菌細胞における周期の制御機構を考えると、ATP は dATP の 20 倍程度存在することから¹⁵⁹、ATP/dATP 比の変動は小さくほとんど Min 波に影響を与えないと考えられる。したがって、生細胞において周期を安定に保つ機構の解明が求められる。

ATP は多くの反応拡散波で利用されていること^{43,143,160}、そして本研究で見出した ATP/dATP 比による周期の制御は反応パラメータが変化する 2 種の化合物の混合というシンプルな作用機序であることから、Min 波以外の反応拡散波においても周期をパラメータの摂動によって制御できる可能性がある。推定される ATP/dATP 比による周期の制御のメカニズムから、MinE のみの濃度変化によっても周期を制御できると考えられるが、MinE は 100 nM 程度の濃度変化で Min 波の性質を大きく変えてしまうため要素数が制限される微小な細胞サイズ空間においては制御が困難である。本研究で見出した ATP/dATP 濃度比による Min 波の周期変調は数百 μM 程度の濃度変化が必要であるため、波の周期の制御が容易であると同時に、MinDE の濃度比の制御と別軸の制御であるため、可塑的な時間制御機構を持つナノ・マイクロ材料や分子ロボットの開発につながる。また、周期の変調を人工的な細胞サイズ空間で再現できることから、細胞の分裂面や運動方向を規定する細胞内反応拡散波の制御メカニズムの解明をするための重要なツールとなることが期待される。

さらに、本研究では Min 波の周期が ATP/dATP 比により変化することを利用し、Min 波の周期から人工細胞内の ATP/dATP 比を情報として取り出すことが可能であることを実証した。この濃度と周期のような情報変換は、人工細胞同士のコミュニケーションや人工細胞と電子機器の情報通信の新しい手段につながる。また、高速液体クロマトグラフィーのような装置を必要としない、簡便な ATP/dATP 比測定ツールとしての利用が可能である。

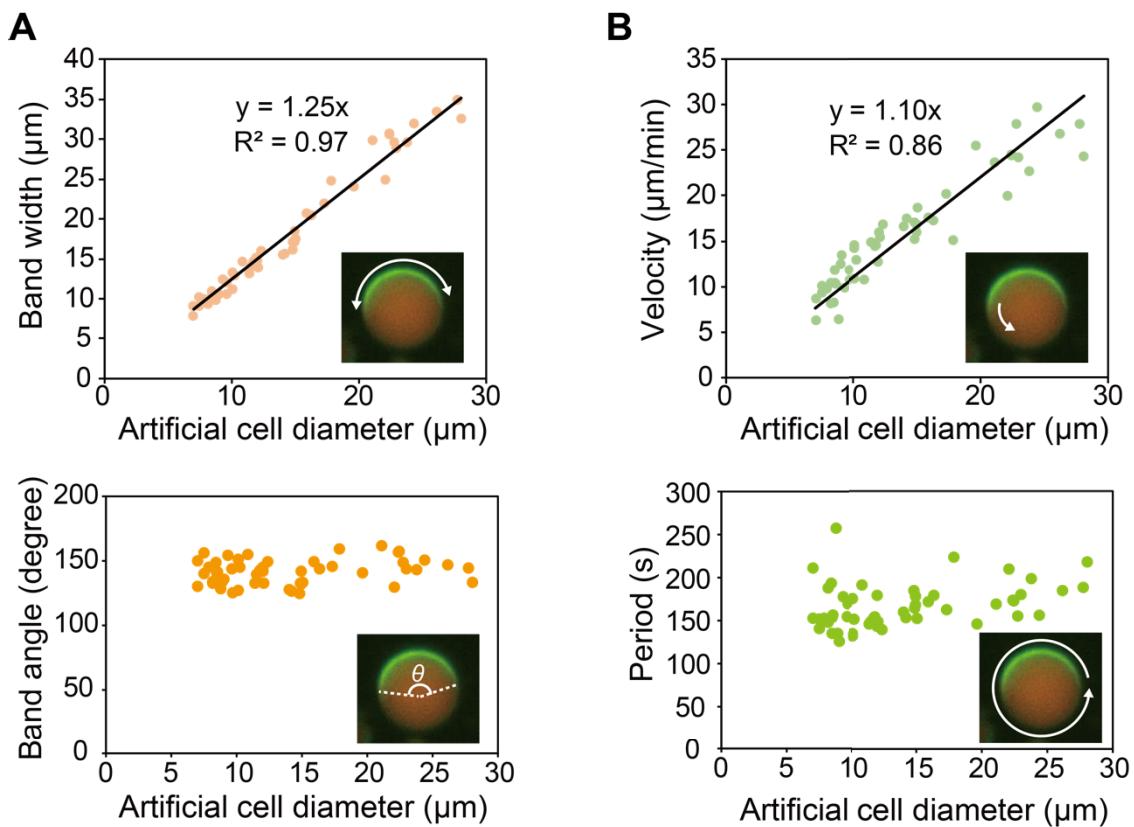


Fig. 3-1. 人工細胞内における Min 波の時空間特性のスケーリング

(A および B) 人工細胞の直径と Min 波の波幅 (A 上) または波の占有角 (A 下), 速さ (B 上), 周期 (B 下) の関係 ($n=53$). 人工細胞は $1 \mu\text{M}$ sfGFP-MinD, $1 \mu\text{M}$ MinE-mCherry, 2.5 mM ATP および 100 mg/mL BSA を内包したものである. データは東京大学の光山博士により取得された顕微鏡画像を解析したものである. グラフ内部の画像は Min 波の各時空間特性を図示したものである.

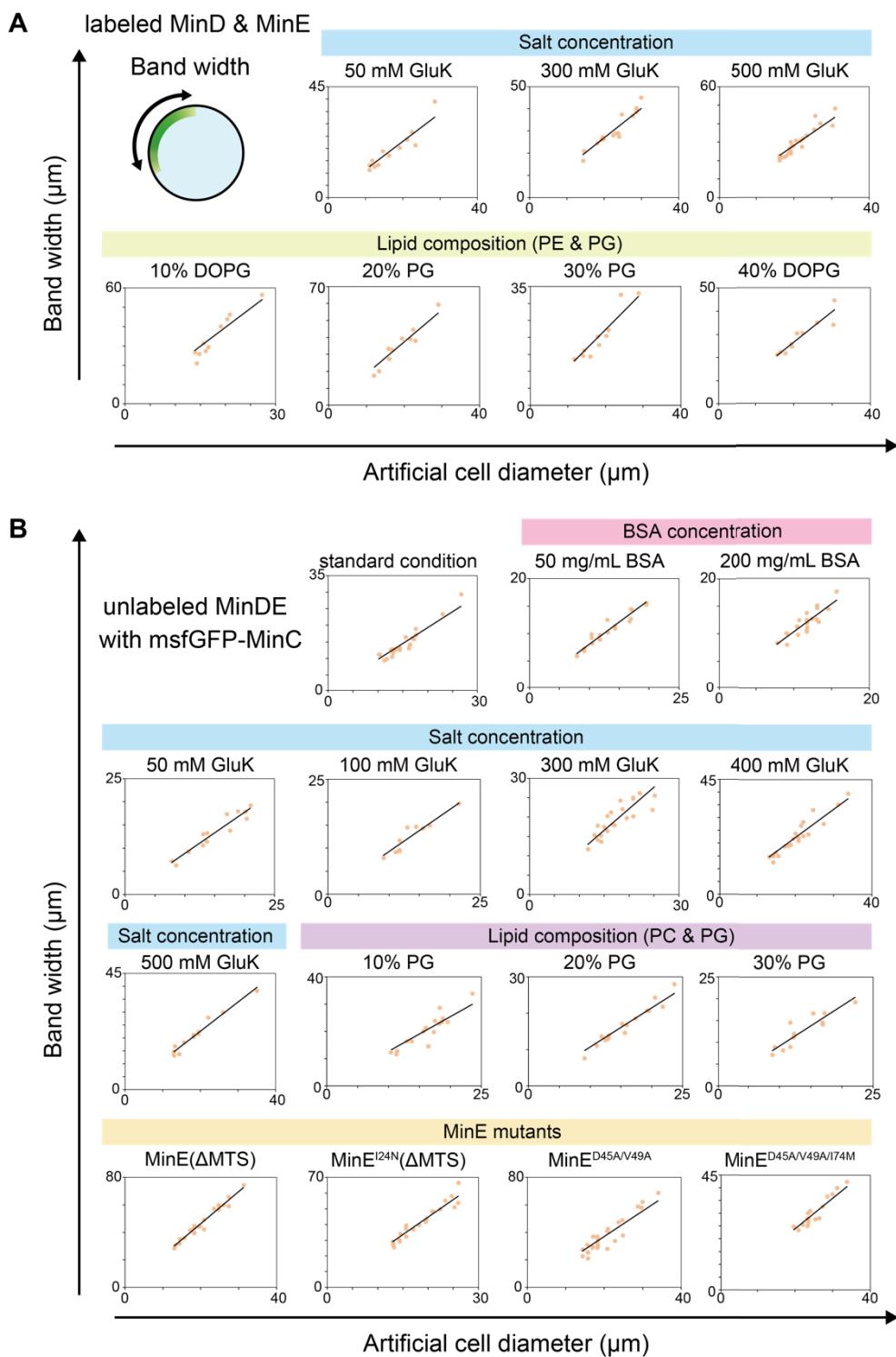


Fig. 3-2. 様々な物理化学パラメータ条件における人工細胞内の Min 波の波幅のスケーリング

(A) および (B) 様々な物理化学パラメータ条件において人工細胞内で再構成された波の数が 1 つの Min 波の波幅が人工細胞の直径に対してプロットされた。直線は原点を通る回帰直線である。 (A) 1 μM sfGFP-MinD, 1 μM MinE-mCherry, 2.5 mM ATP, 100 mg/mL BSA および 150 mM GluK を、大腸菌極性脂質に界面が覆われた油中水滴に内包したものを通常条件とした。通常条件から GluK 濃度は 50, 300, 500 mM に (上), 脂質膜は大腸菌極性脂質から DOPE および DOPG を様々な濃度比 (10–40% DOPG) で混合した脂質に変更された (下)。10–23 個の人工細胞の解析結果が示してある。 (B) 0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD, 1 μM MinE, 2.5 mM ATP, 100 mg/mL BSA および 150 mM GluK を、大腸菌極性脂質に界面が覆われた油中水滴に内包したものを通常条件とし、BSA 濃度 (50 または 200 mg/mL) および GluK 濃度 (50–500 mM) が変更された。脂質組成は、大腸菌極性脂質から DOPC および DOPG を異なる濃度比 (10–30% DOPG) で混合した脂質に変更された。MinE の変異体を用いた実験では、1 μM MinE の代わりに 0.3 μM MinE Δ MTS または 0.3 μM MinE $^{124\text{N}}$ Δ MTS, 1 μM MinE $^{\text{D45A/V49A}}$, 0.7 μM MinE $^{\text{D45A/V49A/I74M}}$ を使用した。10–26 個の人工細胞の解析結果が示してある。

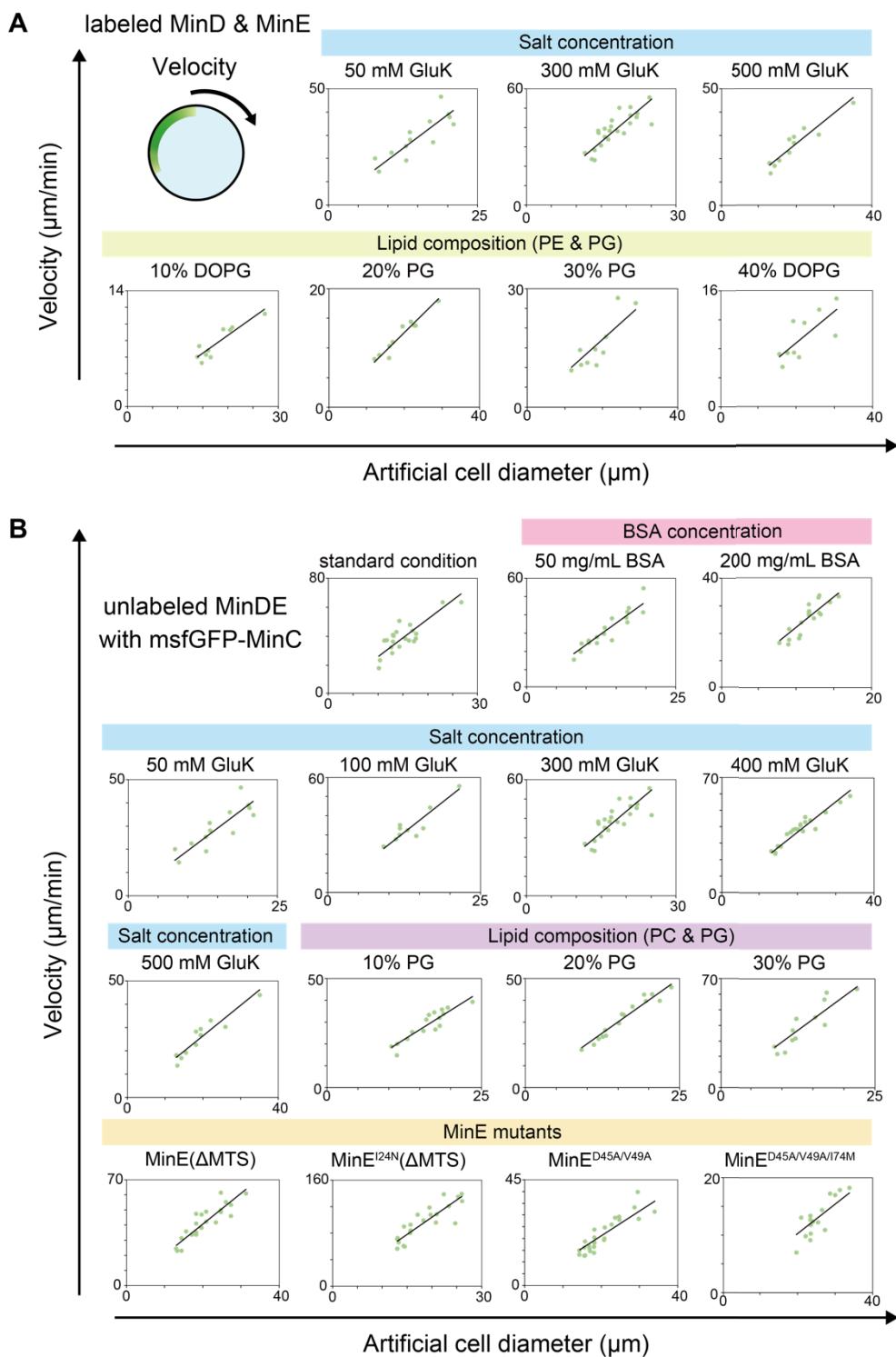


Fig. 3-3. 様々な物理化学パラメータ条件における人工細胞内での Min 波の速さのスケーリング

(A および B) 様々な物理化学パラメータ条件において人工細胞内で再構成された波の数が 1 つの Min 波の速さが人工細胞の直径に対してプロットされた。直線は原点を通る回帰直線である。Fig. 3-2 で解析されたものと同じ人工細胞において速さを解析した。

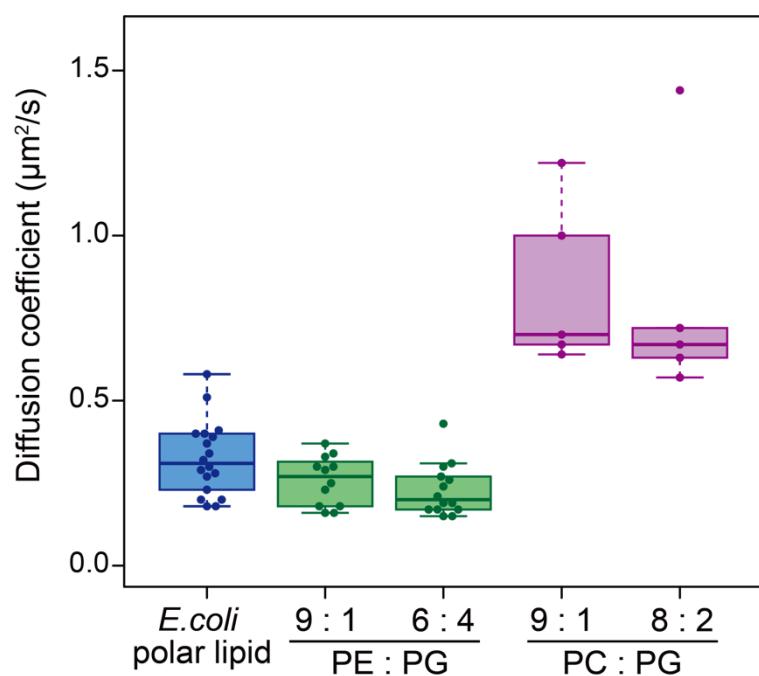


Fig. 3-4. 人工細胞の膜上における msfGFP-MinD の拡散係数

人工細胞の膜に結合した msfGFP-MinD の拡散係数を FRAP により解析したものである ($n=5-18$)。人工細胞は、 $1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinD および 5 mM ATP, 100 mg/mL BSA を脂質膜で覆われた油中水滴に内包したものであり、脂質は大腸菌極性脂質または DOPE と DOPG の混合脂質、DOPC と DOPG の混合脂質を用いた。

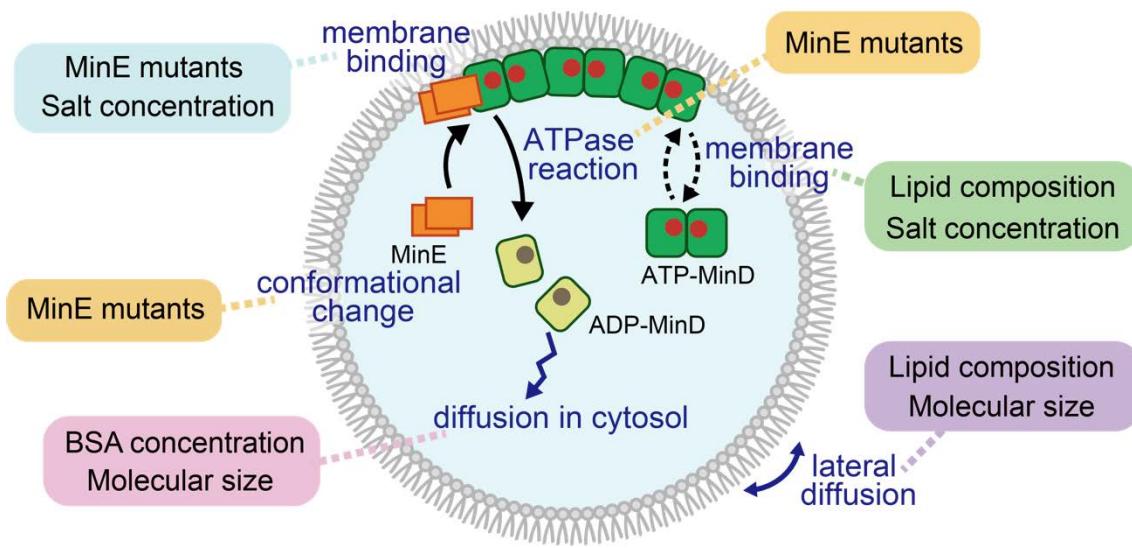


Fig. 3-5. 実験条件の変更による Min 波の人工細胞系の反応拡散パラメータの調節

Min 波の発生に関わる反応拡散パラメータと各パラメータを調節可能な実験条件の対応を示している。

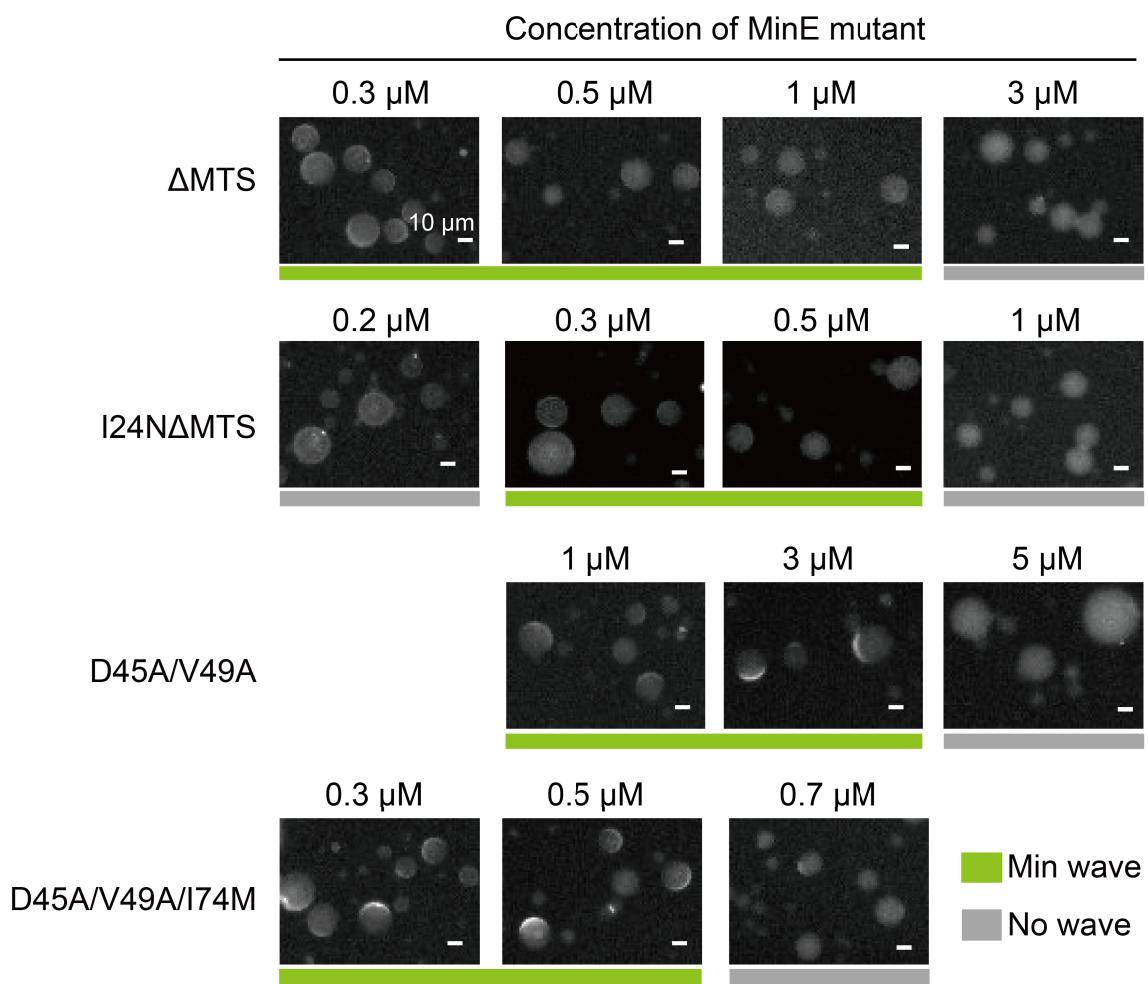


Fig. 3-6. MinE 変異体を用いた人工細胞内における Min タンパク質の挙動

0.1 μ M msfGFP-MinC および 1 μ M MinD, 2.5 mM ATP, 100 mg/mL BSA を様々な濃度の MinE 変異体 ($MinE\Delta$ MTS または $MinE^{I^{124N}}\Delta$ MTS, $MinE^{D^{45A/V49A}}$, $MinE^{D^{45A/V49A/I74M}}$) と共に内包した人工細胞における msfGFP-MinC の蛍光顕微鏡画像。Min 波が発生した条件は緑色のバーで、Min 波が発生しなかった条件は灰色のバーで示されている。スケールバーは 10 μ m である。

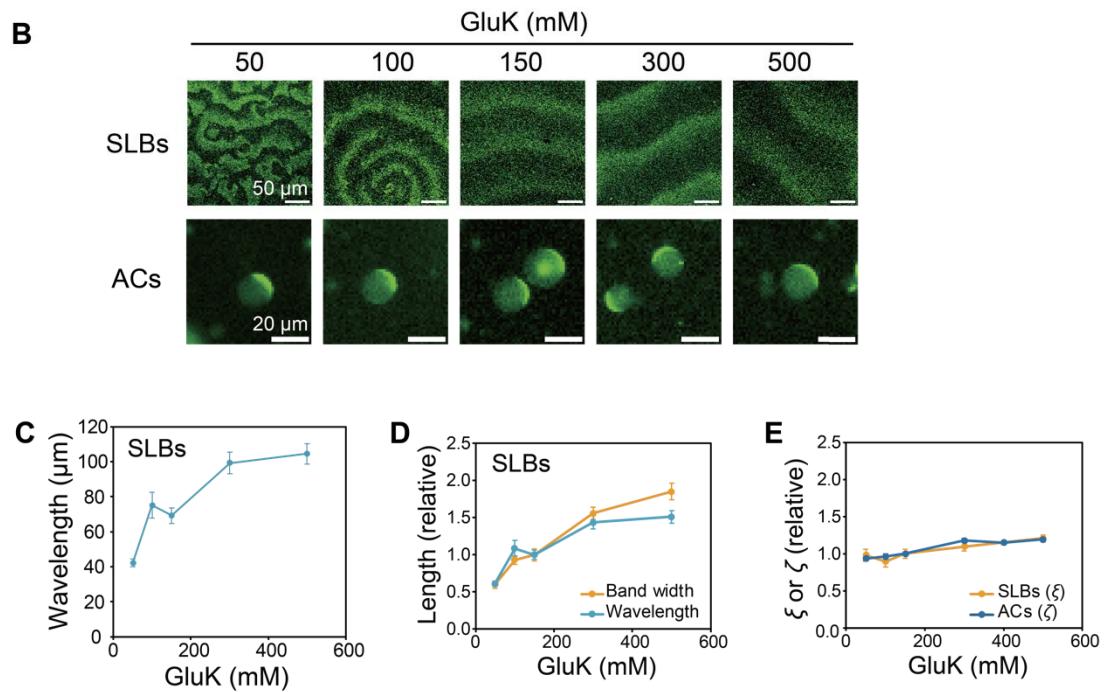
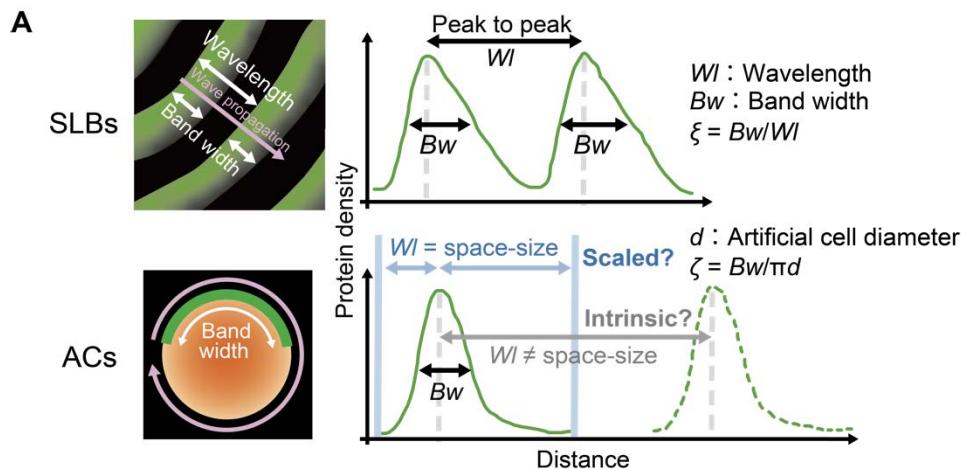


Fig. 3-7. 波の数が 1 つの Min 波の波長の空間サイズによる制御

(A) 二次元の平面膜 (supported lipid bilayers, SLBs) 上および人工細胞 (artificial cells, ACs) 内における Min 波の波幅と波長の定義の模式図。平面膜上においては波の数が複数の Min 波 (緑) が伝播し (左上), ピンクの矢印上の MinD の密度のラインプロファイルは複数のピークを示す(右上)。左図における白矢印, および右図における黒矢印は Min 波のタンパク質密度のピークの幅である波幅およびピーク間の距離である波長を示す。人工細胞内においては, 波の数が 1 つの Min 波が形成され (左下), ピンク色の矢印上の MinD 密度のラインプロファイル (緑色の実線) は単一のピークを示す (右下)。Min 波の波幅は平面膜系と同様に定義されるが, 波長は (i) 実際に存在する波 (緑色の実線) と実在せず人工細胞より大きな空間において現れると考えられる 2 つ目の波 (緑色の破線) の間の距離である固有波長をもつ可能性 (薄灰色の矢印), および (ii) 空間サイズ (人工細胞断面の円周) が波長となり波長がスケーリングする可能性 (水色の矢印) の 2 つの定義の仕方が考えられる。 (B-E) 0.1 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 1 μM MinE, 2.5 mM ATP を用いて様々な GluK 濃度条件で平面膜上および人工細胞内において再構成された Min 波を解析した。人工細胞系の場合は, 100 mg/mL BSA も添加された。 (B) 蛍光顕微鏡画像。 (C) 平面膜上における Min 波の波長と GluK 濃度の関係 (平均値 \pm 標準誤差, $n = 10-17$)。 (D) 平面膜上における Min 波の波長または波幅の相対値と GluK 濃度の関係 (平均値 \pm 標準誤差, $n = 10-17$)。 (E) 平面膜上における Min 波の $\zeta(Bw/Wl, Bw:$ 波幅, $Wl:$ 波長) または人工細胞内の Min 波の $\zeta(Bw/\pi d, d:$ 人工細胞の直径) と GluK 濃度の関係。平均値 \pm 標準誤差 (平面膜: $n = 10-17$, 人工細胞: $n = 10-23$)。

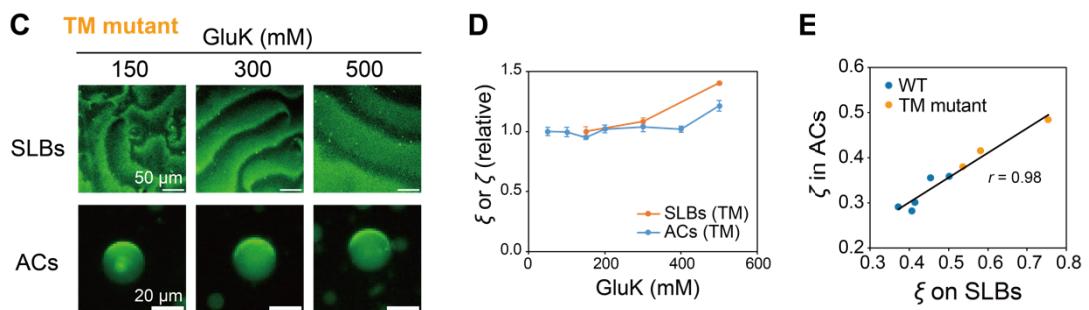
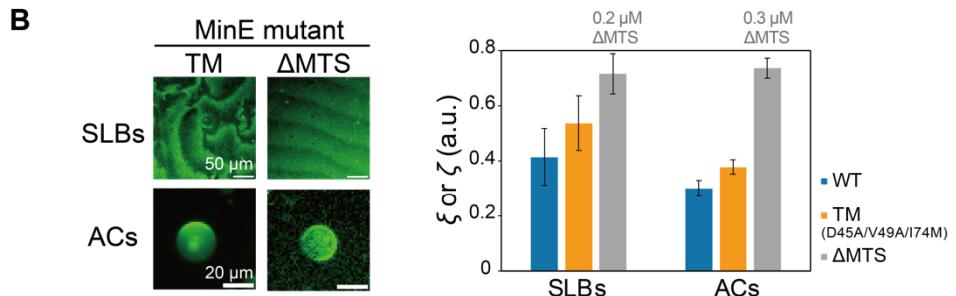
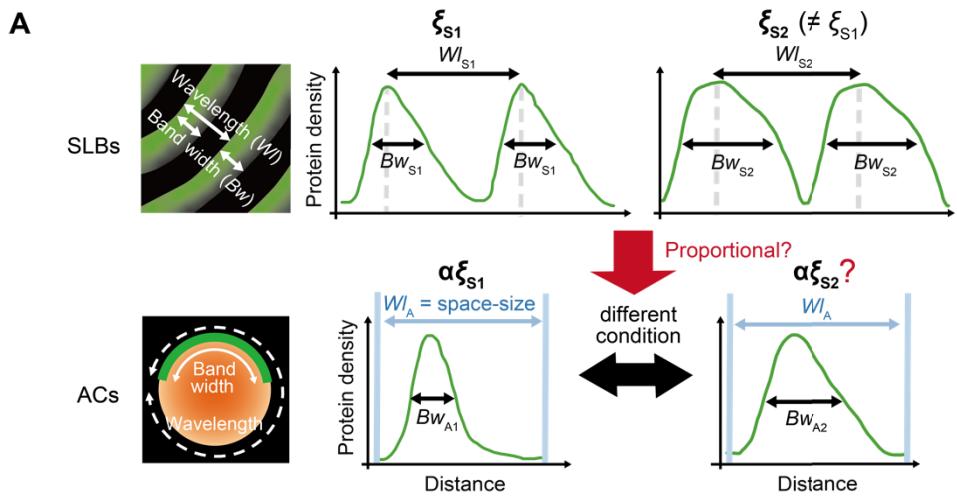


Fig. 3-8. 人工細胞内における Min 波の ζ と平面膜上における Min 波の ζ の比較

(A) パラメータ条件の変化に対する平面膜 (SLBs) 上および人工細胞 (ACs) 内における Min 波の形状の応答の模式図。平面膜上における Min 波の ζ は物理化学パラメータにより変化するため、異なる条件における MinD 密度のラインプロファイルは異なる波幅 (B_{WS1} および B_{WS2}) および異なる波長 (WL_{S1} および WL_{S2})、異なる ζ (ζ_{S1} および ζ_{S2}) を示す（上）。人工細胞内における Min 波の ζ が平面膜上における Min 波の ζ と本質的に等しい指標である場合、両者は比例関係にあるため、 ζ は $\alpha\zeta$ と表すことができる。この場合、異なる条件下における同じ大きさの人工細胞内の Min 波では、波長が空間サイズにより同一の長さ (WL_A) に決定されるため、波幅のみが異なる値 (B_{WA1} および B_{WA2}) を取ることになる（下）。(B) 平面膜上および人工細胞内において $0.1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinC, $1 \mu\text{M}$ MinD, 2.5 mM ATP および MinE 変異体 ($0.7 \mu\text{M}$ MinE^{D45A/V49A/I74} および平面膜系では $0.2 \mu\text{M}$ 、人工細胞系では $0.3 \mu\text{M}$ の MinEΔMTS) を用いて Min 波が再構成された。左：蛍光顕微鏡画像。右：平面膜上における ζ および人工細胞系における ζ 。平均値 \pm 標準誤差（平面膜: $n = 16-23$ 、人工細胞: $n = 14-22$ ）。(C) および (D) $0.1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinC および $1 \mu\text{M}$ MinD, $0.7 \mu\text{M}$ TM 変異体, 2.5 mM ATP を用いて人工細胞系では BSA を添加、平面膜系では BSA を非添加の条件で Min 波が再構成された。(C) 蛍光顕微鏡画像。(D) 平面膜上における Min 波の ζ または人工細胞内の Min 波の ζ と GluK 濃度の関係。平均値 \pm 標準誤差（平面膜: $n = 22-28$ 、人工細胞: $n = 7-16$ ）。(E) 平面膜上における Min 波の ζ および人工細胞内における ζ の関係。野生型 MinE または TM 変異体を用いて様々な GluK 濃度において再構成された Min 波のデータを使用している。

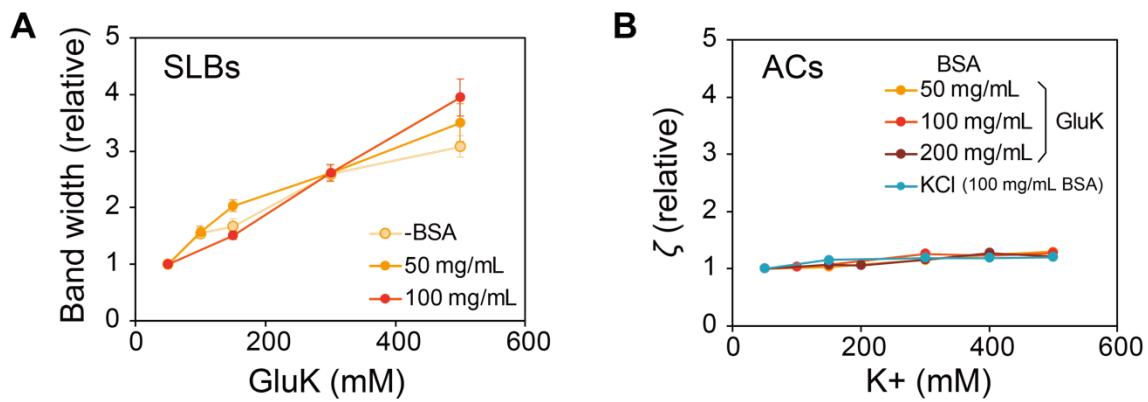


Fig. 3-9. Min 波の波幅の塩濃度依存性

(A) 0.1 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 1 μM MinE, 2.5 mM ATP を用いて BSA 濃度および GluK 濃度を変えて平面膜 (SLBs) 上において再構成された Min 波の波幅と GluK 濃度の関係を示したものである (平均値 ± 標準誤差, n = 10–20). (B) 0.1 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 1 μM MinE, 2.5 mM ATP を用いて BSA 濃度および GluK (KCl) 濃度を変えて人工細胞 (ACs) 内において再構成された Min 波の ζ とカリウムイオン濃度の関係を示した (平均値 ± 標準誤差, n = 10–23).

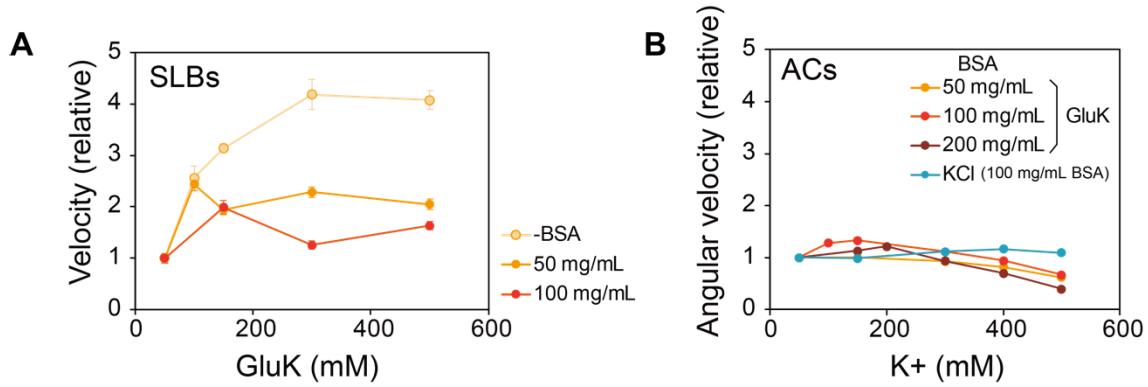


Fig. 3-10. Min 波の速さの塩濃度依存性

(A) GluK 濃度に対する平面膜 (SLBs) 上における Min 波の速さのプロット (平均値 \pm 標準誤差, $n = 10\text{--}20$). 速さは Fig. 3-9A と同じ平面膜系のデータから解析された. (B) GluK 濃度に対する人工細胞 (ACs) 内における Min 波の角速度のプロット (平均値 \pm 標準誤差, $n = 10\text{--}23$). 角速度は Fig. 3-9B と同じ人工細胞から解析された.

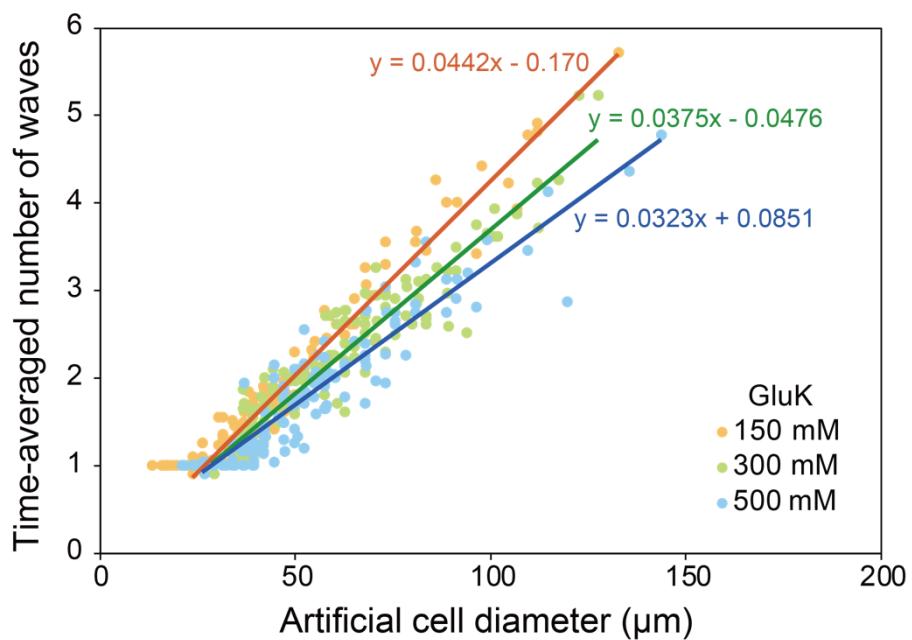


Fig. 3-11. 人工細胞内における Min 波の波の数に対する塩濃度の影響

人工細胞内において $0.1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinC および $1 \mu\text{M}$ MinD, $1 \mu\text{M}$ MinE, 2.5 mM ATP, 100 mg/mL BSA を用いて様々な GluK 濃度において再構成された Min 波の波の数の時間平均を人工細胞の直径に対してプロットした ($n = 134\text{--}167$). 直線は波の数の時間平均が 1 より大きい人工細胞のデータの回帰直線である.

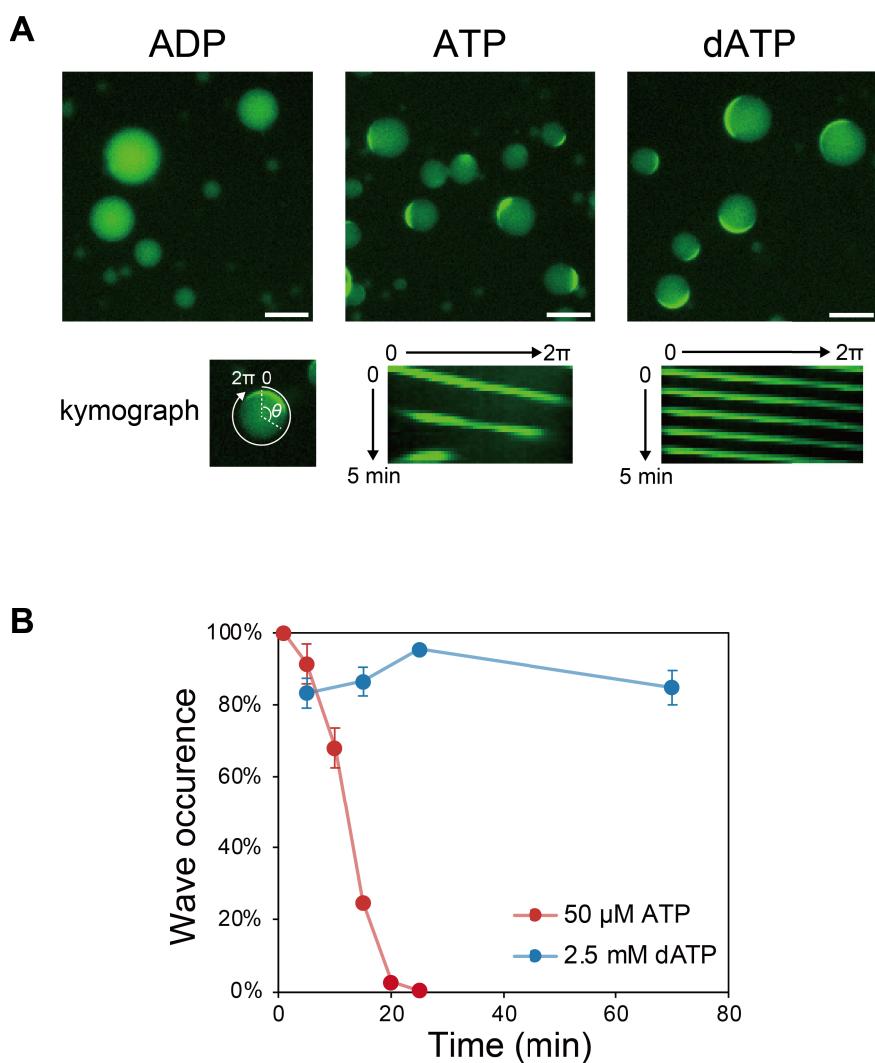


Fig. 3-12. ATP または dATP による人工細胞内における Min 波の発生

(A) 上：0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD, 1 μM MinE, 100 mg/mL BSA, 2.5 mM ADP または ATP, dATP を内包した人工細胞の顕微鏡画像。スケールバーは 20 μm 。下：ATP または dATP 条件における人工細胞の膜上の msfGFP-MinC の蛍光シグナルのキモグラフ。(B) 50 μM ATP または 2.5 mM dATP 存在下で人工細胞内において形成された Min 波の発生率の時間変化。人工細胞は 0.1 μM msfGFP-MinC, 1 μM MinD, 1 μM MinE, 100 mg/mL BSA および 50 μM ATP または 2.5 mM dATP のどちらか一方を内包したものである。平均値 \pm 標準偏差 (3 つの関心領域を解析)。

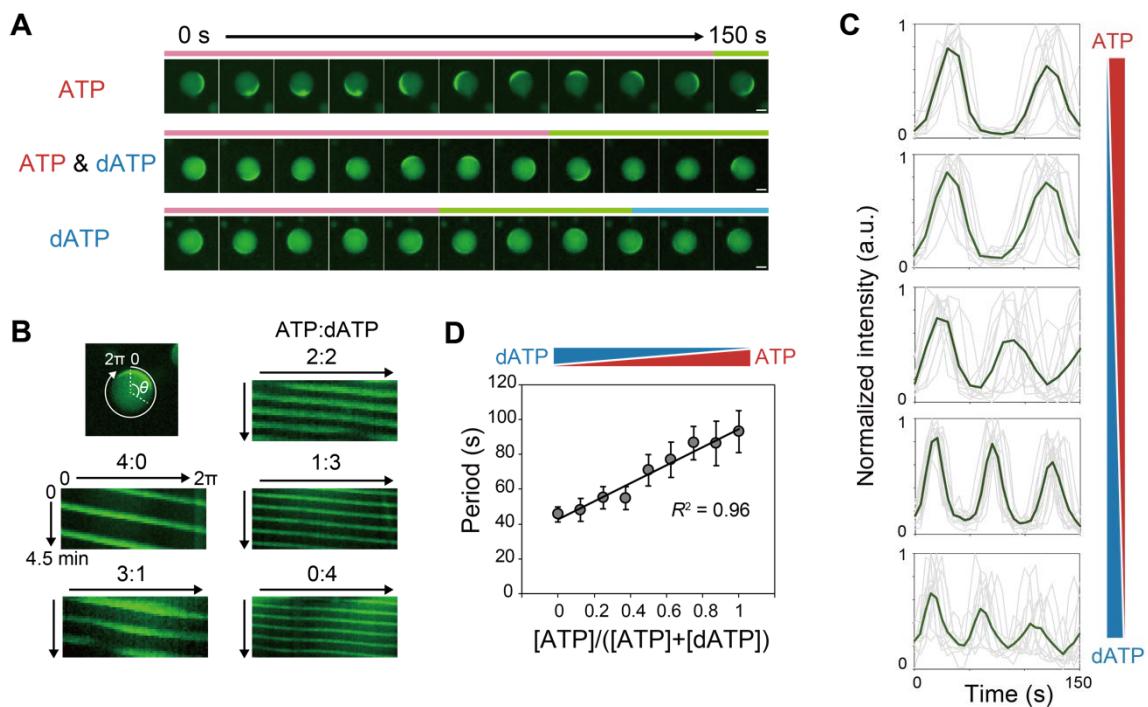


Fig. 3-13. ATP/dATP 濃度比による Min 波の周期の調節

0.1 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 0.7 μM MinE, 100 mg/mL BSA, 2.5 mM ヌクレオチド (ATP および dATP の合計) を内包した人工細胞を解析した. (A) 2.5 mM ATP, および ATP と dATP を等モル濃度で混合した条件, 2.5 mM dATP 条件における Min 波のタイムラプス画像. タイムラプス画像上部のカラーバーは Min 波の 1 周期を示している. スケールバーは 10 μm である. (B) 各 ATP/dATP 濃度比における人工細胞の膜上の msfGFP-MinC のキモグラフ. (C) 人工細胞の膜上の定点における msfGFP-MinC の蛍光シグナルの時間変化. 各人工細胞のデータは薄灰色で, 11–13 個の人工細胞のデータの平均は緑色で示された. 5 種類の ATP/dATP 混合比 (上から順に 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4) におけるデータを示している. (D) ATP/dATP 濃度比と Min 波の周期の関係 (平均値 ± 標準偏差, n = 24–26).

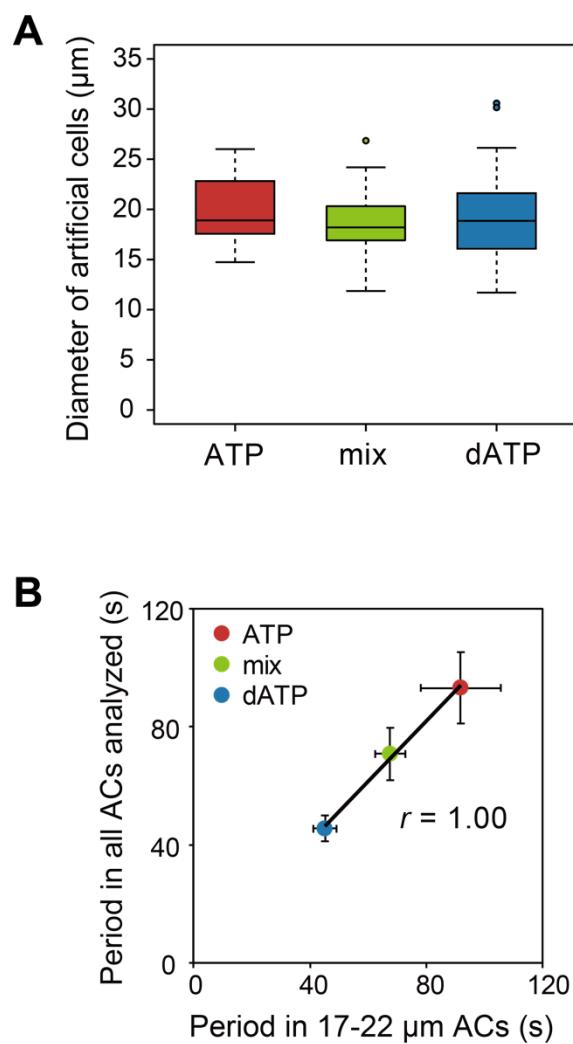


Fig. 3-14. Min 波の周期の人工細胞サイズ依存性

(A) Fig. 3-13において解析された ATP 条件, ATP と dATP を等モル濃度で混合した条件, および dATP 条件における人工細胞の直径の分布を箱ひげ図で示した ($n = 24\text{--}26$). (B) (A)で解析された直径 17–22 μm の人工細胞における Min 波の周期 ($n = 12\text{--}13$) に対する全ての人工細胞 (直径 7–30 μm) における Min 波の周期のプロット.

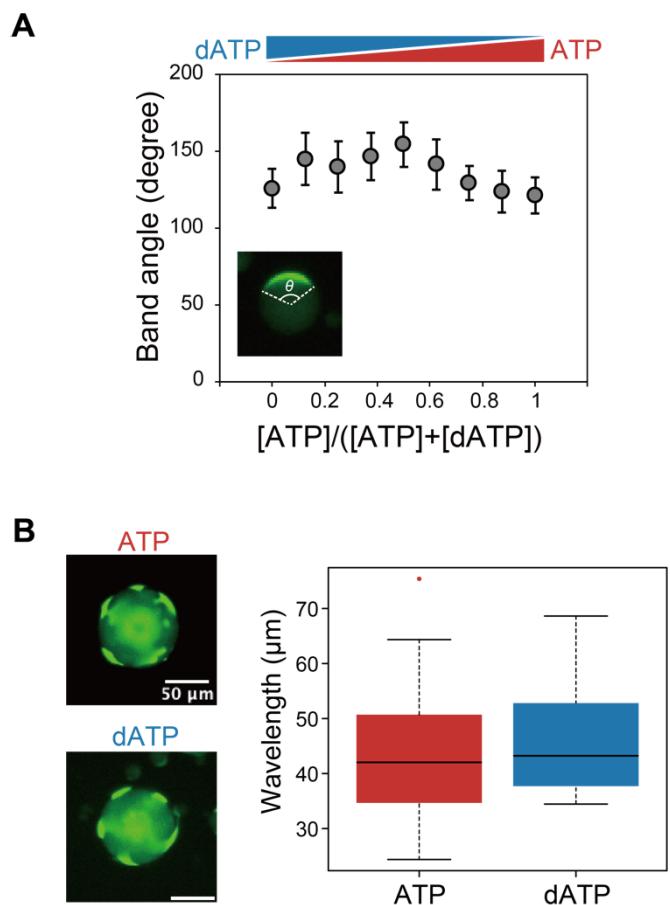


Fig. 3-15. ATP または dATP により発生した Min 波の空間特性

(A) 0.1 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 0.7 μM MinE, 100 mg/mL BSA, 2.5 mM ヌクレオチド (ATP および dATP の合計) を内包した人工細胞における Min 波の占有角 (平均値 ± 標準偏差, n = 24–26). 占有角は人工細胞の断面の膜上において msfGFP-MinC ドメインが占める角度を示している (グラフ内の挿入図). (B) 0.1 μM msfGFP-MinC および 1 μM MinD, 0.7 μM MinE, 100 mg/mL BSA, 2.5 mM ATP または dATP を内包した大きい人工細胞を解析した. 左: 蛍光顕微鏡画像. 右: 波の数が複数の Min 波の波長の分布を箱ひげ図により示した (ATP: n = 23, dATP: n = 20). 各人工細胞における Min 波の波長は、波のピーク間の距離の平均とした. 波のピークは人工細胞の膜上の msfGFP-MinC のラインプロファイルの空間的自己相関から決定された.

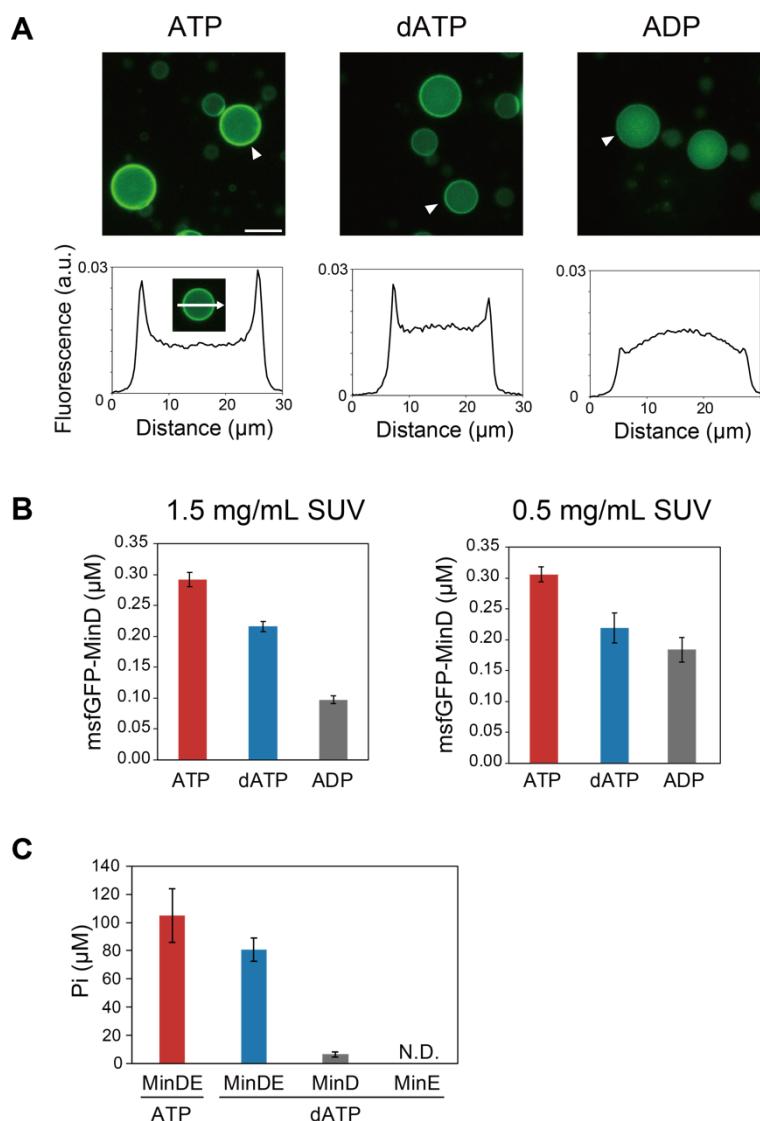


Fig. 3-16. ATP または dATP 条件における MinD の膜結合力および加水分解活性

(A) 1 μM msfGFP-MinD, 100 mg/mL BSA, および 2.5 mM ATP または dATP, ADP を内包した人工細胞を解析した。上：蛍光顕微鏡画像。スケールバーは 20 μm である。下：上図において白矢印で示された人工細胞の中心線上の msfGFP-MinD の蛍光シグナルのラインプロファイル。蛍光強度は各線上における蛍光強度の合計値により標準化された。(B) ATP または dATP, ADP 存在下において small unilamellar vesicles (SUVs) と共に沈殿した msfGFP-MinD の量を示した (平均値 \pm 標準誤差, n = 4)。0.5 μM msfGFP-MinD, 0.5 または 1.5 mg/mL SUVs, および 500 μM ATP または dATP, ADP から構成された反応溶液を遠心分離し、沈殿に含まれる msfGFP-MinD 量を定量した結果を示している。(C) MinDE による ATP または dATP の加水分解により放出されるリン酸 (Pi) 濃度を定量した結果を示している (平均値 \pm 標準誤差, n = 4)。dATP 条件では、MinD または MinE 一方のみの条件におけるリン酸濃度の定量結果も示した。

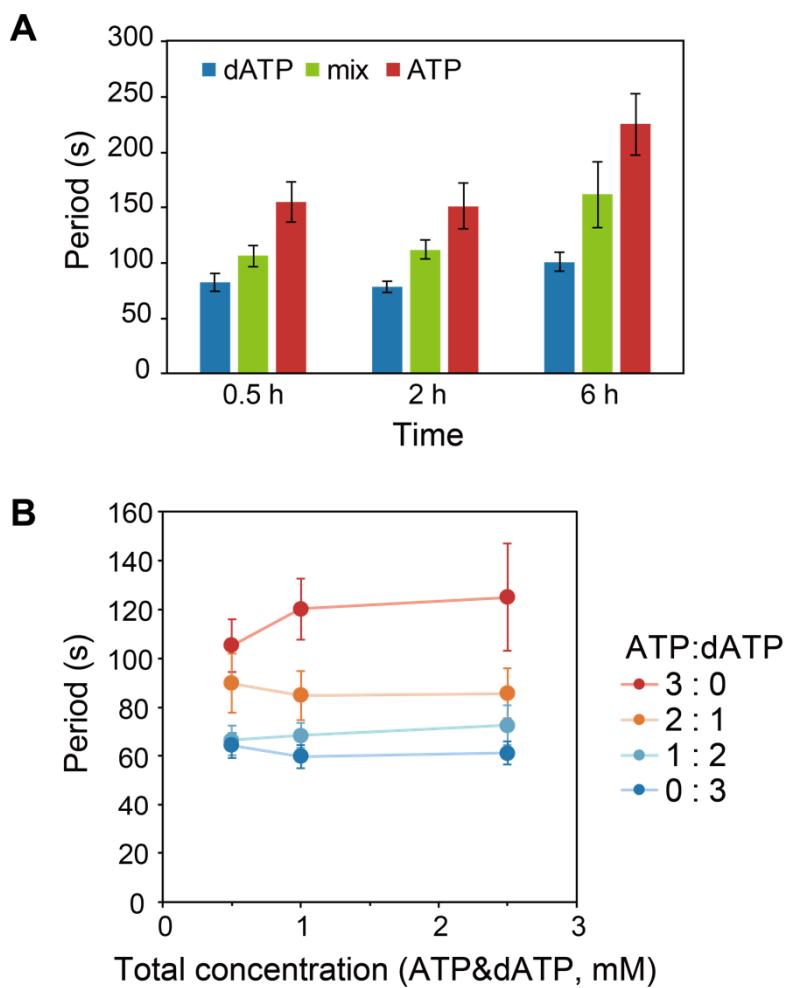


Fig. 3-17. ATP および dATP の混合溶液により形成される Min 波の周期に対する観察時間およびヌクレオチド濃度の影響

(A) 0.1 μ M msfGFP-MinC, 1 μ M MinD, 0.7 μ M MinE, 100 mg/mL BSA, および 2.5 mM ATP または 1.25 mM ずつの ATP と dATP (mix), 2.5 mM dATP により人工細胞内において再構成された Min 波について、人工細胞作製から 30 分後、2 時間後、6 時間後の Min 波の周期を解析した結果を示している (平均値 \pm 標準偏差, n = 20). (B) 合計濃度が 0.5–2.5 mM のヌクレオチド (ATP:dATP = 3:0, 2:1, 1:2 または 0:3) により形成された Min 波の周期 (平均値 \pm 標準偏差, n = 20). 人工細胞は 0.1 μ M msfGFP-MinC および 1 μ M MinD, 0.7 μ M MinE, 100 mg/mL BSA, 様々な濃度および混合比の ATP および dATP を内包したものである.

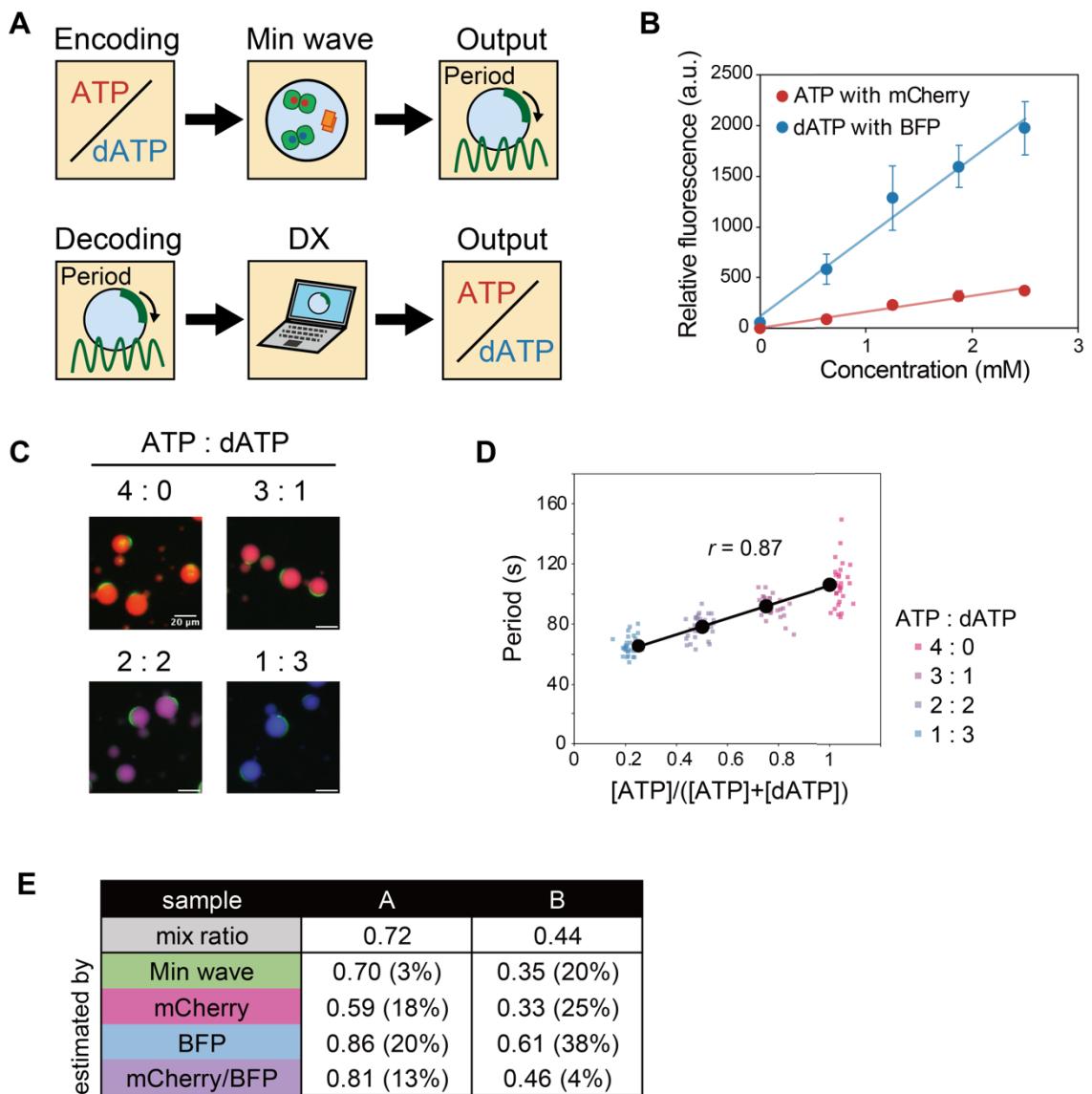


Fig. 3-18. Min 波の周期による ATP/dATP 濃度比の推定

(A) Min 波の周期と ATP/dATP 混合比の情報変換のエンコーディングとデコーディングの模式図。ATP と dATP の混合溶液を Min タンパク質と共に人工細胞に内包することで、ATP/dATP 比が Min 波にエンコーディングされる。Min 波の蛍光画像から Min 波の周期の情報が得られると、Min 波の周期と ATP/dATP 比の関係から周期から ATP/dATP 比がデコーディングされる。(B) 蛍光強度からスクレオチド濃度を推定するための検量線。ATP および dATP 濃度比に対する mCherry および TagBFP2 の相対蛍光強度のプロット (平均値 \pm 標準偏差, $n = 37-70$)。蛍光顕微鏡観察により取得される画像は z 軸方向 (人工細胞の厚み) の蛍光シグナルの合計であるため、顕微鏡画像から取得された蛍光強度を人工細胞サイズにより標準化した値を相対蛍光強度とした。具体的には、Fiji ソフトウェアの Analyze Particle 法を用いて各人工細胞内における蛍光強度を半自動的に定量し、人工細胞の断面積の平方根により割ることで相対蛍光強度を算出した。100 mg/mL BSA および様々な濃度比の ATP および dATP (4:0, 3:1, 2:2, 1:3 および 0:4, 合計で 2.5 mM), ATP および dATP の濃度比に対応する濃度の mCherry および TagBFP2 を内包した人工細胞における蛍光強度を定量した。赤線の mCherry の検量線は ATP 濃度、青線の TagBFP2 の検量線は dATP 濃度に対応する。(C) および (D) 0.1 μ M msfGFP-MinC, 1 μ M MinD, 0.7 μ M MinE, 100 mg/mL BSA, 様々な濃度比の ATP および dATP (4:0, 3:1, 2:2 および 1:3, 合計 2.5 mM) および ATP/dATP 比に対応する濃度の mCherry および TagBFP2 を内包した人工細胞を解析した結果である。(C) msfGFP-MinC および mCherry, TagBFP2 の蛍光顕微鏡画像。スケールバーは 20 μ m である。(D)(B) の検量線を用いて mCherry および TagBFP2 の蛍光強度から算出された ATP/dATP 比の平均に対する Min 波の周期のプロット (黒いプロット、各条件につき $n = 30$)。散布図は各人工細胞のデータを示しており、ATP/dATP 比により異なる色でプロットされている (ATP/dATP 比 = 4:0: ピンク, 3:1: 紫, 2:2: 薄紫, 1:3: 薄青)。(E) ATP/dATP 比が未知のサンプルにおける ATP/dATP 比を、Min 波の周期および mCherry または TagBFP2 の蛍光強度から推定した結果を示している。推定には 54 個の人工細胞のデータの平均値を使用した。百分率 (%) は、ATP/dATP 比の推定値から実際の ATP/dATP 比の差を実際の値で割ることで算出した誤差を示している。

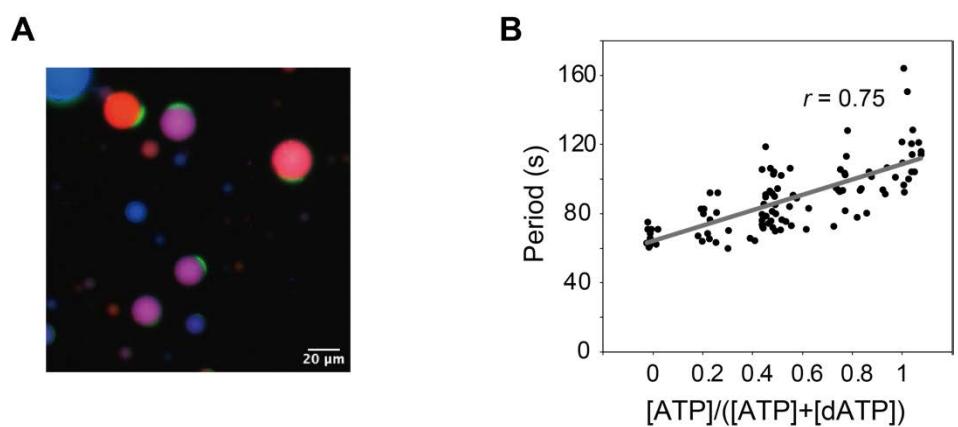


Fig. 3-19. 様々な ATP/dATP 比の人工細胞の混合溶液における Min 波の周期の同時測定

(A) $0.1 \mu\text{M}$ msfGFP-MinC, $1 \mu\text{M}$ MinD, $0.7 \mu\text{M}$ MinE, 100 mg/mL BSA, 様々な濃度比の ATP/dATP (4:0, 3:1, 2:2, 1:3 および 0:4, 合計 2.5 mM) および ATP/dATP 比に対応する濃度の mCherry および TagBFP2 を内包した 5 種類の人工細胞の混合溶液の顕微鏡画像。スケールバーは $20 \mu\text{m}$ である。 (B) ATP の割合と Min 波の周期の関係 ($n = 103$)。Fig. 3-18B の検量線を用いて mCherry または TagBFP2 の蛍光強度から ATP の割合を算出した。

第4章 総括

4.1 結果のまとめおよび結論

本研究では、Min 波の人工細胞系を用いて細胞サイズ空間における細胞内反応拡散波の形成機構および制御機構を明らかにすることを目的とし、Min 波のモードの選択原理の解明、空間サイズに対するスケーリング機構の解明、および低分子化合物を用いた Min 波の時空間的特徴量の制御を試みた。

第2章では Min 波の動きのモードの制御原理を解明することを目的とし、人工細胞系の反応パラメータを変更し、先行研究¹²⁵で多く出現していた traveling wave ではなく、生細胞において細胞分裂面の規定に必要な standing wave が発生可能な条件を探査した。MinDE 濃度を変更したところ、MinDE のどちらかが過剰な条件では波が出現しない一方で、MinD が相対的に少ない、あるいは MinE が相対的に多い条件では standing wave が発生したことから、MinD と MinE の濃度比が Min 波のモードを制御していることが示された。MinDE の濃度だけではなく、MinE の膜結合量を調節する塩濃度や MinDE 複合体の ATPase 活性を調節する温度の変更によっても優勢なモードが制御された。これらの結果から、分子濃度と反応速度定数により決定される反応速度が Min 波のモードを決定しており、MinD の膜結合に比べて膜解離が優先な条件において standing wave が発生することが示された。この結論を反応拡散方程式に当てはめると、分子集合の活性化と阻害のバランスにより Min 波のモードが決定すると一般化できる。本研究で明らかにしたモード選択のメカニズムに基づき観察中に反応パラメータを摂動させることで、同一人工細胞内においてモードを遷移可能であることを実証した。このモード遷移は全ての条件において観察されるのではなく、モード遷移が可能な条件に反応速度を変更してもモード遷移が見られないヒステリシスの性質があることを明らかにした。

第3章では、Min 波の波長や MinD の高濃度領域の幅（波幅）、周期などの時空間的特徴量の制御原理を解明することを目的とした。第3章前半では、同一条件下における Min 波の空間サイズによる制御について検証した。先行研究¹³¹において MinD の高濃度領域の数（波の数）が 1 の Min 波の波幅と速度のスケーリングが見出されていたが、本研究により、このスケーリングは反応速度や拡散速度などのパラメータに非依存の現象であることが示された。また、開放系において Min 波の波長と波幅を変化させるカリウムイオン濃度を変更しても、平面膜系と人工細胞系の両方において、波幅と波長あるいは空間サイズの比により定義される波の形状が一定であったことから、人工細胞系で波の数が 1 の場合の Min 波の波長は人工細胞の円周により規定され、空間サイズによりスケールされることを明らかにした。開放系では空間サイズに依存しない反応拡散波が細胞サイズ空間に閉じ込められると、波長が空間によりスケールされることで波全体が拡大縮小され、波幅と速度もスケールされるといえる。このスケーリングは開放系において異なる波長の Min 波を発生させるパラメータ条件であっても、同じサイズの人工細胞であれば波長を揃えられることを意味す

る。この点と、波の形状が塩濃度変化に対して安定であることにより、人工細胞系では波幅が塩環境変化に対して安定性を示すことを示した。

第3章後半では、パラメータ変化に対して複雑な挙動を示す反応拡散波の理解を容易にするため、低分子化合物であるdATPによる競合阻害を用いて单一のパラメータを調節することを試みた。驚くべきことに、MinDの膜結合の競合阻害剤として知られていたdATPを用いてもMin波が発生することを見出した。dATPにより発生したMin波はATP条件の2倍程度の速さであり、dATPとATPの混合比を変えることでMin波の周期を線形に制御できることを明らかにした。dATPを用いるとMinDの膜結合量は減少する一方、dATPの加水分解速度はATPの場合と同程度であることから、膜結合しているMinD量に対して相互作用可能なMinEの量が相対的に増加することがdATPにより周期が短くなる理由であることが示唆された。また、Min波の周期を用いて人工細胞内のdATP/ATP混合比を推定することで、反応拡散波の性質から溶液組成を推定することが可能であることを実証した。

これらの結果より、Min波形成における各反応拡散パラメータのバランスがMinタンパク質全体の集合や離散を決定づけることでMin波の動態や時空間特性が制御されると同時に、空間と反応拡散波の周期性により細胞サイズ空間においてMin波が安定性を獲得することが明らかになった。

4.2 本研究の展望

4.2.1 Min波の形成および制御機構の解明

第2章においてMin波のモードの制御原理、第3章において周期の制御や波長、波幅、速度のスケーリング機構の解明を行ったが、実際の生細胞におけるMin波の制御機構の理解にはまだ課題が残っている。たとえば、人工細胞内においてMin波のモードは活性化因子と阻害因子のバランスによって制御されたが、standing waveが発生可能なパラメータ領域はtraveling waveの領域に比べて狭かった。人工細胞系においてstanding waveが主要な状態であったとしても、同じ条件下においてMin波が発生していない人工細胞も20–30%程度存在する条件が多かったことからも、standing waveの安定的出現には他の要因があると考えられる。通常の生細胞においては温度変化や細胞サイズの変化が起きても必ずstanding waveが発生することから^{130,140}、standing waveが発生可能なパラメータ領域が広いと考えられる。このような生細胞におけるstanding waveの頑健性の原理の最も有力な仮説は、生細胞のロッド状という空間形状によるstanding wave発生モードの安定化である。ロッド状の空間と球状の空間では膜面積/体積比や曲率の均一性が異なるため、膜近傍における反応速度が変化すると考えられる。この点について、これまでの球状の人工細胞ではなく、生細胞を模倣したロッド状の人工細胞を作製することで検証が可能になると考えられる。また、ロッド状の人工細胞において、MinDやMinE単体の局在や、本研究で実施したようなパラメータとMin波のモードの関係を解析することで、反応パラメータによるモードの制御と空間形状によるモードの制御の関連性が明らかになるはずである(**Fig. 4-1A**)。

生細胞における周期の制御機構にも不明な点が多く残されている。Min 波は細胞の両極においてバランスよく細胞分裂を阻害する必要があるため、適切な長さに制御される必要がある。実際に、周期が 34–124 秒の Min 波が発生している大腸菌細胞は野生型と同じ表現型を示すが、MinD の過剰発現により 230 秒の周期の Min 波が発生している場合は分裂異常が確認されている⁵³。第 3 章において dATP/ATP 比により周期が精密に制御されることを示したが、実際の大腸菌細胞では ATP が dATP の 20 倍程度存在する¹⁵⁹。それゆえ、細胞において周期が乱れるような環境変化や細胞内の状態変化があったとしても、dATP/ATP 比により周期を補正することは難しいため、パラメータ変化に応じて周期を維持する仕組みが必要である。この点において、空間サイズに対する Min 波のスケーリングは、Min 波内在の周期が一定のまま波全体が拡大縮小する現象であるため、周期を反応拡散波内在の性質として空間サイズの影響を受けずに一定に保つための機構と捉えられる。しかし、温度などの物理化学的要素の変動に対しては、Min 波の周期が変化すると同時に¹⁴⁰、分裂速度も変化する。細胞分裂面を制御する Min 波の周期と細胞分裂速度の変化の関係性や、細胞が適切に分裂可能な範囲に Min 波の周期を維持する仕組みの追求は、今後の課題である。周期を大きく変調する要素の候補は Min タンパク質そのものであるが、環境変化に応答して細胞が瞬時に Min タンパク質濃度を変えるのは難しいと考えられる。生細胞が実際に利用可能な手法の中から、周期を制御するその他の要素の探索が必要である。一方、視点を変えると、生細胞で Min 波が野生型と同じ表現型を維持できる周期は、少なくとも 34–124 秒と幅広いとも言える。この視点に立つと、Min 波の周期はある程度の変動の余地があり、厳密な制御は必要としている可能性もある。周期を制御する第 3 の因子の探索は人工細胞系を用いることで解決され、細胞分裂面の規定が可能な Min 波の周期の同定は、生細胞において温度や Min タンパク質の精密な制御を行うことで可能になるだろう。

生細胞における Min 波と再構成系における Min 波の波長の乖離の要因も未解決である。第 3 章において明らかになった反応拡散波の波長のスケーリングは、この波長問題は生細胞サイズの短い波長の波を発生させるのではなく、微小空間で波が出現可能かという問題であるという新たな視点をもたらす。しかし、現時点では本研究の人工細胞系では直径 5 μm 以下の人工細胞では Min 波が発生しないという課題がある。このような波が発生可能な空間サイズの閾値の存在は、線虫初期胚の PAR 系の静的なパターン形成においても報告されていることから¹⁵⁷、Min 波特有の性質ではなく、反応拡散波一般の特性であると考えられる。この点において、空間サイズにより大きく変化する要素の一つは膜面積/体積比である。そのため、実際に大腸菌サイズの空間で Min 波が発生できるかどうかは生化学や物理化学の要素に強く依存しており、そのような大きな膜面積/体積比の条件下で Min 波を発生可能な生化学あるいは物理化学的パラメータ領域の探索が必要である。細胞内における高分子混雑にともなう細胞質や細胞膜の拡散速度、Min 波構成要素の結合定数の変化、細胞サイズ空間において顕在化する多分子競合効果など、いずれの要素が微小空間において Min 波を発生可能にするかは今後の研究で明らかにされるだろう (Fig. 4-1B)。

4.2.2 生物学的側面における貢献と課題：様々な反応拡散波の形成原理の理解と位置情報制御の原理

本研究では Min 波の人工細胞系を用い、細胞内反応拡散波のモードが活性化因子と阻害因子のバランスにより制御されること（第 2 章）、細胞サイズ空間において反応拡散波の波長がスケーリングすること（第 3 章前半）、および反応拡散波の発生において dATP もエネルギー源となり波の性質を変化させること（第 3 章後半）を明らかにした。ただし、本研究の実験では Min 波という特定の反応拡散波の要素を用いていることから、これらの反応拡散波の制御原理の一般性は実験的には検証されていない。モード選択については、細胞性粘菌の PIP₃/PTEN 波では、PIP₃ ドメインの核形成速度が異なる細胞では異なるモードの波が出現することや、反応拡散方程式に基づいた理論モデルではパラメータにより異なるモードとなることが示されているが⁷⁴、本研究で示した Min 波のモード選択原理との対応は不明である。また、エネルギー種については、大腸菌においては dATP の 20 倍程度¹⁵⁹、哺乳類細胞においては 100 倍程度¹⁶¹と ATP が豊富に存在する生細胞を用いた従来の研究では、異なるエネルギー分子の影響の検証が困難である。しかし、細胞内反応拡散波の多くは ATP や GTP をエネルギー源や状態遷移の手段として利用しているため、Min 波と同様に dATP や dGTP がエネルギー源として用いられている可能性や、複数のエネルギー源の利用により波の動態が変化する可能性がある。反応拡散波のスケーリングは、共同研究者である公立はこだて未来大学の義永教授による三変数に縮約した反応拡散モデルにおいても確認されており、反応拡散波一般に成り立つ性質であることが示唆されているが。しかし、ノイズがなくても自発的に発生可能な Min 波のような反応拡散波と、周期性はあるものの波の出現にノイズが必要な興奮性を有する PIP₃/PTEN 波や Rho/アクチン波など、様々な種類の反応拡散波に適用可能な性質か否かは不明である。今後 Min 波の人工細胞系を用いて明らかになった細胞サイズ空間における反応拡散波の性質の一般性を、実験により検証する必要がある。

Min 波の人工細胞系により明らかになった細胞内反応拡散波の性質の一般性を検証するには、Min 波以外の細胞内反応拡散波の人工細胞内再構成系の構築が必要である（Fig. 4-1C）。近年の細胞を用いた解析により、PIP₃/PTEN 波は PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) と PTEN、アクチン、脂質分子 PIP₃ が⁵⁰⁻⁵²、Rho/アクチン波は Rho, Ect2, RGA-3/4、アクチン^{46,47}が波の発生に関与することが明らかになってきている。これらの要素が波の発生に必要な最少因子であるかは不明であるが、精製要素を内包した人工細胞を作製することで、最少因子の同定、そして人工細胞内再構成系の構築ができるだろう。さらに、Min 波と同様に個別の反応拡散系の反応ネットワークや制御原理、そして Min 波に見られた波の制御機構を同様に検証することで、細胞内反応拡散波の制御の普遍的な原理の理解が進むことが期待される。

反応拡散系による細胞内の時空間パターンの理解に必要不可欠である一方、多くの謎が残されているのが、PAR 系や Cdc42 系のような定常パターン^{42,56}の形成機構である。細胞内の動的な波はマクロな状態が常に変化することから非平衡状態であることが明確であり、時空間の両方に周期性が存在するため、反応拡散波であることを現象論的に想像しやすい。

一方、細胞内の定常パターンはドメインの数が1つであり時間軸だけではなく空間的な周期性がないこと、そしてマクロな構造の時間変化がないため非平衡定常状態と平衡状態の区別が難しいことから、現象論的にパターン形成原理を推測することが困難である。動的なMin波の解析に人工細胞系が有効であったように、人工細胞系であれば空間サイズによるドメイン数(波の数)の変化や自発的なパターン形成など、反応拡散系によるパターン形成に特有の性質を容易に観察できる。今後、細胞内の定常パターンにおいても人工細胞内再構成系の構築によりその形成原理が解明されることが期待される。

細胞内反応拡散波の人工細胞系は、時空間パターンの形成原理だけではなく、反応拡散波が創り出した時空間情報が、どのように下流の生命現象に伝達されるかも明らかにできると考えられる。大腸菌のMin波であればMin波が存在しない領域への細胞骨格分子FtsZの重合とリング状構造を促進し⁶、真核細胞のアクチン波であればアクチンの波による細胞膜の押し出しや波の集積が運動の誘起や細胞分裂面の決定を司る^{43,48}。また、定常的なパターンの場合も、出芽酵母のCdc42のクラスターが細胞骨格の一部とされているセプチニンをリクルートして出芽位置を決定し⁵⁶、線虫初期胚のPAR系がP顆粒の分布などを規定し前後軸を制御する⁴。このように、反応拡散波が細胞骨格などの分子をリクルートすることで、生命現象が生じる場所を決めている。これらの下流の因子を細胞内反応拡散波の人工細胞系に加えることで、分子の1対1の相互作用ではなく、分子集団となった反応拡散波と下流因子の相互作用の様式や、位置情報の伝達のタイムラグなどを明らかにできるだろう。

このように、今後の研究においてMin波以外の細胞内反応拡散波の人工細胞内再構成系を構築することで、それぞれの反応拡散系が時空間パターンを形成するのに必要な最少因子の同定や、反応ネットワークの理解、反応拡散波の一般的性質が明らかになることが期待される。さらに、人工細胞系を拡張し反応拡散波と相互作用する分子を添加することで、実際の細胞で行われている反応拡散波による生命現象の制御の全貌の理解に貢献できると考えられる。

4.2.3 物理学的側面における貢献と課題：動的な反応拡散波と定常パターン

本研究で扱ったMin波は細胞が生命現象の制御に利用している生体由来のものであるが、本研究の成果は微小閉鎖空間における反応拡散波の理解という物理学的側面においても貢献可能である。BZ反応をベースとした動的な反応拡散波の実験系^{162,163}や反応拡散系が形成する定常パターンであるTuring patternの実験系は複数の報告があるものの¹⁶⁴⁻¹⁷⁰、人工細胞系のような微小閉鎖空間において反応拡散波が発生可能な実験系は存在しないため、微小閉鎖空間で反応拡散波が示す振る舞いを実験により検証できない状況であった。反応拡散系は一般解を得るのが難しい非線形現象であるため、反応拡散方程式を用いた理論による理解が困難であるという問題があり、実験ベースで研究を行うのが通常である。これは、多くの理論解析では、一次元や二次元の開放系が想定され、常に物質の流入がある非平衡開

放系が設定されているが、細胞のような微小な閉鎖空間を理論で記述する際は、三次元空間や界面の効果、周期境界条件、質量保存則などを考慮する必要があり、計算量が膨大になることに由来する。この点において、本研究では微小閉鎖空間において反応拡散波を発生可能な唯一の実験系である Min 波の人工細胞系を用い、精密に制御された物理化学パラメータや空間サイズと反応拡散波の動態を対応させることで、モードの制御原理やモード遷移におけるヒステリシスの影響の発見、そして波長のスケーリングを実験的に実証することに成功した。特に、波長のスケーリングは、反応拡散波は空間サイズに依存しない固有波長をもつとする従来の考えを覆し、波長より小さな空間における反応拡散波の形成という新たな視点をもたらすものである。

本研究で得られた知見は、細胞サイズ空間における反応拡散波の形成原理を明らかにしてきたが、まだ未解決な問題も残されている。たとえば、波長のスケーリングを明らかにしたもの、その詳細なメカニズムは不明である。反応拡散波の内在的な性質で自発的にスケーリングされるものなのか、あるいは膜面積/体積比の変化がスケーリングをもたらすのか、小さい空間ほど分子数が減少するため波を構成する要素数が限定され波全体が縮小されるのか、いずれが要因なのかは明らかではない。今後、空間形状や分子濃度と波長や波幅の関係を解析することで、反応拡散波のスケーリングの詳細な原理を解明できるだろう。また、反応拡散波のモードがパラメータにより制御されることが示されたが、これは細胞内で主に見られる traveling wave と standing wave の 2 種類のモードに限定されている。しかし、二次元平面上では同心円状に伝播する波や螺旋波など様々なモードの波が出現する^{30,37,117,162,163}。これらの波も活性化因子と阻害因子のバランスというような一般化可能なパラメータにより制御可能かどうかという点は、反応拡散波の物理的な理解における新たな視点となるだろう。

細胞サイズ空間における反応拡散波を理解する上で重要な課題として、定常パターンの形成が残されている。一般に、反応拡散形は Min 波のような動的な波だけではなく、Turing pattern のような空間周期的な定常パターンも形成可能である。Min 波の反応ネットワークはこの Turing pattern を形成可能な構造であるにもかかわらず³⁸、これまで人工細胞系においては定常パターンが観察されていない。これには、Min 波が形成し得る Turing pattern のパラメータ領域が本研究で実施した実験条件とはかけ離れている可能性、および細胞サイズの閉鎖空間では Turing pattern が形成できない可能性の 2 つの仮説が考えられる。前者について、一般的に Turing pattern の形成には活性化因子に比べて非常に速い速度で拡散する阻害因子による広範囲における阻害効果 (lateral inhibition) が必要であるとされている。しかし、Min 波を構成する MinD (活性化因子) と MinE (阻害因子) の拡散速度は大腸菌細胞の細胞質においてはそれぞれ $16 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と同程度である⁶³。この Turing pattern の形成には不適切な拡散条件が、Min 波の人工細胞系において定常パターンが出現しない原因の可能性がある。後者の仮説は、これまでに生体由来の反応拡散系に限らず、細胞のような微小な閉鎖空間における Turing pattern の形成が報告されていないことによっても支持される。

Min 波の人工細胞系に細胞骨格因子 FtsZ を添加することで準定常的な Turing-like pattern が形成されたことが報告されているが、定常性の検証やパターンの再編などの Turing pattern の特徴の検証がされておらず、Turing pattern であるかは不明である¹⁷¹。動的な反応拡散波については空間サイズが波長の整数倍ではない空間においてもスケーリングにより波が出現可能であることを明らかにしたが、静的なパターンがこれと同じ性質をもつのかは不明である点も、細胞サイズ空間における Turing pattern の形成可能性に疑問を投じる。特に、動的な波は常にマクロなパターンの構造が変化するが、静的なパターンを閉鎖空間において出現させる場合は、パターンの構造上の重心が安定でなければその定常状態を維持するのは難しいと考えられる。このような特殊条件下において Turing pattern が形成可能か否かは、Min 波の人工細胞系への拡散速度を調節する因子の添加や、Min 波の反応ネットワークの改変などにより検証される必要がある (Fig. 4-1D)。人工細胞内において Turing pattern を形成することができれば、本研究の Min 波の解析と同様に、スケーリングやパターンの構造の種類の制御方法を検証することで、細胞サイズ空間における Turing pattern の性質や動的な波の知見を統合した反応拡散波の普遍的原理が解明されることが期待される。

4.2.4 分子ロボティクスへの貢献

本研究の成果は、細胞内反応拡散波の生物学および物理学両方の視点からの理解という理学的な貢献だけではなく、生体分子を組み上げることでロボットのような機能するシステムを構築することを追求する分子ロボティクスのような工学的な貢献も期待される。たとえば、大腸菌細胞において Min 波が細胞分裂面を規定することを利用すれば、分裂する人工細胞の創生が可能になるだろう。実際に、Kohyama らはリポソーム内において無細胞転写翻訳系を用いて MinC, MinD, MinE, 細胞骨格分子 FtsZ, および FtsZ を膜ヘリクルートする FtsA を合成することで、リポソームの赤道面上に FtsZ-ring を形成することに成功している¹⁷²。この先行研究では FtsZ-ring 近傍の膜が狭窄するのに留まり、人工細胞の分裂は達成されていないが、本研究で得られた standing wave が出現しやすいパラメータ条件を利用して standing wave を安定して発生させられるとすれば、FtsZ-ring の形成効率が向上すると考えられる。ここに FtsZ の重合を促進する高分子混雑剤や、divisome と呼ばれる細胞分裂に必要なタンパク質複合体を構成する要素を追加していくことで、分裂する人工細胞を構築できる可能性がある。また、パラメータ変化による traveling wave と standing wave の遷移を利用することで、分裂のタイミングも制御可能になると考えられる。

また、Min 波の人工細胞系とアクチンを組み合わせることで、運動する人工細胞の構築が可能だと考えられる。真核細胞ではアクチンの重合を促進する因子の反応拡散波がアクチンの波を形成させ、細胞膜が押し出されることで細胞が運動を起こす⁴⁴。これと同じメカニズムで、Arp2/3 や ActA などのアクチンの重合を促進する要素を Min タンパク質と相互作用させることで、Min 波がアクチンの重合を誘導し、人工細胞の運動を誘導できるようになると考えられる。これまでにアクチンの自己組織化や光刺激、低分子化合物の添加などにより

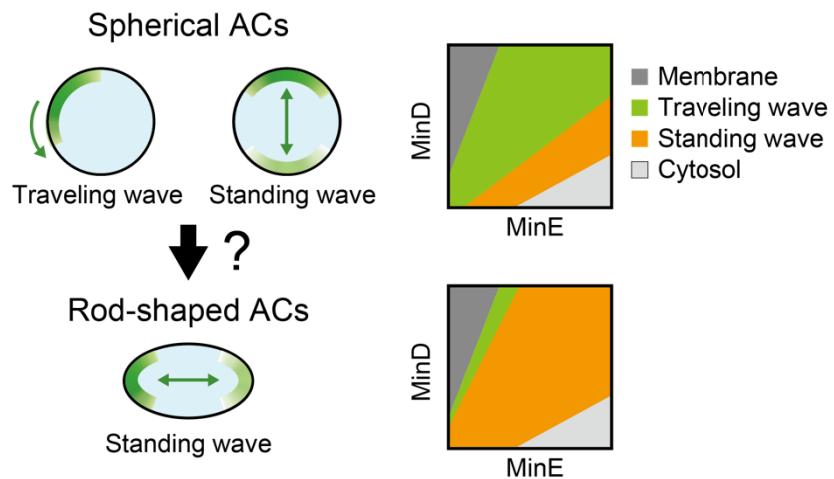
変形や運動をする人工細胞が報告されているが^{85,173–175}, Min 波を用いて実際の細胞運動のメカニズムを模倣することで, 反応拡散波と細胞骨格分子の運動による強い力の発生や, 反応拡散波の特性制御を利用した運動方向や速度の制御などが期待できる.

さらなる展開として, Min 波の時間の周期性を利用すれば, 周期的に応答を示す人工細胞を創り出すことができるだろう. たとえば, 人工細胞の膜上の特定部分にタンパク質分子 A を局在させ, そのタンパク質と相互作用し反応を起こす分子 B を Min タンパク質に融合させる. すると, Min 波が人工細胞内を一周し, 分子 A が局在する部分に達すると A と B が反応を起こし, 生命現象が創発される. Min 波はエネルギーが枯渇しない限り持続的に周期運動を繰り返すため, A と B による反応がある一定間隔の時間で周期的に起こることになる. これを利用すれば, 概日リズムの再現など生命で行われる周期運動を模倣した人工細胞を構築できると考えられる. さらに, dATP/ATP 比による周期の制御を組み合わせることで, この生命現象の周期も制御可能になる. このように, Min 波の人工細胞系を他の生命現象と組み合わせることで, 分子ロボティクスに転用可能な時空間制御を獲得した高機能な人工細胞が構築され得る.

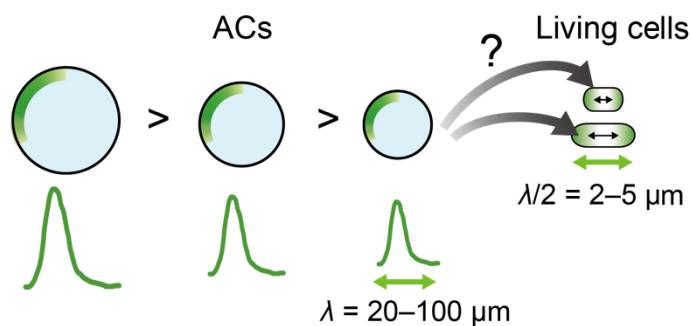
4.2.5 本研究の展望のまとめ

本研究では, ボトムアップ手法により定められた実験条件下で複雑な生命現象を理解した. この戦略はその他の反応拡散波の理解にも応用可能である. 人工細胞系のような夾雜因子が存在しない実験系では, 反応拡散系そのものが示す挙動を解析可能であり, Min 波以外の反応拡散波以外にも適用可能な普遍的な性質を抽出できる可能性がある. この点において, 反応拡散波の理解という非平衡物理的側面での貢献も期待できる. 将来的には, 様々な反応拡散波の人工細胞系の構築や, 反応拡散波とその他の生命現象を組み合わせることで, 複雑な生命現象の構成的かつ階層的な理解が可能になるはずである.

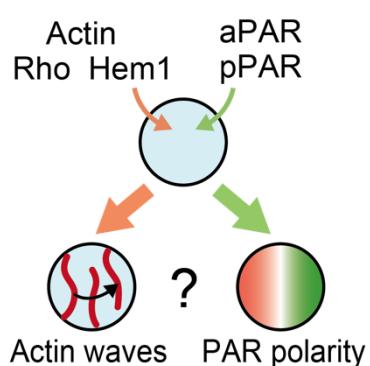
A Effect of geometry on mode selection



B Generation condition for Min waves with short wavelength



C Reconstitution in ACs



D Transition of pattern dynamics

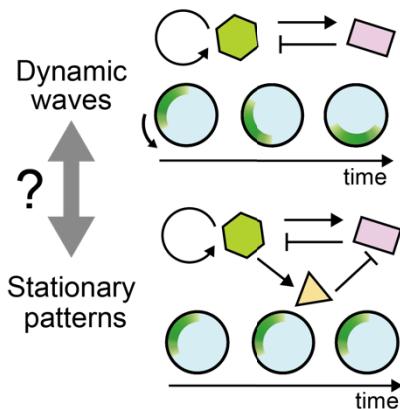


Fig. 4-1. 細胞内反応拡散波における主要な未解決課題

(A) Min 波のモード選択における空間形状の影響は未解決である。球形の人工細胞系 (ACs) の場合、standing wave の発生するパラメーター領域は traveling wave より狭い (上)。人工細胞を大腸菌細胞のようなロッド状に変形させることで、standing wave の発生可能なパラメーター領域が拡大する可能性がある (下)。 (B) Min 波は空間サイズによりスケールされることにより微小空間においても短い波長の Min 波が発生可能になるが、生細胞と同程度の微小なサイズの人工細胞内においては Min 波は観察されていない。 *in vitro* において 100 μm 程度の大きな波長を持つ Min 波が、生細胞同様の 2–5 μm の微小な空間において発生可能な条件は完全には理解されていない。 (C) Min 波以外の細胞内反応拡散波の人工細胞内再構成系の構築により、それぞれのパターン形成原理が検証可能になる。 (D) Turing タイプの静的なパターンの形成条件は明らかではない。人工細胞系を用いることで、動的な反応拡散波を静的なパターンに変換可能か否かを検証可能である。

参考文献

1. Hubatsch, L. & Goehring, N. W. Intracellular morphogens: Specifying patterns at the subcellular scale. *Curr. Top. Dev. Biol.* **137**, 247–278 (2020).
2. Vendel, K. J. A., Tschirpke, S., Shamsi, F., Dogterom, M. & Laan, L. Minimal *in vitro* systems shed light on cell polarity. *J. Cell Sci.* **132**, jcs217554 (2019).
3. Burkart, T., Wigbers, M. C., Würthner, L. & Frey, E. Control of protein-based pattern formation via guiding cues. *Nat. Rev. Phys.* **4**, 511–527 (2022).
4. Hoege, C. & Hyman, A. A. Principles of PAR polarity in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 315–322 (2013).
5. Kalab, P. & Heald, R. The RanGTP gradient – a GPS for the mitotic spindle. *J. Cell Sci.* **121**, 1577–1586 (2008).
6. Rowlett, V. W. & Margolin, W. The bacterial Min system. *Curr. Biol.* **23**, R553–R556 (2013).
7. Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N. L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Van Den Bosch, L., Tompa, P. & Fuxreiter, M. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* **28**, 420–435 (2018).
8. Yuan, C., Li, Q., Xing, R., Li, J. & Yan, X. Peptide self-assembly through liquid-liquid phase separation. *Chem* **9**, 2425–2445 (2023).
9. Hirose, T., Ninomiya, K., Nakagawa, S. & Yamazaki, T. A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **24**, 288–304 (2023).
10. Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R. A., Chakraborty, A. K. & Sharp, P. A. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* **169**, 13–23 (2017).
11. Sabari, B. R., Dall’Agnese, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Hannett, N. M., Zamudio, A. V., Manteiga, J. C., et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* **361**, eaar3958 (2018).
12. Yasuda, S., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Guo, Q., Ikeuchi, K., Endo, A., Arai, N., Ohtake, F., Murata, S., Inada, T., Baumeister, W., Fernández-Busnadio, R., Tanaka, K. & Saeki, Y. Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome. *Nature* **578**, 296–300 (2020).
13. Fujioka, Y., Alam, J. M., Noshiro, D., Mouri, K., Ando, T., Okada, Y., May, A. I., Knorr, R. L., Suzuki, K., Ohsumi, Y. & Noda, N. N. Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature* **578**, 301–305 (2020).
14. Mata, J. & Nurse, P. *tea1* and the Microtubular Cytoskeleton Are Important for Generating Global Spatial Order within the Fission Yeast Cell. *Cell* **89**, 939–949 (1997).
15. Khaliullin, R. N., Green, R. A., Shi, L. Z., Gomez-Cavazos, J. S., Berns, M. W., Desai, A. & Oegema, K. A positive-feedback-based mechanism for constriction rate acceleration during cytokinesis in *Caenorhabditis elegans*. *eLife* **7**, e36073 (2018).

16. Caballero-Mancebo, S., Shinde, R., Bolger-Munro, M., Peruzzo, M., Szep, G., Steccari, I., Labrousse-Arias, D., Zhenen, V., Merrin, J., Callan-Jones, A., Voituriez, R. & Heisenberg, C.-P. Friction forces determine cytoplasmic reorganization and shape changes of ascidian oocytes upon fertilization. *Nat. Phys.* **20**, 310–321 (2024).
17. Illukkumbura, R., Bland, T. & Goehring, N. W. Patterning and polarization of cells by intracellular flows. *Curr. Opin. Cell Biol.* **62**, 123–134 (2020).
18. Goode, B. L., Eskin, J. & Shekhar, S. Mechanisms of actin disassembly and turnover. *J. Cell Biol.* **222**, e202309021 (2023).
19. Gierer, A. & Meinhardt, H. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* **12**, 30–39 (1972).
20. Epstein, I. R. & Pojman, J. A. *An introduction to nonlinear chemical dynamics: oscillations, waves, patterns, and chaos*. (Oxford university press, 1998).
21. Weiner, O. D., Marganski, W. A., Wu, L. F., Altschuler, S. J. & Kirschner, M. W. An Actin-Based Wave Generator Organizes Cell Motility. *PLoS Biol.* **5**, e221 (2007).
22. Kondo, S. & Asai, R. A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish *Pomacanthus*. *Nature* **376**, 765–768 (1995).
23. Kondo, S. & Miura, T. Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. *Science* **329**, 1616–1620 (2010).
24. Glover, J. D., Sudderick, Z. R., Shih, B. B.-J., Batho-Samblas, C., Charlton, L., Krause, A. L., Anderson, C., Riddell, J., Balic, A., Li, J., et al. The developmental basis of fingerprint pattern formation and variation. *Cell* **186**, 940–956.e20 (2023).
25. Sheth, R., Marcon, L., Bastida, M. F., Junco, M., Quintana, L., Dahn, R., Kmita, M., Sharpe, J. & Ros, M. A. Hox Genes Regulate Digit Patterning by Controlling the Wavelength of a Turing-Type Mechanism. *Science* **338**, 1476–1480 (2012).
26. Raspopovic, J., Marcon, L., Russo, L. & Sharpe, J. Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. *Science* **345**, 566–570 (2014).
27. Onimaru, K., Marcon, L., Musy, M., Tanaka, M. & Sharpe, J. The fin-to-limb transition as the reorganization of a Turing pattern. *Nat. Commun.* **7**, 11582 (2016).
28. Turing, A. M. The Chemical Basis of Morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. London B* **237**, 37–72 (1952).
29. Cross, M. C. & Hohenberg, P. C. Pattern formation outside of equilibrium. *Rev. Mod. Phys.* **65**, 851–1112 (1993).
30. Zaikin, A. N. & Zhabotinsky, A. M. Concentration Wave Propagation in Two-dimensional Liquid-phase Self-oscillating System. *Nature* **225**, 535–537 (1970).
31. Ross, J., Müller, S. C. & Vidal, C. Chemical waves. *Science* **240**, 460–465 (1988).

32. Prigogine, I. & Lefever, R. Symmetry Breaking Instabilities in Dissipative Systems. II. *J. Chem. Phys.* **48**, 1695–1700 (1968).
33. Field, R. J. & Noyes, R. M. Oscillations in chemical systems. IV. Limit cycle behavior in a model of a real chemical reaction. *J. Chem. Phys.* **60**, 1877–1884 (1974).
34. Keener, J. P. & Tyson, J. J. Spiral waves in the Belousov-Zhabotinskii reaction. *Phys. D Nonlinear Phenom.* **21**, 307–324 (1986).
35. Vanag, V. K. & Epstein, I. R. Patterns of nanodroplets: the Belousov-Zhabotinsky–Aerosol Ot-Microemulsion system in *Self-Organized Morphology in Nanostructured Materials* (eds. Al-Shamery, K & Parisi, K.) 89-113 (Springer, 2008).
36. Zhabotinsky, A. M., Dolnik, M. & Epstein, I. R. Pattern formation arising from wave instability in a simple reaction-diffusion system. *J. Chem. Phys.* **103**, 10306–10314 (1995).
37. Yang, L., Dolnik, M., Zhabotinsky, A. M. & Epstein, I. R. Pattern formation arising from interactions between turing and wave instabilities. *J. Chem. Phys.* **117**, 7259–7265 (2002).
38. Scholes, N. S., Schnoerr, D., Isalan, M. & Stumpf, M. P. H. A Comprehensive Network Atlas Reveals That Turing Patterns Are Common but Not Robust. *Cell Syst.* **9**, 243-257.e4 (2019).
39. Nishide, R. & Ishihara, S. Pattern Propagation Driven by Surface Curvature. *Phys. Rev. Lett.* **128**, 224101 (2022).
40. Villar-Sepúlveda, E. & Champneys, A. R. General conditions for Turing and wave instabilities in reaction -diffusion systems. *J. Math. Biol.* **86**, 39 (2023).
41. Halatek, J., Brauns, F. & Frey, E. Self-organization principles of intracellular pattern formation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **373**, 20170107 (2018).
42. Motegi, F. & Seydoux, G. The PAR network: Redundancy and robustness in a symmetry-breaking system. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, 20130010 (2013).
43. Vicker, M. G. Eukaryotic cell locomotion depends on the propagation of self-organized reaction-diffusion waves and oscillations of actin filament assembly. *Exp. Cell Res.* **275**, 54–66 (2002).
44. Allard, J. & Mogilner, A. Traveling waves in actin dynamics and cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 107–115 (2013).
45. Beta, C., Edelstein-Keshet, L., Gov, N. & Yochelis, A. From actin waves to mechanism and back: How theory aids biological understanding. *eLife* **12**, e87181 (2023).
46. Bement, W. M., Leda, M., Moe, A. M., Kita, A. M., Larson, M. E., Golding, A. E., Pfeuti, C., Su, K. C., Miller, A. L., Goryachev, A. B. & Von Dassow, G. Activator-inhibitor coupling between Rho signalling and actin assembly makes the cell cortex an excitable medium. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1471–1483 (2015).
47. Michaud, A., Leda, M., Swider, Z. T., Kim, S., He, J., Landino, J., Valley, J. R., Huisken, J., Goryachev, A. B., Von Dassow, G. & Bement, W. M. A versatile cortical pattern-forming circuit based on Rho, F-actin, Ect2, and RGA-3/4. *J. Cell Biol.* **221**, e202203017 (2022).

48. Goryachev, A. B., Leda, M., Miller, A. L., von Dassow, G. & Bement, W. M. How to make a static cytokinetic furrow out of traveling excitable waves. *Small GTPases* **7**, 65–70 (2016).
49. Devreotes, P. N., Bhattacharya, S., Edwards, M., Iglesias, P. A., Lampert, T. & Miao, Y. Excitable Signal Transduction Networks in Directed Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **33**, 103–125 (2017).
50. Gerisch, G., Schroth-Diez, B., Müller-Taubenberger, A. & Ecke, M. PIP3 waves and PTEN dynamics in the emergence of cell polarity. *Biophys. J.* **103**, 1170–1178 (2012).
51. Matsuoka, S. & Ueda, M. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 generates bistability for polarity in motile cells. *Nat. Commun.* **9**, 4481 (2018).
52. Arai, Y., Shibata, T., Matsuoka, S., Sato, M. J., Yanagida, T. & Ueda, M. Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12399–12404 (2010).
53. Raskin, D. M. & De Boer, P. A. J. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4971–4976 (1999).
54. Hu, Z. & Lutkenhaus, J. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol. Microbiol.* **34**, 82–90 (1999).
55. Lackner, L. L., Raskin, D. M. & De Boer, P. A. J. ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane in vitro. *J. Bacteriol.* **185**, 735–749 (2003).
56. Bi, E. & Park, H. O. Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**, 347–387 (2012).
57. Cuenca, A. A., Schetter, A., Aceto, D., Kemphues, K. & Seydoux, G. Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* **130**, 1255–1265 (2003).
58. Johnson, J. M., Jin, M. & Lew, D. J. Symmetry breaking and the establishment of cell polarity in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 740–746 (2011).
59. Goryachev, A. B. & Pokhilko, A. V. Dynamics of Cdc42 network embodies a Turing-type mechanism of yeast cell polarity. *FEBS Lett.* **582**, 1437–1443 (2008).
60. Goehring, N. W. PAR polarity: From complexity to design principles. *Exp. Cell Res.* **328**, 258–266 (2014).
61. Goehring, N. W., Trong, P. K., Bois, J. S., Chowdhury, D., Nicola, E. M., Hyman, A. A. & Grill, S. W. Polarization of PAR Proteins by Advectional Triggering of a Pattern-Forming System. *Science* **334**, 1137–1141 (2011).

62. Bretschneider, T., Anderson, K., Ecke, M., Müller-Taubenberger, A., Schroth-Diez, B., Ishikawa-Ankerhold, H. C. & Gerisch, G. The three-dimensional dynamics of actin waves, a model of cytoskeletal self-organization. *Biophys. J.* **96**, 2888–2900 (2009).
63. Meacci, G., Ries, J., Fischer-Friedrich, E., Kahya, N., Schwille, P. & Kruse, K. Mobility of Min-proteins in *Escherichia coli* measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Biol.* **3**, 255–263 (2006).
64. Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–269 (2005).
65. Motegi, F., Zonies, S., Hao, Y., Cuenca, A. A., Griffin, E. & Seydoux, G. Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1361–1367 (2011).
66. Kono, K., Yoshiura, S., Fujita, I., Okada, Y., Shitamukai, A., Shibata, T. & Matsuzaki, F. Reconstruction of Par-dependent polarity in apolar cells reveals a dynamic process of cortical polarization. *eLife* **8**, e45559 (2019).
67. Ramanujam, R., Han, Z., Zhang, Z., Kanchanawong, P. & Motegi, F. Establishment of the PAR-1 cortical gradient by the aPKC-PRBH circuit. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 917–927 (2018).
68. Watson, J. L., Krüger, L. K., Ben-Sasson, A. J., Bittleston, A., Shahbazi, M. N., Planelles-Herrero, V. J., Chambers, J. E., Manton, J. D., Baker, D. & Derivery, E. Synthetic Par polarity induces cytoskeleton asymmetry in unpolarized mammalian cells. *Cell* **186**, 4710-4727.e35 (2023).
69. Knoch, F., Tarantola, M., Bodenschatz, E. & Rappel, W.-J. Modeling self-organized spatio-temporal patterns of PIP3 and PTEN during spontaneous cell polarization. *Phys. Biol.* **11**, 046002 (2014).
70. Meinhardt, H. & De Boer, P. A. J. Pattern formation in *Escherichia coli*: A model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14202–14207 (2001).
71. Howard, M., Rutenberg, A. D. & de Vet, S. Dynamic Compartmentalization of Bacteria: Accurate Division in *E. Coli*. *Phys. Rev. Lett.* **87**, 278102 (2001).
72. Bonny, M., Fischer-Friedrich, E., Loose, M., Schwille, P. & Kruse, K. Membrane binding of MinE allows for a comprehensive description of Min-protein pattern formation. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003347 (2013).
73. Geßele, R., Halatek, J., Würthner, L. & Frey, E. Geometric cues stabilise long-axis polarisation of PAR protein patterns in *C. elegans*. *Nat. Commun.* **11**, 539 (2020).
74. Taniguchi, D., Ishihara, S., Oonuki, T., Honda-Kitahara, M., Kaneko, K. & Sawai, S. Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 5016–5021 (2013).

75. Wigbers, M. C., Tan, T. H., Brauns, F., Liu, J., Swartz, S. Z., Frey, E. & Fakhri, N. A hierarchy of protein patterns robustly decodes cell shape information. *Nat. Phys.* **17**, 578–584 (2021).
76. Lee, M. E., Lo, W. C., Miller, K. E., Chou, C. S. & Park, H. O. Regulation of Cdc42 polarization by the Rsr1 GTPase and Rga1, a Cdc42 GTPase-activating protein, in budding yeast. *J. Cell Sci.* **128**, 2106–2117 (2015).
77. Wu, F., van Schie, B. G. C., Keymer, J. E. & Dekker, C. Symmetry and scale orient Min protein patterns in shaped bacterial sculptures. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 719–726 (2015).
78. Rondelez, Y. Competition for Catalytic Resources Alters Biological Network Dynamics. *Phys. Rev. Lett.* **108**, 018102 (2012).
79. Nishikawa, S., Sato, G., Takada, S., Kohyama, S., Honda, G., Yanagisawa, M., Hori, Y., Doi, N., Yoshinaga, N. & Fujiwara, K. Multimolecular Competition Effect as a Modulator of Protein Localization and Biochemical Networks in Cell-Size Space. *Adv. Sci.* **11**, 2308030 (2024).
80. Sato, G., Kinoshita, S., Yamada, T. G., Arai, S., Kitaguchi, T., Funahashi, A., Doi, N. & Fujiwara, K. Metabolic Tug-of-War between Glycolysis and Translation Revealed by Biochemical Reconstitution. *ACS Synth. Biol.* **13**, 1572–1581 (2024).
81. Salehi-Reyhani, A., Ces, O. & Elani, Y. Artificial cell mimics as simplified models for the study of cell biology. *Exp. Biol. Med.* **242**, 1309–1317 (2017).
82. Yanagisawa, M., Watanabe, C., Yoshinaga, N. & Fujiwara, K. Cell-Size Space Regulates the Behavior of Confined Polymers: From Nano- and Micromaterials Science to Biology. *Langmuir* **38**, 11811–11827 (2022).
83. Théry, M. & Blanchoin, L. Reconstituting the dynamic steady states of actin networks in vitro. *Nat. Cell Biol.* **26**, 494–497 (2024).
84. Miyazaki, M., Chiba, M., Eguchi, H., Ohki, T. & Ishiwata, S. Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings *in vitro*. *Nat. Cell Biol.* **17**, 480–489 (2015).
85. Sakamoto, R., Izri, Z., Shimamoto, Y., Miyazaki, M. & Maeda, Y. T. Geometric trade-off between contractile force and viscous drag determines the actomyosin-based motility of a cell-sized droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2121147119 (2022).
86. Sakamoto, R., Tanabe, M., Hiraiwa, T., Suzuki, K., Ishiwata, S., Maeda, Y. T. & Miyazaki, M. Tug-of-war between actomyosin-driven antagonistic forces determines the positioning symmetry in cell-sized confinement. *Nat. Commun.* **11**, 3063 (2020).
87. Pinot, M., Steiner, V., Dehapiot, B., Yoo, B. K., Chesnel, F., Blanchoin, L., Kervrann, C. & Gueroui, Z. Confinement induces actin flow in a meiotic cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 11705–11710 (2012).

88. Sakuta, H., Nakatani, N., Torisawa, T., Sumino, Y., Tsumoto, K., Oiwa, K. & Yoshikawa, K. Self-emergent vortex flow of microtubule and kinesin in cell-sized droplets under water/water phase separation. *Commun. Chem.* **6**, 80 (2023).
89. Garenne, D., Libchaber, A. & Noireaux, V. Membrane molecular crowding enhances MreB polymerization to shape synthetic cells from spheres to rods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 1902–1909 (2020).
90. Good, M. C., Vahey, M. D., Skandarajah, A., Fletcher, D. A. & Heald, R. Cytoplasmic Volume Modulates Spindle Size During Embryogenesis. *Science* **342**, 856–860 (2013).
91. Hazel, J., Krutkramelis, K., Mooney, P., Tomschik, M., Gerow, K., Oakey, J. & Gatlin, J. C. Changes in Cytoplasmic Volume Are Sufficient to Drive Spindle Scaling. *Science* **342**, 853–856 (2013).
92. Woods, B. & Lew, D. J. Polarity establishment by Cdc42: Key roles for positive feedback and differential mobility. *Small GTPases* **10**, 130–137 (2019).
93. Howell, A. S., Savage, N. S., Johnson, S. A., Bose, I., Wagner, A. W., Zyla, T. R., Nijhout, H. F., Reed, M. C., Goryachev, A. B. & Lew, D. J. Singularity in Polarization: Rewiring Yeast Cells to Make Two Buds. *Cell* **139**, 731–743 (2009).
94. Wu, C.-F., Chiou, J.-G., Minakova, M., Woods, B., Tsygankov, D., Zyla, T. R., Savage, N. S., Elston, T. C. & Lew, D. J. Role of competition between polarity sites in establishing a unique front. *eLife* **4**, e11611 (2015).
95. Thalmeier, D., Halatek, J. & Frey, E. Geometry-induced protein pattern formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 548–553 (2016).
96. Watanabe, C. & Yanagisawa, M. Cell-size confinement effect on protein diffusion in crowded poly(ethylene)glycol solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 8842–8847 (2018).
97. Watanabe, C., Kobori, Y., Yamamoto, J., Kinjo, M. & Yanagisawa, M. Quantitative Analysis of Membrane Surface and Small Confinement Effects on Molecular Diffusion. *J. Phys. Chem. B* **124**, 1090–1098 (2020).
98. Loose, M., Fischer-friedrich, E., Ries, J., Kruse, K. & Schwille, P. Spatial Regulators for Bacterial Cell Division Self-Organize into Surface Waves in Vitro. *Science* **320**, 789–792 (2008).
99. Ramm, B., Heermann, T. & Schwille, P. The *E. coli* MinCDE system in the regulation of protein patterns and gradients. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 4245–4273 (2019).
100. Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14819–14824 (1999).
101. Hu, Z. & Lutkenhaus, J. A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum. *Mol. Microbiol.* **47**, 345–355 (2003).

102. Szeto, T. H., Rowland, S. L., Habrukowich, C. L. & King, G. F. The MinD membrane targeting sequence is a transplantable lipid-binding helix. *J. Biol. Chem.* **278**, 40050–40056 (2003).
103. Halatek, J. & Frey, E. Highly canalized MinD Transfer and MinE sequestration explain the origin of robust MinCDE-protein dynamics. *Cell Rep.* **1**, 741–752 (2012).
104. Wettmann, L. & Kruse, K. The Min-protein oscillations in *Escherichia coli*: An example of self-organized cellular protein waves. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **373**, 20170111 (2018).
105. Park, K. T., Villar, M. T., Artigues, A. & Lutkenhaus, J. MinE conformational dynamics regulate membrane binding, MinD interaction, and Min oscillation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 7497–7504 (2017).
106. Park, K. T., Wu, W., Battaile, K. P., Lovell, S., Holyoak, T. & Lutkenhaus, J. The Min oscillator uses MinD-dependent conformational changes in MinE to spatially regulate cytokinesis. *Cell* **146**, 396–407 (2011).
107. Park, K. T., Wu, W., Lovell, S. & Lutkenhaus, J. Mechanism of the asymmetric activation of the MinD ATPase by MinE. *Mol. Microbiol.* **85**, 271–281 (2012).
108. De Boer, P. A. J., Crossley, R. E., Hand, A. R. & Rothfield, L. I. The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *EMBO J.* **10**, 4371–4380 (1991).
109. Hu, Z., Gogol, E. P. & Lutkenhaus, J. Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6761–6766 (2002).
110. Loose, M., Fischer-Friedrich, E., Herold, C., Kruse, K. & Schwille, P. Min protein patterns emerge from rapid rebinding and membrane interaction of MinE. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 577–583 (2011).
111. Vecchiarelli, A. G., Li, M., Mizuuchi, M. & Mizuuchi, K. Differential affinities of MinD and MinE to anionic phospholipid influence Min patterning dynamics *in vitro*. *Mol. Microbiol.* **93**, 453–463 (2014).
112. Kretschmer, S., Zieske, K. & Schwille, P. Large-scale modulation of reconstituted Min protein patterns and gradients by defined mutations in MinE's membrane targeting sequence. *PLoS One* **12**, e0179582 (2017).
113. Martos, A., Raso, A., Jiménez, M., Petrášek, Z., Rivas, G. & Schwille, P. FtsZ Polymers Tethered to the Membrane by ZipA Are Susceptible to Spatial Regulation by Min Waves. *Biophys. J.* **108**, 2371–2383 (2015).
114. Caspi, Y. & Dekker, C. Mapping out min protein patterns in fully confined fluidic chambers. *eLife* **5**, e19271 (2016).
115. Schweizer, J., Loose, M., Bonny, M., Kruse, K., Moñch, I. & Schwille, P. Geometry sensing by self-organized protein patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 15283–15288 (2012).

116. Kretschmer, S., Heermann, T., Tassinari, A., Glock, P. & Schwille, P. Increasing MinD's membrane affinity yields standing wave oscillations and functional gradients on flat membranes. *ACS Synth. Biol.* **10**, 939–949 (2021).
117. Vecchiarelli, A. G., Li, M., Mizuuchi, M., Hwang, L. C., Seol, Y., Neuman, K. C. & Mizuuchi, K. Membrane-bound MinDE complex acts as a toggle switch that drives Min oscillation coupled to cytoplasmic depletion of MinD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E1479–E1488 (2016).
118. Zieske, K. & Schwille, P. Reconstitution of pole-to-pole oscillations of Min proteins in microengineered polydimethylsiloxane compartments. *Angew. Chemie. Int. Ed.* **52**, 459–462 (2013).
119. Zieske, K. & Schwille, P. Reconstitution of self-organizing protein gradients as spatial cues in cell-free systems. *eLife* **3**, e03949 (2014).
120. Brauns, F., Pawlik, G., Halatek, J., Kerssemakers, J., Frey, E. & Dekker, C. Bulk-surface coupling identifies the mechanistic connection between Min-protein patterns *in vivo* and *in vitro*. *Nat. Commun.* **12**, 3312 (2021).
121. Würthner, L., Brauns, F., Pawlik, G., Halatek, J., Kerssemakers, J., Dekker, C. & Frey, E. Bridging scales in a multiscale pattern-forming system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2206888119 (2022).
122. Wu, F., Halatek, J., Reiter, M., Kingma, E., Frey, E. & Dekker, C. Multistability and dynamic transitions of intracellular Min protein patterns. *Mol. Syst. Biol.* **12**, 873 (2016).
123. Zieske, K., Chwastek, G. & Schwille, P. Protein Patterns and Oscillations on Lipid Monolayers and in Microdroplets. *Angew. Chemie. Int. Ed.* **55**, 13455–13459 (2016).
124. Litschel, T., Ramm, B., Maas, R., Heymann, M. & Schwille, P. Beating vesicles: Encapsulated protein oscillations cause dynamic membrane deformations. *Angew. Chemie. Int. Ed.* **57**, 16286–16290 (2018).
125. Kohyama, S., Yoshinaga, N., Yanagisawa, M., Fujiwara, K. & Doi, N. Cell-sized confinement controls generation and stability of a protein wave for spatiotemporal regulation in cells. *eLife* **8**, e44591 (2019).
126. Kohyama, S., Fujiwara, K., Yoshinaga, N. & Doi, N. Conformational equilibrium of MinE regulates allowable concentration ranges of a protein wave for cell division. *Nanoscale* **12**, 11960–11970 (2020).
127. Yoshida, A., Kohyama, S., Fujiwara, K., Nishikawa, S. & Doi, N. Regulation of spatiotemporal patterning in artificial cells by a defined protein expression system. *Chem. Sci.* **10**, 11064–11072 (2019).
128. Hörning, M. & Shibata, T. Three-Dimensional Cell Geometry Controls Excitable Membrane Signaling in *Dictyostelium* Cells. *Biophys. J.* **116**, 372–382 (2019).

129. Flemming, S., Font, F., Alonso, S. & Beta, C. How cortical waves drive fission of motile cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 6330–6338 (2020).
130. Fischer-Friedrich, E., Meacci, G., Lutkenhaus, J., Chaté, H. & Kruse, K. Intra- and intercellular fluctuations in Min-protein dynamics decrease with cell length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 6134–6139 (2010).
131. Kohyama, S. Characterization of Min waves reconstituted in artificial cells. *Keio Univ. Ph.D. thesis* (2020).
132. Raskin, D. M. & De Boer, P. A. J. MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 6419–6424 (1999).
133. Shih, Y. L., Kawagishi, I. & Rothfield, L. The MreB and Min cytoskeletal-like systems play independent roles in prokaryotic polar differentiation. *Mol. Microbiol.* **58**, 917–928 (2005).
134. Akui, T., Fujiwara, K., Sato, G., Takinoue, M., Nomura, S. M. & Doi, N. System concentration shift as a regulator of transcription-translation system within liposomes. *iScience* **24**, 102859 (2021).
135. Shih, Y. L., Fu, X., King, G. F., Le, T. & Rothfield, L. Division site placement in *E.coli*: Mutations that prevent formation of the MinE ring lead to loss of the normal midcell arrest of growth of polar MinD membrane domains. *EMBO J.* **21**, 3347–3357 (2002).
136. Palanisamy, N., Öztürk, M. A. & Ventura, B. Di. C-terminal eYFP fusion impairs *Escherichia coli* MinE function. *Open Biol.* **10**, 200010 (2020).
137. Hu, Z., Saez, C. & Lutkenhaus, J. Recruitment of MinC, an Inhibitor of Z-Ring Formation, to the Membrane in *Escherichia coli* : Role of MinD and MinE. *J. Bacteriol.* **185**, 196–203 (2003).
138. Heermann, T., Ramm, B., Glaser, S. & Schwille, P. Local self-enhancement of MinD membrane binding in Min potein pattern formation. *J. Mol. Biol.* **432**, 3191–3204 (2020).
139. Hsieh, C. W., Lin, T. Y., Lai, H. M., Lin, C. C., Hsieh, T. S. & Shih, Y. L. Direct MinE-membrane interaction contributes to the proper localization of MinDE in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **75**, 499–512 (2010).
140. Touhami, A., Jericho, M. & Rutenberg, A. D. Temperature dependence of minD oscillation in *Escherichia coli*: Running hot and fast. *J. Bacteriol.* **188**, 7661–7667 (2006).
141. Fu, X., Shih, Y. L., Zhang, Y. & Rothfield, L. I. The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 980–985 (2001).
142. Wu, M., Wu, X. & De Camilli, P. Calcium oscillations-coupled conversion of actin travelling waves to standing oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 1339–1344 (2013).
143. Inagaki, N. & Katsuno, H. Actin Waves: Origin of Cell Polarization and Migration? *Trends Cell Biol.* **27**, 515–526 (2017).

144. Kapustina, M., Elston, T. C. & Jacobson, K. Compression and dilation of the membrane-cortex layer generates rapid changes in cell shape. *J. Cell Biol.* **200**, 95–108 (2013).
145. Driscoll, M. K., Losert, W., Jacobson, K. & Kapustina, M. Spatiotemporal relationships between the cell shape and the actomyosin cortex of periodically protruding cells. *Cytoskeleton* **72**, 268–281 (2015).
146. Martos, A., Petrasek, Z. & Schwille, P. Propagation of MinCDE waves on free-standing membranes. *Environ. Microbiol.* **15**, 3319–3326 (2013).
147. Ramm, B., Glock, P., Mücksch, J., Blumhardt, P., García-Soriano, D. A., Heymann, M. & Schwille, P. The MinDE system is a generic spatial cue for membrane protein distribution in vitro. *Nat. Commun.* **9**, 3942 (2018).
148. Richey, B., Cayley, D. S., Mossing, M. C., Kolka, C., Anderson, C. F., Farrar, T. C. & Record, M. T. Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 7157–7164 (1987).
149. Nozaki, S. & Niki, H. Exonuclease III (XthA) enforces *in vivo* DNA cloning of *Escherichia coli* to create cohesive ends. *J. Bacteriol.* **201**, e00660-18 (2019).
150. Ramm, B., Glock, P. & Schwille, P. *In Vitro* Reconstitution of Self-Organizing Protein Patterns on Supported Lipid Bilayers. *J. Vis. Exp.* **2018**, e58139 (2018).
151. Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W. W. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* **16**, 1055–1069 (1976).
152. Wickner, S. & Hurwitz, J. Association of φX174 DNA dependent ATPase activity with an *Escherichia coli* protein, replication factor Y, required for *in vitro* synthesis of φX174 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 3342–3346 (1975).
153. Sawadogo, M. & Roeder, R. G. Energy requirement for specific transcription initiation by the human RNA polymerase II system. *J. Biol. Chem.* **259**, 5321–5326 (1984).
154. Bachmann, M., Pfeifer, K., Schröder, H. C. & Müller, W. E. G. Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* **60**, 85–93 (1990).
155. Leffers, G. & Rao, V. B. Biochemical characterization of an ATPase activity associated with the large packaging subunit gp17 from bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **275**, 37127–37136 (2000).
156. Schultheisz, H. L., Szymczyna, B. R., Scott, L. G. & Williamson, J. R. Pathway Engineered Enzymatic de Novo Purine Nucleotide Synthesis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 499–511 (2008).
157. Hubatsch, L., Peglion, F., Reich, J. D., Rodrigues, N. T. L., Hirani, N., Illukkumbura, R. & Goehring, N. W. A cell-size threshold limits cell polarity and asymmetric division potential. *Nat. Phys.* **15**, 1078–1085 (2019).

158. Wu, W., Park, K. T., Holyoak, T. & Lutkenhaus, J. Determination of the structure of the MinD-ATP complex reveals the orientation of MinD on the membrane and the relative location of the binding sites for MinE and MinC. *Mol. Microbiol.* **79**, 1515–1528 (2011).
159. Buckstein, M. H., He, J. & Rubin, H. Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 718–726 (2008).
160. Vecchiarelli, A. G., Neuman, K. C. & Mizuuchi, K. A propagating ATPase gradient drives transport of surface-confined cellular cargo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 4880–4885 (2014).
161. Traut, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* **140**, 1–22 (1994).
162. Vanag, V. K. & Epstein, I. R. Pattern formation mechanisms in reaction-diffusion systems. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 673–681 (2009).
163. Epstein, I. R. & Xu, B. Reaction-diffusion processes at the nano- and microscales. *Nat. Nanotechnol.* **11**, 312–319 (2016).
164. Castets, V., Dulos, E., Boissonade, J. & De Kepper, P. Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2953–2957 (1990).
165. Ouyang, Q. & Swinney, H. L. Transition from a uniform state to hexagonal and striped Turing patterns. *Nature* **352**, 610–612 (1991).
166. Bánsági, T., Vanag, V. K. & Epstein, I. R. Tomography of Reaction-Diffusion Microemulsions Reveals Three-Dimensional Turing Patterns. *Science* **331**, 1309–1312 (2011).
167. Tan, Z., Chen, S., Peng, X., Zhang, L. & Gao, C. Polyamide membranes with nanoscale Turing structures for water purification. *Science* **360**, 518–521 (2018).
168. Escárcega-Bobadilla, M. V., Maldonado-Domínguez, M., Romero-Ávila, M. & Zelada-Guillén, G. A. Turing patterns by supramolecular self-assembly of a single salphen building block. *iScience* **25**, 104545 (2022).
169. Gu, J., Li, L., Yang, Q., Tian, F., Zhao, W., Xie, Y., Yu, J., Zhang, A., Zhang, L., Li, H., Zhong, J., Jiang, J., Wang, Y., Liu, J. & Lu, J. Twinning Engineering of Platinum/Iridium Nanonets as Turing-Type Catalysts for Efficient Water Splitting. *J. Am. Chem. Soc.* **146**, 5355–5365 (2024).
170. Zhang, X. L., Yang, P. P., Zheng, Y. R., Duan, Y., Hu, S. J., Ma, T., Gao, F. Y., Niu, Z. Z., Wu, Z. Z., Qin, S., et al. An Efficient Turing-Type Ag₂Se-CoSe₂ Multi-Interfacial Oxygen-Evolving Electrocatalyst. *Angew. Chemie. Int. Ed.* **60**, 6553–6560 (2021).
171. Reverte-López, M., Gavrilovic, S., Merino-Salomón, A., Eto, H., Yagüe Relimpió, A., Rivas, G. & Schwille, P. Protein-Based Patterning to Spatially Functionalize Biomimetic Membranes. *Small Methods* **7**, 2300173 (2023).
172. Kohyama, S., Merino-Salomón, A. & Schwille, P. In vitro assembly, positioning and contraction of a division ring in minimal cells. *Nat. Commun.* **13**, 6098 (2022).

173. Tanaka, S., Takiguchi, K. & Hayashi, M. Repetitive stretching of giant liposomes utilizing the nematic alignment of confined actin. *Commun. Phys.* **1**, 18 (2018).
174. Gavriljuk, K., Scocozza, B., Ghasemalizadeh, F., Seidel, H., Nandan, A. P., Campos-Medina, M., Schmick, M., Koseska, A. & Bastiaens, P. I. H. A self-organized synthetic morphogenic liposome responds with shape changes to local light cues. *Nat. Commun.* **12**, 1548 (2021).
175. Razavi, S., Wong, F., Abubaker-Sharif, B., Matsubayashi, H. T., Nakamura, H., Nguyen, N. T. H., Robinson, D. N., Chen, B., Iglesias, P. A. & Inoue, T. Synthetic control of actin polymerization and symmetry breaking in active protocells. *Sci. Adv.* **10**, eadk9731 (2024).

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学部藤原慶准教授の指導のもとに行ったものです。

本研究を遂行するにあたり、研究に必要なすべての要素についてご指導を賜りました、藤原准教授に深く感謝申し上げます。実験手法、研究計画の立て方、新たな研究テーマの発想、プレゼンテーション技術、申請書や論文の書き方など、研究の遂行そのものに必要な技術・知識から研究内容のアピールに必要な能力まで、熱心にご指導いただきました。研究室での日常生活では、これまでに幅広い分野の研究に携わられてきた藤原准教授だからこそ多角的な視点と素早さで実験結果を考察し、瞬時に次の検討事項を判断される姿を見た、スピード感をもって研究に取り組む重要性を学びました。実際に毎日の実験で生まれた疑問をなるべく早く解決するよう努めた結果、研究の進展に繋がったと思います。また、些細な疑問を藤原准教授に投げかけると、毎度私の想像以上に深く広い視野で議論をしてくださいました。そのような議論から貴重な知識を得ることができました。プレゼンテーション作成や書類の執筆の際には、聴衆や読者の属性を意識した上で聴衆を惹きつけるプレゼンや研究の重要性を伝える効果的な文章構成を、自分自身をアピールすることが苦手な私にも根気強く教えてくださいました。まだその力は不十分ですが、少しずつその感覚が身についてきたと感じています。また、常に学生の性格や考え方に対する接し方で指導されている姿から教育者としての姿勢も学びました。藤原先生からご指導いただいたこと、そして学んだことはここには書ききれませんが、全てが今後の研究生活の糧となると思います。この場をお借りして、心より感謝申し上げます。

研究室の責任者として自由に研究ができる環境を整えてくださり、研究についてのご指導を賜りました慶應義塾大理工学部生命情報学科土居信英教授に深く御礼申し上げます。私自身の研究はボトムアップ合成生物学の立場から人工細胞という”生命”ではないものを扱うからこそ、実験系を”創る”ことや手段を問わず現象を”制御する”という工学的な思考に無意識に陥っていることが多々ありました。その中で、土居教授からは実際の細胞における現象の解釈や個々の分子の振る舞いや相互作用の変化など生物学の視点からの助言を多くいただいたことで、生命現象を理解したいという自身の原点に立ち返り、研究に取り組むことができました。土居教授からは常に感情に左右されない安定した精神力をもつことの重要性を学びました。土居教授は学生のネガティブな実験結果を見ても落胆するのではなく、実験結果から適切に事実だけを見極めており、科学者として真実を追求することにつながるのだと感じました。この場をお借りし、深く感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、各専門分野の観点からご教示を賜りました、慶應義塾大理工学部生命情報学科の加納英明教授、堀田耕司准教授、同大学理工学部応用化学科の朝倉浩一教授に深く感謝申し上げます。

共同研究者として本研究には欠かせない理論解析をしてくださっただけでなく、理論の視点から反応拡散系についてご教示いただきました、公立はこだて未来大学システム情報科学部複雑系知能学科の義永那津人教授に深く御礼申し上げます。私が研究を始めた当初から数多くの議論をしてくださり、自分が扱う Min 波について分子メカニズム的視点だけではなく、理論的視点からの理解を深めることができました。また、議論の際には実験と理論の対応を深くかつ理論家の視点から考察される過程を見し、反応拡散系の理論的解釈の多くを学ぶことができました。この場をお借りし、深く感謝申し上げます。

本研究の土台を構築され、実験手法や関連知識についてご教示くださいました、東京大学大学院理学研究科物理学専攻物理学科助教の光山隼史博士に深く御礼申し上げます。所属研究室の先輩である光山博士は、在学中に Min 波の人工細胞内再構成系を構築されました。私の研究はこの実験系に残された謎に端を発したものであり、光山博士による素晴らしい研究がなければ行うことはできませんでした。私の研究生活はコロナ禍と共に始まりたため、最初の 3 ヶ月間は自宅学習でした。その中で、研究の知識も進め方も何も知らない私に対し、オンラインで Min 波の知識や論文の読み方を教えてくださいました。さらには、プロトコルの作り方や研究計画、自宅でも進められる解析などの指針も立ててくださいましたことは、研究をする上での礎となっています。心より感謝申し上げます。

共同研究者として本研究の遂行に欠かせない実験の場を提供してくださっただけでなく、ソフトマター物理の視点から人工細胞系についてご教示いただきました、東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻相関基礎科学系の柳澤実穂准教授に深く御礼申し上げます。柳澤准教授は、必要な時にはいつも快く実験の場を貸してくださいました。また、自身の研究について物理学の視点から多くのご助言をいただきました。この場をお借りし、深く感謝申し上げます。また、同大学大学院総合文化研究科先進科学研究機構特任助教の本田玄博士には、Min 波の人工細胞系の今後の展開に欠かせない実験系を構築していただきました。同じく柳澤研究室の金久保有希さんには、拡散速度の測定について教えていただきました。また、同学年の理系学生として研究内容や進路について語ったことは心に残っています。この場をお借りし、心より感謝申し上げます。

本研究の土台となる実験系についてその謎を解明する重要な発見をされただけでなく、実験手法を一からご教示くださいました、所属研究室の先輩の西川早紀さんに深く御礼申し上げます。西川さんは Min 波という同じ実験系を扱う先輩として、実験に関して何も分からぬ状態の私に、一から丁寧に実験手法や研究の知識を教えてくださいました。当初はコロナ禍で、西川さん自身が実験できる時間も限られる中、優しくかつ分かりやすく、そして必要な注意点は漏らさずに手技を教えてくださったことは感謝してもしきれません。本当にありがとうございました。

所属研究室のメンバーからは多くのことを学びました。所属研究室の先輩の濱野理さんは生命科学以外にもあらゆる分野に造詣が深く、研究室の皆から尊敬される存在でした。濱野さんからは、些細なことでも徹底的に検証することの大しさや、現状を改善するため

に新しい実験系に取り組むことの大切さを学びました。同研究室の佐藤岳博士からは、博士課程の先輩として多くのことを学びました。研究に関しては、研究のゴールを明確に設定し、そこに向けた実験計画を細かく定め丁寧に検証する重要性を学びました。後輩の指導に関しては、佐藤博士は研究の背景知識や実験手法を分かりやすくユーモアを交えて指導される姿が印象的でした。さらに、後輩の研究テーマの設定や研究計画にも尽力されており、自身の実験系を発展させるための幅広い知識と発想力をもつことの大切さを学びました。研究室での日常生活では研究の話から他愛もない会話までしてくださり、とても嬉しかったです。本当にありがとうございました。同研究室の先輩の松井ゆきのさんからは、研究の進展に必要な新しい実験系に取り組むバイタリティーと、実験結果を懐疑的な視点で見つめ、あらゆる可能性を検討することの重要性を学びました。同研究室の後輩の寺家琴音さんからは、根気強く確実に検証を進める大切さを学びました。寺家さんは不足している共通試薬の調製などを進んでしてくださっており、心地よい研究室運営に欠かせない存在でした。そして、私の唯一の直属の後輩になってくれたのは大里美緒さんでした。大里さんの研究は私と同じ Min 波の人工細胞系を扱う一方で、所属研究室ではこれまでに扱ったことのない材料を主軸としていました。試行錯誤が多い中であまり役に立つ指導はできませんでしたが、これまでに得た知識の応用の仕方や、研究を客観的に眺めるとの大切さを学んだと共に、大里さん自身が「面白そう」と感じて研究に取り組む姿を見て、研究を楽しむという原点を思い出しました。お世話になった皆様に、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

研究に取り組む中で、心の支えになったのは幼少期から続いている音楽活動です。その中で、小学 5 年生の時からピアノのご指導を賜っております齊藤季子先生に、深く御礼申し上げます。中・高・大学生時代は勉強や部活動に、現在は研究に疲れた状態でレッスンに伺っても、その疲れを忘れるほど齊藤先生のレッスンは楽しく刺激的で、レッスン後は必ず「レッスンに行ってよかった」と思うことができました。この充実した時間があったからこそ、研究に打ち込むことができました。また、齊藤先生は常に音楽の楽しさをどのように伝えられるか、どのようにしたら生徒が楽しく演奏できるか考え、新たな指導方法を次々と開拓していました。そのような生徒の上達を第一に考え、先生自身も新しいことにチャレンジされる姿勢は、教育者の鑑だと思います。齊藤先生から学んだことを今後研究者として活かしてまいります。この場をお借りし、深く感謝申し上げます。

ピアノ演奏者の多くはソロで演奏しますが、室内楽サークルに所属していた私は他の楽器の演奏者とアンサンブルをする機会に恵まれました。これまで一緒に演奏をしてくださった方々に感謝申し上げます。サークルで知り合った方は皆、音楽以外の世界で輝ける場所をお持ちで、忙しい中でも精一杯音楽を楽しむ姿勢を尊敬しています。特に、サークル活動の中で知り合った河野麗さんには、プライベートでも非常にお世話になりました。理系学生という共通点をもつ河野さんとは研究の大変さを共有するとともに、彼女のタフさにいつも刺激を受けていました。この場をお借りし、心より感謝申し上げます。

最後に、今まで支えてくださった家族に深く感謝いたします。幼少期からの記憶を辿ってもこれといって叱られた覚えもなく、両親は常にやりたいことを好きなようにさせてくれました。その中で、勉強する習慣とピアノという一つのことに長く取り組み追求する姿勢を身につけられたのは、自ら進んで勉強や練習に取り組めるような環境を整えてくれたからだと思います。研究においても、先人が明らかにしてきた膨大な知識を学習すると同時に、常に更新され、そして新たに生み出されていく知識も習得する必要があります。自発的に勉強をする姿勢は、研究においても大いに役に立ったと思います。また、研究は自らの専門を誰よりも深く掘り下げ、追求する必要があります。ピアノに長く取り組んだ我慢強さは、研究においても一つの現象に真摯に向き合うことにつながりました。長く単身赴任をしていた父は、私がやりたいことを不自由なくできる生活をつくり上げてくれました。私が落ち込んでいる時でも普段と変わらずおおらかに接してくれたからこそ、家庭で心地よく過ごせました。また、母は常に私を最優先に考えて生活スタイルを合わせてくれました。私が何の心配事もなく研究に取り組めたのは、母のサポートのおかげです。このように家族が自主性を重んじて育てくれたからこそ、自分が興味をもつ研究に取り組むことができました。今後、家族やこれまでお世話になった方に恩返しができるよう、自分にできることを常に考え努力し続けたいと思います。本当にありがとうございました。

2025年1月
高田 咲良

付録 研究業績

主論文に関する原著論文

- [1] Sakura Takada, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi & Kei Fujiwara, Mode selection mechanism in traveling and standing waves revealed by Min wave reconstituted in artificial cells. *Science Advances* **8**, eabm8460 (2022).
- [2] Sakura Takada, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi & Kei Fujiwara, Controlling the periodicity of a reaction-diffusion wave in artificial cells by a two-way energy supplier. *ACS Nano* **16**, 16853–16861 (2022).

他の論文

- [1] Saki Nishikawa, Gaku Sato, Sakura Takada, Shunshi Kohyama, Gen Honda, Miho Yanagisawa, Yutaka Hori, Nobuhide Doi, Natsuhiko Yoshinaga & Kei Fujiwara, Multimolecular competition effect as a modulator of protein localization and biochemical networks in cell-size space. *Advanced Science* **11**, 2308030 (2024).
- [2] Sakura Takada & Kei Fujiwara, Artificial cell system as a tool for investigating pattern formation mechanisms of intracellular reaction-diffusion waves. *Biophysics and Physicobiology*, e210022 (2024).

国際会議発表

- [1] Sakura Takada, Turing pattern constructed in artificial cells, STATPHYS28 Satellite Meeting: Statistical Physics and Information Processing in Living Systems, Komaba-campus, The University of Tokyo, Japan, 2023 年 8 月 4 日ポスター発表済.
- [2] Sakura Takada, Shunshi Kohyama, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi, Kei Fujiwara, Mechanism of scaling behavior of an intracellular reaction-diffusion wave in cell-size space, 21st IUPAB Congress 2024, Kyoto International Conference Center, Japan, 2024 年 6 月 25 日ポスター発表済.
- [3] Sakura Takada, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi, Kei Fujiwara, Creation of Turing patterns in artificial cells using engineered reaction-diffusion networks, 1st International SynBYSS Conference, University of Hawai‘i at Mānoa, Honolulu, U.S.A., 2024 年 12 月 10 日ポスター発表済.

国内学会発表

- [1] 高田咲良, 光山隼史, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 反応拡散共役により現れる Min 波の示す空間サイズ相似性, 第 19 回関東ソフトマター研究会, オンライン, 2020 年 11 月 21 日ポスター発表済.

- [2] 高田咲良, 光山隼史, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 細胞内時空間パターンを制御する Min 波が示す空間サイズ相似性, 第 43 回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020 年 12 月 2 日ポスター発表済.
- [3] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, Min 波の極間振動の人工細胞内再構成, 第 17 回 21 世紀大腸菌研究会, オンライン, 2021 年 8 月 20 日口頭発表済.
- [4] 高田咲良, 光山隼史, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 細胞サイズ空間において反応拡散波が示す形状安定性の原理, 第 20 回関東ソフトマター研究会, オンライン, 2021 年 11 月 2 日口頭発表済.
- [5] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 人工細胞内の時空間パターンを操る:極間振動波と移動波の制御, 第 5 回分子ロボティクス年次大会, オンライン, 2021 年 11 月 6–7 日ポスターセレクション口頭発表およびポスター発表済.
- [6] Sakura Takada, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi, Kei Fujiwara, Robustness and plasticity of spatiotemporal patterning by a reaction-diffusion wave entrapped in protocells, 第 59 回日本生物物理学会年会, オンライン, 2021 年 11 月 26 日一般口頭発表済.
- [7] 高田咲良, 光山隼史, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 細胞内時空間パターンを司る Min 波が示す空間サイズの制御とその原理, 第 44 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2021 年 12 月 1 日ポスター発表済.
- [8] Sakura Takada, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi, Kei Fujiwara, Shaping dynamic and static patterns in artificial cells by modulating reaction-diffusion coupling of Min system, Active Matter Workshop 2022, オンライン, 2022 年 1 月 29 日口頭発表済.
- [9] 高田咲良, 佐藤岳, 土居信英, 藤原慶, 再構成研究:Min 波や解糖系は dATP でも動く, 第 18 回 21 世紀大腸菌研究会, CiC 富山ステーションフロント, 富山, 2022 年 6 月 27 日口頭発表済.
- [10] Sakura Takada, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi, Kei Fujiwara, Tuning dynamics and period of a reaction-diffusion wave for cell division in artificial cells, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館アリーナ, 函館, 2022 年 9 月 29 日ポスター発表済.
- [11] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 人工細胞の中でチューリングパターンを創る, 「細胞を創る」研究会 15.0, 東工大蔵前会館, 東京, 2022 年 10 月 17 日ポスターセレクション口頭発表済および 17–18 日ポスター発表済.
- [12] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 茂木文夫, 藤原慶, 人工細胞の中に静的なパターンを創る:Min 系と PAR 系, 第 17 回無細胞生命科学研究会, 下呂交流会館, 下呂, 2022

年 11 月 17 日口頭発表済.

- [13] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 細胞サイズの空間でチューリングパターンを創る, 「定量生物学の会」第十回年会, 広島大学東広島キャンパス学士会館, 東広島, 2022 年 12 月 15–16 日ポスター発表済.
- [14] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 細胞サイズ空間に創られたチューリングパターン, 新学術領域研究「情報物理学でひととく生命の秩序と設計原理」 第 6 回領域会議, アクロス福岡 国際会議場, 福岡, 2023 年 3 月 6 日ポスター発表済.
- [15] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, タンパク質工学により創られた人工細胞内チューリングパターン, 第 23 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 名古屋, 2023 年 7 月 6 日招待講演およびポスター発表済.
- [16] 高田咲良, 反応拡散波による人工細胞の時空間秩序制御, 学術変革領域研究(A)「生物を凌駕する無細胞分子システムのボトムアップ構築学」2023 年度領域会議, 高野山大学 松下講堂黎明館, 和歌山, 2023 年 9 月 22 日ポスター発表済.
- [17] 高田咲良, 反応拡散波による人工細胞内の時空間秩序制御, 第 12 回分子モーター討論会, 東北大学 青葉山キャンパス サイエンスキャンパスホール, 仙台, 2023 年 9 月 28 日招待講演済.
- [18] Sakura Takada, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi, Kei Fujiwara, Creation of Turing pattern in artificial cells by PAR system-like mutual inhibition network, 第 61 回日本生物物理学年会, 名古屋国際会議場, 名古屋, 2023 年 11 月 14 日若手招待講演およびポスター発表済.
- [19] 高田咲良, 藤原慶, エネルギーによる動きと形:人工細胞系に創る反応拡散共役パターン, 第 46 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアホテル, 神戸, 2023 年 12 月 6 日招待講演済.
- [20] 高田咲良, 人工細胞系により理解する細胞分裂を制御する反応拡散波の制御原理, 学術変革(B) SPEED 第 24 回 Journal Club, オンライン, 2024 年 1 月 26 日招待講演済.
- [21] 高田咲良, 光山隼史, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 細胞内反応拡散波は空間サイズによりスケールする, 新学術領域研究「情報物理学でひととく生命の秩序と設計原理」終了報告会・第 8 回領域会議, 東京大学本郷キャンパス内 鉄門記念講堂, 東京, 2024 年 3 月 4–5 日ポスター発表済.
- [22] 高田咲良, 義永那津人, 土居信英, 藤原慶, 人工細胞内反応拡散波を創る・動かす・制御する, 第 7 回分子ロボティクス年次大会, 東京大学駒場キャンパス I 21 KOMCEE EAST, 東京, 2024 年 3 月 13 日口頭発表済.

- [23] 高田咲良, 光山隼史, 土居信英, 義永那津人, 藤原慶, 反応拡散波はなぜ細胞内座標の決定に利用されているのか?, 「細胞を創る」研究会 17.0, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館, 吹田, 2024 年 11 月 11–12 日ポスターセレクション口頭発表およびポスター発表済.

受賞歴

- [1] 高田咲良, 慶應工学会賞, 慶應工学会理事長 北城恪太郎, 2021 年 3 月 10 日受賞.
- [2] 高田咲良, 口頭発表部門 優秀発表賞, 21 世紀大腸菌研究会, Min 波の極間振動の人工細胞内再構成 (第 17 回 21 世紀大腸菌研究会), 2021 年 8 月 20 日受賞.
- [3] 高田咲良, 若手研究奨励賞, 計測自動制御学会システム・情報部門 知能分子ロボティクス調査研究会 主査 東俊一, 人工細胞内の時空間パターン操る: 極間振動波と移動波の制御 (第 5 回分子ロボティクス年次大会), 2021 年 11 月 7 日受賞.
- [4] 高田咲良, 第 6 回日本生物物理学会学生発表賞, 日本生物物理学会会長 野地博行, Robustness and plasticity of spatiotemporal patterning by a reaction-diffusion wave entrapped in protocells (第 59 回日本生物物理学会年会), 2021 年 11 月 27 日受賞.
- [5] 高田咲良, 口頭発表部門 発表優秀賞, 21 世紀大腸菌研究会, 再構成研究: Min 波や解糖系は dATP でも動く (第 18 回 21 世紀大腸菌研究会), 2022 年 6 月 28 日受賞.
- [6] 高田咲良, IUPAB student award, 日本生物物理学会会長 野地博行, Tuning dynamics and period of a reaction-diffusion wave for cell division in artificial cells (第 60 回日本生物物理学年会), 2022 年 9 月 29 日受賞.
- [7] 高田咲良, 第 3 回領域研究賞, 新学術領域研究「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」, エネルギー供給源の多様化による細胞サイズ空間で生じる反応拡散波の周期制御, 2023 年 3 月 7 日受賞.
- [8] 高田咲良, 第 6 回領域会議 発表賞, 新学術領域研究「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」, 細胞サイズ空間に創られたチューリングパターン (新学術領域研究「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」 第 6 回領域会議), 2023 年 3 月 7 日受賞.
- [9] 高田咲良, 米沢富美子賞, 慶應義塾大学大学院理工学研究科委員長 斎木敏治, 2023 年 3 月 28 日受賞
- [10] 高田咲良, 2023 年度日本蛋白質科学会若手奨励賞優秀賞, 日本蛋白質科学会, タンパク質工学により創られた人工細胞内チューリングパターン (第 23 回日本蛋白質科学会年

会), 2023 年 7 月 7 日受賞.

- [11] 高田咲良, IUPAB student award, 日本生物物理学会会長 高橋聰, Creation of Turing pattern in artificial cells by PAR system-like mutual inhibition network (第 61 回日本生物物理学会年会), 2023 年 11 月 15 日受賞.
- [12] 高田咲良, 第十九回日本生物物理学会若手奨励賞, 日本生物物理学会会長 高橋聰, Creation of Turing pattern in artificial cells by PAR system-like mutual inhibition network (第 61 回日本生物物理学会年会), 2023 年 11 月 15 日受賞.
- [13] 高田咲良, 第 8 回領域会議 発表賞, 新学術領域研究「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」, 細胞内反応拡散波は空間サイズによりスケールする (新学術領域研究「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」第 8 回領域会議), 2024 年 3 月 5 日受賞.
- [14] 高田咲良, 学生プレゼンテーション賞, 第 7 回分子ロボティクス年次大会 大会実行委員長 豊田太郎, 人工細胞内反応拡散波を創る・動かす・制御する (第 7 回分子ロボティクス年次大会), 2024 年 3 月 14 日受賞.
- [15] Sakura Takada, IUPAB2024 Student and Early Career Researcher Poster Award, Hiroyuki Noji The Chair of the Organizing Committee of IUPAB2024, Mechanism of scaling behavior of an intracellular reaction-diffusion wave in cell-size space (21st IUPAB Congress 2024), 2024 年 6 月 28 日受賞.
- [16] Sakura Takada, Poster award, SynBYSS, Creation of Turing patterns in artificial cells using engineered reaction-diffusion networks (1st International SynBYSS Conference), 2024 年 12 月 11 日受賞.

その他（著作物）

- [1] 高田咲良, タンパク質の反応拡散波 (Min 波) を人工細胞内で発生させる手法, 蛋白質科学会アーカイブ **16**, e113 (2023).