

科学研究費助成事業「新学術領域研究（研究領域提案型）」 研究概要  
〔令和5年度事後評価用〕

令和5年6月30日現在

機関番号：14401

領域設定期間：2018年6月29日～2023年3月31日

領域番号：8007

研究領域名（和文）シンギュラリティ生物学

研究領域名（英文）Singularity Biology

領域代表者

永井 健治 (NAGAI Takeharu)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：20311350

交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,216,140,000円

研究成果の概要

本領域では、バイオイメージング・タンパク質工学・生物物理学・システム生物学・バイオインフォマティクス・細胞生物学・神経科学・免疫学・薬理学・数理科学など、多分野にわたる研究者が集結し、稀な細胞（シンギュラリティ細胞）が特異点（シンギュラリティ）となり多細胞システム全体に爆発的で不連続な変化（シンギュラリティ現象と定義）を如何にして引き起こすのかを解明するために、スケール横断的イメージングシステム AMATERAS の開発を軸としてその現象観察と解析の方法論を提唱してきた。領域活動においては、公募班を中心として様々な生物種や生命現象におけるシンギュラリティ細胞やシンギュラリティ現象の可能性を提案し研究を進めたことで、当初想像もしなかった発見を含む非常に質の高い成果を数多く発信した。さらには共同研究を通じて、分野をまたいだ研究者間の人的ネットワークが数多く形成された。本領域を通して、学問分野としてのシンギュラリティ生物学が全世界へ周知され、他の学術領域へも大きな影響を与える成果がもたらされた。

研究分野：生物物理学、ケミカルバイオロジー

キーワード：シンギュラリティ現象、AMATERAS

1. 研究開始当初の背景

ビッグバンのように「無から有が創出される現象」や、人工知能がヒトの知能を凌駕する現象は、システム全体が劇的に変化する事例の典型であり、これらは時空特異点や技術的特異点などのシンギュラリティによって引き起こされると考えられている。生命システムにおいても、有機スープからの生命誕生や進化、感染爆発のように、システム全体の挙動が不連続かつ劇的に変化する例が多数知られており、これらも極めて稀にしか起こらない少数要素のイベントがシンギュラリティとなり、多要素システム全体の働きに不連続な変化をもたらす可能性が示唆されている。しかしながらその詳細はほとんど明らかにされていなかった。生命システムにおいてシンギュラリティとなりうる細胞（シンギュラリティ細胞と定義）にアプローチするためには、稀にしか見いだされない細胞やイベントを見逃さない、超広視野と高解像度、高速と長時間撮影を両立したイメージングプラットフォームと対応する情報解析手法を構築し、シンギュラリティ細胞が生成される作用機序、ならびにそれが果たす生物学的な役割を解明する新しい学術の開拓が必要になっていた（図1）。

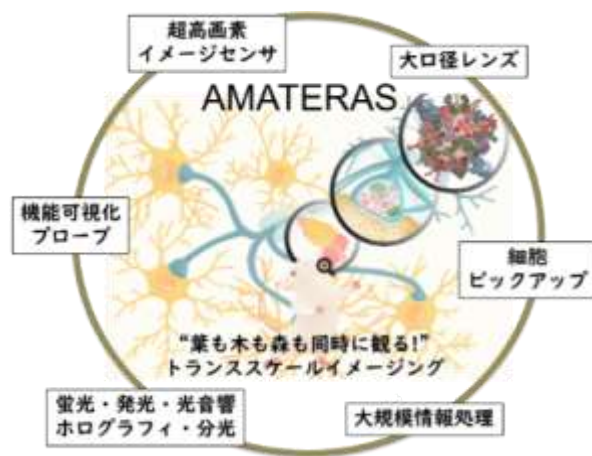


図1. 「同一標本の」シンギュラリティ現象をマルチモーダル・スケールで観察・操作・解析する概念

## 2. 研究の目的

本領域ではシングュラリティ細胞がどのように生起し、如何にしてシングュラリティ現象を引き起こすのかを解明する方法論を確立することを目的とした。さらに、様々な生物種や生命現象におけるシングュラリティ細胞やシングュラリティ現象を新たに同定し、生命におけるその普遍性を示すことで、シングュラリティ生物学の創生を目指した。

本領域で確立する方法論の本質は、マイクロからマクロまでを同一標本上で「分断なく」「動態解析」すること、つまり cm サイズの視野を細胞粒度で高精細に解析することであった。これは、従来の「マイクロとマクロ」をつなぐとされる多くの研究が、分子/細胞/細胞集団それぞれの階層での独立したものであることとは一線を画す。さらに、しばしば時間的な分断も伴う従来研究に対して、本研究では、シングュラリティ細胞を中心に、そのマイクロな生起機構を分子階層にまたがって解析すると同時に、シングュラリティ細胞がマクロシステム全体 ( $10^4 \sim 10^8$  細胞からなる組織・臓器や全個体) にシングュラリティ現象をもたらす過程を全空間・全時間的に計測・解析することで、真の意味において階層間を連続的につなぐ研究を推進した。

## 3. 研究の方法

本領域では以下の3項目を設定した。

- A01 シングュラリティ細胞の計測・操作技術の開発
- A02 シングュラリティ現象を解析するための技術開発
- A03 シングュラリティ現象の生物学的意義の解明

具体的には、コア技術として以下の開発を行う。

- シングュラリティ細胞を捉えるための各種機能プローブと計測・操作技術
- 組織・臓器・個体を全細胞計測するための技術の応用と標準化
- 1細胞レベルで、たくさんの細胞の特徴を DNA/RNA の配列や発現量で同定する技術
- シングュラリティ細胞を同定するためのイメージ・インフォマティクス技術
- 大量の1細胞定量データから特徴データを発掘するデータマイニングと効率的な情報探索などの先端的な情報技術

さらに、これらを有機的に統合させたアプローチで、脳・発生・がん・免疫などをモデルに、以下を実施する。

- シングュラリティ細胞がシングュラリティ現象をもたらす原理の解明
- シングュラリティ細胞を生み出す分子機構の解明

「分子～細胞～臓器(全身)」をスケール横断的に計測・可視化できるイメージングシステム AMATERAS (Aspired Multimodal Analytical Tools for Every Rare Activities in Singularity) を開発するために総括班内にコアチームを編成した。さらに、シングュラリティ細胞の分取・解析を可能にする計測・解析統合デバイスの開発も総括班と計画班の連携により進めた。この AMATERAS を中心にそれぞれの研究項目の力を集結させて有機的・相乗的な連携研究を押し進めることをコアチームの運営戦略の柱とした。つまり、A01 班が、多くの細胞を長時間に渡って、複数の特徴量について計測するための要素技術を開発し、AMATERAS を随時進化させるとともに、得られた膨大なデータをもとに、シングュラリティ細胞を同定する革新的方法を開発することを A02 班が担当した。A03 班が、AMATERAS を駆使し脳や発生、免疫を含むさまざまなモデル生命現象において、シングュラリティ細胞の存在を実証し、その生物学的意義を示す研究を進めた。解析規模の単純な拡大や時間の延長に留まらず、分子、時間、空間という3つの観点からこれらを有機的に連動させ、「マイクロからマクロをシームレスにつなぐ」真のトランススケール解析でしか理解し得ないシングュラリティ生物学研究を展開した(図2)。

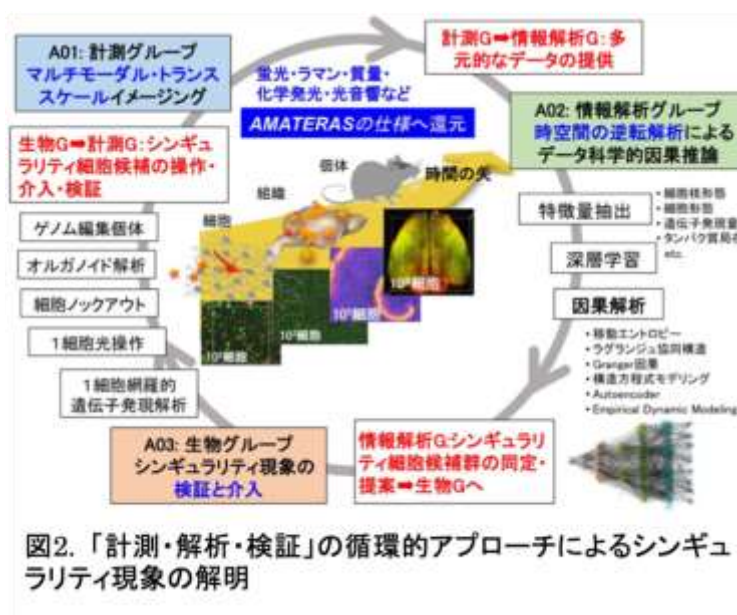
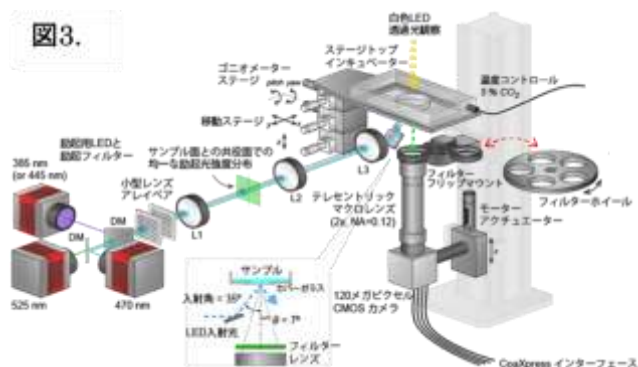


図2. 「計測・解析・検証」の循環的アプローチによるシングュラリティ現象の解明

## 4. 研究の成果

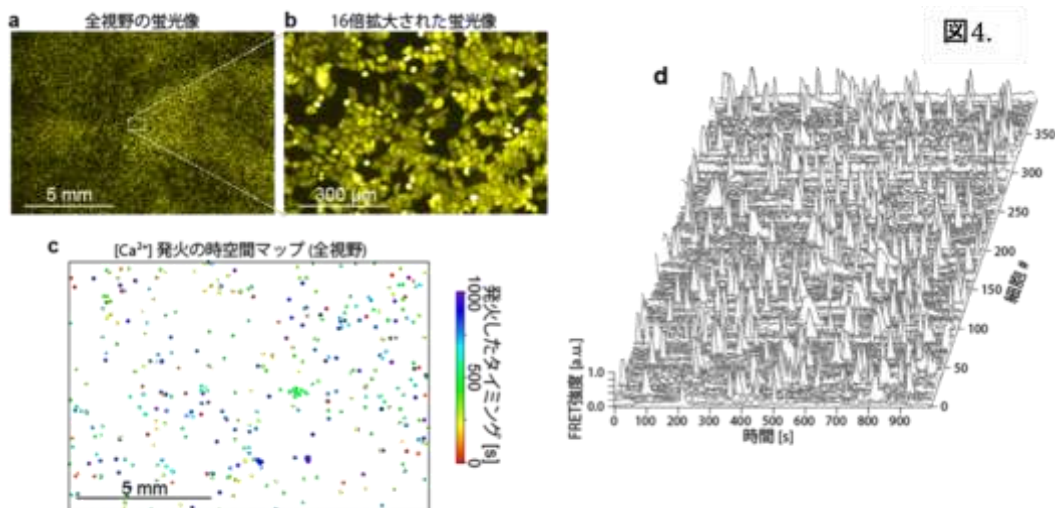
### 4-1. AMATERAS の開発

AMATERAS の開発は総括班を中心として行い、A01 計画班、技術支援班、大阪大学先導的学際研究機構超次元ライブイメージング部門と共同で行った。性能目標としては、センチメートルを超える視野中の 100 万個以上の真核細胞を瞬時に撮像し、全ての細胞の動態を観察できる仕様とした。そのため、生物顕微鏡で用いられるカメラとレンズではなく、マシンビジョン用の 1.2 億画素 CMOS センサー及び倍率 2 倍のテレセントリックマクロレンズを組み合わせた。開発した AMATERAS は細胞粒度で観察できるイメージング装置としては世界最大の視野 1.46x1.01 cm<sup>2</sup> を有する。空間分解能は約 2 μm で、サブ秒のワンショットカメラ露光によって 10 万から 100 万にものぼる数の細胞の観察を実現した(論文番号 5)。また、AMATERAS は 3 色の高輝度 LED を備え、試料を斜め下より照射することで背景光の少ない蛍光観察を可能にした(図 3)。



AMATERAS を用いて稀少な細胞を検出できることを実証するために、遺伝子にコードされた蛍光カルシウム指示薬である Yellow Cameleon 3.60 (YC3.60) が発現する 12 万の HeLa 細胞をガラス基板上で培養し、タイムラプス観察した。この結果、自発的興奮能がないとされている HeLa 細胞にもかかわらず、0.33 %の細胞が自発的に発火を起こすことが観察された(図 4)。

この他にも、細胞性粘菌の細胞が集合して、多細胞体を形成する過程の経時観察を実施し、



その中で特殊な振る舞いをする 0.2 %程度しか存在しない稀少細胞が多細胞体形成を誘導するメカニズムについても論文として発表した(論文番号 4)。

AMATERAS はより高画素なイメージセンサー、共焦点光学系などを備えた 2 号機、さらにはロボットアームを備えサンプル培養から観察までを全自動で行う機能を有する 3 号機と、その目的に合わせて改良を続けている。シンギュラリティ細胞の解析には、AMATERAS による観察と併せて細胞の正確な分取が重要であり、A01 城口計画班が中心となり細胞分取ロボット「ALPS (Automated Live-imaging and cell Picking System)」を開発した(論文番号 10)。ALPS は、画像取得・細胞分取・アーム移動・吐出など一連の工程を自動化することで、それに基づく細胞の選択・単一細胞の分取を、多数の細胞を対象に自動で繰り返して実施することが可能となった(技術開発支援班との共同で特願済)。

#### 4-2. 各研究者による成果

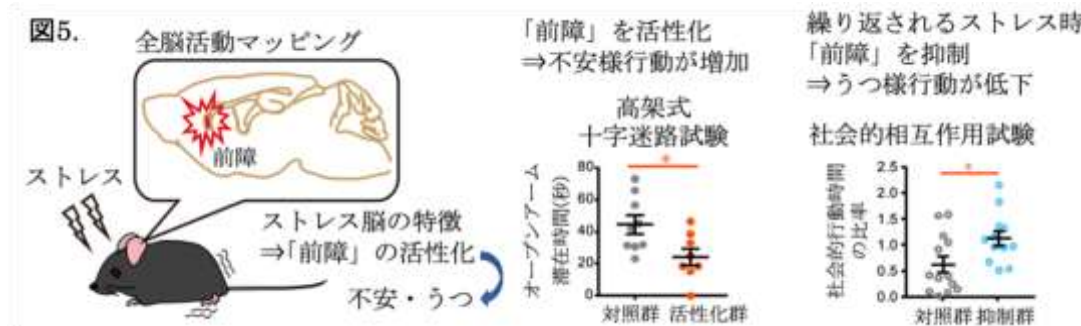
A01、A02、A03 各計画班および公募班がそれぞれの研究分野において、シンギュラリティ現象の解明に繋がる研究を推進し、多くの成果を公表した。また、「学問としてシンギュラリティ生物学を確立する」という本領域の目的を達成するため、領域として積極的に成果を発信し周知を行った。

A01 班ではシンギュラリティ細胞の計測・操作技術の開発を目的とした研究を行い、240 報の論文発表、14 件の特許出願/公開を行った。これら技術の一部については AMATERAS への統合が完了しており、今後、様々なシンギュラリティ現象についてこれらの有用技術を利用できる体制が整っている。A01 永井計画班では、細胞イメージングのための蛍光プローブの素材として、世界最短波長の蛍光を示す蛍光タンパク質 Sumire を開発し、多色イメージングの波長範囲の拡大に貢献した(論文番号 15)。A01 大場公募班は、極少数個のインフルエンザウイルス粒子が細胞集団内で感染拡大する現象をシンギュラリティ現象と捉え、ウイルスの感染・伝播を AMATERAS を用い可視化・操作するための様々な基盤技術を開発した(論文番号 3)。

A02 班ではシンギュラリティ現象を理解するためのデータ解析法の開発と利用基盤、ならびに

理論構築を目的とした研究を行い、領域内共同研究10件を含む84報の論文を発表した。AMATERAS に関する研究では、撮像した画像データより細胞トラッキングを行い、そこから因果関係を推定するための情報解析基盤を構築した。A02-1 大浪計画班は、また AMATERAS1.0 で取得した大規模画像データや、1細胞網羅的遺伝子発現データなどの当領域で取得された多様なデータと、それらの解析/活用のために開発されたソフトウェアを領域内で共有するために、1.0 ペタバイトのストレージシステムを含むデータ共有プラットフォーム SSBD:database, SSBD:repository を構築し、運用を開始した。さらには画像データ形式の標準化と保存のルールを設けることで、全世界の研究者が互いに画像を利用することができる共有体制を構築した(論文番号8)。

A03 班ではシンギュラリティ現象の生物学的意義を解明するため、神経変性・個体発生・神経生理・がん・免疫・ウイルス感染など多岐にわたるモデル現象を対象にした研究を進め、511報の論文を発表した。A03-3 橋本計画班は、活性化した神経細胞が蛍光蛋白質で標識されるレポーターマウスと脳の全ての細胞を観察できる FAST システムを組み合わせる事で、精神的なストレスを受けた直後のマウスの脳全体の神経細胞の活性化を分析し、「前障」という微小な脳領域の活性化が最も特徴的であることを見出した(図5, 論文番号16)。さらに、前障にある特定の細胞集団が、ストレス後の不安様行動やうつ様行動の発現を制御することを解明した。



A03-4 岡崎計画班は、抑制性免疫補助受容体 PD-1 を核とした免疫制御をモデルに、T 細胞の適切な活性化、腫瘍の排除や自己組織の破壊、がん転移などをシンギュラリティ現象と捉え、それらの現象を担う細胞や分子を同定し、その発生条件や機能の一端を解明した(論文番号2, 12)。A03 林公募班は疲れと眠気の関係性に着目し、線虫及びマウスを用いた実験にて、細胞中の小胞体ストレスの蓄積が疲労の指標となり睡眠が誘導されることを明らかにした(論文番号20)。

以上、領域全体として756報の国際論文を発表し(20報を投稿中)、139件の招待・基調講演を行うなど十分な成果を得た。加えて、領域内共同研究についても60件超が進行中であり、共同研究論文29報を発表した。

#### 4-3. 総括班による活動

領域会議、研究会、Zoom 交流会、サイトビジット、国際トレーニングコースなど、シンギュラリティ生物学を深耕・周知するための活動を主催した。

総括班の発足、領域ホームページの立ち上げによって、アライアンス交流支援の場、班員間の情報交換の場を構築し、SNS も有効活用した。またオンライン・サイトビジットを33回、領域会議を計7回、Web 交流会を計39回開催することで、メンバー間での連携を密に取り、領域全体の意思疎通を図るとともに、デザイン思考研究会を計5回開催した。

ニュースレターを計4回発行し、Web セミナーを1回、国際トレーニングコースを1回、「分子夾雑」「生命金属」「シンギュラリティ生物学」の三つの新学術領域での合同勉強会を1回、新学術領域「細胞ダイバース」との合同ワークショップを1回、新学術領域「発動分子科学」との合同勉強会を1回、その他ワークショップを計3回、シンポジウムを計6回、日本生物物理学会年会等での共催シンポジウムを計7回、QST 量子生命科学研究所共催による成果報告シンポジウムを1回開催するとともに、第31回バイオイメージング学会学術集會にて AMATERAS 見学会を開催することで、領域内のみならず、AMATERAS の領域外共用の促進とシンギュラリティ生物学の方法論の周知を図り、また AMATERAS の協働開発・共同研究拠点の形成につとめた。

#### 5. 主な発表論文等(受賞等を含む)

- Liu N, Matsumura H, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T, Asakawa K, Morinaga H, Mohri Y, De Arcangelis A, Geroges-Labouesse E, Nanba D, Nishimura EK.: Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature* 568: 344-350 (2019).
- Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazaki T.: Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science* 364: 558-566 (2019).
- Fujioka Y, Satoh A0, Horiuchi K, Fujioka M, Tsutsumi K, Sasaki J, Nepal P, Kashiwagi S, Paudel S, Nishide S, Nanbo A, Sasaki T, Ohba Y.: A peptide derived from phosphoinositide 3-kinase inhibits endocytosis and influenza virus infection, *Cell Struct Funct* 44: 61-74 (2019).
- Kakizuka T, Hara Y, Ohta Y, Mukai A, Ichiraku A, Arai Y, Ichimura T, Nagai T,

- Horikawa K.: Cellular logics bringing the symmetry breaking in spiral nucleation revealed by trans-scale imaging. *bioRxiv* 176891 (2020).
5. Ichimura T, Kakizuka T, Horikawa K, Seiriki K, Kasai A, Hashimoto H, Fujita K, Watanabe TM, Nagai T.: Exploring rare cellular activity in more than one million cells by a transscale scope. *Sci Rep* 11: 16539 (2021).
  6. Honda M, Oki S, Kimura R, Harada A, Maehara K, Tanaka K, Meno C, Ohkawa Y.: High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nat Commun.* 12: 4416 (2021).
  7. Shibata AC, Ueda HH, Eto K, Onda M, Sato A, Ohba T, Nabekura J, Murakoshi H: Photoactivatable CaMKII induces synaptic plasticity in single synapses. *Nat commun* 12: 751 (2021).
  8. Swedlow J R, Kankaanpää P, Sarkans U, Goscinski W, Galloway G, Malacrida L, Sullivan R P, Härtel S, Brown C M, Wood C, Keppler A, Paina F, Loos B, Zullino S, Longo D L, Aime S, Onami S.: A global view of standards for open image data formats and repositories. *Nat Method* 18: 1440-1446 (2021).
  9. Zhang B, ..., Shioguchi K, ...他 28 名: B cell-derived GABA elicits IL-10+ macrophages to limit anti-tumour immunity. *Nature*,599: 471-476 (2021).
  10. Jin J, Yamamoto R, Takeuchi T, Cui G, Miyauchi E, Hojo N, Ikuta K, Ohno H, Shioguchi K.: High-throughput identification and quantification of single bacterial cells in the microbiota. *Nat Commun* 13: 863 (2022).
  11. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Ikubo J, Yoshikawa H, Naenaka K, Ishimaru N, Kosako H, Takemoto T, Okazaki T.: Binding of LAG-3 to stable peptide-MHCII limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity*, 55: 912-924 (2022).
  12. Sugiura D, Okazaki IM, Maeda TK, Maruhashi T, Shimizu K, Arakaki R, Takemoto T, Ishimaru N, Okazaki T.: PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity. *Nat Immun* 23: 399-410 (2022).
  13. Sattari S, Basak U, James R, Perrin L, Crutchfield J, Komatsuzaki T.: Modes of information flow in collective cohesion. *Sci Adv* 8: 6 (2022).
  14. Orioka M, Eguchi M, Mizui Y, Ikeda Y, Sakama A, Li Q, Yoshimura H, Ozawa T, Citterio D, Hiruta Y.: A Series of Furimazine Derivatives for Sustained Live-cell Bioluminescence Imaging and Application to the Monitoring of Myogenesis at Single-cell Level. *Bioconjug Chem* 33: 496-504 (2022).
  15. Sugiura K, Nagai T.: Extension of the short wavelength side of fluorescent proteins using hydrated chromophores, and its application. *Commun Biol* 5: 1172 (2022).
  16. Niu M, Kasai A, Tanuma M, Seiriki K, Igarashi H, Kuwaki T, Nagayasu K, Miyaji K, Ueno H, Tanabe W, Seo K, Yokoyama R, Ohkubo J, Ago Y, Hayashida M, Inoue KI, Takada M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Kaneko S, Okuno H, Yamanaka A, Hashimoto H.: Claustrium mediates bidirectional and reversible control of stress-induced anxiety responses. *Sci Adv* 8: eabi6375 (2022).
  17. Akter E, Tasaki Y, Mori Y, Nakai K, Hachiya K, Lin H, Konno M, Kamasaki T, Tanabe K, Umeda Y, Yamano S, Fujita Y, Kon S. Non-degradable autophagic vacuoles are indispensable for cell competition. *Cell Rep* 40: 111292 (2022).
  18. Ono D, Wang H, Hung J.C, Wang T.H, Kon N, Yamanaka A, Li Y, Sugiyama T.: Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Sci Adv* 9: 1 (2023).
  19. Nagai Y, Kisaka Y, Nomura K, Nishitani N, Andoh C, Koda M, Kawai H, Seiriki K, Nagayasu K, Kasai A, Shirakawa H, Nakazawa T, Hashimoto H, Kaneko S.: Dorsal raphe serotonergic neurons preferentially reactivate dorsal dentate gyrus cell ensembles associated with positive experience. *Cell Rep* 42: 112149 (2023).
  20. Kawano T, Kashiwagi M, Kanuka M, Chen C K, Yasugaki S, Hatori S, Miyazaki S, Tanaka K, Fujita H, Nakajima T, Yanagisawa M, Nakagawa Y, Hayashi Y.: ER proteostasis regulators cell-non-autonomously control sleep. *Cell Rep* 42: 112267 (2023).

領域ホームページ: <https://singularity-bio.jp>

AMATERAS プロモーションビデオ (YouTube): <https://www.youtube.com/watch?v=af-0ih2Cl-E>