

細胞性粘菌における cAMP 受容体のノイズ処理

立命館大学大学院 生命科学研究科 木本 早紀, 毛利蔵人, 長野正道
Saki Kimoto, Kurato Mohri, Seido Nagano
Graduate School of Life Sciences,
Ritsumeikan University

1. 研究背景・目的

1-1. 走化性

「走化性」とは特定の物質の濃度勾配に対して方向性を持った運動をする現象である。この走化性は生体内で重要な役割を多数担っている。例えば個体発生、シナプス形成、組織再生、免疫反応等が挙げられる。そのため走化性の機構およびその動作原理を解明すれば、近年注目を浴びている再生医療の分野から複雑なシステムを扱うような工学分野にまで幅広く応用できることが期待される。

走化性では受容体ーリガンド相互作用が重要である。細胞表面に多数存在する受容体がりガンドと結合すると、細胞はその結合数の差から周囲のリガンド濃度勾配を感知する。このとき、分子の結合や運動は確率的であることから受容体へのリガンドの結合数はゆらいでおり¹⁾、これがノイズとして働いている。しかし細胞はノイズの存在下でも、時にはノイズがシグナルを上回ることがあっても安定して走化性運動を行うことができる¹⁾²⁾³⁾。すなわちノイズ処理を行うことによって安定した応答を得ている。本研究の目的はこのノイズ処理の機構を解明することである。今回はその前段階として「細胞はどの程度のノイズを処理できるのか」について調べた。

1-2. 細胞性粘菌⁴⁾

本研究では走化性研究のモデル生物として広く用いられている細胞性粘菌の一種 *Dictyostelium discoideum* (以下 *D. discoideum*) を実験生物として採用した。細胞性粘菌は栄養下では単細胞アメーバとして増殖するが、飢餓時には多細胞体を形成する。単細胞状態から多細胞状態へ移行するためには細胞の集合が必要であるが、これを走化性運動によって実現している。個々の細胞は飢餓を感知すると走化性因子である cAMP (cyclic adenosine monophosphate) をパルス状に分泌する。この分泌リズムを細胞間で同期させ、細胞膜に一様に存在する cAMP 受容体で感知し、細胞数の多い方へと走化性運動により集合する。また、細胞性粘菌の集合パターンは Belousov-Zhabotinsky 反応と一致し、非線形現象としても知られている。本研究では、集合期の細胞にノイズを与え、走化性運動への影響を見た。

2. 実験方法・解析方法

2-1. 走化性のノイズ処理実験系

集合期の細胞性粘菌 *D. discoideum* を対象に走化性のノイズ処理実験を行った。集合期の *D. discoideum* は cAMP への走化性を示すが、この際のリガンドは cAMP であり、主に働く受容体は cAR1 であることが知られている。また、対応するシミュレーションモデルも存在する⁵⁾ため、実験と理論の比較も可能である。*D. discoideum* を用いてノイズ処理実験を行うにあたって、次の2点 (a) 細胞がノイズを適切に処理できたかの判断、(b) 再現性のあるノイズの付与、が必要となる。この2点について以下で詳しく説明する。

(a) ノイズを適切に処理できたかの判断

これはスーパーマイクロウェルを用いて細胞の集合を観測することによって可能となった。スーパーマイクロウェルとは図1に示すように、円形のウェルである。今回は直径 320 μ m のウェルに細胞を閉じ込めて観測を行った。スーパーマイクロウェルを用いることによって細胞の移動をある程度制限することが可能である。したがって集合を定点観察でき、集合中心を詳細に見ることができる。また細胞数を固定することも可能となる。ノイズを処理した際には細胞は cAMP パルスを同期させ、集合することになる。

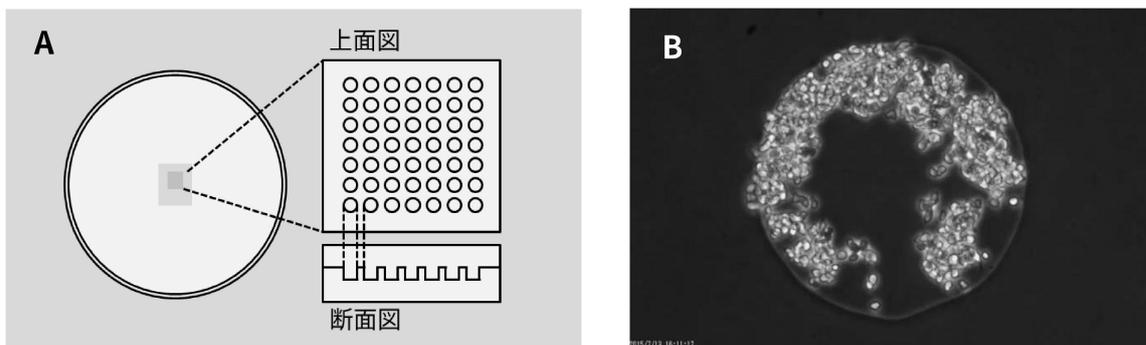


図1. スーパーマイクロウェルの構造

A ガラスシャーレ内の寒天上に構築したスーパーマイクロウェルの構造を表した図。**B** スーパーマイクロウェル内に閉じ込められた細胞。ウェルの直径は約 320 μ m である。

(b) 再現性のあるノイズの付与

これについては cAMP 水溶液中で細胞集合を観測することによって実現した。上記の実験系に cAMP 水溶液を添加し、その cAMP を仮想ノイズとした。細胞は cAMP パルスを同期して細胞間コミュニケーションを可能にしている。しかしこの cAMP と外部から添加した cAMP を区別することはできない。さらに、細胞が分泌する PDE (phosphodiesterase) と呼ばれる細胞外の cAMP を分解する酵素の働きにより、その濃度は時間的・空間的に一定とならない。したがって細胞間相互作用は妨げられることとなり、添加した cAMP はノイズとしての役割を果たす。しかしこのノイズの上限濃度は添加した cAMP 水溶液濃度と等しい。このため再現可能なノイズが実現した。

2-2. 実験方法

D. discoideum AX-2 株を対象に次の実験を行った。ガラスシャーレ内に無栄養寒天を用いてス

ーパーマイクロウェルを構築した。その1つにKK2 bufferで飢餓状態にした細胞を注入した。そこへcAMP水溶液(cAMP+KK2 buffer)を添加して静置、無栄養寒天でスーパーマイクロウェルに蓋をした。ウェルをタイムラプス撮影し、画像解析を行った。

以上の実験を添加するcAMP水溶液の濃度を変えて複数回行った。細胞がノイズを処理できた際には①同期したcAMPパルスが発生し、②細胞が集合する。したがってこの2条件に注目して各濃度での結果をまとめた。

2-3. 解析手法

① cAMPパルスの同期

撮影した画像を用いて光強度の時間変化グラフ(図2)を用いて判断した。cAMPパルスが同期しているときは規則的な波形が、同期していないときは不規則な波形が現れる⁶⁾。

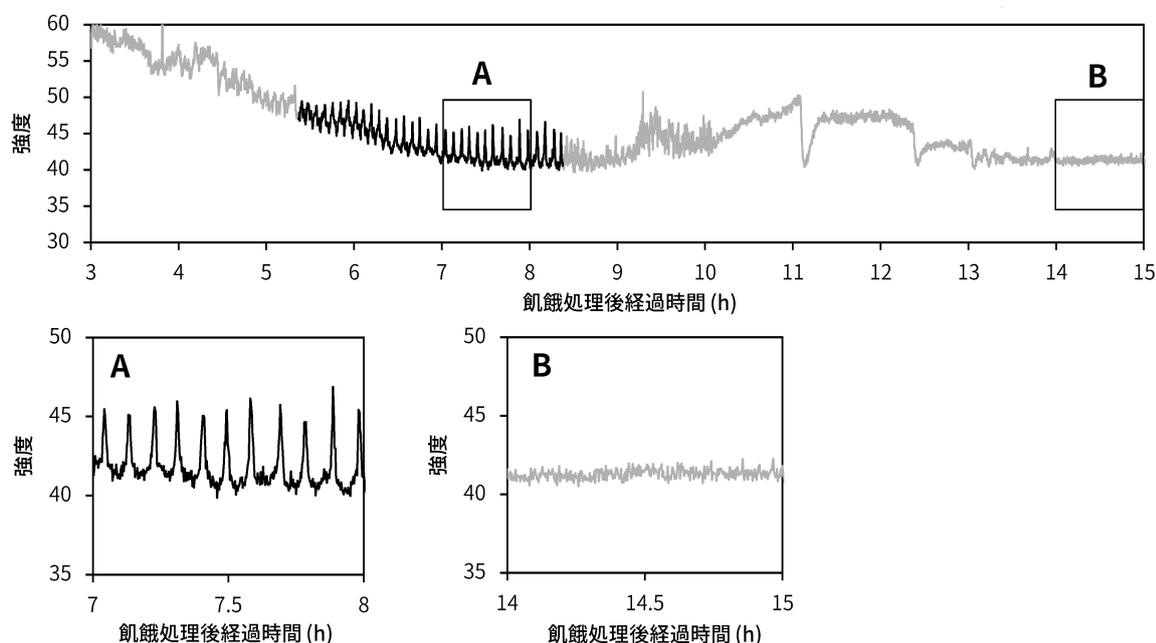


図2. 光強度の時間変化

横軸が飢餓処理後経過時間(h)、縦軸が光強度を表している。(上)黒:cAMPパルスが同期しているとき。グレー:cAMPパルスが同期していないとき。cAMPパルスが同期しているときは規則的な波形となり、フーリエ解析を行うと周期は約6minである。cAMPが同期していないときは不規則な波形となり、フーリエ解析を行っても特徴的な周期は見られない。(下)上図の囲いA、Bを拡大した図。

② 細胞の集合

撮影した画像から動画を作成し、細胞の集合状態を観測した(図3)。

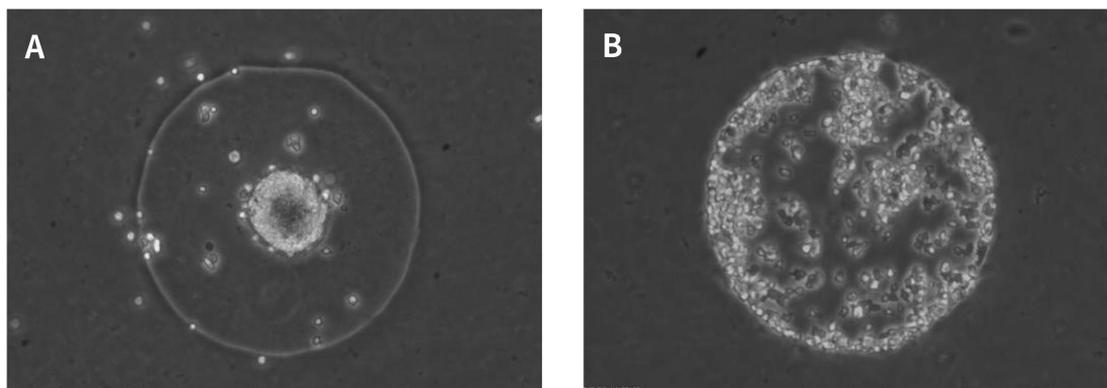


図3. 細胞の集合状態

A 細胞が集合したときの様子. B 細胞が集合しなかったときの様子.

3. 結果・考察

3-1. 同期した cAMP パルスの発生

同期した cAMP パルスの発生について図4にまとめた. ここでは各実験結果を3グループ, A: 連続的・規則的に発生したグループ, B: 不規則に発生したグループ, C: 発生しなかったグループに分類した. 実験により添加する cAMP 水溶液の濃度が高くなるにつれ cAMP パルスが同期する確率が下がることが明らかになった. また, 1.6nM までは cAMP パルスを高確率で同期することができていた.

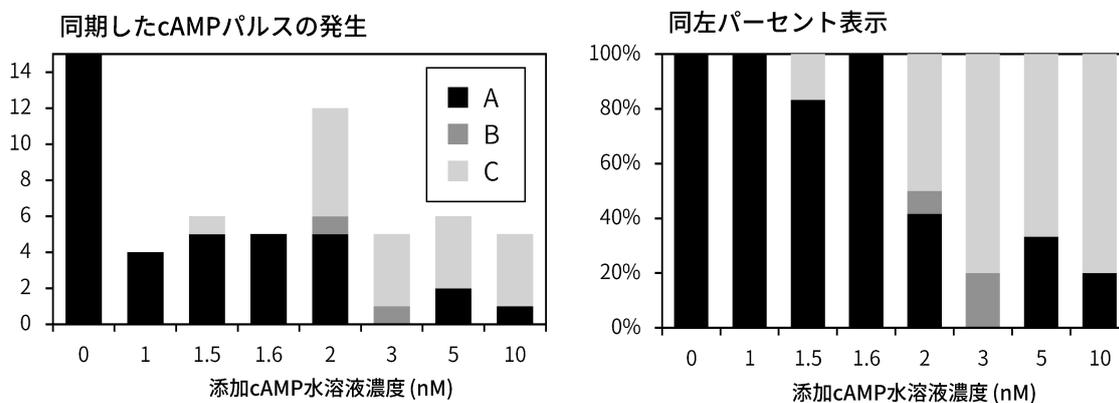


図4. 同期した cAMP パルスの発生

■A 連続的・規則的に発生, ■B 不規則に発生, ■C 発生しなかった. (左) 横軸は添加した cAMP 水溶液濃度 (nM), 縦軸は実験回数を表す. (右) 左図の実験回数をパーセント表示したもの.

3-2. 集合状態

集合状態について図5にまとめた. ここでは各実験結果を3グループ, I: 集合したグループ,

II：部分的に集合した/一度集合したが離散したグループ，III：集合しなかったグループに分類した。結果より添加する cAMP 水溶液の濃度が高くなるにつれ集合する確率が低下することが明らかになった。

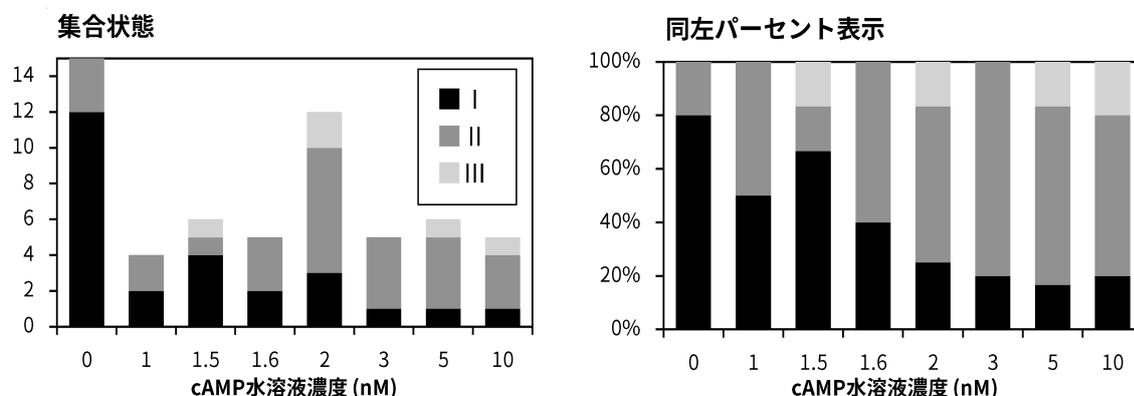


図 5. 集合状態

■ I 集合した，■ II 部分的に集合した/一度集合したが離散したグループ，□ III 集合しなかった。(左) 横軸は添加した cAMP 水溶液濃度 (nM)，縦軸は実験回数を表す。(右) 左図の実験回数をパーセント表示したもの。

3-3. まとめ

細胞外に 1.6nM cAMP 水溶液を添加しても同期した cAMP パルスが発生することが明らかになった。しかし、1.6nM よりも低い濃度でも一度集合した細胞が離散することが多くあった。また全く集合できなかった結果は少なく、集合後に離散する結果が多く見られた。このことから今回与えたノイズは細胞間コミュニケーション、すなわち cAMP パルスの同期に影響していると考えられる。cAMP パルスの同期が維持できず、集合が完成する前に停止、離散したと推察される。

本実験により、添加 cAMP 濃度が 1.6nM 以下のとき細胞はノイズを処理し、cAMP パルスを同期できることが明らかになった。しかし、ノイズ処理可能・不可能の境界については不明瞭であり、1.6nM から 2.0nM の間を詳細に調べる必要がある。また閾値以下の cAMP 水溶液を与えたとき、細胞がどのようにしてノイズを処理しているのか、シミュレーションと比較することでその機構を明らかにすることが今後の課題である。

4. 参考文献

- 1) Masahiro Ueda, Tatsuo Shibata. (2007) "Stochastic signal processing and transduction in chemotactic response of eukaryotic cells". *Biophysical Journal* **93**, 11-20.
- 2) Jose M. Mato, Antonia Losada, Vidyanand Nanjundiah, Theo M. Konijn. (1975) "Signal input for a chemotactic response in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, No. 12, pp. 4991-4993.
- 3) P. J. M. Van Haastert. (1995) "Transduction of the chemotactic cAMP signal across the plasma membrane of *Dictyostelium* cells". *Experientia* **51**, pp 1144-1154.

- 4) 阿部知顕, 前田靖男. (2012) “細胞性粘菌：研究の新展開～モデル生物・創薬資源・バイオ～”. 株式会社アイピーシー.
- 5) Seido Nagano, Shunsuke Sakurai. (2013) “Cell-to-cell coordination for the spontaneous cAMP oscillation in *Dictyostelium*”. PHYSICAL REVIEW E **88**, 062710.
- 6) 上条和. (2013) “スーパーマイクロウェル実験系を用いた細胞性粘菌の cAMP パルスに関する研究”. 修士論文.