

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06675

研究課題名(和文)細胞性粘菌多細胞体の再生過程における位置情報再構成機構の解析

研究課題名(英文) Study for the reestablishment of positional information during regeneration of multicellular bodies of social amoebae.

研究代表者

毛利 蔵人 (Mohri, Kurato)

沖縄科学技術大学院大学・進化神経生物学ユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：70392149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物が失われた部位を再生する際、どのように攪乱された位置情報が再構成されるのかを明らかにすることを目的に、細胞性粘菌の多細胞体を用いて、生体小分子動態のイメージング解析を中心に研究を行った。先行研究から、再生過程で位置情報を構成することが予想された生体内小分子cAMPやCa<sup>2+</sup>について、再生過程における生体内動態を解析した。その結果、当初の予想とは異なり、再生過程においてこれらの小分子が多細胞体内で濃度勾配形成や周期的なパルス発生などを行うことはなく、別の機構が働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞性粘菌の多細胞体が再生する際に、当初予想されたcAMPなどの生体内小分子による濃度勾配や周期的なパルスなどが形成されないことが明らかとなった。この結果から、細胞性粘菌では、これら小分子による濃度勾配形成やそれに対する細胞の応答などが再生の主要な仕組みではなく、接触追従や自己組織化などの別の機構が働くことが示唆された。従来の動物での研究では、本研究の結果とは異なり細胞外分泌因子から入力されるシグナルの勾配が位置情報の再構築に働くと考えられているため、本研究の結果は多細胞生物を通じて再生機構の共通性や特殊性を比較検討するうえで重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：To clarify how disturbed positional information is reconstructed in multicellular organisms during regeneration of lost body parts, we performed imaging analysis for analyzing dynamics of small biomolecules using amputated multicellular bodies of cellular slime molds. We analyzed the in vivo dynamics of cAMP and Ca<sup>2+</sup>, which were predicted to compose positional information during regeneration, by live cell imaging. The results suggest that, contrary to our initial expectation, these small molecules do not form concentration gradients or generate periodic pulses in the multicellular body during the regeneration process. It was suggested that another mechanism works.

研究分野：発生生物学

キーワード：再生 細胞性粘菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物が切除等により失われた体の一部を再び作り直す再生現象は多くの生物で知られているが、果たしてどのように攪乱された位置情報が再構成されるのか、再構成された位置情報にどのように細胞が応答し細胞の再分化や組織の再構成が進行するのかについては不明な点も多い。代表者は、切断しても失われた部位を速やかに再生できるという細胞性粘菌の多細胞体を用いて再生過程の研究を行ってきた。細胞性粘菌を用いることにより、他のモデル生物では困難であった再生過程における標識された細胞のタイムラプストラッキング等の解析が可能となった。この有利な点を生かし研究を行い、代表者はこれまでに多細胞体の切断部位の近傍ですみやかに細胞の分化転換が生じることによって再生が進行することを明らかにした。

一方、細胞性粘菌の多細胞体での位置情報再構成について、詳細な分子機構はほとんど分かっていなかったが、これまでの研究から、細胞性粘菌の多細胞体の形成には、環状アデノシン 1 リン酸 (cAMP) の周期的なパルス形成が必要で、形成された多細胞体でも前後の位置情報の確立や協調的な細胞移動に関与していることが明らかにされていた。また、 $\text{Ca}^{2+}$ 、ポリケチドの一種である differentiation inducing factor 1 (DIF-1) 等の小分子が移動体の位置情報形成や再生に関与していることが示唆されており、これらの小分子が再生時に濃度勾配や周期的なパルスを形成することによって細胞の移動や分化の基準となる位置情報形成に関与することが予想された。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、まず上述の、細胞性粘菌において主要な位置情報構成因子と考えられている小分子 (cAMP、 $\text{Ca}^{2+}$  イオン、DIF-1) が、再生過程において攪乱された位置情報の再構築過程でどのように働くか明らかにすることを目的に次の研究を行った。1) ライブイメージングの手法により、細胞内の濃度や動態を可視化することができる cAMP、 $\text{Ca}^{2+}$  について、再生過程の多細胞体において顕著な濃度変化や濃度勾配、パルス形成などが観察されるか検証した。2) DIF-1 の働きを明らかにするために、再生過程における DIF-1 関連遺伝子の欠損変異体の挙動解析を行った、また、3) 再生過程に働くそのほかの細胞内情報伝達系の関与を明らかにする目的で、これまでに知られている多細胞体で働く主要な細胞内シグナル伝達因子 (ERK、STAT) の再生過程における細胞内動態を調べた。

## 3. 研究の方法

### 1) 生体イメージングによる、再生過程における生体内小分子の動態解析

細胞内の cAMP や  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度はこれらの分子に特異的に結合し蛍光を発するレポーターを用いることにより可視化することができるため、それぞれのレポーターを発現するベクターを導入した細胞を用いて多細胞体を作成し、切断した多細胞体の再生過程を蛍光タイムラプス撮影した。蛍光から再生過程における cAMP と  $\text{Ca}^{2+}$  の時間、空間的濃度変化を解析することにより、これらの小分子が位置情報再構成に関与しているかどうかを検証した。

### 2) 再生時における DIF-1 シグナル関連遺伝子変異細胞の挙動解析

解析対象である小分子、DIF-1 についてはイメージングによる動態の解析ができないが、受容体や下流で働く遺伝子、合成、分解に関与する酵素などの関連遺伝子が明らかとされている。そのため、DIF-1 により伝わる情報伝達系の再生における働きを明らかにするために、関連遺伝子欠損変異体を用いて移動体を作成し、再生過程の挙動解析を行った。

### 3) 多細胞体再生時に働く細胞内シグナル伝達因子の解析

細胞性粘菌の多細胞体において、シグナル受容から遺伝子発現の間で働く主要な細胞内シグナル伝達因子 (ERK、STAT) の再生過程における機能を調べるために、再生過程における ERK のリン酸化および STAT タンパク質の核移行をライブイメージングと抗体染色により解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 生体イメージングによる、再生過程における生体内小分子の動態解析

多細胞体の再生過程において細胞内 cAMP の濃度変化や濃度勾配、パルスの形成などが生じるか解析するために、細胞内 cAMP 濃度に応じて蛍光を発するレポーター遺伝子を導入した細胞を用いて多細胞体を形成し、切断後再生する過程での cAMP 濃度変化を蛍光強度の変化により観察した。すると予想に反して、cAMP の濃度勾配や多細胞体形成過程で生じるような周期的な cAMP パルスの発生は再生過程においては観察されなかった。また、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンは細胞性粘菌の多細胞体に

において前方から後方へ濃度勾配を形成しているという報告があった。そこで多細胞体の再生過程における細胞内カルシウム濃度の変化を FRET 法により観察することを試みたが、用いたシステムでは前提となる多細胞体での濃度勾配を確認することができなかった。また再生過程においても顕著な濃度変化を観察できなかった。このことから、これらの小分子の濃度勾配の形成や、発火シグナルの同調による集合中心の形成などによって位置情報が再構成されるわけではないことが示唆された。

## 2) 再生時における DIF-1 シグナル関連遺伝子変異細胞の挙動解析

ポリケチドの一種である DIF-1 は多細胞体の前方で濃度が高く細胞分化の制御を行っていることが知られている。そこで、DIF-1 合成に働く遺伝子の欠損変異体、また DIF-1 を受容した細胞で働く転写制御因子の変異体を用いて多細胞体の再生を観察した。すると、予想に反し、DIF-1 関連遺伝子変異体では野生型と同様の再生能を示した。この結果から多細胞体中に形成された DIF-1 の濃度勾配や DIF-1 を介した細胞間相互作用が多細胞体の再生に必須ではないことが示唆された。

## 3) 多細胞体再生時に働く細胞内シグナル伝達因子の解析

移動体再生過程に働くことが予想されている主要な細胞内シグナル伝達因子 ERK のリン酸化およびシグナル受容に伴い核移行する転写因子 STAT について、再生時における両者の動態を可視化することを試みた。前者については抗リン酸化 ERK を認識する抗体を用いた蛍光抗体法を行い、再生初期の切断面付近での ERK のリン酸化の亢進を確認した。一方で、STAT-GFP を発現する細胞で形成された多細胞体の生体蛍光観察により、多細胞体の切断に伴いこのタンパク質が核移行することが確認された。これらのシグナル伝達の下流でどのような分子機構が働き再生へと繋がるのかが今後の課題である。

本研究の結果、当初予想していた cAMP の濃度勾配やパルスの形成、一過的な濃度変化などの特徴的な動態が再生時には観察されなかった。また多細胞体で濃度勾配を形成していると報告がある  $\text{Ca}^{2+}$  や DIF-1 の再生過程における関与は少ないことが示唆された。よって、これら分子の濃度そのものが濃度勾配などによる位置情報を構成するものでなく、接触追従や自己組織化を含めた別の機構によるものであることが示唆された。これまでに行われてきたプラナリアや両生類等の動物での研究では、細胞外分泌因子から入力されるシグナルの勾配が位置情報の再構築に働くと考えられている。そのため、細胞性粘菌の再生機構がこれらの動物のものと大きく異なるのであれば、多細胞生物を通じた再生機構の共通性や特殊性を比較検討するうえで重要な知見となる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------