

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14491

研究課題名(和文) 一分子計測・操作による cAMP 発振回路の構築機構の解明

研究課題名(英文) Single molecule analysis in the generation of oscillatory circuit for cAMP signaling

研究代表者

堀川 一樹 (HORIKAWA, Kazuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：70420247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シグナル伝達回路の構築/作動原理を解明するには、回路構成因子群(cAMP受容体、合成酵素、中間制御因子など)の絶対数計測が必須である。その実現のため、従来は困難であったGFPノックイン細胞株を容易に作成する手法(BMC Biotech, 2016)や、超高感度なcAMP指示薬を開発した(ACS Chem Biol, 2016)。これらの同時計測により、一部の機能タンパク質の保有数が突出した少数個の細胞が存在すること、こうした細胞がいち早く走化性シグナルを発生させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To ask the mechanisms in the construction of oscillatory signaling circuit, we performed single molecule quantification for essential components in the cAMP signaling system. We developed essential technologies including the efficient generation of GFP-tagged cell lines(BMC Biotech, 2016) and ultrasensitive cAMP indicators (ACS Chem Biol, 2016). By utilizing these tools, we performed a simultaneous imaging of cellular function (cAMP) and molecular quantification and identified that self-organized construction of signaling circuit is regulated by few proteins characterized with significantly low level expression.

研究分野：生物物理

キーワード：イメージング 生物リズム 自己組織化 cAMP

1. 研究開始当初の背景

細胞内化学反応ネットワークの動作原理を解明することは、生命科学の最重要課題である。ゲノムプロジェクト・Omics 解析・数理モデリングなどを駆使し、多くの反応ネットワークを対象とした研究が行われており、概日リズムや細胞周期、振動的な代謝をもたらす発振回路は、最も解析が進んでいる反応ネットワークの一つである。過去の研究から、その安定な出力であるリミットサイクル振動を維持するには、遅れフィードバックの存在、もしくは速い活性化と遅い抑制の組み合わせが必須であることが、安定振動中の遺伝子回路 (= できあがった回路) について明らかにされてきた (Horikawa et al, Nature 2006 など)。

ところで、生命システムの最大の特徴は、反応ネットワークの機能を柔軟に改変できることにある。記憶の可塑性、生物の発生・進化等、なんらかの生理機能が新たに生み出される局面では、土台となる回路が存在しない初期状態からであっても、機能的な反応ネットワークが新規に構築されうる。しかしながら、最も良く研究されている発振回路ですら、発振しない状態から発振する状態が生み出される仕組みについてはほとんど何もわかっていない。

2. 研究の目的

細胞性粘菌は、栄養飢餓などの環境ストレスに暴露されると、走化性因子 cAMP を細胞間リレーさせ、同心円や螺旋波状の走化性集合流を自発的に作り出す。この興奮性シグナルは飢餓処理後 10 時間のうちに新たに出現し、6-10 分周期で繰り返しシグナルを発生させるが、その初期状態ではシグナルリレー能力を欠いている。つまり、飢餓処理直後には機能しない発振回路が、その発生過程で発振能力を獲得することがわかる。この過程では、飢餓刺激によって誘導される遺伝子発現に加え、cAMP パルスによって段階的に増強される遺伝子発現が必要とされているがその詳細は未解明のままである。本研究では、cAMP 発振回路が自発的に構築される仕組みの解明を目指した分子レベルの解析を目的とする。特に、cAMP 発振回路を構成するタンパク質の「絶対数変化」こそ理解の鍵であるとの立場から、一分子精度での計測と操作によって、回路構造の変化とこれをもたらす仕組みの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) cAMP 動態の可視化

回路の構造変化プロセスを理解するには、走化性シグナル cAMP 動態の可視化が必須である。しかしながら cAMP 動態を細胞内ならびに細胞外で定量計測できる高性能な指示薬は存在しなかった。そこで本研究では、極めて高感度に cAMP 濃度変動を検出できる機能性指示薬の開発を行った。具体的には FRET

型指示薬の、シグナル変化率を最大化するための指示薬ライブラリを構築し (図 1)、効率良く指示薬スクリーニングするための基盤整備を行った。

(2) 走化性シグナル伝達制御因子の計数

cAMP 発振回路を構成する主要 5 因子の発現分子数を蛍光計測するため、それぞれの遺伝子について相同組み換え法を用い GFP ノックイン株を樹立した。具体的には、プラスチサイジン耐性能による一次選別、PCR 法によるゲノム構造確認による二次選別を行った。最終的にはウエスタンブロッティング法を用い、全ての GFP 組み換え株で、予想通りの分子量をもつ GFP 融合タンパク質が発現していることを確認した。分子数の一分子計測ならびに生化学的解析には、セルソーターを用いて分取した単一細胞由来のクローン集団を用いた。

各タンパク質因子間の相対量を比較するために、 10^4 細胞に由来する細胞抽出物を抗 GFP モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング法を行った。シグナルのデジタル解析には ImageJ を用いた。

単一細胞あたりの GFP 融合分子の絶対数を計測するため、全反射顕微鏡を用いた一分子蛍光観察を行った。分子の絶対数決定は、低密度分子 (<1000 分子/細胞) については GFP 輝点総数で、これ以上の高密度分子については、未退色蛍光像の総輝度を、一段階消光する GFP 輝点の平均輝度値で、除算することで決定した。

4. 研究成果

(1) 走化性シグナル伝達動態の可視化

シグナル変化率と感度を著しく向上させた新たな cAMP 指示薬を開発することに成功した (図 1) (Ohta et al., ACS Chemical Biol, 2016)。

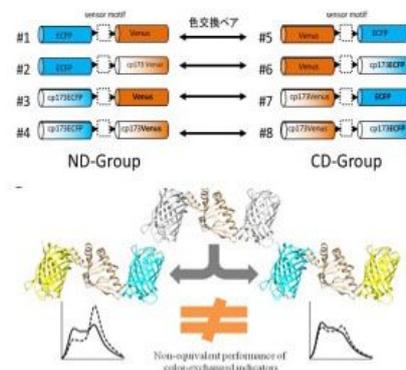


図 1. 高感度 cAMP 指示薬の開発

FRET 型指示薬のドナー/アクセプター配向性を最適化するためのスキーム (上) と、ドナー/アクセプター配向性に対してドナー/アクセプター順列が及ぼす予想外の影響

この新規指示薬を用いた解析により、細胞外 cAMP の最大濃度は回路形成の初期では、25nM

程度に、安定発振中でも 300nM にとどまることが初めて明らかになった。この結果から、初期状態では発現しない回路構成因子は、25nM 程度の微弱なパルス入力により発現増強され、非発振 発振遷移がもたらされる可能性が示唆された。

(2) 走化性シグナル伝達制御因子の計数

一分子計測を行うには、計測対象分子を蛍光標識する手間が必要となる。このためには、ゲノム内の各遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインしなくてはならないため、従来の研究ではその実現が容易な大腸菌や酵母に限られてきた。

本研究で用いた、モデル真核生物「細胞性粘菌」も高い相同組み換え効率を示す事から、優れた研究材料となりうる。しかしながら、そのいびつなゲノム組成（最大 80% 超える AT 含有率）のため、相同組み換え用カセットを作製することが極めて困難であり、GFP ノックイン株樹立の報告は数例にとどまっていた。この問題を解決するため、我々は直鎖ファージ DNA を利用した極めて高効率かつ安定に GFP ノックイン用 DNA カセット調整方法を開発した、GFP ノックイン株を最短 20 日で取得できる新規技術を開発した（図 2）(Mulai et al., BMC Biotech, 2016)。

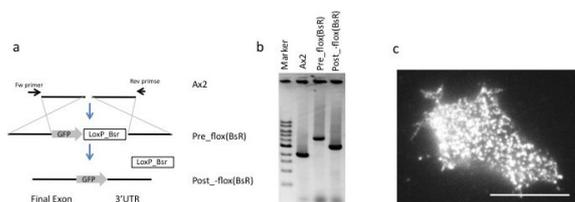


図 2. GFP ノックイン株の樹立と、分子数計測

相同組み換え法による cAMP 受容体遺伝子座への GFP ノックインスキーム(a)と、PCR 法による組み換え体ゲノム構造の確認(b)。全反射顕微鏡観察による、cAMP 受容体-GFP 融合タンパク質の観察像(c)

樹立した細胞株の一分子イメージングを行い、シグナル伝達因子群の細胞あたりの保有数と時間変化を計測した。その結果、一部の必須タンパク質が極めて少量しか存在しないこと、その発現量は極低濃度の cAMP パルスによって増強されること、必要なパルスの回数は 10 回以下で十分であることなど、発振回路を細胞内に新規構築する過程の一端を初めて定量化することに成功した。この結果は、発振回路を構成する多数の制御因子の全てについてその量を変化させるのではなく、一部の必須因子の存在量だけを調節する事で回路実装が行われている可能性を示唆している。特に、cAMP 受容体から合成酵素に至る正の制御回路の構成分子数の増加と、初期状態で過剰に発現する負の制御回路の構成因子を減少という二つの制御により安

定発振回路を構築していると考えられる(図 3)。こうした二重制御は構築過程にある未成熟な回路が乱雑な発振をしないことを保証し、ロバストな遺伝子回路構築を実現するための普遍的な仕組みである可能性がある。cAMP 発振回路以外の遺伝子回路についても同様の解析を行う事で、この仮説の検証を行うことが重要と考えられる。

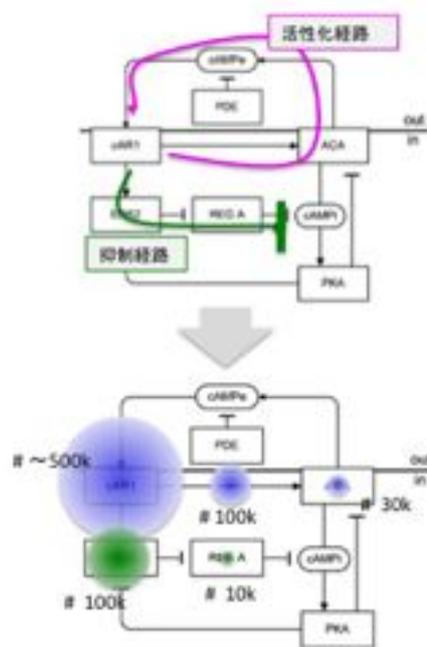


図 3. cAMP 発振回路と、機能分子の数

(上) cAMP 合成経路(マゼンタ)と、cAMP 分解経路(緑)。 (下) 主要因子の存在比率。cAMP 受容体の発現量は極めて多いが、最終エフェクターの発現量は活性化経路ならびに分解経路の両方で極めて少ない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- Ohta Y, Kamagata T, Mukai A, Takada S, Nagai T, *Horikawa K: Nontrivial Effect of the Color-Exchange of a Donor/Acceptor Pair in the Engineering of Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Indicators. *ACS Chem Biol.*, 11(7), 1816-1822, 2016 査読有, doi:10.1021/acscchembio.6b00221
- Mukai A, Ichiraku A, *Horikawa K: Reliable handling of highly A/T-rich

genomic DNA for efficient generation of knockin strains of *Dictyostelium discoideum*. *BMC Biotech.*, 16, 37, 2016, 査読有,

doi:10.1186/s12896-016-0267-8

3. Sakane A, Yoshizawa S, Nishimura M, Tsuchiya Y, Matsushita N, Miyake K, Horikawa K, Imoto I, Mizuguchi C, Saito H, Ueno T, Matsushita S, Haga H, Deguchi S, Mizuguchi K, Yokota H, *Sasaki T: Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides ‘law and order’ in collective cell migration. *Mol Biol Cell.*, 27(20), 3095-3108, 2016, 査読有,

doi:10.1091/mbc.E16-05-0332

4. Hanson DJ, Nakamura S, Amachi R, Hiasa M, Oda A, Tsuji D, Itoh K, Harada T, Horikawa K, Teramachi J, Miki H, Matsumoto T, Abe M. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by blockade of monocarboxylate transportation *Oncotarget.* 2015.6(32):33568-33586. 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.5598

〔学会発表〕(計2件)

1. 堀川一樹, Minority control of synchronized dynamics in biological oscillator, 第38回日本分子生物学会, 2015/12/6, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
2. 堀川一樹, 自発的発振回路の新規構築原理, 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 2015/5/13, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計1件)

1. 永井健治, 村越秀治, 大場雄介, 富樫祐一, 小松崎民樹, 城口克之, 野地博行, 前島一博, 粟津暁紀, 鈴木宏明, 茅元司, 矢島潤

一郎, 谷口雄一, 小嶋誠司, 今田勝巳, 石島秋彦, 福岡 創, 蔡荣淑, 堀川一樹, 大出晃士, 上田泰己, 日本評論社, 少数性生物学, 2017年, 192ページ(153-161)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tbis2013.net>

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀川一樹 (HORIKAWA, Kazuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号: 70420247