

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02483

研究課題名(和文) ストレス応答特異性を規定する時間情報コードの解読

研究課題名(英文) Understanding temporal coding of stress signaling specificity

研究代表者

杉 拓磨 (Takuma, Sugi)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・特任准教授

研究者番号：70571305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では線虫*C. elegans*をモデル動物として、多種多様な環境からのストレスが特定の分子を介してどのように識別・処理されているのか、そのメカニズムの解明を試みた。準備段階の生化学的解析によりMAPキナーゼの活性が経時的に変動している可能性を得ていたことから、この分子の*In vivo*での機能解析を試みた。その中で活性を計測するためのシステムの開発に成功した。一方で特定の神経細胞としてAVAだけをターゲットに計測を行った結果、活性の変動は検出されなかった。そこで現在、全神経細胞の活性を同時に検出するために開発した顕微鏡で網羅的に活性変動を検出することを試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、*In vivo*で分子活性を検出するための2種類の顕微鏡を開発することに成功し、論文化されたことは学術的意義として大きいことと考えられる。一方で、生体メカニズムとしてはまだ不明瞭な点が残された。今後、これらのメカニズムの解析から、ストレス応答の特異性を決定する機構について、さらに知見が積み重なることで、社会的意義も得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, using the nematode *C. elegans* as a model animal, we attempted to elucidate the mechanism of how diverse environmental stresses processed via specific molecules to exert different behavioral responses. Since the biochemical analysis in the preliminary experiments revealed the possibility that the activity of MAP kinase oscillates over time, we attempted to analyze the function of this molecule *in vivo*. We succeeded in developing a system to measure the activity. On the other hand, we did not detect any change in the activity of the molecule when we targeted only AVA as a specific neuron. Therefore, we are now attempting to detect the oscillation comprehensively using a microscope developed to detect the activity of all neurons simultaneously.

研究分野：生物物理学

キーワード：C. elegans stress signaling

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで分子遺伝学・分子生物学的研究によりストレス応答に関わる分子が絞り込まれてきた。しかしヒトを含む動物個体レベルでは、接触などの物理的ストレス、酸化ストレスや炎症ストレスなど、日常的に曝されるストレスの種類は極めて多様である。限られた種類のストレス応答分子で、いかにそれぞれの入力刺激を混線することなく、特定の出力応答へ導くのかは不明であり、この特異性を担うメカニズムを解明することがストレス応答機構を理解するための次の重要な問いである。

特異的なシグナル伝達を可能にするメカニズムは主に2つ考えられる。1つは、特定の分子が組織ごとに結合パートナーを変え、分子の組み合わせの違いにより異なる下流シグナルを誘起する機構である。一方、近年システム生物学の分野では、多様な刺激と応答の特異的な対応づけを可能にする別の機構として、特定の分子の活性の経時的な変動パターンに刺激情報がコードされることにより、多彩な生理機能を保障する「時間情報コード」の概念が示されている(Purvis & Lahav, *Cell*, 2013)。例えば血中インスリン濃度は食後の一過的な分泌や空腹時の低濃度の持続的分泌など異なる変動パターンがあり、各パターンに応じて異なる代謝作用を示す(Kubota et al. *Mol Cell*, 2012 他)。癌抑制因子 p53 の活性は線照射に対してパルス型の変動パターンとなり細胞周期を停止し、UV 照射に対して持続型の変動パターンとなりアポトーシスを誘導する(Purvis & Lahav, *Cell*, 2013 他)。つまり時間情報コーディングでは「活性の波」をラジオのように多様な刺激情報を埋め込む媒体にして異なる下流を誘起する。このように特異性を担う機構には2つの可能性が挙げられるが、ストレス応答の分子機構については従来 *In vitro* の細胞レベルの解析が主であり、実際に *In vivo* の組織間ネットワーク存在下でストレス応答の特異性がどのように決まっているのかは明らかではない。その理由は個体内 *In vivo* のストレス応答分子の活性を定量化することやその経時変化を追うことが技術的に難しいためである。ストレス刺激は我々にとって万病の根幹をなすリスクファクターであり、ストレス応答機構の解明は応用研究にも資する重要な課題である。特に特異性の問題は創薬における副作用の問題とも関連する。したがって本研究では技術的課題を克服し、「ストレス応答経路の特異性」の問題を解決することが学術分野における核心的な問いと考えた。

2. 研究の目的

本研究者はわずか 959 個の体細胞からなる線虫 *C. elegans* を利用することで動物個体レベルの分子活性の時系列解析を可能にした。*C. elegans* は 1 細胞単位の分解能で遺伝子発現・抑制、蛍光発色などが可能である。本研究者はこの細胞特異的な遺伝学的手法に生化学的手法を組み合わせ、個体まるごとで破碎・ウエスタンブロットティングし、*In vivo* の分子活性を「細胞特異的」に時間軸に沿って即座に定量化する解析系を確立した(Sugi* et al. *PNAS*, 2014 他)。

線虫 *C. elegans* は低い個体密度で飼育された場合、他の個体との物理的な接触刺激が少ないため、成虫期で体のサイズが小さく、飼育シャーレの振動などの物理的なストレス刺激に対する応答行動が鈍くなり、脆弱になる(Rose et al. 2005 他)。この物理刺激への脆弱性は興奮性神経伝達を担う AMPA 受容体の発現低下に起因し、同様の現象が哺乳類でも知られる(Miyazaki et al. 2012 他)。本研究者は *C. elegans* の AMPA 受容体のプロモーター結合因子のスクリーニングと行動実験を行った結果、MAP キナーゼ p38 - 転写因子 ATF2 の経路が、AMPA 受容体の遺伝子発現と負のフィードバック回路を形成し、物理刺激下で AMPA 受容体の遺伝子発現を抑制することを見出した。さらに *C. elegans* を低、中、高の 3 つの個体密度で飼育し、p38 の活性の経時変化を解析した結果、p38 の活性は経時的に変動し、個体密度依存的に変動パターン(周波数)が変わることが餌の探索行動に重要であることを見出した。

ストレス応答性キナーゼ p38 は哺乳類まで保存され、様々なストレス刺激の処理に関わる。実際、*C. elegans* においても酸化ストレスや病原体ストレスに対し、p38 により異なる下流遺伝子と応答が誘導されることが知られる。本研究者は各ストレス刺激に対する p38 の活性変動パターン、つまり時間情報コードの違いがストレス刺激と応答(遺伝子発現や表現型)を特異的に対応づけるのではないかと考えた。そこで、本研究では各ストレス刺激から p38 の活性変動パターンへのコーディングを解析し、ストレス応答経路の特異性の問題を解決することを目的とした。

3. 研究の方法

本計画では、生化学的および光学的計測により様々なストレス条件下における p38 の活性変動

パターンを同定する。ストレス源としては主に、*C. elegans*で p38 が関与することが知られる酸化ストレス(ヒ素)、緑膿菌を用いた病原体ストレス、レーザーによる神経損傷ストレス、自ら見出した物理ストレスを利用する。特に酸化ストレスや病原体ストレスについては、p38 による下流遺伝子発現の制御が *C. elegans* の寿命に影響を及ぼすことが知られている。

生化学的計測については、同調飼育した *C. elegans* 集団を経時的に回収・破碎して個体まるごとの p38 の活性を定量化する実験と、p38 を欠失した変異体の特定の神経細胞のみに p38 を回復した *C. elegans* 集団を回収・破碎し、細胞特異的に p38 の活性を定量化する実験を行う。光学的計測のために、まず神経細胞の活性を計測するための顕微鏡システムの構築を試みた。また蛍光プローブとしては、キナーゼ活性を核内外のシャトリング量として定量化する KTR(Kinase Translocation Reporter)テクノロジー(Regot et al, *Cell*, 2014)を利用し、非侵襲に特定の神経細胞の p38 活性を *In vivo* ライブイメージングすることを試みた。この手法では p38 によるリン酸化を受けることにより核から細胞質へ放出される蛍光プローブを用いるが、国内の研究グループで既に線虫で使用実績のあるプローブを *C. elegans* へ導入済みである。生化学的及び光学的計測は互いに一方の計測が当初計画通りいかない場合のバックアップとして準備しており、両手法から異なる結果が得られた場合も新たな仮説を得ることが期待できる。また酸化ストレス下の *C. elegans* 集団の時系列解析からは p38 の活性が一過的に亢進し、物理ストレス刺激下で観察された減衰パターンとは異なる変動パターンを示す予備結果が得られており、他のストレス刺激においても変動パターンの同定が期待しうる。

また、仮に生化学的解析で検出された p38 の活性の変動が、AVA ニューロンに由来するものでなかった時のために、全神経細胞の活性の変動を検出するための全脳イメージング顕微鏡の開発を進めた。

4. 研究成果

In vivo で p38 の活性変動パターンを非侵襲に計測するための蛍光プローブの作成とそれを用いた AVA ニューロンにおける活性計測を行った。また、そのために、非侵襲に特定の神経細胞の p38 活性を *In vivo* ライブイメージングするシステムの構築に成功した。このシステムでは従来のシステムに比べ、力学刺激のパラメータを精密にコントロールするためのデバイスを取り付けた。しかしながら、このシステムを用いた計測の結果、蛍光プローブの蛍光強度は時間ともに大きな変動は見られなかったことから、少なくとも生化学的解析で検出されたほどの大きな p38 の活性の変動は検出されなかった。この理由として、生化学的に観察されていた p38 の活性変動は他の神経細胞や腸などの発現量の多い細胞種における活性変動を反映していた可能性が考えられた。つまり、線虫の体内には p38 が活性変動している細胞としていない細胞の 2 種類があり、生化学的実験において観察された活性変動は、発現量の多い細胞由来の活性を見ていた可能と考えられた。したがって、p38 活性計測用プローブは既に作製済みであることから、まず腸に p38 活性計測用プローブを発現させた線虫株を作成した。現在、この線虫株を用いて、活性変動が検出されるかどうかを検証中である。また、腸以外で、AVA ニューロン以外の神経細胞で活性変動している可能性を検証するため、全神経細胞の蛍光検出のための全脳イメージングシステムの開発を行った。このシステムにおいて、高解像度に全神経細胞の蛍光を網羅的に検出することが可能となった。現在、このシステムを利用し、実際に p38 の活性計測を行っており、その結果が得られ次第、生化学的データと合わせて論文化する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Sugi Takuma, Ito Hiroshi, Nishimura Masaki, Nagai Ken H. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 C. elegans collectively forms dynamical networks | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 683 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08537-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kawatsuki Akihiro, Morita Shin-ya, Watanabe Naoki, Hibino Emi, Mitsuishi Yachiyo, Sugi Takuma, Murayama Shigeo, Nishimura Masaki | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Lipid class composition of membrane and raft fractions from brains of individuals with Alzheimer's disease | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports | 6. 最初と最後の頁 100704 ~ 100704 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.100704 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sugi Takuma, Ito Hiroshi, Nagai Ken H. | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Pattern Formations in Active Matter Physics | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri | 6. 最初と最後の頁 006 ~ 012 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.60.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sugi Takuma, Igarashi Ryuji, Nishimura Masaki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Noninvasive Mechanochemical Imaging in Unconstrained Caenorhabditis elegans | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Materials | 6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1034 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma11061034 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Igarashi Ryuji, Sugi Takuma, Sotoma Shingo, Genjo Takuya, Kumiya Yuta, Walinda Erik, Ueno Hiroshi, Ikeda Kazuhiro, Sumiya Hitoshi, Tochio Hidehito, Yoshinari Yohsuke, Harada Yoshie, Shirakawa Masahiro | 4. 巻 142 |
| 2. 論文標題 Tracking the 3D Rotational Dynamics in Nanoscopic Biological Systems | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society | 6. 最初と最後の頁 7542 ~ 7554 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c01191 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉拓磨 |
| 2. 発表標題 線虫の全脳イメージングを目指したライトフィールド顕微鏡の開発 |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 杉拓磨 |
| 2. 発表標題 個体集団の再構成とその情報伝播機構の研究 |
| 3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 13.0 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 杉拓磨 |
| 2. 発表標題 超高速高解像三次元イメージング技術の開発とその応用 |
| 3. 学会等名 量子生命科学会 第2回大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuki Shigyou, Haruka Maeoka, Reiji Yagi, Kazuki Shimabukuro, Shin Usuki, Takuma Sugi |
| 2. 発表標題 Development of Light field microscope for whole brain imaging of C. elegans |
| 3. 学会等名 Taiwan-Japan Joint workshop (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 執行航希, 前岡遙花, 八木玲士, 島袋主基, 白杵深, 杉拓磨 |
| 2. 発表標題 線虫の全脳イメージングを目指したライトフィールド顕微鏡の開発 |
| 3. 学会等名 日本応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuma Sugi, Hiroshi Ito, Ken H. Nagai |
| 2. 発表標題 Dynamical network formation of C. elegans |
| 3. 学会等名 ASAB summer (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ken H. Nagai, Hiroshi Ito, Takuma Sugi, |
| 2. 発表標題 Dynamical network formation of C. elegans |
| 3. 学会等名 43rd Indian Biophysical Society Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

該当なし

| |
|--|
| |
|--|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|