

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22680024

研究課題名（和文） 複数のモジュールで構成されるシグナル伝達経路の適応性、振動性及び周波数特性の解析

研究課題名（英文） Analysis of frequency specificity, oscillations and adaptation in a signaling pathway consisting of multiple signaling modules.

研究代表者

澤井 哲 (SAWAI SATOSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：20500367

研究成果の概要（和文）：複数の時間スケールで生じる適応的、振動的な細胞応答について細胞性粘菌の cAMP 刺激にたいする細胞内 cAMP の一過的な上昇を題材にとり、定量的な解析をおこなった。早い最初のピークが相対変化検出をおこない、絶対濃度にたいして変化した出力であり、かつ周波数応答性をもつのにたいし、後者は絶対濃度に依存すること、また前者が受容体レベルの修飾に依存するのにたいし、後者はアクチン重合を介したフィードバックによることを明らかにした。以上の性質と細胞間シグナリングの頑強性について考察した。

研究成果の概要（英文）：Adaptive and oscillatory response consisting of multiple time-scales was analyzed by taking an example from cAMP-induced cAMP relay-response in Dictyostelium. Based on quantitative live-cell imaging analysis, we found that the first peak can be considered as an output from a module that realizes fold-change detection. The prolonged response on the other hand depends on the absolute concentration of extracellular cAMP and appears to be dependent on F-actin mediated feedback. We discussed the relationship between these observed properties and robustness of cell-cell signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2012年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：生体情報 振動

## 1. 研究開始当初の背景

外部からの刺激に対する細胞の応答は、閾値以上の刺激に対して一過的に生じる（興奮性）。外部因子の濃度の絶対値だけでなく、それが時間的に空間的にいかに変化しているか、また過去の履歴などによって応答は

変化する。例えば、細胞への外部入力が増加しているにもかかわらず、入力への感受性や、回路からの出力が刺激入力前の状態に戻る性質は適応(adaptation)と呼ばれている。こうした現象は、細菌の走化性、動物細胞のカルシウムや MAP キナーゼ活性、粘菌や白血球などのアメーバ状細胞

胞の走化性、酵母の浸透圧調節、視覚の暗順応など、広範囲の対象でみられる。多くの場合、外部入力から応答にいたるまでの生化学反応の経路は、フィードバックとフィードフォワード回路がモジュールをなし、いくつもの階層を形成している。こうしたモジュールが複数つながることで、入出力関係の感受性やダイナミックレンジが変形されるだけでなく、各々のフィードバックに固有の時間スケールで適応的現象、多重安定性、振動性が出現することが数理的に予想されていた。

## 2. 研究の目的

細胞内の生化学ネットワークにおいて、フィードバック、フィードフォワード回路が複数組み合わせられることによって、外部入力に含まれる特定の成分の情報（相対的な濃度変化、周期性など）がいかに選択され、入力に応じた多様な出力が実現されているかを検証する。具体的に、粘菌細胞のサイクリック AMP シグナル系を例にとり、様々な変異株にたいしてライブセルイメージングによる解析を行う。詳細な数理モデルから予測される振る舞いについて、実験からの検討を行い、ネットワークの構造を検証し、それらの機能の特徴づける。得られた知見から、モジュールの組み合わせ方によって発現する機能について、一般的な理論を展開する。

## 3. 研究の方法

細胞性粘菌の cAMP シグナルの経路とそのダイナミクスについて、実験と数理モデルによる検証の両面から解析を進める。FRET を利用した計測系により、細胞外の cAMP 濃度の時間および空間的な変化を自在に操りながら、遺伝子改変を加えた様々な株について、生きた細胞における細胞内 cAMP の応答を追跡する。具体的には、隔離した細胞性粘菌にたいして、灌流系を用いて細胞外 cAMP の濃度を制御する実験の測定と解析方法の概要を述べ、続いて cAMP 刺激にたいして細胞内 cAMP

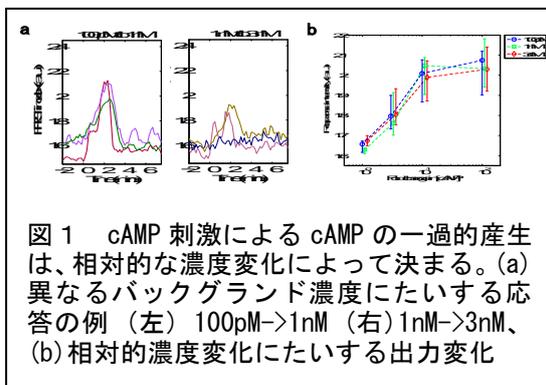


図1 cAMP 刺激による cAMP の一過的産生は、相対的な濃度変化によって決まる。(a) 異なるバックグラウンド濃度にたいする応答の例 (左) 100pM→1nM (右) 1nM→3nM、(b) 相対的濃度変化にたいする出力変化

が一過的に上昇する応答について、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した生細胞イメージングに基づく実験解析をおこなう。これに加え、上流のモジュールの応答として膜上のリン脂質やアクチン結合タンパクを同時に可視化する。PIP3 産生については、これと選択的に結合するタンパクドメインに蛍光タンパクを融合させたプローブを、アクチンについては、LimE のドメインの一部に RFP を融合したものをプローブとして用いた。これらを恒常的に細胞内で発現した株を作成し、生細胞イメージング測定をおこなう。PIP3 の現在予想している複雑なシグナル経路について、理論的に予想される振る舞いと実験結果を相互に照らし合わせながら、システムレベルの理解を進める。

## 4. 研究成果

持続的な cAMP 刺激にたいする細胞内 cAMP の一過的な上昇 (cAMP リレー応答) の適応の仕方を調べたところ、特に、細胞を一定時間非ゼロの cAMP 濃度環境にさらした後に、細胞外 cAMP をさらにそこから上昇させたところ、一過的な細胞内 cAMP 上昇のピーク値が、細胞外 cAMP 濃度の相対的な変化、具体的には倍変化によって特徴づけられていることを突き止めた (図1)。また、この特徴が、二桁の絶対濃度領域にわたって、この検出が成立していることを明らかにしている。さらに、周期的な入力にたいしても、5-6分間隔の周期的な相対的濃度変化にたいして、追従する (図2) ことから、実際の細胞集団でこのような特性がいかにされている可能性を強く示唆した (投稿論文準備中)。また、高濃度刺激にたいしては、応答の波形が保存しないことから、別の経路が働いていることが疑われた。

いくつかの薬剤などによる阻害実験をおこなったところ、アクチン重合を阻害す

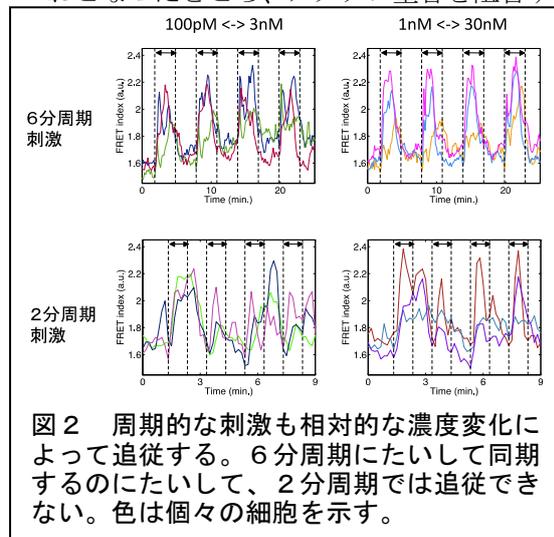


図2 周期的な刺激も相対的な濃度変化によって追従する。6分周期にたいして同期するのにたいして、2分周期では追従できない。色は個々の細胞を示す。

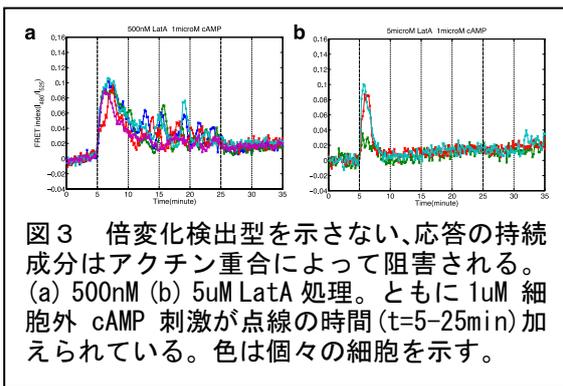


図3 倍変化検出型を示さない、応答の持続成分はアクチン重合によって阻害される。(a) 500nM (b) 5µM LatA 処理。ともに 1µM 細胞外 cAMP 刺激が点線の時間 (t=5-25min) 加えられている。色は個々の細胞を示す。

るラトランキュリン処理によって、高濃度刺激にたいする特徴的な持続的に応答が消滅することを見出した (図3)。そこで、cAMP の産生調整のシグナル上流にある PI3 キナーゼによるホスファチジルイノシトール (3, 4, 5) 三リン酸 (PIP3) の自発的発火について解析したところ、それがアクチン重合を介したフィードバックに依存していることを見出した (論文①)。相対濃度検出がシグナル経路のどの段階でおこなわれているか検証したところ、少なくとも PIP3 の一過的な産生も倍変化型検出によること、ただし、ダイナミックレンジは cAMP のものより一桁ばかり小さいことを示している。また、PIP3 は cAMP の産生と走化性の方向検出の双方を調整していることから、走化性の方向検出機構について、これまでのモデルを改良するネットワークトポロジーを提案した。またパスイ解析をおこなう上で有用な薬剤を探索したところ、カテキンとそのアナログが PI3 キナーゼ経路まわりを抑制する上で有用である可能性を見出した (論文②)。

波形が濃度によって変形することについて、膜上の cAMP 受容体レベルの調節が聞いているかについて検証した。リン酸化できない変異型の cAMP 受容体について、ライブセル可視化法によって cAMP 応答を解析をすすめ、野生型の受容体では出力が濃度に依存しない特性を示すのにたいして、変異型では濃度依存的に出力が増加することをつきと

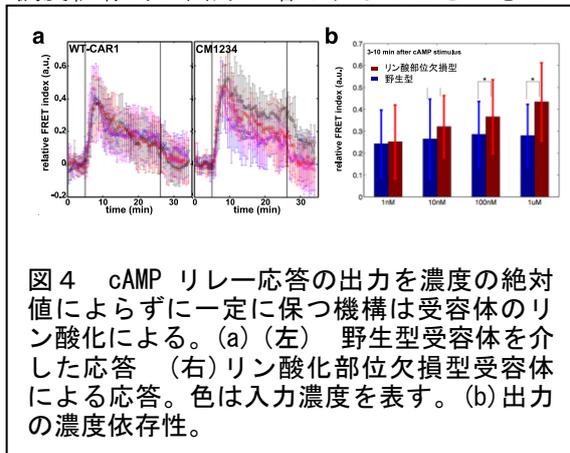


図4 cAMP リレー応答の出力を濃度の絶対値によらずに一定に保つ機構は受容体のリン酸化による。(a) (左) 野生型受容体を介した応答 (右) リン酸化部位欠損型受容体による応答。色は入力濃度を表す。(b) 出力の濃度依存性。

めた。この変異体は、cAMP の上昇が自発的に生じやすいことをこれまで明らかにしていたが、今それが細胞に内在性の AMP のパルス発生の増大によるものでなく、増幅率の増加によって細胞外に cAMP がたまりやすいことによっていること、出力波形を一定に保つ機構が受容体レベルであることが示された (図4; 投稿論文 in revision)。一方で、出力や振動を一定に保つ機構について、得られた相対的濃度検出による特性によって、細胞密度依存性が減り頑強性がますこと、細胞外 cAMP を分解する酵素が cAMP 依存的に転写制御されていることと、これによって cAMP が振動しやすいパラメータ領域が広がることを明らかにした (論文③)。

以上のことから、cAMP リレー応答を特徴づける二つの時間スケールを遺伝学的、薬学的に分離し、それぞれの情報処理特性について当初目的とした知見の多くが得られた。それぞれが、相対的な濃度、絶対的な濃度にたいする出力を示すこと、前者が周波数応答性をもち、後者が細胞の運動性 (アクチン重合) を中間入力として利用していることが明らかになったが、その生物学的機能については今後の課題である。こうした性質がパスイの具体的な構成要素とどうつながっているのか、また細胞が情報として利用している成分がどこであるのかについて、より詳細な理解を得ることで、細胞の情報処理特性の一般則が明らかになることが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① D. Taniguchi<sup>‡</sup>, S. Ishihara<sup>‡</sup>, T. Onuki, M. Honda-Kitahara, K. Kaneko and S. Sawai (2013) Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110, 5016-5021. (‡ Equal contribution) DOI:073/pnas.1218025110
- ② K. J. McQuade, A. Nakajima, A. N. Ilacqua<sup>1</sup>, N. Shimada and S. Sawai. (2013) The green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) blocks cell motility, chemotaxis and development in *Dictyostelium discoideum*. PLoS ONE 8(3): e59275. DOI: 10.1371/journal.pone.0059275
- ③ N. Masaki<sup>‡</sup>, K. Fujimoto<sup>‡</sup>, M. Honda-Kitahara, E. Hada and S. Sawai

- (2013) Robustness of Self-Organizing Chemoattractant Field Arising from Precise Pulse Induction of Its Breakdown Enzyme: A Single-Cell Level Analysis of PDE Expression in *Dictyostelium*. *Biophys. J.* 104, 1191–1202. (# Equal contribution)  
DOI: 10.1016/j.bpj.2013.01.023
- ④ K. Kamino, K. Fujimoto and S. Sawai (2011) The collective oscillations in developing cells: Insights from simple systems. *Dev. Growth Diff.* 53, 503-517. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01266.x
- ⑤ T. Gregor, K. Fujimoto, N. Masaki and S. Sawai (2010) The onset of collective behavior in social amoebae. *Science* 328, 1021-1025.  
DOI: 10.1126/science.1183415
- [学会発表] (計 10 件)
- ① S. Sawai 第 43 回発生生物学会シンポジウム “Quantitative biology of spatiotemporal dynamics in development” “Adaptation and de-adaptation kinetics underlying the synchronized oscillations in *Dictyostelium*” 2010 年 6 月 22 日 (京都国際会議場、京都、日本)
- ② 澤井哲 第 19 回日本バイオイメーシング学会シンポジウム「バイオイメーシングと定量生物学」 「倍変化検出型の応答とその集団振動における役割」 2010 年 9 月 10 日 (慶応大学日吉キャンパス来往舎、神奈川、日本)
- ③ S. Sawai CBI 学会 2010 年大会オーガナイズドセッション「数理モデルとシミュレーション」 “Single-cell level analysis of the adaptive cAMP response in *Dictyostelium*” 2010 年 9 月 17 日 (学術総合センター 一橋記念講堂、東京、日本)
- ④ K. Kamino & S. Sawai, International Conference on Systems Biology (ICSB2010) “Single-cell level analysis of adaptation in chemoattractant signaling in *Dictyostelium*” 2010 年 10 月 13 日 (EICC, エジンバラ、英国)
- ⑤ K. Kamino, Y. Kondo & S. Sawai, The annual International *Dictyostelium* conference (Dicty2011) “Single-cell level analysis of adaptive fold-change detection in cAMP relay response” 2011 年 8 月 16 日 (Radisson Cross Keys, ボルチモア、メリーランド州、米国)
- ⑥ K. Kamino, K. Fujimoto and S. Sawai, The 5th Annual Q-bio Conference on Cellular Information Processing “The adaptation of cAMP relay response in single *Dictyostelium* cells” 2011 年 8 月 12 日 (St. John's College, サンタフェ、ニューメキシコ州、米国)
- ⑦ S. Sawai 第 49 回日本生物物理学会年会 シンポジウム 「生命システムの情報処理」 “Adaptive fold-change detection in chemotactic cells and its underlying network topology” 2011 年 9 月 17 日 (兵庫県立大学姫路書写キャンパス、兵庫、日本)
- ⑧ S. Sawai, CDB Symposium 2012 on Quantitative Developmental Biology “Information Processing and Self-organization in Developing Cells” 2012 年 3 月 28 日 (理化学研究所、神戸、日本)
- ⑨ D. Imoto & S. Sawai, 第 50 回日本生物物理学会年会 “Phase response of the collective cAMP oscillations *Dictyostelium discoideum* and its implication to the adaptive properties” 2012 年 9 月 23 日 (名古屋大学東山キャンパス、名古屋、日本)
- ⑩ 井元大輔, 本多麻衣, 澤井哲 第 5 回定量生物学の会「細胞性粘菌の 1 細胞レベルの cAMP 応答における cAMP 受容体のリン酸化の役割」 2012 年 11 月 25 日 (東京大学生産技術研究所、東京、日本)
- [図書] (計 3 件)
- ① 澤井哲 「生細胞イメージング」 『細胞性粘菌 (研究の新展開) —モデル生物、創薬資源、バイオ—』 (阿部知顕、前田靖男 編) 第 2 章 p. 72-90 アイピーシー出版 2012 年
- ② 中島昭彦 澤井哲 「自己組織化の研究: 細胞性粘菌の生物物理学」 『細胞性粘菌 (研究の新展開) —モデル生物、創薬資源、バイオ—』 (阿部知顕、前田靖男 編) 第 8 章 p. 423-454 アイピーシー出版 2012 年
- ③ 澤井哲 「パターン形成リズムのデザイン」細胞工学 30, 12 月号 p. 1262-1267 秀潤社 2011 年

[その他]

- ① 澤井哲 「RESEARCH 研究を通して - 粘菌のふるまいに見る自己組織化の始まり」 JT 生命誌研究館 生命誌季刊号 (65-68号) p.133-140 新曜社 2012年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤井 哲 (SAWAI SATOSHI)  
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授  
研究者番号：20500367

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者