

研究課題別評価書

1. 研究課題名

相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い

2. 氏名

堀川 一樹

3. 研究のねらい

心臓の拍動や神経ネットワークにおける情報処理のように、細胞社会は、しばしば組織化することで高次機能を発現する。これらの高次生命機能が発揮される仕組みを理解するには、第一に、ネットワーク全体の活動パターンを構成単位である細胞レベルで詳細に計測し、次に細胞単位の活動パターンをもとに、ネットワーク全体の活動パターンが生成・維持される原理を抽出することが重要である。本研究では、生命システムの動作原理を理解する事を目的に、1.多細胞システムのネットワーク活動を大規模に計測するためのイメージングツールの開発ならびに、2.自己組織化する多細胞ネットワークの秩序化過程にシグナル伝達のノイズが果たす積極的な役割を明らかにするためのモデル構築と検証を行った。

4. 研究成果

心臓の拍動や脳における情報処理においては、細胞単独でその機能が発揮されるのではなく、多数の細胞が複雑なネットワークを構築することで初めてその機能が発現される。これらの高次生命機能の発現機構、つまり動作原理の解明を試みる研究が注目を集めている。この目的のためには、ネットワークの活動パターンを生きたまま大規模に計測することが必須であり、カルシウムイメージングは最も有効な手法の一つである。神経や筋肉細胞における電気的な活動に限らず、ほとんどの細胞はホルモンなどの細胞外シグナルに応答しセカンドメッセンジャーとして利用される細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる。したがって細胞内カルシウムイオン濃度の変化を計測することで、多細胞ネットワークの活動パターンをモニターすることが可能となる。しかしながら、この方法にも技術的なハードルが残されており、ネットワーク活動の大規模計測はいまだ容易な手法ではない。本研究では様々な種類の多細胞集団について、その自発的なネットワーク活動の大規模イメージングを可能にするため、超高感度カルシウムプローブの開発を行った。

[方法: 超高感度Ca²⁺指示薬の開発]

cameleonは遺伝子にコードされたCa²⁺プローブの代表例で、比較的大きなシグナル変化量を有すること、遺伝子操作により任意の回路にだけ局在化させることができるなど、多細胞ネットワークの活動パターンを計測する上で欠かせない利点をもつ。ところが、cameleonを利用することで人為的に刺激した細胞や小規模な細胞集団においては大きなシグナル変動を検出できる一方で、自発活動に伴う細胞内カルシウム変動の検出は困難で、仮にシグナルが得られてもその変化量は非常に小さいものであるという問題点があった。これは、細胞内カルシウム濃度の変動レンジが人為刺激応答時と自発活動時とで異なっているためと推測された。つまり、人為的な刺激応答時には細胞内カルシウム濃度が100nM以下から μ M程度まで大きく変動するのでその検出は容易であるが、自発活動時にはせいぜい数百nM程度にしか上昇していない可能性が示唆された。そこでnMレンジにおける微少なカルシウム濃度変動を高感度に検出できるようにするため、cameleonの感度特性の改良を試みた。cameleonはカルシウム結合タンパク質であるカルモジュリン(CaM)とその標的タンパク質であるM13との融合ペプチドを骨格にもつカルシウム指示薬である。この骨格の両端に位置するドナーおよびアクセプター蛍光タンパク質から発せられる蛍光シグナル比は骨格部分の立体構造、つまりはカルシウムイオン濃度に応じて変化する。したがってより低濃度のカルシウムイオンの存在下でCaM-M13部分の立体構造変

化をもたらすような改変が有効と推測された。いくつかの改変を試みた結果、CaM-M13 間のリンカー部分を改良することで既存のcameleonに比べ、カルシウムイオンに対する感度を大幅に上昇させることに成功した。つまり、既存のcameleonのカルシウムイオンとの解離定数の最小値が 100nM (yellow cameleon 2.60)であったものが、60、40 そして 20nMと段階的に減少したものが得られ、これらをyellow cameleon Nano60、Nano40、Nano20 と命名した(図1)。

[結果 自発的ネットワーク活動の検出]

得られた高感度指示薬の性能を生細胞内で検討するため社会性アメーバを材料に用いた。社会性アメーバは自らが細胞外に放出するcAMPの濃度勾配に対して正の走化性を示すが、このとき細胞内応答の一つとして Ca^{2+} transientを生じる。まずは対照実験として人為的cAMPの投与に対する応答を検出するため、yellow cameleon2.60 ($K_d=100\text{nM}$)とyellow cameleon Nano20 ($K_d=20\text{nM}$) を遺伝子導入した社会性アメーバを得、終濃度 $10\mu\text{M}$ のcAMPを投与したときの Ca^{2+} 応答を計測した。その結果両方の指示薬で非常に大きな応答を検出できた(図 2a)。次いで、自発的な細胞間cAMPリレーに対応する Ca^{2+} transientの計測を試みた。集合期にある社会性アメーバの集団では 5-10 分の周期で同心円ないし回転螺旋波状の走化的集合流が形成されるが、これに対応する周期的な細胞内カルシウム濃度上昇はYC Nano20 でのみ十分大きなシグナル変化として検出することができた(図 2b)。YCNano20 により得られる大きなシグナル変化は大規模ネットワークを対象にしたイメージングも可能にし、最大10万個の細胞が回転螺旋波状に自発的に集合する過程を詳細に観察できることも明らかになった(図3)。

高感度指示薬を用いたカルシウム濃度変化の検出が神経細胞のネットワークにおいても有効であることを確かめるため以下の実験も行った。YCNano20 を導入した大脳皮質第4層のスライス標本において、活動電位にトリガーされる細胞内カルシウム上昇の検出を試みた。その結果、単一の活動電位にトリガーされる微少なカルシウムスパイクを再現性よく検出する事がわかった。また、ゼブラフィッシュ胚においても最大 1000 個の神経細胞における自発的なネットワーク活動をモニターすることが明らかになった(図 4)。以上の結果から、生体内での自発活動にともなうカルシウム濃度の変動は nM レンジにおいて微少な変化しかしていないことが確かめられ、その検出にあたっては、新規に開発した高感度カルシウム指示薬は非常に有用であることが明らかになった。本研究成果により、さまざまな多細胞ネットワークの自発活動パターンの計測が加速されることが期待される。

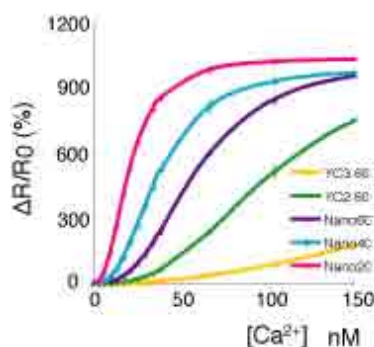


図 1. 改変 cameleon 分子のカルシウム親和性 FRET シグナルの変化量をカルシウム濃度に対してプロットした図

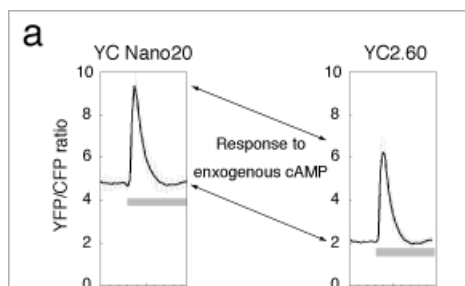


図 2. 改良型 cameleon (YC Nano20)と従来型の cameleon(YC2.60)により検出される社会性アメーバの細胞内 Ca^{2+} 応答。 $10\mu\text{M}$ 64AMP の人為的刺激(a)と、自発的な cAMP リレーに対する Ca^{2+} 応答(b)。

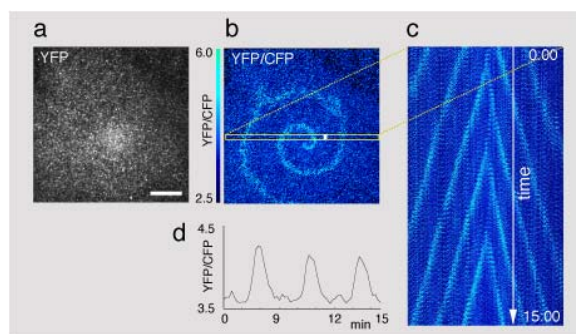


図 3. 社会性アメーバ細胞集団における自己組織的集合流のカルシウムイメージング

YC Nano20 で可視化された約 10 万個の細胞集団内を伝搬する回転螺旋波。(a)YFP 像, (b)FRET signal 像 (c) b の四角領域における signal の時空間プロット (d) および白四角内の時間変化 スケールバー 500 μ m

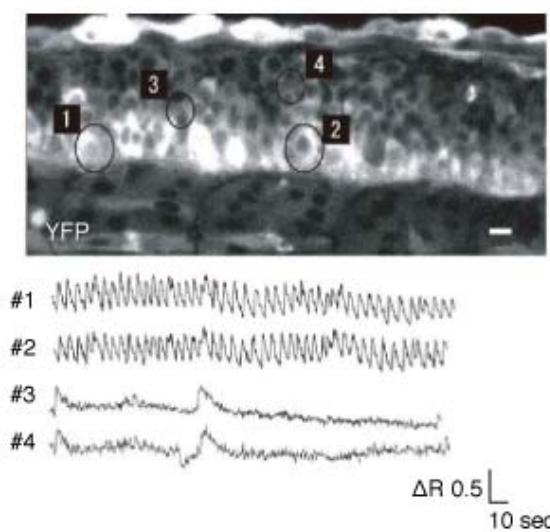


図 3. YC Nano60 で検出される zebrafish 胚 脊髓神経ネットワークの自発活動パターン

約 1000 個の神経細胞の活動パターンの長時間計測。運動神経(#1, #2)と介在神経の活動パターン(#3, #4)。

5. 自己評価

本研究では、高次生命機能を生み出す多細胞ネットワークの動作原理を解明するために、その自発活動のイメージングを行い、さらに定量データを基にした数理モデル化を試みるというアプローチを採用した。イメージングツールの開発から、実験材料の選定、さらには数理モデル化までのすべてを自ら手がけ、かつ一定の成果にまで到達しつつあることは評価できる。数理モデルからはいくつかの興味深い予測が得られているが本研究を完結させるためには、モデルにより導かれた仮説を実験により検証することが必須である。研究期間内においてこれらの課題が完結しなかったことは物足りないが、今後さらに研究を飛躍させる大きな足がかりになることが期待される。

6. 研究総括の見解

大規模多細胞ネットワークを対象に、細胞間情報伝達の時空間パターンを定量計測するための高感度のライブイメージング用指示薬を開発し、その結果、良質のデータが取れていることは、大きな成果と評価する。最大 10 万個の多細胞ネットワークにおける単一細胞レベルでのシグナル応答パターンを計測できるようになり、シミュレーションによる検証を行い、非常に質の高い成果となっている。今後、このアプローチにより、多くの成果が期待できる。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①受賞

平成 19 年度科学技術分野、文部科学大臣表彰、若手科学者賞

②学会発表

1. The SSF/JST-PRESTO joint symposium “Noise reduction mechanism in multicellular coupled oscillator” 2008.5.26
2. The 7th NIBB-EMBL Meeting: “Systems Biology and Functional Genomics”
“Noise reduction mechanism in multicellular coupled oscillator” 2008.4.18
3. Gordon research conference calcium signaling “Ca²⁺ dynamics in large-scale cellular networks visualized by ultra-sensitive Ca²⁺ probe, cameleon Nano” 2009.7.16
4. The Third q-bio Conference on Cellular Information Processing “Constructive role of noise in self-organized pattern formation in social amoeba” 2009.8.8

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K and Nagai T *Nature Methods*, 6: 351–353, (2009)
2. Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. Satou C, Kimura Y, Kohashi T, Horikawa K, Takeda H, Oda Y, Higashijima S *J Neurosci*. 29(21):6780–93. (2009)
3. Tanimoto M, Ota Y, Horikawa K, Oda Y. Auditory input to CNS is acquired coincidentally with development of inner ear after formation of functional afferent pathway in zebrafish. *J Neurosci*. 29(9):2762–7. (2009)