

研究終了報告書

「細胞の個性と共同性を統制する電気化学ポテンシャル」

研究期間:2020 年 11 月～2024 年 3 月

研究者:森本 雄祐

1. 研究のねらい

細胞における電気化学ポテンシャルは、膜内外のイオン濃度差による化学ポテンシャルの勾配と、膜電位による電気ポテンシャル勾配の和からなり、生命機能の多くに利用されている。膜電位が脳・神経系においてシグナルとして働いていることは周知のことであるが、それ以外の一般的な細胞においても膜電位は広くシグナル伝達に寄与していることが示唆されている。しかし、脳・神経細胞に比べ、非興奮性細胞での膜電位の役割については未解明な部分が多い。本研究課題では、生物全ての細胞が保持する電気化学ポテンシャルが、1細胞レベルの細胞ごと、および多細胞システムにおいて、どのような役割を担っているのかを、分子生物学的手法と生物物理学的手法により明らかにする。

本研究課題では、シグナル伝達のモデル生物として扱われている細胞性粘菌を中心に扱う。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壌中に生息する真核微生物で、通常はアメーバ状の単細胞生物として分裂増殖しており、一般的な哺乳類由来の培養細胞と同等に扱えるが、飢餓状態になると自身が産生する cAMP シグナルによって 10 万細胞程度からなる多細胞体を構築する。これまでの研究から、多細胞化のための細胞間 cAMP シグナルリレーや細胞分化において、電気化学ポテンシャルの変動が起こっていることが明らかとなっており、これが細胞機能の共同的な振る舞いによって成り立っている多細胞システムにおいて、個性と共同性の両立にどのように働いているかを明らかにすることを目指す。遺伝子操作が容易でモデル生物として研究されている細胞性粘菌を用いて、細胞運動、細胞分化におけるイオン選択的な電気化学ポテンシャル変化の役割を解明することにより、ヒト細胞などでも保存されている多くの共通の細胞機能において電気化学ポテンシャルがグローバルに働いていることを示すことができる。また、機構解明を行うための汎用的なプローブや計測手法の開発も並行して行い、さまざまな系での応用を検討する。

2. 研究成果

(1) 概要

高感度なイオンイメージング手法の確立によって、膜電位、細胞内イオン濃度を定量的に解析し、これらが細胞性粘菌の多細胞システムのダイナミクスにおいてどのように働いているかを明らかにした。

真核生物である細胞性粘菌の多細胞期において、機械刺激応答のシグナル伝達にカルシウムイオンが大きく働いていることを明らかにし、機械刺激応答に関わるカルシウムシグナル経路は、単細胞期と多細胞期では異なっていることが明らかとなった。

東北大学などとの共同研究により、新規のレプトスピラ属細菌由来のタンパク質 LprA が、光照射に応答して cAMP を合成し、細菌の運動を瞬時に加速する仕組みがあることを明らかにした。これまでに知られている光活性化アデニル酸シクラーゼとは異なる完全に

新規なタンパク質であり、cAMP によってバクテリアの運動が制御されるメカニズムも初めて明らかとなった。LprA は大腸菌や細胞性粘菌で発現させた場合でも、光照射に応答して cAMP を合成したことから、ほ乳類細胞などを含む多細胞システムに移すことで、光遺伝学ツールとしての幅広い応用が強く期待される。

1細胞内でのシグナル伝搬の計測における時空間分解能を、細胞を巨大化することで向上させることを検討した。細胞質分裂を阻害することで、通常 8 μm 程度の細胞を 100 μm 以上のサイズに効率的に巨大化させることに成功した。巨大化細胞を用いた計測により、cAMP および Ca^{2+} が1細胞内で前後極性を持って伝搬することが明らかとなった。

c-di-GMP シグナルは、一般的にバクテリアで働いているが、真核生物で唯一、細胞性粘菌が c-di-GMP 合成経路を持っている。細胞内で機能する c-di-GMP 蛍光プローブを細胞性粘菌に導入することで、世界で初めて真核生物細胞内で機能する c-di-GMP シグナルを蛍光顕微鏡下で可視化することに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「細胞性粘菌における機械刺激応答機構の解明」

蛍光カルシウムセンサー GCaMP6s を用いたイメージングにより、外部から機械刺激を与えることで、細胞性粘菌の多細胞体を構成する各細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇することが明らかになった[成果リスト1]。多細胞システムの応答機構をより詳細に明らかにするために、多細胞体の前方部と後方部に分けて解析したところ、前方部がより効率的に強く応答していることが明らかとなった(図1)。細胞性粘菌の多細胞体は、前方部を振りながら、周囲を探索するように動いているため、前方部に効率的な応答機構があるものと考えられる。また、機械刺激に伴う Ca^{2+} の流入経路を特定するために、小胞体に存在する IP3 受容体 IplA 欠損株、ヒト細胞にも保存されている機械受容チャネル Piezo 欠損株をそれぞれ用いて多細胞体の計測を進めたところ、IplA チャネルは部分的に機械刺激に寄与しており、Piezo チャネルはほとんど寄与していないことが明らかとなった。これは、単細胞期での機械刺激応答に Piezo チャネルが大きく寄与しているとする過去の

報告[Srivastava *et al.*, PNAS 2020]と異なっている。このことは、細胞性粘菌が単細胞から多細胞システムへと分化することによって機械刺激応答シグナル伝達経路が変化するが、どちらの状態においても Ca^{2+} シグナルを共通して利用していることを示している。この結果は、単細胞と多細胞でのシステムの違いを理解するために重要な知見となると考えられる。今後は、前方部と後方部においてどのようにして機能の違いを作っているのか、メカノセンシングと通常の細胞集団運動において Ca^{2+} シグナルをどのように使い分けているのか、またはシグナルを併用しているのかといった疑問を明らかにすることにより、多細胞システムの細胞集団運動におけるシグナル分子機構を解明していく必要がある。

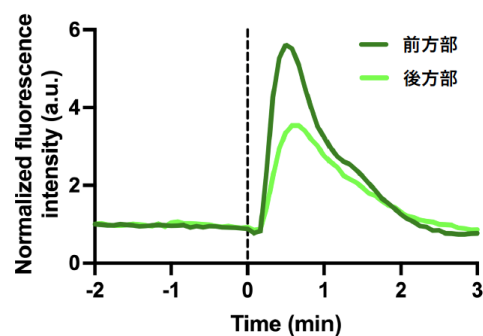


図1. 細胞性粘菌多細胞システムの機械刺激に伴うカルシウム発火

研究テーマ B「細胞内 cAMP シグナル光操作手法の開発」

東北大学と国立感染症研究所との共同研究により、これまでに知られていない光応答メカニズムを持つ新規の光活性型アデニル酸シクラーゼ (PAC) を発見した[成果リスト2]。これは、新種のレプトスピラ属細菌から見つかったものであり、LprA と名付けた。バクテリアのべん毛運動を制御する様々な因子が調べられているが、cAMP がべん毛の回転機構を制御することを示したのは本研究が初めてである。また、クローニングして大腸菌に発現させた LprA の解析により、大腸菌の中で光依存的な cAMP 合成を確認することができた。LprA を GFP で標識して局在を調べたところ、発現量は少ないものの、べん毛が存在する菌体両末端に局在していることが明らかとなった。運動器官であるべん毛基部の近くに LprA が集まることで、cAMP 濃度が局所的に高まる信号増幅の効果が誘発され、その結果、光照射後すぐに運動が応答できるのではないかと考えられる。この結果を受け、細胞性粘菌に LprA を発現させ、周期的に光刺激を与えてみたところ、cAMP シグナルが光刺激の周期と同期することが観察できた。これらの結果は、LprA が1細胞レベルでの活性を制御可能な応答性能の高い PAC として機能していることを示唆している。今後はこれを他の真核生物でも応用可能にするために、未解明な光応答の分子機能について解析を進めるとともに、細胞性粘菌のシグナル操作手法としての確立を進める。

研究テーマ C「1細胞内局所レベルでのシグナル計測手法の開発」

これまでに、蛍光プローブタンパク質を用いたイメージングにより、細胞性粘菌の多細胞システムにおけるシグナル伝達を高感度に可視化してきた。しかし、細胞間のシグナル伝達を実現するために、細胞内においてシグナルがどのように伝搬するかは、十分に可視化できておらず、1細胞内でのシグナル伝達の時空間スケールは未解明のままである。これは、1細胞のサイズが小さいため、時空間情報の抽出に限界があることが大きな課題となっている。そこで、細胞を巨大化することで、この情報限界を超える計測を可能にすることを検討した。細胞質分裂を阻害することで、細胞が多核化し巨大化することが知られている。培養条件の検討により、通常 8 μm 程度の細胞を 100 μm 以上のサイズに効率的に巨大化させることに成功した。作成した巨大化細胞は、走化性応答における前後極性を維持していることから、走化性に伴うシグナル伝達機構を維持していることが示唆された。巨大化細胞を用いた計測により、cAMP に対する走化性応答時に、cAMP および Ca^{2+} が1細胞内で前後極性を持って伝搬することが明らかとなった。これは、これまで未解明であった1細胞内シグナル伝達機構を明らかにする大きな知見である。また、 Ca^{2+} シグナルは、一度の cAMP シグナル応答に対し、前方と後方で時間がずれて二相性の応答をすることが明らかになった。これは Ca^{2+} シグナルの高速性に起因するものと考えられ、巨大化細胞で初めて明らかとなった。今後は、巨大化細胞を用いて確立した拡張計測手法を利用し、多細胞システムにおける1細胞局所レベルでのシグナル分子機構を明らかにする。特にイオンシグナルは、化学シグナルに比べて伝搬速度が高速であるため、本手法によって新しい知見が得られることが期待される。

研究テーマ D「真核細胞 c-di-GMP シグナルの計測」

サイクリック di-GMP (c-di-GMP) は、原核生物であるバクテリアのセカンドメッセンジャーとして広く機能しており、バイオフィーム形成、べん毛運動など、さまざまなバクテリアの機能に働いているが、これまで c-di-GMP は原核生物のみにおいて合成される物質だと考えられていたため、微生物学においてのみ注目されていた。しかし、近年、c-di-GMP 自体がヒト細胞において自然免疫応答を引き起こすことや、真核生物である細胞性粘菌が分化制御のために c-di-GMP の合成経路をもっていることなどが明らかとなり[Chen *et al.*, Nature 2014]、c-di-GMP シグナル研究の領域が広がりつつある。本研究課題では、バクテリアの研究にて開発された c-di-GMP 蛍光プローブを細胞性粘菌に導入することを試みた。プローブの発現量を向上させることと細胞性粘菌の自家蛍光を低下させることにより、世界で初めて真核生物細胞内で機能する c-di-GMP シグナルを蛍光顕微鏡下で可視化することに成功した[成果リスト3] (図2)。これにより、細胞性粘菌の多細胞体先端にて、分化誘導シグナルとして柄細胞形成時に細胞質 c-di-GMP 濃度が上昇していることを明らかにした。

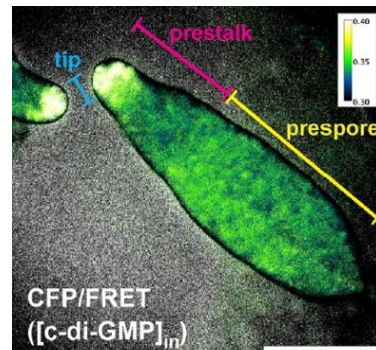


図2. 細胞性粘菌多細胞体の c-di-GMP イメージング

3. 今後の展開

本研究課題の実施により、生命現象の機能解明が進んだだけでなく、独自の技術開発により、これまでになく高感度、高分解能な計測手法の確立を進めることができた。本研究課題内では、細胞性粘菌を主な対象としたが、開発した計測手法は、哺乳類細胞など、他の生物種でも適用可能なものである。領域内はもちろんであるが、より多くの研究者との共同研究の推進により、幅広くライフサイエンス研究に手法を役立てていく。

細胞性粘菌を利用した研究により、機械刺激応答機構など、単細胞と多細胞のステージによって分子機構が異なることが明らかとなった。異なるシグナルを利用するようになるのではなく、同じシグナルにもかかわらず、分子機構を切り替えることは、生命が単細胞と多細胞とで共通したシグナルを使い分けている仕組みと理由を明らかにするために重要な手がかりとなることが期待される。今後も、細胞性粘菌を利用することで、単細胞と多細胞の違い、そしてどのようにして生物において多細胞システムが確立されたのかを明らかにしていく。

4. 自己評価

本研究課題の実施によって、単細胞と多細胞システムでのシグナルの使い分け機構の一端が解明されるなどするとともに、いくつかの新しい研究手法の確立を行うことができた。今後の研究につながる大きな基盤づくりが達成できた事は大きな成果であると考えている。また、本さがけ研究の成果を含めた業績が認められ、令和5年12月に、現所属の九州工業大学大学院情報工学研究院にて、教授に昇進した。

さがけ研究内で得た研究成果が認められ、国内外での招待講演が増え(さがけ採択後:国内4件、海外3件)、本分野のトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。また、国際誌「Frontiers in Microbiology」の Review Editor、国際誌「Biomolecules」の Guest Editor の就任にもつながった。さらに、日本細胞性粘菌学会の評議員、日本生物物理学会のウェブサイト編集委員を担当するなど、国内の学会においても委員会活動を任されるようになり、研究者としての飛躍に働いている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Hidenori Hashimura, Yusuke V. Morimoto*, Yusei Hirayama, Masahiro Ueda. Calcium responses to external mechanical stimuli in the multicellular stage of *Dictyostelium discoideum*. Scientific Reports 12: 12428 (2022)

細胞性粘菌の多細胞期において、機械刺激に応答してカルシウムシグナルが発火することを世界で初めて明らかにした。また、細胞性粘菌の単細胞期においても同様に機械刺激応答にカルシウムシグナルが働いているが、単細胞期と多細胞期では、異なる分子経路を介してカルシウムシグナルが発生していることを明らかにした。

2. Jun Xu[#], Nobuo Koizumi[#], Yusuke V. Morimoto*, Ryo Ozuru, Toshiyuki Masuzawa, Shuichi Nakamura. Light dependent synthesis of a nucleotide second messenger controls the motility of a spirochete bacterium. Scientific Reports 12: 6825 (2022)

光照射に応答して、運動速度を加速させるメカニズムをもつレプトスピラ属のバクテリアを発見した。光応答機構を担っている遺伝子を特定し、新規の光感受性アデニル酸シクラーゼが関与していることが明らかとなった。これにより、cAMP シグナルがバクテリアの運動制御に働いていることが分かり、バクテリアのべん毛運動が cAMP シグナルによって制御される機構を世界で初めて発見した。

3. Hayato Ide, Yukihisa Hayashida, Yusuke V. Morimoto*. Visualization of c-di-GMP in multicellular *Dictyostelium* stages. Frontiers in Cell and Developmental Biology 11: 1237778 (2023)

c-di-GMP シグナルは、一般的にバクテリアで働いているが、真核生物で唯一、細胞性粘菌が c-di-GMP 合成経路を持っている。細胞内で機能する c-di-GMP 蛍光プローブを細胞性粘菌に導入することで、世界で初めて真核生物細胞内で機能する c-di-GMP シグナルを蛍光顕微鏡下で可視化することに成功した。これにより、細胞性粘菌の多細胞体先端にて、分化誘導シグナルとして柄細胞形成時に細胞質 c-di-GMP 濃度が上昇していることを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 招待講演:サルモネラのべん毛運動と走化性、第 59 回日本生物物理学会年会 2021 年 11 月
2. 招待講演:Measurement of proton motive force utilized by bacteria in the single cell. 1st Material Symbiosis International Symposium 2023 年 3 月
3. 招待講演:細胞性粘菌の単細胞と多細胞体におけるシグナル伝達を見る、第 75 回日本細胞生物学会 2023 年 6 月
4. 招待講演:Signal transduction in unicellular and multicellular stages of *Dictyostelium*. NanoBioCoM2023 2023 年 9 月
5. 招待講演:バクテリアべん毛で働くプロトン駆動力の計測、第 32 回日本バイオイメーシング学会学術集会 2023 年 11 月