

タンパク質でできた分子スパイによる細胞間非平衡現象の可視化

北海道大学電子科学研究所 永井健治、堀川一樹

【はじめに】あらゆる化学反応は確率的なプロセスであり、これらの素過程から構築される細胞内或いは細胞間情報伝達ネットワークもまたノイズの影響から逃れることはできない。しかしながら、多細胞間ネットワークとして機能する動的な生命システムの振る舞いは往々にして安定であり、こうした安定性をもたらす機構はほとんど理解されていない。そこで我々は、本問題にアプローチする為、自己組織的に走化性集合流を作り出す社会性アメーバに着目した。約1万個の細胞集団は栄養の枯渇をきっかけにして同心円波や螺旋波状の走化性集合パターンを作り出す。この集合パターンは細胞集団内の一部の細胞が分泌する cyclic AMP (cAMP) に対する走化性運動の動的変化の結果として形成されるが、cAMP 刺激に伴う細胞内シグナル変化と集合パターンの時空間関係を調べた研究はこれまで報告されていなかった。我々はこれまで、遺伝子工学技術に基づく生体分子機能可視化技術、例えばフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) などを利用した細胞内斥候分子を開発し、それらを細胞内や組織内のあらゆる部位に放つことによって、細胞内シグナル伝達を担うタンパク質のリン酸化状態や細胞内カルシウムイオン濃度の変化といった細胞内シグナルの流れを可視化することを可能にしてきた。本講演では、確率的な生化学反応のネットワークによって構成される動的な生命システムが如何にしてロバストな振舞いを示すのかを理解する手段としてのバイオイメージング法の有効性を紹介する。

【結果と考察】

シアン色蛍光タンパク質 (CFP) と黄色蛍光タンパク質 (YFP) 間の FRET を利用した Ca^{2+} 指示薬 *cameleon* YC3.60 (Nagai T. et al PNAS 2004) の Ca^{2+} センシング部分であるカルモジュリンと M13 ペプチド何に変異を導入し、 Ca^{2+} に対する親和性が高い、高感度の Ca^{2+} センサーを開発した。その結果、これまで報告された如何なる Ca^{2+} センサーよりも Ca^{2+} に対して高い親和性 ($K_d=20\text{nM}$) を持つ超高感度 Ca^{2+} センサー (*cameleon* ZERO) を開発した事に成功した。驚いたことに *cameleon* ZERO を一過的に発現させた細胞性粘菌は野生型同様に分裂増殖することから内在の Ca^{2+} キレート効果による細胞毒性は見られないことが分かった。そこで、*cameleon* ZERO を安定的に発現する細胞性粘菌を作成し、この細胞性粘菌が栄養の枯渇をきっかけにして作り出す同心円波や螺旋波の走化性集合パターンを微分干渉観察と蛍光観察を併用して行うことで、細胞運動と集合全体が示す Ca^{2+} 動態を同時に捉え、 Ca^{2+} 波や Ca^{2+} 発火と集合パターン形成の関係を調べた。

飢餓後 6-7 時間に同心円波の集合パターンを示す細胞集団の Ca^{2+} を観察したところ、ペースメーカー領域から安定な「伝播する Ca^{2+} 波」が生じることが見いだされた。また、興味深いことに同心円状の集合パターンとは一致しない一過的な「伝播しない Ca^{2+} 発火」が多数見いだされた。この一過的な Ca^{2+} の上昇には 1) 時間的にも空間的にも分布はランダムで周期性は認められないこと、2) 集合流における Ca^{2+} 振動とは波形が異なる、という二つの特

徴が見いだされた。

本観察で、高い頻度で見いだされる「伝播しない Ca^{2+} 発火」は、情報伝達的にはノイズとなりうる成分であり、「伝播する Ca^{2+} 波」と相互作用することで容易に螺旋波が生じ、さらに過剰な「伝播しない Ca^{2+} 発火」は集合パターンを乱流化する可能性がある。しかしながら、細胞性粘菌の集合流においては、これら二つの発火が長時間にわたって共存できることがあきらかになった。この結果は、細胞性粘菌ではランダムな Ca^{2+} 発火の影響が平面波には伝わらないようにする特別な機構があることを示唆している。

【参考文献】

- (1) Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K & Nagai T: An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods* 6: 351–353, 2009
- (2) Yamamoto T, Kumagai T, Saito K & Nagai T: Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomers and a polymer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9: 670–672, 2009
- (3) Saito K, Kobayashi K, Tani T & Nagai T: A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function. *Cell Struct Funct.* 33: 133–141, 2008
- (4) Kotera I & Nagai T. A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme. *J. Biotechnol.* 137: 1–7, 2008
- (5) Matsuda T, Miyawaki A & Nagai T: Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nature Methods* 5:339–345, 2008
- (6) Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T & Okano H: Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci.* 121:1204–1212, 2008
- (7) Takemoto K, Kuranaga E, Tonoki A, Nagai T, Miyawaki A & Miura M: Local initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:13367–13372, 2007
- (8) Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A & Hayashi Y: Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bi-directional plasticity. *Nature Neurosci* 7: 1104–1112, 2004
- (9) Nagai T, Yamada S, Tominaga, T, Ichikawa M & Miyawaki A: Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10554–10559, 2004
- (10) Nagai T, Iyata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K & Miyawaki A: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnol.* 20:87–90, 2002
- (11) Nagai T, Sawano A, Park ES & Miyawaki A: Circularly permuted green fluorescent protein engineered to sense Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3197–3202, 2001