

博士論文

細胞性粘菌の cAMP リレー応答と集団的振動の
細胞運動依存性の解析

福神 史仁

目次

第 1 章 序論	1
1.1 節 本研究の目的	1
1.2 節 本論文の構成	2
第 2 章 背景	3
2.1 節 細胞運動の重要性	3
2.2 節 細胞性粘菌の集合過程	4
2.3 節 細胞内シグナル伝達機構	5
2.4 節 応答のダイナミクス	9
2.5 節 本研究の趣旨	10
第 3 章 手法・材料	13
3.1 節 細胞株, 培養・飢餓条件	13
3.2 節 蛍光顕微鏡観察	16
3.3 節 暗視野観察	18
3.4 節 微小流路の作製	21
3.5 節 ガラス表面へのポリマーのコーティング	25
3.6 節 灌流実験	28
3.7 節 ガラスボトムディッシュを用いた実験	31
3.8 節 画像解析	32
第 4 章 結果 1: 集団的 cAMP 振動のアクチン重合依存性	35
4.1 節 LatA 濃度勾配による cAMP 振動の攪乱	35
4.2 節 cAMP 振動の LatA 濃度依存性	41
4.3 節 灌流下での細胞集団の cAMP 振動の測定	45
第 5 章 結果 2: 一細胞レベルの cAMP リレー応答のアクチン重合依存性	47
5.1 節 微小流路を用いた cAMP リレー応答の測定	47
5.2 節 cAMP リレー応答の LatA 依存性	50
5.2.1 項 cAMP リレー応答の LatA 濃度依存性	50

5.2.2 項	LatA を投与した細胞の cAMP リレー応答の細胞外 cAMP 濃度依存性	54
5.3 節	cAMP リレー応答の脱適応のキネティクスとその LatA 依存性	58
5.4 節	PI3K の寄与	61
第 6 章 結果 3: 基質接着依存性		65
6.1 節	細胞-基質間接着の促進による cAMP 振動の攪乱	65
6.2 節	細胞-基質間接着の促進による cAMP リレー応答の抑制	68
6.3 節	細胞-基質間接着の阻害の影響	70
6.4 節	細胞の基質への接着領域の制限	72
第 7 章 結果 4: cAMP リレー応答と細胞の機械的特性との関係		75
7.1 節	共焦点顕微鏡による cAMP リレー応答の測定	75
7.2 節	細胞側面における F-アクチンの動態との関係	78
7.3 節	基質接着面側の F-アクチンの動態との関係	89
7.4 節	細胞の形状・重心移動との関係	99
7.4.1 項	細胞の形状と cAMP リレー応答との関係	100
7.4.2 項	細胞の形状と F-アクチンの動態との関係	105
7.4.3 項	細胞の重心移動と cAMP リレー応答との関係	112
7.4.4 項	細胞の重心移動と F-アクチンの動態との関係	114
7.5 節	時間的に緩やかな濃度上昇を実現する微小流路デバイスの作製	118
第 8 章 考察		123
8.1 節	F-アクチンの細胞内シグナル伝達機構への寄与	123
8.1.1 項	F-アクチン依存性から考えられるシグナル伝達機構への寄与	123
8.1.2 項	cAMP リレー応答の非適応性との関係	125
8.1.3 項	cAMP リレー応答の時間スケールの F-アクチン非依存性	127
8.1.4 項	cAMP リレー応答と F-アクチンの構造の関係	128
8.1.5 項	細胞内 cAMP に依存した細胞運動との関係	129
8.2 節	機械的シグナルの影響	130
8.2.1 項	接着の寄与と F-アクチンの集積との関係	130
8.2.2 項	基質接着に関わる細胞内分子との関係	133
8.2.3 項	基質接着阻害の影響	133

8.2.4 項	細胞形状や重心移動からのフィードバックの存在の可能性	134
8.3 節	アクチン重合や運動に依存した cAMP 振動の生物学的意義	135
8.3.1 項	一細胞レベルの cAMP リレー応答と細胞集団の cAMP 振動との関係	135
8.3.2 項	一細胞レベルの応答のばらつきが cAMP 振動に与え得る影響	138
8.3.3 項	細胞運動に依存した cAMP 振動の生物学的意義	138
8.4 節	まとめ	141
	謝辞	143
	参考文献	145

第1章 序論

1.1 節 本研究の目的

餌や外敵や仲間等の細胞外環境を認識して行動を変化させるということは、生物の基本的な能力である。そのような行動は一細胞レベルにおいても見られる現象であり、誘引物質の濃度勾配等の細胞外環境の情報が細胞内のシグナル伝達機構で処理される結果生じる最終的な出力として、細胞が形状を変化させたり移動したりする。しかし、近年の研究から、細胞が形を変えることや移動するということが逆にシグナル伝達機構に寄与し、細胞外環境からの情報の処理を偏重させる現象が知られるようになってきた。例えば、分子レベルでは、細胞内シグナル伝達機構にアクチンの重合が関与するフィードバック機構があることが予想されている [Sasaki *et al.*, 2007; Inoue and Meyer, 2008]。また細胞スケールでは、空間の制限により細胞の移動速度が上昇するという報告がある [Pathak and Kumar, 2012]。アクチン等の細胞骨格タンパク質の反応による細胞の形状変化や移動を単なる最終的な出力として捉えるだけでは、重要な情報を見落とすことになりかねない。他の様々な応答との関係を精査することで、細胞運動が、ある種の“シグナル伝達因子”の役割を担っていると考えることができれば、細胞の挙動の理解はより進むことが期待される。

単細胞真核生物である細胞性粘菌は遺伝子操作が簡便であり、発生と分化を行う細胞集団は自己組織的に振る舞うことから、自己組織化のモデル生物として広く研究材料として扱われている。飢餓状態において粘菌細胞が走化性応答により集合する際、粘菌細胞は細胞外の走化性誘引分子に対して非線形的な応答を示し、自身で誘引分子を合成し分泌する。よって、この応答を特徴付けることは細胞集団の自己組織化現象を理解する上で重要であると考えられる。さ

らに、この応答が細胞運動と強く相関する振る舞いを示すのであれば、細胞外シグナル分子に対する応答と細胞運動との間で相互的な制御が行われていることが期待される。本研究では細胞性粘菌において、シグナル分子に対する応答が、アクチンや、細胞の運動にどのように依存するのかを解析することとした。その上で、その依存性が細胞集団の自己組織的な振る舞いにどのように影響するのかを検証することで、運動に依存するシグナル分子への応答の意義を明らかにすることを目的とした。

1.2 節 本論文の構成

第 2 章では、本研究の背景に関して、細胞運動がシグナル伝達機構に影響を及ぼすと期待される内容を述べる。また、研究の材料である細胞性粘菌について解説する。第 3 章では、研究手法を述べる。第 4 章で、細胞性粘菌の集団レベルでの測定結果から、細胞集団で見られる cAMP 振動という現象がアクチン重合に依存すると期待されることを述べる。第 5 章では、cAMP 振動を構成する一細胞レベルでの応答 (cAMP リレー応答) を解析した結果から、cAMP リレー応答がアクチン重合に依存すると期待されることを述べる。第 6 章では、細胞の基質への接着性を変えることにより、cAMP 振動や一細胞レベルの応答が攪乱されることを示す。第 7 章では、F-アクチンの動態を cAMP リレー応答と同時に測定した結果から、それらがどのような相関関係にあるかを明らかにする。また、細胞の形状や重心移動との関係についても言及する。第 8 章で、研究結果から考察されることと今後への課題を述べ、本研究をまとめる。

第2章 背景

2.1 節 細胞運動の重要性

多くの生命現象において、細胞運動は重要な役割を果たしている。発生過程における形態変化、創傷治癒、癌の転移等、協調的な細胞運動が関与する生命現象のメカニズムの解明は生命科学における一つの大きな課題となっている。多くの場合、細胞は細胞外マトリクス等の接着基質や分泌性の化学物質をシグナルとして運動を行う。走化性運動はその代表的な例である [Artemenko *et al.*, 2014]。ある細胞から分泌する拡散性物質の濃度勾配を細胞が検知し、それに従って運動の方向を決定し、移動する。その拡散性物質の濃度勾配は、しばしばその細胞自身が分泌する化学物質により形成される。哺乳類の上皮細胞における自己分泌型の細胞増殖因子 (EGF) による運動の促進は有名な例であり、その分泌量と細胞内分子の活性や移動速度等との関係が定量的に解析されている [Joslin *et al.*, 2007]。

細胞に対する機械的なシグナルもまた細胞運動において重要である [Pruitt *et al.*, 2014]。機械的シグナルを検知することをメカノセンシングと呼び、機械的シグナルにより細胞内でのシグナル伝達機構が活性化されることをメカノトランスダクションと呼ぶ。メカノセンシングは特に動物細胞での研究が近年進んでいる。細胞接着構造を構成する複数のタンパク質とビンキュリンとの結合が細胞内の張力に依存して調整されることから、ビンキュリンがメカノセンシングを担う分子の一つであると考えられている [Yonemura, 2011]。また、細胞内分子の活性と細胞が基質に与える力との間に関する詳細な報告や [Reffay *et al.*, 2014]、細胞間にはたらく牽引力に起因する細胞内分子の分布の変化が細胞集団運動の協調性を生み出す報告等がある [Das *et al.*, 2015]。

2.2 節 細胞性粘菌の集合過程

細胞運動に関して広く研究対象となっているものに、社会性アメーバである細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*, キイロタマホコリカビ) がある。単細胞の真核生物である *Dictyostelium discoideum* は遺伝子操作が簡便であり、その集団は自己組織的に振る舞い発生と分化を行うことから、広く研究材料として扱われている。バクテリア等を餌としており、餌が豊富な環境下ではそれを捕食しているが、飢餓状態になると細胞が集合し、胞子と柄に分化し子実体を形成する[前田, 2006; 漆原, 2006; Gaudet *et al.*, 2008].

また, *Dictyostelium discoideum* は集合する過程においても特徴的な振る舞いを示す。飢餓状態になった細胞は環状アデノシンーリン酸 (サイクリック AMP, cyclic AMP, cAMP) の刺激を与えられると細胞内で cAMP を一過的に合成し, 分泌する。これを cAMP リレー応答と呼ぶ。細胞はホスホジエステラーゼ (PDE) を分泌しており, これによって細胞外 cAMP が分解される。この応答が細胞集団において同調的かつ周期的に行われ, 細胞外 cAMP は空間的に伝播する進行波を形成する。しばしば進行波は大域的ならせん波様の形状をとる。この cAMP 濃度場の集団的かつ振動的な振る舞いを, cAMP 振動と呼ぶ。細胞は, cAMP を誘引物質とする走化性運動により, 自己組織的に形成された波状の cAMP 濃度場に対してその波に向かう方向へと進む。その結果, らせん波の中心に向かって細胞が集合するに至る。本論文では, この現象のことを集合過程と呼ぶ (図 3.5 を参照)。また, 細胞の置かれた環境の細胞外 cAMP 濃度が約 6 分周期で変化することで, 走化性応答や柄と胞子への分化などに必要なタンパク質の遺伝子の発現が誘起されることが知られている[Gerisch *et al.*, 1975].

Dictyostelium discoideum の集合過程において, 細胞集団の cAMP 振動と細胞の運動との間に強い相関関係が存在することが知られている。図 2.1 にその概略を示す。cAMP 振動が進行すると, その周期は徐々に短くなっていき, 安定した周期でしばらくの間振動する。細胞外 cAMP の濃度が上昇したとき, 細胞の形状は伸長し波が向かってくる方向へと移動する。濃度が下降すると一方向的な移動はなくなり丸みを帯びる。さらに, 飢餓処理後約 6 時間を境にその周期が約 4 分程度まで短くなり, それと同時に細胞は細長い形状を保持しながら集合中心に向かって一方向的な移動を行う (これをストリーミングと呼ぶ)。

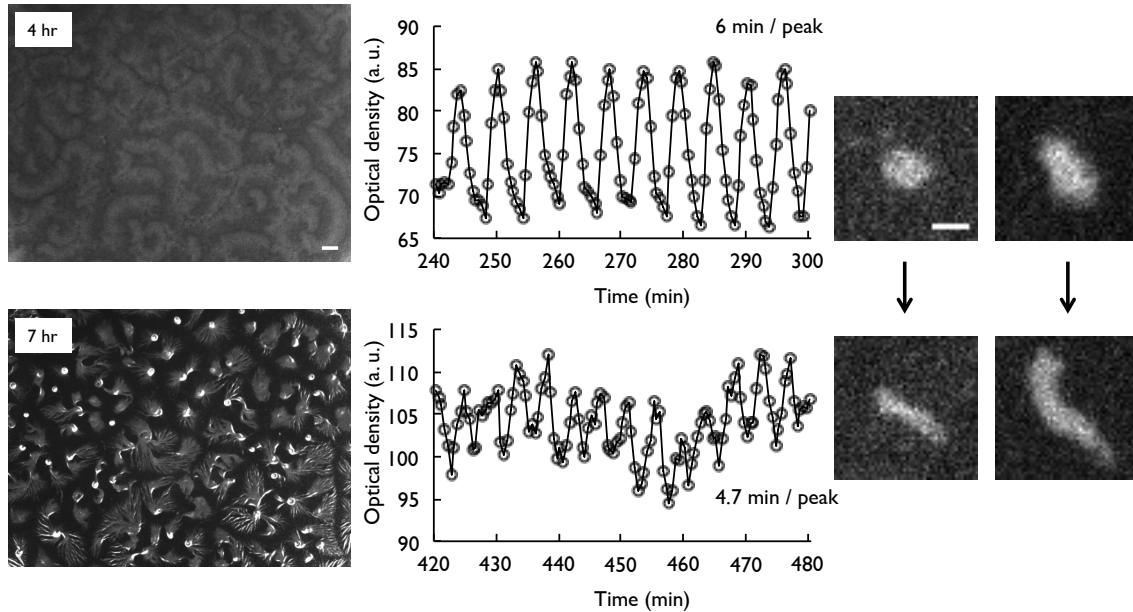


図 2.1: *Dictyostelium discoideum* の集合過程における cAMP 振動周期と細胞の形状の変遷。らせん波を形成する時期から一方向的に集合する時期への移行時には (左, 暗視野画像, 光学密度の変化は cAMP 濃度上昇に伴う細胞の形状の変化に対応しており, 従ってその周期的変化は cAMP 振動を反映している, スケールバーは 1 mm), cAMP 振動の周期が短くなり (中央, 暗視野画像の光学密度の時系列, 時間は飢餓処理後の経過時間), 細胞の形状は細長くなる (右, *Epac1-camps* の遺伝子を発現した細胞 (詳細は 3.1 節を参照) を少ない割合で野生株と混ぜて寒天上で発生させ落射蛍光顕微鏡で観察した様子, スケールバーは 10 μ m)。

2.3 節 細胞内シグナル伝達機構

先行研究により, 集合過程における走化性応答や cAMP リレー応答に関する細胞内のシグナル伝達を構成する分子機構が明らかにされてきた [Swaney *et al.*, 2010; Artemenko *et al.*, 2014]. 図 2.2 にシグナル伝達機構の概略を示す. 以下に述べるように, 走化性応答と cAMP リレー応答のシグナル伝達機構を構成する分子は共有されている.

細胞外 cAMP を受容するのは細胞膜上の G タンパク質共役受容体 (cAMP receptor, CAR) であり, cAMP と結合すると細胞内のヘテロ三量体 G タンパク質を活性化させる. cAMP 受容体には CAR1, CAR2, CAR3, CAR4 があり, 集合過程においては CAR1 が主に発現している [Klein *et al.*, 1988]. 活性化したヘテロ三量体 G タンパク質は $G\alpha$ サブユニットと $G\beta\gamma$ サブユニット複合

体とに解離し [Janetopoulos *et al.*, 2001], それぞれが下流のシグナル分子の活性を調整すると考えられている。Gβγ の下流に位置すると考えられている分子の中で最も上流で知られているのは低分子量 G タンパク質の Ras である [Sasaki and Firtel, 2006]. Ras は不活性型をとるとき GDP と結合しているが, RasGEF (Ras guanine nucleotide exchange factor) により GDP が GTP と交換されると活性型となる [Kae *et al.*, 2007]. 活性型 Ras は RasGAP (Ras GTPase activating protein) と結合すると GTP が加水分解されることで, GDP と結合した不活性型になる [Zhang *et al.*, 2008]. Ras は複数種類存在することが知られており, 走化性応答や cAMP リレー応答に主に寄与すると考えられているのは RasC と RasG である [Swaney *et al.*, 2010]. RasC と RasG は, 主にそれぞれ別の種類の RasGEF (GEFA・GEFH と GEFR) によって活性が促進されると考えられている [Kae *et al.*, 2007; Charest *et al.*, 2010]. また, RasC と RasG の活性には寄与しないがアデニル酸シクラーゼ (詳細は後述する) の活性を促進する RasGEF (GEFM) の存在も知られている [Arigoni *et al.*, 2005]. Gβγ によるそれらの因子の調整の機構の詳細はまだ明らかになっていない. RasC は主に TORC2 (Target of Rapamycin Complex 2) [Cai *et al.*, 2010] の活性を, RasG は主に PI3 キナーゼ (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K) [Sasaki *et al.*, 2004] の活性を主に制御している. PI3K には Ras 結合ドメイン (Ras binding domain (RBD)) があり [Funamoto *et al.*, 2002], 活性型の RasG と結合し細胞膜上へと移動することで, リン脂質の一種である PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) をリン酸化し PIP₃ (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) を合成する. この逆の反応である PIP₃ を脱リン酸化する反応は PTEN (Phosphate and tensin homolog) が担っており, PI3K と PTEN の分布が PIP₃ の膜上の分布に大きく関与している [Huang *et al.*, 2003]. PIP₃ は特定の PH ドメイン (Pleckstrin homology (PH) domain) 構造を有するタンパク質と結合することができ, すなわち特定のタンパク質を細胞膜上に移動させ活性化する役割がある. TORC2 は, TOR, Lst8, Rip3, PiaA からなるタンパク質複合体であり, そのいずれのタンパク質を欠損させても, 走化性応答に異常が見られることがわかっている [Lee *et al.*, 2005]. TORC2 は主に PKB (Protein kinase B) の活性を制御する [Lee *et al.*, 2005; Kamimura *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2010]. PKB には, PKBA と PKBR1 の二種類が存在し, TORC2 は両方の活性に寄与すると考えられている [Cai *et al.*, 2010]. PKB の下流に位置する分子が有する機能の詳細は明らかになっていないが, その中の一つの分子の活性化が単量体のアクチンの重合反応を促進すると考えられている [Tang *et al.*, 2011]. PKBA は PH ドメインを有しているため PIP₃ の PKB 活性への寄与も考えられている [Meili *et al.*, 1999]. また, PKB により活性が制御されるタンパク質として, Sca1 がある [Charest *et al.*, 2010]. これは, GEFA 等と複合体を形成する足場タンパク質であり, 細胞外 cAMP の投与により膜へ移動することで RasC の活性上昇に寄与するとともに, PKB による Sca1 のリン酸化により GEFA の活性が低下することから, RasC の活性を抑制するはたらきも持つと考えられている.

cAMP の濃度勾配の存在下で細胞が cAMP の高濃度側へと移動するときの細胞内分子の動態

について、図 2.3 に概略を示す。Ras や PI3K は高濃度側の、PTEN は低濃度側の細胞膜上に局在することで細胞内における PIP₃ の濃度勾配が形成される [Sasaki and Firtel, 2006; Funamoto *et al.*, 2002]. これにより高濃度側の細胞膜の付近で F-アクチンの樹状フィラメントの新規生成が促進され、細胞膜を押すことで仮足を伸ばして移動する。低濃度側では、ミオシン II の活性が促進されることにより細胞膜を内側に牽引する力がはたらく。また、細胞外に cAMP を投与しない状況で細胞が自発的に運動する際、Ras と PI3K の自発的な活性化がアクチンの重合による仮足の伸長が行われている部位と同じ場所で起こること、また PI3K の活性を薬理的に阻害すると自発的な Ras の活性上昇が制御されていることなどから、PI3K とアクチンがフィードバックループを形成していると考えられている [Sasaki *et al.*, 2007]. 動物細胞においてアクチン重合を阻害したときに PIP₃ の量が減少することから、他種の細胞でもアクチンが関与するフィードバック機構の存在が予想されている [Inoue and Meyer, 2008]. しかし、*Dictyostelium discoideum* のアクチンの重合を阻害したとき、細胞外 cAMP に対する RasG 活性上昇の動態はコントロールと比較して違いが見られなかった [Takeda *et al.*, 2012]. このフィードバックループを構成する分子の詳細は明らかになっていない。

アデニル酸シクラーゼ (Adenylyl cyclase, AC) はアデノシン三リン酸 (ATP) から cAMP を合成する [Pitt *et al.*, 1992]. 粘菌においては ACA, ACB, ACG の 3 種類存在するが、集合期の細胞の cAMP 産生は膜 12 回貫通型の ACA が主に担っている [Saran *et al.*, 2002; Kriebel and Parent, 2004]. PIP₃ が活性を調節するタンパク質には PH ドメインを有するタンパク質の一つ CRAC (Cytosolic regulator of adenylyl cyclase) も含まれている。PIP₃ と結合することで CRAC が細胞膜上に局在し、このことが ACA の活性化に必須である [Parent *et al.*, 1998]. また、PKBA と PKBR1 の両方を欠損すると ACA の活性が抑制されることから、ACA の活性には PKB の活性も必要であると考えられている [Cai *et al.*, 2010]. RasC を欠損した株では cAMP の産生が抑制され [Bolourani *et al.*, 2006], また、RasG ではなく RasC の活性が PKB の活性に大きく寄与する [Cai *et al.*, 2010]. さらに、TORC2 を構成する PiaA を欠損すると cAMP の産生が抑制されることから [Chen *et al.*, 1997], RasC・TORC2・PKB の経路が ACA の活性の制御を主に担っていると考えられる。一方、PI3K 活性の阻害により cAMP の産生が抑制されるとの報告 [Loovers *et al.*, 2006] もあることから、RasG・PI3K の経路の寄与もまた小さくはない。また、MAP キナーゼである ERK2 が ACA の活性に必須であることもわかっている [Segall *et al.*, 1995]. 細胞が強い極性を持つとき ACA は細胞の進行方向の後ろ側の細胞膜上に局在することが知られている [Kriebel *et al.*, 2003]. CRAC や PKB は高濃度側に局在することから [Parent *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001], これらのタンパク質がどのように ACA と相互作用して ACA の活性を制御しているかについては謎である。

合成された cAMP は細胞外に分泌されるか、細胞内 PDE である RegA によって分解される [Thomason *et al.*, 1998]. cAMP の分泌の機構については主に二つの可能性が示唆されている。一

つは, ACA をその膜に含む小胞内に cAMP が蓄積されエキソサイトーシスにより分泌されるとするものである[Maeda and Gerisch, 1977; Kriebel *et al.*, 2008]. もう一つは, 細胞膜上の ABC (ATP Binding Cassette) 輸送体によるものである[Miranda *et al.*, 2015]. 分泌された cAMP は隣接する細胞に受容されるが, PDE は細胞外にも分泌されており細胞外の cAMP を分解する. このように, 細胞質中で cAMP を合成し分泌し, また細胞外 cAMP を分解することで, 集合過程における細胞外 cAMP 濃度の増減が引き起こされる.

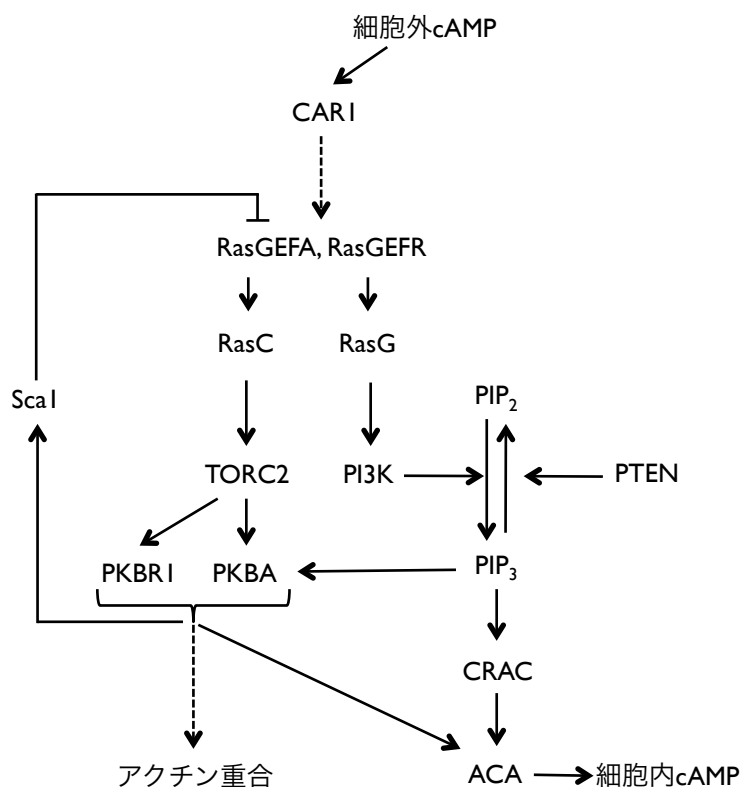


図 2.2: 細胞性粘菌の走化性応答と cAMP リレー応答を担うシグナル伝達機構の概略. 実際はこの他にも様々な細胞内因子が存在する. RasG は主に PI3K の活性を, RasC は主に TORC2 の活性を制御する.

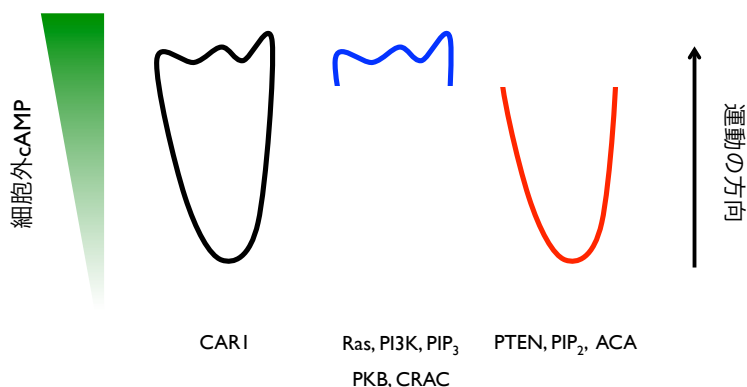


図 2.3: 走化性応答する細胞における細胞内分子の分布. cAMP の濃度勾配が存在するとき (図において上側が高濃度), CAR1 は細胞膜上に均一に存在するが (左), Ras, PI3K は高濃度側に局在することで高濃度側で PIP₃ が多く産生される (中央). PTEN は低濃度側に局在し PIP₂ の量も多い (右). 細胞が強い極性を持つとき ACA は進行方向の後ろ側に局在する (右).

2.4 節 応答のダイナミクス

細胞外 cAMP の投与に対して、走化性応答や cAMP リレー応答のシグナル伝達機構を構成する分子の中で、Ras より下流に位置する分子は適応的な応答を示すことが知られている [Swaney *et al.*, 2010]. 時間変化しない一定量の入力に対して出力が一過的に上昇し時間の経過とともに出力のレベルが減少するような応答を、適応応答と呼ぶ。環境の変化が段階的に起こるような状況のとき、さらなる変化を感知するのに適応応答は有用である。このような適応現象は自然界に広く見られ、例えば大腸菌の走化性応答に見られる [Berg and Tedesco, 1975]. 細胞性粘菌においては、特に、RasG の活性や PI3K による PIP₃ の産生について、細胞外 cAMP に対する一細胞レベルの応答が適応的であることが生細胞観察によって明らかになっている [Xu *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2012]. ヘテロ三量体 G タンパク質の Gα2 サブユニットと Gβ サブユニットにそれぞれ CFP と YFP を連結させたものを用いた FRET 計測によると、持続的な cAMP の投与に対してヘテロ三量体 G タンパク質のサブユニットは解離した状態を持続させるため、従って適応しない応答であると言える [Janetopoulos *et al.*, 2001].

cAMP リレー応答についても、同様に適応的であることは示されてきた [Devreotes *et al.*, 1979; Devreotes and Steck, 1979; Dinauer *et al.*, 1980a,b,c; Theibert and Devreotes, 1983]. 細胞が分泌する cAMP や PDE の影響を除外するために灌流系を使用して、また分泌される PDE の活性を抑制す

る薬剤を投与して、生細胞の cAMP リレー応答の測定が行われてきた。放射性同位体で標識した餌で培養することで与えた cAMP と分泌された cAMP を区別し、細胞の cAMP 分泌量を測定した。nM から数十 μ M の濃度の cAMP を投与して、2~3 分で cAMP の分泌量が最大となり 3~10 分で cAMP を投与する前と同じ状態まで戻る様子が示された。すなわち適応的な応答であった。

以上の報告は細胞集団に対して測定されたものであったが、生細胞観察の技術の向上により一細胞レベルでの cAMP リレー応答の測定が可能になった [Gregor *et al.*, 2010]。1 nM 以下の濃度の細胞外 cAMP を与えると一過的に細胞内 cAMP 濃度が上昇した。また、10 nM 程度の濃度の細胞外 cAMP を与えると細胞内の cAMP 濃度は周期 2~5 分で増減を繰り返しその振幅は cAMP を与える前のレベルにまで徐々に減少した。また、100 nM 以上の濃度で与えると細胞内の cAMP 濃度は同様に周期的に変動し、その振幅は cAMP 溶液を与え続ける数十分間は常に一定であった。この周期的な細胞内 cAMP 濃度の変動は、各細胞間で位相が揃っているわけではないため、細胞集団の平均として観察したときにはこのような周期的な変動は観察できなかったと考えられる [Kamino *et al.*, 2011]。この細胞内 cAMP の周期的変動の意義については明らかになっていないが、細胞集団が自己組織的に cAMP の濃度場を形成する現象を理解する上で、cAMP リレー応答のこのような非線形性を精査することは重要である。

また、細胞性粘菌においても機械的シグナルに対して応答する報告は存在する。マイクロアスピレーターにより細胞の一部を吸引し局所的に形状を変化させたとき、PTEN がその地点に集積することでミオシン II の活性が上昇し、ミオシンとその他のアクチンを架橋するタンパク質 (Cortaxillin や α -アクチニン) とが生じさせる力により膜を牽引するとの報告がある [Pramanik *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2013]。また、細胞が接着する基質を人為的に繰り返し伸縮させたとき、それと垂直な方向に細胞が運動するとの報告もある [Iwadate and Yumura, 2009]。

2.5 節 本研究の趣旨

これまで述べてきたことで特筆すべきことは以下のことである。1: 機械的シグナルに対して細胞内シグナル伝達機構の構成分子が応答する事例がある。2: 細胞性粘菌の集合過程において細胞集団の cAMP 振動と細胞の運動との間に強い相関関係が存在する。3: 走化性応答と cAMP リレー応答において、それらのシグナル伝達機構は共有されている。4: アクチンが関与する正のフィードバック機構の存在が予想されている。5: 一細胞レベルの cAMP リレー応答は、一定濃度の細胞外 cAMP に対して周期的な応答を示す。これらのことを踏まえると、F-アクチンが

寄与する細胞運動と cAMP リレー応答との間に何らかの相互的な制御が行われている可能性が期待される。集合過程において、自己組織的に形成された cAMP 濃度の進行波により細胞の走化性運動が生じることから、cAMP リレー応答が細胞運動に寄与することは明白である。また、走化性応答において、ACA が細胞の後端へと局在し、細胞の後端でより多くの cAMP を産生し分泌することで、その細胞に追従するような別の細胞の運動を誘起すると期待されている [Kriebel *et al.*, 2008]。さらに、ACA を欠損した細胞において細胞の側方仮足が頻発することから、細胞内 cAMP に依存して細胞の側方仮足の形成が抑制されることで運動の一方向性に寄与するとの報告がある [Stepanovic *et al.*, 2005]。しかし、細胞集団の cAMP 振動や一細胞レベルの cAMP リレー応答の細胞運動依存性についての知見は乏しい。また、機械的シグナルについての影響についても明らかにされていない。

シグナル伝達機構を構成する分子の活性が F-アクチンにどのように依存するかについても、調べられている。生化学的アッセイから、細胞外 cAMP による RasC の活性上昇はアクチン重合の薬理的阻害により抑制されることが示されている [Charest *et al.*, 2010]。また、生化学的アッセイから、細胞外 cAMP 投与による ACA 活性の上昇がアクチン重合の薬理的阻害により抑制されることが報告されている [Kriebel *et al.*, 2008]。これは、アクチンの重合を阻害することにより cAMP リレー応答が抑制されることを示唆するものである。しかし、アクチン重合と cAMP 振動や cAMP リレー応答との関係を、生細胞を用いて定量的に解析した報告が無く、cAMP 振動や cAMP リレー応答に対するアクチン重合の寄与に関する知識は乏しいのが現状である。

本研究では、アクチン重合の阻害や細胞と基質との接着性を変えることで細胞運動に攪乱を生じさせ、このときに細胞集団の cAMP 振動や一細胞レベルの cAMP リレー応答がどのように変化するかを、生細胞観察により検証した。加えて、cAMP リレー応答と F-アクチンの量や細胞の形状等との量的関係を明らかにし、細胞運動の cAMP リレー応答への寄与を理解することを目的とした。

第3章 手法・材料

3.1 節 細胞株, 培養・飢餓条件

細胞内 cAMP 濃度の変化の測定には, 一分子 FRET (蛍光共鳴エネルギー移動, Fluorescence Resonance Energy Transfer) に基づく cAMP センサーである蛍光タンパク質 Epac1-camps [Nikolaev *et al.*, 2004]の遺伝子を恒常的に発現する無菌培養株 Epac1-camps/AX4 を用いた [Gregor *et al.*, 2010]. これは *Dictyostelium discoideum* の変異株で無菌培養が可能である AX4 を親株としており, アクチン 15 のプロモーター (pA15) の制御の下で薬剤 (G418) 耐性遺伝子と Epac1-camps の遺伝子が恒常的に発現されるように遺伝子導入された株である [Gregor *et al.*, 2010]. Epac1-camps は, ヒト由来タンパク質 Epac1 の cAMP 結合ドメインに CFP と YFP を連結したもので, cAMP の結合に起因するコンフォメーションの変化により二種の蛍光タンパク質間の距離が変化することを利用している. 近接した二種類の蛍光物質があるとき, 短波長寄りの励起スペクトルを持つ蛍光物質の励起光を当てると, そのエネルギーが近接した他方の蛍光物質に移動し, 結果として長波長寄りの励起スペクトルを持つ蛍光物質の蛍光が強く観察される. これを FRET と呼ぶ. 図 3.1 に概略を示す. 細胞内の F-アクチンの動態との同時可視化には, F-アクチンのプローブとして知られる Lifeact [Riedl *et al.*, 2008] に粘菌で多用されている赤色蛍光タンパク質 mRFPmars [Fischer *et al.*, 2004] を連結したもの [Lemieux *et al.*, 2014] (Lifeact-mRFPmars, David Knecht 博士から供与) を共発現させた株を用いた. Lifeact は, 出芽酵母由来のタンパク質 Abp140 における 17 アミノ酸残基からなるアクチン結合ドメインであり, これに蛍光タンパク質を連結したものは, 細胞内におけるアクチンの動態への干渉がほとんど無いとされている [Riedl *et al.*, 2008]. また, その細胞内分布はファロイジンをを用いた固定染色により可視化した F-アクチンの

細胞内分布とよく一致していることがわかっている[Riedl *et al.*, 2008].

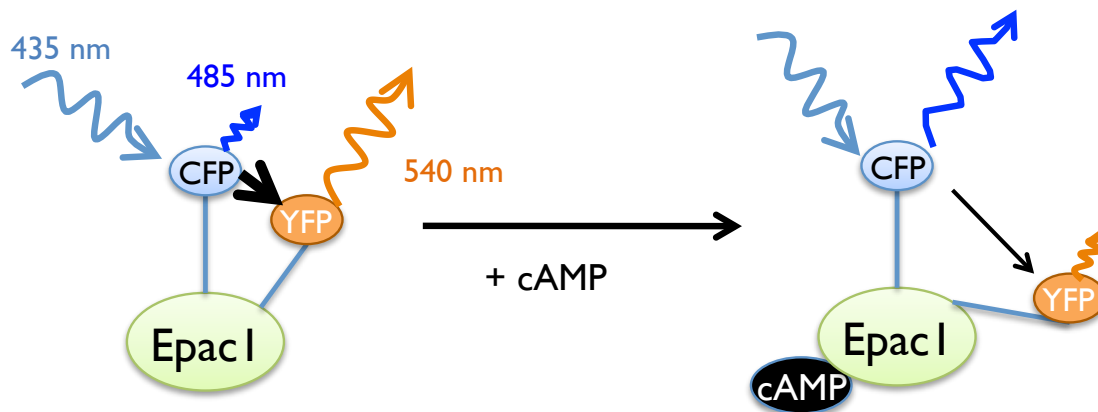


図 3.1: Epac1-camps. 図中の「Epac1」は Epac1 の cAMP 結合ドメインを表す。cAMP の結合による構造変化により CFP と YFP の間の距離が増大し、FRET 効率が低下する。

Lifect-mRFPmars を共発現させた株は以下のような手順で島田奈央博士、中島明彦博士が作製したものを用いた。なお、共発現株作製にあたって使用したプラスミド、大腸菌株、細胞性粘菌株はいずれも澤井研究室にて作製され保存されていたものである。Act15 プロモーター、mRFP1 の遺伝子、2H3 ターミネーターを含むプラスミド (ハイグロマイシン B(HygB)耐性用カセットを含む) に *Bgl* II サイトを作り、プロモーター領域とターミネーター領域に挟まれた部分を切断し、*Cla* I と *Xho* I の制限酵素サイトを含むオリゴヌクレオチドをそこに挿入することで、プラスミド pHygEX-C/X を作製した。このプラスミドの *Cla* I / *Xho* I サイトに、別のプラスミドの RFPmars の遺伝子の断片 (*Cla* I サイト、*Xho* I サイトを含む) を挿入することで、バックボーンとなるプラスミド pHygEX-C/X-RFPmars を作製した。このプラスミドを *Cla* I の地点で切断し、両端に *Cla* I サイトを付加した Lifect オリゴヌクレオチドをライゲーションした。こうして作製したプラスミド pHygEX Lifect-mRFPmars を Epac1-camps/AX4 株に導入した。形質転換とクローニングはエレクトロポレーション法により行った[Nellen *et al.*, 1984].

これらの株を、PS 培地 (組成: 1% peptone (LP0072, OXOID), 0.7% yeast extract (LP0021, OXOID), 1.5% D-glucose, 10 mM KH_2PO_4 , 0.24 mM Na_2HPO_4 , 1x antibiotic antimycotic mix (15240-112, Gibco), 40 ng/mL vitamin B12, 80 ng/mL folic acid) にて、典型的には 10 mL の培養液を 50 mL チューブに入れて 22 °C で振盪培養した。倍加時間はおおよそ 12 時間であり、1/4~1/5 で継代培養した。2.0×10⁶ cells/ml を超えないよう注意した。プローブ発現株の選択には、10 μg/mL G418 (G-418 硫酸塩(078-05961, Wako)を超純水に 10 mg/mL の濃度で溶解したものをストック

溶液として使用)と 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygB (Hygromycin B, Streptomyces sp.(400051-1MU, Calbiochem, 約 400 mg/mL)をストック溶液として使用)を抗生剤として用いた。

生細胞観察する際は、栄養成長期の細胞 (約 $1.0\sim 2.0\times 10^6$ cells/ml) を $4\text{ }^\circ\text{C}$ に冷却したバッファー (Developmental Buffer (DB), 組成: 6 mM KH_2PO_4 , 4 mM Na_2HPO_4 , 2 mM MgSO_4 , 0.2 mM CaCl_2 , pH 6.5) で 2 回洗浄 ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 700G, 3 分で遠心し, 上清を捨て再び DB に懸濁する) し, 細胞密度 2.0×10^7 cells/mL となるよう 1 mL の DB に懸濁し, 4 時間 30 分から 5 時間程度振盪した (この操作を飢餓処理と呼ぶ)。DB 寒天上で細胞集団の cAMP 振動を観察する際は, DB に懸濁した直後に懸濁液を DB 寒天上に乗せ, 細胞を寒天に貼りつかせた後に上清を除去した。PS 培地と DB は, $120\text{ }^\circ\text{C}$ で 20 分間オートクレーブ滅菌, もしくはフィルタ滅菌処理したものを使用した。DB 寒天は, DB に質量比で 1 %の Bacto agar (BD) を混ぜたもので, 60 mm シャーレに, 厚みが約 3 mm となるように作製した。

細胞への刺激として与える cAMP 溶液は, cAMP \cdot Na 塩 (A6885-100MG, Sigma) をフィルタ滅菌した超純粋に 100 mM の濃度で溶解したものをマスターストックとした。マスターストックは 100 μL ずつ小分けして $-30\text{ }^\circ\text{C}$ で保存した。実験で使用する際の cAMP 溶液の濃度は 300 pM から 1 μM であるため, マスターストックを DB で希釈し 10 μM もしくは 100 nM としたものを用意し, 1 mL ずつ小分けしたものを用意した ($-30\text{ }^\circ\text{C}$ で保存)。

細胞のアクチン重合の阻害には, 阻害剤であるラトランキュリン A (Latrunculin A, LatA, 125-04363, Wako) を溶液に加え送液した。粉末状の LatA をジメチルスルホキシド (DMSO, 047-29353, Wako) に 500 μM で溶かし分注することでストックとし, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ で保存した。LatA は海綿 (*Latrunculia magnifica*) から単離された毒素の一つで, アクチン単量体 (G-アクチン) と結合することにより ATP の結合が抑制されることで単量体同士の重合反応を妨げる [Spector *et al.*, 1983; Yarmola *et al.*, 2000]。LatA は 2.5 μM の濃度で粘菌に投与するとアメーバ運動をしていた細胞は仮足を伸長することができなくなり, 丸まり即座に運動性を失うという報告がある [Thompson *et al.*, 2004]。LatA の最高濃度はその他の多くの先行研究 (例えば [Sasaki *et al.*, 2004; Kriebel *et al.*, 2008]) で使われている濃度 5 μM とした。いかなる濃度の LatA 溶液を用意する場合でも DMSO の濃度が等しくなるように, 送液する溶液に適宜 DMSO を加えた (DMSO 濃度は最高で 1 % (体積比))。

同じく海綿から単離された別のアクチン重合阻害剤であるラトランキュリン B (Latrunculin B, LatB, 129-05101, Wako) も使用した。同様に 2 mM の DMSO 溶液をストックとして作製し, $-30\text{ }^\circ\text{C}$ で保存した。LatB は LatA とよく似た構造を持ち同様な作用機序でアクチンの重合を阻害するが [Spector *et al.*, 1983], 効能は LatA と比べて弱く [Spector *et al.*, 1989], LatA と同程度の阻害の度合いを実現するためには, より高い濃度で投与する必要がある。LatB の最高濃度は 20 μM とした。

PI3K の活性の阻害には、LY294002 (LY, 129-04861, Wako) を用いた。LY は、PI3K の ATP 結合部位に結合することでその酵素活性を阻害する[Vlahos *et al.*, 1994]。LatA と同様に 5 mM の DMSO 溶液をストックとして作製し、 -30°C で保存した。LY は $12.5\ \mu\text{M}$ の濃度で投与すると PKB の活性が 90 % 以上抑制されるとの報告がある[Meili *et al.*, 1999]。LY の最高濃度はその他の多くの先行研究 (例えば[Loovers *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2007]) で使われている濃度 $50\ \mu\text{M}$ とした。

微小流路内での溶液の置換の様子を観察のためにフルオレセイン溶液を用いた。ウラニン (フルオレセインナトリウム, 231-00092, Wako) を DB に 1 mM となるように加えて溶解させ 4°C で冷蔵保存した。使用時における濃度は $1\ \mu\text{M}$ とした (DB で希釈)。

3.2 節 蛍光顕微鏡観察

細胞内に発現した蛍光プローブ由来の蛍光を検出するため、蛍光顕微鏡を用いた。倒立型蛍光顕微鏡 (IX81 または IX83, オリンパス) を用いた。図 3.2 に概要を示す。細胞内 cAMP 濃度レベルのみを測定する際はキセノンランプ (UXL-75XB, ウシオ電機) を光源として使用し、落射照明で観察した (細胞の落射照明蛍光像は図 5.14 を参照)。CFP に対する単一の励起光に対して CFP と YFP の蛍光画像を取得するため、435 nm の励起フィルタ (BP425-445HQ), ダイクロミックミラー (DM450), 460~510 nm と 515~560 nm のバンドパスフィルタ (BA460-510HQ と BA515-560HQ) を使用した (いずれもオリンパス)。

Lifeact-mRFPmars の細胞内での動態を同時に可視化する際は、高速共焦点スキャニングユニット (CSU-X1, 横河) を用いた共焦点蛍光観察を行った。共焦点顕微鏡ではレーザー光源を用い、焦点面の 1 点のみを励起し試料からの蛍光をピンホールに通すことで焦点の合っていない面から発せられる光を除外し、焦点面の蛍光のみを検出する (細胞の共焦点蛍光画像は図 7.3 を参照)。試料に対して多点を同時に励起しスキャニングできるニポウディスク方式を採用することで、試料の焦点面を 1 点ずつ励起するガルバノミラー方式に比べて焦点面上の全体のスライス像を高速に得ることができる。光源として半導体レーザーを用い、Epac1-camps の CFP の励起には 445 nm のレーザー (出力 80 mW, Vortran Laser Technology), Lifeact-mRFPmars の励起には 561 nm のレーザー (出力 75 mW, Melles Griot) を用い、575 nm のバリアフィルタ (BA575IF, オリンパス) を RFP の蛍光フィルタとして用いた。各波長の蛍光画像は逐次的に取得した。焦点面は、細胞の基質接着面から約 $2\ \mu\text{m}$ の距離の面とした。

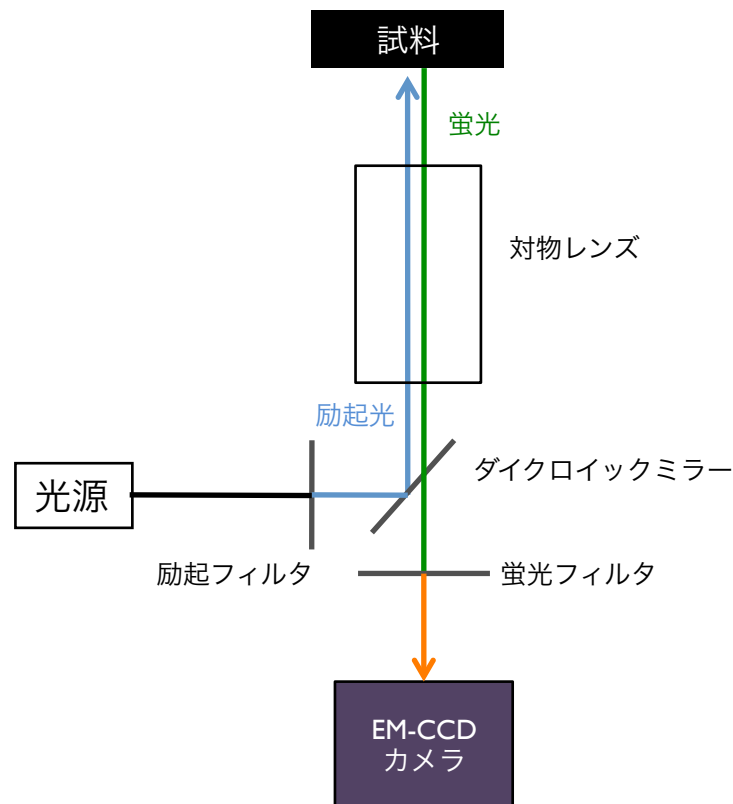


図 3.2: 蛍光顕微鏡の概略図. 共焦点ユニットを用いる場合は光源からの光は共焦点ユニットを通りそれから励起フィルタに至る.

また、基質接着面近傍での Lifeact-mRFPmars の動態を可視化する際には、全反射照明蛍光顕微鏡（TIRF 顕微鏡）を使用した。図 3.3 に概要を示す。TIRF 顕微鏡を用いると、試料を接着させたガラス面に対して反対側からレーザー光を全反射させ、試料側へとしみ出すエバネッセント場により蛍光物質を励起させることで、基質接着面近傍での蛍光物質の動態を測定することができる（細胞の TIRF 画像は図 7.11, 図 7.12 を参照）。励起には 560 nm のレーザーを搭載した Laser combiner system (Andor) を用いた。ダイクロイックミラー（488 nm/561 nm dual DM）と蛍光フィルタ（バリアフィルタ, BA575IF）を用いた。各波長の蛍光画像は逐次的に取得した。レーザー光の入射角は 66.4° とした。理論的にはこのとき 107.5 nm のレーザー光のしみ出しが生じる。

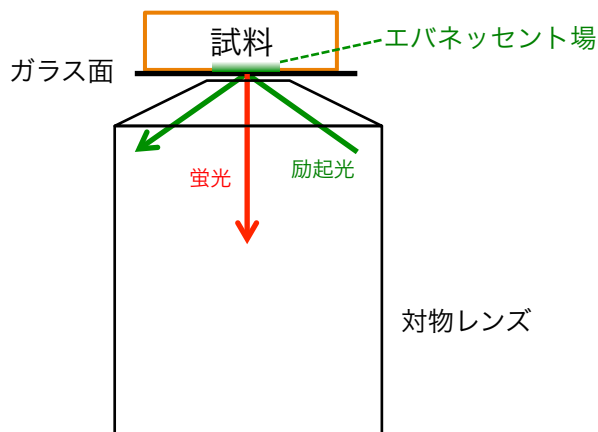


図 3.3: 全反射照明の概略図. エバネッセント場の形成により基質接着面近傍でのみ蛍光物質を励起させる. 専用の対物レンズを用いた.

これら顕微鏡には, 電動ステージ (シグマ光機), フィルタホイール (MAC5000 で制御, Ludl), 電動シャッター (Ludl), EM-CCD カメラ (CASCADE II または Evolve512, Photometrics) を搭載しており, これらを用いた. 対物レンズは, 落射照明による観察には 20x oil UPlanSApo NA0.85, 20x air PlanApoN NA1.42, 60x oil PlanApoN NA1.35 を, 共焦点顕微鏡による観察には 60x oil UPlanSApo NA1.42, 100x oilUPlanSApo NA1.40 を, TIRF 顕微鏡による観察には 100x oil TIRF UApoN NA1.49 を用いた (いずれもオリンパス). 励起光に対する細胞へのダメージを抑制するために ND フィルタを用いて 6~25% に減光した. これらの電子機器を PC に接続しアプリケーションソフト Metamorph (Molecular Device) により制御することで, タイムラプス間隔 4 秒から 30 秒で, 512×512 ピクセルの 16 ビットグレースケールの TIFF 形式の画像ファイルを取得した.

微小流路の実用性の検証のため, 微小流路中のフルオレセイン溶液の輝度値の測定を行った (3.6 節参照). その際は, 4 倍の対物レンズ (4x UPlanFLN NA0.13, オリンパス) を用いた. 蛍光物質フルオレセインの蛍光を観察する際は励起フィルタ (BP470-495), ダイクロイックミラー (DM505), 蛍光フィルタ (BA510-550) を使用した (いずれもオリンパス). 画像取得のタイムラプス間隔は 2 秒とした.

3.3 節 暗視野観察

寒天に乗せた細胞集団の cAMP 振動の観察のため, 暗視野顕微鏡を用いた. DB 寒天 (直径

60 mm) の中心にパスツールピペット (Fisher) の先端を用いて直径約 6.5 mm の穴を開け, その寒天上に, 細胞間で cAMP のリレーが行われるよう高密度 (約 1.67×10^5 cells/cm²) に細胞をまいた. 寒天の穴が視野の中心となるようにした. 22 °Cでの暗視野照明観察を, 細胞を乗せてから 1 時間後に開始した. 観察開始から 2 時間 30 分後に, DB で希釈した 5 μ M の LatA 75 μ L を穴に注入した. 暗視野照明による観察の概略を図 3.4 に示す. 対物レンズとしてマクロレンズ (M2514-MP2 2/3" 25 mm F1.4, Computar) を用い CMOS カメラ (PL-A741, PixeLINK) で試料からの散乱光を検出した. カメラは PC に接続し, 画像の取得は PixeLink capture OEM ソフトウェア (PixeLINK) を用いた. タイムラプス間隔 30 秒で, 8 ビットグレースケールの TIFF 形式の画像ファイル (640×640 ピクセル) を取得した. 暗視野照明観察で見られる光学密度の変化は cAMP 濃度上昇に伴う細胞の形状の変化に対応しており, 従ってその周期的変化は cAMP 振動を反映している [Gerisch, 1965; Futrelle *et al.*, 1982]. 暗視野観察した例を図 3.5 に示す.

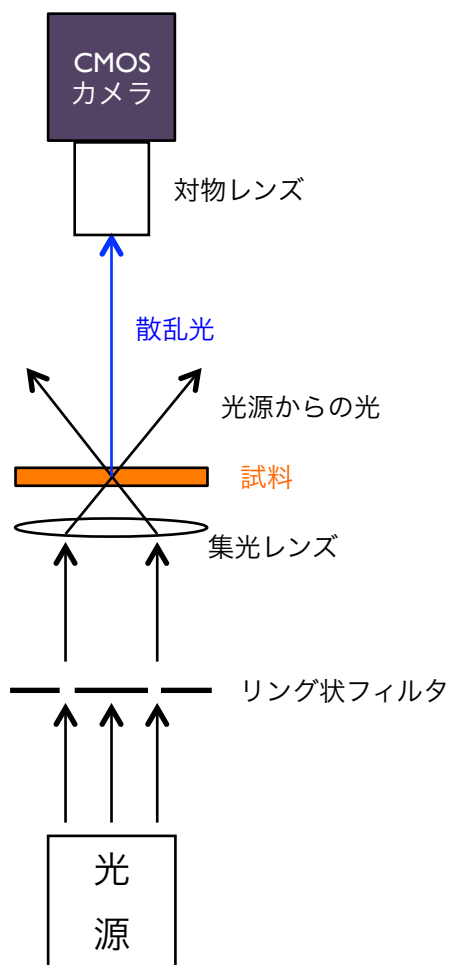


図 3.4: 暗視野照明による観察の概略図. 過去の文献[Gross *et al.*, 1976]を元に作図した. リング状のフィルタを通した光をレンズで集光し試料に当て, その散乱光をカメラで検出する.

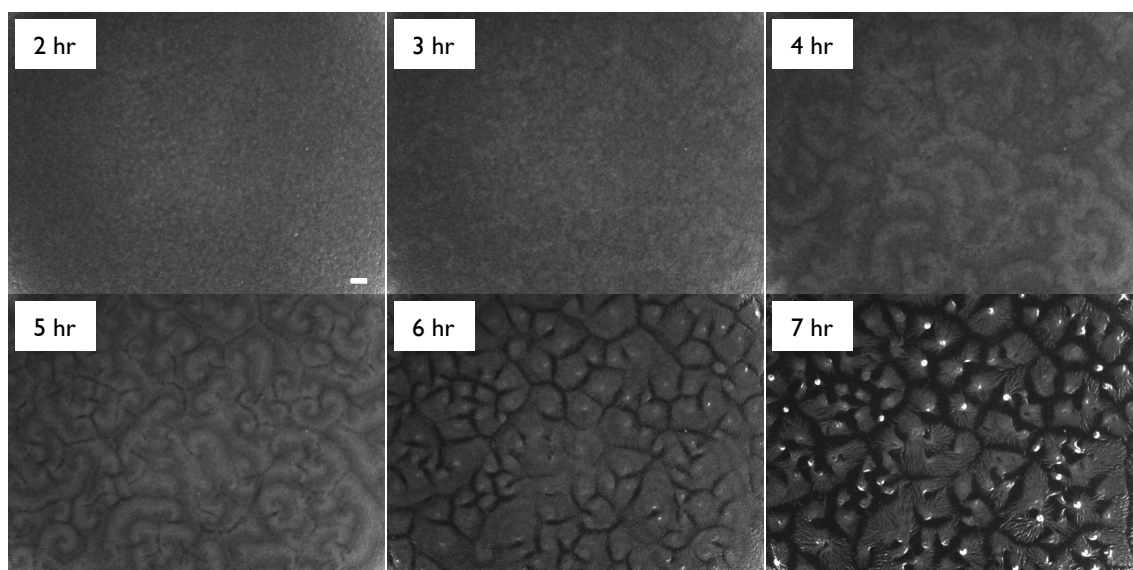


図 3.5: 細胞性粘菌の集合過程の暗視野画像. 光学密度の変化は cAMP 濃度上昇に伴う細胞の形状の変化に対応しており, 従ってその周期的変化は cAMP 振動を反映している. らせん波が形成され, その中心に向かって細胞は集合した. スケールバーは 1 mm を表す.

3.4 節 微小流路の作製

一細胞レベルの応答を観察する際は, 細胞外の物質の濃度を一定に保つために微小な流路内に溶液を灌流しながら観察を行った. これにより, 細胞自身が分泌する cAMP や PDE の効果を排除でき, 細胞外 cAMP 濃度を空間一様で時間的に階段状に変化させることができる. また, 使用する試薬の量を抑えられることも利点として挙げられる. 以下, 微小流路の作製方法を述べる.

フォトリソグラフィの技術を応用した手法を用いて, 微小流路を作製した[Whitesides *et al.*, 2001]. なお, 使用するスライドガラスとカバーガラスは, 断らない限り, すべて塩基性洗剤, エタノール, 強塩基水溶液で超音波洗浄 (超音波洗浄機(ASU-3, アズワン)を用いた) し, 140 °C で 40 分間乾燥したものである.

CAD ソフト (図脳 RAPID, フォトロン) を用いて流路の形状を設計した. この際, 輪郭や塗りつぶし等は全て円弧と線分のみで記述した. 描画図を図 3.6 に示す. これを DXF 形式ファイルとして保存し, これを基にレーザー直接描画装置 (DDB-201, ネオアーク) を用いてクロムとフォトレジスト AZ P1350 をコート済みのマスクブランクス (CBL4006Du-AZP, Clean Surface

Technology Co.) にレーザーを照射した。レーザー光の強度（ここでは $1.7\sim 3\text{ V}$ ），走査速度（ここでは $100\sim 300\ \mu\text{m/s}$ ），フォーカス（ここではフォーカスオフセット値 $-0.6\sim 1.6$ ）を調整することで数 μm から数十 μm 幅で基板にレーザー光を照射できる。マスクブランクスは、クロムを $1\ \text{k}\text{\AA}$ の厚みで、その上に AZ を $5.4\ \text{k}\text{\AA}$ の厚みでコートされた基板である。この基板に $408\ \text{nm}$ のレーザーを当てて現像液（NMD-3, 東京応化）に浸すことで、レーザーを照射された部分のレジストのみが溶解する。その上でクロムエッチャント液（MPM-P350, DNP ファインケミカル）に浸すことでその部分でのみクロムの溶解を行うことができる。最後にアセトン（012-00343, Wako）に浸してレジストを溶解することでフォトマスクを完成させた。

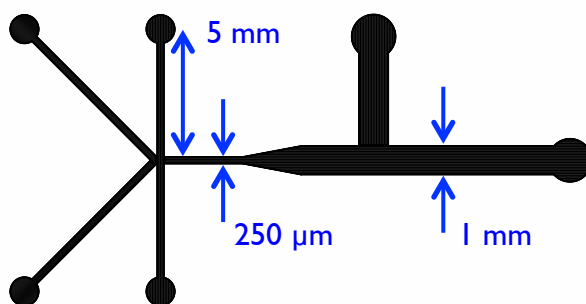


図 3.6: 流路のデザインを CAD ソフトで描画したもの。円弧と線分のみで表現している。このデザインを専用のアプリケーションで読み込ませて、レーザー描画を行った。

スピンのコーター（MS-A150, MIKASA）を用いて、スライドガラス（ $76\times 26\ \text{mm}$, Matsunami）上に $50\ \mu\text{m}$ 厚の SU-8 3050（MicroChem）約 $3\ \text{mL}$ をスピンのコート（ $500\ \text{rpm}$ で 5 秒間， $2800\ \text{rpm}$ で 30 秒間）し， $95\ ^\circ\text{C}$ のホットプレート（C-MAG HP 4, IKA）に 90 分以上乗せることで有機溶媒を蒸発させてガラスと接着させた。マスクライナー（MA-20, MIKASA）を用いて水銀ランプ（USH-500D, USHIO）を光源とする紫外線（UV）を、作製したフォトマスクを介して照射した（照射時間 15 秒）。 $95\ ^\circ\text{C}$ のホットプレートに 10 分乗せて紫外線を照射された SU-8 の架橋反応を促進させた後に現像液（SU-8 developer, MicroChem）に浸した。最後に 2-プロパノール（166-04831, Wako）に浸して白色沈殿が生じないことを確認して、モールドを完成させた。二層構造のモールドを作製する際（7.5 節で示すデバイスの作製のため）は、一層目（厚さ $100\ \mu\text{m}$ ，スピンのコート条件は $500\ \text{rpm}$ で 5 秒間， $1300\ \text{rpm}$ で 30 秒間）を UV 照射した後にその上に再び SU-8 をコートし（厚さ $25\ \mu\text{m}$ ，SU-8 3025 (MicroChem) を用い，スピンのコート条件は $500\ \text{rpm}$ で 5 秒間， $3000\ \text{rpm}$ で 30 秒間），UV を照射した。一層目と二層目を合わせて現像を行った。以上の工程を図 3.8 に示す。



図 3.7: レーザー直接描画装置とマスクアライナー.

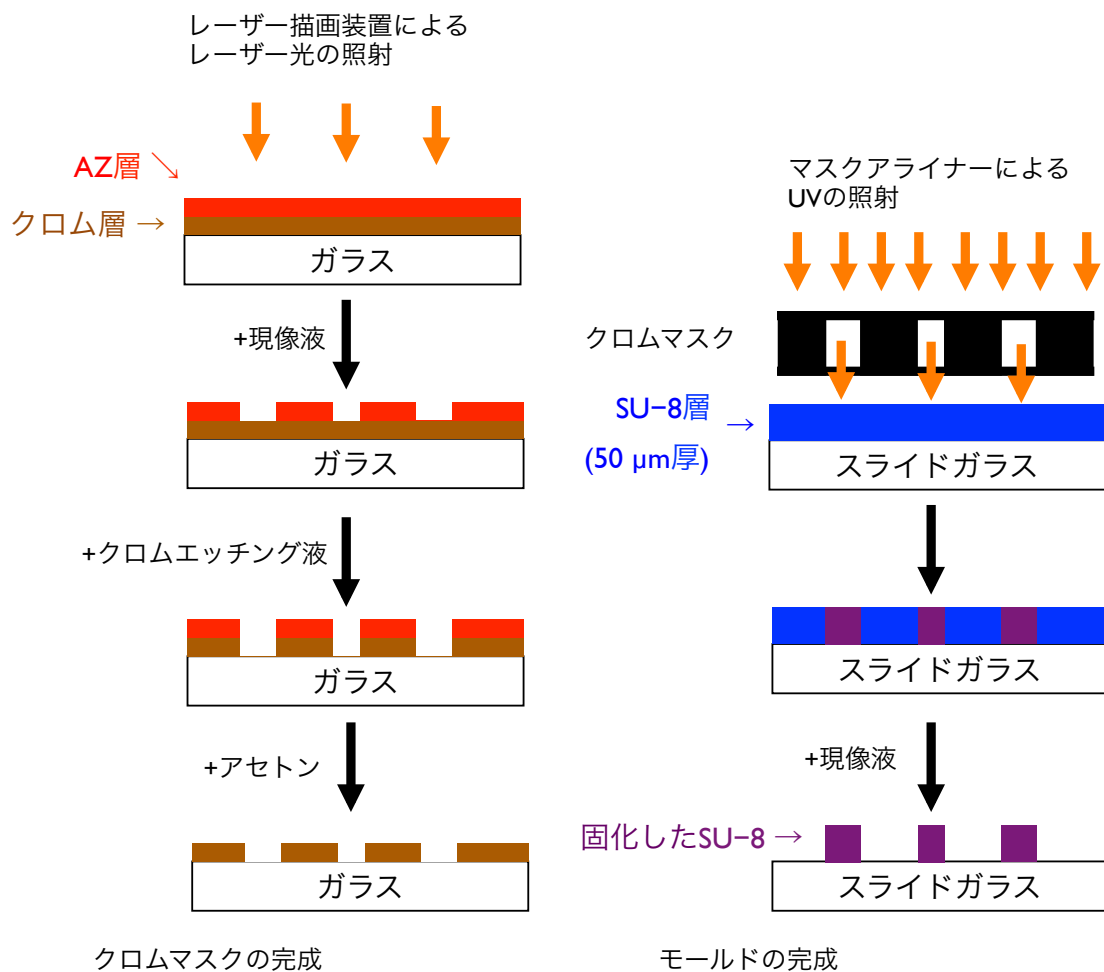


図 3.8: フォトリソグラフィの技術を利用した微小流路作製工程の一部。一面に蒸着されたクロムの層を、流路をかたどるように削ることでマスクとする。そのマスクを介して SU-8 をコートしたガラスに UV を照射することで、流路の領域のみ SU-8 が固化して残り、鋳型となる。二層構造のモールドを作製する際（例えば、7.5 節で示すデバイスの作製のため）は、過去の知見に従い[Mata *et al.*, 2006], 一層目を UV 照射した後にその上に再び SU-8 をコートし、UV を照射した。

作製したモールドを 90 mm シャーレに入れ、PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer Base)約 35 g とその 1/10 量の硬化剤(Sylgard 184 Silicone Elastomer Curing Agent)を約 10 分間よくかき混ぜたものをそのシャーレに流し込み、30 分以上脱気し 65 °C で 1 時間乾熱することで PDMS を硬化させた(厚さは約 5 mm となる)。カッターナイフで成形し、流路の端の地点に生検トレパン (BP-20F, 貝印) を用いて 2 mm 径の穴を開け、塩基性洗剤とエタノールで超音波洗浄を施したカバーガラス (32×24 mm No.1, Matsunami) を貼り付けることで、微小流路として使用した。完成した流路の写真を図 3.9 に示す。PDMS チップはカバーガラスを除いてエタノールで洗浄することで、

再利用した。

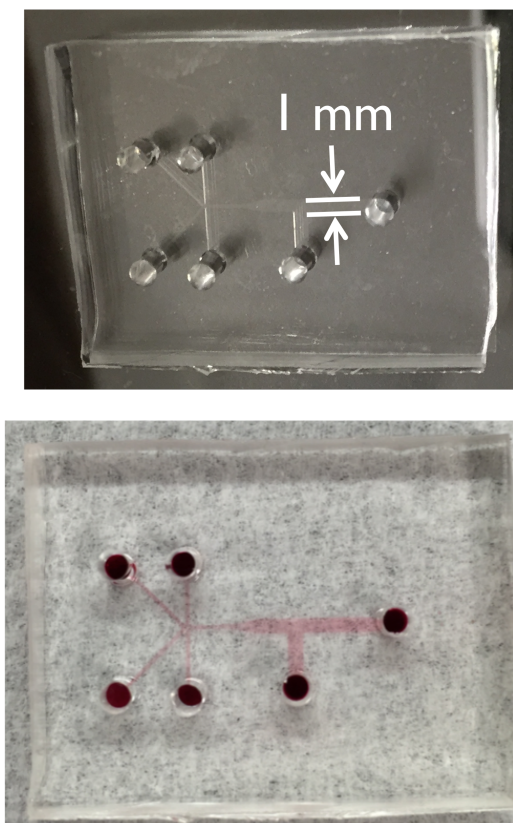


図 3.9: 完成した微小流路. 下図は, 流路内に 0.05 %ニュートラルレッド (Neutral Red, 140-00932, Wako) 溶液を導入した様子.

3.5 節 ガラス表面へのポリマーのコーティング

細胞の基質への接着性を変化させたときの細胞の応答を観察するため, ガラス表面の化学組成を改変した. 細胞の基質への接着を促進するために, ポリ-L-リジン (PLL) を用いた. PLL は正に帯電しており, 負に帯電している細胞膜との間に静電的な力がはたらく. この PLL をガラス基板にコートすることで, 細胞の基質への接着が促進される. ガラス表面にコートするために, 超音波洗浄したカバーガラス (No.1, Matsunami) に 9×9 mm のフレームシール (SLF0201, BIO-RAD) を貼り, その枠内に最大で $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の密度でコートされるように, 0.05 % PLL 溶液 (P4832, Sigma) を適宜超純水で希釈して滴下した. 図 3.10 に概要を示す. 微小流路内を PLL でコートする際は, PDMS チップをガラスに貼り付けた状態で, 開けた穴からピペットを用いて

PLL 溶液を導入した, 30 分静置した後に, 上清を除去し 2 時間以上静置することで乾燥させた. PLL をコートしたガラスは, コートした当日に使用した.

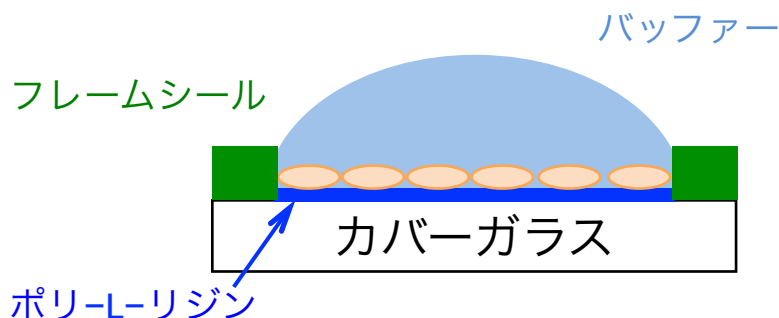


図 3.10: PLL をコートしたガラス上の細胞観察用のセットアップ. ガラスに貼ったフレイムシールの枠内を PLL コートした後に, 細胞を乗せた.

細胞の基質への接着を阻害するために, ポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール共重合体 (Pluronic F108, BASF 社, 以下プルロニックと呼ぶ) を用いた [Owens *et al.*, 1987]. プルロニックは両親媒性のポリマーであり, ポリプロピレングリコール部が疎水的な基質と接着し, 基質表面に露出したポリエチレングリコール部がタンパク質・細胞の接着を抑制する. ガラス表面にコートするために, まず超音波洗浄したカバーガラスにシラン処理を施した. n-ヘキシルメチルジクロロシラン (S09875, Wako) を用い, 90 mm シャーレの中に, 処理したいガラスと, 9×9 mm フレイムシールを貼った別のガラスを入れ, フレイムシールの枠内にシランを 5 μL 滴下し, 一晚脱気することでシラン処理とした. シラン処理したガラスに 9×9 mm フレイムシールを貼り, ガラスボトムディッシュのガラス部分と置換し, 1 mg/mL のプルロニック水溶液 (超純水に溶解) をディッシュ内に 3 mL 入れ, 30 分静置した. その後に, 表面を乾かさないうちに超純水で洗浄した. プルロニックをコートしたガラスは, 当日のみ使用した.

細胞の基質への接着領域を制限するために, プルロニックのガラス基板上へのパターンニングを行った [Tzvetkova-Chevolleau *et al.* 2009]. 超音波洗浄したカバーガラス (No.1, Matsunami) にポジティブフォトリソトである AZ P-1350 (AZ Electronic Materials) 500 μL をスピコート (500 rpm で 5 秒間, 2000 rpm で 25 秒間) し, 105~115 °C のホットプレートに 2 分間乗せて, 有機溶媒を蒸発させガラスと接着させた. 別に作製したクロムマスクを介して UV を照射 (80 mJ/cm^2) し, 現像した (現像液: NMD-3). 図 3.11 に概要を示す. マスクは, 光が透過する部分が 40 μm 間隔で幅 30 μm となるようなストライプ状の構造を持つものとした (マスク作製時の描画条件は, レーザー光強度は 3 V, 走査速度は 100 $\mu\text{m}/\text{s}$, フォーカスオフセット値は約 -0.5 ~ 0). 図 3.12 にレジストを現像したガラス基板の画像を示す. 実際には, UV の漏れ込み等の影

響によりレジストが溶解しなかった部分の幅が約 $6.5 \mu\text{m}$ となった（理想的には $10 \mu\text{m}$ となるはずである）。この基板を上述した方法でシラン処理した後にレジストをアセトンで全て溶解することで、シランのパターニングを完了させた。その後、上述した方法でプルロニックをコートすることで、シラン処理されなかった部分（幅約 $6.5 \mu\text{m}$ の部分）でのみ細胞が接着することになる。

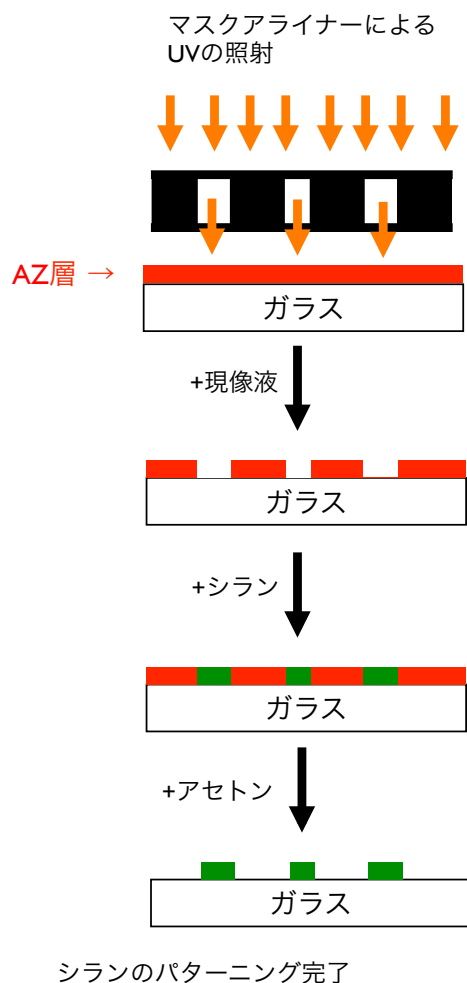


図 3.11: ガラス基板へのシランのパターニングの方法。マスクを介してフォトレジスト (AZ P1350) をコートしたガラスに UV を照射し現像する。その基板をシラン処理し、レジストを全て除去することでシランのパターニングを行う。シラン処理された部分でのみプルロニックがコートされるため、細胞の接着領域を制限できる。



図 3.12: レジスト (AZ P1350) をコートしマスクを介して UV を照射し現像したガラス基板。レジストが溶解しなかった部分 (幅の狭い領域) は, 約 $6.5 \mu\text{m}$ の幅を持った。レジストが溶解した部分 (幅の広い領域) でのみシランがコートされ, またプルロニックがコートされることになる。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ を表す。

3.6 節 灌流実験

実験で使用する数十分前に微小流路内を DB で満たした。一細胞レベルでの応答を測定する際は, 細胞間で分泌物の授受を行わないように, 流路内での密度が低密度 (約 $1.3 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$) となるように飢餓処理後 4 時間 30 分~5 時間の細胞懸濁液を流路内に導入し, 静置した。集団の cAMP 振動を観察する際は, 細胞間で cAMP の授受が行われるよう高密度 (約 $6.7 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$) に導入した。細胞が基質と接着した後に, 1 mL シリンジ (SS-01T, テルモ) を用いて, 適当な長さのチューブ (ラボランシリコンチューブ(9-869-02, アズワン), ヒビキポリエチレン細管 (No.3, クニイ), ETFE チューブ(6010-36505, ジーエルサイエンス)) を組み合わせ, シリンジポンプ (NE-1002X, New Era Pump Systems) を用いて一定の流速で流路内に送液した。LatA や LY 等の薬剤は細胞に cAMP を与える 30 分前から投与した。細胞を導入する前に LatA や LY の溶液のチューブを流路に接続しておく, 細胞を静置している間に LatA や LY が拡散するためチューブ内で空間的な濃度勾配ができる。そのため, 送液を開始すると流路内の LatA・LY 濃度は緩やかに上昇する。約 5 分間で目的の濃度まで上昇させた (代わりにフルオレセイン溶液を用いて流路内の蛍光強度の時間変化を観察することにより, これを確認した)。細胞への刺激として, cAMP 溶液と cAMP 非添加の DB を用意し流速を同時に切り替えることで, 流路内の

cAMP 濃度を階段状に変化させた。図 3.13 に概要を示す。流速は、一細胞レベルの応答を測定する際は常に $10 \mu\text{L}/\text{min}$ とした。細胞集団の cAMP 振動を観察する際は、 $100\sim 500 \text{ nL}/\text{min}$ とした。

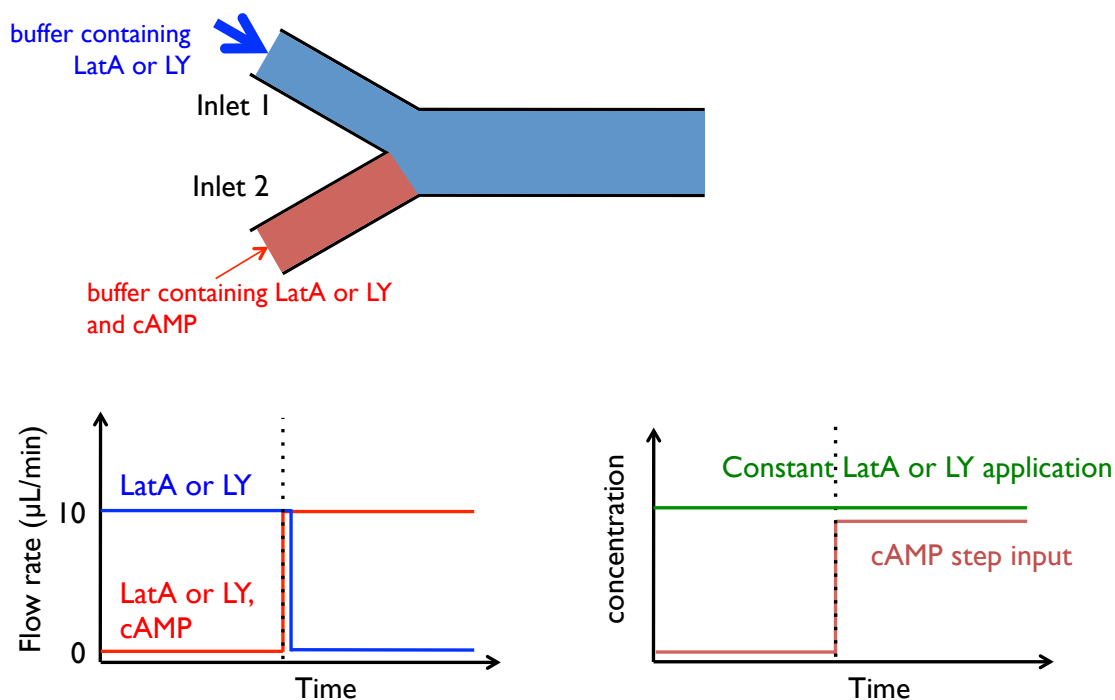


図 3.13: 灌流実験の概要図。二種類の溶液の流速を同時に変化させることで、階段状の濃度変化を実現する。

作製した微小流路が溶液の濃度の階段状の変化を実現しうるかの検証のため、蛍光物質であるフルオレセインの溶液を蛍光顕微鏡下で観察した。フルオレセインの分子量 (376.3) は cAMP の分子量 (369.2) とほぼ等しく、従って液中の拡散係数はほぼ等しいと考えられるため、フルオレセインの蛍光値を cAMP の空間的分布の指標とした。DB と $1 \mu\text{M}$ フルオレセイン溶液の流速を同時刻に切り替えた際の流路内の蛍光輝度の変化の様子を図 3.14 に示す。流速は $10 \mu\text{L}/\text{min}$ である。流路幅 1 mm の部分で撮影している。流路内は空間的に狭く低レイノルズ数の環境であるため乱流による二種類の溶液の混合は起こらず層流を形成し、流路の一方の端からもう一方の端へその境界が移動していることがわかった。約 40 秒で流路全体がフルオレセイン溶液で置換されていることがわかった。

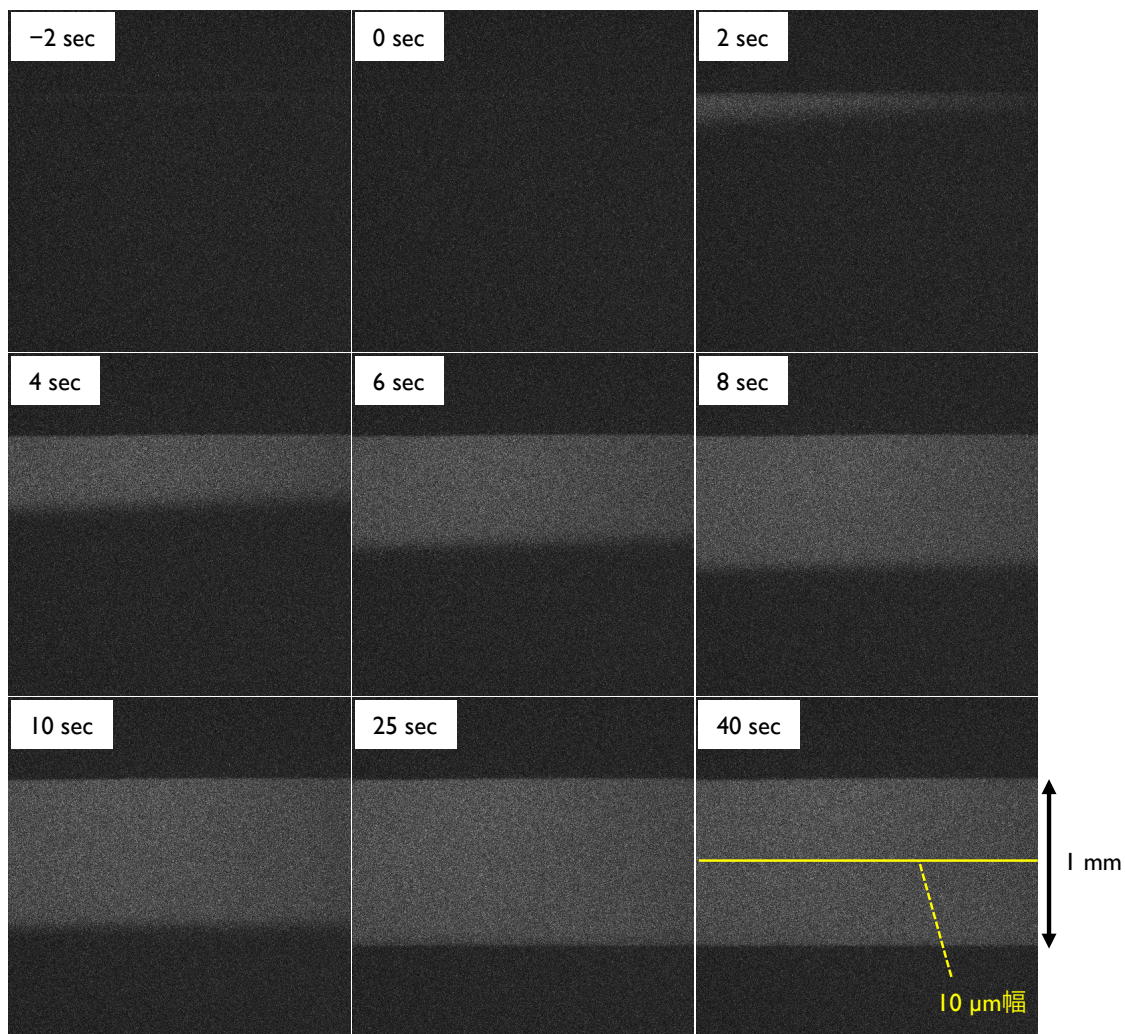


図 3.14: フルオレセイン溶液濃度の階段状の時間変化。流速は $10 \mu\text{L}/\text{min}$ である。シリンジポンプでの操作上で溶液の流速を切り替えた時刻を 0 sec としている。層流が形成され、その境界の位置が時間とともに移動した。

流路内中央の約 $10 \mu\text{m}$ 幅の領域（図 3.14 の黄色で示した領域）の輝度の時間変化を図 3.15 に示す。撮影間隔である 2 秒以内に溶液が切り替わっていることがわかった。細胞の大きさが約 $10 \mu\text{m}$ であるため、この流路内の細胞は約 2 秒で切り替わる時間的濃度変化を受けると考えられる。

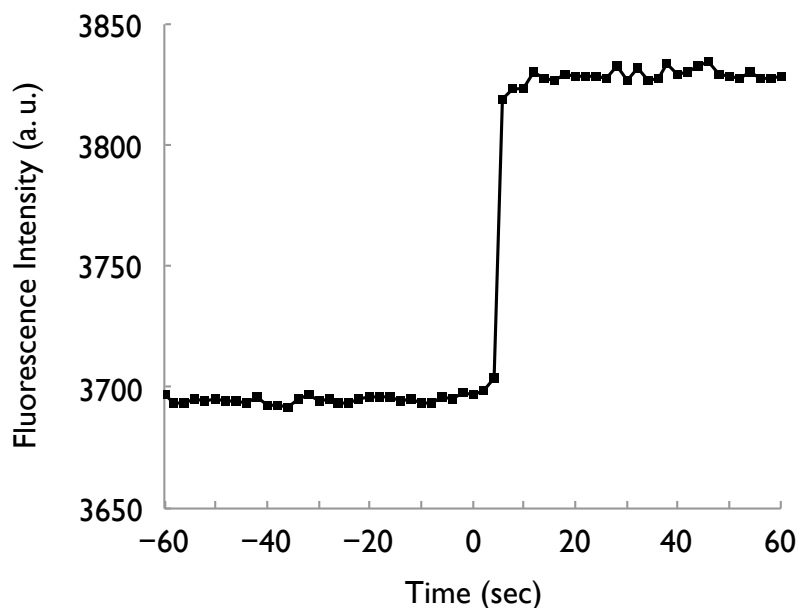


図 3.15: フルオレセインの蛍光輝度の時間変化. 流速は $10 \mu\text{L}/\text{min}$ である. 流路内中央の約 $10 \mu\text{m}$ 幅の領域 (図 3.14 の黄色で示した領域) の輝度値を求め, その時系列を得た. 時刻 0 秒で溶液の流速を切り替えた. 2 秒以内に溶液の置換を完了できる.

3.7 節 ガラスボトムディッシュを用いた実験

細胞集団の cAMP 振動を Epac1-camps を用いて観察する際は, ガラスボトムディッシュ上に細胞を乗せ, 蛍光顕微鏡を用いて観察した. ガラスボトムディッシュ (P35G-0-14-C, MatTek) のガラスが露出した円形部分 (直径 14 mm) に, 細胞間で cAMP の授受を行うよう高密度 (約 $1.67 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2$) になるように飢餓処理後 4 時間 30 分~5 時間の細胞懸濁液 ($250 \mu\text{L}$) を乗せた. DB に浸した状態で上清を除去せずに, 灌流しない状態で観察した. 図 3.16 に概略を示す. LatA の投与は, 細胞を乗せて 75 分後に行った. ポリマーをコーティングしたガラス基板は, ガラスボトムディッシュのガラス部分を交換して用いた. ガラスの接着にはフレームシールを用いた (3.5 節を参照).

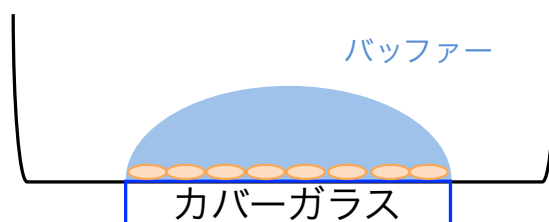


図 3.16: ガラスボトムディッシュを用いた実験の概略. ガラスが露出した部分にのみ細胞を乗せた.

3.8 節 画像解析

画像解析は, MATLAB (MathWorks, Natwick, MA)を用いて行った. キモグラフを作製する際のみ, ImageJ (National Institutes of Health, USA)を用いた.

寒天上の細胞集団の cAMP 振動の周期の定量化には, 先行研究[Torrence and Compo, 1998; Sawai *et al.*, 2005]に倣ってウェーブレット解析を用いた. 暗視野画像から, 各 4×4 ピクセルの領域内で平均化した時系列データを取得し, Morlet の関数を用いたウェーブレット変換

$$W_n(s) = \sum_{n'=0}^{N-1} x_{n'} \cdot \psi \left[\frac{(n' - n)\delta t}{s} \right]$$

$$\psi(\eta) = \pi^{-1/4} e^{i\omega_0 \eta} e^{-\eta^2/2}$$

を行った. x_n は時系列データ, δt は撮影時間間隔, s は周期を表す. ψ は Morlet の関数で $\omega_0 = 6$ とした. パワースペクトル (ウェーブレット係数 $W_n(s)$ の絶対値) が最大値を持つ周波数を求めることで各時空間の点での周波数を決定し, 振動周期の時系列を得た. 振動の位相は, ウェーブレット係数の偏角として定義した. cAMP 振動のらせん波の中心の位置は, 位相の値を基に再構成された画像から決定した.

蛍光画像の解析は以下のように行った. 画像のピクセル値のヒストグラムを描き, ある閾値 T を定めてそれを境に二つのクラスに分割し, それぞれのクラスのピクセル値の算術平均 m_1 と m_2 を算出する. 二つのクラスの平均値の算術平均 $m (= (m_1 + m_2) / 2)$ が閾値 T と一致するような閾値 T_m をアルゴリズムで求め, T_m 以上のピクセル値を持つ領域を細胞領域とし, T_m 以下のピクセル値を持つ領域を背景領域と定めた. 細胞領域内の輝度値の平均値から, 背景領域内の輝度値の平均値を減ずることで, 各画像の蛍光輝度値を算出した. CFP 画像の蛍光輝度値と YFP 画像の蛍光輝度値の比 (I_{485}/I_{540}) を計算し, この蛍光強度比を FRET 効率の指標として用いた. 一細胞レベルの蛍光強度比の値は, 観察開始から 5 分間の値の平均値で各細胞において規格化し

た。細胞集団の cAMP 振動の周期と一細胞レベルの細胞内 cAMP 濃度のピーク間の間隔は、観察時間中のパルス波形の数から計算した。細胞の形状の指標は円形度の逆数を用いた。円形度 (Circularity) は細胞の周囲長と面積から求められ ($= (\text{細胞の面積}) / (\text{細胞の輪郭の長さ})^2$) , その逆数 (図中では Circularity^{-1} と表示) は、形状が真円からどれだけ離れたものであるかを計る指標となる。輪郭の長さ、面積、細胞の重心位置は、二値化により取得した細胞領域から計算した。

Lifeact-mRFPmars の共焦点蛍光画像 (I_{600}) の解析は以下のように行った。図 3.17 に概略を示す。二値化により得られた細胞領域の境界から $1\mu\text{m}$ までの領域を細胞側面の領域とし、その内側の領域とともに、その輝度値の平均値を計算した。細胞の側面での F-アクチン量の指標として、細胞側面の領域の輝度値とその内側の領域の輝度値の比を用いた。細胞底面側の Lifeact-mRFPmars の輝度値について、膜の辺縁部での輝度値 ($I_{600, \text{edge}}$) の解析も、同様の方法を用いた。

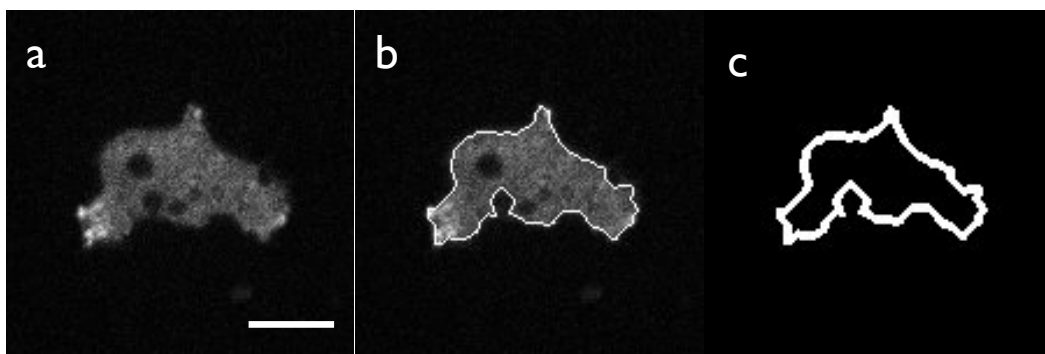


図 3.17: 細胞側面における Lifeact-mRFPmars の輝度値の定量方法。二値化により得られた細胞領域 (b) を 4 回エロージョン処理し、細胞領域を収縮させた領域を得て、その領域を元の細胞領域から除外した部分 (c) を、細胞側面の領域とした。スケールバーは $10\mu\text{m}$ を表す。

第 4 章 結果 1: 集団的 cAMP 振動のアクチン重合依存性

cAMP の振動と波は、粘菌細胞の走化性運動の方向を決める。本章では、この細胞集団の cAMP 振動が細胞形状の変化や重心移動に寄与するアクチン重合に依存するか、また依存する場合はどのような依存性を持っているかを検証するため、アクチン重合阻害剤である LatA の投与下における cAMP 振動を観察した。

4.1 節 LatA 濃度勾配による cAMP 振動の攪乱

直径 60 mm のシャーレに 1 % DB 寒天を厚さ約 3 mm で用意し、その中央にパスツールピペットを用いて約 6.5 mm 径の穴を開けた。この寒天上に細胞を単層に 1.67×10^5 cells/cm² となるように乗せ、観察開始から 2 時間 30 分後に穴に 5 μ M の LatA 溶液を 75 μ L 添加した(3.3 節を参照)。LatA は寒天中を拡散し、その結果 LatA の濃度勾配が形成されることが期待される。その模式図を図 4.1 に示す。暗視野観察にて、30 秒間隔でタイムラプス撮影を行った。暗視野照明観察で見られる光学密度の変化は cAMP 濃度上昇に伴う細胞の形状変化に対応しており、従ってその周期的変化は cAMP 振動を反映している[Gerisch, 1965; Futrelle *et al.*, 1982]。図 4.2 にその差分画像を示す。LatA 溶液（コントロール実験の場合は DMSO 溶液）を加えた状態でも、先行研究と同様に光学密度のらせん波が観察できた。但し、LatA のリザーバーからの距離が近い地点（3 mm 以内）では、明瞭な光学密度波は観察されなかった。これは、細胞のアクチン重合が強く阻害

されたことにより形状の変化が抑制されたためと考えられる。

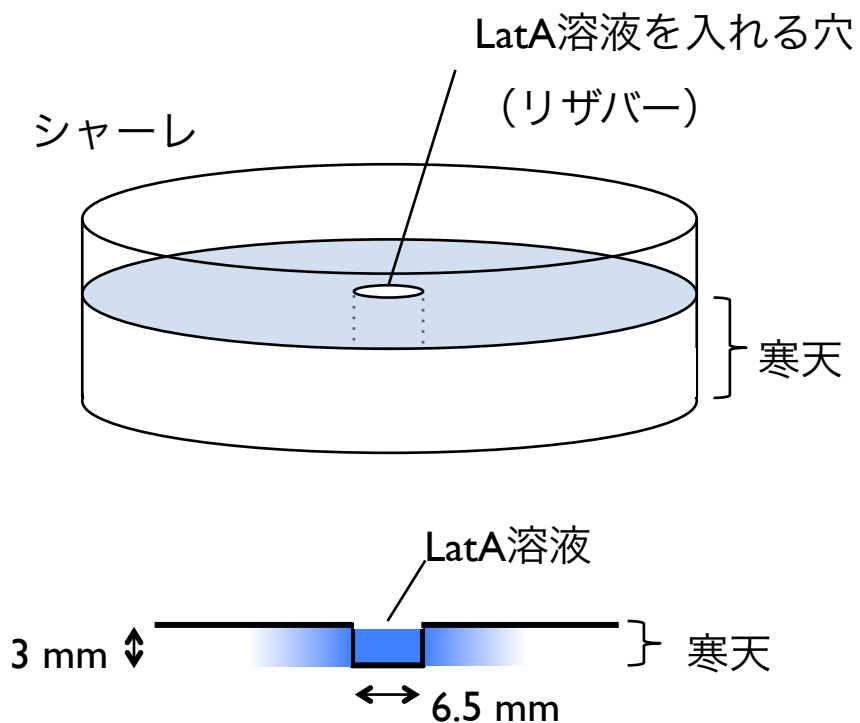


図 4.1: 寒天を用いた LatA 濃度勾配の形成. 寒天の中央に開けた穴の中に LatA 溶液を入れる. 寒天中を拡散することにより, 濃度勾配が形成される. 寒天の表面に細胞をのせる.

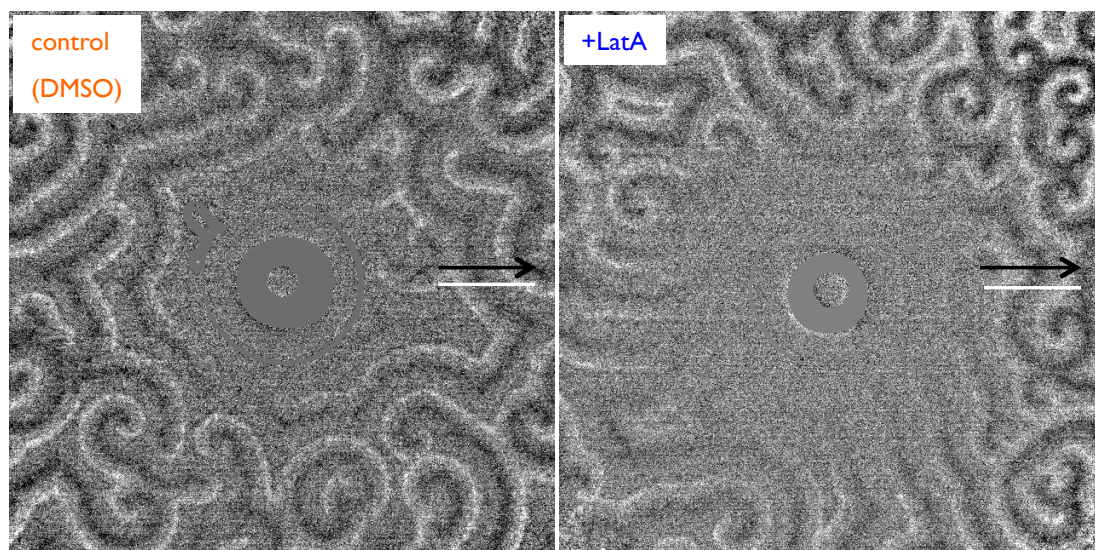


図 4.2: 観察開始から 4 時間 30 分経過した時点 (LatA を中心の穴に注入してから 2 時間後) での cAMP 振動の様子. 左はコントロール実験 (1 % DMSO 溶液を注入), 右は 5 μ M LatA 溶液を注入した実験の結果である. 取得した画像において, その 1 つ前の時点の画像との差分を取った. 図中の白線は 4 mm を表し, この線上でのキモグラフを作製した (矢印は図 4.3 の縦軸の向きと対応する). 空間的に明瞭ならせん模様の cAMP 振動が観察された. LatA のリザーバーから近い地点では明瞭なパターンは検出されなかった.

そこで, 光学密度の波が確認できる領域における振動の周期に着目し, 図 4.2 で示した白い直線の地点におけるキモグラフを作製した. 左端は穴から 3 mm の地点, 右端は 7 mm の地点である. 5 μ M LatA 溶液もしくは 1 % DMSO 溶液を投与して以降の時間変化を図 4.3 に示す. また, 観察開始から 5 時間 30 分経過した時点での振動周期を比較した結果を図 4.4 に示す. LatA 溶液を入れた穴 (リザーバー) からの距離によって振動の周期が延びる様子が観察された. リザーバーからの距離が中程度の地点 (約 3 mm) では, 振動周期が徐々に延びていく様子が見られた. リザーバーからさらに離れた地点 (約 6 mm) では, 振動周期の増大は観察されず, コントロール実験との差は見られなかった. また, コントロール実験において振動周期は位置に依存しなかった. この結果は, アクチン重合が阻害されることで cAMP 振動周期の増大が引き起こされる可能性を示唆している.

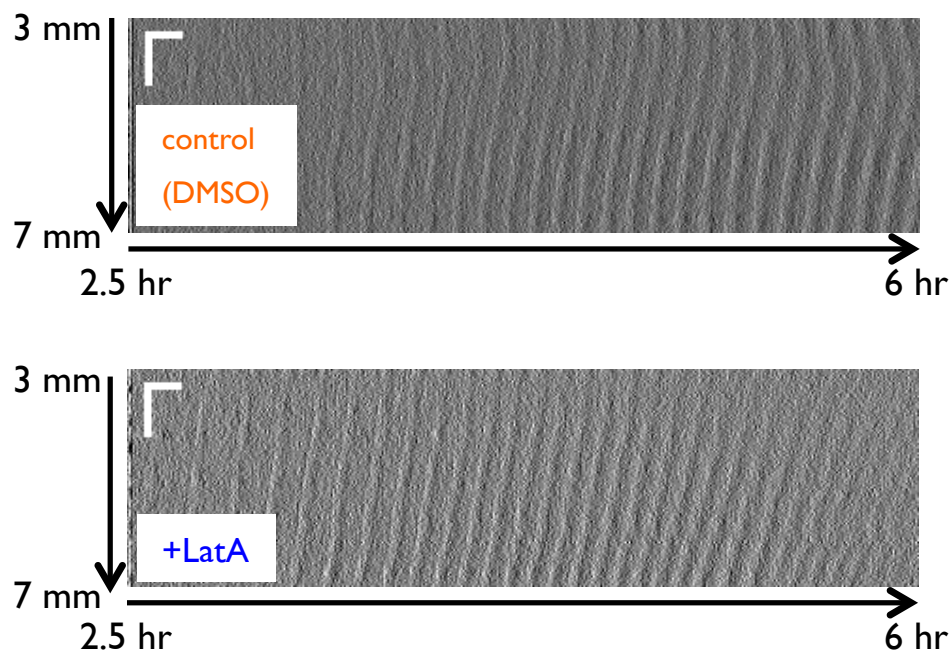


図 4.3: 暗視野観察を開始後 2 時間 30 分から 6 時間における cAMP 振動の時間変化を示すキモグラフ。0 M LatA は 1 % の DMSO を含む。縦軸は、図 4.2 の白線に対応する。縦軸は、LatA のリザーバーからの距離を表す。輝度の明暗は暗視野観察における輝度の明暗に対応しており、すなわち cAMP 濃度レベルに対応する。LatA 存在下で、リザーバーに近いほど cAMP 振動の周期が延びていく様子が見られる。

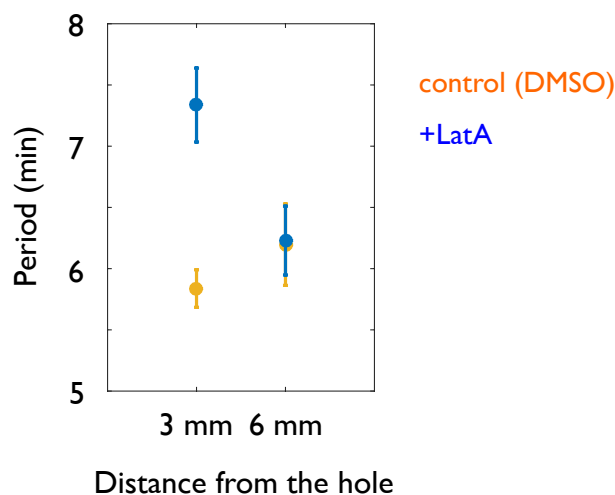


図 4.4: 観察を開始して 5 時間 30 分経過した時点での cAMP 振動の周期. 0 M LatA は 1% の DMSO を含む. リザーバーからの距離によって振動周期に差が生じた. LatA 非存在下では, リザーバーからの距離に依存しなかった(ウェルチの t 検定において, コントロール(LatA なし)と LatA を投与したときとの間で, 3 mm の地点では $p=0.0027 < 0.005$ で有意差が認められた). 各試行で代表的な 4 地点の平均値をその実験における周期とした. この試行を独立に 6 回行った平均値を示している. エラーバーは標準誤差を表す.

続いて, らせん波の中心の数に着目し, リザーバーからの距離に対するらせん波中心の数を計量した. リザーバーからの距離が 3 mm から 5 mm に位置するらせん波中心の数と, 5 mm から 7 mm に位置するらせん波中心の数を比較した結果を図 4.5 に示す. その結果, 高濃度の LatA に曝された地点では, 低濃度側やコントロール実験と比べてらせん波中心の数が少ない傾向にあることがわかった. 時折, 高濃度の地点でらせん波の中心が生成されることはあったが, その多くが, 低濃度側から伝搬する波に飲み込まれるような形で消失した(図 4.6). 図 4.6 で示した黄線でのキモグラフを図 4.7 に示す. この線はらせん波の波面に対して垂直である. 初めは, LatA 高濃度側(0 mm の地点)と LatA 低濃度側(6.15 mm の地点)の両方から伝播するらせん波が約 3 mm の地点でぶつかり合う様子が観察されていたが, 時刻約 5 時間では, らせん波中心付近の cAMP 振動の波形が不連続となり, それ以降は波が LatA 低濃度側から高濃度側まで到達する様子が観察された. また, 振動の周期は, 高濃度側の地点の方が低濃度側と比較して長かった. これらの結果は, LatA によるアクチン重合の障害に依存して cAMP 振動の周期が変化することで振動の引き込み(entrainment)が生じ, らせん波中心の数が LatA 高濃度側で低下することを示している. LatA のリザーバーからの距離が近い地点(3 mm 以内)では, 明瞭な光学密度波は観察されなかった. この実験系では, 細胞形状の変化を光学密度の変化として検出しているため,

アクチンの重合が阻害されることで形状の変化がほとんど生じていないことにより光学密度波が観察されなかったと考えられる。この地点で cAMP 振動が生じているか、その周期はいくらか、等については、この実験系において判別することはできなかった。

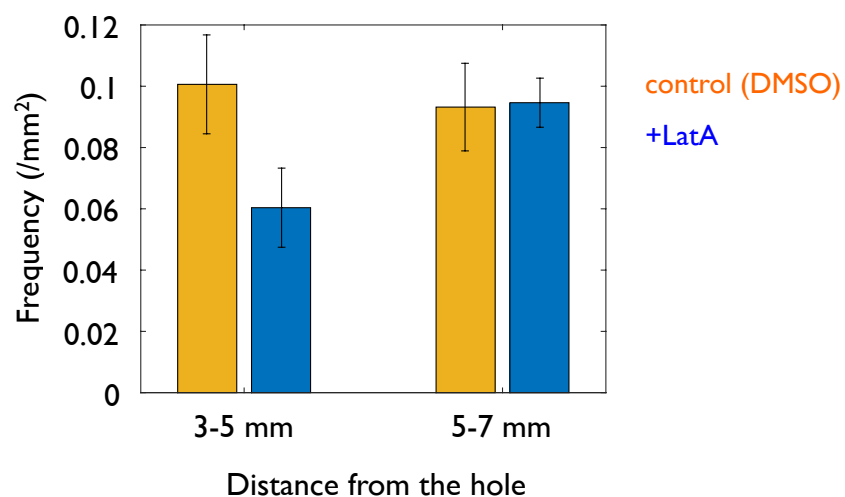


図 4.5: 観察時間中に消失せず安定して存在したらせん波中心の数密度。0 M LatA は 1 %の DMSO を含む。リザーバーからの距離に対する単位面積あたりのらせん波中心の数を表す。リザーバーからの距離が近い地点でのらせん波の数は、LatA の存在により減少する傾向にあった。独立に 6 回試行を行った平均値を示している。エラーバーは標準誤差を表す。

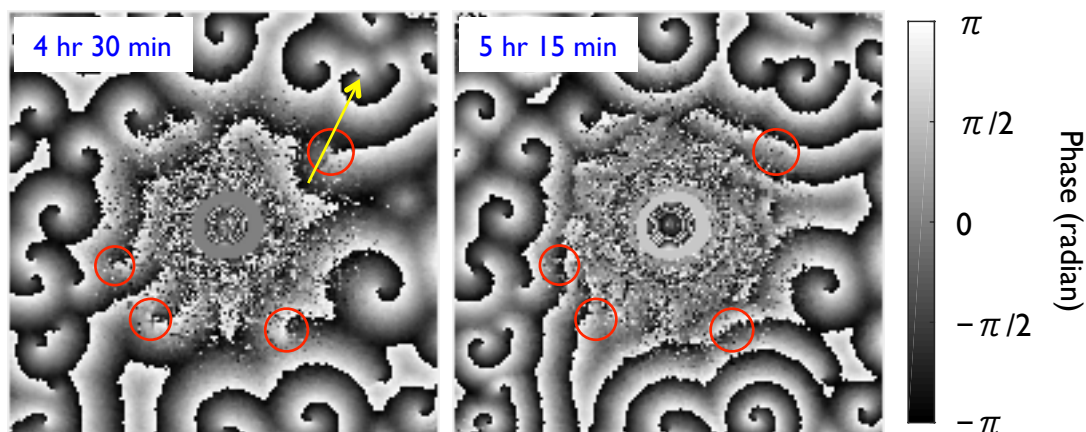


図 4.6: ウェーブレット解析により得られた cAMP 振動の位相から再構築した画像。図 4.2 で示したものは別の試行のデータである。らせん様の波形が際立って表示される。LatA 存在下で、赤丸で囲った地点に見られるらせん波の中心が、時間の経過とともに消失する様子が見られた。黄線(らせん波の波面に対して垂直)は約 6.15 mm を表し、図 4.7 で示すキモグラフの縦軸に相当する。

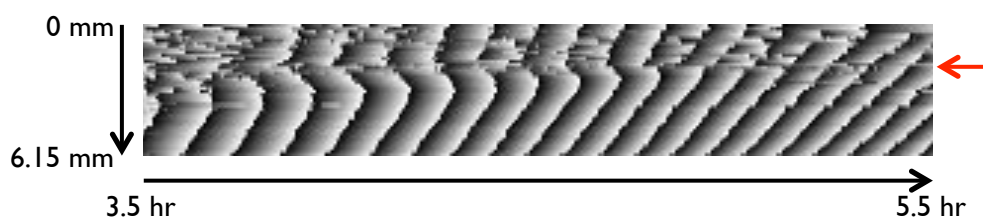


図 4.7: cAMP 振動の位相を表すキモグラフ。縦軸は図 4.6 の黄線(らせん波の波面に対して垂直)に対応し、0 mm が高濃度 LatA 側、6.15 mm が低濃度 LatA 側である。赤矢印で示した地点で、らせん波中心の消失が生じた。時刻約 5 時間で波形が不連続となり、それ以降は 6.15 mm の地点からの波が 0 mm の地点まで到達する様子が観察された。また周期は、赤矢印で示した地点より高濃度側の方が、低濃度側と比べて長かった。グレースケールバーは図 4.6 を参照。

4.2 節 cAMP 振動の LatA 濃度依存性

cAMP 振動の周期のアクチン重合依存性をより定量的に検証するために、Epac1-camps を発現した細胞株を用いて細胞集団の cAMP 振動を測定した。これにより細胞質中の cAMP 濃度変化

を可視化できるので、前節で示した細胞の形状に依存した方法とは独立に、cAMP 振動の測定が可能となる。ガラスボトムディッシュ上に飢餓処理した細胞を希釈し 250 μL の懸濁液を乗せた（細胞密度は 1.67×10^5 cells/cm² とした）。静置し、細胞をガラス基質に貼りつかせた後に、上清を除去せずに LatA 溶液を 250 μL を加え、灌流しない状態で観察した。落射蛍光顕微鏡で、30 秒間隔でタイムラプス撮影を行った。20 倍の油浸対物レンズで観察し、視野中 ($408 \mu\text{m} \times 408 \mu\text{m}$) の細胞全体の平均輝度値から蛍光強度比を求め、その時系列を得た。

LatA を与えた細胞の様子を図 4.8 に、代表的な cAMP 振動の時系列を図 4.9 に示す。LatA を投与しない細胞において、cAMP 振動の周期は約 10 分であり、先行研究と同程度であった [Gregor *et al.*, 2010]。使用した最低濃度である 250 nM の LatA を与えたときでも、細胞は丸みを帯び形状の変化がほとんど見られなくなった。しかしながら一方で、細胞内 cAMP 濃度の変化は自動的に繰り返し生じることが確認された。500 nM 以上の LatA を投与した場合、cAMP 振動の周期が増大することがわかった。cAMP 振動の波形について、LatA の濃度に依る変化は見られなかった (図 4.9)。振幅に関しては、1 μM と 5 μM の LatA を投与した細胞については、徐々に減少するような様子が見られた (図 4.9 の下段)。

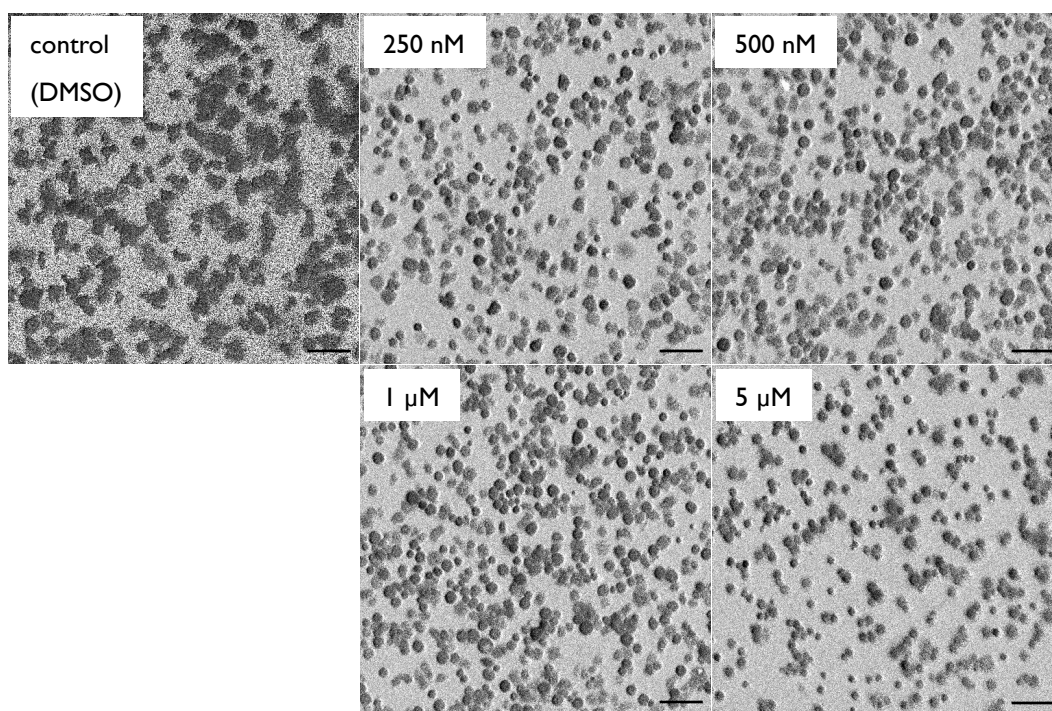


図 4.8: LatA 処理した細胞の様子。0 M LatA は 1 % の DMSO を含む。CFP と YFP の蛍光強度比の値をグレースケール表示した。250 nM 以上の LatA を与えると細胞の形状は丸みを帯びた。スケールバーは 20 μm を表す。

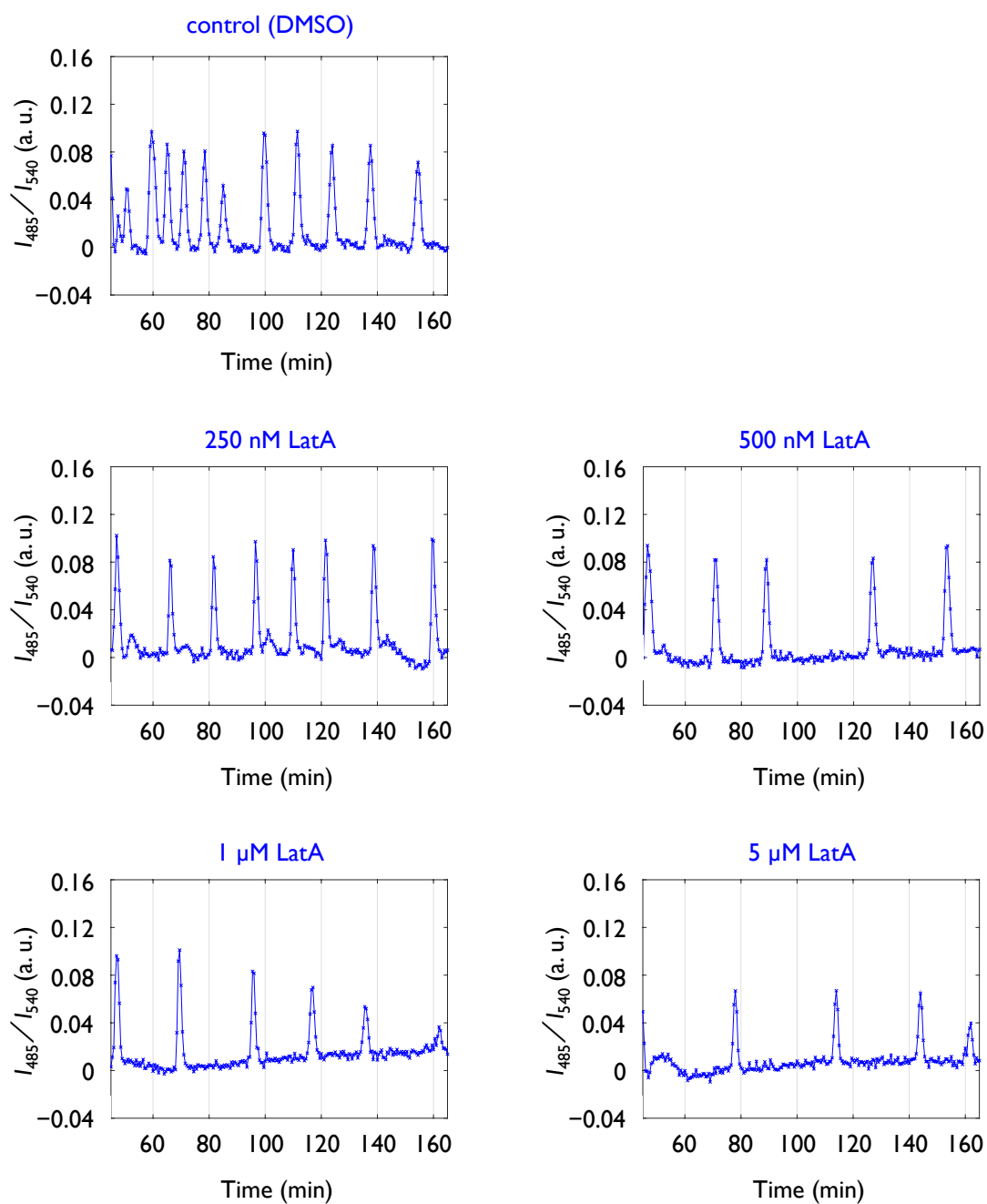


図 4.9: 各 LatA 濃度における代表的な cAMP 振動の時系列グラフ. 0 M LatA は 1% の DMSO を含む. 図 4.7 で示した画像と対応する (解析方法は 3.8 節を参照). 500 nM 以上の LatA を与えると, cAMP 振動の周期が延びる様子が観察された.

cAMP 振動の波が空間を伝播する速さを, グレースケール表示した画像セットを用いて測定した. その結果を図 4.10 の上段に示す. 平均値としては, 1 μ M と 5 μ M の LatA を投与したとき, 波の伝播の速さは小さくなる傾向にあったが, LatA を投与しないときとの有意な差は見られなかった. 一方, cAMP 振動の周期は LatA 濃度依存的に増大することが明らかになった (図 4.10

の下段). 前節の結果と合わせて, 以上の Epac1-camps を用いた定量的な解析結果から, アクチン重合の阻害に依存して cAMP 振動の周期が増大することが強く示唆された.

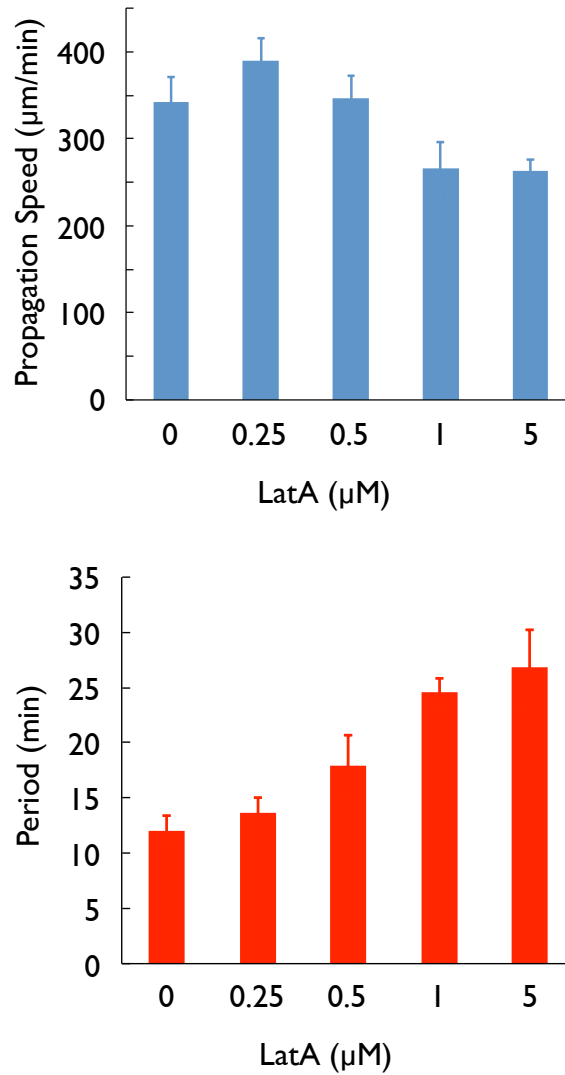


図 4.10: LatA 濃度と cAMP 振動の波の伝播の速さと周期の関係. 0 M LatA は 1 % の DMSO を含む. 波の伝播の速さ (上段) について, 平均値としては, 1 µM と 5 µM の LatA を投与すると伝播の速さは小さくなるがあったが, 有意な差は見られなかった. 周期 (下段) については, LatA 濃度に依存して長くなった (ウェルチの t 検定において, コントロール(LatA なし) との間で, 1 µM LatA では $p=0.0031 < 0.005$ で, 5 µM LatA では $p=0.018 < 0.05$ で有意差が認められた). 試行回数はコントロールから順に 3 回, 3 回, 5 回, 3 回, 4 回である. エラーバーは標準誤差を示す.

4.3 節 灌流下での細胞集団の cAMP 振動の測定

前節の灌流しない実験系では、細胞外 cAMP 濃度の減少は細胞自身が分泌する PDE に依存している [Masaki *et al.*, 2013]. 細胞外の PDE の量は試行ごとにばらつく可能性があり、PDE の量が少ないことにより細胞外 cAMP 濃度が上昇した状態が続くと cAMP 振動が消失することがあるため [神野, 2013], 注意が必要である. 現に, 前節の結果で, 細胞内 cAMP 濃度のパルスの波形に二相性が見られることがあった (図 4.9 の 250 nM LatA のデータの時刻約 50 分と約 100 分). これは, 細胞外 cAMP 濃度の減少が緩やかであったため一細胞レベルで見られる cAMP リレー応答の二つ目のピークが生じたことによるものであると考えられる. 実験条件を正確に揃えるためには, 細胞外 cAMP の除去をコントロールできる環境下にて cAMP 振動を観察することが求められる. そこで次に, 微小流路デバイスを用いて DB を灌流しながら観察することで, 細胞外環境を一定に保持した状態で細胞集団の cAMP 振動を観察することとした. 細胞密度は, 細胞間で cAMP の授受が行えるような密度 (約 6.7×10^4 cells/cm²) とした.

図 4.11 に cAMP 振動の代表的な時系列を, 図 4.12 に cAMP 振動の周期の流速依存性を示す. 灌流の流速が大きいほど, 周期が増大する傾向にあった. この結果は, 細胞外の cAMP が蓄積されづらい環境であるとき cAMP 振動の周期が増大することを示した先行研究の結果と一致する [Gregor *et al.*, 2010]. LatA を与える, または基質への接着性を変える状態で (第 6 章を参照) 同様な実験を行うことが求められるが, 微小な空間においては少量の溶液の流れが大きな応力を生じるため細胞が剥がれやすく, 細胞密度を制御することは困難であることもわかった. ポリ-L-リジン (3.5 節と第 6 章を参照) をコートし基質との接着を僅かに促進させることでこの問題を解消できるかもしれない. 微小流路を用いた灌流下での cAMP 振動のアクチン重合依存性や基質接着依存性の解析は, 今後の課題である.

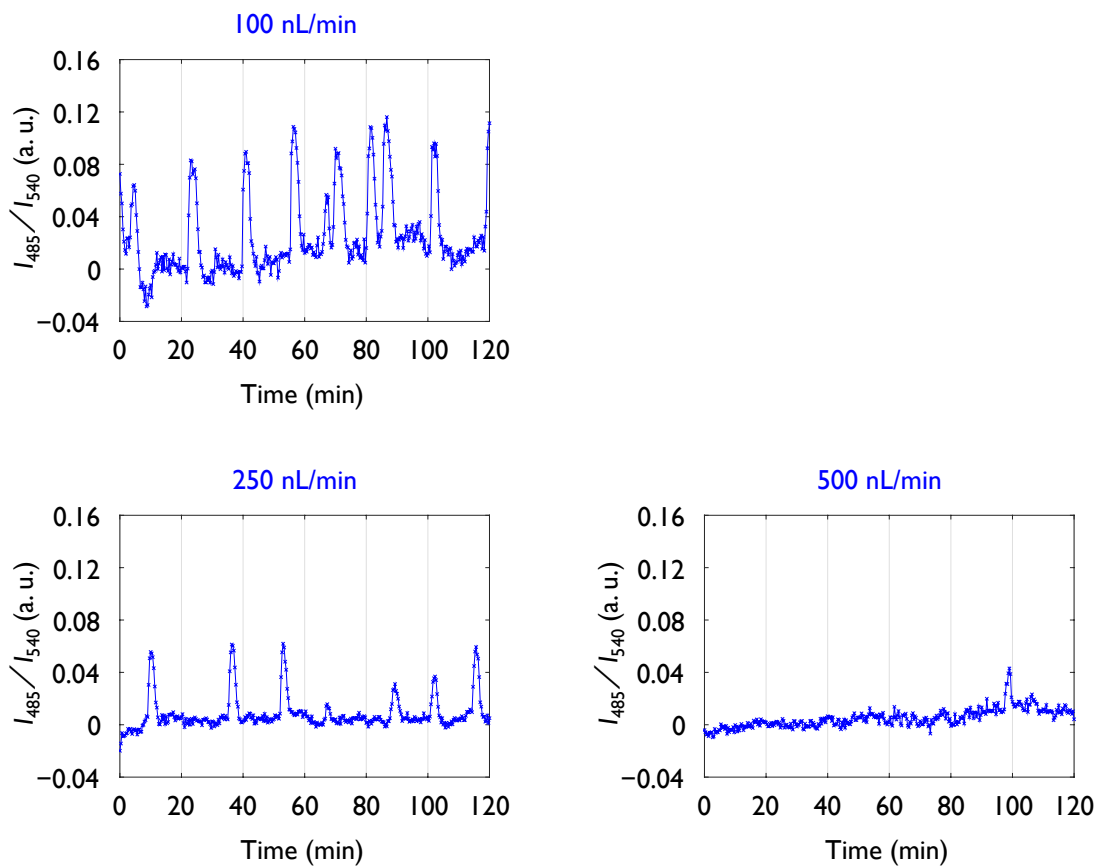


図 4.11: 微小流路で灌流しながら観察した細胞集団の cAMP 振動の代表的な時系列.
流速を上昇させると集団的なパルスの出現頻度が低下した.

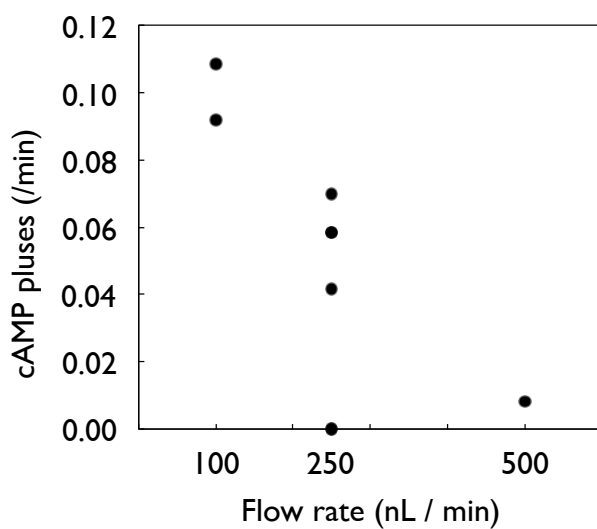


図 4.12: 微小流路で灌流しながら観察した細胞集団の cAMP 振動の周期. 各実験で得られた振動周期をプロットしている. 流速が上昇すると, 振動の周期が増大した.

第 5 章 結果 2: 一細胞レベルの cAMP リレー 応答のアクチン重合依存性

一細胞レベルで見られる cAMP リレー応答が細胞間で伝播し空間的に連続して繰り返し生じることにより、集団の cAMP 振動は生じると考えられている。従って、cAMP 振動の周期が増大したのは、一細胞レベルでの cAMP リレー応答が攪乱されたことによるものと考えられる。cAMP リレー応答がアクチン重合にどのように依存するかを検証するために、LatA 存在下で細胞外 cAMP 濃度を時間的に階段状に上昇させたときの一細胞レベルの cAMP リレー応答を生細胞観察した。また、cAMP 振動の周期を増大させる要因として不応期が長くなった可能性も考えられるため、その LatA 依存性を検証した。さらに、シグナル伝達機構を構成する重要な細胞内分子である PI3K の活性が阻害された細胞において cAMP リレー応答を解析し、アクチン重合との関連性を検証した。

5.1 節 微小流路を用いた cAMP リレー応答の測定

微小な流路デバイスを用いることで、流路の溶液の素早い切り替えが可能となり、細胞外 cAMP 濃度の階段状の上昇が実現された（第 3 章，図 3.14 と図 3.15）。また、溶液を灌流することにより、細胞自身が分泌する化学物質の影響を抑えることが期待される。細胞が流路内で細胞間での分泌物の授受を行いにくい希薄な細胞密度（約 1.3×10^3 cells/cm²）となるように細胞懸濁液を流路内に導入した。10 秒間隔でタイムラプス撮影を行い、取得した落射蛍光画像から蛍

光強度比を算出し、時系列を得た。一細胞レベルでの観察には 60 倍の対物レンズを使用した。

まず、LatA を投与しない細胞に対して、細胞外 cAMP を 0 からある濃度に上昇させたときの細胞の応答を解析した。代表的な時系列を図 5.1 に示す。300 pM から 1 nM の細胞外 cAMP を投与した場合、投与直後にのみ一過的に細胞内 cAMP 濃度は 1~2 分間に上昇し、その後は 1~2 分以内に cAMP 投与前のレベルまで減少した。つまり、適応的な応答を示した。一方、10 nM 以上の細胞外 cAMP を与えた場合、細胞内 cAMP 濃度は 2~5 分の時間間隔で増加と減少を繰り返した。細胞外 cAMP 濃度が 10 nM のときはその応答強度は徐々に減少していったが、100 nM 以上の濃度では刺激を与えた直後の応答強度を保ったまま持続した。また、細胞によっては cAMP 投与直後の波形が異なっており、例えば図 5.1 の 10 nM のデータの青で示された時系列や、1 μ M のデータの青で示された時系列で見られるように、cAMP 投与後数十秒の間に蛍光強度比の値が数十秒間上昇し、その後下降に転じるような二相的な応答も見られた。これは、持続的に見られる数分スケールの上昇と下降と比べて非常に短い時間での変動である。また、この短い時間スケールは、Ras や PIP₃ の応答がピークに到達する時間と類似している。これら細胞外 cAMP 濃度依存的に cAMP リレー応答のダイナミクスに変化が生じる様子は、ガラスボトムディッシュを用いた、より容積の大きい灌流系を用いた先行研究[Gregor *et al.*, 2010]で得られた結果と一致している。

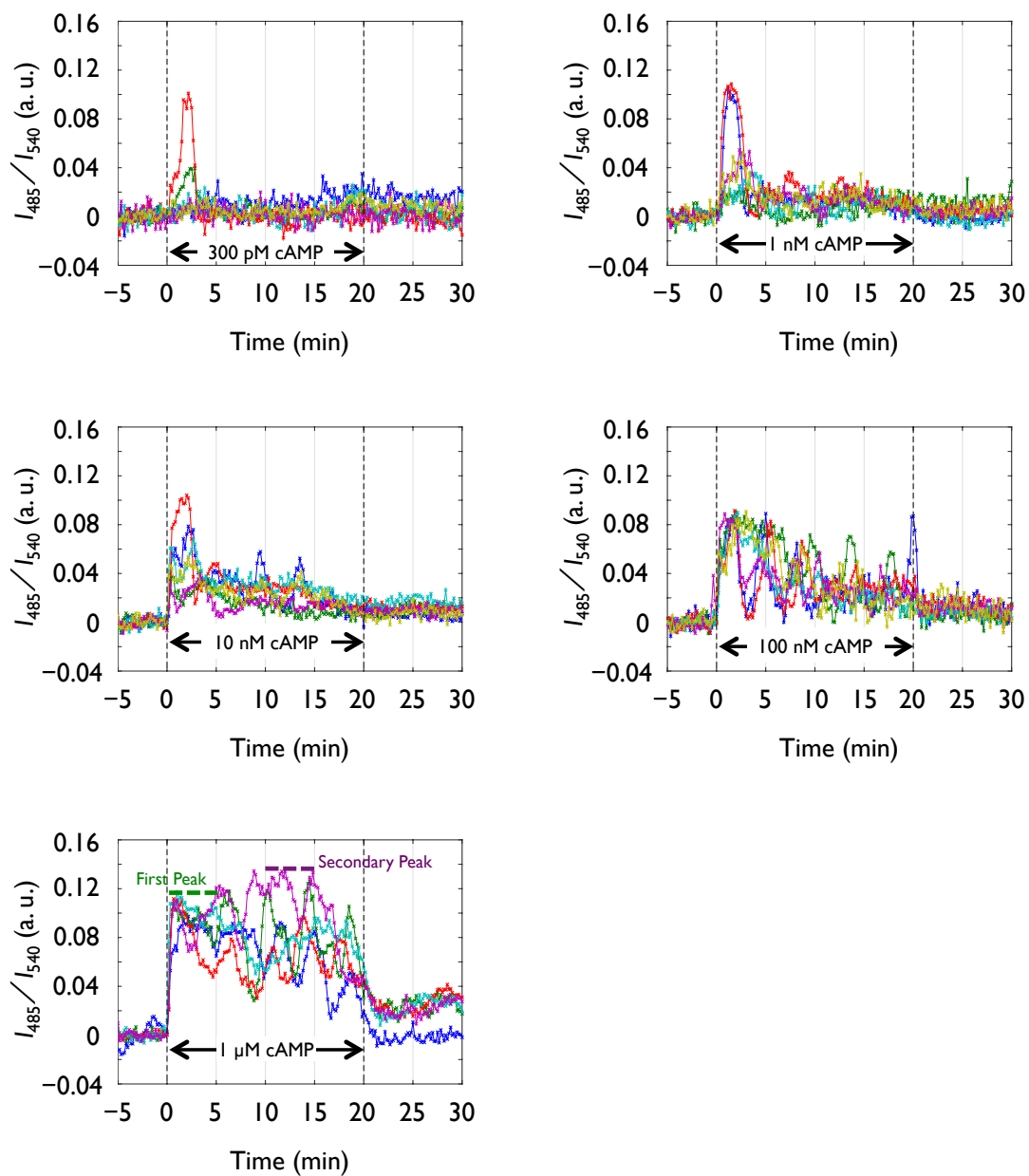


図 5.1: LatA を投与しない細胞の cAMP リレー応答の代表的な時系列. それぞれのグラフにおける各色の時系列は, 同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 細胞外 cAMP 濃度に依存して, 適応的な応答や, 持続的かつ周期的な振る舞いを示した. cAMP 投与後数十秒の間に蛍光強度比が上昇し下降に転じる様子が時折見られた.

5.2 節 cAMP リレー応答の LatA 依存性

5.2.1 項 cAMP リレー応答の LatA 濃度依存性

LatA 投与下における $1\ \mu\text{M}$ cAMP の持続的投与に対する細胞内 cAMP の濃度変化を解析した。 $5\ \mu\text{M}$ LatA の投与下では、細胞の形状が丸みを帯びる様子が観察された (図 5.14 の中央)。 cAMP リレー応答の代表的な時系列を図 5.2 に示す。 $5\ \mu\text{M}$ の LatA 投与下では、cAMP リレー応答の持続的かつ周期応答が消失し、蛍光強度比は cAMP 投与前のレベルにまで減少した。つまり、適応的な応答が完全であった。また、cAMP を与えて始めて直後の応答の強度も抑制された。 $250\ \text{nM}$ や $500\ \text{nM}$ の LatA では、cAMP 投与直後の応答の強度は LatA を投与しない細胞と同等であったが、cAMP を与えて約 5 分以降に見られる持続する周期的振る舞いの強度は減少する傾向にあった。しかし、LatA はその周期自体には影響を与えないようであった。 LatA を投与しない細胞で見られた、cAMP 投与後数十秒の間に見られる蛍光強度比の上昇と下降は、 $250\ \text{nM}$ LatA を与えた細胞においても見られることがあった。

$5\ \mu\text{M}$ の LatA を投与した後に、LatA を含まないバッファーを送液し、再び $1\ \mu\text{M}$ の cAMP を細胞に投与したところ、LatA を事前に投与しない場合と同様に、持続的に蛍光強度比が増減する振る舞いを示した (図 5.3)。また、cAMP を投与しない状態での、 $1\ \mu\text{M}$ LatA による細胞内 cAMP レベルを観察したところ、 $1\ \mu\text{M}$ LatA の有無によらず一定に保たれることがわかった (図 5.4)。

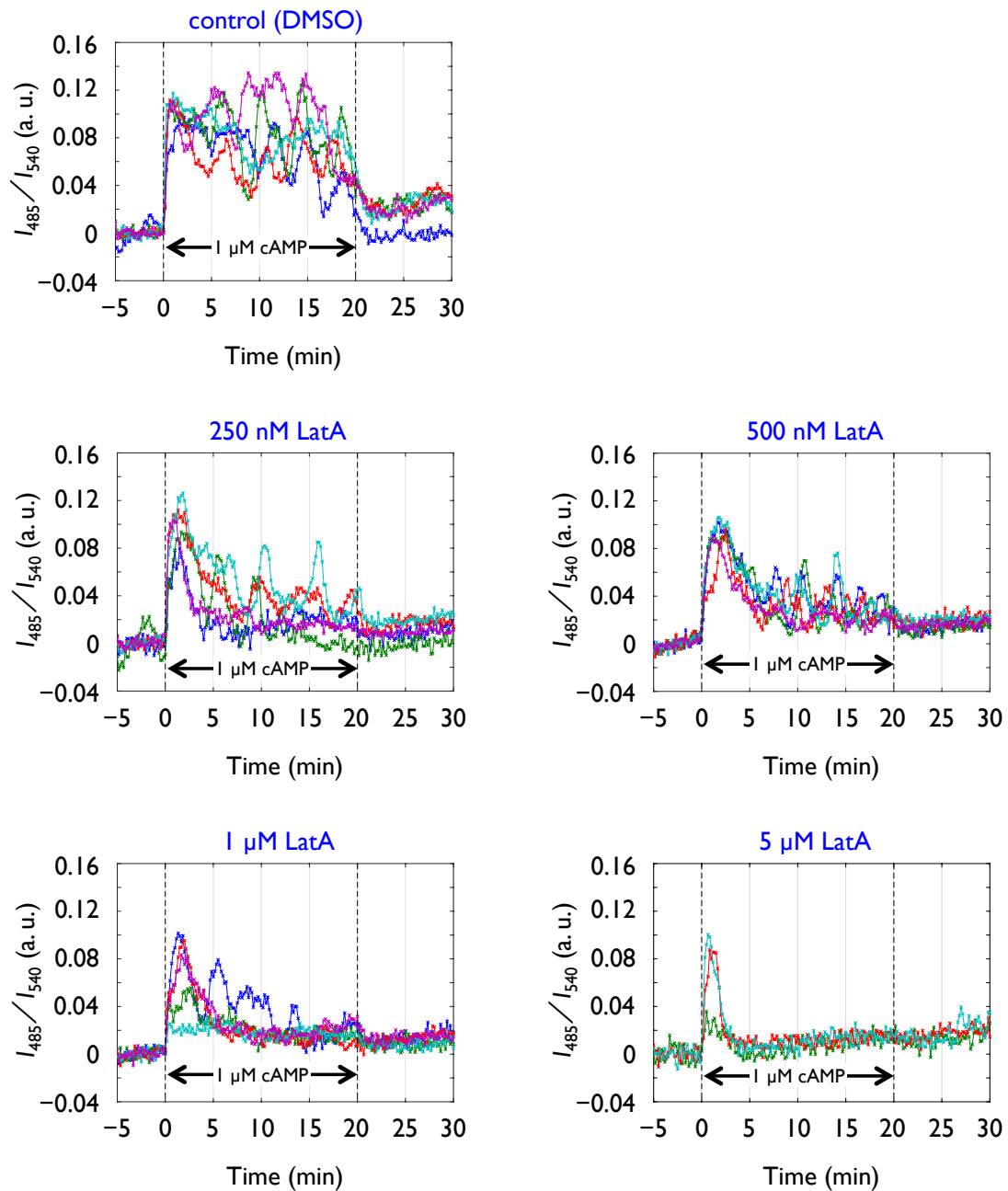


図 5.2: 様々な濃度の LatA を投与した細胞の cAMP リレー応答の代表的な時系列データ。0 M LatA は 1% の DMSO を含む。それぞれのグラフにおける各色の時系列は、同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す。点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた。特に、持続的かつ周期的応答の抑制が顕著に見られた。

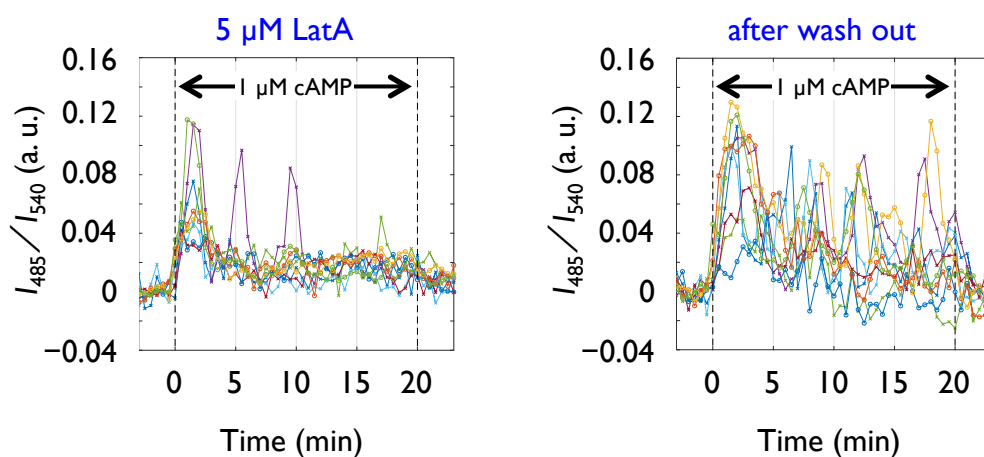


図 5.3: 5 μM LatA を投与した細胞に 1 μM cAMP を与えたときの cAMP リレー応答 (左) を測定した後に LatA を含まないバッファーを送液し、再び 1 μM cAMP を投与したときの cAMP リレー応答 (右) を測定した結果。0 M LatA は 1 % の DMSO を含む。各色の時系列は、同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す。点線で示した時刻 (0 分、20 分) の間で cAMP を与えた。5 μM LatA の投与により持続的かつ周期的応答が顕著に抑制されたが、LatA を除去すると、持続的かつ周期的応答は回復した。

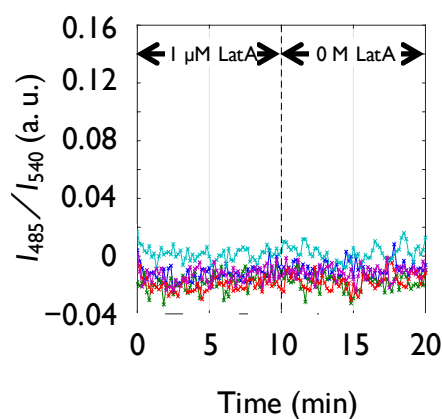


図 5.4: 1 μM LatA を投与した細胞の細胞内 cAMP レベルの測定。0 M LatA は 1 % の DMSO を含む。細胞外 cAMP は投与していない。各色の時系列は、同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す。点線で示した時刻 (10 分) で LatA を除去した。細胞外 cAMP を投与しない状態での細胞内 cAMP レベルは、プローブの検出能の限りにおいて、1 μM LatA の有無によらず一定であった。

応答の強度を定量するために、cAMP を与えた直後 5 分間の蛍光強度比の最大値を一次ピーク

(First Peak) と、投与後 10 分から 15 分間の最大値を二次ピーク (Secondary Peak) と定義した (図 5.1 下段左を参照)。一次ピークの値は cAMP 投与直後の応答強度を、二次ピークの値は持続的な応答の強度をそれぞれ表す。LatA による cAMP リレー応答の強度の抑制の度合いを図 5.5 に示す。一次ピークの値は LatA に依存して減少し、その傾向は 1 μM 以上の LatA を与えたときに特に顕著であった。二次ピークについてもその値は減少し、250 nM の LatA を与えたときでさえその傾向は見られ、5 μM の LatA を与えたときはほとんど応答が認められないまでになった。また、持続的な応答のピーク間の間隔について、LatA 濃度依存性を図 5.6 に示す。LatA 濃度に依らず持続的な振る舞いのピーク間の間隔は一定であることがわかった。

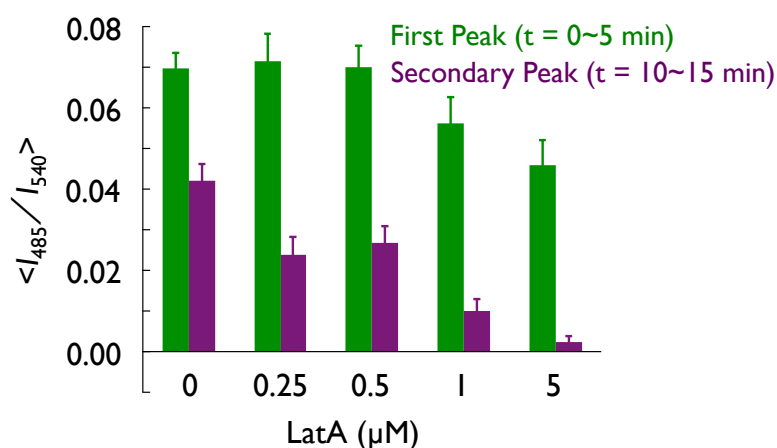


図 5.5: LatA 濃度と cAMP リレー応答強度との関係。0 M LatA は 1 %の DMSO を含む。LatA 濃度上昇に依存して応答強度は抑制された。cAMP 投与直後の応答の強度の指標である一次ピークは 5 μM の LatA で顕著に抑制された (ウェルチの t 検定において、コントロール(LatA なし)と 5 μM LatA との間で $p=0.0022<0.005$ で有意差が認められた)。持続的かつ周期的振る舞いの応答強度の指標である二次ピークは 250 nM 以上の LatA で顕著に抑制された (ウェルチの t 検定において、コントロールとの間で 250 nM LatA から順に、 $p=0.0045<0.005$, $p=0.011<0.05$, $p=3.8\times 10^{-8}<5\times 10^{-8}$, $p=4.7\times 10^{-12}<5\times 10^{-12}$ で有意差が認められた)。観察した細胞数はコントロールから順に 42, 22, 15, 19, 17 である。エラーバーは標準誤差を表す。

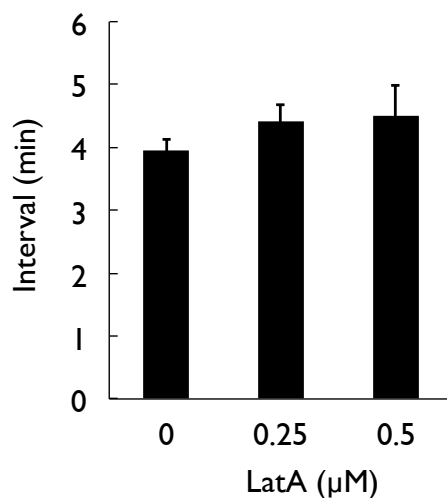


図 5.6: 持続する応答のピーク間の間隔と LatA 濃度の関係. 0 M LatA は 1 % の DMSO を含む. cAMP を与えた 20 分間における応答の強度の極大を数えることでピーク間の間隔を計算した. 1 μM 以上の LatA を与えた場合, 持続的な応答が見られない細胞が多くを占めたため, ピーク間の間隔は計算できなかった. LatA による影響は認められなかった. 観察した細胞数はコントロールから順に 31, 18, 12 である. エラーバーは標準誤差を表す.

5.2.2 項 LatA を投与した細胞の cAMP リレー応答の細胞外 cAMP 濃度依存性

様々な濃度の cAMP を与えたときの cAMP リレー応答を, 5 μM の LatA 投与下で比較, 検証した. 代表的な時系列を図 5.7 に示す. 細胞外 cAMP 濃度が 300 pM から 1 nM の場合, cAMP を与えた直後の応答が顕著に抑制される様子が見られた. 細胞外 cAMP 濃度 10 nM 以上の場合は, cAMP 投与直後の応答への影響は限定的であったが, 持続的かつ周期的な応答の強度は顕著に抑制された. つまり, cAMP 投与直後に一過的に蛍光強度比が上昇し, 適応的な応答を示した. なお, LatA と似た構造を持つ別のアクチン重合阻害剤である LatB を 20 μM の濃度で投与した細胞に細胞外 cAMP を与えたときも, 1 nM の cAMP の場合, 応答が顕著に抑制され, 1 μM の cAMP の場合, 持続的かつ周期的応答の強度が顕著に抑制された (図 5.8).

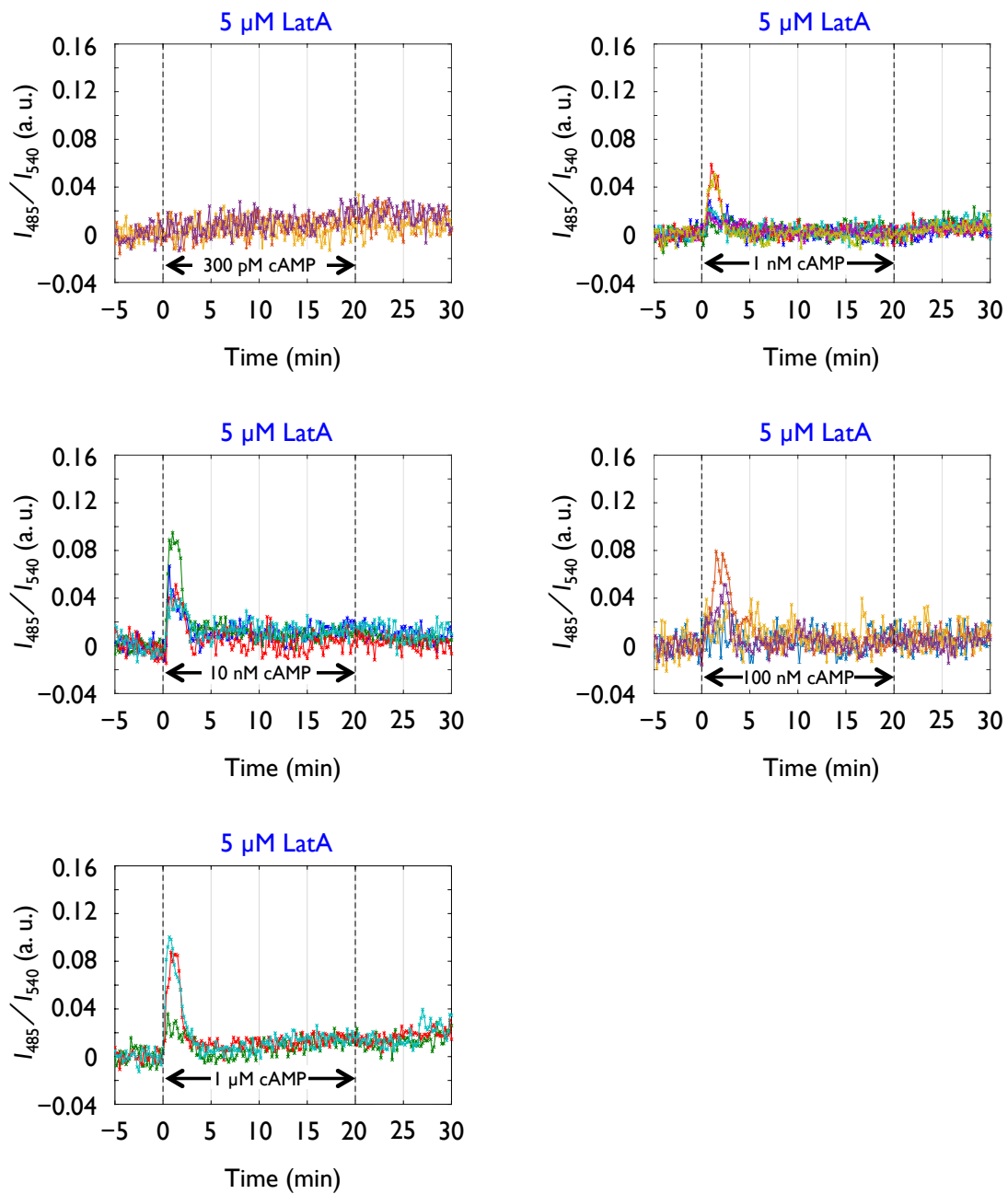


図 5.7: $5 \mu\text{M}$ LatA 投与下の細胞の cAMP リレー応答の代表的な時系列データ. それぞれのグラフにおける各色の時系列は, 同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 1 nM 以下の cAMP 投与直後の応答は顕著に抑制された. 10 nM 以上の細胞外 cAMP については, 持続的かつ周期的応答が顕著に抑制された.

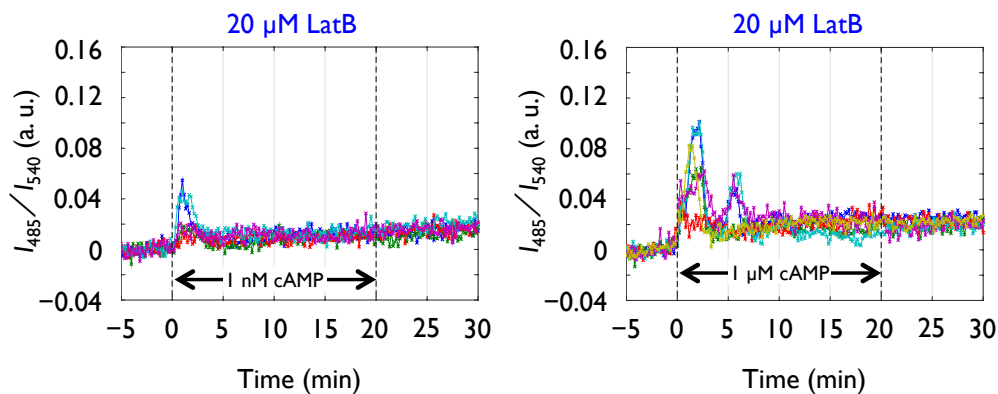


図 5.8: 20 μ M LatB 投与下の細胞の cAMP リレー応答の代表的な時系列データ。それぞれのグラフにおける各色の時系列は、同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す。点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた。1 nM cAMP を投与して直後の応答は顕著に抑制された。1 μ M cAMP の場合、持続的かつ周期的応答が顕著に抑制された。5 μ M LatA を投与した細胞の cAMP リレー応答と同様な結果であった (図 5.6)。

5 μ M の LatA を投与した細胞の cAMP リレー応答の強度を図 5.9 に示す。以上の結果から、アクチン重合の阻害により cAMP リレー応答の強度が抑制されることが示された。これは、LatA 濃度依存的に細胞集団の cAMP 振動の周期が増大したと矛盾しない。また、一次ピークよりも二次ピークの方が LatA の影響を受けやすかったことは、F-アクチンが cAMP リレー応答の非適応的な成分に寄与していることを示唆している。

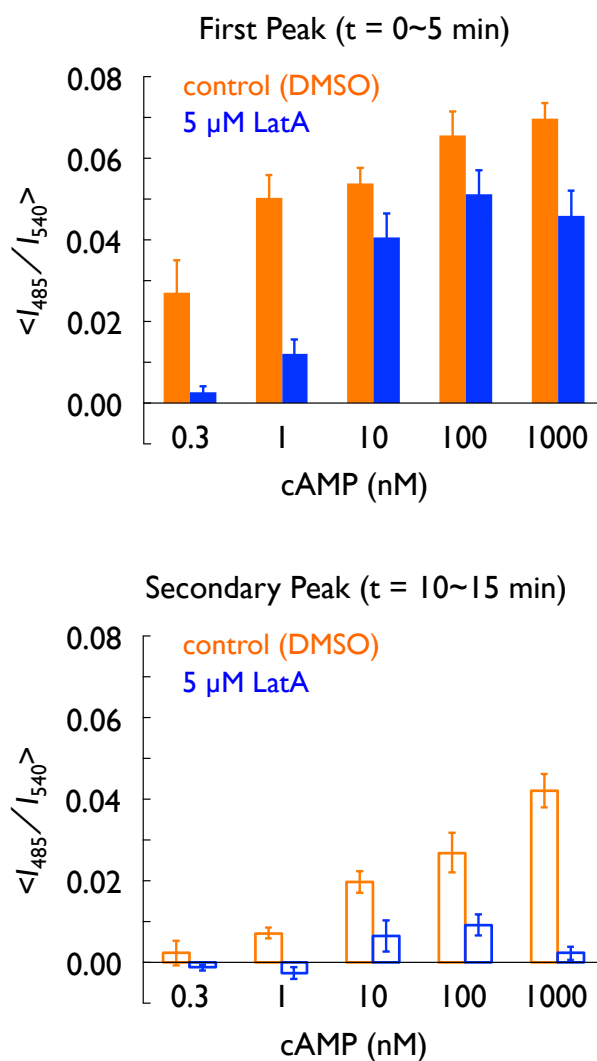


図 5.9: 5 μM LatA を投与したときの cAMP リレー応答の強度の変化。0 M LatA は 1 %の DMSO を含む。一次ピークは、1 nM 以下の細胞外 cAMP では LatA により顕著に抑制された (ウェルチの t 検定において、コントロール (LatA なし) と 5 μM LatA 投与時との間で、300 pM cAMP のとき $p=0.0016 < 0.005$, 1 nM cAMP のとき $p=0.00023 < 0.0005$ で有意差が認められた)。二次ピークは、全ての細胞外 cAMP 濃度においてほとんど見られなくなった (ウェルチの t 検定において、コントロールと 5 μM LatA 投与時との間で、300 pM cAMP から順に、 $p=0.012 < 0.05$, $p=0.0033 < 0.005$, $p=0.0071 < 0.01$, $p=0.019 < 0.05$, $p=9.2 \times 10^{-7} < 10^{-6}$ で有意差が認められた)。観察した細胞数は、コントロールは 300 pM cAMP から順に 18, 32, 51, 15, 42 で、5 μM LatA 投与時は 300 pM cAMP から順に 4, 15, 13, 19, 17 である。エラーバーは標準誤差を表す。

5.3 節 cAMP リレー応答の脱適応のキネティクスとその LatA 依存性

細胞が一過的な刺激を受けたとき、刺激が与えられる前の状態にまで戻るのに要する時間を不応期と呼ぶ。細胞が不応期にあるときに刺激を与えられても、細胞の応答は弱くなる。応答が全く無い期間を絶対不応期と呼び、時間に応じて応答が回復する期間を相対不応期と呼ぶ。細胞集団で cAMP 振動が生じているとき細胞外 cAMP 濃度も増減を繰り返していると考えられていることから（細胞懸濁液中の細胞外 cAMP 濃度と細胞内 cAMP 濃度がどちらも増減を繰り返していることが明らかにされている[Gerisch and Wick, 1979]）、細胞外 cAMP に対する不応期も、細胞集団の cAMP 振動の周期を決定する要因の一つと考えられる。

cAMP を投与してからそれを除去し再び cAMP を与え、二度目の投与に対する応答強度が一度目の投与時のそれと比べて同程度のものになったとき、細胞は一度目の cAMP 刺激による不応期を脱していたことになる。特に、細胞外 cAMP が 10 nM 以下の場合、cAMP リレー応答は適応的である。適応状態の細胞に対する cAMP 刺激を除去したとき、適応状態を脱して cAMP 投与前の状態にまで戻る、つまり細胞の‘脱適応’(de-adaptation) が完了するには、ある程度の時間を要すると推測される。この、脱適応に要する時間がアクチン重合にどのように依存するかを検証した。ここでは、図 5.10 に示すように、10 nM の細胞外 cAMP に適応した状態の細胞に対して、DB を流すことで cAMP を除去し、ある時間間隔をもって再び 10 nM の cAMP を投与したときの応答強度を測定した。

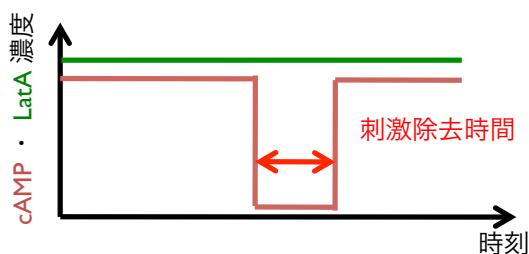


図 5.10: 脱適応のキネティクスを観察するために実現させるための微小流路内の cAMP 濃度と LatA 濃度の時間変化を表す模式図。cAMP 除去時間を様々に変えたときの、2 度目の投与に対する応答強度を測定する。

cAMP 刺激除去時間を 3 分としたときの時系列データを図 5.11 に示す。LatA を投与しない細胞について、前刺激なしの場合の cAMP リレー応答の一次ピークと比較すると（図 5.1 中段左を参照）、応答強度は弱い傾向にあることがわかった。与える LatA の濃度は、LatA を投与しない細胞と応答強度が同程度になるような LatA 濃度である $1 \mu\text{M}$ とした（図 5.12 に代表的な時系列を示す）。LatA を与えた細胞についても、前刺激なしの場合の cAMP リレー応答の一次ピークと比較すると応答強度は弱いことがわかった。様々な cAMP 刺激除去時間についてのデータをまとめたものを図 5.13 に示す。cAMP を除去して 1 分経過した時点で 30 %程度応答が回復し、3 ~ 5 分経過すると応答は 60 %程度回復し、10 分経過すると応答はほぼ完全に回復することがわかった（図 5.13 橙）。このような回復の傾向は、先行研究[Dinauer *et al.*, 1980c]において細胞集団レベルの生化学的なアッセイで測定された結果と同様なものであった。また、LatA を投与した細胞についても同様な時間スケールで適応から回復することがわかった（図 5.13 緑）。この LatA 濃度を細胞集団に与えたとき cAMP 振動の周期は増大していることは（図 4.10 下段を参照）、脱適応の時間の変化に起因しないことが示された。以上の結果から、LatA の投与による cAMP 振動の周期の増大は、一細胞レベルの cAMP リレー応答の不応期の変化によるものではなく、応答強度が抑制されたことと関連付けるべき性質であると考えられる。また、今回の結果から、絶対不応期はあったとしてもその期間は約 30 秒以下であり、cAMP の投与から 30 秒後から約 10 分の間は相対不応期であることが示された。

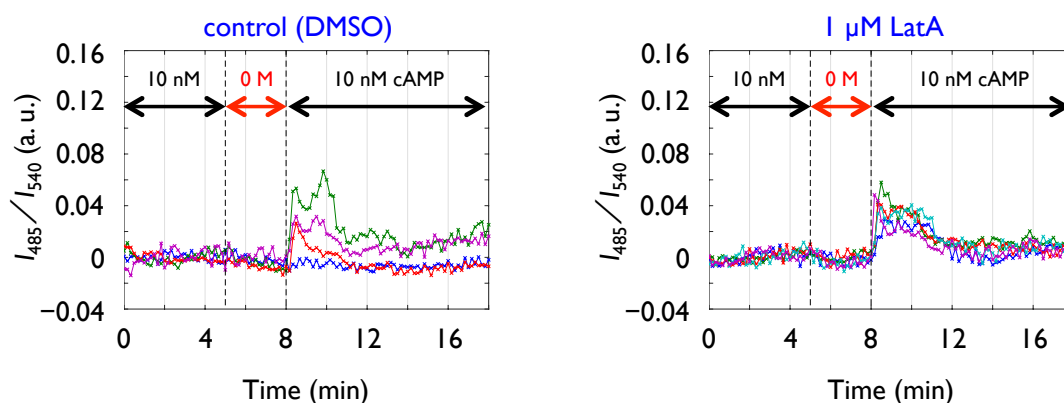


図 5.11: cAMP 刺激除去時間が 3 分のときの応答の時系列。0 M LatA は 1 %の DMSO を含む。それぞれのグラフにおける各色の時系列は、同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す。点線で示した時刻（5 分、8 分）の間で cAMP を除去した。前刺激なしの細胞と比べて応答強度が小さかった（図 5.1 中段左を参照）。

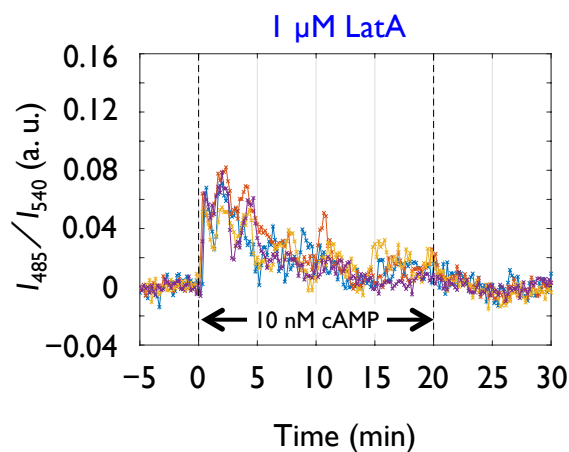


図 5.12: 1 μM の LatA を投与した細胞に 10 nM cAMP を投与したときの cAMP リレ一応答の代表的な時系列. それぞれのグラフにおける各色の時系列は, 同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. LatA を投与しないとき (図 5.1 中段左を参照) と比べて同程度の一次ピークの値を持った (図 5.13 の一番右のデータ点を参照).

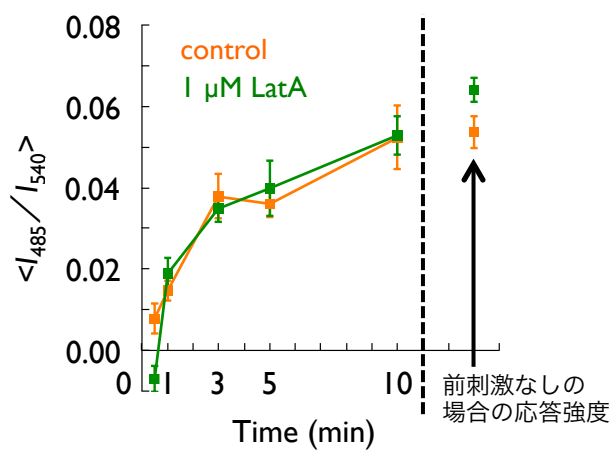


図 5.13: 脱適応のキネティクス. コントロール実験では 1% の DMSO を含む. 1 μM の LatA の有無に依らないことがわかった. 観察した細胞数は, コントロールは 30 秒, 1 分, 3 分, 5 分, 10 分, 前刺激なしの場合の順に 8, 20, 22, 45, 9, 51 で, 1 μM LatA 投与時は 30 秒から順に 5, 10, 20, 15, 15, 34 である. エラーバーは標準誤差を表す.

5.4 節 PI3K の寄与

過去の研究の知見を踏まえると、アクチンの重合の阻害は RasC・TORC2 の経路の活性を抑制する（第 2 章の 2.3 節を参照）。LatA の投与によって cAMP リレー応答の強度が減少し、細胞内 cAMP の適応的応答が完全であったことから、RasC・TORC2 の経路との関連が考えられる。一方で、シグナル伝達機構において PI3K の経路もまた重要な役割を担っている（第 2 章の 2.3 節を参照）。そこで cAMP リレー応答が PI3K にどのように依存するかを検証した。LatA に代わって、PI3K の阻害剤である LY294002（LY）を投与した細胞の cAMP リレー応答を測定した。

50 μ M LY を投与したときの細胞の画像を図 5.14 の右に示す。LatA を投与したときと異なり、仮足を伸ばす様子が観察された。LY を投与された細胞に対して 1 μ M の cAMP を投与した場合の代表的な応答の時系列を図 5.15 に示す。LY の濃度に依存してそのダイナミクスが変化する様子が見られた。cAMP 投与直後の cAMP リレー応答は、LY を投与しない細胞と比べて減少した。また、30 μ M 以上の LY を与えると、持続的かつ周期的応答は強く抑制された。これらの結果は PI3K もまた cAMP リレー応答の非適応性に寄与することを示唆する。ところが、50 μ M の LY を投与した細胞においては、20 分間の cAMP 投与中に蛍光強度比が緩やかながら上昇し、cAMP を除去すると蛍光強度比が減少する様子が見られた。これは、適応的な応答が完全であった LatA を投与した細胞とは対照的である。また、LY を投与しない細胞で見られた、cAMP 投与後数十秒の間に見られる蛍光強度比の二相的な波形は、LY の存在下でも見られた。

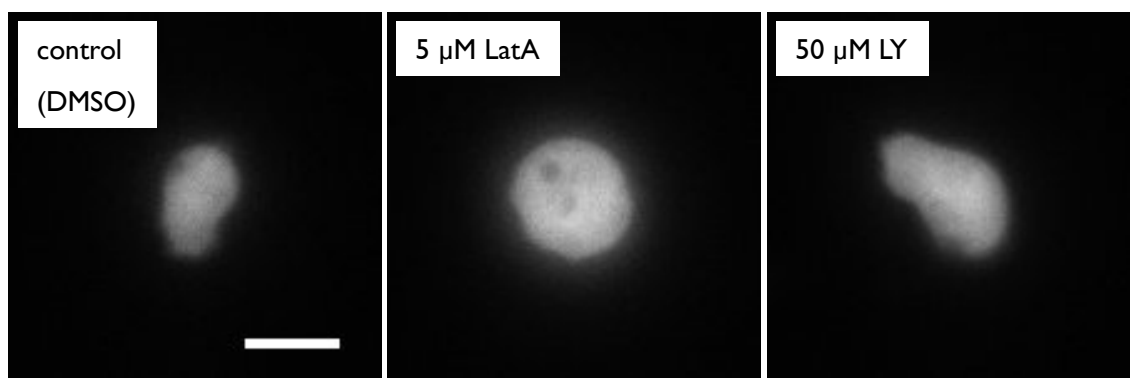


図 5.14: cAMP リレー応答の観察に用いた細胞の落射蛍光画像 (540 nm 付近の蛍光像). 1 μ M cAMP を投与している. 5 μ M LatA を投与した場合 (中央, 図 5.2 の下段右の水色で示したデータの細胞(時刻 5 分 10 秒)), 細胞の形状は丸みを帯びた. 50 μ M LY を投与した場合 (右, 図 5.15 の下段の緑色で示したデータの細胞(時刻 9 分 40 秒)) は, LatA \cdot LY を投与しない細胞 (左, 図 5.1 の下段の青色で示したデータの細胞(時刻 17 分 20 秒)) と同様に, 仮足を形成する様子が観察された. スケールバーは 10 μ m を表す.

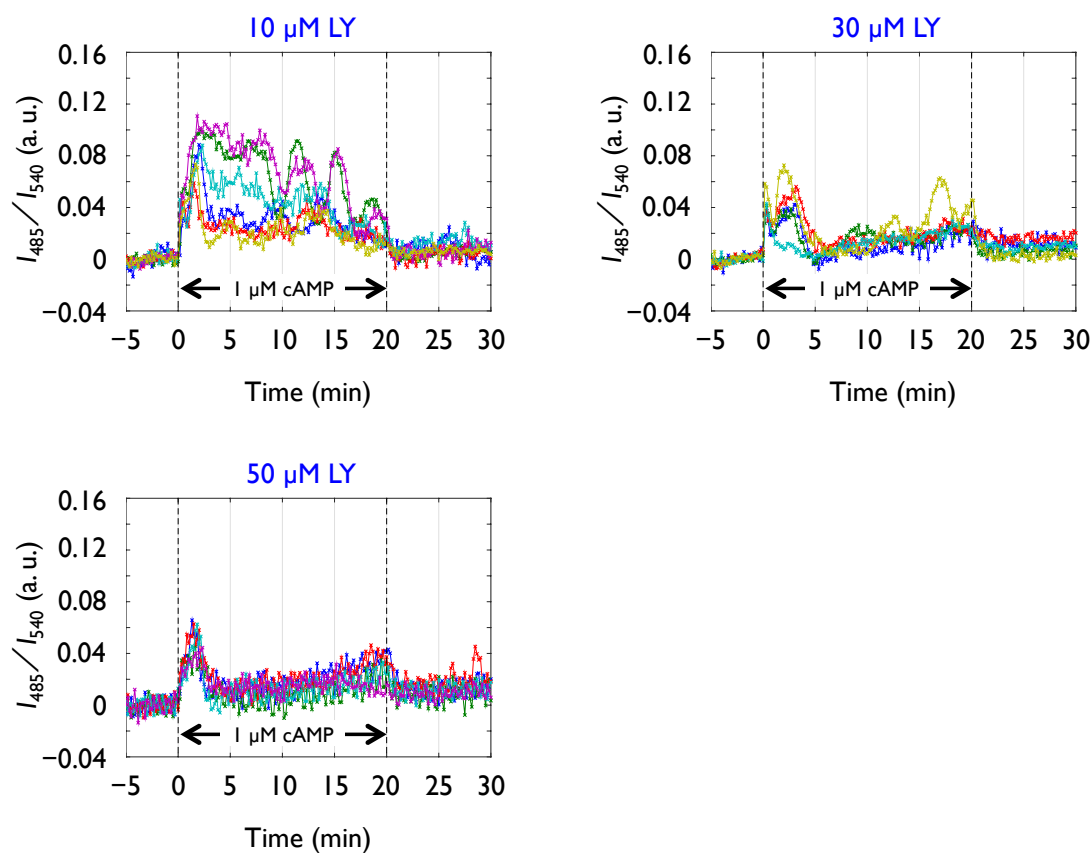


図 5.15: LY を与えた細胞の cAMP リレー応答の代表的な時系列. それぞれのグラフにおける各色の時系列は, 同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 30 μ M, 50 μ M の LY を与えると持続的かつ周期的応答は強く抑制されたが, LatA を与えた細胞と違い, cAMP 投与後 15 分以降で若干のシグナルの上昇が見られた.

LY による cAMP リレー応答の強度の抑制の度合いを図 5.16 に示す. 一次ピーク, 二次ピークともにその値は LY に依存して減少した. その傾向は 30 μ M 以上の LY を与えたときに顕著であった. また, 各 LY 濃度における時系列データについて, 各時刻における蛍光強度比の平均値と標準誤差から作製した時系列グラフを図 5.17 に示す. 50 μ M を投与した細胞においても, 僅かながら持続的な応答が見られることが示された. 50 μ M LY 投与下で細胞の形状は丸みを帯びないことから, アクチン重合の抑制は限定的であると考えられるため, この持続的な応答はアクチン重合に依存するものであると期待される. 以上のことから, cAMP リレー応答の持続的応答への寄与が PI3K よりアクチン重合のほうが大きい可能性が示唆された.

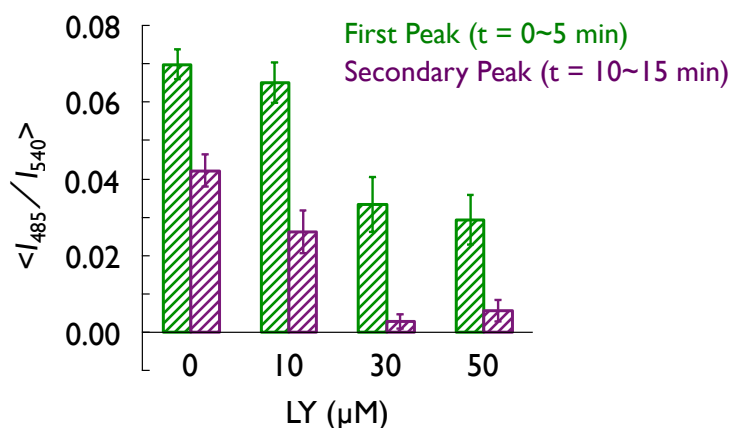


図 5.16: LY 濃度と cAMP リレー応答強度との関係. LY 濃度に依存して応答強度は減少した. cAMP 投与直後の応答の強度の指標である一次ピークは 30 μM 以上の LY で顕著に抑制された (ウェルチの t 検定において, コントロール(LY なし)との間で 30 μM LY から順に $p=0.016<0.05$, $p=4.1\times 10^{-5}<5\times 10^{-5}$ で有意差が認められた). 持続的かつ周期的な応答の強度の指標である二次ピークは 30 μM 以上の LY で顕著に抑制された (ウェルチの t 検定において, コントロールとの間で 30 μM LY から順に, $p=3.4\times 10^{-6}<5\times 10^{-6}$, $p=3.6\times 10^{-7}<5\times 10^{-7}$ で有意差が認められた). 観察した細胞数はコントロールから順に 42, 16, 10, 6 である. エラーバーは標準誤差を表す.

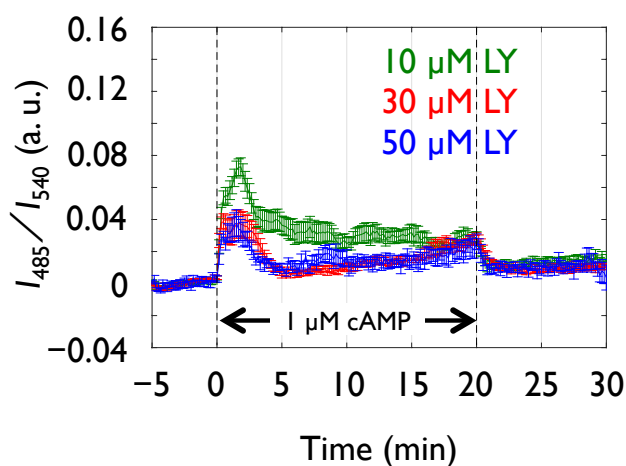


図 5.17: 各 LY 濃度について, 各時刻における蛍光強度比の平均値と標準誤差から作製した時系列グラフ. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. どの LY 濃度でも, 僅かながら持続的な応答が見られた. 細胞数は, 10 μM LY から順に 16, 10, 6 である.

第6章 結果3: 基質接着依存性

第4章, 5章の結果より, アクチン重合の抑制により, 細胞集団の cAMP 振動と一細胞レベルの cAMP リレー応答が抑制されることをみた. F-アクチンは細胞運動において, 細胞膜の突出やミオシンによる細胞膜の牽引に寄与する. また, F-アクチンは膜の裏打ち構造を構成し細胞の形状の維持を担っている. LatA によるアクチン重合の阻害は, 以上のような F-アクチンの機能すべてを抑制していると考えられるため, cAMP 振動や cAMP リレー応答にどのようなアクチン構造が寄与するかに言及することは困難である. そこでさらなるヒントを得るべく, 異なる方法により細胞の運動を抑制し, cAMP 振動と cAMP リレー応答がどのような影響を受けるかを検証した. 具体的には, 細胞と基質との間の接着性を変え, 細胞の運動を抑制し cAMP 振動と一細胞レベルの cAMP リレー応答を観察した.

6.1 節 細胞-基質間接着の促進による cAMP 振動の攪乱

PLL は正の電荷を持ち, 負に帯電している細胞膜との間に静電的な力がはたらく. PLL をガラス基板にコートすることで, 細胞の基質の接着が促進される. 先行研究により, 剪断応力による細胞の基質からの剥離が, PLL コートにより抑えられることが示されている[Lombardi *et al.*, 2008].

飢餓処理した細胞 (Epac1-camps/AX4) を, PLL をコートしたガラス上に乗せ, 細胞の重心移動の様子を観察した (方法は 3.5 節を参照). 20 倍の対物レンズで 30 秒間隔で明視野観察し, 60 分間の撮影での細胞の重心位置から平均二乗距離 (Mean Square Displacement, MSD) を計算

した。PLL コート密度が $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のとき、PLL をコートしないときと比べて MSD は減少することがわかった (図 6.1)。

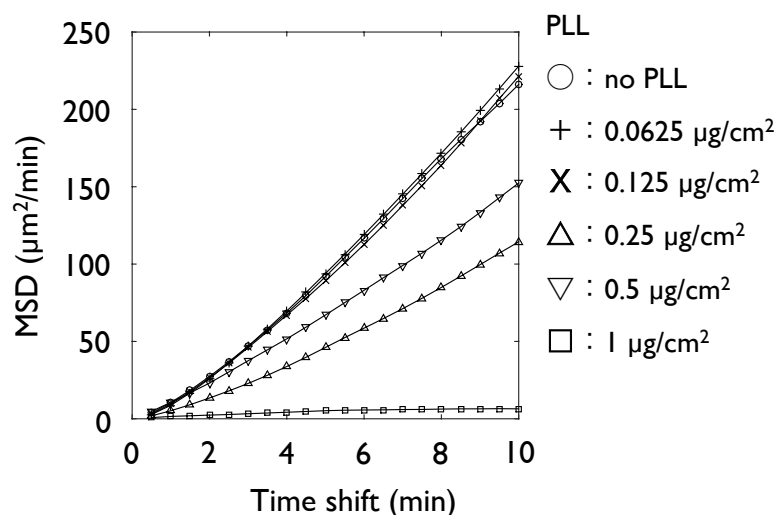


図 6.1: PLL コート密度に依存した細胞の重心移動の抑制. 横軸に示した時間幅での細胞の変位を二乗した値を時間平均し, それを全ての細胞に対して平均した値を縦軸に示した (観察した細胞数は, PLL をコートしない条件から順に, 13, 15, 9, 29, 22, 3). $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上で PLL をコートしたとき, 細胞の重心移動が抑制された.

続いて, $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の密度で PLL をコートしたときの細胞集団レベルの cAMP 振動を観察した. 市販のガラスボトムディッシュのガラス部分を, PLL をコートしたガラスに置換し, ガラスが露出した部分に, 飢餓処理した細胞 (Epac1-camps/AX4) を希釈し $500 \mu\text{L}$ の懸濁液を乗せた (細胞密度は $1.67 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2$ とした). 20 倍の対物レンズを使用し, 視野中の細胞全体の平均輝度値から蛍光強度比 (I_{485}/I_{540}) を求め, その時系列を得た. 代表的な時系列を図 6.2 に示す. PLL 存在下では振動の周期が増大することがわかった (図 6.3).

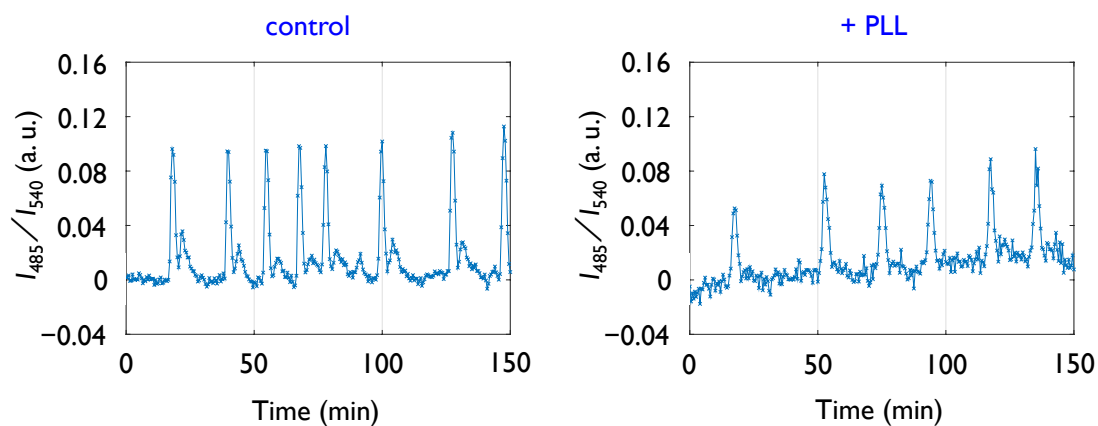


図 6.2: PLL ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) をコートしたガラス上の細胞集団の cAMP 振動の代表的な時系列グラフ. PLL のコートによって cAMP 振動の周期が長くなることが観察された.

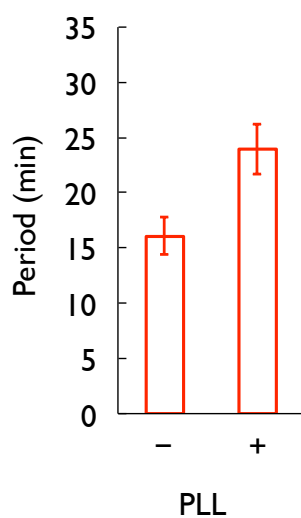


図 6.3: PLL の有無による cAMP 振動の周期の変化. PLL の存在下では, その周期は増大した (ウェルチの t 検定において, $p=0.021 < 0.05$ で有意差が認められた). 試行回数は, コントロールは 6 回, PLL 存在下では 6 回である. エラーバーは標準誤差を表す.

6.2 節 細胞-基質間接着の促進による cAMP リレー応答の抑制

PLL のコートにより細胞集団の cAMP 振動の周期が長くなったことは、一細胞レベルの cAMP リレー応答が、基質との接着の促進により攪乱を受ける可能性を示唆している。そこで、微小流路内に PLL をコートし、そこに貼りつけた細胞の cAMP リレー応答を観察した。微小流路はガラスと PDMS で囲まれた空間であり、ガラス面以外に PDMS からなる上面と側面にも PLL が吸着されるため、絶対的なコート密度は定義しにくい。そのため、cAMP リレー応答の測定の際は、コートするときに流路内に導入した PLL 溶液の濃度から計算される相対コート密度を用いた。相対コート密度が 1 とは、本研究で使用した最大濃度である 0.05 % PLL 溶液を流路内に導入して得られるコート密度を指す。

代表的な時系列を図 6.4 に示す。1 μ M の細胞外 cAMP に対する応答の強度は、PLL コート密度依存的に減少することが明らかになった。最大の PLL コート密度のとき、cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答が消失し、蛍光強度比は cAMP 投与前のレベルにまで減少した。また、cAMP を投与して直後の応答の強度も抑制された。コート密度が低い条件でも、cAMP 投与直後の応答の強度は抑制され、cAMP を与えて約 5 分以降に見られる持続する周期的振る舞いの強度も減少する傾向にあった。これらのデータを図 6.5 にまとめる。この結果は、PLL のコートにより運動が抑制されたことで、一細胞レベルの cAMP リレー応答が抑制され、そのため細胞集団の cAMP 振動も抑制された可能性を強く示唆している。

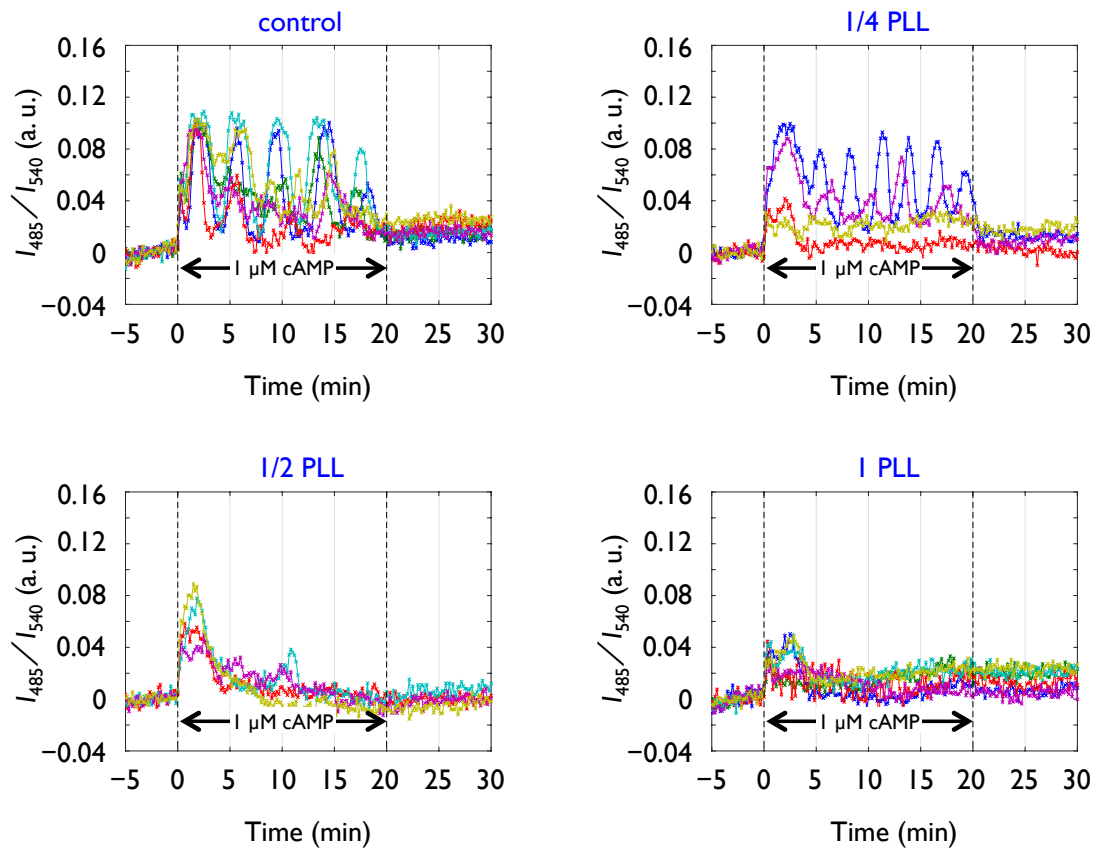


図 6.4: PLL をコートしたときの、細胞の cAMP リレー応答の代表的な時系列。それぞれのグラフにおける各色の時系列は、同一視野内でない別の単一細胞のデータ点を表す。点線で示した時刻（0 分、20 分）の間で cAMP を与えた。特に、持続的かつ周期的応答の抑制が顕著に見られた。高密度の PLL 存在下では、cAMP 投与直後の応答も強く抑制された。

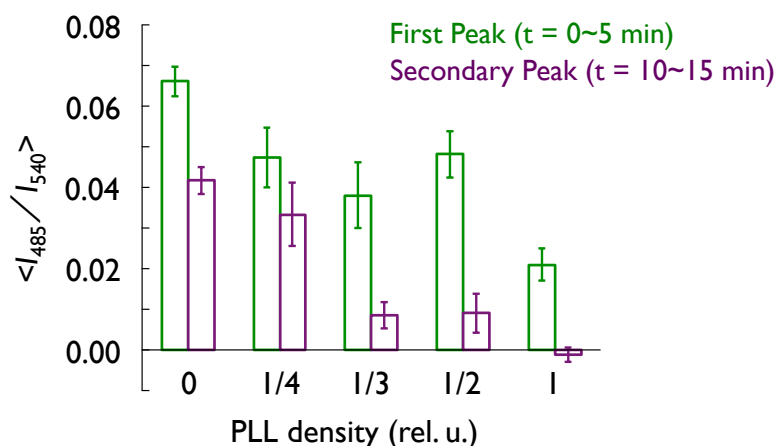


図 6.5: PLL コート密度と cAMP リレー応答強度との関係。コート密度に依存して応答強度は抑制された。一次ピークはウェルチの t 検定において、コントロールとの間で 1/4 PLL から順に $p=0.040<0.05$, $p=0.0055<0.01$, $p=0.010<0.05$, $p=3.0\times 10^{-7}<5\times 10^{-7}$ で有意差が認められた。二次ピークはウェルチの t 検定において、コントロールとの間で 1/3 PLL, 1/2 PLL, 1 PLL の順に $p=1.0\times 10^{-5}<5\times 10^{-5}$, $p=6.0\times 10^{-6}<10^{-5}$, $p=1.0\times 10^{-9}<5\times 10^{-8}$ で有意差が認められた。観察した細胞数は、コントロールから順に 31, 15, 6, 17, 12 である。エラーバーは標準誤差を表す。

6.3 節 細胞-基質間接着の障害の影響

運動を抑制する別の手法として、細胞の基質への接着を障害することが挙げられる。しかし、本研究で行っているような振盪による飢餓処理により、走化性応答や cAMP リレー応答に関わるシグナル伝達機構の構成タンパク質の発現量が上昇することが、マイクロアレイを用いた解析により明らかになっている [Iranfar *et al.*, 2003]。また、細胞外 cAMP に対するシグナル伝達機構の構成タンパク質の活性を解析した多くの研究は、懸濁液中の細胞の応答を測定している。従って、細胞が基質と接着できなくても cAMP 振動は生じ得るが、ガラス基質面に静置した状態で、基質との接着の障害が cAMP 振動にどのような与える影響を及ぼすかは明らかではない。

細胞-基質間接着を障害したときの細胞集団の cAMP 振動を測定するため、細胞接着を障害するポリマー分子であるプルロニックをコートしたガラス基質上に細胞を乗せ、振る舞いを観察することとした。細胞の画像を図 6.6 の左に示す。細胞の基質への接着は抑制されたが、細胞同士が接着することで細胞密度の不均一さが生じてしまった。細胞間接着は Ca^{2+} イオンに依存して生じるため、これを抑制するために、バッファーに 2 価イオンのキレート剤である EDTA (同

仁化学) を $400\ \mu\text{M}$ の終濃度で加えて観察した。その様子を図 6.6 の右に示す。通常のガラス上であるにも関わらず細胞が丸みを帯びた形状を取った。応答も弱まったことから (図 6.7), EDTA は細胞へのダメージが強いことが示唆された。

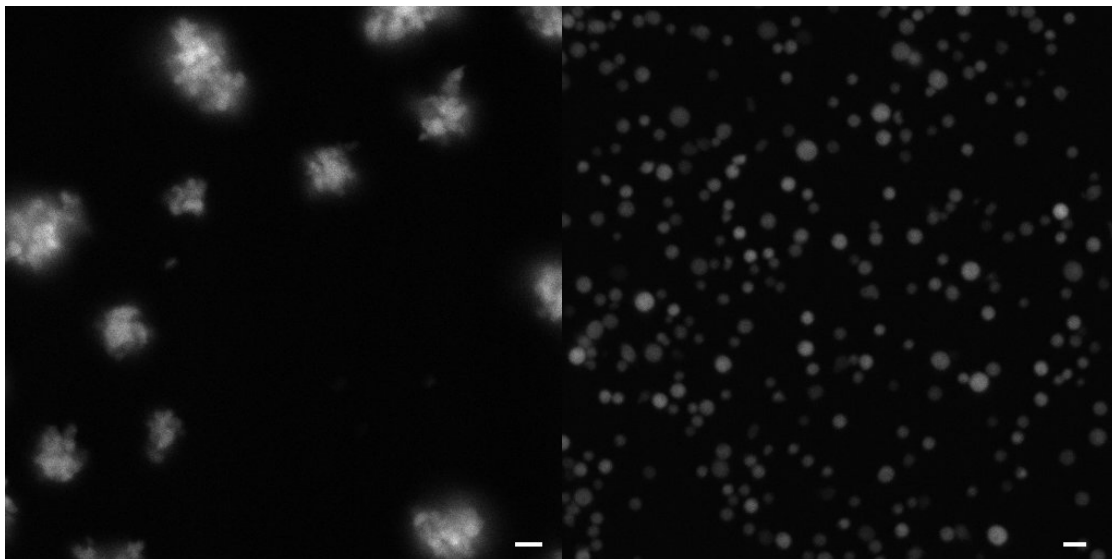


図 6.6: 細胞接着の影響の検証を試みた実験の様子。プルロニックをコートしたガラス基質上では細胞同士で接着し細胞塊を形成することが多かった (左)。2価イオンのキレート剤である EDTA を加えたところ、通常のガラス上でも、細胞へのダメージが強いことがわかった (右)。バーは $20\ \mu\text{m}$ を表す。

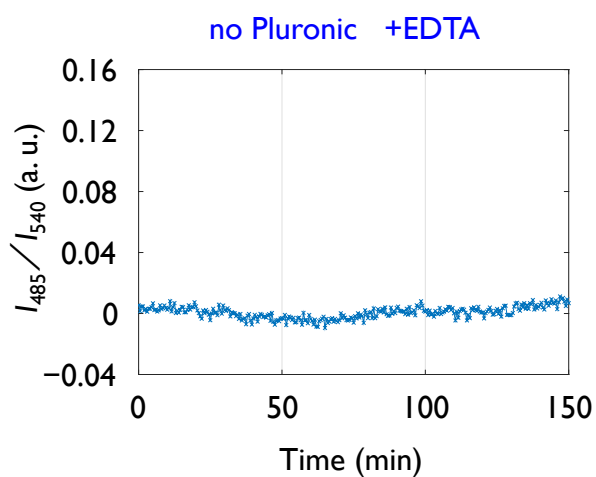


図 6.7: プルロニックをコートしていないガラス上で EDTA を投与した細胞集団の cAMP 振動の代表的な時系列グラフ。cAMP 振動が顕著に抑制された。

6.4 節 細胞の基質への接着領域の制限

細胞の形状や移動方向を人為的に制限したときの細胞の応答を観察できれば、直接的に、細胞形状や重心移動が cAMP リレー応答にどのように影響するかを検証することができる。そこで、ガラス基質上にプルロニックをパターンニングすることで、細胞の基質への接着領域を制限して、細胞形状や重心移動の方向を制御することを試みた。

ガラス基質上に、プルロニックを 40 μm 間隔でストライプ状にコートした (3.5 節を参照)。細胞が接着できる領域は 40 μm 間隔で約 6.5 μm の幅を持った領域である。このガラスに、液体培地中で培養していた細胞をバッファーで洗浄してすぐさま乗せて観察した様子を図 6.8 に示す。細胞の配置を制限することができた。しかし、細胞の形状を 6.5 μm の幅に制御することはできなかった。また、細胞塊ができやすく、プルロニックをコートした部分にも細胞が存在する様子が観察された。続いて、振盪による飢餓処理を行った細胞をこのガラス基質上に乗せて観察したところ、cAMP の周期的な進行波は様々な方向に伝播した (図 6.9)。細胞が移動できる方向に依存して波の伝播が特定の方向にバイアスされるような振る舞いは見られなかった。

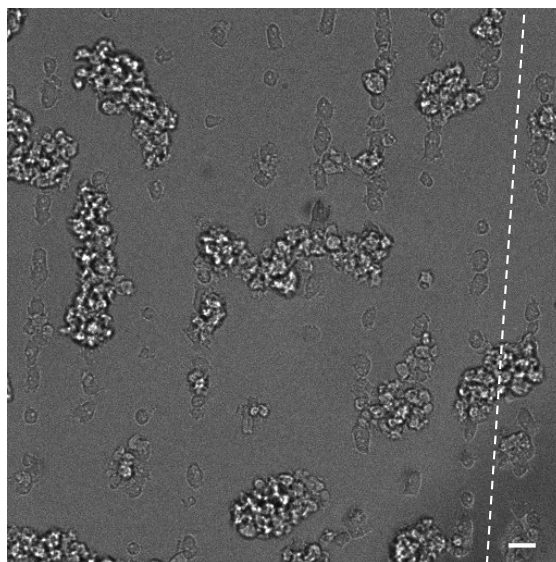


図 6.8: プルロニックのパターンニングにより細胞の基質への接着位置を操作できた例。白い点線と平行に、ストライプ状に細胞が存在する様子が見られた。また、細胞塊が生じた。スケールバーは 20 μm を表す。

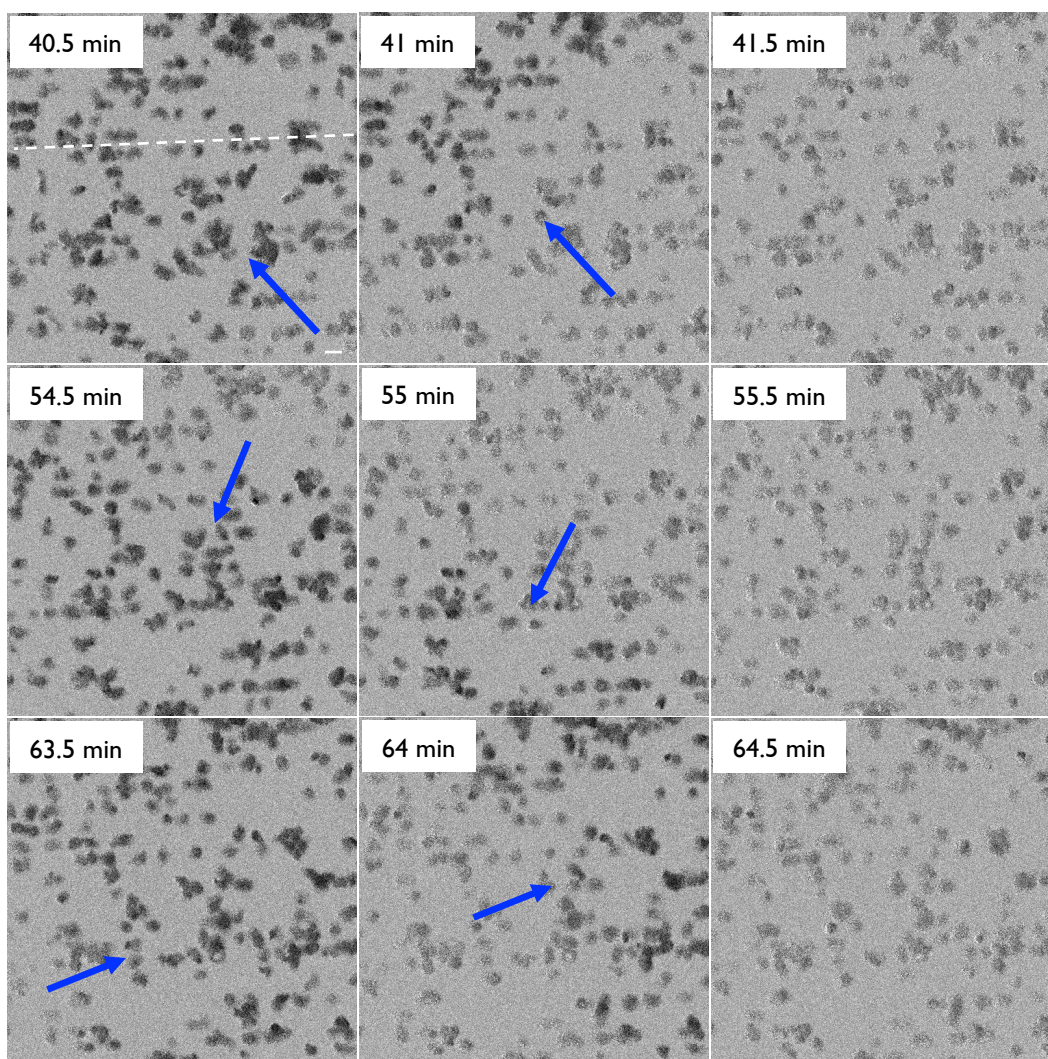


図 6.9: ストライプ状の接着領域を持つガラス基質上での細胞集団の cAMP 振動の様子。CFP と YFP の蛍光強度比の値をもって画像を再構成した。白い点線と平行に並ぶように細胞が位置しているが、細胞塊ができることがあった。cAMP 振動の波は、様々な方向から伝播した (青い矢印)。スケールバーは 20 μm を表す。

第7章 結果 4: cAMP リレー応答と細胞の機械的特性との関係

第4章, 5章, 6章の結果から, アクチン重合や細胞運動の薬理的な阻害により cAMP リレー応答が抑制されることが明らかになった. 一方で, 集合過程においては, 細胞は自律的に走化性応答と cAMP リレー応答とのタイミングを揃えて行いながら細胞集団が集合する. LatA や PLL の存在の有無にかかわらず, F-アクチンの量や細胞形状や重心移動といった特徴と cAMP リレー応答とがどのような量的関係を持っているかを検証することで, 両者の間の相関関係を明らかにすることができる. そこで, 同一細胞において, cAMP リレー応答とともに F-アクチンの動態や細胞の運動速度や形状を同時に定量し, それらの関係を解析することとした.

7.1 節 共焦点顕微鏡による cAMP リレー応答の測定

Epac1-camps と Lifeact-mRFPmars を共発現した株を用い cAMP リレー応答と F-アクチンの動態を同時に可視化し, cAMP を投与したときの, F-アクチンの量と cAMP リレー応答との量的関係を検証した. 細胞の側面における F-アクチン量を定量するため, 共焦点顕微鏡により基質接着面から高さ $2\mu\text{m}$ のスライス蛍光画像を取得することとした.

先行研究[Gregor *et al.*, 2010]においても, これまで本研究で示してきた結果においても, Epac1-camps によって可視化された cAMP リレー応答は全て落射蛍光顕微鏡により取得した画像を元に解析された. 落射蛍光像は, あらゆる観察面で取得された共焦点像を積算したものとする

ことができる。従って、共焦点顕微鏡により取得したスライス画像を元に解析した cAMP リレー応答の動態が、これまでと同様なものであるかどうかは自明ではない。これを検証した。

まず、細胞内 cAMP 濃度の偏りが存在するかを、100 倍の対物レンズでの 4 秒間隔のタイムラプス撮影から検証した。各座標の CFP と YFP の蛍光強度比の値をもって再構成した画像を図 7.1 に示す。所々にピクセル値の偏りが生じていることがわかった。しかし、局所的にピクセル値の高い領域は、4 秒後も同じ地点にとどまることはほとんどなかった。取得した蛍光画像がノイズを多く含むものであることや、細胞内の核や小胞体等の構造の存在による蛍光のぼらつきがあることが要因と考えられる。また、細胞の仮足の伸長に伴ったピクセル値の上昇や減少は見られなかった。10 nM の cAMP を投与すると（時刻 0 以降）細胞の領域全体でピクセル値が上昇した（図 7.1 上段の 1 min 24 sec 以降，図 7.1 下段の 0 min 56 sec 以降）。細胞内の cAMP は、本測定の時間分解能の範囲で、細胞質中に均一に存在していると考えられる。また、細胞領域全体の平均輝度値を用いて蛍光強度比を計算するこれまで行ってきた解析方法の妥当性も、この結果より裏付けられた。

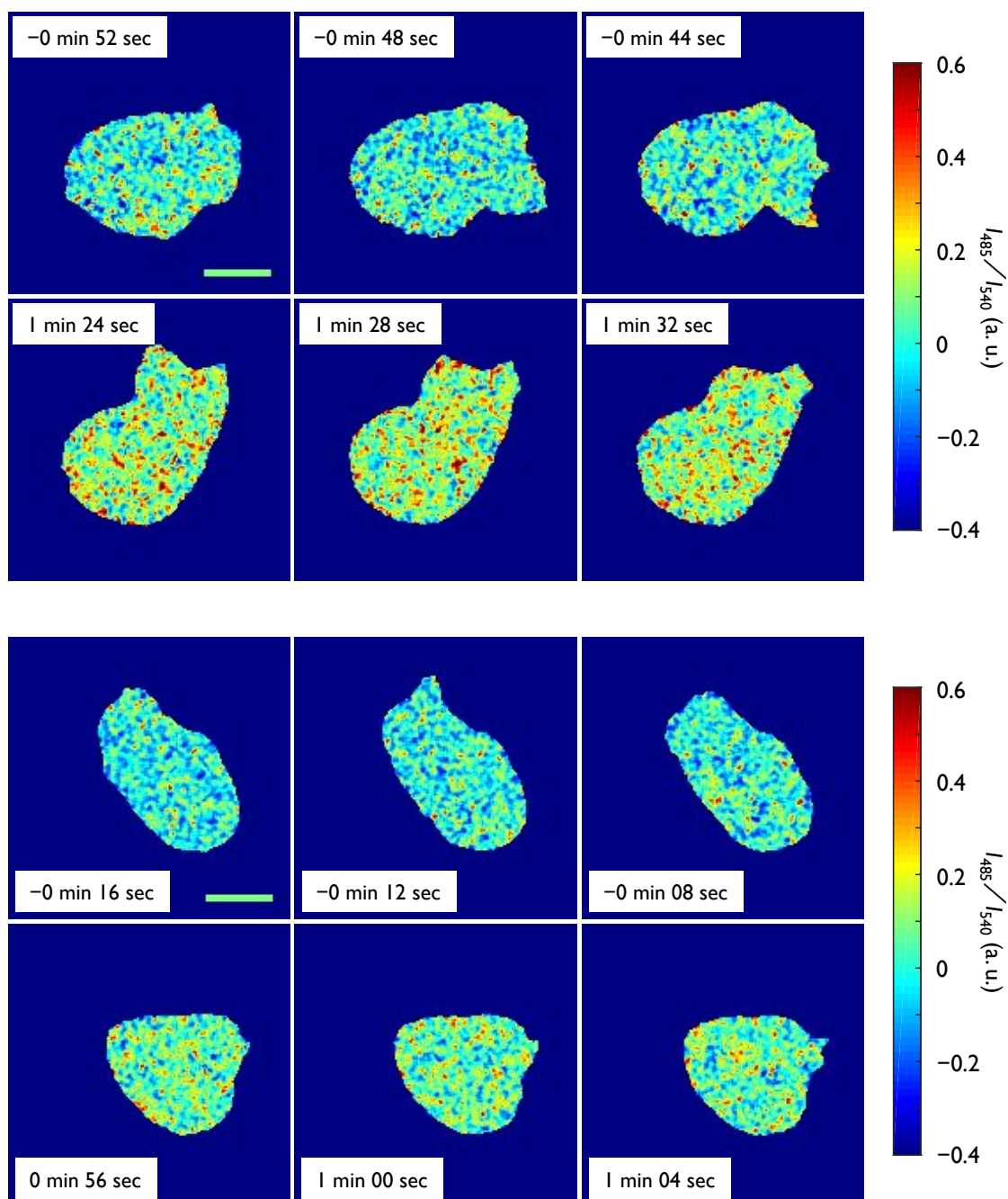


図 7.1: 10 nM の cAMP を投与した細胞を共焦点観察し、各座標の CFP と YFP の蛍光強度比の値をもって再構成した画像。時刻 0 で cAMP の投与を開始した。100 倍の対物レンズにて観察した。二つの画像列はそれぞれ別の試行での観察結果である。ピクセル値の高い領域が 4 秒後にも同じ地点にとどまることはほとんど無かった。また、仮足の形成に伴うピクセル値の上昇や減少は見られなかった。cAMP を投与すると、細胞領域全体でピクセル値が上昇した。スケールバーは 5 μm を表す。

続いて、共焦点顕微鏡により得られた画像から、10 nM と 1 μM の cAMP を投与したときの

cAMP リレー応答を解析した(図 7.2). 落射蛍光像での解析結果と比べてノイズが大きいことが, cAMP を加えていない時間帯での蛍光強度比の値の変化からわかった. 応答のダイナミクスは, 10 nM cAMP では適応的であり, 1 μ M cAMP では持続的であった. すなわち, 応答の波形は概ね落射蛍光顕微鏡で得られた画像から解析したもの(図 5.1 の中段左と下段)と同様の動態を示すことがわかった.

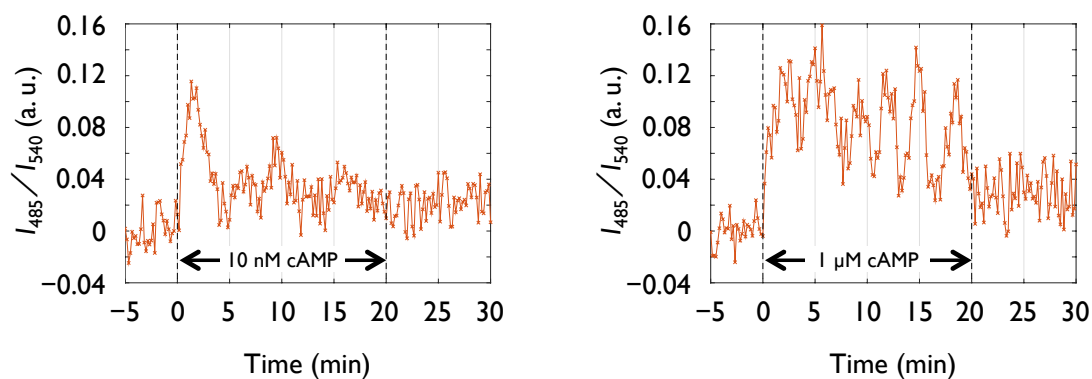


図 7.2: 共焦点像から得られた cAMP リレー応答. 点線で示した時刻(0分, 20分)の間で cAMP を与えた. 先行研究[Gregor *et al.*, 2010]や, 本研究にて落射蛍光像から解析した結果(図 5.1 の中段左と下段)と同様に, 低濃度の cAMP を与えると適応的な応答を示し, 高濃度の cAMP を与えると持続的かつ周期的応答を示した.

7.2 節 細胞側面における F-アクチンの動態との関係

細胞外 cAMP 存在下での細胞における Lifeact-mRFPmars の共焦点蛍光画像を図 7.3 に示す. 60 倍の対物レンズを用いて, 10 秒間隔のタイムラプス撮影を行った. cAMP 投与前(図 7.3, -3 min 40 sec)から仮足形成を伴う局所的な Lifeact-mRFPmars の集積が認められた. cAMP を投与して 30 秒以内(図 7.3, 0 min 10 sec)に, 細胞の縁全体において Lifeact-mRFPmars が増加し, 縁を除いた細胞領域では Lifeact-mRFPmars 輝度値の減少が観察された. cAMP を投与して 30 秒以降(図 7.3, 6 min 40 sec 以降)は, 局所的な Lifeact-mRFPmars の集積が繰り返し生じる様子が再び見られた.

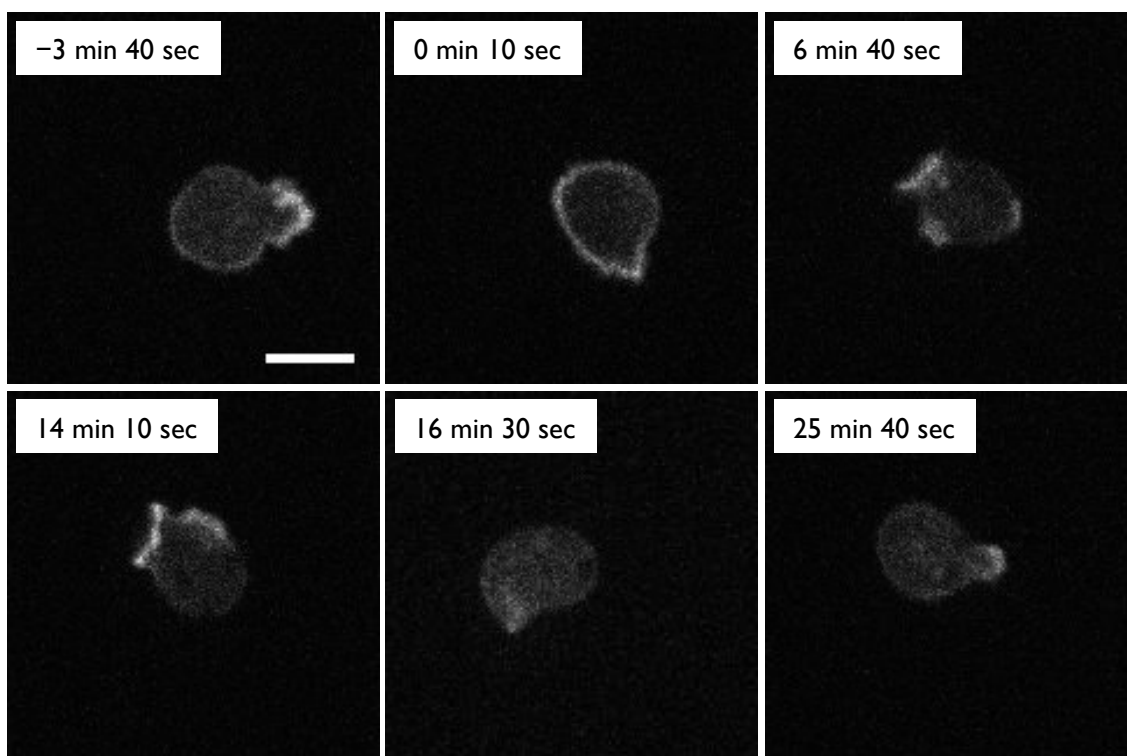


図 7.3: Lifeact-mRFPmars を発現した細胞の共焦点蛍光像. cAMP 投入前から, Lifeact-mRFPmars の集積と同時に細胞膜の押し出しが見られた. cAMP 投与直後 (時刻 0 以降) に, 細胞の縁全体で Lifeact-mRFPmars の集積が生じ, 縁を除いた細胞領域の輝度は減少した. スケールバーは 10 μm を表す.

1 μM の cAMP 投与下における F-アクチンの動態と cAMP リレー応答を同時可視化した結果を図 7.4 に示す. 細胞の側面における F-アクチン量は, 1 μm の厚みを持った細胞膜領域の Lifeact-mRFPmars の輝度値とその内側の輝度値との比で定義した (I_{600} , 3.8 節を参照). cAMP を投与してから 30 秒以内に F-アクチンの量が一過的に上昇する様子が見られた. また, cAMP を投与して約 10 分経過してから, cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答と F-アクチンの側面での量の変動とのタイミングが非常によく一致している様子が見られることがあった (図 7.4 の上段). しかし, 多くの場合, 同期は認められなかった (図 7.4 の中段と下段). 細胞の側面における F-アクチンの集積が周期的に行われることと cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答は必ずしも連動していないことがわかった.

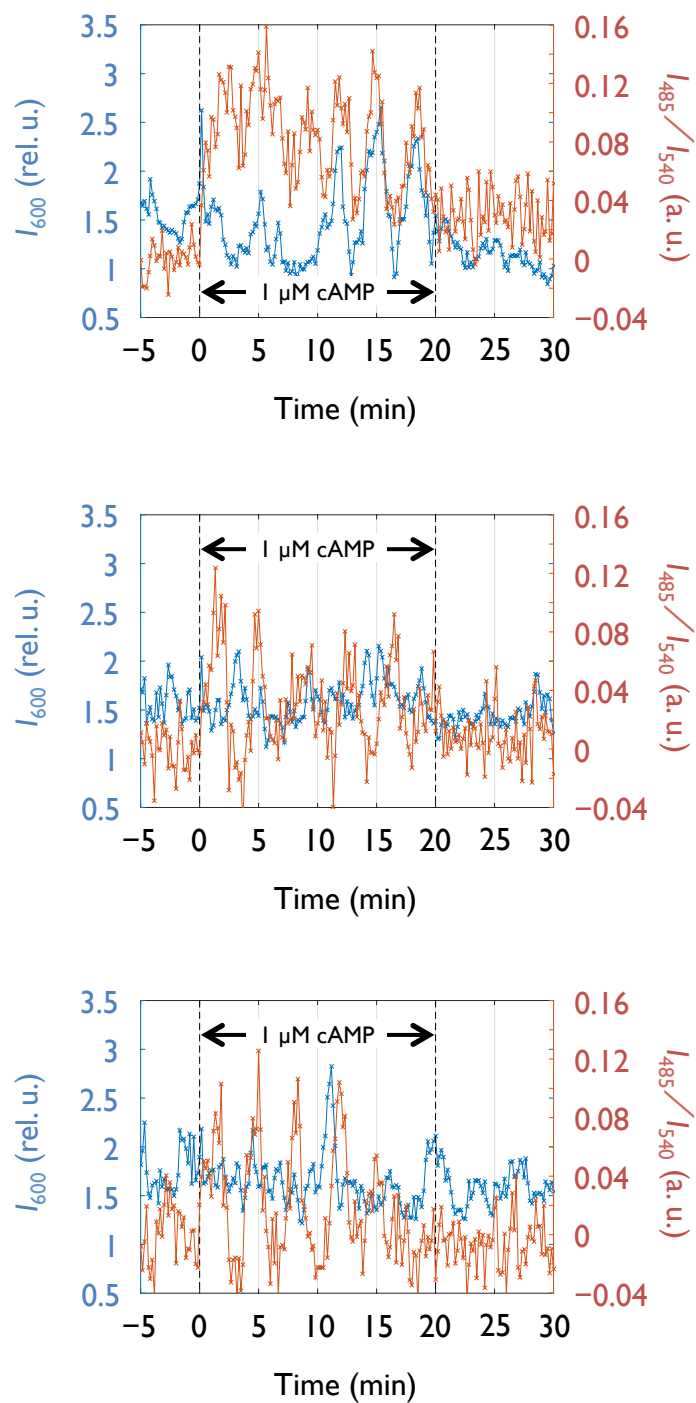


図 7.4: 共焦点像より得られた, $1 \mu\text{M}$ の cAMP を投与したときの F-アクチンの動態と cAMP リレー応答の代表的な時系列. 各グラフは別の試行における単一細胞のデータ点を表す. 青は細胞側面における Lifeact-mRFPmars の輝度値, 赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 両応答の周期的変動が一致することがまれにあったが (上段の 15~25 分, 図 7.3 に対応), 多くの場合, 同期は認められなかった (中段, 下段).

次に、10 nM の cAMP を投与したときの F-アクチンの動態と cAMP リレー応答を同時可視化した結果を図 7.5 に示す。1 μ M のときと同様に、cAMP を投与してから約 30 秒以内に細胞側面での F-アクチンの集積が生じた。cAMP リレー応答と同様に、F-アクチンの量も一過的に上昇して次第に cAMP 投与前のレベルにまで減少するような動態を示すことと（図 7.5 の上段）、示さないことが観察された（図 7.5 の中段、下段）。

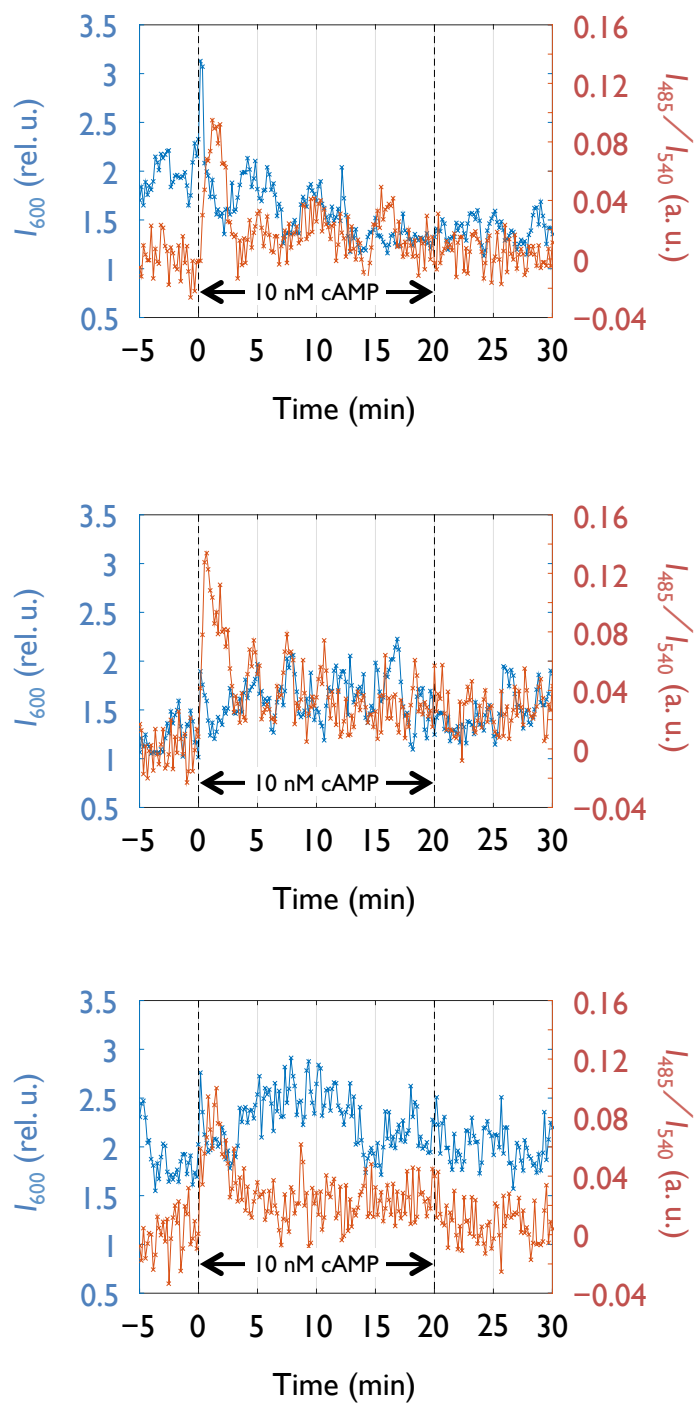


図 7.5: 共焦点像より得られた, 10 nM の cAMP を投与したときの F-アクチンの動態と cAMP リレー応答の代表的な時系列. 各グラフは別の試行における単一細胞のデータである. 青は細胞側面における Lifeact-mRFPmars の輝度値, 赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. F-アクチンの量が cAMP リレー応答と同様な動態を示すことと (上段), 示さないことが観察された (中段, 下段).

細胞外 cAMP に対する F-アクチン量と cAMP リレー応答の強度との相関を見るため、F-アクチンの量と cAMP リレー応答の強度との間の相関係数を求めることとした。cAMP 投与後 30 秒以内での細胞側面における F-アクチン量の最大値を横軸に、cAMP リレー応答の一次ピークを縦軸に取り散布図を作成した (図 7.6)。ここで、F-アクチン量は、cAMP 投与前 5 分間の F-アクチン量の時間平均値との比をとることで規格化している。LatA と PLL の非存在下での細胞のデータのみで見ると、10 nM cAMP については正に相関する傾向が見られ、1 μ M cAMP については主な相関は確認できないことがわかった (図 7.6, 丸点)。10 nM の cAMP を与えた細胞について、LatA 処理したときと基質上に PLL をコートしたとき、F-アクチン量のピーク値は減少した。これらのデータをまとめて散布図に表示すると、F-アクチン量のピーク値と cAMP リレー応答の一次ピーク値との間に正の相関関係が認められた (図 7.6 の左図, 右下のデータ点をはずれ値として除いた場合、ピアソンの積率相関係数 $r = 0.5994$ ($p = 0.0032 < 0.005$))。1 μ M cAMP についても、基質に PLL をコートしたとき、F-アクチン量は減少した (図 7.6 の右図, \times 点)。同様にこのデータを加えた散布図を図 7.6 の右に示す。1 μ M cAMP のデータについては、強い相関は見られなかった。

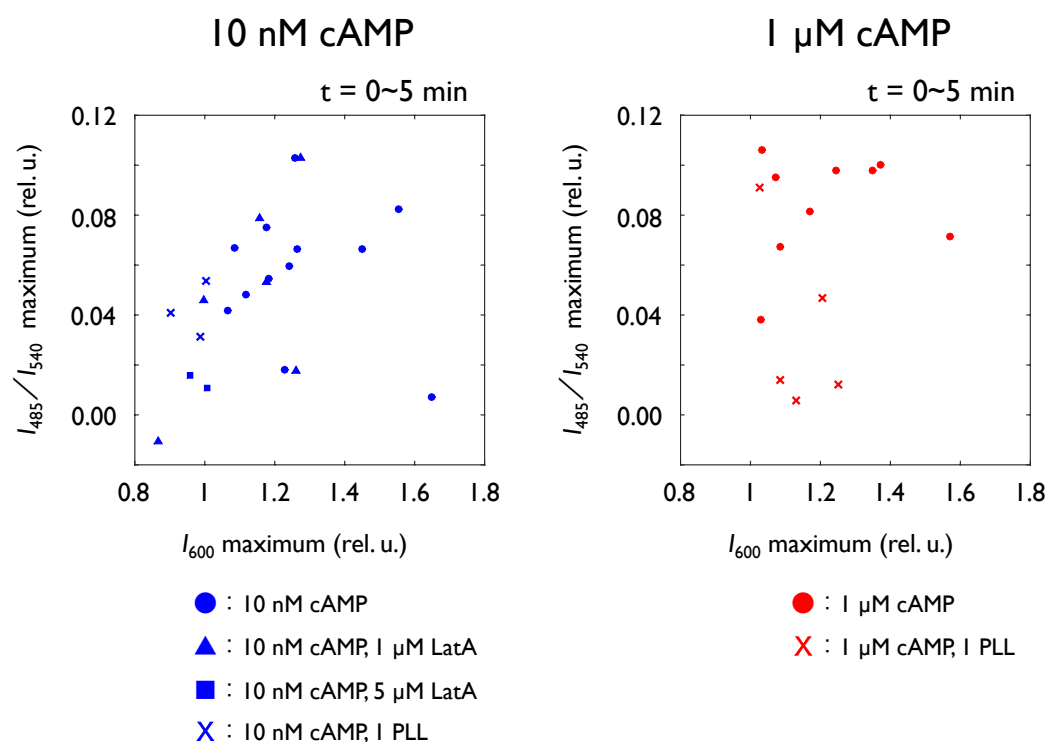


図 7.6: cAMP 投与後 30 秒間の細胞側面の F-アクチン量のピーク値(横軸)と cAMP リレー応答の一次ピーク(縦軸)との関係。共焦点蛍光像より解析した。10 nM cAMP (左)では、正に相関した(右下のデータ点を除いてピアソンの積率相関係数 $r = 0.5994$ ($p = 0.0032 < 0.005$))。1 μM cAMP (右)については相関は弱かった。

続いて、cAMP 投与後 5 分間での細胞側面の F-アクチン量の時間平均値を横軸にとり散布図を作成した(図 7.7)。F-アクチン量は、cAMP 投与前 5 分間の F-アクチン量の時間平均値との比をとることで規格化した。この F-アクチン量の時間平均値は、cAMP 投与前後の F-アクチン量の変化を計るものとして使用した。10 nM cAMP のデータにおいては正の相関が見られた(図 7.7 左、ピアソンの積率相関係数 $r = 0.4367$ ($p = 0.0372 < 0.05$))。cAMP 投与直後の細胞側面における F-アクチンの量が増加したとき cAMP リレー応答の強度も高くなり、F-アクチンの量にほとんど変化が見られないとき最も cAMP リレー応答が弱まることを表している。1 μM cAMP のデータにおいては、主な相関は見られなかった(図 7.7 右)。どちらの細胞外 cAMP 濃度においても、F-アクチン量の値が 1 を下回る、つまり細胞側面に見られる F-アクチン量が cAMP 投与前と比べて減少したときも cAMP リレー応答の強度が高くなることがあった。細胞側面の F-アクチン量が減少したとしても細胞内 cAMP 濃度が減少するとは限らないことを示している。

細胞側面における F-アクチン量は、10 nM cAMP と 1 μM cAMP との間で差は見られなかったが(図 7.7 の青丸点と赤丸点)、PLL 存在下では細胞外 cAMP 濃度依存性が見られた(図 7.7 の

青色×点と赤色×点).

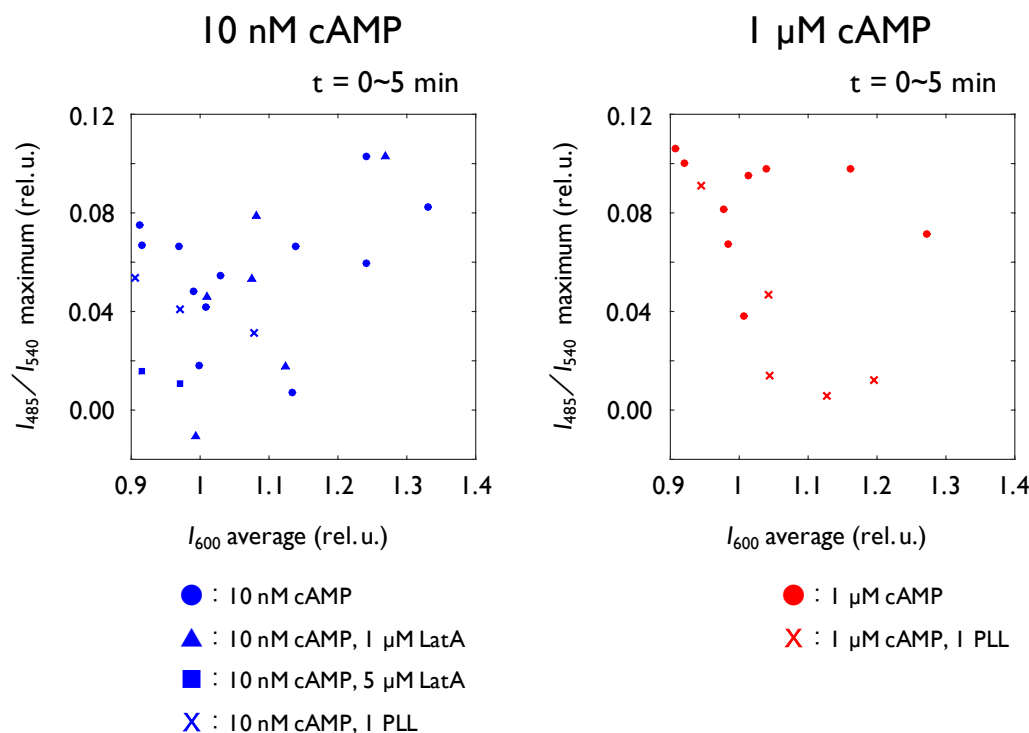


図 7.7: cAMP 投与後 5 分間の細胞側面における F-アクチン量の平均値 (横軸) と cAMP リレー応答の一次ピーク (縦軸) との関係。共焦点蛍光像より解析した。10 nM cAMP (左) においては、正の相関が見られた (ピアソンの積率相関係数 $r = 0.4367$ ($p = 0.0372 < 0.05$)). F-アクチン量が 1 を下回る (cAMP 投与前と比べて F-アクチン量が減少する) 場合においても、cAMP リレー応答が高い強度を持つことがあった。1 μM cAMP (右) においても、このような傾向がみられた。

cAMP リレー応答の持続的応答との量的関係を検証するため、cAMP を加えて 10~15 分後の F-アクチン量を横軸に、cAMP リレー応答の二次ピークの値を縦軸にとり散布図を作成した (図 7.8)。F-アクチン量は、cAMP 投与後 10~15 分間の F-アクチンの量の最大値と平均値の比とした。10 nM cAMP のデータにおいては、主な相関は見られなかった (図 7.8 左)。1 μM cAMP のデータにおいては、cAMP リレー応答の二次ピーク値が高いときは、F-アクチンの量も多い傾向にあることがわかった (図 7.8 右の右上のデータ点)。

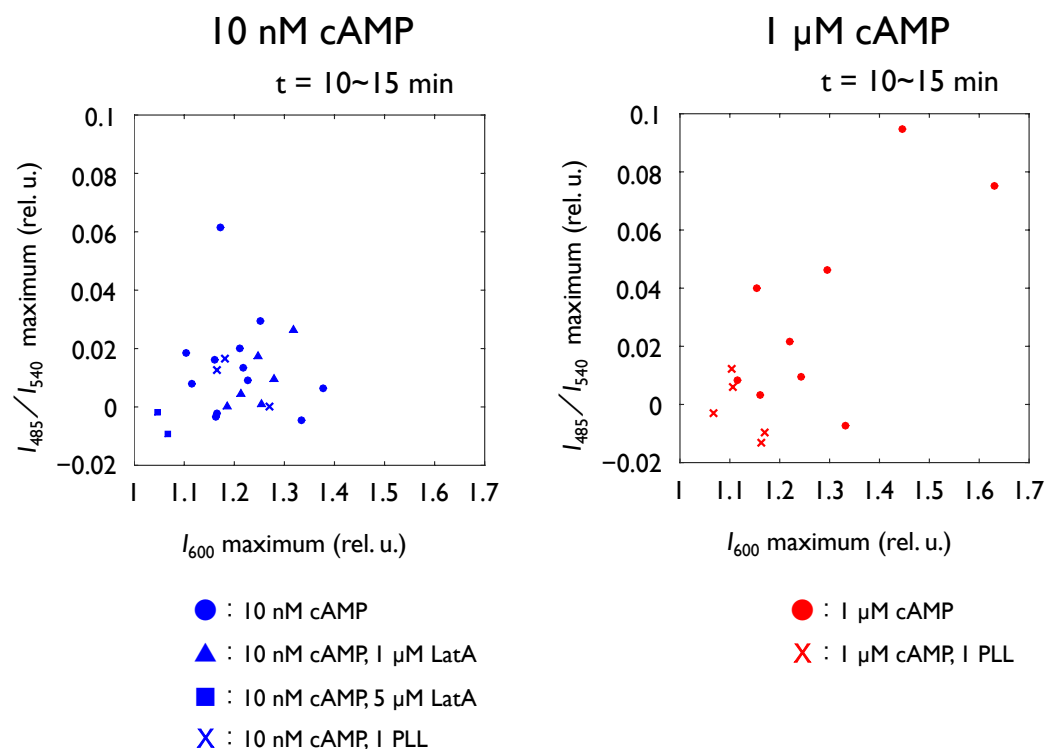


図 7.8: cAMP 投与後 10~15 分の細胞側面における F-アクチン量のピーク値（横軸）と cAMP リレー応答の二次ピーク（縦軸）との関係。共焦点蛍光像より解析した。10 nM cAMP (左) については主だった傾向は見られなかった。1 μM cAMP (右) については、両応答のピーク値が高い値を持つことがあった。

ここまでの解析より細胞内 cAMP 濃度と細胞側面における F-アクチン量との間には弱いながらも正の相関がみられた。細胞側面における F-アクチンの量が ACA の活性に相当するものであるとするならば、cAMP リレー応答を反映する蛍光強度比のデータを時間微分した量と F-アクチン量との間により明瞭な相関がみられるかもしれない。そこで、F-アクチン量と cAMP リレー応答の時間変化率との関係を検証するため、それぞれの量を横軸と縦軸にとり散布図を作成した (図 7.9)。cAMP 投与後 30 秒以内での細胞側面における F-アクチン量の最大値と cAMP 投与後 5 分間での cAMP リレー応答の時間変化率の最大値との関係 (図 7.9 の上段)、cAMP 投与後 5 分間での細胞側面の F-アクチン量の時間平均値と cAMP リレー応答の時間変化率の最大値との関係 (図 7.9 の中段)、cAMP を投与して 10~15 分後の F-アクチン量と cAMP リレー応答の時間変化率の最大値との関係 (図 7.9 の下段) を示している。規格化の方法は図 7.6, 図 7.7, 図 7.8 の散布図を作成したときと同様に行った。cAMP 投与直後では、10 nM cAMP のデータでは正の相関が見られ、1 μM cAMP のデータでは明瞭な相関は見られなかった。cAMP を投与して 10~15 分後では、1 μM cAMP のデータでは正に相関する傾向が確認された。以上の結果は、

F-アクチン量と cAMP リレー応答のピーク値との間の相関と同様な傾向であった。図 7.10 に示すように、cAMP リレー応答のピーク値と cAMP リレー応答の時間変化率の最大値との間には強い正の相関が見られることから (ピアソンの積率相関係数 $r = 0.8984$ ($p = 6.99 \times 10^{-16} < 10^{-15}$)), cAMP リレー応答のピーク値との相関を解析した結果は、cAMP リレー応答の時間変化率との相関をある程度反映していると考えられる。以降、cAMP リレー応答との相関を解析する際は、ピーク値のみを取り扱う。

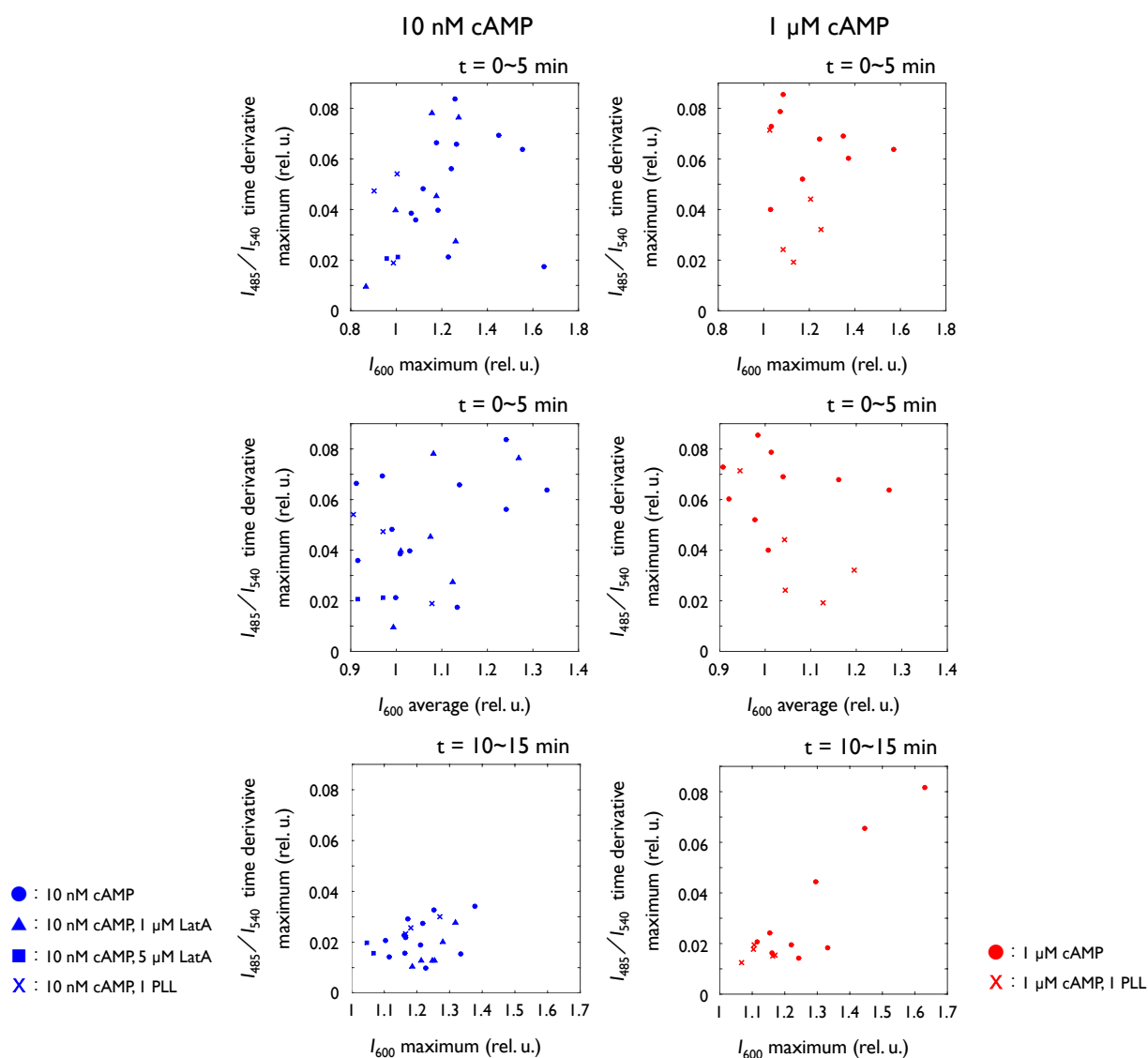


図 7.9: 細胞側面の F-アクチン量 (横軸) と cAMP リレー応答の時間変化率 (縦軸) との関係。共焦点蛍光像より解析した。細胞側面の F-アクチン量の指標は、上段は cAMP 投与後 30 秒間の F-アクチン量のピーク値、中段は cAMP 投与後 5 分間の F-アクチン量の平均値、下段は cAMP 投与後 10~15 分の F-アクチン量のピーク値である。左側は 10 nM cAMP、右側は 1 μM cAMP のデータである。cAMP 投与直後は、10 nM cAMP のデータでは正の相関が見られた (上段左(右下のデータ点を除いてピアソンの積率相関係数 $r = 0.5945(p=0.0035<0.005)$), 中段左)。cAMP を投与して 10~15 分後では、1 μM cAMP のデータでは正の相関する傾向が確認された (下段右)。

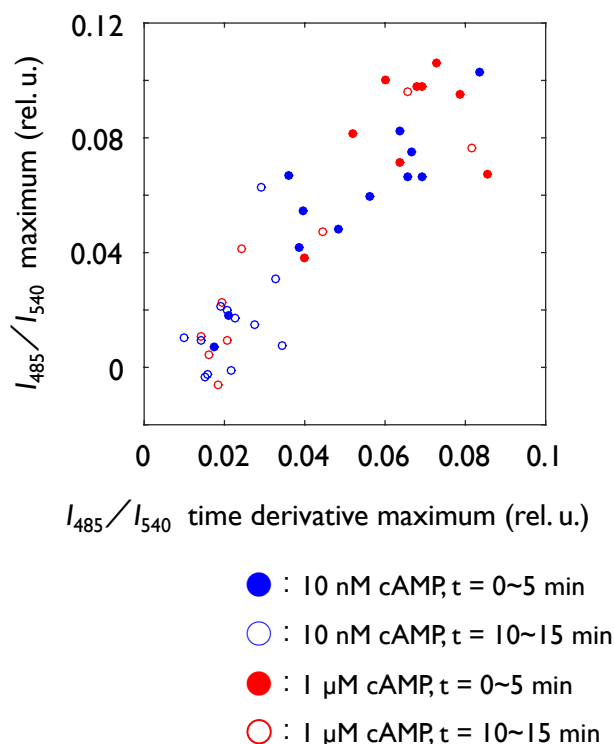


図 7.10: cAMP リレー応答のピーク値（縦軸）と時間変化率の最大値（横軸）との関係。共焦点蛍光像より解析した。正に強く相関した（ピアソンの積率相関係数 $r = 0.8984$ ($p = 6.99 \times 10^{-16} < 10^{-15}$)).

7.3 節 基質接着面側の F-アクチンの動態との関係

7.1 節, 7.2 節での観察で見られた F-アクチンの集積は膜の突出を伴うことから, 主に仮足の形成に寄与するものであると期待される。7.2 節で観察したのは基質接着面から約 $2 \mu\text{m}$ 離れた面の F-アクチンの動態であり, 他の段面の F-アクチン量が捉えきれていない。膜の押し出しに寄与する F-アクチンは枝分かれを持った比較的二次元的な構造だが, 膜の裏打ちにおいては直線状の束状の構造を持っている [Ridley *et al.*, 2003]。現に, 共焦点像においても, cAMP 投与直後以外の時間帯で細胞側面に Lifeact-mRFPmars が局在している様子は見られ (図 7.3, $-3 \text{ min } 40 \text{ sec}$), これは膜の裏打ちにおける F-アクチンの束状構造であると考えられる。F-アクチンの構造の違いを考慮することは重要であり, PLL のコートによる F-アクチンの影響を考える上でも, 基質接着面側の膜の裏打ちの F-アクチンの動態を観察する必要がある。

また, 飢餓時間の短い細胞において, 基質接着面側で PIP_3 や F-アクチンが自己組織的に集積

し細胞内を伝搬するような興奮的な振る舞いが観察されている[Taniguchi *et al.*, 2013]. このような基質接着面側で伝播する F-アクチンの細胞内での集積構造をアクチン波と呼ぶ. この波は, 細胞に依る環境知覚やエンドサイトーシスに関与すると考えられているが[Gerisch *et al.*, 2009], cAMP リレー応答への関与については明らかにされていない. そこで, TIRF 顕微鏡を用いて, 基質接着面側の F-アクチンの動態を可視化することとした. cAMP リレー応答は落射照明により観察した. 対物レンズは, TIRF 用の 100 倍レンズを用い, 10 秒間隔のタイムラプス撮影を行った.

取得した TIRF 画像を図 7.11, 図 7.12 に示す. 観察中, 細胞の領域内の全ての領域で輝度が明減する様子が見られ, 時折, 直径数 μm ほどの大きさの F-アクチンの集積が見られた. 10 nM cAMP 投与直後 30 秒程度まででは, 細胞の基質接着面の辺縁部でのみ F-アクチン量が増加したが (図 7.11 の 0 min 10 sec), 1 μM cAMP では, 細胞の領域全体で F-アクチン量が増加する様子がみられた (図 7.12 の 0 min 20 sec). また, cAMP 投与後 5 分以内に直径数 μm ほどの大きさの F-アクチンの集積が生じることが多く (例えば図 7.11 の 0 min 40 sec, 図 7.12 の 1 min 00 sec), それ以降も F-アクチンの集積は生じた (例えば図 7.11 の 7 min 10 sec). しかし, 生成された F-アクチンの集積が「波」のように細胞の領域を大きく伝播することは稀で, ほとんどの場合 10 秒から 1 分程度で消失した. 図 7.12 の「16 min 40 sec」の画像で見られる F-アクチンの集積構造は 5 分以上持続し, 最大で約 $64 \mu\text{m}^2$ の大きさを持った. この集積構造は細胞外 cAMP を除去すると 1 分以内に消失したことから, 細胞外 cAMP に依存した F-アクチンの集積であると考えられる.

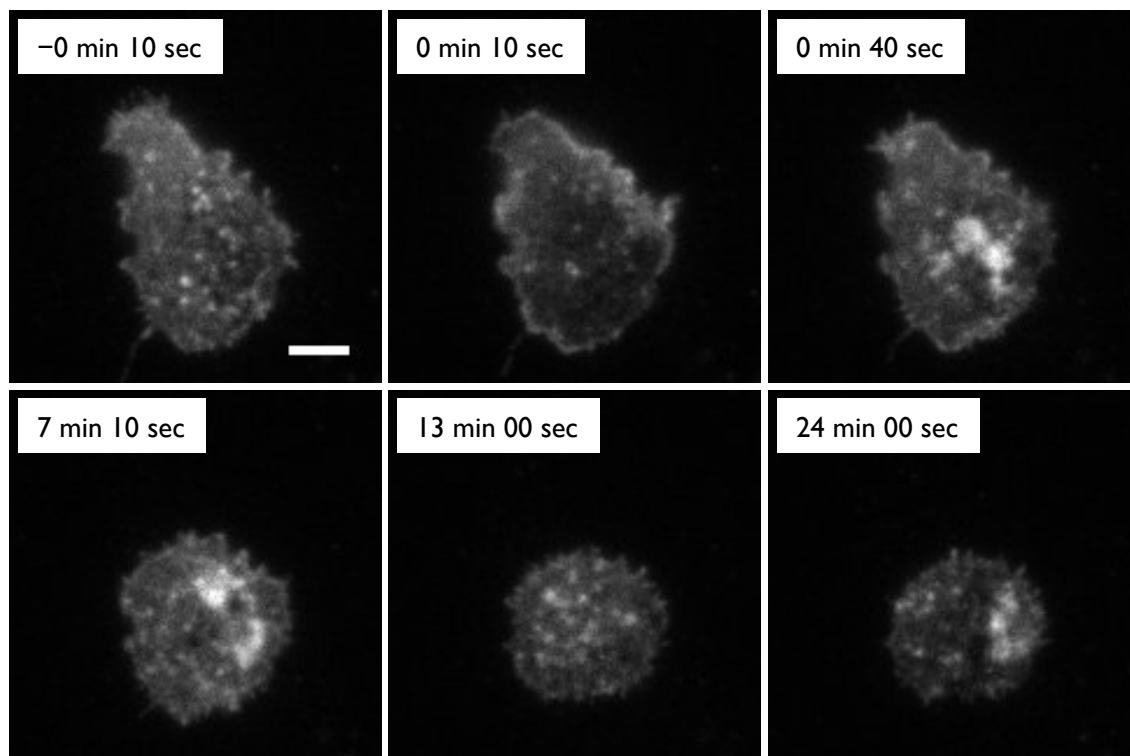


図 7.11: Lifeact-mRFPmars を発現した細胞に 10 nM cAMP を投与したときの TIRF 像。時刻 0 で cAMP を投与している。cAMP 投与前後にわたって断続的に輝度の明滅がいたるところで生じていた。cAMP 投与直後に、細胞の縁でのみ F-アクチンの集積が見られた (0 min 10 sec)。その後、直径数 μm の大きさの F-アクチンの集積が起きた (0 min 40 sec)。このような集積はそれ以外の時間帯 (7 min 10 sec, 24 min 00 sec) でも見られたが、生成後 10 秒から 1 分程度で消失することがほとんどであった。スケールバーは 5 μm を表す。

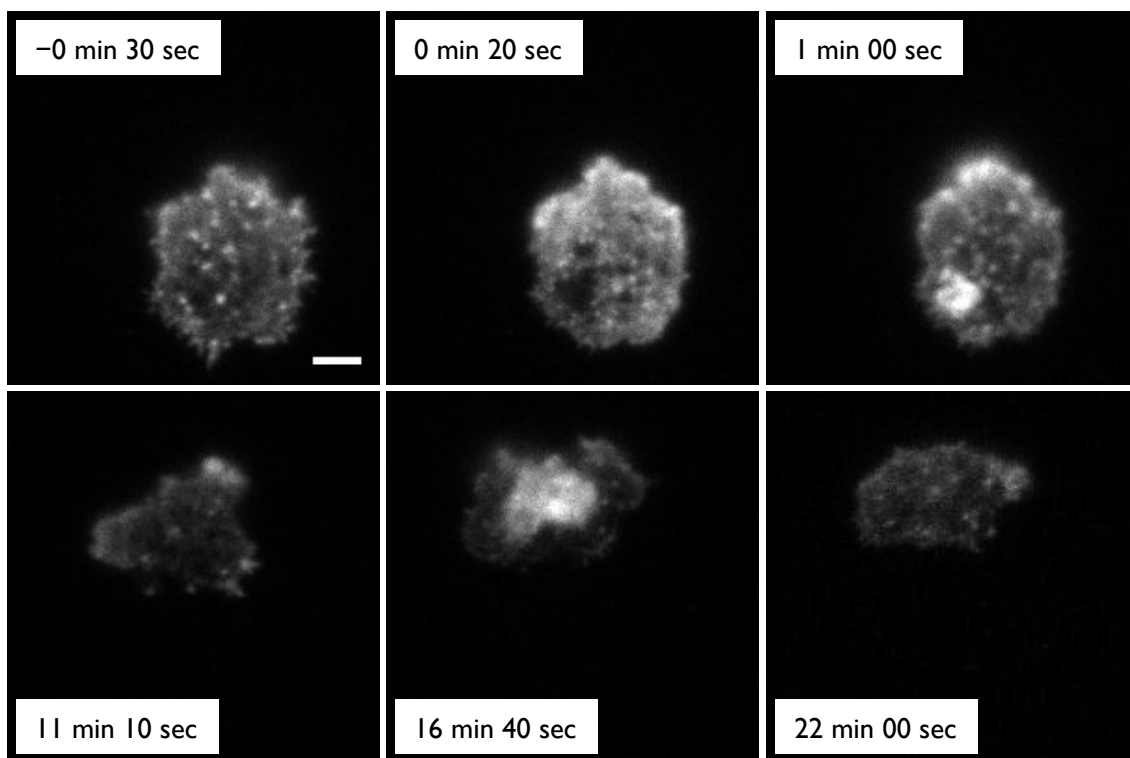


図 7.12: Lifeact-mRFPmars を発現した細胞に $1 \mu\text{M}$ cAMP を投与したときの TIRF 像。時刻 0 で $1 \mu\text{M}$ cAMP を投与している。cAMP 投与前後において断続的に輝度の明滅がいたるところで生じていた。cAMP 投与直後に、基質接着面全体で F-アクチン量の増加が見られた (0 min 20 sec)。その後、直径数 μm の大きさの F-アクチンの集積が起きた (1 min 00 sec の画像下側)。このような集積はそれ以外の時間帯でも見られたが、生成後 10 秒から 1 分程度で消失することがほとんどであった (16 min 40 sec で見られる F-アクチンの集積構造は 5 分以上持続し、最大で約 $64 \mu\text{m}^2$ の大きさを持った。細胞外 cAMP を除去すると 1 分以内に消失した)。スケールバーは $5 \mu\text{m}$ を表す。

F-アクチンの集積が生じる頻度を解析した。結果を図 7.13 に示す。断続的な輝度の明滅より大きい面積 ($1 \mu\text{m}^2$ 以上とした) で輝度の高い領域を持つとき、これを F-アクチンの集積とした。ほとんどの F-アクチンの集積は $5 \sim 25 \mu\text{m}^2$ の面積を持った。35 分間の測定の中で、cAMP を投与しない時間 (-5~0 分と 20~30 分) と cAMP を投与した時間 (0~20 分) に分けて計数した。cAMP を投与下の方が、そうでない場合と比べて F-アクチンの集積が生じる頻度が高い傾向にあることがわかった (図 7.13 の左と中央)。また、cAMP 投与後 5 分間の F-アクチンの集積の頻度は、cAMP を投与している 20 分間 (0~20 分) 全体での頻度と比べて高い傾向にあることがわかった (図 7.13 の中央と右)。また、PLL をコートした状況では、cAMP を投与した

ときの F-アクチンの集積の頻度は減少する傾向にあった (図 7.13 の下段).

accum. frequency (/min)	no cAMP	+ cAMP	+ cAMP (First 5 min)
10 nM cAMP	0.022	0.067	0.267
1 μ M cAMP	0.044	0.15	0.2
1 μ M cAMP + PLL	0.033	0.03	0

図 7.13: TIRF 画像で見られた F-アクチンの集積 (Lifeact-mRFPmars の輝度値の局所的な上昇) の頻度を解析した結果. cAMP を投与しない時間 (図中では「no cAMP」と表示) と cAMP を投与した時間 (図中では「+ cAMP」と表示) に分けて計数した. また, cAMP を投与後 5 分間での頻度も解析した (図中では「+ cAMP (First 5 min)」と表示). cAMP を投与時の方が F-アクチンの集積が生じる頻度が高い傾向にあり, cAMP 投与後 5 分間での F-アクチンの集積の頻度がさらに高い傾向にあることがわかった. PLL 存在下で F-アクチンの集積の頻度は減少する傾向にあった. 観察した細胞数は 10 nM cAMP, 1 μ M cAMP, 1 μ M cAMP + PLL の順に 3, 3, 2 である.

10 nM cAMP 投与に対する F-アクチン量の動態と cAMP リレー応答の代表的な時系列を図 7.14 に示す. F-アクチン量の指標として, 1 μ m の厚みを持った縁での Lifeact-mRFPmars 輝度値とその内側の Lifeact-mRFPmars 輝度値との比 (図 7.14 の上段, 共焦点像の解析と同様, 図中では $I_{600, \text{edge}}$ と表記), 細胞領域全体の Lifeact-mRFPmars 輝度値の平均値 (図 7.14 の下段, 図中では $I_{600, \text{all}}$ と表記), の 2 種類を用いた. 前者は, 細胞の側面における F-アクチン量の指標として用いた. 後者は, 基質接着面側の F-アクチン量を反映する指標として用いた. 細胞の側面での F-アクチン量は, cAMP 投与直後 30 秒以内に増加し, 減少に転じた. 接着面全体での F-アクチン量は, cAMP 投与直後 30 秒以内に一時的に減少した. その後は, 接着面全体での F-アクチン量の増加は繰り返し生じた. これは直径数 μ m ほどの大きさの F-アクチンの集積に対応している.

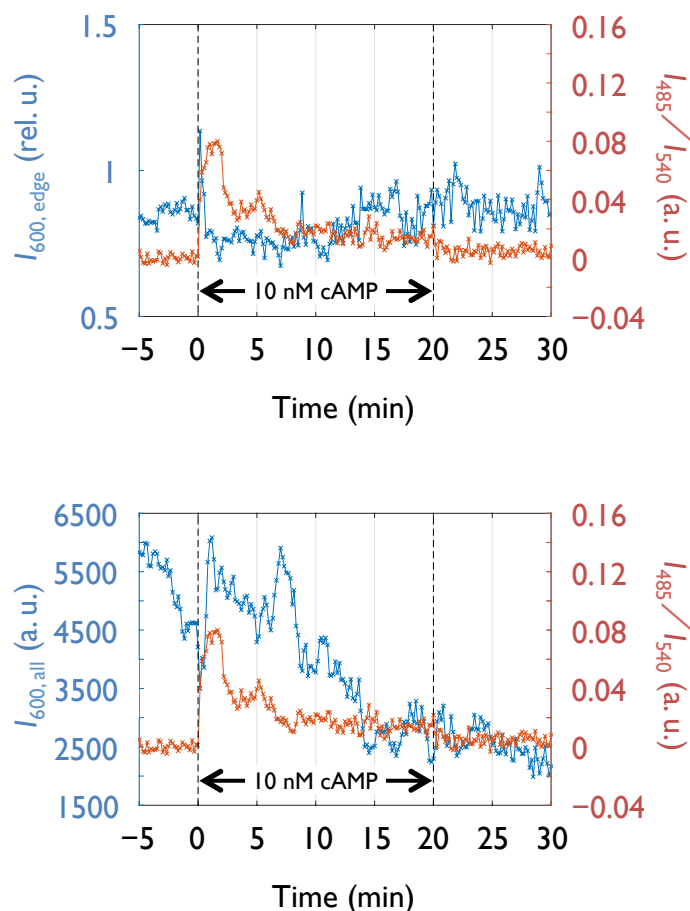


図 7.14: 10 nM の細胞外 cAMP に対する細胞底面の F-アクチンの動態 (TIRF 像より解析) と cAMP リレー応答 (落射照明像より解析) の代表的な時系列. 図 7.11 に対応する. F-アクチン量の指標として, 縁の Lifeact-mRFPmars 輝度値とその内側の輝度値との比 (上段青), 細胞領域全体の Lifeact-mRFPmars 輝度値の平均値 (下段青), の 2 種類を用いた. 赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 細胞側面の F-アクチン量は cAMP 投与直後に一過的に上昇し (上段, 投与後 30 秒以内), 基質接着面側の F-アクチン量は減少した (下段, 投与後 30 秒以内). その後, 基質接着面側での F-アクチン量の上昇が見られた (下段, cAMP 投与後約 1 分以降). これは, 直径数 μm ほどの大きさの F-アクチンの集積に対応している.

1 μM の細胞外 cAMP に対する F-アクチン量の動態と cAMP リレー応答の代表的な時系列を図 7.15 と図 7.16 に示す. 10 nM cAMP に対する応答と比べて, 接着面側全体の F-アクチン量が cAMP 投与直後 30 秒以内に増加した. また, 図 7.16 の例のように, 基質接着面側の F-アクチン量は周期的に変動することがあったが, その位相は cAMP リレー応答の位相と一致しなかつ

た. これは共焦点顕微鏡による観察で得られた細胞側面の F-アクチンの動態と同様の傾向である.

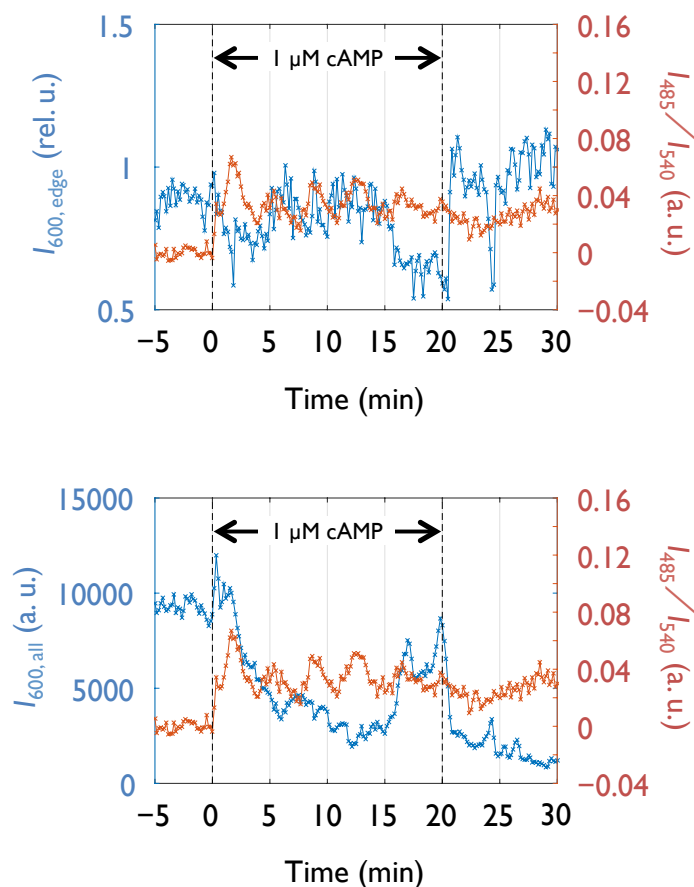


図 7.15: 1 μM の細胞外 cAMP に対する細胞底面の F-アクチンの動態 (TIRF 像より解析) と cAMP リレー応答 (落射照明像より解析) の代表的な時系列. 図 7.12 に対応する. F-アクチン量の指標として, 縁の Lifeact-mRFPmars 輝度値とその内側の輝度値との比 (上段青), 細胞領域全体の Lifeact-mRFPmars 輝度値の平均値 (下段青), の 2 種類を用いた. 赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 基質接着面側での F-アクチン量の上昇が cAMP 投与直後に見られた (下段).

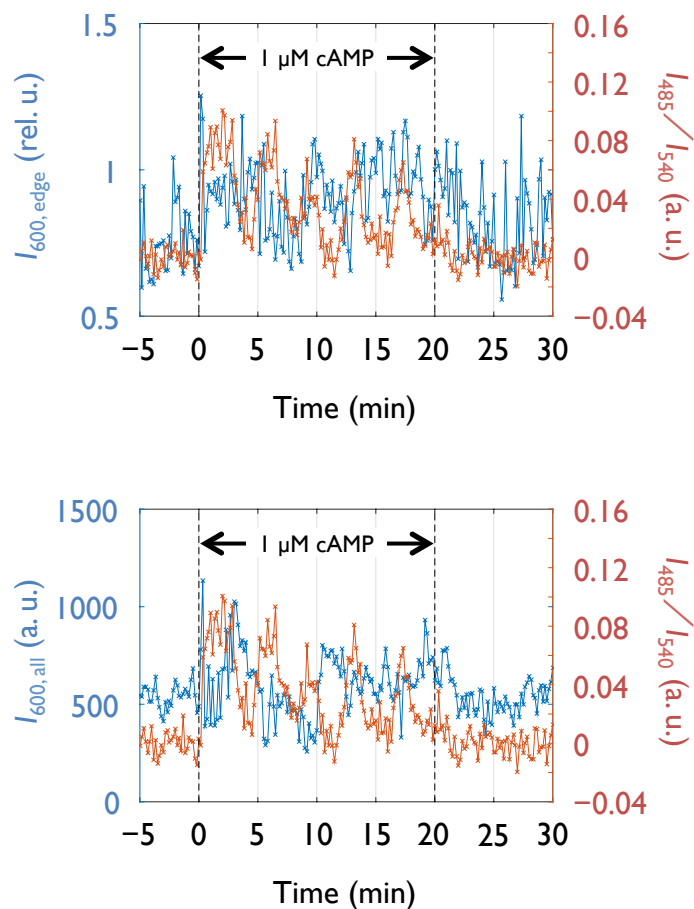


図 7.16: 1 μM の細胞外 cAMP に対する細胞底面の F-アクチンの動態 (TIRF 像より解析) と cAMP リレー応答 (落射照明像より解析) の代表的な時系列. 図 7.12 で示したものは別の細胞のデータである. F-アクチン量の指標として, 縁の Lifeact-mRFPmars 輝度値とその内側の輝度値との比 (上段青), 細胞領域全体の Lifeact-mRFPmars 輝度値の平均値 (下段青), の 2 種類を用いた. 赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 基質接着面側での F-アクチン量の上昇が cAMP 投与直後に見られた (下段). その後, F-アクチンの集積が繰り返されたが, その持続時間は長くて 1 分程度にとどまった. この周期的変化は, cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答とタイミングが一致しなかった.

cAMP 投与直後の F-アクチン量を横軸に, cAMP リレー応答の一次ピーク値を縦軸にとり, 散布図を作成した (図 7.17). F-アクチン量の指標として, cAMP 投与後 30 秒以内における F-アクチン量の最大値と投与前の F-アクチン量の平均値の比を用いた. 共焦点顕微鏡で得られた F-アクチンの動態と異なり, 10 nM cAMP の投与時と比べて 1 μM cAMP の投与時の方が基質接

着面側の F-アクチン量が高いことがわかった。また、1 μM の細胞外 cAMP について、PLL の存在下で基質接着面側の F-アクチン量が抑制されることがわかった。

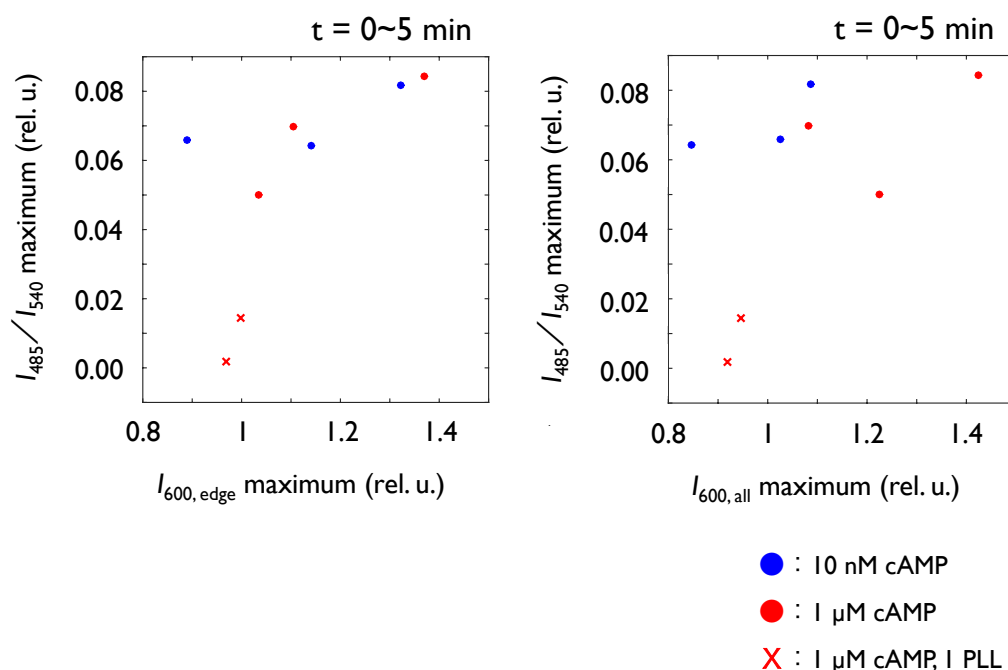


図 7.17: cAMP 投与後 30 秒間の細胞底面の F-アクチン量のピーク値 (横軸, TIRF 像より解析) と cAMP リレー応答の一次ピーク (縦軸, 落射蛍光像より解析) との関係。底面側の膜の辺縁部の Lifeact-mRFPmars 輝度値とその内側の輝度値との比 (左), 底面側の膜付近全体の Lifeact-mRFPmars 輝度値の平均値 (右), の 2 種類を用いた。鉛直方向中央の断面の細胞側面の F-アクチン量 (図 7.6) よりも基質接着面側の F-アクチン量の方が, 細胞外 cAMP 濃度依存的であった (右)。また, F-アクチン量は PLL コートにより顕著に減少した。

cAMP 投与後 5 分間における F-アクチン量の平均値を横軸に取り散布図を作成した (図 7.18)。同様に, cAMP 投与前の F-アクチン量の平均値との比をとることで規格化した。細胞の側面における F-アクチン量と cAMP リレー応答の一次ピークとの間の相関は弱かった (図 7.18 左)。基質接着面側の F-アクチン量と cAMP リレー応答の一次ピーク値は正に相関することがわかった (図 7.18 右, ピアソンの積率相関係数 $r = 0.8924 (p = 0.0029 < 0.005)$)。

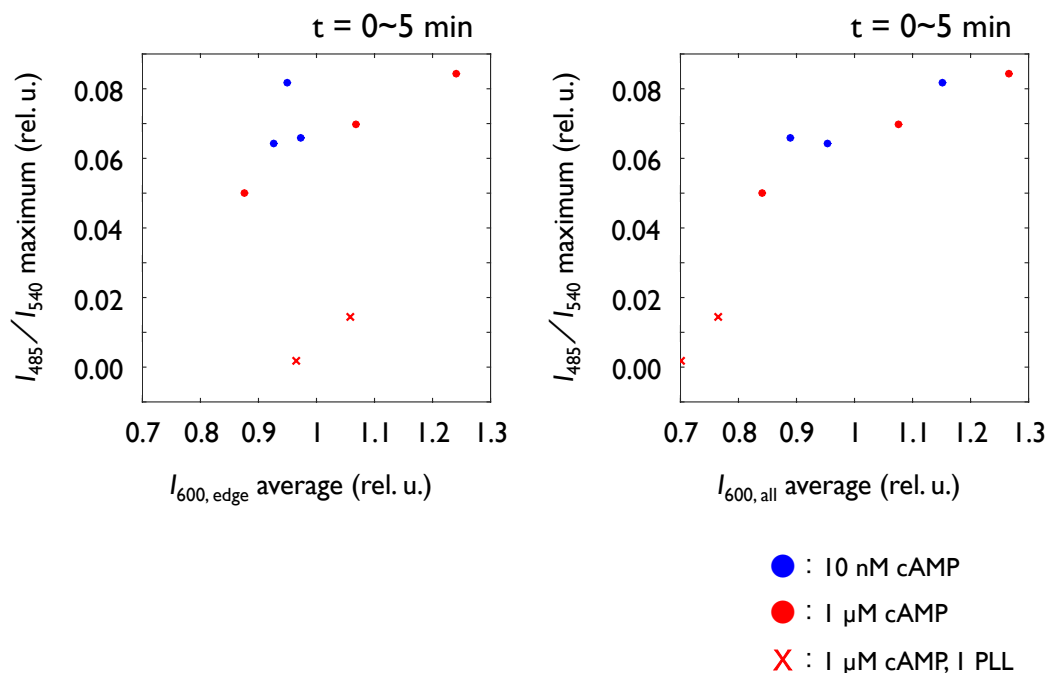


図 7.18: cAMP 投与後 5 分間の細胞底面の F-アクチン量の平均値 (横軸, TIRF 像より解析) と cAMP リレー応答の一次ピーク (縦軸, 落射蛍光像より解析) との関係. 底面側の膜の辺縁部の Lifeact-mRFPmars 輝度値とその内側の輝度値との比 (左), 底面側の膜付近全体の Lifeact-mRFPmars 輝度値の平均値 (右), の 2 種類を用いた. 基質接着面側の F-アクチン量と cAMP リレー応答とは正の相関した (右, ピアソンの積率相関係数 $r = 0.8924(p=0.0029<0.005)$).

cAMP リレー応答の持続的応答との関係を検証するため, cAMP 投与後 10~15 分における F-アクチン量を横軸に, cAMP リレー応答の二次ピークを縦軸にとり散布図を作成した (図 7.19). F-アクチン量は, cAMP 投与後 10~15 分間の F-アクチンの量の最大値と平均値の比とした. 細胞側面における F-アクチン量と cAMP リレー応答の二次ピークとの間に正の相関が確認された (図 7.19 の左, ピアソンの積率相関係数 $r = 0.7393(p=0.0359<0.05)$). 基質接着面側の F-アクチン量は細胞外 cAMP 濃度に依存して上昇することがわかった. また, PLL 存在下では F-アクチン量は顕著に減少した.

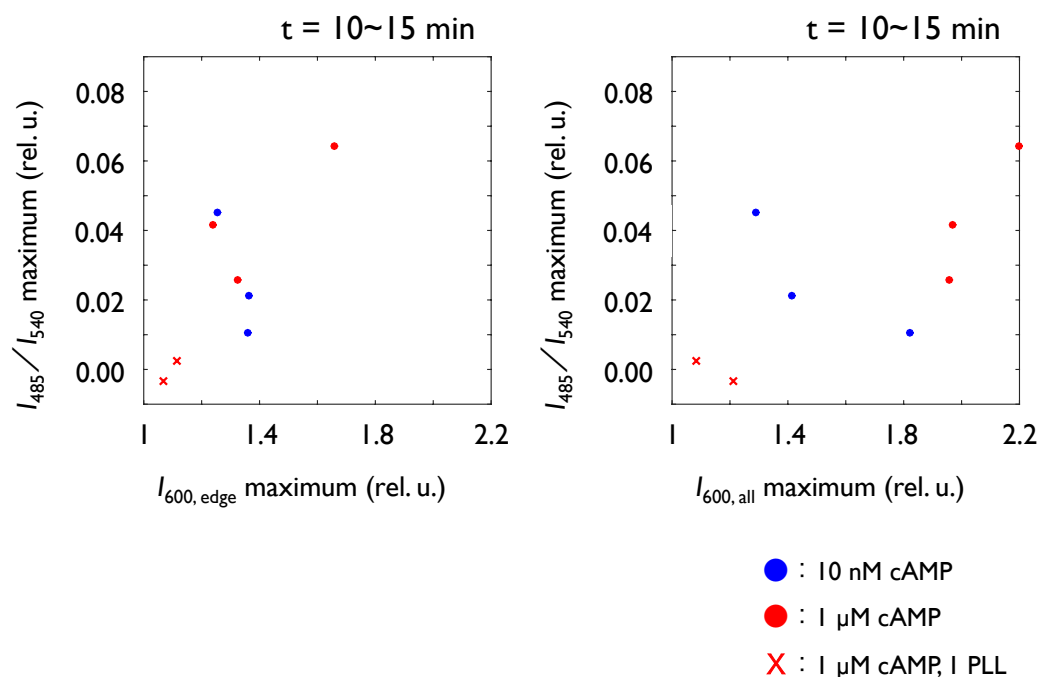


図 7.19: cAMP 投与後 10~15 分の間の細胞底面の F-アクチン量のピーク値 (横軸, TIRF 像より解析) と cAMP リレー応答の二次ピーク (縦軸, 落射蛍光像より解析) との関係。底面側の膜の辺縁部の Lifeact-mRFPmars 輝度値とその内側の輝度値との比 (左), 底面側の膜付近全体の Lifeact-mRFPmars 輝度値の平均値 (右), の 2 種類を用いた。鉛直方向中央の断面の細胞側面における F-アクチン量と cAMP リレー応答の二次ピークとの間に正の相関が確認された (左, ピアソンの積率相関係数 $r = 0.7393(p=0.0359<0.05)$)。また, 細胞外 cAMP 濃度が高いほど基質接着面側における F-アクチン量は高かった。

図 7.17, 図 7.18, 図 7.19 の結果から, cAMP 投与直後の応答に関して, 基質接着面側の F-アクチン量は細胞外 cAMP 濃度に依存して増加し, cAMP リレー応答と強い相関を示すことが明らかになった。

7.4 節 細胞の形状・重心移動との関係

細胞膜付近での F-アクチンの集積は, 細胞の形状の変化やそれに続く重心移動に寄与すると考えられることから, 特に低濃度の細胞外 cAMP では, 細胞の形状の変化や重心移動と cAMP

リレー応答との間にも相関が予想される。そこで、cAMP リレー応答と細胞の形状や重心移動との間の量的関係を検証した。

7.4.1 項 細胞の形状と cAMP リレー応答との関係

形状の指標として、落射蛍光顕微鏡にて得た Epac1-camps の YFP 蛍光画像より取得した細胞領域の面積と輪郭の周囲長から計算される円形度の逆数 (Circularity^{-1}) を用いた (方法, 式は 3.8 節を参照)。図 7.20 に示すように, この値が高いほど円形から離れた形状を取る。

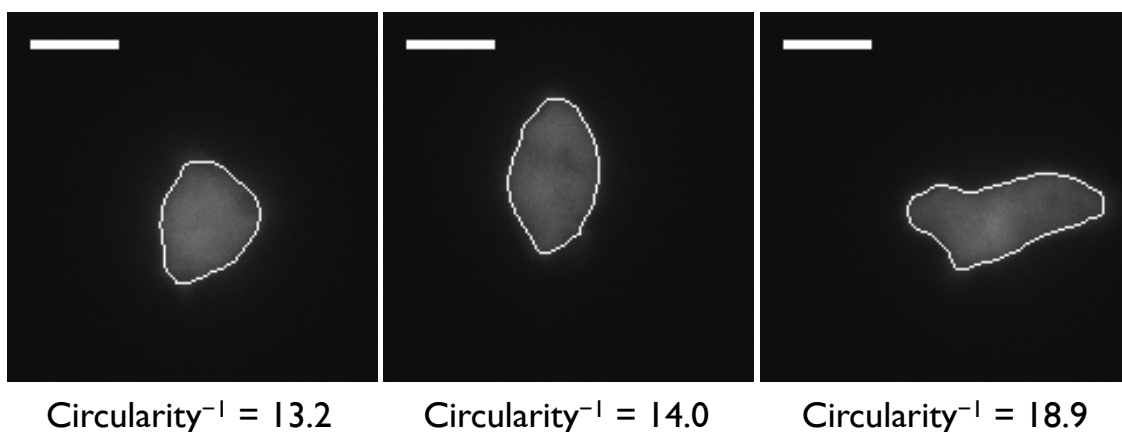


図 7.20: 細胞の形状と, そこから求められる円形度との関係。円から離れた形状を取るほど, 円形度の逆数は高い値を持つ。スケールバーは 10 μm を表す。

5.1 節での計測データ (落射蛍光像) から解析した細胞形状と cAMP リレー応答の代表的な時系列を図 7.21 と図 7.22 に示す。1 nM, 10 nM, 1 μM のいずれの細胞外 cAMP 濃度においても, 形状の変化が周期的に生じることが多かった。また, 1 μM の cAMP を与えたときに, 形状の変化の周期的変化の位相が cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答の位相と一致するような振る舞いが見られることがあった (図 7.22)。細胞側面の F-アクチン量の周期的変化と cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答の位相が一致する様子はごくまれにしかみられなかったが, 細胞形状においては高い割合で形状の周期的変化の位相と一致した。両応答が周期的に変動するもののみを選び, 各々で規格化した円形度の逆数と cAMP リレー応答とで相互相関をとり, その値がピークをとる時間差を求めた。図 7.23 にそのヒストグラムを示す。すると, 時間差が $-1/4 \sim 1/4$ 分でピークをとる頻度が最も多かった。ここで正の値をとるとき, 円形度の逆数が cAMP リレー応答より先んじて周期的に変動することを意味する。

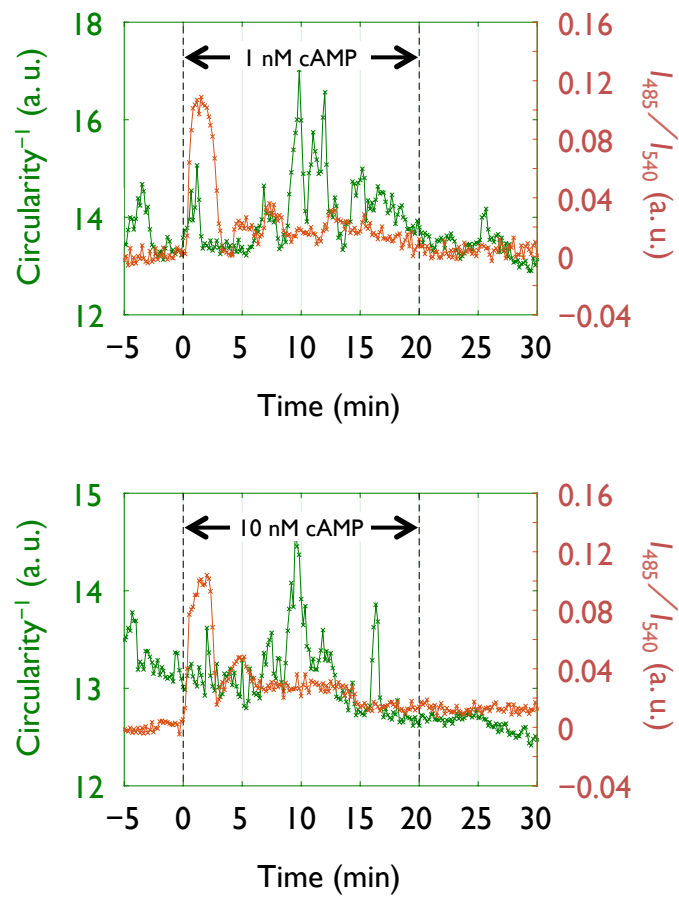


図 7.21: 1 nM と 10 nM の細胞外 cAMP に対する形状の変化の様子と cAMP リレー応答の代表的な時系列 (いずれも落射照明像より解析)。緑は円形度の逆数、赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す。上段は図 5.1 上段右の赤色で示したデータに対応する。下段は図 5.1 中段左の赤色で示したデータに対応する。点線で示した時刻 (0 分、20 分) の間で cAMP を与えた。形状が周期的に変化する様子が見られた。

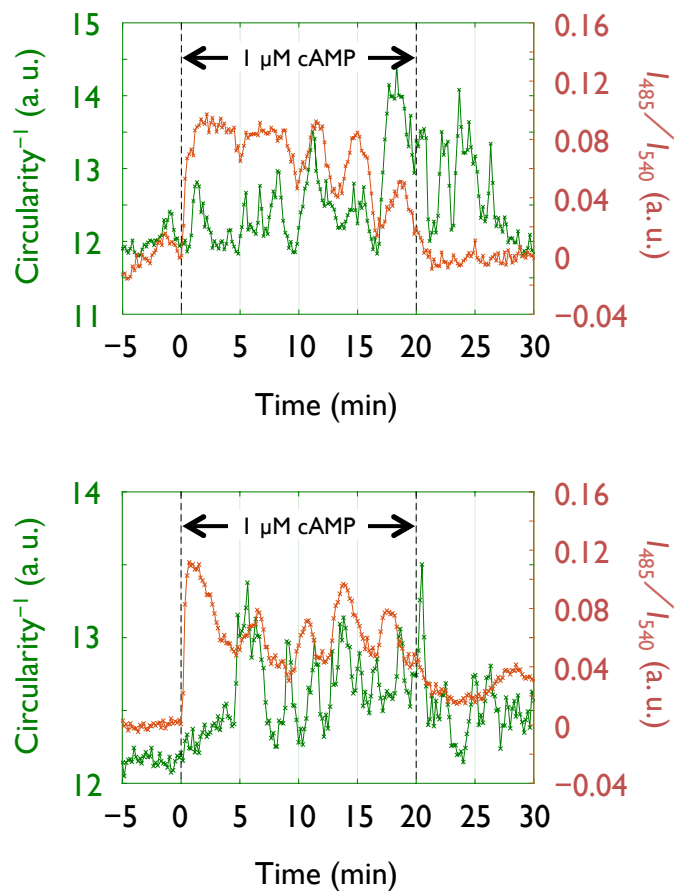


図 7.22: 1 μM の細胞外 cAMP に対する形状の変化の様子と cAMP リレー応答の代表的な時系列 (いずれも落射照明像より解析)。緑は円形度の逆数, 赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す。上段は図 5.1 下段の青色で示したデータに対応する。下段は図 5.1 下段の赤色で示したデータに対応する。点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた。形状が周期的に変化する様子が見られ, それは cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答と同様な周期を持った。必ずしもその位相は一致しなかった。

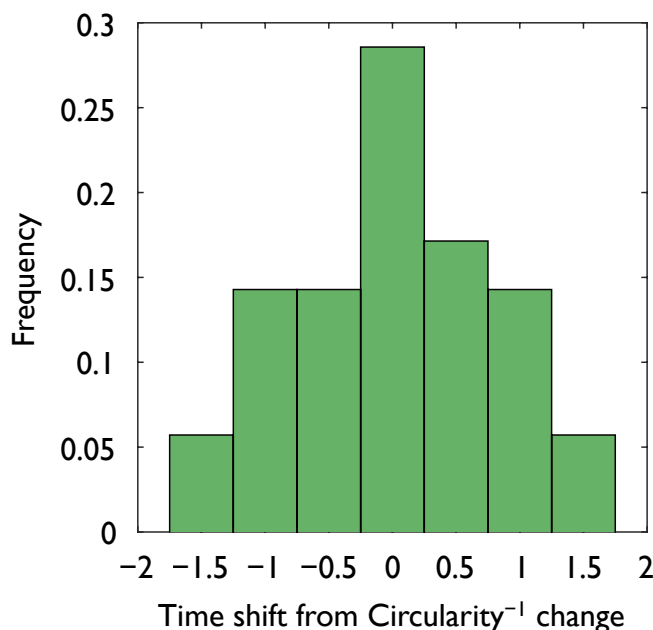


図 7.23: 1 μM cAMP の存在下 (時刻 0~20 分) の形状 (円形度の逆数) と cAMP リレー応答の時系列との相互相関を取り, それが極大値をとるときの時間差の分布を表した図. 落射蛍光像より解析した. 正の値をとるとき, 形状が cAMP リレー応答より先んじて周期的に変動することを意味する. 時間差が $-1/4 \sim 1/4$ 分でピークをとることが最も多く, その割合は 3 割程度であった. どちらの量も周期的に変動する細胞 35 個のデータから解析した.

細胞形状の指標である円形度の逆数を横軸に, cAMP リレー応答を縦軸にとり散布図を作成した (図 7.24). 5.1 節と 6.2 節での計測データから解析した. 1 nM の細胞外 cAMP においては, 弱い正の相関が見られた (図 7.24 上段左の緑点, 右下の 2 データ点を除いてピアソンの積率相関係数 $r = 0.3993$, $p = 0.0288 < 0.05$). 低濃度の細胞外 cAMP において膜の突出に寄与する F-アクチンが細胞の形状を変化させ, それと同時に cAMP リレー応答の強度も上昇する, と解釈できるかもしれない. 一方, 1 μM では弱い負の相関が見られた (図 7.24 上段左の赤点, ピアソンの積率相関係数 $r = -0.4180$ ($p = 0.0059 < 0.01$)). 膜の裏打ち構造に寄与する F-アクチン量が高いとき, 形状の変化が抑制されかつ cAMP リレー応答が高くなる, と解釈できるかもしれない. しかし, F-アクチン量と cAMP リレー応答との関係と比べると, その相関関係は不明瞭であった. また, cAMP 投与直後に cAMP リレー応答がピークを取る時刻での円形度の逆数を取って散布図を作成したところ (図 7.25), 相関は確認されなかった.

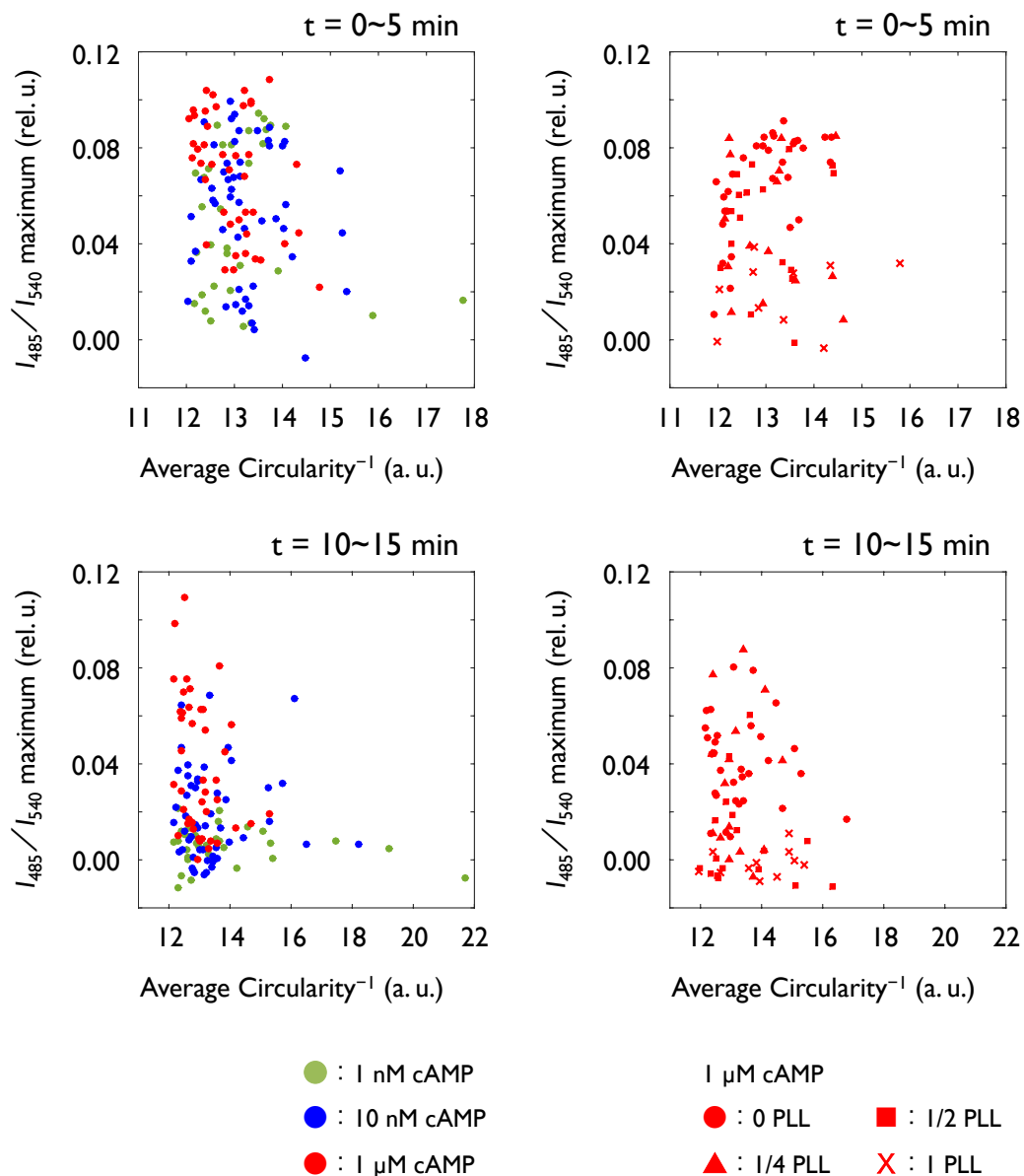


図 7.24: 5 分間の円形度の逆数の平均値 (横軸) と cAMP リレー応答のピーク値 (縦軸) との関係。落射蛍光像を元に解析した。上段は cAMP 投与後 5 分間 (一次ピーク), 下段は投与後 10~15 分 (二次ピーク) の平均である。左側は様々な細胞外 cAMP 濃度でのデータを, 右側は 1 μ M の細胞外 cAMP に対する応答の様々な PLL コート密度でのデータをまとめて表示している。強い相関は確認できなかった。cAMP 投与後 5 分間のデータについて (上段左), 1 nM の細胞外 cAMP に対する応答には弱い正の相関が (緑点, 右下の 2 データ点を除いてピアソンの積率相関係数 $r = 0.3993$, $p = 0.0288 < 0.05$), 1 μ M の細胞外 cAMP に対する応答には弱い負の相関が見られた (赤点, ピアソンの積率相関係数 $r = -0.4180$ ($p = 0.0059 < 0.01$)).

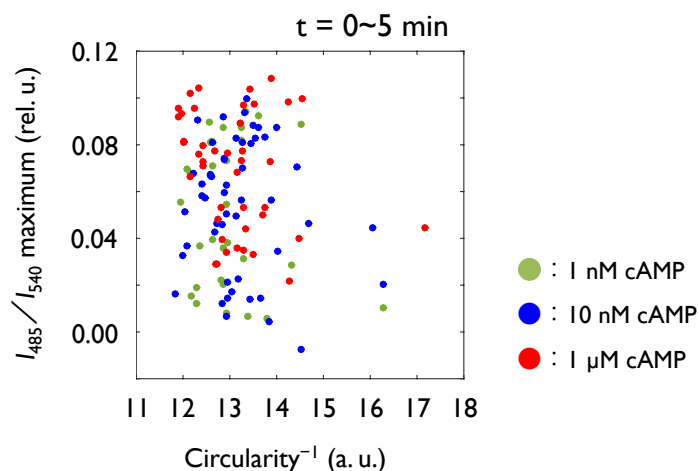


図 7.25: cAMP 投与後 5 分間の cAMP リレー応答の一次ピーク値 (縦軸) と, cAMP リレー応答がピーク値を取る時刻での円形度の逆数 (横軸) との関係. 落射蛍光像を元に解析した. 様々な細胞外 cAMP 濃度でのデータをまとめて表示している. 相関はみられなかった.

7.4.2 項 細胞の形状と F-アクチンの動態との関係

細胞の形状と F-アクチンの動態との関係を検証するため, 共焦点顕微鏡で撮影された細胞の画像から円形度の逆数を計算し, その値と F-アクチン量との関係を解析した. 7.2 節での計測データを用いた. F-アクチン量は, $1 \mu\text{m}$ の厚みを持った細胞膜領域の Lifeact-mRFPmars の輝度値とその内側の輝度値との比で定義した.

共焦点蛍光像から解析した細胞形状, 細胞側面での F-アクチン量, cAMP リレー応答の代表的な時系列を図 7.26 に示す. 10 nM , $1 \mu\text{M}$ のいずれの細胞外 cAMP 濃度においても, 経時的に形状の変化が生じることがわかった. このように細胞形状が経時的に変化する振る舞いは落射蛍光像から解析した細胞形状においてもみられた特徴である (図 7.21 の下段, 図 7.22). $1 \mu\text{M}$ の cAMP を投与したときの持続的かつ周期的な細胞内 cAMP 濃度の増減と F-アクチンの側面での量の変動とのタイミングが非常によく一致している様子が見られることがあり (図 7.4 の上段), 細胞形状の変動とのタイミングとも一致していた (図 7.26 の中段). しかし, 円形度の逆数の上昇は F-アクチン量や細胞内 cAMP 濃度の上昇に必ず伴うわけではなかった (図 7.26 の下段).

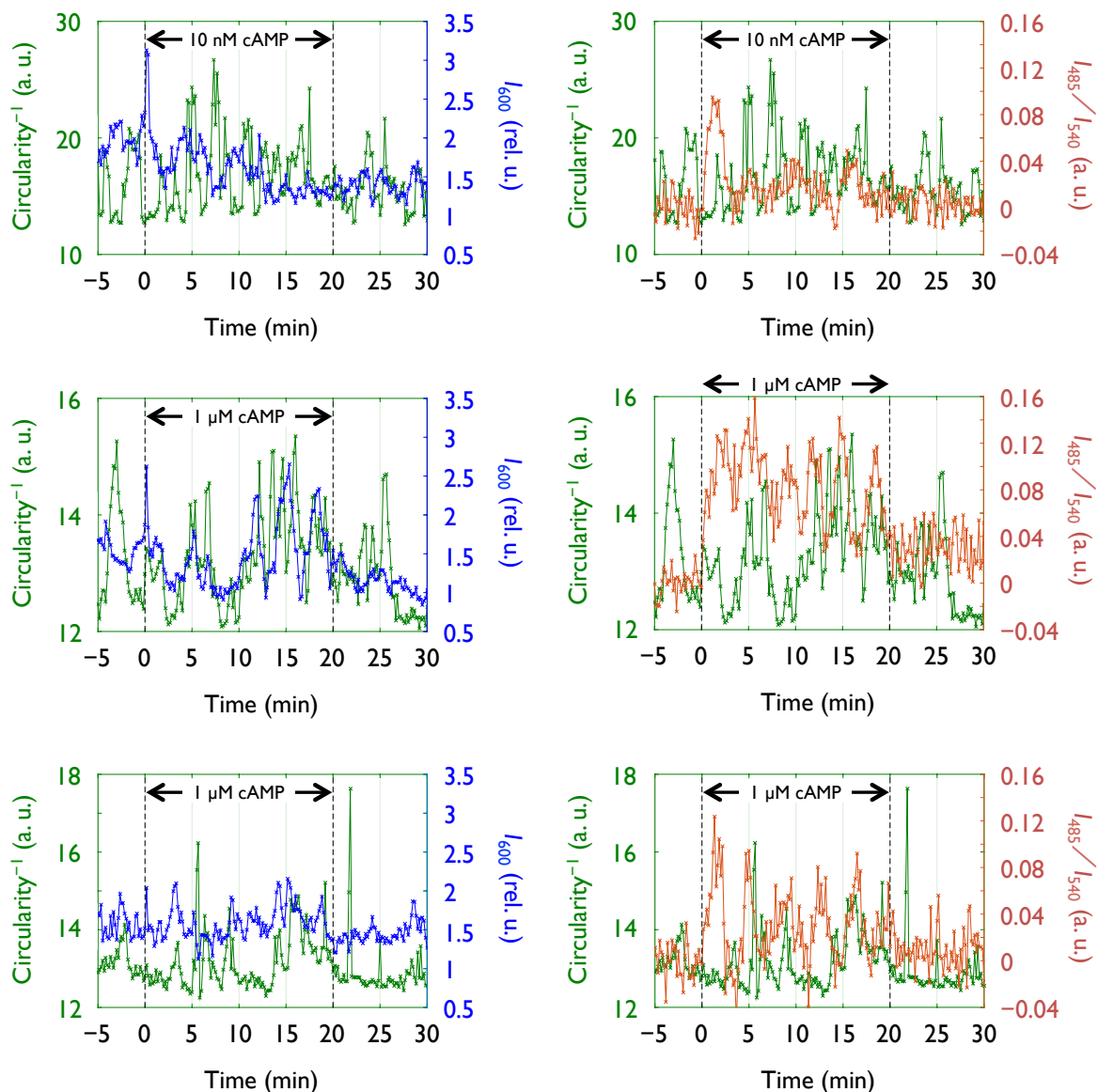


図 7.26: 細胞外 AMP に対する形状の変化の様子と細胞側面の F-アクチン量の動態 (左) と, cAMP リレー応答 (右) の代表的な時系列 (いずれも共焦点顕微鏡像より解析). 緑は円形度の逆数, 青は細胞側面における Lifeact-mRFPmars の輝度値, 赤は Epac1-camps の CFP と YFP の蛍光強度比を表す. 横に並んだグラフは同一細胞のデータである. 上段は図 7.5 上段で示したデータに, 中段は図 7.4 上段で示したデータに, 下段は図 7.4 中段で示したデータに対応する. 点線で示した時刻 (0 分, 20 分) の間で cAMP を与えた. 細胞形状が経時的に変動するような様子が見られた. 1 μ M の cAMP を投与したとき, 細胞形状と, F-アクチン量や細胞内 cAMP の周期的変化とが同調することがあった (中段).

細胞外 cAMP に対する細胞の形状と F-アクチン量の相関を検証するため、cAMP 投与後 30 秒以内の細胞側面における F-アクチン量の最大値を横軸に、円形度の逆数を縦軸に取り散布図を作成した (図 7.27)。ここで、F-アクチン量は、cAMP 投与前 5 分間の F-アクチン量の時間平均値との比をとることで規格化している。円形度の逆数は、cAMP 投与後 30 秒間のピーク値 (図 7.27 上段) と、cAMP 投与後 5 分間の平均値 (図 7.27 下段) の二種類の指標を用いた。LatA を投与した条件や PLL をコートした条件のデータもまとめて表示した。10 nM の cAMP を投与したとき、円形度の逆数について、cAMP 投与後 30 秒間でのピーク値 (図 7.27 上段左) と比べて cAMP 投与後 5 分間の平均値 (図 7.27 下段左) の方が F-アクチン量と正に強く相関することがわかった (ピアソンの積率相関係数 $r = 0.5373(p=0.0099<0.01)$)。1 μM の cAMP を投与したときは、細胞形状と F-アクチン量との間の相関は弱かった。

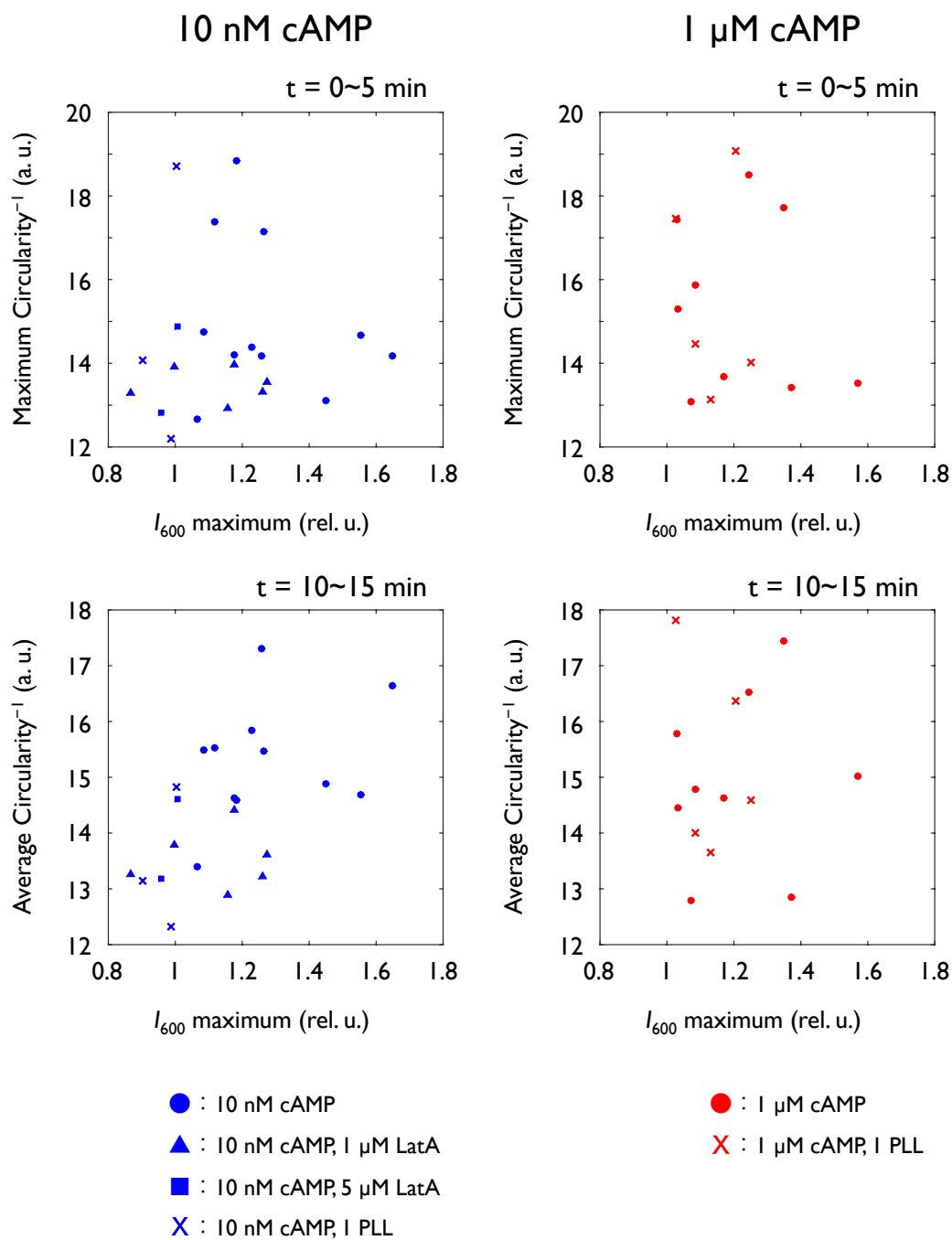


図 7.27: cAMP 投与後 30 秒間での細胞側面の F-アクチン量のピーク値(横軸)と、円形度の逆数(縦軸)との関係。共焦点蛍光像より解析した。円形度の逆数は、cAMP 投与後 30 秒間でのピーク値(上段)と、cAMP 投与後 5 分間の平均値(下段)の二種類の指標を用いた。10 nM cAMP の場合(左)は、cAMP 投与後 5 分間の円形度の逆数の平均値と F-アクチン量とが正に相関した(左下段、ピアソンの積率相関係数 $r = 0.5373(p = 0.0099 < 0.01)$)。1 μ M の cAMP の場合については相関は弱かった(右)。

cAMP 投与後 5 分間の細胞側面の F-アクチン量の時間平均値を横軸にとり散布図を作成した (図 7.28)。この際も、F-アクチン量は、cAMP 投与前 5 分間の F-アクチン量の時間平均値との比をとることで規格化している。この指標は、cAMP 投与前後の F-アクチン量の変化を計るものとして使用した。10 nM の細胞外 cAMP については、cAMP 投与後 30 秒間の細胞側面の F-アクチン量のピーク値との相関 (図 7.28 の左) と比べると弱く相関する傾向が見られた (図 7.28 の左)。1 μ M の cAMP を投与したときは、弱い相関がみられた (図 7.28 の右)。

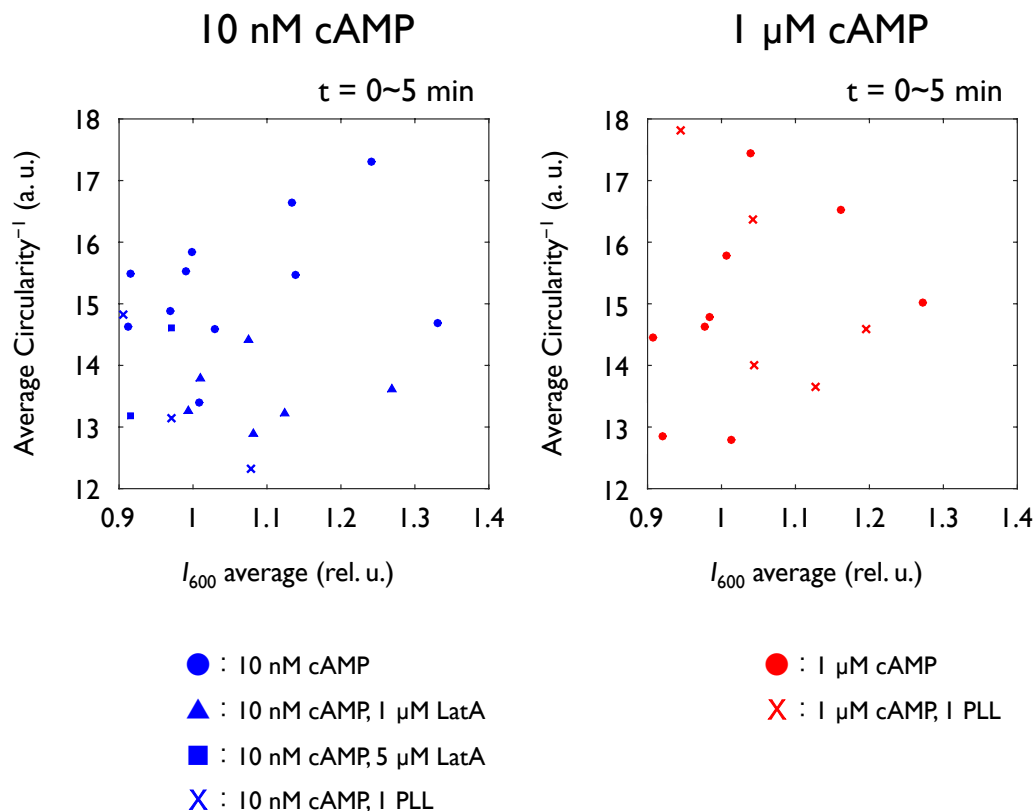


図 7.28: cAMP 投与後 5 分間の細胞側面の F-アクチン量の平均値 (横軸) と、円形度の逆数の平均値 (縦軸) との関係。共焦点蛍光像より解析した。10 nM cAMP (左) では、正に相関する傾向があった。

cAMP を加えて 10~15 分後の F-アクチン量を横軸に、円形度の逆数を縦軸にとり散布図を作製した (図 7.29)。F-アクチン量は、cAMP 投与後 10~15 分間の F-アクチン量の最大値と最小値の比とした。10 nM の cAMP を投与したときは、正に相関する傾向が見られた (図 7.29 の左)。1 μ M の cAMP を投与したときは、相関は弱かった (図 7.29 の右)

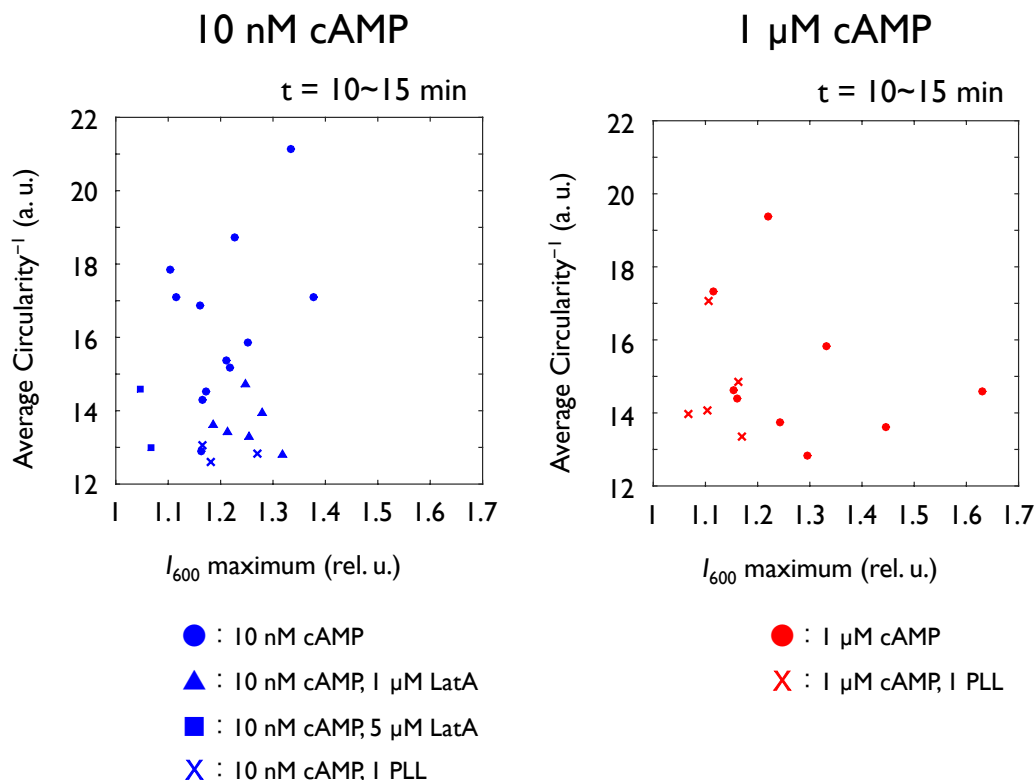


図 7.29: cAMP 投与後 10~15 分の細胞側面における F-アクチン量のピーク値 (横軸) と円形度の逆数の平均値 (縦軸) との関係。共焦点蛍光像より解析した。10 nM の cAMP を投与したとき、正の相関する傾向が見られた (左)。

次に、共焦点顕微鏡画像から解析したデータを元にして、円形度の逆数を横軸に、cAMP リレー応答の一次ピークと二次ピークを縦軸にとり、それぞれ散布図を作製した (図 7.30)。10 nM と 1 μM どちらの細胞外 cAMP についても、主な相関は見られなかった。F-アクチン量と cAMP リレー応答との間には正の相関が見られ (図 7.6 左, 図 7.7 左), また細胞形状と F-アクチン量との間にも正の相関が見られたこと (図 7.27 下段左) とは対照的である。

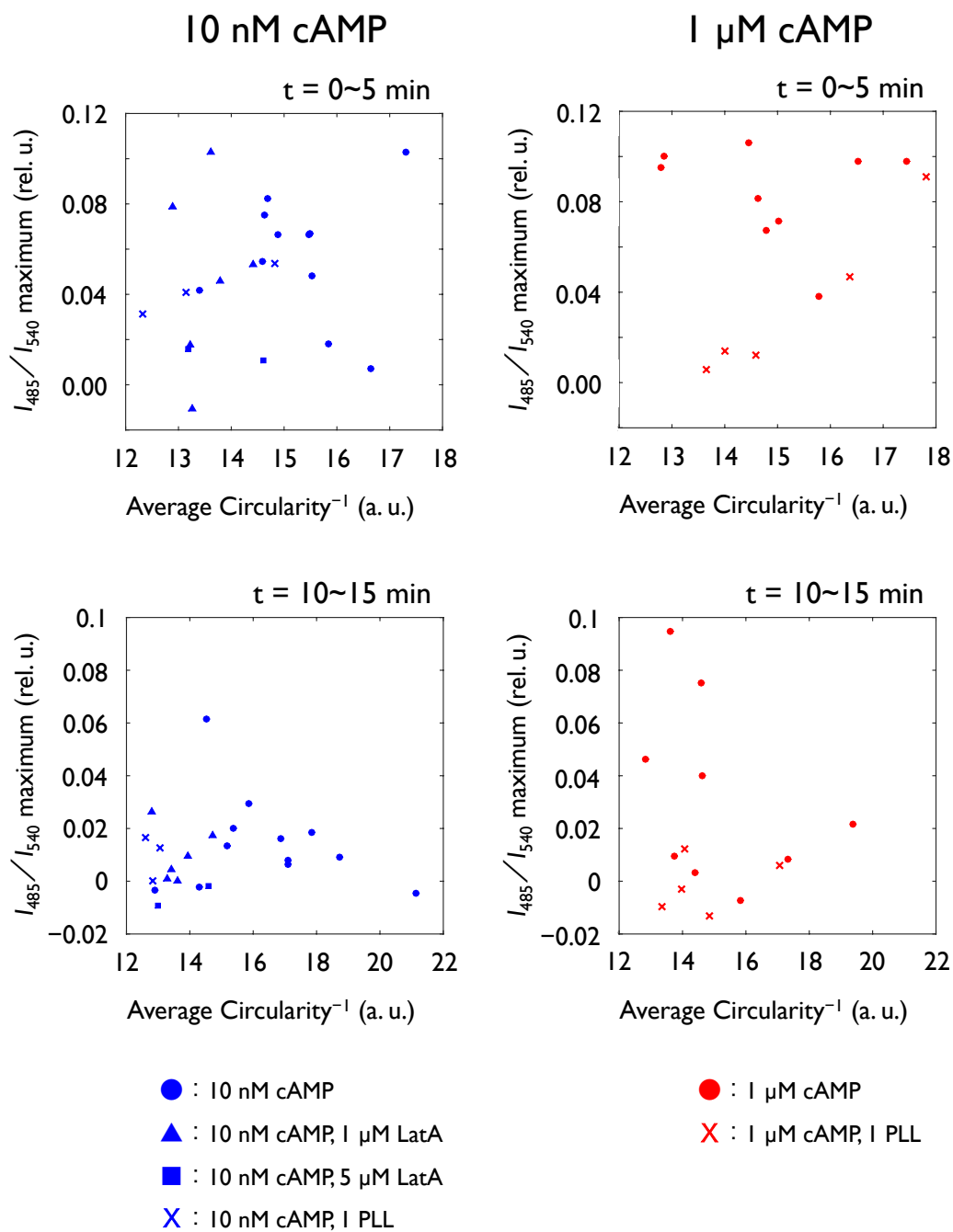


図 7.30: 5 分間の円形度の逆数の平均値 (横軸) と cAMP リレー応答 (縦軸) との関係。共焦点蛍光像を元に解析した。上段は cAMP 投与後 5 分間 (一次ピーク), 下段は投与後 10~15 分 (二次ピーク) の平均である。左側は 10 nM cAMP を投与したときのデータ, 右側は 1 μM cAMP を投与したときのデータである。強い相関は確認できなかった。

7.4.3 項 細胞の重心移動と cAMP リレー応答との関係

続いて、細胞の重心移動と cAMP リレー応答の強度との関係について解析した。一細胞レベルで計測したこれまでのデータを用いた (5.1 節, 6.2 節, 7.2 節)。60 倍の対物レンズで 10 秒間隔で観察した細胞について、時間幅 2.5 分での細胞の重心位置の変位を二乗した値について 5 分間 (時刻 0~5 分, もしくは 10~15 分) の平均値を求め、その値を重心移動の指標とした (3.8 節を参照)。図中ではこれを「MSD($\Delta T=2.5$ min)」と表記した。取得した蛍光像の空間分解能は 1 ピクセルあたり $0.26 \mu\text{m}$ である。

細胞の重心移動の指標を横軸に、cAMP リレー応答を縦軸にとり散布図を作成した (図 7.31)。5.1 節と 6.2 節での計測データ (落射蛍光像) から解析した。多くの細胞は重心移動をほとんど行わないことがわかった。細胞の形状と cAMP リレー応答との関係と比べて、データのばらつきがより大きく、主だった相関は見られなかった。一様濃度の細胞外 cAMP に対しては一方向運動が持続しづらいことが、要因の一つとして考えられる。

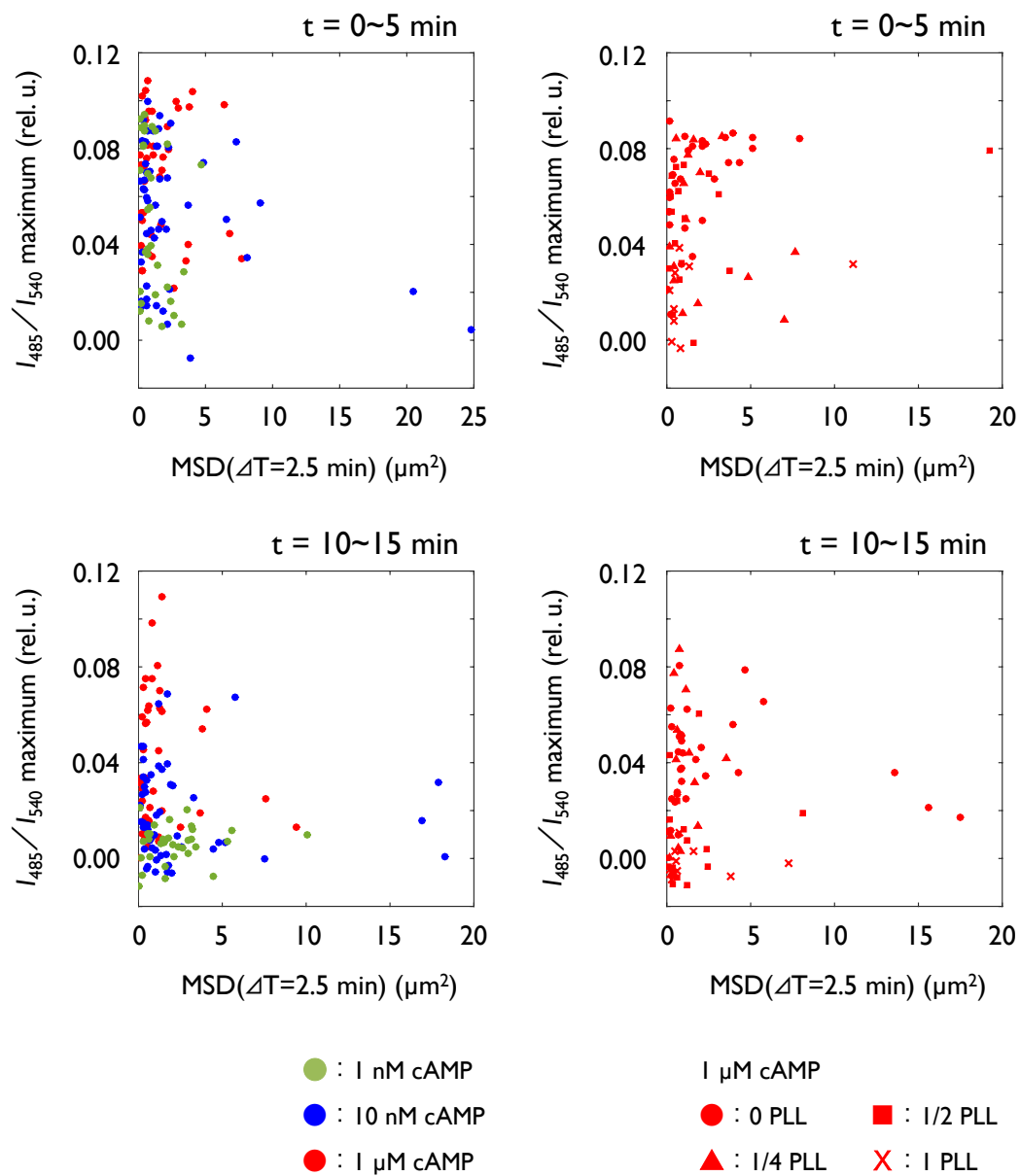


図 7.31: 細胞の重心移動の指標 (横軸) と cAMP リレー応答 (縦軸) との関係。落射蛍光像より解析した。時間幅 2.5 分での細胞の重心位置の変位を二乗した値について 5 分間 (cAMP 投与後 5 分間, もしくは cAMP 投与後 10~15 分) の平均値を求め, その値を重心移動の指標とした。上段は cAMP 投与後 5 分間 (一次ピーク), 下段は投与後 10~15 分 (二次ピーク) の平均である。左側は様々な細胞外 cAMP 濃度でのデータを, 右側は 1 μ M cAMP に対する応答の様々な PLL コート密度でのデータをまとめて表示している。多くの細胞は重心移動をほとんど行わなかった。強い相関は確認できなかった。形状よりもデータのばらつきが大きいのに見えた。

7.4.4 項 細胞の重心移動と F-アクチンの動態との関係

細胞の重心移動と F-アクチンの動態との関係を解析するため、共焦点顕微鏡像から重心移動の指標 (MSD($\Delta T=2.5$ min)) を計算し、その値と F-アクチン量との関係を解析した。7.2 節での計測データを用いた。F-アクチン量は、 $1 \mu\text{m}$ の厚みを持った細胞膜領域の Lifeact-mRFPmars の輝度値とその内側の輝度値との比で定義した。

散布図を図 7.32 に示す。cAMP 投与後 30 秒間の細胞側面における F-アクチン量の最大値との関係 (図 7.32 の上段)、cAMP 投与後 5 分間での細胞側面の F-アクチン量の時間平均値との関係 (図 7.32 の中段)、cAMP を投与して 10~15 分後の F-アクチン量との関係 (図 7.32 の下段) を示している。規格化の方法は図 7.6、図 7.7、図 7.8 の散布図を作成したときと同様に行った。10 nM cAMP 投与後 5 分間の F-アクチン量の平均値と細胞の重心移動との間に正の相関が確認された (図 7.32 の中段左、ピアソンの積率相関係数 $r = 0.4528(p=0.0301 < 0.05)$)。それ以外の条件 (図 7.32 の上段、中段右、下段) では、明瞭な相関は確認されなかった。

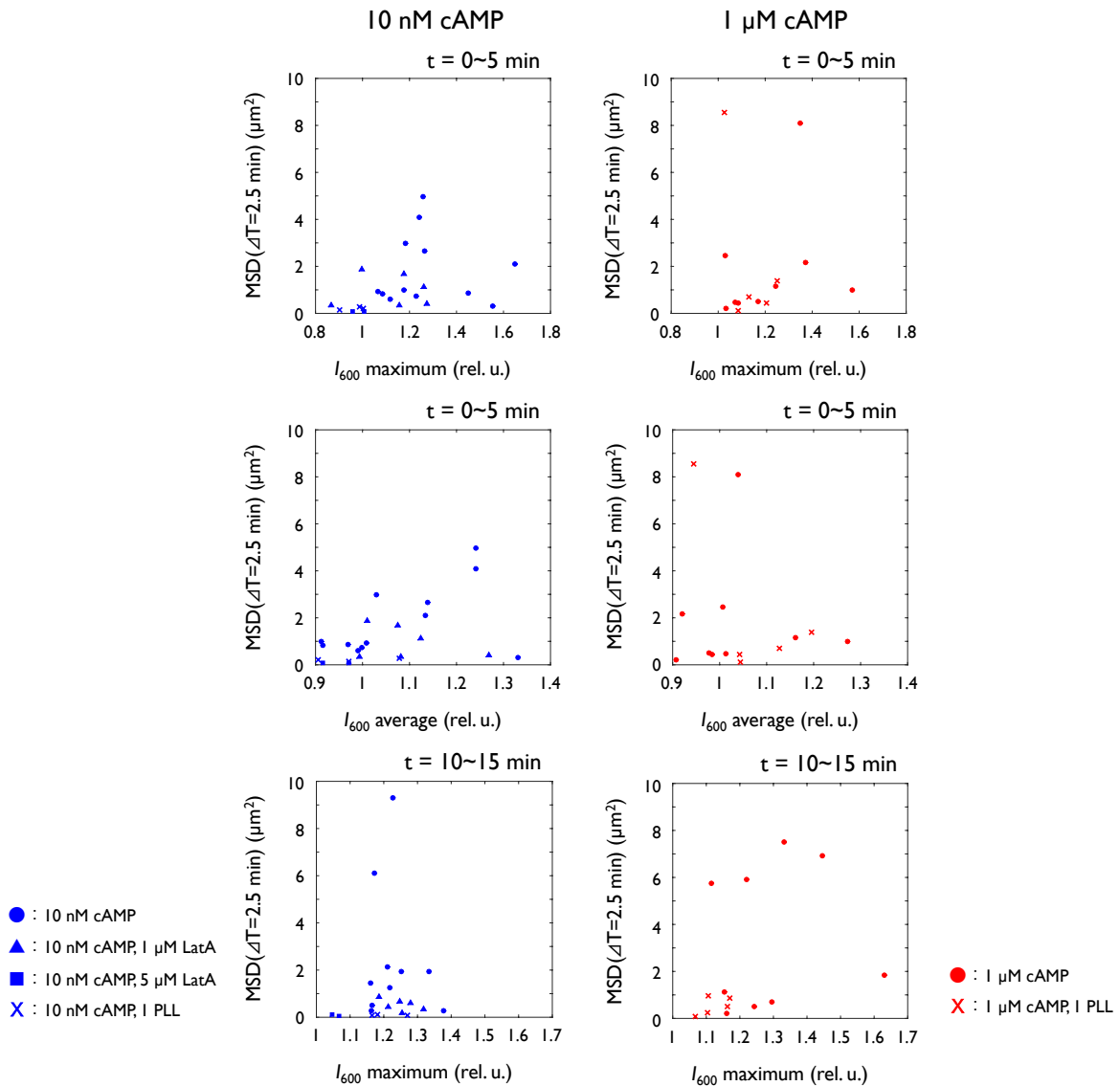


図 7.32: F-アクチン量 (横軸) と細胞の重心移動の指標 (縦軸) との関係。共焦点蛍光像より解析した。時間幅 2.5 分での細胞の重心位置の変位を二乗した値について 5 分間 (cAMP 投与後 5 分間, もしくは cAMP 投与後 10~15 分) の平均値を求め, その値を重心移動の指標とした。細胞側面の F-アクチン量の指標は, 上段は cAMP 投与後 30 秒間の F-アクチン量のピーク値, 中段は cAMP 投与後 5 分間の F-アクチン量の平均値, 下段は cAMP 投与後 10~15 分の F-アクチン量のピーク値である。左側は 10 nM cAMP, 右側は 1 μM cAMP のデータである。多くの細胞は重心移動をほとんど行わなかった。10 nM cAMP において, cAMP 投与後 5 分間の F-アクチン量の平均値と重心移動との間に正の相関が確認された (中段左, ピアソンの積率相関係数 $r = 0.4528(p=0.0301<0.05)$)。

7.4.3 項では落射蛍光像を解析したデータを元に細胞の重心移動と cAMP リレー応答との相関を調べた (図 7.31)。ここでは、共焦点顕微鏡画像から解析したデータを元にして、細胞の重心移動を横軸に、cAMP リレー応答を縦軸にとり散布図を作製した (図 7.33)。10 nM と 1 μ M どちらの細胞外 cAMP のデータについても、主だった相関は見られないことがわかった。F-アクチン量と cAMP リレー応答との間には正の相関が見られ (図 7.6 左, 図 7.7 左), また F-アクチン量と細胞の重心移動の間にも正の相関が見られることがあったこと (図 7.32 の中段左) とは対照的である。

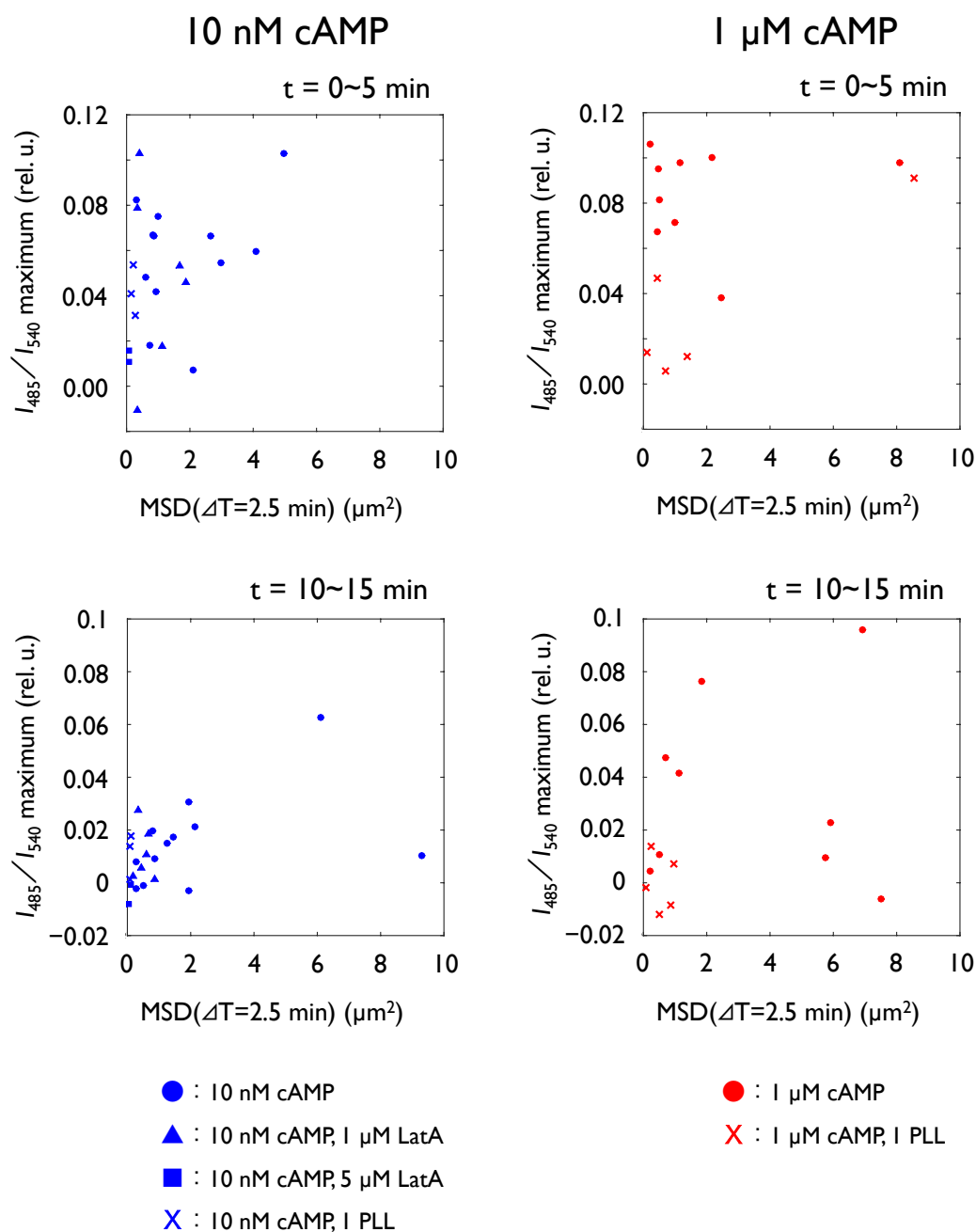


図 7.33: 細胞の重心移動の指標 (横軸) と cAMP リレー応答 (縦軸) との関係。共焦点蛍光像より解析した。時間幅 2.5 分での細胞の重心位置の変位を二乗した値について 5 分間 (cAMP 投与後 5 分間, もしくは cAMP 投与後 10~15 分) の平均値を求め、その値を重心移動の指標とした。上段は cAMP 投与後 5 分間 (一次ピーク), 下段は投与後 10~15 分 (二次ピーク) の平均である。左側は 10 nM cAMP , 右側は $1 \text{ } \mu\text{M cAMP}$ のデータである。多くの細胞は重心移動をほとんど行わなかった。また、強い相関は確認できなかった。形状よりもデータのばらつきが大きいように見えた。

以上から、細胞形状や重心移動と F-アクチン量との間には相関が認められ、これと比較して細胞形状や重心移動と cAMP リレー応答との間にはより弱い相関がみられるにとどまることがわかった。

7.5 節 時間的に緩やかな濃度上昇を実現する微小流路デバイスの作製

空間的に一様に、かつ時間的に階段状に細胞外 cAMP 濃度が上昇する条件では、特に高濃度の cAMP の存在下では細胞形状の変化や重心移動が生じにくいことが知られている[Chen *et al.*, 2003]. このことは、細胞形状や重心移動と cAMP リレー応答との相関が弱いことと関係している可能性がある。濃度勾配を形成する微小流路デバイスによって cAMP の定常濃度勾配を形成させ、それに対する細胞の応答を解析すると、走化性応答により細胞はある程度の大きさを持った速さで重心移動する[Song *et al.*, 2006]. このように cAMP の濃度勾配に対して一方向的に動いている際の細胞の移動速度と cAMP リレー応答の間にはより強い相関がみられる可能性がある。また、空間的に一様な濃度変化であっても、時間をかけて徐々に cAMP 濃度が上昇するように与えたときの細胞形状の変化や重心移動の速さと cAMP リレー応答との間の関係についても、より強い相関がみられる可能性がある。cAMP の進行波刺激を細胞に与えるのにかかる時間に依存して、細胞の応答の動態が変化することがわかっており[Nakajima *et al.*, 2014], 時間的に緩やかな細胞外 cAMP 濃度上昇に対する応答を精査することは重要である。

時間的に緩やかな細胞外 cAMP 濃度変化を実現する微小流路デバイスは、現存の技術で作製することができる[Stroock *et al.*, 2002]. 図 7.34 にそのデバイスのデザインを示す。これは chaotic mixer と呼ばれ、微小な流路の天井部分に V 字型の溝を多数付与した構造を持つ。流路内を通る液体はこの溝にそって流路内で回転する。初めに層流を形成している二種の液体は、この溝の部分を通過することでカオスのパイコね変換のように複雑に流路内を回転するため、速やかに液体の混合が完了する。実際にこのデバイスを作製し (3.4 節を参照)、二種類の溶液を流す速さを緩やかに変えることで、流路内の溶液の濃度が時間的に緩やかに変化することが確かめられた。図 7.35 と図 7.36 にその結果を示す。このデバイスを用いた、時間的に緩やかな細胞外 cAMP の濃度上昇に対する細胞の応答の解析は、今後の課題である。

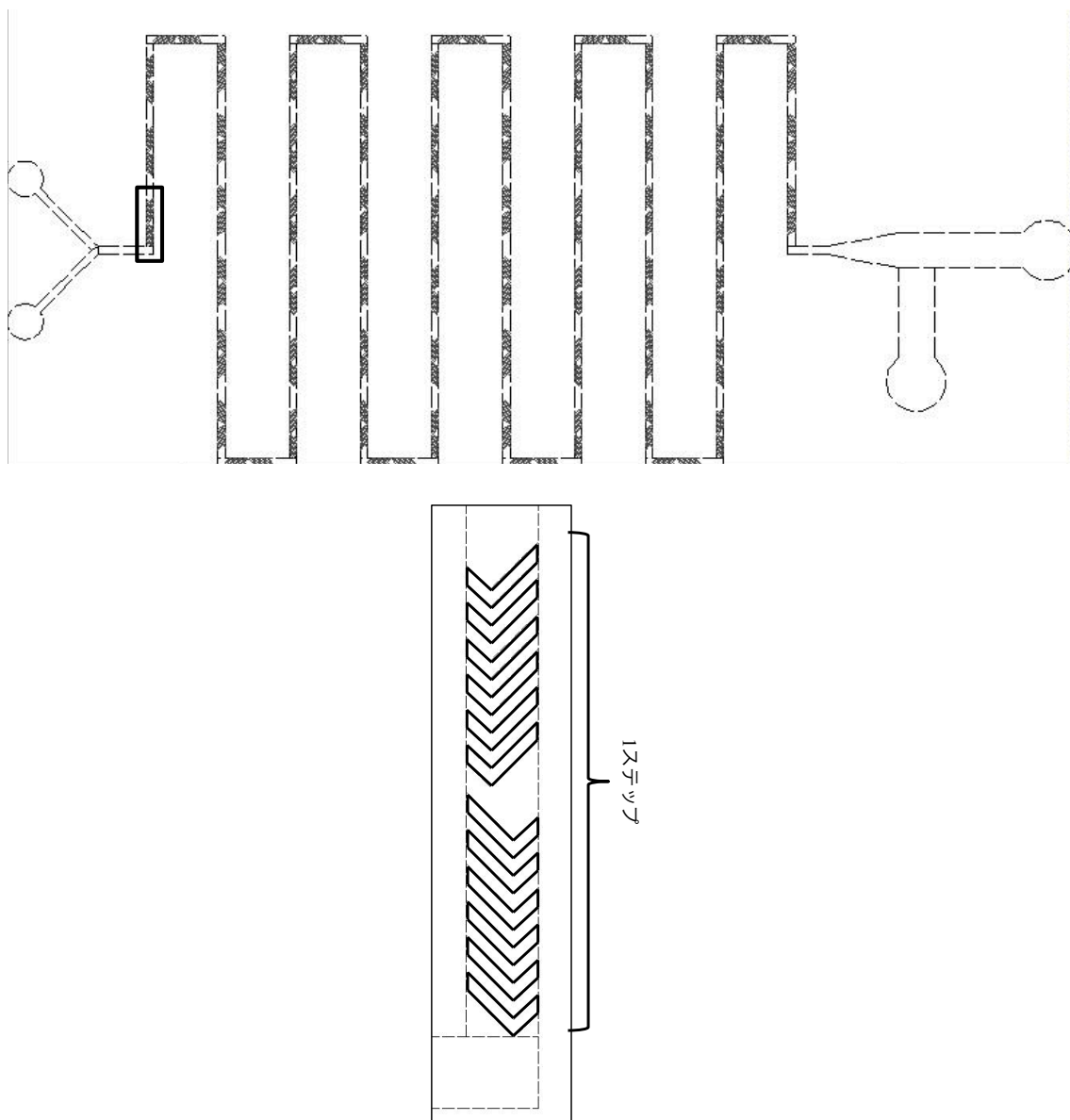


図 7.34: 溶液の時間的に緩やかな濃度変化を実現する微小流路のデザイン[Stroock *et al.*, 2002]. V字型の部分は溝になっており、これが12個並んだ部分を1ステップとする。ステップ間隔は2 mm, 流路幅は200 μm , 高さは100 μm , 溝の幅は10 μm , 溝の深さは25 μm , 右端の部分の流路幅は1 mm, 流路全体の大きさは、横30 mm, 縦12 mmである。

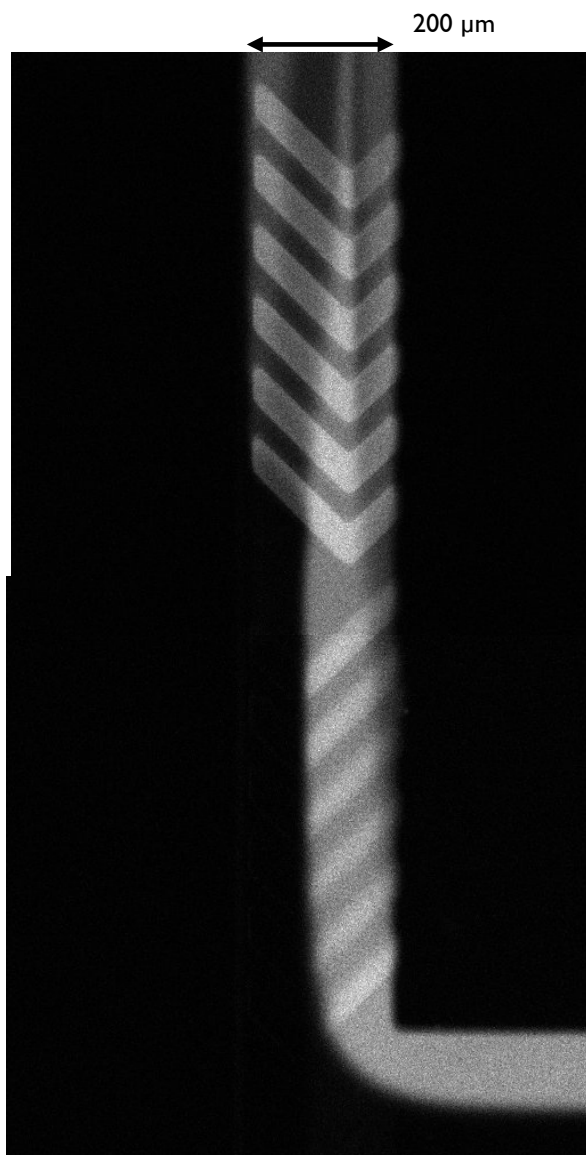


図 7.35: 溶液の時間的に緩やかな濃度変化を実現する微小流路の一部。作製した流路内に 1 μM フルオレセイン溶液とバッファーを同時に送液した（それぞれ 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）。落射蛍光顕微鏡にて観察した。手前（画像右下）で層流を形成しているが、V 字型の溝が連続した部分を通過すると、カオスのパイコね変換のように溶液が混合されていく（このデバイスは chaotic mixer と称される）。この合計 12 個の溝を一つのステップとしたとき、6 ステップ目（距離にして 12 mm）ではほとんど均一に 2 種類の溶液は混合された。

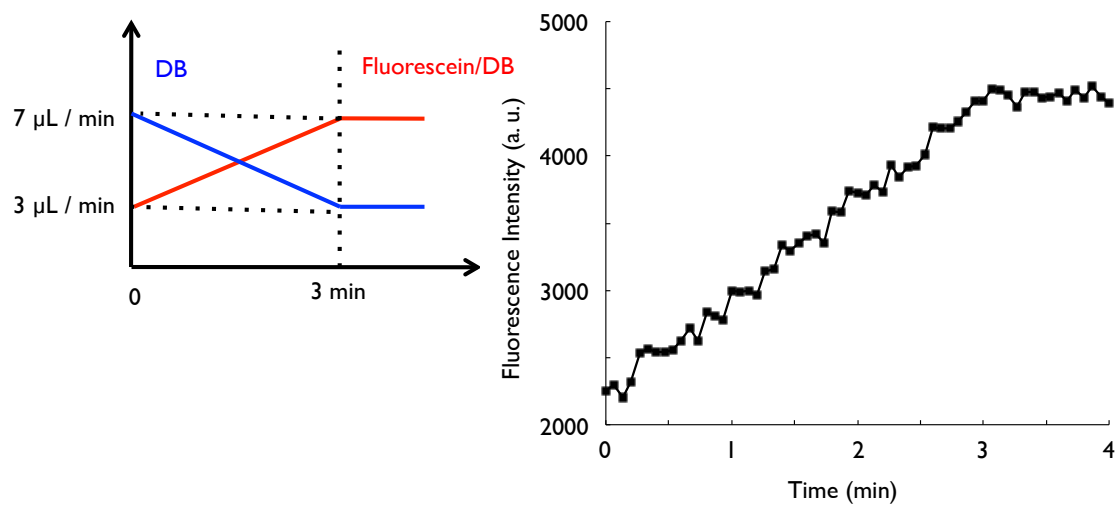


図 7.36: 溶液の時間的に緩やかな濃度変化を実現するための送液方法と、フルオレセインの輝度値の時系列. シリンジポンプにより 2 種類の溶液の流速を緩やかに上下させた. V 字の溝の 7 ステップ目以降のフルオレセイン輝度値を測定したところ, 時間的に緩やかに上昇していく様子が確認できた.

第8章 考察

以下に、本研究結果についての考察と、今後の展望について述べる。

cAMP リレー応答は、細胞内での cAMP の合成、細胞内での cAMP の分解、細胞外への cAMP の分泌から構成されている。本研究で得られた結果から、これらの反応がアクチン重合にどのように依存する可能性があるのかを考察する。特に、アクチンの重合が cAMP の合成に影響を及ぼすのであれば、cAMP の合成や走化性応答に関するシグナル伝達機構を構成する分子の活性とアクチン重合との間の関係を考察することは意義深い。また、細胞形状や重心移動からシグナル伝達機構へのフィードバックの存在の可能性について考察する。これらの結果・考察を踏まえて、一細胞レベルでの cAMP リレー応答から構成される細胞集団の cAMP 振動がアクチン重合や運動に依存することの生物学的意義について考察する。

8.1 節 F-アクチンの細胞内シグナル伝達機構への寄与

8.1.1 項 F-アクチン依存性から考えられるシグナル伝達機構への寄与

LatA の投与により cAMP リレー応答が抑制されることの要因の一つとして、細胞外 cAMP に対するレセプター CAR1 の親和性が減少した可能性が挙げられる。これは、第5章の5.2節の結果より、5 μ M の LatA の存在下では、非存在下と同程度の cAMP リレー応答のピーク値を取るためにはより高濃度の細胞外 cAMP を要したことも矛盾しない (図 5.9)。1 μ M cAMP の投与に依るヘテロ三量体 G タンパク質の活性化 (サブユニットの解離) は LatA に依存しないことが

明らかになっているが[Elzie *et al.*, 2009], LatA 存在下でのヘテロ三量体 G タンパク質の活性化の細胞外 cAMP 濃度依存性については明らかになっていない. CAR1 の細胞外 cAMP に対する親和性は, CAR1 の C 末端ドメインに存在するセリンのリン酸化により減少する[Caterina *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1999]. また, C 末端ドメインのリン酸化ができない変異株では, 野生株と比べて細胞外 cAMP 投与に依る ACA の活性化が持続する[Brzostowski *et al.*, 2013]. cAMP 投与して後に数分かけてリン酸化される CAR1 の量が上昇すると考えられており[Caterina *et al.*, 1995], これは細胞外 cAMP に対する細胞内 cAMP 濃度上昇の時間スケールと近い. CAR1 の細胞外 cAMP に対する親和性がアクチン重合にどのように依存するかを検証することの意義は大きい.

LatA の投与により, 細胞外 cAMP によって誘起される PI3K の膜への局在化は抑制される[Sasaki *et al.*, 2004]. 一方, Raf1-RBD や, PIP₃ と結合する PH ドメインを用いた蛍光プローブで見られる細胞外 cAMP に対する Ras や PIP₃ の応答は適応的であり, LatA を投与しても応答の強度や適応性に変化はないことが生細胞観察により明らかになっている[Xu *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2012]. Ras 活性の蛍光プローブはヒト由来のタンパク質 Raf1 の Ras 結合ドメイン(Raf1-RBD)に蛍光タンパク質を連結させたものであり, Raf1-RBD は活性型 RasG, RasB, RasD に結合し, 活性型 RasC にはほとんど結合しないと考えられている[Sasaki *et al.*, 2004; Kae *et al.*, 2004]. また, Raf1-RBD で見られる Ras の活性について, 細胞外 cAMP の空間的な進行波が向かってくる側でのみ Ras の活性が上昇するが, LatA 処理してもその傾向は維持される[Nakajima *et al.*, 2014]. 一方, 細胞外 cAMP によって誘起される Sca1 の膜への局在や RasC の活性上昇は LatB (LatA と同様な作用機序によりアクチンの重合を阻害する) の投与により抑制されることが明らかになっている[Charest *et al.*, 2010]. RasC が関与するシグナル伝達が F-アクチンに依存することで, TORC2 や PKB の活性が制御され, cAMP リレー応答に影響を及ぼす可能性がある.

F-アクチンの量が ACA の活性等細胞内 cAMP の合成に寄与するものであるならば, cAMP リレー応答を反映する蛍光強度比のデータを時間微分した量と F-アクチン量との間に明瞭な相関がみられると期待される. しかし, この二つの量の相関は, 10 nM cAMP については弱いながら正の相関がみられ, 1 μ M cAMP については相関はみられなかった. これは F-アクチン量と cAMP リレー応答のピーク値との相関と同様の傾向であった (図 7.9). F-アクチンの量が直接 ACA の活性に比例するものではないことを示唆する結果である.

cAMP 投与後数十秒の間に蛍光強度比の値 (I_{485}/I_{540}) が 0.04~0.08 程に上昇し 10 秒程度で下降に転じる様子は, LatA や LY を与えた細胞においても見られることがあった (図 5.1, 図 5.2, 図 5.15). この時間スケールは, Ras や PIP₃ の応答のそれと類似している. 以上のことから, この数十秒スケールの応答は Ras や PIP₃ に依存しており, それ以後の数分スケールの応答は, それとは別のメカニズムによって駆動されている可能性が示唆される.

8.1.2 項 cAMP リレー応答の非適応性との関係

シグナル伝達機構において、Ras より下流の因子の多くが適応的な応答を示すことが、先行研究により明らかにされている。しかし、最近の報告より、細胞外 cAMP 濃度が μM のオーダーのときは、Ras の活性が細胞外 cAMP により一過的に上昇し減少するが、cAMP 投与前のレベルにまでは完全に戻らないことが示された[Nakajima *et al.*, 2014]。細胞内シグナル伝達機構の入出力関係は非線形的であることが多く (cAMP リレー応答がまさにその一例である)、少しの入力がありさえすれば大きな出力を示す可能性は十分にあるため、この Ras の僅かな持続的活性が cAMP リレー応答の非適応性を生じさせている可能性は否定できない。

走化性応答と cAMP リレー応答を担う主な Ras は RasG と RasC であり、それぞれ PI3K と TORC2 の活性を制御すると考えられている (第 2 章の 2.3 節を参照)。細胞外 cAMP により活性が上昇する PI3K1 と PI3K2 を欠損することで PI3K の活性を部分的に阻害したとき、細胞外 cAMP による ACA の活性が適応的でなくなり野生株と比べて活性が高くなることから PI3K が適応応答に寄与する、と主張する報告がある[Comer and Parent, 2006]。しかし、LY を低濃度で投与したときに ACA の活性は単に減少するのみで適応的であるとの報告もある [Loovers *et al.*, 2006]。これらの報告はいずれも生化学的アッセイによるものであるが、第 5 章の 5.4 節で、LY の投与により cAMP リレー応答の持続的かつ周期的な応答は顕著に抑制されるが、僅かながらシグナルの上昇が見られることが生細胞観察により明らかになった (図 5.17)。低濃度の LY ($10 \mu\text{M}$) を投与したときも、投与しないときと比べて持続的な応答のピーク値が上昇する等の振る舞いは見られなかった (図 5.17)。これは、PI3K の活性上昇に依存して ACA の活性が上昇することを示唆するものであり、LY の投与のより ACA の活性が減少するという報告[Loovers *et al.*, 2006] と矛盾しない。

一方、本研究において、LatA の投与下では cAMP リレー応答は完全適応を示した。LY を投与した細胞で仮足を伸ばす様子が観察されており (図 5.14 右)、従ってアクチン重合の阻害の度合いは、少なくとも仮足形成を担う樹状フィラメントについては LatA と比べて小さいと考えられる。以上のことから、PI3K の経路と TORC2 の経路の両方が cAMP リレー応答に寄与するが、非適応性に関しては TORC2 の経路の寄与がより大きい可能性がある。生化学的実験から、活性型 RasC は TORC2 と結合し、また RasC の恒常的活性上昇による PKB 活性の持続的上昇が TORC2 を構成する一分子 PiaA を欠損することで抑制されることがわかっており、従って TORC2 の活性上昇には RasC の活性上昇が必要であると考えられている[Cai *et al.*, 2010]。また、アクチン重合の薬理的阻害により TORC2 による PKB のリン酸化が抑制されると考えられている[Charest *et al.*, 2010]。TORC2 の経路の非適応性への寄与を検証する一つの手法として、LatA を与えたとき

の RasC の活性をライブイメージングにより測定することが挙げられる。例えば、特定の Ras の活性を測定できる蛍光プローブ Raichu [Aoki and Matsuda, 2009]は、GTPase とそれに特異的な結合ドメインを連結したものの両端に CFP と YFP を連結させたもので、GTPase が GTP と結合することによるコンフォメーションの変化により FRET 効率が変化することを顕微鏡下で観察することで、GTPase 活性を生細胞観察できるものである。RasC とその結合ドメインを用いて Raichu を作製することで、細胞内の RasC 活性の動態を可視化できれば、TORC2 の経路の非適応性への寄与を検証できる。

また、ACA の活性化に必要である ERK2 は高濃度の細胞外 cAMP に対して持続的な応答を示すことが生化学的実験により明らかになっている [Segall *et al.*, 1995; Brzostowski and Kimmel, 2006]。ERK2 の下流のシグナル伝達の経路はよくわかっていないが [Artemenko *et al.*, 2014]、細胞外 cAMP による ERK2 活性の F-アクチン依存性を考慮することは重要である。

LatA の投与により cAMP リレー応答は抑制されたが、これがアクチン重合の阻害を介したものであるかについては慎重に考える必要がある。第 7 章の 7.2 節の結果から、LatA の投与により細胞側面における Lifeact-mRFPmars の輝度値 (F-アクチンの量の指標) は確かに減少し (図 7.6, 図 7.7)、F-アクチンの量と cAMP リレー応答のピーク値との間の正の相関が示されたが、因果関係について直接言及するには至らなかった。LatA の投与によりアクチン重合の阻害以外の副次的な作用がはたらいたことで cAMP リレー応答が抑制された可能性は否定できない。ただし、5 μ M という高濃度の LatA を投与して、後に LatA を除去すると、cAMP リレー応答は回復したことから (図 5.3)、不可逆的な毒性を見ていないことを示している。

また、アクチン重合を阻害すると考えられている他種の薬剤を使用することは、cAMP リレー応答のアクチン重合依存性を独立に検証する上で有用であろう。その例として、(似た構造を有するが) 別の薬剤である LatB を細胞に投与したとき、LatA を投与した時と同様に、1 nM cAMP を与えたとき投与直後の応答のピーク値は顕著に抑制され、1 μ M cAMP を与えたときは持続的かつ周期的応答のピーク値が顕著に抑制された (図 5.8)。その他の薬剤としてはアクチン重合の阻害剤として知られるサイトカラシン (cytochalasin) があるが、*Dictyostelium discoideum* の細胞膜を透過しないことが明らかになっており [McRobbie and Newell, 1985]、アクチン重合の薬理的阻害にはラトランキュリンを用いる以外に有効な手法がないのが現状である。

遺伝子変異株を用いた実験を行ったとしても、その結果の解釈には注意を要する。集合過程における遺伝子発現の多くは細胞内 cAMP に依存する [Iranfar *et al.*, 2003]。cAMP リレー応答や走化性応答に関するシグナル伝達機構を構成するタンパク質の遺伝子を欠損した株において cAMP リレー応答が抑制されたとの結果を得た場合、それがそのタンパク質を欠損したことそのものに依るのか、その他の遺伝子発現の異常に依るものなのかの判断は慎重を要する。これを解決するかもしれない手法として、遺伝子操作により温度感受性を持つタンパク質を発現する

方法が考えられる。例えば 27 °C で活性を失う G β サブユニット（ヘテロ三量体 G タンパク質を構成する）を発現する細胞を用いることで、G β サブユニットの活性に依存して ACA の活性が上昇することを示した報告がある [Jin *et al.*, 1998]。他の主要なタンパク質に温度感受性を付与した変異体を作製することができれば、グローバルな遺伝子発現の影響を排除した状態で、cAMP リレー応答におけるそのタンパク質の依存性を解析することができるようになる。ただし、観察時の温度を変えること自体が細胞の機能全体に与える影響を考慮する必要は生じる。

8.1.3 項 cAMP リレー応答の時間スケールの F-アクチン非依存性

数分の時間スケールをもった cAMP リレー応答の持続性は、LatA により顕著に抑制された。一方、LatA の投与により、蛍光強度比 (I_{485}/I_{540}) の値の上昇率や下降率の顕著な変動はなく (図 5.2)、また、cAMP リレー応答の持続的かつ周期的応答のピーク間の間隔は変動しなかった (図 5.6)。この結果は、細胞内 cAMP 濃度の上昇速度や減少速度に変化がないことを意味し、ACA による合成速度や PDE による分解速度や分泌速度が、F-アクチンの影響を受けている可能性が低いことを示唆するものである。

cAMP 投与中に細胞側面や基質接着面側における F-アクチン量も増減を繰り返すことがわかったが、それは cAMP リレー応答の周期的応答とはその位相は必ずしも一致しなかった (図 7.4)。F-アクチン量が周期的に変化することと cAMP リレー応答の持続的かつ周期的変動は必ずしも伴わないことを意味する。一方、LatA 濃度依存的に cAMP リレー応答の二次ピークは減少した (図 5.5)。また、10 nM cAMP よりも 1 μ M cAMP を投与した方が基質接着面側の F-アクチン量は増加した (図 7.17 右, 図 7.19 右)。以上のことから、F-アクチンの量に依存して、ある細胞内因子の活性の (時定数ではなく) 強度が決定し、その細胞内因子の活性に依存して cAMP リレー応答の持続的な振る舞いが生じている、という仮説をたてることができる。さらに、基質接着面側の F-アクチン量のピーク値 (図 7.17 右) と比べて、cAMP 投与後 5 分間の平均値 (図 7.18 右) の方が、cAMP リレー応答の強度とよく相関したことから、各時刻における F-アクチンの量よりは、ある時間幅での F-アクチンの量の積算量の方が cAMP リレー応答に効いている可能性も示唆される。持続的な細胞外 cAMP 存在下でその活性が数分のスケールで周期的に変動すると明らかになっている細胞内因子は見つかっていない。例えば RasG や PIP₃ の動態についても、数十分の間一定濃度の細胞外 cAMP を投与して観察し続けた結果の報告はなされていない。細胞内シグナル伝達機構の主要な因子について、より詳細な情報を取得する必要があると言える。

8.1.4 項 cAMP リレー応答と F-アクチンの構造の関係

共焦点像から解析された F-アクチンの動態（第 7 章の 7.2 節）と TIRF 画像から解析された F-アクチンの動態（第 7 章の 7.3 節）とを比較すると、特に TIRF 画像から解析された基質接着面側での F-アクチン量は細胞外 cAMP 濃度依存的に上昇した。また、F-アクチン量と cAMP リレー応答との相関は、基質接着面側での F-アクチン量の方が、鉛直方向中央の断面の細胞側面における F-アクチン量よりも強い相関を示した。その要因の一つとして考えられることとして、観察の焦点面の違いがある。基質面と、接着面から $2\mu\text{m}$ 離れた面とで、観察できる細胞膜の面積に大きな差がある。接着面から離れた面では、得られた細胞の領域のうち細胞膜である部分はその輪郭のみである。TIRF 顕微鏡でより多くの細胞膜領域を観察できたことにより、F-アクチン量と cAMP リレー応答との関係を正確に捉えることができたのかもしれない。細胞外 cAMP を投与したとき、共焦点蛍光画像から観察された細胞側面の F-アクチン量が減少したとしても細胞内 cAMP 濃度が上昇することがあったのは（図 7.7）、基質接着面側での F-アクチンの動態が捉えられていなかったからという可能性が挙げられる。

F-アクチンは、膜を押し仮足の形成に寄与する枝分かれを持った構造と、膜を裏打ちする直線状の束状の構造の、主に 2 種類の構造をとる。F-アクチンに結合する Arp2/3 複合体 (Actin related protein 2/3 complex) を起点として F-アクチンの分岐構造が形成される。細胞外 cAMP の投与により Arp2/3 は一過的に細胞膜付近へ移動し 15 秒程度で投与前のレベルにまで戻る [Insall *et al.*, 2001; Cha and Jeon, 2011]。また Arp2/3 複合体は、基質接着面側で生じる F-アクチンの集積 (アクチン波) とも共局在する [Bretschneider *et al.*, 2004]。Arp2/3 複合体を構成するタンパク質の一つである Arp2 のリン酸化はアクチンの枝分かれ構造の形成に必須で、リン酸化されない Arp2 を発現した変異株は、細胞外 cAMP に対する F-アクチン量の上昇が抑制されるだけでなく、CAR1 や ACA の発現量が抑制されることが明らかになっている [Choi *et al.*, 2013]。束状の構造は、Cortexillin I と II というアクチンを架橋するタンパク質が F-アクチンに結合することで形成される [Faix *et al.*, 1996]。この構造は、PTEN やミオシン II と共局在し、Arp2/3 複合体を伴う F-アクチンとは排他的に存在する [Gerisch *et al.*, 2011]。Cortexillin は PIP_2 に結合し細胞膜に主に分布している [Faix *et al.*, 1996]。細胞外 cAMP の投与により、Cortexillin は 2~3 秒で一過的に細胞質に移動しその数秒後に細胞膜付近での量が cAMP 投与前よりも増加した後、15 秒程度で投与前のレベルにまで戻る [Cha and Jeon, 2011]。Cortexillin I と II を欠損した細胞は cAMP に対する走化性応答や cAMP の産生が抑制されることから、Cortexillin によりアクチンが適切な構造を取ることが走化性応答のみならず cAMP の産生にとって重要であると考えられている [Shu *et al.*, 2012]。cAMP 投与により誘起される Cortexillin の動態を数分~数十分スケールで測定した知見はなく、

Cortexillin の動態が非適応的である可能性はある。

第7章の7.2節と7.3節の結果から、nMオーダーの細胞外cAMPを投与したとき、投与後30秒以内では主に細胞側面でのみF-アクチンが集積し(図7.11)、 μM オーダーの細胞外cAMPを投与後30秒以内では基質接着面側を含めてF-アクチンが集積した(図7.12)。共焦点顕微鏡での観察結果で、10 nMの細胞外cAMPにおいて、細胞側面のF-アクチン量とcAMPリレー応答の強度との間に正の相関関係が見られた(図7.6左, 図7.7左)。また、共焦点顕微鏡での観察結果では1 μM の細胞外cAMPにおいて、細胞側面のF-アクチン量とcAMPリレー応答の強度との間に明瞭な相関関係は見られなかったが(図7.6右, 図7.7右)、TIRF顕微鏡の観察結果から、cAMP投与開始から5分間の基質接着面側のF-アクチン量の平均値とcAMPリレー応答との間に強い相関が確かめられた(図7.18右)。ここで見られた基質接着面側のF-アクチンの集積は出現頻度が細胞外cAMP存在下で上昇する傾向にあることから、細胞外cAMPに依存したものである可能性が示唆される。cAMP投与開始から30秒以内ではArp2/3やCortexillinはともに細胞膜へ移動すると考えられる。30秒以降で見られるF-アクチンの集積はArp2/3のみの集積が伴うものであると仮定すると、Arp2/3複合体の相互作用を伴う枝分かれ構造を持ったF-アクチン量とcAMPリレー応答とが強く相関する可能性が示唆される。

Lifeact-mRFPmarsではF-アクチンの樹状構造と束状構造とを区別することはできない。これを検証する方法としては、例えばCortexillinやArp2/3の動態と細胞内cAMP濃度とを同時に可視化することが挙げられる。

なお、F-アクチン量とcAMPリレー応答や細胞形状との相関がLatAやPLL存在下のデータより明瞭に確認できたことは、LatAやPLLが存在しない条件よりも小さいF-アクチン量を実現できたことによるものと考えられる。

8.1.5 項 細胞内cAMPに依存した細胞運動との関係

ACA欠損株では、cAMPの濃度勾配下で側方仮足形成頻度が増加することから、細胞内cAMPが走化性応答に寄与している可能性が指摘されている[Stepanovic *et al.*, 2005]。第7章の7.4節の結果より、細胞の形状の指標である円形度の逆数は、周期的に変化することが示された(図7.22, 図7.26)。形状の変化が、細胞の境界の一部でのみ仮足が形成されることに起因するとしたら、細胞内cAMP濃度が周期的に変化することが形状の変化に反映されていると考えることができるかもしれない。しかし、形状の変化とcAMPリレー応答との同時性は常に見られるわけではなかった(図7.22, 図7.26)。また、同グループの先行研究[Wessels *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Stepanovic *et al.*, 2005]では細胞内cAMP依存的に活性が制御されるPKA (protein kinase A) に着

目し, ACA の欠損, 細胞内 cAMP を分解する細胞内 PDE である RegA の欠損, PKA の活性の抑制を担うサブユニットの欠損により側方仮足の形成の頻度が増加することを明らかにしている. ACA や RegA や PKA は, 細胞外と細胞内の cAMP 濃度の周期的変化を制御する機構を構成していると考えられており [Maeda *et al.*, 2004], この構成因子のどれか一つを欠くことで細胞内 cAMP 濃度の周期的変化が生じなくなることが側方仮足の抑制に関与していると主張している [Stepanovic *et al.*, 2005]. PKA はシグナル伝達機構を構成する多くの分子の発現に必須であり [Iranfar *et al.*, 2003], また, CAR1 のリン酸化による細胞外 cAMP に対する感受性の減少や ERK2 の活性の阻害を担うと考えられている [Laub and Loomis, 1998; Maeda *et al.*, 2004]. なお, RegA 欠損株でも, 高濃度 cAMP を投与したとき細胞内 cAMP 濃度が周期的に変動する様子が生細胞観察されている [Gregor *et al.*, 2010]. これらタンパク質の F-アクチン依存性を解析することは今後の課題であろう.

8.2 節 機械的シグナルの影響

8.2.1 項 接着の寄与と F-アクチンの集積との関係

第 2 章の 2.1 節, 2.4 節で述べた先行研究から, 動物細胞や細胞性粘菌において, 細胞にはたらく力により細胞内の分子の活性が変化し, これによって細胞の挙動に影響がもたらされることが明らかになっている. 基質との接着依存性については, PLL コートしたガラス上で LatA によるアクチン重合阻害の度合いが増すことや, ストリーミングと呼ばれる集合過程における細胞集団の一方向的な移動が生じないことが報告された [McCann *et al.*, 2014]. また, ポリエチレングリコール (PEG) をガラス上にコートし細胞の基質への接着を抑制したときも, ストリーミングは生じなかった [Wang *et al.*, 2014]. 細胞が基質と接着できるとき, 細胞間で接着した二細胞で形状の変化が同調して行われることが示され, このことがストリーミングを生じるのに重要な役割を果たしていると考えられている [Wang *et al.*, 2014]. しかし, 基質接着性を変化させたときの cAMP 振動や一細胞の cAMP リレー応答との関連については言及されていない. 第 6 章, 7 章の結果より, PLL コートにより基質との接着を促進したとき, F-アクチンの集積と cAMP リレー応答は一細胞レベルとともに抑制され (図 7.6, 図 6.5), 集団レベルの cAMP 振動の周期も増大することがわかった (図 6.3). 特に, cAMP 投与下における基質接着面側での F-アクチン量は PLL 存在下で顕著に抑制された (図 7.17). このことから, PLL コートにより F-アクチン量が抑制されたことが cAMP リレー応答の抑制を引き起こした可能性が示唆される. PLL 存在

下での cAMP リレー応答の抑制が F-アクチンを介したものをさらに検証するには、PLL 存在下でアクチン重合量を促進する状況での cAMP リレー応答を測定が必要である。例えば、アクチン重合量が過剰に増加する変異株として、Arp2/3 の活性を制御するタンパク質複合体 SCAR/WAVE を構成する一タンパク質 PIR121 の欠損株がある [Blagg *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2013]。8.1.2 項で述べたように、遺伝子欠損株を用いた実験の結果の解釈は慎重に行う必要がある。8.1.4 項で述べたように、Arp2/3 は CAR1 や ACA の発現量に寄与することからも、注意が必要である。また、PLL のコートに依る不可逆的な毒性については明らかになっていないため、PLL コートの副次的な作用についても注意する必要がある。

細胞性粘菌が集合する過程において、細胞と基質との間の距離が周期的に変動していることが知られている [Schäfer *et al.*, 2013]。これは電極上の細胞のインピーダンス値を測定することで細胞の電極への接着面積を見積もることによる。基質との距離が離れて数分後に細胞の形状が細長くなることから、cAMP 濃度についても基質との距離が離れて数分後に極大となると予想される。また、基質接着面側に見られる自発的な PIP₃ 波やアクチン波に先行する形で、反射干渉顕微鏡 (IRM) で観察される“基質との距離が離れた部分”の波が細胞内を伝搬していることがわかっている [千田, 2015]。第 7 章の 7.3 節で示した細胞外 cAMP 存在下での基質接着面側での F-アクチンの動態は、cAMP 投与後 5 分以内に F-アクチンの集積がよく見られ、PLL 存在下ではほとんど観察されなかった (図 7.13)。これらを踏まえると、cAMP を投与すると細胞の一部は僅かに基質から離れ、その部分が再び基質と接着する際にアクチンの重合が促進され、それに依存して細胞内で cAMP が合成されやすくなっている可能性がある。この仮説に従うと、PLL 存在下では細胞と基質との接着は強まるためアクチンの重合が抑えられ、cAMP リレー応答も抑制されることになる。なお、アクチン重合を阻害しても cAMP リレー応答の不応期には影響を及ぼさなかった (図 5.13)。PLL 上での細胞について cAMP リレー応答の脱適応のキネティクスを解析することで、細胞と基質との距離が離れることが不応期とどのように関係するかについて言及することができると思われる。

先行研究 [Pramanik *et al.*, 2009] によると、細胞を局所的に吸引すると PTEN がそこに集積することが示されており、それにより PIP₂ が産生されミオシン II の活性が上昇し、吸引による形状の変化を元に戻すような牽引力がはたらく。Arp2/3 の集積を伴うアクチン波が生成されたときにその地点で PTEN が細胞膜から離れると、この現象とは逆に、PIP₂ の産生は抑制され相対的に PIP₃ の量が増加し、その結果 ACA の活性が上昇する可能性がある。PTEN の欠損により細胞外 cAMP 存在下での ACA の活性が上昇するとの報告もあることから [Iijima *et al.*, 2002]、PTEN の動態を考慮することは重要である。ただし、PIP₂ と結合する Cortexillin が ACA の発現に必要なとの報告 [Shu *et al.*, 2012] もあることから、PIP₂ の産生の抑制により細胞膜上での Cortexillin が減少することにより ACA の活性が抑制される、というロジックが成り立っている可能性もあ

る (8.2.2 項を参照)。細胞外 cAMP 投与により細胞膜付近での Cortexillin の局在量は減少した後増加に転じることから (8.1.4 項を参照)、Cortexillin の細胞膜への局在の動態と細胞内 cAMP 濃度の持続的かつ周期的な増減とは、(これまでに観察されている時間スケールは両者で大きく異なるものの) 何らかの関係があるのかもしれない。

PLL 存在下では細胞が基質と強く接着するため、ミオシン II が寄与する牽引力に何らかの影響をおよぼすことが期待される。PLL 存在下での cAMP リレー応答の抑制は、それを反映しているのかもしれない。走化性応答においてミオシン II は PTEN や Cortexillin とともに細胞後端に局在することから、アクチンとミオシンからなる複合体 (アクトミオシン) のはたらきにより細胞膜を牽引していると考えられている [Schroth-Diez *et al.*, 2009; Tsujioka *et al.*, 2012]。ミオシン II の活性を阻害する薬剤であるブレビスタチンを投与した細胞での F-アクチンの動態と cAMP リレー応答との関係を解析することは、ミオシン II の寄与を検証する一つの手がかりとなる。しかし、ブレビスタチンは有色であり、また、450~490 nm の励起光を照射すると分解され細胞毒性を持つ [Kolega, 2004]。実際に観察を試みたところ、蛍光の漏れ込みが顕著に起きた。490 nm より長波長側に励起スペクトルの極大を持つ別の蛍光タンパク質を利用した cAMP センサーを作製し用いる必要がある。

cAMP 振動を観察する際、DB 寒天上とガラスボトムディッシュ上の二種類の実験系を用いた。cAMP 振動、特に大域的ならせん波を観察する場合は DB 寒天上に細胞を乗せて観察することが多いが (図 3.5, 図 4.2)、ガラス上でも cAMP 振動は生じる様子が観察された (図 4.9)。このことから、cAMP リレー応答は接着基質の剛性の影響を受けないことが示唆される。

また、先行研究と本研究では、用いた灌流系が異なる。先行研究においてはガラスボトムディッシュを用いているため、細胞を貼りつけたガラスの上部は開放されている。本研究ではガラスと PDMS で囲われた微小流路を使用した。また、溶液の流れによる剪断応力は微小流路の方が強いと考えられる。この微小流路内で細胞にかかる剪断応力 σ を先行研究 [Décavé *et al.*, 2003] を元に見積もると、

$$\sigma = \frac{6D\eta}{le^2} \cong 0.4 \text{ Pa}$$

である。ただし、 D は流速 ($10 \mu\text{L}/\text{min} = 1/6 \text{ mm}^3/\text{sec}$)、 η は溶液の粘度 (水の場合 $8.90 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{sec}$)、 l は流路の幅 (1 mm)、 e は流路の高さ ($50 \mu\text{m} = 0.05 \text{ mm}$) である。先行研究 [Décavé *et al.*, 2003] によると、0.7 Pa の剪断応力をかけるとその応力の方向への細胞の移動を誘起する。本研究での条件ではそれよりも低い応力であると考えられる。本研究で示された cAMP リレー応答の動態 (図 5.1) は先行研究の結果 [Gregor *et al.*, 2010] と同様のものであったことから、cAMP リレー応答は、細胞が存在する空間の高さ方向の制限や、大きさが約 0.4 Pa の剪断応力の影響を受けないと考えられる。

8.2.2 項 基質接着に関わる細胞内分子との関係

動物細胞においてはインテグリン等の膜貫通タンパク質と細胞外マトリクスの分子との特異的な結合により基質と接着するが、*Dictyostelium discoideum* においては、特異的な細胞外接着分子を必要としないと考えられている[Artemenko *et al.*, 2014]. 糖やアミノ酸を加えると接着が抑制されることから、膜貫通型の糖タンパク質と基質との間のファンデルワールス力によって接着が促進されている可能性が示唆されている[Loomis *et al.*, 2012].

一方で、基質接着に寄与する細胞内分子がシグナル伝達機構を構成する因子に影響を与えうるとの報告は多く存在する。Cortexillin や Coronin 等、アクチンに結合し基質接着に関わるとされるタンパク質の遺伝子を欠損した株では、CAR や ACA の発現量が著しく減少し、その結果、細胞が集合する過程に異常が見られる[Shu *et al.*, 2012; Vinet *et al.*, 2014]. しかし、集合過程において見られる、遺伝子発現よりも短い時間スケールで見られる細胞運動と細胞間シグナリングの協調的な振る舞いにおいて、これらの分子がどのような役割を果たしているのかについては、よくわからないのが現状である。また、同様に接着に関与するタンパク質 TalinA と TalinB を欠損した株は、基質との接着性が低下し、細胞の集合過程に異常が見られる[Tsujioka *et al.*, 2008]. 動物細胞において Talin はアクチンとインテグリンに結合することが知られている[Artemenko *et al.*, 2014]. 粘菌においても、Talin はインテグリン様のタンパク質と結合することがわかっている[Cornillon *et al.*, 2006]. TalinB は PKB によりその活性が制御されるとの報告があるが[Kamimura *et al.*, 2008], Talin の活性の ACA 活性への寄与等は明らかになっていない。これらタンパク質の動態や、その遺伝子欠損株の応答を精査することは重要である。

8.2.3 項 基質接着阻害の影響

第 6 章の 6.1 節と 6.2 節で、基質との接着を促進することにより細胞運動を抑制した(図 6.1). 基質との接着や剥離が F-アクチンの動態の変化や ACA 活性を変化させる可能性があることから (8.2.1 項を参照), 逆に、細胞の基質への接着を阻害した場合も何らかの影響があると期待できる。しかし、本研究で行っているような振盪による飢餓処理により、走化性応答や cAMP リレー応答に関わるシグナル伝達機構の構成タンパク質 (CAR1 や ACA 等) の発現量が上昇することが、マイクロアレイを用いた解析により明らかになっている[Iranfar *et al.*, 2003]. また、これらタンパク質の発現量上昇には、アデニル酸シクラーゼや、細胞内 cAMP 依存的に活性が制

御される PKA (protein kinase A) が必要であることを示している [Iranfar *et al.*, 2003]. さらに, 細胞外 cAMP に対するシグナル伝達機構の構成タンパク質の活性を解析した多くの研究は, 懸濁液中の細胞の応答を測定している. 従って, 細胞が基質と接着できなくとも細胞集団の cAMP 振動は生じ得る.

基質接着を阻害した影響を検証するために, 第 6 章の 6.3 節のように, プルロニックを用いて細胞接着を阻害した状態での cAMP 振動の測定を試みたが, 細胞同士が接着することで細胞密度の不均一が生じてしまった (図 6.6 左). また, 細胞間接着を抑制するために, バッファーに 2 価イオンのキレート剤である EDTA を加えて観察したところ, 通常ガラス上で細胞が丸みを帯びた形状を取り応答が弱まったことから (図 6.6 右, 図 6.7), 細胞へのダメージが強いことが示唆された. 今後, 実験手法の改善が求められる.

8.2.4 項 細胞形状や重心移動からのフィードバックの存在の可能性

細胞の形状と cAMP リレー応答との関係については, 落射蛍光像からの解析から, 1 nM cAMP の投与では弱い正の相関が, 1 μ M cAMP の投与では弱い負の相関が見られた (図 7.24). 先行研究 [Chen *et al.*, 2003] においても, 1 μ M の cAMP を投与して 30 秒程で細胞は丸みを帯び運動が抑制されるとの報告がある. また, 共焦点蛍光像からの解析から, 細胞の形状と cAMP リレー応答との間に相関は見られなかった (図 7.30). 一方, 共焦点蛍光像の解析から, 10 nM cAMP の投与下での細胞の形状と F-アクチン量との間には正の相関が確認された (図 7.27 左). F-アクチンは cAMP リレー応答と細胞の形状の両方に影響を及ぼし得るが, そのことが両者の間に明瞭な相関関係を生じさせるまでには至らない, と考えられるかもしれない. 但し, 細胞外の cAMP 濃度を比較的の不連続に変化させたときの応答を解析したため, 重心移動の一方向性が生じづらい条件であった可能性がある. 例えば, 時間的に緩やかな細胞外 cAMP 濃度上昇に対する応答を精査することは重要である (7.5 節を参照).

また, 細胞の形状や移動方向を人為的に操作したときの細胞の応答を観察することで, 直接的に, 細胞の形状や重心移動が cAMP リレー応答にどのように影響するかを検証することができると期待される. その手法の一つとして, 細胞の接着を阻害するポリマー分子であるプルロニックをガラス基板上にパターンニングし, その基板上での cAMP 振動の測定を試みた (第 6 章の 6.4 節). この基板上へ細胞を乗せて観察したところ, 細胞の配置を限定することができたが, 細胞の形状を操作することはできなかった (図 6.8). また, この基板上での cAMP 振動を観察したところ, cAMP の周期的な波は, 細胞が移動できる方向には依らずに様々な方向に伝播する様子が観察された (図 6.9). このことから, 細胞の移動方向の制約が, cAMP 振動の波の方向性

に影響を及ぼすかについて言及するには至らなかった。この基板上においても、細胞同士が接着し細胞密度が不均一になることが多かったことから、実験手法の改善が求められる。

細胞の形状や重心運動、F-アクチン量、cAMP リレー応答の間の関係の解析においては、そのうち二つの応答の強度の間の相関係数を求めることで、両応答の相関を解析した。上述した理由により形状変化や重心移動が生じづらい実験条件であったことから、三つ以上の応答のデータを用いた多変量解析は行わず、二変数間の関係を解析し比較することに徹した。今後、実験条件を検討した上で十分量のサンプル数を取得できた際には、細胞の形状や重心移動、F-アクチン量、cAMP リレー応答の三つの応答の関係を多変量解析により記述することができるようになると思われる。

8.3 節 アクチン重合や運動に依存した cAMP 振動の生物学的意義

8.3.1 項 一細胞レベルの cAMP リレー応答と細胞集団の cAMP 振動との関係

細胞内での cAMP の合成と分泌により隣接する別の細胞の応答が誘起され、それが大域的に生じることで、集団レベルの cAMP 振動は引き起こされる。先行研究[Tomchik and Devreotes, 1981]によると、単層に撒かれた細胞集団が cAMP 振動を行っているときの cAMP の全濃度は 10 nM から 1 μ M である。第 4 章の 4.2 節の結果より、アクチンの重合を薬剤で抑制すると、cAMP 振動の波の伝播速度は大きく変化しないまま (図 4.10 上段)、周期が増大した (図 4.10 下段)。また、第 5 章の 5.2 節の結果より、アクチン重合を薬剤で抑制すると、nM オーダーの細胞外 cAMP に対する cAMP リレー応答の強度は顕著に抑制された (図 5.9)。1 μ M cAMP に対する応答強度の半分の値の応答強度を持つ細胞外 cAMP 濃度 (これを IC₅₀ とする) は、LatA を投与しない場合は約 0.45 nM、5 μ M LatA を投与した場合は約 2.4 nM である (図 5.9 のデータを元に、図 8.1 から見積もった)。すなわち、5 μ M LatA を投与した細胞が LatA を投与した細胞と同程度の cAMP リレー応答の強度を示すには、細胞外 cAMP 濃度が 5 倍程度高くなければならない。

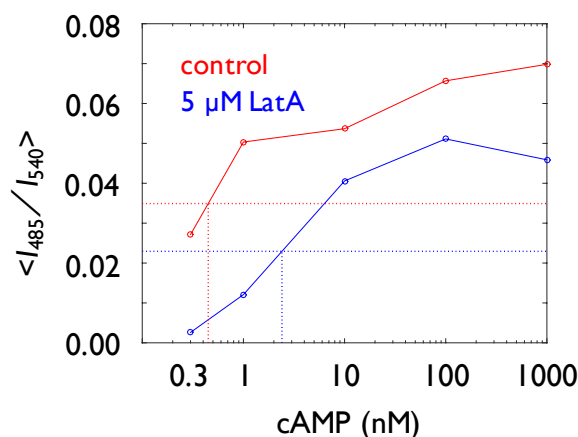


図 8.1: 1 μ M cAMP に対する cAMP リレー応答の一次ピークの最大値の半値をとる細胞外 cAMP 濃度 (IC_{50}) の見積もり. 細胞外 cAMP (横軸, 対数表示) の投与による cAMP リレー応答の一次ピークの値 (縦軸, 図 5.9 を参照のこと) から, LatA を投与しないときは約 0.45 nM, 5 μ M LatA を投与したときは約 2.4 nM と決定した.

細胞集団の cAMP 振動が開始されるにはある程度細胞外 cAMP 濃度が上昇する必要がある, それを実現するのは細胞自身によるランダムな散発的な cAMP の分泌によると考えられている [Gregor *et al.*, 2010; Sgro *et al.*, 2015]. この散発的な cAMP の分泌の頻度は, nM より低い細胞外 cAMP 濃度では細胞外 cAMP 濃度に依存して上昇することが示されている [Gregor *et al.*, 2010]. アクチン重合の阻害により 1 nM 以下の細胞外 cAMP を投与したときの cAMP リレー応答の強度が抑制されたことから, 散発的な cAMP の分泌の頻度も減少したと考えられる. この散発的な cAMP の分泌の頻度の増加に依存して cAMP の波の核形成に要する時間が短くなると考えると, アクチン重合を阻害した状態ではこの核形成にかかる時間が延びることになる. その結果, cAMP 振動の周期が増大したと考えられる. また, 先行研究 [Gregor *et al.*, 2010] や 4.3 節の結果から, 灌流速度を上昇させると cAMP 振動の周期が増大することが明らかになっている (図 4.12). さらに, 先行研究 [Siegert and Weijer, 1989] においても, cAMP の産生を抑制するカフェイン [Brenner and Thoms, 1984] を投与したとき, cAMP 振動の周期が増大することが示されている. これらの結果は, 細胞外の cAMP 濃度が低下することで cAMP の波の核形成にかかる時間が延びたことによるものと考えられる. 従って, これらの知見と今回の結果を総合すると, アクチン重合を阻害したときの cAMP 振動の周期が増大した要因は, 一細胞レベルの cAMP リレー応答の強度が抑制され, 細胞外への cAMP 分泌量が減少したことによるものと考えられる.

注意すべき点としては, 細胞集団中の細胞外 cAMP は階段状に上昇していない可能性である. 時間的に緩やかな細胞外 cAMP 濃度上昇に対する応答が, 本研究で観察されたものと同様なものとなるとは限らない. 例えば, 緩やかに上昇する細胞外 cAMP に対して, PIP_3 の量が緩やか

に上昇し続ける様子が観察されている[Dormann *et al.*, 2002]. 時間的に緩やかな細胞外 cAMP 濃度上昇に対する cAMP リレー応答のダイナミクスとそのアクチン重合依存性を検証する必要がある (7.5 節を参照).

集合過程において, cAMP 振動の周期が短くなる現象が見られるが, この周期と, 一細胞レベルの cAMP リレー応答に見られるピーク間の間隔とが類似している点も興味深い(図 2.1 のグラフ, 図 5.6). cAMP 振動において細胞外の cAMP 濃度は増減を繰り返していると考えられているが, その絶対濃度の定量はなされていない. 短周期の cAMP 振動が生じているとき細胞外 cAMP 濃度が μM のオーダーの範囲で遷移しているとしたら, この短周期の cAMP 振動を構成する一細胞レベルの cAMP リレー応答は, 灌流系での実験に見られた持続的かつ周期的な応答であるかもしれない. 本研究結果でも, cAMP 振動において細胞内 cAMP 濃度のパルスの波形に二相性が見られることがあった(図 4.9 の 250 nM LatA のデータの時刻約 50 分と約 100 分). cAMP リレー応答の特性が飢餓時間に依存して変化する可能性は十分考えられるため, そうした発生段階による依存性は今後の課題である.

cAMP の分泌は, 細胞内 cAMP 濃度に比例して輸送されることがわかっている[Dinauer *et al.*, 1980a]. 細胞が強い極性を持って運動する際, F-アクチンやミオシン II に部分的に依存する形で ACA が細胞の後端へと局在するが, 常活性型の ACA を発現した細胞株では常活性型 ACA は細胞後端への局在量が少なく, 細胞質中の小胞に多く存在することが知られている[Kriebel *et al.*, 2003]. 小胞内に蓄積された cAMP がアクチン依存的に細胞の後端に輸送され cAMP を分泌することで, その細胞に追従するような別の細胞の運動を誘起すると提案されている[Kriebel *et al.*, 2008]. しかし, 最近の報告で, cAMP を輸送していると考えられる ABC 輸送体の存在が示されており, この ABC 輸送体を介した cAMP の分泌が行われていることが示されている[Miranda *et al.*, 2015]. ABC 輸送体は動物細胞における cAMP や環状グアノシン一リン酸(サイクリック GMP, cyclic GMP, cGMP) の分泌を担っており[Cheepala *et al.*, 2013], 動物細胞においてアクチン重合の薬理的阻害により ABC 輸送体による細胞内分子の分泌量や ABC 輸送体の細胞内での分布が変化しないことが知られている[Meszaros *et al.*, 2013]. 従って, cAMP の分泌自体は F-アクチンには依らない現象であるかもしれない. このことは, 細胞外 cAMP を投与しない状態において細胞内 cAMP のレベルが LatA によって低下しないことから支持される(図 5.4). また, 細胞内 cAMP が常に上昇することで PKA の活性が常に上昇している変異株[Abe and Yanagisawa, 1983]において, PKA の活性を阻害するペプチドを細胞膜に透過させると, 細胞の集合が野生株と同様に正常に行われるとの結果が示されている[Ryves and Harwood, 2006]. これは, PKA の過剰な活性が抑制されることで cAMP の細胞外への分泌が促進された可能性を示唆するものである. なお, ACA の細胞後端への局在や細胞が前の細胞を追従する運動を示した先行研究[Kriebel *et al.*, 2008]は, 本研究で採用した飢餓時間(4 時間 30 分~5 時間)よりもさらに飢餓を進めた時期(約

7時間)の細胞を観察している。飢餓時間に依存した現象である可能性を含めて検証する必要があると考えられる。

8.3.2 項 一細胞レベルの応答のばらつきが cAMP 振動に与え得る影響

細胞の応答のばらつきなどにより偶然、細胞外の cAMP の濃度が高い地点が生じると、そこでは散発的な cAMP の産生と分泌が隣接する細胞間で連鎖的に生じやすく、このことで細胞集団の cAMP 振動が開始すると考えられている[Gregor *et al.*, 2010; Sgro *et al.*, 2015]。第7章の結果から、cAMP リレー応答は F-アクチン量と正に相関することが明らかにされた(図 7.6, 図 7.7)。cAMP 振動開始の要因である細胞の応答のばらつきの起源は、各細胞における運動する能力のばらつきなのかもしれない。先行研究[Wang *et al.*, 2012]では、cAMP の分泌量が細胞によってばらつくとき、ばらつかないときと比べて細胞集団の集合が速く完了することを数値シミュレーションにより示している。ただしこれは、均一な集団では空間的に位相差のない振動が生じやすいことから進行波が生じにくいためであると考えられる。実際に cAMP 振動と F-アクチンの動態を同時に可視化し、細胞間での F-アクチン量のばらつきと cAMP の合成のばらつきを解析することで、細胞の運動する能力のばらつきが cAMP 振動の開始に寄与するかを検証することができると考えられる。

8.3.3 項 細胞運動に依存した cAMP 振動の生物学的意義

ここで、アクチン重合や細胞運動に依存した cAMP 振動の生物学的意義について考察する。図 8.2 にその概要を示す。アクチン重合が生じにくい、もしくは運動しづらい環境下では、cAMP 振動の周期は長くなる。野外環境において、例えば、アクチンの重合に影響を及ぼす毒素(タマゴテングタケから分泌されるファロイジンや、真菌から分泌されるサイトカラシン D 等[Cooper, 1987])や物理的環境により運動を抑制する地点が存在したとすると、細胞集団は、そこから離れた地点に集合することが望まれる。このような状況では、アクチン重合や細胞運動に依存した cAMP 振動により、運動を抑制する地点からの距離が近いほど cAMP 振動の周期は長く、遠いほど周期は短くなる。そこで振動の引き込み現象が起きるとすると、自己組織化的に、短周期の cAMP 振動が空間的に占められ、集合中心が運動を抑制する地点からの距離が遠い地点に生じやすくなる。その結果、細胞集団は、運動を抑制する地点から離れた地点で集合することができる。細胞運動に依存した cAMP 振動は、運動を抑制する環境から離れた地点に

細胞集団が集合するような生存戦略を担っていると期待される。

第4章の結果から、LatAの濃度勾配が存在するとき、その高濃度側での周期は長くなった(図4.3, 図4.4)。またcAMPの空間的ならせん波の中心がLatAの高濃度側に生じたとき、それが消失し、低濃度側からの短周期のcAMPの進行波がその地点に伝搬する様子が観察された(図4.6, 図4.7)。上記で考察したように、運動を抑制する地点からの距離が遠い点で集合中心が多く生じた一つの事例であると考えられる。

ただし今回、消失したらせん波の付近に存在した細胞が、LatA低濃度側から伝播するcAMPの波に対して実際に走化性応答し集合する様子を追跡しなかった。これを観察することは困難であるかもしれない。LatAの濃度勾配は拡散により形成されており、その絶対濃度は経時的に増加する。従って、消失したらせん波の付近に存在した細胞は、走化性応答による移動ができないほどにアクチン重合が阻害されてしまうと考えられる。LatA濃度勾配が存在するときに細胞がLatA低濃度側から伝播する波に応答して集合する過程を観察するためには、化学物質の定常的な濃度勾配を形成できる別種の微小流路を用いた観察を行う必要がある。

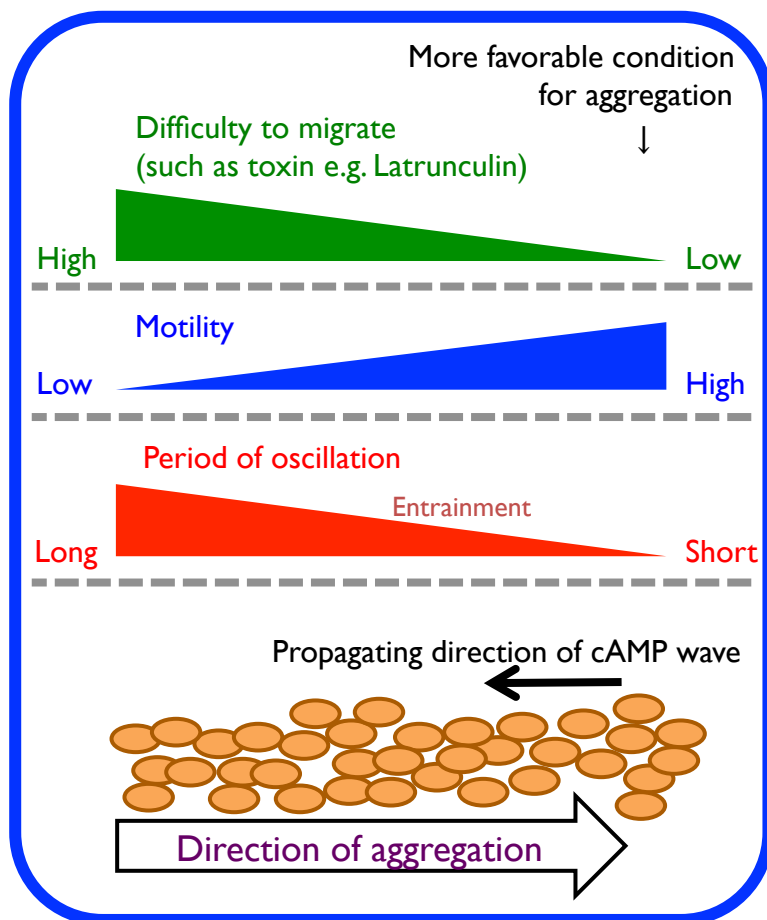


図 8.2: 細胞運動に依存した cAMP 振動の生物学的意義. LatA のような、運動を阻害するような毒素が細胞外環境に存在した場合、その毒素が最も低い濃度の位置、つまり最も運動しやすい位置で cAMP 振動の周期は最も短くなる. 振動の引き込みが生じるとすると、cAMP の空間的進行波は最も運動しやすい位置の振動周期が空間を占めることになり、最終的にその位置へ集合するはずである. 運動を抑制する因子から近づく方向へ細胞を向かわせないことで、生存戦略を担っている可能性がある.

このような、cAMP が環境検知に寄与するという現象は、細胞が乾燥した環境に置かれたときの一細胞レベルの嚢子（シスト）形成においても見られる（drought sensing と呼ぶ）. 系統的に細胞性粘菌のタマホコリカビ類（Dictyostelid）は 4 つのグループに分けられ、本研究で使用した *Dictyostelium discoideum*（キイロタマホコリカビ）は進化的に最も後に分岐したグループ 4 に属している[Schaap *et al.*, 2006]. グループ 4 に属する種のみが、走化性応答の誘引物質として cAMP を用いて集合する. また、グループ 1, 2, 3 に属する種のみが乾燥環境におけるシスト形

成を行う。乾燥によるシスト形成には、細胞内 cAMP 濃度が上昇し PKA の活性が上昇することが必要であるとの報告があることから[Ritchie *et al.*, 2008], cAMP が乾燥環境の検知による生存戦略を担っていると考えられる。飢餓状態において、cAMP に対する走化性応答により細胞集団が協調して運動することで子実体の形成に寄与する役割があるが[Siegert and Weijer, 1992], これは乾燥環境の感知での役割から進化したものである可能性が提唱されており[Ritchie *et al.*, 2008], さらに子実体形成における役割から進化したグループ 4 の種で見られる集合過程での cAMP による走化性応答の機構が形成されたと考えられている[Alvarez-Curto *et al.*, 2005]. 上述したような、cAMP により運動しづらい環境が検知されるメカニズムは、cAMP が乾燥環境を検知に寄与するメカニズムと進化的に何らかの関連があるかもしれない。

8.4 節 まとめ

本研究の成果をまとめる。

細胞性粘菌の集合過程で見られる cAMP 振動は、アクチン重合の阻害剤 LatA を投与することでその周期が増大した。LatA 濃度勾配下では、LatA 低濃度側での cAMP 振動の周期は短く、また低濃度側でより多くのらせん波中心が持続した。一方、LatA 高濃度側での周期が長く、高濃度側で生成したらせん波中心は消失することがわかった。一細胞レベルの cAMP リレー応答は、LatA の投与によりその応答強度が抑制された。特に、5 μ M LatA 投与下では、細胞内 cAMP 濃度上昇の持続成分が消失し、応答は完全に適応した。PI3K の活性を阻害する LY 投与下では cAMP リレー応答は完全には適応しなかったことから、cAMP リレー応答の非適応性がシグナル伝達機構の PI3K の経路に依らない可能性が示唆された。脱適応のキネティクスは、LatA の投与による変化はなかった。これまでの知見を総合すると、細胞外への cAMP の分泌量が減少する条件下では cAMP 振動の周期は増大することから、アクチン重合の阻害により cAMP 振動の周期が増大した要因は、一細胞レベルの cAMP リレー応答の応答強度が抑制されたことによるものと考えられる。

細胞の基質への接着を促進した状態においても、cAMP 振動の周期の増大と、一細胞レベルの cAMP リレー応答の強度の抑制が観察された。一細胞レベルの cAMP リレー応答と細胞集団の cAMP 振動は、F-アクチンや基質への接着に依存する現象であることが示された。F-アクチンの動態を可視化したところ、LatA の投与や PLL の基質へのコートにより、F-アクチン量が減少することがわかった。cAMP リレー応答と、基質接着面から離れた面における細胞側面での F-アクチンの動態を同時可視化したところ、低濃度の cAMP 投与下において、細胞側面における F-

-アクチン量と cAMP リレー応答の強度が正に相関することがわかった。cAMP リレー応答と、基質接着面側の F-アクチンの動態の同時可視化から、低濃度のみならず高濃度 cAMP 投与下において、基質接着面側の F-アクチン量と cAMP リレー応答の強度に正の相関があった。また、基質接着面から離れた断面における細胞側面の F-アクチン量と異なり、基質接着面側の F-アクチン量は細胞外 cAMP 濃度依存的に上昇した。

F-アクチン量と細胞の形状との間には、低濃度の cAMP を投与したとき、正の相関が確認された。また、細胞の形状の周期的変動と細胞内 cAMP 濃度の周期的変動の位相が一致する様子が時折観察された。細胞の形状との連動が期待されたが、両者の量的関係については弱い相関が見られるにとどまった。

以上の結果から、一細胞レベルの cAMP リレー応答と細胞集団の cAMP 振動は、F-アクチン量や基質への接着に依存する現象であることが明らかになった。集合過程における cAMP 振動とそれを構成する一細胞レベルの cAMP リレー応答の運動依存性という新規の性質を明らかにした。この特徴は、野外環境においてアクチン重合の阻害するような地点や運動を抑制するような物理的環境が存在したときに、そこからの距離が遠い地点に集合中心が生じやすくなる、という生存戦略を担っていると期待される。細胞性粘菌に限らず他種の生物においても、本研究で明らかになった細胞応答と細胞間コミュニケーションの運動依存性が今後明らかになることで、個々の細胞の振る舞いにより生み出される集団的挙動のメカニズムの理解がより深まるだろうと考えられる。

謝辞

澤井哲准教授には、6年間に渡りお世話になりました。澤井准教授の独創的なアイデアや厳しい指摘は、本研究をここまで形にするのに必要不可欠でした。充実した最先端の研究環境で自由に研究活動が行えたことは非常に幸運でした。厚く御礼を申し上げます。

澤井准教授を含めて澤井研究室のメンバー、OB・OGの皆さんからの確なご助言をいただいたことは本研究において大変重要でした。また、皆さんの研究進捗報告は大変興味深く、刺激を受けました。皆さんのご協力があったからこそ、研究室での生活を滞り無く続けることができました。島田奈央さん、中島昭彦さん、藤城美奈さん、杉田登代子さん、後藤佳奈子さん、城川祐香さん、中村允さん、入亮介さん、井元大輔さん、藤森大平さん、千田優子さん、林希恵さん、樋渡翔太郎さん、石田元彦さん、本田玄さん。ありがとうございました。また、Lifeact-mRFPmars 共発現株は島田奈央さんと中島明彦さんが作製したものを使用しました。重ねて御礼申し上げます。

微細加工技術は、若本祐一准教授をはじめとする若本研究室の皆さんにご指導いただきました。微小流路作製の機会を与えてくださったことは、本研究における最初の大きな一歩でした。皆さんの多大なるサポートに深く感謝致します。

本研究は、日本学術振興会特別研究員奨励費の助成を受けたものです。東京大学、日本学生支援機構、日本学術振興会に、御礼申し上げます。

27年間で巡り会えた全ての方々のおかげで、今の私があります。友人、部活動の仲間、親戚、家族、そして同居人の方には、ありとあらゆる面で支えていただきました。この恩に深く感謝を申し上げます。

参考文献

- Abe, K., Yanagisawa, K., 1983, A new class of rapidly developing mutants in *Dictyostelium discoideum*: implications for cyclic AMP metabolism and cell differentiation, *Dev. Biol.* **95**, 200–210.
- Alvarez-Curto, E., Rozen, D. E., Ritchie, A. V., Fouquet, C., Baldauf S. L., Schaap, P., 2005, Evolutionary origin of cAMP-based chemoattraction in the social amoebae, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 6385–6390.
- Aoki, K., Matsuda, M., 2009, Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors, *Nat. Protoc.* **4**, 1623–1631.
- Arigoni, M., Bracco, E., Lusche, D. F., Kae, H., Weeks, G. Bozzaro, S., 2005, A novel *Dictyostelium* RasGEF required for chemotaxis and development, *BMC Cell Biol.* **6**.
- Artemenko, Y., Lampert, T. J., Devreotes, P. N., 2014, Moving towards a paradigm: common mechanisms of chemotactic signaling in *Dictyostelium* and mammalian, *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3711–3747.
- Berg, H. C., Tedesco, P. M., 1975, Transient response to chemotactic stimuli in *Escherichia coli*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 3235–3239.
- Blagg, S. L., Stewart, M., Sambles, C., Insall, R. H., 2003, PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in *Dictyostelium*, *Curr. Biol.* **13**, 1480–1487.
- Bolourani, P., Spiegelman, G. B., Weeks, G., 2006, Delineation of the roles played by RasG and RasC in cAMP-dependent signal transduction during the early development of *Dictyostelium discoideum*, *Mol. Biol. Cell* **17**, 4543–4550.
- Brenner, S., Thoms, S. D., 1984, Caffeine blocks activation of cyclic AMP synthesis in *Dictyostelium discoideum*, *Dev. Biol.* **101**, 136–146.
- Bretschneider, T., Diez, S., Anderson, K., Heuser, J., Clarke, M., Müller-Taubenberger, A., Köhler, J., Gerisch, G., 2004, Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells, *Curr. Biol.* **14**, 1–10.

- Brzostowski, J. A., Kimmel A. R., 2006, Nonadaptive regulation of ERK2 in *Dictyostelium*: implications for mechanisms of cAMP relay, *Mol. Biol. Cell* **17**, 4220–4227.
- Brzostowski, J. A., Sawai, S., Rozov, O., Liao, X., Imoto, D., Parent, C. A., Kimmel, A. R., 2013, Phosphorylation of chemoattractant receptors regulates chemotaxis, actin reorganization and signal relay, *J. Cell Sci.* **126**, 4614–4626.
- Cai, H., Das, S., Kamimura, Y., Long, Y., Parent, C. A., Devreotes, P. N., 2010, Ras–mediated activation of the TORC2–PKB pathway is critical for chemotaxis, *J. Cell Biol.* **190**, 233–245.
- Caterina, M. J., Devreotes, P. N., Borleis, J., Hereld, D., 1995, Agonist–induced Loss of Ligand Binding Is Correlated with Phosphorylation of cAR1, a G Protein–coupled Chemoattractant Receptor from *Dictyostelium*, *J. Biol. Chem.* **270**, 8667–8672.
- Cha, I., Jeon, T. J., 2011, Dynamic localization of the actin–bundling protein cortexillin I during cell migration, *Mol. Cells* **32**, 281–287.
- Charest, P. G., Shen, Z., Lakoduk, A., Sasaki, A. T., Briggs, S. P., Firtel, R. A., 2010, A Ras signaling complex controls the RasC–TORC2 pathway and directed cell migration, *Dev. Cell* **18**, 737–749.
- Cheepala, S., Hulot, J.–S., Morgan, J. A., Sassi, Y., Zhang, W. Naren, A. P., Schuetz, J. D., 2013, Cyclic nucleotide compartmentalization: contributions of phosphodiesterases and ATP–binding cassette transporters, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 231–253.
- Chen, L., Janetopoulos, C., Huang, Y. E., Iijima, M., Borleis, J., Devreotes, P. N., 2003, Two phases of actin polymerization display different dependencies on PI(3,4,5)P₃ accumulation and have unique roles during chemotaxis, *Mol. Biol. Cell* **14**, 5028–5037.
- Chen, M. Y., Long, Y., Devreotes, P. N., 1997, A novel cytosolic regulator, Pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein–mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in *Dictyostelium*, *Genes. Dev.* **11**, 3218–3231.
- 千田優子, 2015, 『細胞性粘菌の PIP₃/F–アクチン波の細胞外基質依存性』, 修士学位論文, 東京大学大学院総合文化研究科.
- Choi, C.–H., Thomason, P. A., Zaki, M., Insall, R. H., Barber, D. L., 2013, Phosphorylation of actin–related protein 2 (Arp2) is required for normal development and cAMP chemotaxis in *Dictyostelium*, *J. Biol. Chem.* **288**, 2464–2474.

- Chung, C. Y., Potikyan, G., Firtel, R. A., 2001, Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAK α , *Mol. Cell* **7**, 937–947.
- Comer, F. I., Parent, C. A., 2006, Phosphoinositide 3-kinase activity controls the chemoattractant-mediated activation and adaptation of adenylyl cyclase, *Mol. Biol. Cell* **17**, 357–366.
- Cooper, J. A., 1987, Effects of cytochalasin and phalloidin on actin, *J. Cell Biol.* **105**, 1473–1478.
- Cornillon, S., Gebbie, L., Benghezal, M., Nair, P., Keller, S., Wehrle-Haller, B., Charette, S. J., Brückert, F., Letourneur, F., Cosson, P., 2006, An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium* amoebae with integrin β features, *EMBO Rep.* **7** 617–621.
- Das, T., Safferling, K., Rausch, S., Grabe, N., Boehm, H., Spatz, J. P., 2015, A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells, *Nat. Cell Biol.* **17**, 276–287.
- Décavé, E., Rieu, D., Dalous, J., Fache, S., Bréchet, Y., Fourcade, B., Satre, M., Bruckert, F., 2003, Shear flow-induced motility of *Dictyostelium discoideum* cells on solid substrate, *J. Cell Sci.* **116**, 4331–4343.
- Devreotes, P., Derstine, P., Steck, T., 1979, Cyclic 3',5' AMP relay in *Dictyostelium discoideum*. I. A technique to monitor responses to controlled stimuli, *J. Cell Biol.* **80**, 291–299.
- Devreotes, P., Steck, T., 1979, Cyclic 3',5' AMP relay in *Dictyostelium discoideum*. II. Requirements for the initiation and termination of the response, *J. Cell Biol.* **80**, 300–309.
- Dinauer, M. C., McCay, S. A., Devreotes, P. N., 1980a, Cyclic 3',5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* III. The relationship of cAMP synthesis and secretion during the cAMP signaling response, *J. Cell Biol.* **86**, 537–544.
- Dinauer, M. C., Steck, T. L., Devreotes, P. N., 1980b, Cyclic 3',5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* IV. Recovery of the cAMP signaling response after adaptation to cAMP, *J. Cell Biol.* **86**, 545–553.
- Dinauer, M. C., Steck, T. L., Devreotes, P. N., 1980c, Cyclic 3',5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* V. Adaptation of the cAMP signaling response during cAMP stimulation, *J. Cell Biol.* **86**, 554–561.

- Dormann, D., Weijer, G., Parent, C. A., Devreotes, P. N., Weijer, C. J., 2002, Visualizing PI3 kinase-mediated cell-cell signaling during *Dictyostelium* development, *Curr. Biol.* **12**, 1178–1188.
- Elzie, C. A., Colby, J., Sammons, M. A. Janetopoulos, C., 2009, Dynamic localization of G proteins in *Dictyostelium discoideum*, *J. Cell Sci.* **122**, 2597–2603.
- Faix, J., Steinmetz, M., Boves, H., Kammerer, R. A., Lottspeich, F., Mintert, U., Murphy, J., Stock, A., Aebi, U., Gerisch, G., 1996, Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail, *Cell* **86**, 631–642.
- Fischer, M., Haase, I., Simmeth, E., Gerisch, G., Müller-Taubenberger, A., 2004, A brilliant monomeric red fluorescent protein to visualize cytoskeleton dynamics in *Dictyostelium*, *FEBS Lett.* **577**, 227–232.
- Funamoto, S., Meili, R. Lee, S., Parry, L., Firtel, R. A., 2002, Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis, *Cell* **109**, 611–623.
- Futrelle, R. P., Traut, J., Mckee, W. G., 1982, Cell behavior in *Dictyostelium discoideum*: preaggregation response to localized cyclic AMP pulses, *J. Cell Biol.* **92**, 807–821.
- Gaudet, P., Williams, J.G., Fey, P., Chisholm, R. L., 2008, An anatomy ontology to represent biological knowledge in *Dictyostelium discoideum*, *BMC Genomics* **9**.
- Gerisch, G., 1965, Stadienspezifische aggregationsmuster bei *Dictyostelium discoideum*, *Roux. Arch. Dev. Biol.* **156**, 127–144.
- Gerisch, G., Ecke, M., Schroth-Diez, B., Gerwig, S., Engel, U., Maddera, L., Clarke, M., 2009, Self-organizing actin waves as planar phagocytic cup structures, *Cell Adh. Migr.* **3**, 373–382.
- Gerisch, G., Ecke, M., Wischniewski, D., Schroth-Diez, B., 2011, Different modes of state transitions determine pattern in the phosphatidylinositide-actin system, *BMC Cell Biol.* **12**, 42.
- Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A., Wick, U., 1975, Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in differentiating *Dictyostelium* cells, *Nature* **255**, 547–549.
- Gerisch, G., Malchow, D., Roos, W., Wick, U., 1979, Oscillations of cyclic nucleotide concentrations in relation to the excitability of *Dictyostelium* cells, *J. Exp. Biol.* **81**, 33–47.
- Gerisch, G., Wick, U., 1975, Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from *Dictyostelium* cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 364–370.

- Gregor, T., Fujimoto, K., Masaki, N., Sawai, S., 2010, The onset of collective behavior in social amoebae, *Science* **328**, 1021–1025.
- Gross, J. D., Peacey, M. J., Trevan, D. J., 1976, Signal emission and signal propagation during early aggregation in *Dictyostelium discoideum*, *J. Cell Sci.* **22**, 645–656.
- Huang, Y. E., Iijima, M., Parent, C. A., Funamoto, S., Firtel, R. A., Devreotes, P., 2003, Receptor-mediated regulation of PI3Ks confines PI(3,4,5)P₃ to the leading edge of chemotaxing cells, *Mol. Biol. Cell* **14**, 1913–1922.
- Iijima, M., Devreotes, P. A., 2002, Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients, *Cell* **109**, 599–610.
- Inoue, T., Meyer, T., 2008, Synthetic activation of endogenous PI3K and Rac identifies an AND-gate switch for cell polarization and migration, *PLoS ONE* **3**, e3068.
- Insall, R., Müller-Taubenberger, A., Machesky, L., Köhler, J., Simmeth, E., Atkinson, S. J., Weber, I., Gerisch, G. 2001, Dynamics of the *Dictyostelium* Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis, *Cell Motility and the Cytoskeleton* **50**, 115–128.
- Iranfar, N., Fuller, D., Loomis, W. F., 2003, Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum*, *Eucaryotic Cell* **2**, 664–670.
- Iwadate, Y., Yumura, S., 2009, Cyclic stretch of the substratum using a shape-memory alloy induces directional migration in *Dictyostelium* cells, *Biotechniques* **47**, 757–767.
- Janetopoulos, C., Jin, T., Devreotes, P., 2001 Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells, *Science* **291**, 2408–2411.
- Jin, T., Soede, R. D. M., Liu, J., Kimmel, A. R., Devreotes, P. N., Schaap, P., 1998, Temperature-sensitive Gβ mutants discriminate between G protein-dependent and -independent signaling mediated by serpentine receptors, *EMBO J.* **17**, 5076–5084.
- Joslin, E. J., Opresko, L. K., Wells, A., Wiley, H. S., Lauffenburger, D. A., 2007, EGF-receptor-mediated mammary epithelial cell migration is driven by sustained ERK signaling from autocrine stimulation, *J. Cell Sci.* **120**, 3688–3699.

- Kae, H., Kortholt, A., Rehmann, H., Insall, R. H., Haastert, P. J. M. V., Spiegelman, G. B., Weeks, G., 2007, Cyclic AMP signalling in *Dictyostelium*: G-proteins activate separate Ras pathways using specific RasGEFs, *EMBO Rep.* **8**, 477–482.
- Kae, H., Lim, C. J., Spiegelman, G. B., Weeks, G., 2004, Chemoattractant-induced Ras activation during *Dictyostelium* aggregation, *EMBO Rep.* **5**, 602–606.
- Kamimura, Y., Xiong, Y., Iglesias, P. A., Hoeller, O., Bolourani, P., Devreotes, P. N., 2008, PIP₃-independent activation of TorC2 and PKB at the cell's leading edge mediates chemotaxis, *Curr. Biol.* **18**, 1034–1043.
- 神野圭太, 2013, 『A response-rescaling property revealed by single-cell analysis of cAMP signaling response in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*』, 博士学位論文, 東京大学大学院総合文化研究科.
- Kamino, K., Fujimoto, K., Sawai, S., 2011, Collective oscillations in developing cells: Insights from simple systems, *Dev. Growth Differ.* **53**, 503–517.
- Klein, P. S., Sun, T. J., Saxe III, C. L., Kimmel, A. R., Johnson, R. L., Devreotes, P. N., 1988, A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*, *Science* **241**, 1467–1472.
- Kolega, J., 2004, Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1020–1025.
- Kriebel, P. W., Barr, V. A., Parent, C. A., 2003, Adenylyl cyclase localization regulates streaming during chemotaxis, *Cell* **112**, 549–560.
- Kriebel, P. W., Barr, V. A., Rericha, E. C., Zhang, G., Parent, C. A., 2008, Collective cell migration requires vesicular trafficking for chemoattractant delivery at the trailing edge, *J. Cell Biol.* **183**, 949–961.
- Kriebel, P. W., Parent, C. A., 2004, Adenylyl cyclase expression and regulation during the differentiation of *Dictyostelium discoideum*, *IUBMB Life* **56**, 541–546.
- Laub, M. T., Loomis, W. F., 1998, A molecular network that produces spontaneous oscillations in excitable cells of *Dictyostelium*, *Mol. Biol. Cell* **9**, 3521–3532.

- Lee, S., Comer, F. I., Sasaki, A., McLeod, I. X., Duong, Y., Okumura, K., Yates III, J. R., Parent, C. A., Firtel, R. A., 2005, TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in *Dictyostelium*, *Mol. Biol. Cell* **16**, 4572–83.
- Lemieux, M. G., Janzen, D., Hwang, R., Roldan, J., Jarchum, I., Knecht, D. A., 2014, Visualization of the actin cytoskeleton: different F-actin-binding probes tell different stories, *Cytoskeleton* **71**, 157–169.
- Lombardi, M. L., Knecht, D. A., Lee, J., 2008, Mechano-chemical signaling maintains the rapid movement of *Dictyostelium* cells, *Exp. Cell Res.* **314**, 1850–1859.
- Loomis, W. F., Fuller, D., Gutierrez, E., Groisman, A., Rappel, W.-J., 2012, Innate non-specific cell substratum adhesion, *PLoS ONE* **7**, e42033.
- Loovers, H. M., Postma, M., Keizer-Gunnink, I., Huang, Y. E., Devreotes, P. N., Haastert, P. J. M. V., 2006, Distinct roles of PI(3,4,5)P3 during chemoattractant signaling in *Dictyostelium*: a quantitative in vivo analysis by inhibition of PI3-kinase, *Mol. Biol. Cell* **17**, 1503–1513.
- Luo, T., Mohan, K., Iglesias, P. A., Robinson, D. N., 2013, Molecular mechanisms of cellular mechanosensing, *Nat. Mater.* **12**, 1064–1071.
- Maeda, M., Lu, S., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A., Loomis, W. F., 2004, Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA, *Science* **304**, 875–878.
- 前田靖男, 2006, 『パワフル粘菌』, 東北大学出版会.
- Maeda, Y. Gerisch, G., 1977, Vesicle formation in *Dictyostelium discoideum* cells during oscillations of cAMP synthesis and release, *Exp. Cell Res.* **110**, 119–126.
- Masaki, N., Fujimoto, K., Honda – Kitahara, M., Hada, E., Sawai, S., 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.
- Mata, A., Fleischman, A. J., Roy, S., 2006, Fabrication of multi-layer SU-8 microstructures, *J. Micromechanics and MicroEngineering* **16**, 276–284.
- McCann, C. P., Rericha, E. C., Wang, C., Losert, W., Parent, C. A., 2014, *Dictyostelium* cells migrate similarly on surfaces of varying chemical composition, *PLoS ONE* **9**, e87981.

- McRobbie, S. J., Newell, P. C., 1985, Effects of cytochalasin B on cell movements and chemoattractant-elicited actin changes of *Dictyostelium*, *Exp. Cell Res.* **160**, 275–286.
- Meili, R., Ellsworth, C., Lee, S., Reddy, T. B. K., Ma, H., Firtel, R. A., 1999, Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in *Dictyostelium*, *EMBO J.* **18**, 2092–2105.
- Meszáros, P., Hummel, I., Klappe, K., Draghiciu, O., Hoekstra, D., Kok, J. W., 2013, The function of the ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCB1 is not susceptible to actin disruption, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **1828**, 340–351.
- Miranda, E. R., Nam, E. A., Kuspa, A., Shaulsky, G., 2015, The ABC transporter, AbcB3, mediates cAMP export in *D. discoideum* development, *Dev. Biol.* **397**, 203–211.
- Nakajima, A., Ishihara, S., Imoto, D., Sawai, S., 2014, Rectified directional sensing in long-range cell migration, *Nat. Commun.* **5**, 5367.
- Nellen, W., Silan, C., Firtel, R. A., 1984, DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion, *Mol. Cell Biol.* **4** 2890–2898.
- Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., Lohse, M. J., 2004, Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation, *J. Biol. Chem.* **279**, 37215–37218.
- Owens, N. F., Gingell, D., Rutter, P. R., 1987, Inhibition of cell adhesion by a synthetic polymer adsorbed to glass shown under defined hydrodynamic stress, *J. Cell Sci.* **87**, 667–675.
- Parent, C. A., Blacklock, B. J., Froehlich, W. M., Murphy D. B., Devreotes, P. N., 1998, G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells, *Cell* **95**, 81–91.
- Pathak, A., Kumar, S., 2012, Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **109**, 10334–10339.
- Pitt, G. S., Milona, N., Borleis, J., Lin, K. C., Reed, R. R., Devreotes, P. N., 1992, Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development, *Cell* **69**, 305–315.
- Pramanik, K., Iijima, M., Iwadate, Y., Yumura, S., 2009, PTEN is a mechanosensing signal transducer for myosin II localization in *Dictyostelium* cells, *Genes Cells* **14**, 821–834.

- Pruitt, B. L., Dunn, A. R., Weis, W. I., Nelson, W. J., 2014, Mechano–transduction: from molecules to tissues, *PLoS Biol.* **12**, e1001996.
- Reffay, M., Parrini, M. C., Cochet–Escartin, O., Ladoux, B., Buguin, A., Coscoy, S., Amblard, F., Camonis, J., Silberzan, P., 2014, Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells, *Nat. Cell Biol.* **16**, 217–223.
- Ren, Y., Effler, J. C., Norstrom, M., Luo, T., Firtel, R. A., Iglesias, P. A., Rock, R. S., Robinson, D. N., 2009, Mechanosensing through cooperative interactions between myosin II and the actin crosslinker cortexillin I, *Curr. Biol.* **19**, 1421–1428.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., Horwitz, A. R., 2003, Cell migration: integrating signals from front to back, *Science* **302**, 1704–1709.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich–Soldner, R., 2008, Lifeact: a versatile marker to visualize F–actin, *Nat. Methods* **5**, 605–607.
- Ritchie, A. V., van Es, S., Fouquet, C., Schaap, P., 2008, From drought sensing to developmental control: evolution of cyclic AMP signaling in social amoebas, *Mol. Biol. Evol.* **25**, 2109–2118.
- Ryves, W. J., Harwood, A. J., 2006, Use of a penetratin–linked peptide in *Dictyostelium*, *Mol. Biotechnol.* **33**, 123–132.
- Saran, S., Meima, M. E., Alvarez–Curto, E., Weening, K. E., Rozen, D. E., Schaap, P., 2002, cAMP signaling in *Dictyostelium*. Complexity of cAMP synthesis, degradation and detection, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 793–802.
- Sasaki, A. T., Chun, C., Takeda, K., Firtel, R. A., 2004, Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement, *J. Cell Biol.* **167**, 505–518.
- Sasaki, A. T., Firtel, R.A., 2006, Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR, *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 873–879.
- Sasaki, A. T., Janteopoulos, C., Lee, S., Charest, P. G., Takeda, K., Sundheimer, L. W., Meili, R., Devreotes, P. N., Firtel, R. A., 2007, G protein–independent Ras/PI3K/F–actin circuit regulates basic cell motility, *J. Cell Biol.* **178**, 185–191.

- Sawai, S., Thomason, P. A., Cox, E. C., 2005, An autoregulatory circuit for long-range self-organization in *Dictyostelium* cell populations, *Nature* **433**, 323–326.
- Schaap, P., Winckler, T., Nelson, M., Alvarez-Curto, E., Elgie, B., Hagiwara, H., Cavender, J., Milano-Curto, A., Rozen, D. E., Dingermann, T., Mutzel, R., Baldauf, S. L., 2006, Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas, *Science* **314**, 661–663.
- Schäfer, E., Tarantola, M., Polo, E., Westendorf, C., Oikawa, N., Bodenschatz, E., Geil, B., Janshoff, A., 2013, Chemotaxis of *Dictyostelium discoideum*: collective oscillation of cellular contacts, *PLoS ONE* **8**, e54172.
- Schroth-Diez, B., Gerwig, S., Ecke, M., Hegerl, R., Diez, S., Gerisch, G., 2009, Propagating waves separate two states of actin organization in living cells, *HFSP J.* **3**, 412–427.
- Segall, J. E., Kuspa, A., Shaulsky, G., Ecke, M., Maeda, M., Gaskins, C., Firtel, R. A., Loomis, W. L., 1995, A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*, *J. Cell Biol.* **128**, 405–413.
- Sgro, A. E., Schwab, D. J., Noorbakhsh, J., Mestler, T., Mehta, P., Gregor, T., 2015, From intracellular signaling to population oscillations: bridging size- and time-scales in collective behavior, *Mol. Syst. Biol.* **11**, 779.
- Shu, S., Liua, X., Kriebel, P. W., Danielsc, M. P., Korn, E. D., 2012, Actin cross-linking proteins cortexillin I and II are required for cAMP signaling during *Dictyostelium* chemotaxis and development, *Mol. Biol. Cell* **23**, 390–400.
- Siegert, F., Weijer, C., 1989, Digital image processing of optical density wave propagation in *Dictyostelium discoideum* and analysis of the effects of caffeine and ammonia, *J. Cell Sci.* **93**, 325–335.
- Siegert, F., Weijer, C. J., 1992, Three-dimensional scroll waves organize *Dictyostelium* slugs, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 6433–6437.
- Song, L., Nadkarni, S. M., Bödeker, H. U., Beta, C., Bae, A., Franck, C., Rappel, W.-J., Loomis, W. F., Bodenschatz, E., 2006, *Dictyostelium discoideum* chemotaxis: threshold for directed motion, *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 981–989.

- Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., Kashman, Y., 1989, Latrunculins—novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D, *Cell Motil. Cytoskeleton* **13**, 127–144.
- Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y., Groweiss, A., 1983, Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells, *Science* **219**, 493–495.
- Stepanovic, V., Wessels, D., Daniels, K., Loomis, W. F., Soll, D. R., 2005, Intracellular role of adenylyl cyclase in regulation of lateral pseudopod formation during *Dictyostelium* chemotaxis, *Eucaryotic Cell* **4**, 775–786.
- Stroock, A. D., Dertinger, S. K. W., Ajdari, A., Mezi, I., Stone, H. A., Whitesides, G. M., 2002, Chaotic mixer for microchannels, *Science* **295**, 647–651.
- Swaney, K. F., Huang, C–H, Devreotes, P. N., 2010, Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity, *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 265–289.
- Takeda, K., Shao, D., Adler, M., Charest, P. G., Loomis, W. F., Levine, H, Groisman, A., Rappel, W.–J., Firtel R. A., 2012, Incoherent feedforward control governs adaptation of activated ras in a eukaryotic chemotaxis pathway, *Sci. Signal.* **5**, ra2.
- Tang, M., Iijima, M., Kamimura, Y., Chen, L., Long, Y., Devreotes, P., 2011, Disruption of PKB signaling restores polarity to cells lacking tumor suppressor PTEN, *Mol. Biol. Cell* **22**, 437–447.
- Taniguchi, D., Ishihara, S., Oonuki, T., Honda–Kitahara, M., Kaneko, K., Sawai, S., 2013, Phase geometries of two–dimensional excitable waves govern self–organized morphodynamics of amoeboid cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **110**, 5016–5021.
- Theibert, A., Devreotes, P. N., 1983, Cyclic 3', 5'–AMP relay in *Dictyostelium discoideum*: adaptation is independent of activation of adenylate cyclase, *J. Cell Biol.* **97**, 173–177.
- Thomason, P. A., Traynor, D., Cavet, G., Chang, W.–T., Harwood, A. J., Kay, R. R., 1998, An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*, *EMBO J.* **17**, 2838–2845.
- Thompson, C. R. L., Reichelt, S., Kay, R. R., 2004, A demonstration of pattern formation without positional information in *Dictyostelium*, *Dev. Growth Differ.* **46**, 363–369.

- Tomchik, K. J., Devreotes, P. N., 1981, Adenosine 3',5'-monophosphate waves in *Dictyostelium discoideum*: a demonstration by isotope dilution—fluorography, *Science* **212**, 443–446.
- Torrence, C., Compo, G. P., 1998, A practical guide to wavelet analysis, *Bulletin of the American Meteorological Society* **79**, 61–78.
- Tsujioka, M., Yoshida, K., Nagasaki, A., Yonemura, S., Müller-Taubenberger, A., Uyeda, T. Q. P., 2008, Overlapping functions of the two talin homologues in *Dictyostelium*, *Eukaryotic Cell* **7**, 906–916.
- Tsujioka, M., Yumura S., Kei Inouye, K., Patel, H., Ueda, M., Yonemura, S., 2012, Talin couples the actomyosin cortex to the plasma membrane during rear retraction and cytokinesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **109**, 12992–12997.
- Tzvetkova–Chevolleau, T., Yoxall, E., Fuard, D., Bruckert, F., Schiavone, P., Weidenhaupt, M., 2009, Microscale adhesion patterns for the precise localization of amoeba, *Microelectronic Engineering* **86**, 1485–1487.
- 漆原秀子, 2006, 『細胞性粘菌のサバイバル — 環境ストレスへの巧みな応答』, サイエンス社.
- Vinet, A. F., Fiedlera, T., Studera, V., Froquetb, R., Dardelb, A., Cosson, P., Pieters, J., 2014, Initiation of multicellular differentiation in *Dictyostelium discoideum* is regulated by coronin A, *Mol. Biol. Cell* **25**, 688–701.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., Brown, R. F., 1994, A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), *J. Biol. Chem.* **269**, 5241–5248.
- Wang, C., Chowdhury, S., Driscoll, M., Parent, C. A., Gupta, S. K. Losert, W., 2014, The interplay of cell–cell and cell–substrate adhesion in collective cell migration, *J. Royal Society Interface* **11**, 20140684.
- Wang, C. J., Bergmann, A., Lin, B., Kim, K., Levchenko, A., 2012, Diverse sensitivity thresholds in dynamic signaling responses by social amoebae, *Sci. Signal.* **5**, ra17.
- Wessels, D. J., Zhang, H., Reynolds, J., Daniels, K., Heid, P., Lu, S., Kuspa, A., Shaulsky, G., Loomis, W. F., Soll, D. R., 2000, The internal phosphodiesterase RegA is essential for the suppression of lateral pseudopods during *Dictyostelium* chemotaxis, *Mol. Biol. Cell* **11**, 2803–2820.
- Whitesides, G. M., Stroock, A. D., 2001, Flexible methods for microfluidics, *Phys. Today* **54**, 42–48.

- Xiao, Z., Yao, Y., Long, Y., Devreotes, P., 1999, Desensitization of G-protein-coupled receptors. agonist-induced phosphorylation of the chemoattractant receptor cAR1 lowers its intrinsic affinity for cAMP, *J. Biol. Chem.* **274**, 1440–1448.
- Xu, X., Meier-Schellersheim, M., Jiao, X., Nelson, L.E., Jin, T., 2005, Quantitative imaging of single live cells reveals spatiotemporal dynamics of multistep signaling events of chemoattractant gradient sensing in *Dictyostelium*, *Mol. Biol. Cell* **16**, 676–688.
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I. Bubb, M. R., 2000, Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A, *J. Biol. Chem.* **275**, 28120–28127.
- Yonemura, S., 2011, A mechanism of mechanotransduction at the cell-cell interface: Emergence of α -catenin as the center of a force-balancing mechanism for morphogenesis in multicellular organisms, *Bioessays* **33**, 732–736.
- Zhang, H., Heid, P. J., Wessels, D., Daniels, K. J., Pham, T., Loomis, W. F., Soll, D. R., 2003, Constitutively active protein kinase A disrupts motility and chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*, *Eukaryotic Cell* **2**, 62–75.
- Zhang, S., Charest, P. G., Firtel, R. A., 2008, Spatiotemporal regulation of Ras activity provides directional sensing, *Curr. Biol.* **18**, 1587–1593.