

論文の内容の要旨

論文題目

A response-rescaling property revealed by single-cell analysis of cAMP signaling response in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*

(社会性アメーバ *Dictyostelium discoideum* が示す cAMP 応答のリスケール
ング特性の一細胞解析)

氏名： 神野 圭太

多細胞生物の発生において、しばしば生理機能を担うシグナル分子の時空的・空間的なパターンが形成される。これらのパターンは、生命が不確定性の高い環境下で発生を完遂させるために、様々な外的要因に対し頑健であることが特徴である。社会性アメーバと呼ばれる細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* (以下、粘菌) は、飢餓状態になると、各細胞が独立に振る舞う単細胞期から細胞集団が協同的に振る舞う多細胞期へと遷移する。最終的に子実体を構築するこの発生の最初期、多数の細胞が周期的に cAMP を合成・分泌する様子が観察される。cAMP 振動と呼ばれるこの現象は、細胞の分化を誘導するだけでなく、後の細胞集合の際に必要な空間パターンを形成する基礎となり、発生の成否を決定する重要な過程である。興味深いことにこの cAMP 振動は、非常に広い範囲の細胞密度 (約 10^4 cells/cm² から優に二桁以上) で観察される。すなわち、cAMP 振動は細胞密度の変化に対して頑健である。

cAMP 振動は、細胞レベルの cAMP 応答と呼ばれる性質に起因する。この応答は幾多の分子過程から成り、細胞外の cAMP が細胞膜上の受容体と結合すると、このシグナルが細胞内で生じる化学反応のカスケード（シグナル伝達系）を活性化し、cAMP が合成・分泌される。この過程は、適応的である。すなわち、入力刺激の時間変化（細胞外 cAMP の濃度上昇）に対してのみ一過的に出力（細胞内 cAMP の合成）し、時間変化しない定常的な入力には出力が抑制される。適応的な応答は、バクテリアの走化性応答や視覚系・聴覚系などの感覚系で広く観察され、これによって生物は、環境中の物理的・化学的刺激の時間変化を高い感度で検出している。

非線形科学の観点から、このような性質をもった細胞が多数集まったとき、細胞内外の cAMP 濃度が振動する理由が説明された。まず、細胞外の cAMP が細胞内の cAMP の合成を促しこれが細胞外に分泌されるという正のフィードバックループにより、静的な状態が不安定化する。一方、適応的応答を可能にする負の（抑制的な）制御機構が細胞内に存在するために、増加した細胞内外の cAMP 濃度はある点を境に減少に転じる。これら二つの要素を取り入れた数理モデルによって、cAMP 振動の多くの性質が説明されてきた。しかしながら、本論文の第 1 章で指摘するように、このモデルは非常に限られた細胞密度領域でしか cAMP 振動を生じ得ない。パターン（ここでは振動）とその頑健性が生命現象の特徴であるならば、cAMP 振動の性質は未だ十分には把握できていない。

私は、この原因が cAMP 応答に関する情報が不足していることにあるのではないかと考えた。実際、これまでの cAMP 応答に関する知見は、多数の細胞の出力の平均値を、低い時間分解能で観察して得られたものである。粘菌のように各細胞が強く相互作用する場合、このような実験は細胞外環境の制御が不十分になりやすい。また、細胞集団でシグナルを平均化することにより個体レベルの情報が失われる。そこでまず私は、細胞外環境を十分に制御しながら一細胞レベルの動態を観察し、その性質を再評価することを目指した。

第 2 章において、これを達成するために本研究で用いた実験系を解説した。ここで用いた細胞は形質転換されており、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の原理による cAMP センサーを細胞内に発現する。これによって、細胞内 cAMP 濃度の変化を、顕微画像における細胞の蛍光特性の変化（FRET シグナル）として一細胞レベルで観察することができる。さらに、cAMP センサーの発現量の個体差に由来する観測誤差を除去するために、3 フィルターセット法と呼ばれる FRET シグナルの補正を行った。また、細胞外環境は緩衝液を灌流することによって制御した。灌流する緩衝液の cAMP 濃度を変化させることで、細胞に様々な入力刺激を与えることができる。

このような条件下でタイムラプス撮影を行い、cAMP 応答の入出力関係を一細胞レベルで特徴付けた。この結果を第 3 章に述べた。適応的な応答は、一般に前刺激濃度から後刺激濃度へと階段状に変化する入力刺激によって、その応答特性が特徴付けられる。しかしながらこれ

までの研究では、前刺激濃度がゼロの環境でのみ cAMP 応答が観察されてきた。そこで私は、細胞を前刺激濃度が非ゼロの環境に置き、相対的な濃度変化に対する応答を観察した。その結果、cAMP 応答が倍変化検出 (fold-change detection, FCD) 型の応答であることが示された。すなわち、入力刺激を I_0 から I_1 に階段状に変化させると、出力は、入力の絶対値 (I_0 , I_1 や $I_1 - I_0$) ではなく、その変化の比 (I_1/I_0) に依存する。真核生物系における FCD 型の応答は、いくつかの間接的な実験結果からその普遍性が示唆されているが、本研究は、これを直接かつ一細胞レベルで観察した初めての例である。さらに、一細胞レベルで FCD を観察できる利点を生かし、その性質の個体差の大小を評価した。その結果、cAMP 応答の振幅に比べ FCD 型の応答性は個体差の少ない、頑健な性質であることが明らかになった。すなわち、cAMP 応答における FCD は、細胞内の化学反応パラメータの詳細に依らない性質である。

それではなぜ、粘菌は FCD ような性質を持つのだろうか。FCD 型の応答は、そうでない場合に比べて細胞に何らかの利点を与えるのだろうか。粘菌の発生における cAMP の役割を考えると、FCD が、細胞間シグナリングを行う上で機能的な性質である可能性が考えられる。そこで私は、第 4 章において、FCD を示す細胞が細胞間シグナリングを行った場合、系全体にどのような性質が生じ得るかを考察した。FCD は、方程式系が持つある変数変換に対する不変性として数理的に表現できる。これを用いれば、灌流系で FCD を示す細胞が相互作用する様子は、簡潔な連立微分方程式として表現できる。これを解析した結果、解の定性的な性質が細胞密度の大小に依存しないことが明らかになった。この結果は、FCD を示す細胞が相互作用した結果、cAMP 振動の細胞密度の変化に対する頑健性が創発的に生じる可能性を強く示唆している。

そこで私は、第 5 章においてこの可能性を実験的に検証した。この数理モデルにおいて、実験的に検証されるべき性質は次の 2 点である。1. cAMP 振動において、細胞内 cAMP 濃度の動態は細胞密度に依存しない。2. 一方、細胞外 cAMP 濃度の絶対値は、細胞密度とともに上昇する。以上を検証するために、私は再び灌流系を用いて実験を行った。ここでは、高い細胞密度下で細胞集団の振る舞いを観察し、cAMP 振動の性質を直接解析した。この結果、モデルから予言される上記すべての性質が、現実の系においても成立していることが確認された。

FCD の機能的側面が明らかになった一方で、cAMP 応答の動態を形成する分子メカニズムに関しては、近年の分子生物学的データの蓄積にもかかわらず、未だその多くが不明である。一般に、系の入出力関係を特徴付けて、そのあり得る内部構造を推定・限定していく手法は有効である。しかしながら、cAMP 応答のシグナル伝達系は非常に複雑 (関与する分子種は百のオーダーにのぼる) であるために、細胞内 cAMP の応答特性を特徴付けたとしても、現段階ではその内部構造を限定することは難しい。そこで私は、第 6 章に述べるように、cAMP 合成酵素 アデニル酸シクラーゼの上流に位置するフォスファチジルイノシトール 3 リン酸 (以下、PIP₃) の合成の動態 (PIP₃ 応答) を、一細胞レベルで特徴付けた。その動態は、PIP₃ に特異的に結合

する PH ドメインと蛍光タンパク質が結合したプローブを細胞内で発現させることで観察できる。私は cAMP 応答と同様、相対的な細胞外 cAMP 濃度の変化に対する PIP₃ 応答を観察し、これが FCD に従うことを明らかにした。この結果は、cAMP 応答における FCD が、その上流の PIP₃ 応答における FCD に由来している可能性を示唆するのみならず、cAMP 合成系に比べはるかに小規模である PIP₃ 合成の経路について、その内部構造を強く限定する。

これまで私は、灌流系という理想化された環境で細胞の動態を観察し、FCD と細胞密度に対する頑健性の関係を論じてきた。ここで得られた知見は、果たしてどの程度一般性を持ち得るのだろうか。例えば実際の発生では、細胞外 cAMP は酵素によって分解され、灌流による希釈とは異なる制御を受ける。さらに、細胞間シグナリングは原核生物から真核生物まで広く見られる現象であり、様々な生物種がそれぞれに異なるシグナリング様式を用いている。そこで私は、第 7 章において、FCD 型の応答が細胞密度変化に対する頑健性を保証する条件を考察した。その結果、灌流系内の粘菌とは大きく異なる方法でシグナル分子が分泌・分解される場合でも、細胞が FCD を示す限り、広い条件で細胞密度変化に対する頑健性が生じ得ることが明らかになった。これらの結果は、本研究で見いだされた粘菌の細胞間シグナリングに内在するロジックが、粘菌の実際の発生のみならず他の生物種でも汎用的に用いられている可能性を示唆している。