

研究課題別評価

1. 研究課題名 : 1分子計測による細胞性粘菌の走化性応答の解析

2. 研究者氏名 : 上田昌宏

3. 研究の狙い :

細胞が化学物質の空間的濃度勾配を検出して、一定の方向へと移動する現象は、走化性 (chemotaxis) と呼ばれている。走化性は免疫応答、神経回路形成、形態形成など様々な生物学的過程を支える基本的な細胞機能である。走化性情報伝達システムの機能の一つは、化学物質の濃度勾配を的確に認識することであるが、その仕組みについてはよくわかっていない。本研究では、生きた細胞内において情報伝達分子 1つ1つの反応をイメージングする細胞内 1分子イメージング法を開発し、情報伝達分子が細胞内のどこで、いつ、どのように機能しているのかを調べた。具体的には、走化性研究のモデル生物として知られる細胞性粘菌 *Dictyostelium* の走化性受容体を研究対象とし、その 1分子反応を生きた細胞内で捉えることを目指した。

4. 研究結果 :

細胞性粘菌 *Dictyostelium* は、化学物質サイクリック AMP (cAMP) に対して走化性を示す。cAMP センサーは三量体 G 蛋白質共役型の受容体である。cAMP 受容体 1つ1つの振る舞いを調べるために、受容体への信号入力過程 (cAMP 結合) と受容体からの信号出力過程 (三量体 G 蛋白質の活性化) を 1分子レベルでイメージングできる実験系を開発した。

[1] 入力信号 (cAMP 結合) の 1分子イメージング

蛍光性 cAMP アナログ (Cy3-cAMP) を有機合成し、Cy3-cAMP が細胞上の cAMP 受容体に結合する様子を 1分子イメージングすることに成功した。これにより cAMP が、細胞のどこに、いつ、何個、何秒間結合しているのか、つまり細胞が受け取る入力信号のありのままの姿を捉えることができるようになった。

Cy3-cAMP 1つ1つの結合時間から、cAMP 受容体のリガント解離速度を求めることができる。リガント解離速度は受容体の反応状態を表わすパラメーターである。こうした解析から、受容体の反応状態が細胞上の場所によって異なっていることが分かった。細胞の前側にある受容体は、環境からの情報を細胞内に効率良く伝達するが、後ろ側では情報伝達の効率が低く、細胞全体としては細胞の前方部から優先的に情報が伝達されていることが示唆された (Ueda et al. 2001)。

[2] 出力信号 (三量体 G 蛋白質の活性化) の 1分子イメージング

三量体 G 蛋白質が活性化されるとき、そのサブユニットに結合した GDP が GTP と交換される。当初の研究計画では、この GDP/GTP 交換反応を 1分子イメージングすることを目指した。しかしながら、この方法では十分な成果が得られなかった。ところが、この実験方法の開発過程で、三量体 G 蛋白質の振る舞いとして興味深い現象を発見した。

サブユニット (或いは サブユニット) と GFP (緑色蛍光蛋白質) の融合遺伝子を用いて粘菌細胞

を形質転換し、GFP の 1 分子イメージングにより、サブユニット (或いは サブユニット) の挙動を観察することに成功した。結果、両サブユニットは細胞膜と細胞質の間を活発に行き来すること、さらに、その速度が cAMP 刺激 (受容体の活性化) に伴って変化することが分かった。また、走化性を行なっている細胞では、その速度が細胞上の場所によって異なっていることが分かった。細胞の前側にある G 蛋白質と後ろ側にある G 蛋白質とではその振るまいが異なり、細胞の前側では受容体による活性化が効率よく行なわれていることが示唆された。この結果は、Cy3-cAMP による信号入力過程の解析とよく一致する。

5. 自己評価 :

当初の目標は、[1] 入力信号の可視化、[2] 出力信号の可視化、さらに [3] 入力信号と出力信号の同時計測であった。[1] についてはほぼ当初の計画通り、[2] については計画通りには進まなかったが、新たな現象の発見につながった。これらの研究は、走化性情報伝達研究だけでなく細胞内情報伝達研究一般に対しても貢献できたと考えている。[3] についてはようやく研究を開始することができ、今後の進展を見守っていただければありがたい。

細胞の中で生体分子を 1 分子イメージングする研究は 1998 年に始まり (最初の報告は 2000 年)、私自身もその初期のころから参加してきた。本研究も、大きくはこうした研究の流れの中に位置付けられ、細胞内 1 分子研究の先導的役割を果たしてきていると思う。本研究を通して、黎明期にある細胞内 1 分子研究に携わったことは私にとって非常に幸運であったし、また、今後の発展に対する責任も感じている。さきがけ研究はここで終えるものの、本研究で得られた成果を基にして、さらに研究を続けたい。

6. 研究総括の見解 :

個人研究としてきわめて精力的に研究を遂行した。黎明期にある生細胞内での分子の 1 分子の可視化と計測の技術開発研究で先導的な役割を果たしてきた。出力信号として GDP/GTP 交換反応の 1 分子イメージングには成功しなかったが、GFP-G タンパク質サブユニットの挙動を捉えることにより、新たな現象を発見しており、今後の大きな目標でもある入力信号と出力信号の同時計測の完成を大いに期待したい。いずれにせよ、本研究はさきがけ研究の好例として高く評価できる。

7. 主な論文等

1. Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P. N. & Yanagida, T. (2001). Single molecule analysis of chemotactic signaling in Dictyostelium cells. *Science* 294 :864-867.
2. 上田昌宏・石井由晴・柳田敏雄 (2002) 生体ナノ分子機械の分子メカニズム 応用物理 第 71 巻、pp1457-1466