The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Construction of measurement system and quantitative analysis for electric signal-induced cellular response
Author(s)	佐藤, 雅之
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/448
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【20】

氏　　名	佐　藤　雅　之（さとう　まさゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２２５１７　号
学位授与年月日	平成 20 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学　位　論　文　名	Construction of measurement system and quantitative analysis for electric signal-induced cellular response **（電気シグナルで誘導される細胞応答の測定システムの構築と定量的解析）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　柳田　敏雄 （副査） 教　授　濱田　博司　　教　授　岡村　康司　　教　授　山本　亘彦

論　文　内　容　の　要　旨

外部刺激に対する細胞の応答には、集団平均では見えてこない個々の細胞ごとのばらつきが存在する。これは細胞の応答が単に外部刺激の影響を受けるだけでなく、細胞内情報伝達ネットワークの状態に依存しているためであると考えられる。そこで、このような細胞内情報処理過程を研究するためには、細胞内情報伝達ネットワークの状態をモニターしながら、高精度に制御された入力刺激に対する細胞の応答を一細胞ごとに定量的に計測することが必要となる。入力の精度が高ければ高いほど、細胞内情報処理システムの状態を反映した応答を定量的に計測することができるため、入力刺激の厳密な制御は細胞内情報伝達の仕組みを調べる上で重要である。こうした高精度の入力刺激の制御が容易な手法として、電気刺激の利用が考えられる。実際、様々な細胞は電位勾配を認識して方向性のある運動を示す走電性 (electrotaxis, galvanotaxis)と呼ばれる性質を持つ。そこで、制御された入力刺激として電場を用い、応答として細胞運動を計測することで、上記要請に適う系を構築可能である。本研究は高速かつ低ノイズで電位勾配を発生させることができる実験系を開発し、走電性応答における入出力関係を明らかにした。また、このような入出力関係を実現するメカニズムを明らかにするために、走電性応答に関与している細胞内情報伝達経路を同定した。

走化性研究のモデル生物である細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*は直流電場下で陰極側へ移動運動する。細胞に与える電位勾配を大きくするにつれて、陰極側へ向かう移動の効率が高くなった。そこで電位勾配（入力）と走電性効率（出力）の関係を明らかにするために、細胞の陰極側への移動運動を陰極方向への平均変位速度（Mean Cathodal Displacement Speed、MCSと呼ぶ）により、定量化した。その結果、MCSは電位勾配の大きさE に対してシグモイダルに変化し、その入出力関係は以下の式で記述できることがわかった。

$$MCS = V_{\max}\left\{\frac{E^2}{E^2 + K_E^2}\right\}$$

ここで、V_{max}は陰極方向への最大平均変位速度である。K_EはMCSが50%となる電位勾配であり、細胞の電場感受性の指標となる。また、走電性効率は電位勾配の二乗に影響を受けることがわかった。様々な実験条件下における走電性効率は、この電場感受性K_Eを用いることで議論できる。一例として、細胞性粘菌の走化性誘引物質として働くcAMPの効果を調べた。細胞外液にcAMPを加えると走化性経路の細胞内情報伝達ネットワークが活性化されるが、このとき走電性効率が高くなることが観察された。上式から、cAMP存在下では電場感受性K_Eは約1.3倍高くなり、細胞がより低い電位勾配を認識できるようになることを示している。これは走化性経路の活性化が何からの方法で走電性効率の上昇に寄与していることを示唆している。このように、細胞の走電性応答における入出力関係は上式に従う。

次に、走電性応答の入出力関係を実現している細胞内情報伝達経路を同定することを試みた。その結果、阻害剤と変異体株を用いた実験から、走化性経路として知られるグアニル酸シクラーゼとPI3キナーゼ依存性経路が走電性応答における細胞内情報伝達経路であることを見出した。PI3キナーゼの活性が抑制されたとき、運動性に大きな変化は見られなかったが、電場方向のセンシング効率が著しく低下した。次に、グアニル酸シクラーゼ依存性経路の分子群をノックアウトしたところ、同様に走電性効率が低下した。さらに詳細な解析から、グアニル酸シクラーゼの酵素活性産物であるcGMPが走電性応答における運動方向決定に重要であることがわかった。PI3キナーゼとcGMP依存性経路の活性を同時に抑制したところ、走電性応答の運動方向が陰極から陽極側へと反転した。これらの結果はPI3キナーゼとcGMP依存性経路が走電性応答の運動方向を決定する因子であることを示している。
細胞内情報伝達経路の構成要素であるタンパク質分子は熱ゆらぎや発現量の少数性からくる数ゆらぎなどによってたえずゆらぎに晒されている。しかしながら、細胞は安定にその機能を実現している。したがって、細胞内情報伝達経路は何らかの仕組みでゆらぎを抑制もしくは利用している可能性がある。本研究で得られた結果をもとに、今後は走電性情報伝達分子のダイナミクスをモニターしながら、外部から積極的に変調した入力を加えることで、細胞内情報処理の仕組みを明らかにしたい。

論文審査の結果の要旨

細胞は化学物質、光、重力、電気などの外部刺激に対して応答し、特定方向への移動運動を示す（走性応答）ことが知られている。申請者の佐藤君は外部刺激が細胞内でどのように処理されているか解明することを目的として、操作性の高い電気シグナルに対する走性応答（走電性）に注目し、走電性応答の入出力関係の定量化、そして走電性を担う細胞内情報伝達経路の同定を行った。細胞性粘菌における走電性応答を定量的に解析した結果、入出力関係はミカエリス・メンテン型の単純な現象論的方程式で記述できることがわかった。また、阻害剤や変異体を用いた実験からグアニル酸シクラーゼとイノシトールリン脂質依存性経路が細胞性粘菌の走電性情報伝達経路の実体であり、陰極方向への走電性応答に必須であることを発見した。これらの新しい知見は、広く細胞の走性応答の定量化や運動方向決定メカニズムに適用できる可能性がある。これまでの研究業績と本審査から総合的に判断した結果、申請者の佐藤君は学位（理学）に値するものと認める。