

平成 21 年 8 月 15 日
筑 波 大 学

細胞の走化性運動を制御する物質を発見

ー粘菌の分化誘導因子が走化性運動を正・負に制御するー

このたび、国立大学法人群馬大学（高田邦昭学長）生体調節研究所久保原禪准教授と筑波大学（山田信博学長）大学院生命環境科学研究科桑山秀一講師の研究グループは、細胞性粘菌の走化性運動を正・負に制御する物質を発見しました。

走化性運動とは、ある特定の物質に向かって（あるいは逆向きに）細胞が効率よく移動する現象で、下等生物から高等生物に至る様々な生物種において認められる重要な細胞機能です。走化性運動によって、たとえば、効率良くエサや配偶者を見つける生物や、毒物や敵から効率良く逃げる生物もいます。また、私達の体の免疫細胞は走化性運動によって「侵入者」を追尾し、撃退します。現在、世界中の研究者がこの走化性運動の仕組みを研究しています。

細胞性粘菌類（以下「粘菌」）は、カビに似た子実体（柄と孢子から成る）を形成する土壌微生物です（しかし、粘菌はカビとは異なる独自の生物群です）。孢子から発芽した粘菌アメーバ（この時点では、単細胞生物）は、周囲のバクテリアを食べて増殖します。エサがなくなると、沢山の粘菌アメーバが集合して多細胞体を作り（cAMP という物質に対する走化性運動によって効率良く集まります）、最終的に子実体を形成します。このように、粘菌の生活史は非常に単純で、細胞の取り扱いが簡単なことから、粘菌は細胞生物学・発生学のモデル生物として、走化性運動の仕組みの解明にも利用されています。

粘菌の「走化性制御物質」であることが判明した DIF-1 と DIF-2 という物質は、もともとは粘菌の柄細胞分化誘導因子として発見された低分子化合物で、「分化誘導」以外の生理機能は知られていませんでした。上記のように、粘菌の細胞（アメーバ）は cAMP に向かって走化性運動を示しますが、今回「DIF-1 存在下では走化性運動が抑制され、DIF-2 存在下では逆に走化性運動は促進されること」が明らかとなりました。この DIF-1, DIF-2 の新しい機能は、細胞分化誘導とは異なる機序によること、さらには、DIF-1 と DIF-2 が細胞内の cGMP

濃度を調節することによって走化性運動を制御していることも示されました。「走化性運動を正・負に制御する天然物質（かつ分化誘導因子）の発見は、おそらく世界初」ということです。

久保原准教授は「DIF-1 と DIF-2 は非常に良く似た構造の分化誘導因子でありながら、走化性に対しては逆の作用（促進と阻害）をもっている。今後、粘菌を使ってこのような現象の生理的な意義の研究や DIFs の作用機序の解明をしたい」、また「DIF 様化合物は、哺乳類細胞にも様々な薬理作用を示すことがわかっており、DIF 様因子が哺乳類細胞の走化性運動・細胞運動にも影響する可能性がある。今回の結果を参考に、たとえばヒトの免疫細胞の走化性運動を制御する薬剤や、がん細胞の転移を阻止する薬剤を開発できるかもしれない」としています。

今回の成果は、米国オンライン科学誌「PLoS ONE : プロスワン」（米国西部時間 8 月 14 日）に掲載されました。

発表者

筑波大学大学院 生命環境科学研究科 桑山秀一

群馬大学生体調節研究所 遺伝子情報分野 久保原禪

研究の詳細の解説

<研究の背景>

(背景1)

走化性運動「英語で **chemotaxis**」は、効率的に目的の方向に向かって（走化性誘導因子の濃度勾配を感知しながら）進む運動であり、下等生物から高等生物に至るまで、多くの生物種の細胞が有する基本機能の1つである。走化性運動は、我々哺乳類の発生過程における胚形成、白血球の外敵追尾、傷の治癒、ある種の炎症反応などにも関与している。

したがって、この走化性運動のメカニズムを解明し、さらに走化性運動を調節する内在性因子や人工的化合物を得ることで、走化性運動が関与する様々な現象を人為的にコントロールできることが期待される。すなわち、白血球の運動を調節することによって免疫系をコントロールする薬剤や、炎症反応をコントロールする薬剤を得ることが期待できる。また、走化性運動の阻害剤によって、がん細胞の浸潤や転移を抑制することができるかもしれない。

しかしながら、現在、走化性運動メカニズムの詳細は不明であり、また、走化性運動を人為的にコントロールできる薬剤の開発は進んでいない。

(背景2：細胞性粘菌=薬剤資源&モデル生物)

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* (学名) (和名「キイロタマホコリカビ」：以後、粘菌) は、森の落ち葉の下などに生息する下等真核生物で、カビによく似た子実体 (写真：孢子と柄から成る：京都大学大学院理学



研究科井上敬博士撮影) を形成する。しかし、粘菌とカビ (真菌) 類は、進化的にかけ離れた生物群であり、我々は、真菌類と同様に「粘菌類=薬剤資源 (抗生物質などの宝庫)」と
考え研究を進めており、
実際に、いくつかの薬剤
候補物質を報告してき
た。

一方、粘菌の生活史
(右図) は非常に単純で
扱いが簡単なことから、

QuickTime[®] C2
TIFF[®] Ajit Oai kAj eLi REVEcEOEaEÁ
Ç™Ç+ÇÁEsENE EEC%a@ÇEÇzÇ%Ç...ÇÖIKovÇ-ÇiAB

粘菌は「発生生物学・細胞生物学のモデル生物」として、各種細胞機能の研究が進められている。胞子から発芽した粘菌細胞は、単細胞アメーバとして周囲のバクテリアをエサとして増殖する。エサが無くなると、それがシグナルとなって、細胞は集合し多細胞体（10万個ほどの細胞から成る）を形成し、最終的に子実体を形成する。エサが無くなり、細胞が集合する際、中心部の細胞が分泌する cAMP に対する走化性運動によって多くの細胞が集合し、多細胞体を形成するため、粘菌は「走化性運動の解析モデル」としても優れている。

（背景 3：粘菌の分化誘導因子 DIF）

DIF-1 と DIF-2（下図）は、細胞性粘菌の柄細胞分化誘導因子として、イギリスの研究グループによって単離、同定された低分子化合物である。その中で、DIF-1 がもっとも高い分化誘導活性を有し、DIF-2 は DIF-1 の 40%ほどの分化誘導活性を有する。その後、DIF-1 と DIF-2 はそれぞれ別々の経路で合成されることもわかった。

しかし、DIFs 発見以来 20 年あまり経過した現在でも、DIF-2 特異的な生理的機能は、それがいいのかどうかも含め、まったくわかっていなかった（粘菌はなぜ DIF-2 を作っているのか不明）。さらに、DIF-1 に関して、分化誘導以外の役割があるのではないかと推測されていたが、それは未解明であった。

（本研究の目的と結果のポイント）

今回我々は、モデル生物である粘菌を利用して、走化性運動のメカニズム解明を進める一方で、走化性運動に対する DIFs の効果を検討し、DIF-1 と DIF-2 が、それぞれ走化性運動の「負」と「正」の modulators であることを世界で初めて発見した。

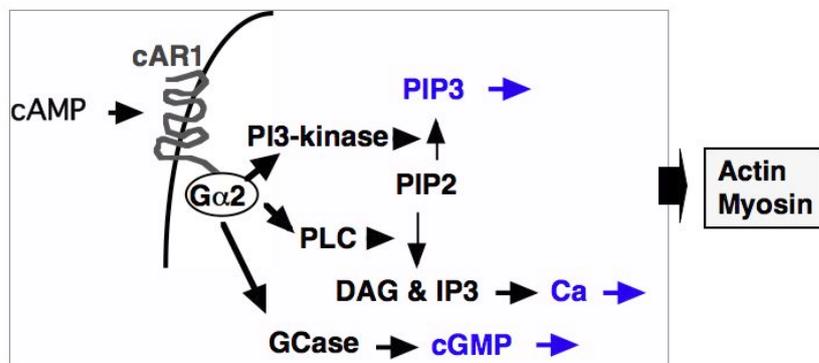
<走化性運動の機序の概要と今回の実験の方法>

（走化性運動のメカニズム）

走化性誘導因子である cAMP が細胞外に分泌されると、それを感知した細胞が cAMP source に向かって移動するのだが、その過程はおよそ以下の図のよう

になっている。

粘菌細胞の走化性運動のメカニズム



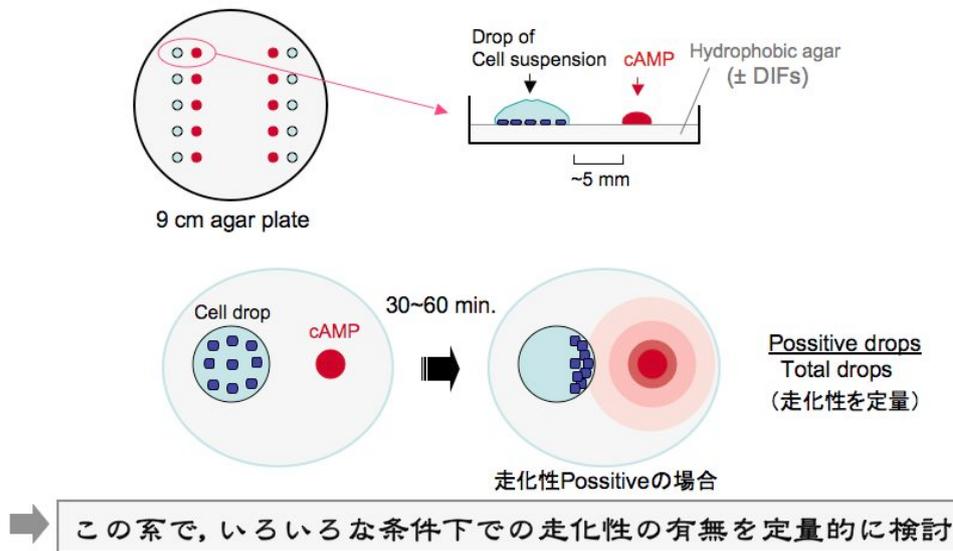
図に示すように、細胞外の cAMP が細胞膜上の受容体(cAMP receptor-1: cAR1)に結合し、G タンパク質を介して細胞内の PI3-kinase や PLC, Guanylyl cyclases (GCase), PLA2 (図には記入していない)などを活性化する。それらの産物である Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate (PIP3)や cGMP, Calcium などが細胞骨格 (アクチンやミオシンなどのタンパク質) をコントロールすることによって、細胞は効率よく cAMP source に向かって移動する。

(粘菌走化性運動の簡単なアッセイ系)

以下のアッセイ系を用いて、粘菌走化性運動を定量的に検討した。

9 cm の agar plate 上に下記のごとく、10組の極少量の cAMP 溶液 droplet と細胞懸濁液 droplet を置く。30-60 分ほどすると細胞は走化性運動によって droplet の端に集合してくる (顕微鏡でチェックできる)。この判定法によって、ある条件下 (cAMP 濃度や DIFs の存在) における走化性運動が、全体(10 droplets)の何パーセントの droplets で起こったのかを定量的に検定 (アッセイ) できる。

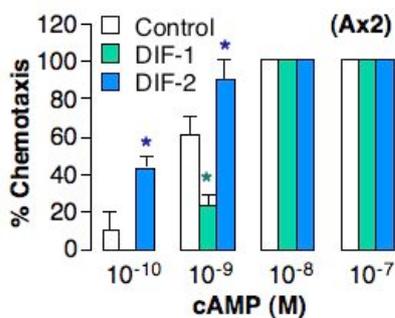
粘菌走化性運動の簡単なアッセイ系



<実験結果>

1) 粘菌野生株 Ax2 細胞に対する DIF-1 と DIF-2 の効果.

集合期（発生開始後数時間後）の粘菌細胞を集め、上記アッセイ系で走化性運動に対する DIFs (100 nM) の効果を調べた（下図）。



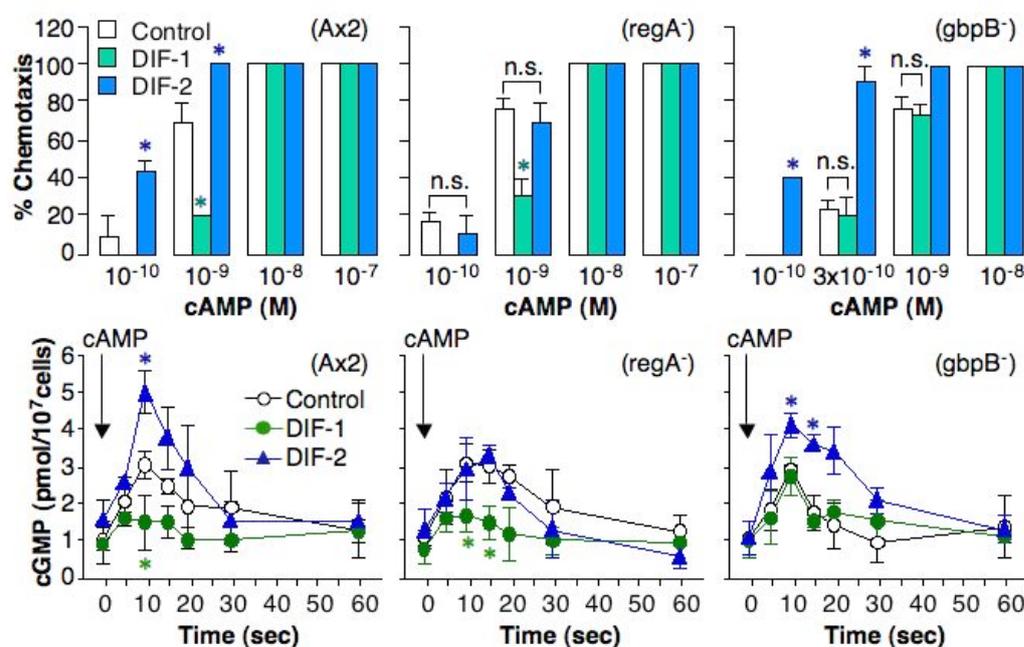
その結果、比較的高濃度の cAMP に対する走化性運動は、DIFs の存在に関係なく 100% の droplet 中で見られたが、驚くべきことに、低濃度 cAMP に対する走化性運動は、DIF-1 によって有意に抑制され、逆に、DIF-2 によって有意に促進された。

粘菌細胞は、DIFs に対する走化性を示さないことから、今回の結果は、DIF-1 と DIF-2 が走化性運動の「負」と「正」の modulators であることを示している。

2) regA 欠損細胞と gbpB 欠損細胞の走化性運動に対する DIF-1 と DIF-2 の効果。(この項目はやや複雑ですので、スキップしていただいて結構です)

DIF-1 と DIF-2 の作用機序を明らかにするために、各種粘菌変異株（走化性運動に関与する各種遺伝子欠損株）に対する DIFs の効果を調べた。その結果、regA (cAMP 分解酵素の 1 つ) と gbpB (cGMP 分解酵素の 1 つ) を欠く変異株が、それぞれ DIF-1 と DIF-2 の作用に関与することが明らかとなった。

下図は、野生株 Ax2 細胞、regA 欠損細胞、gbpB 欠損細胞の走化性運動に対する DIF-1 と DIF-2（それぞれ 10 nM）の効果を検討した結果（上の段）と低濃度 cAMP で細胞を刺激さいた際の細胞内 cGMP 濃度の変化に対する DIF-1 と DIF-2 の効果を調べた結果（下の段）である。



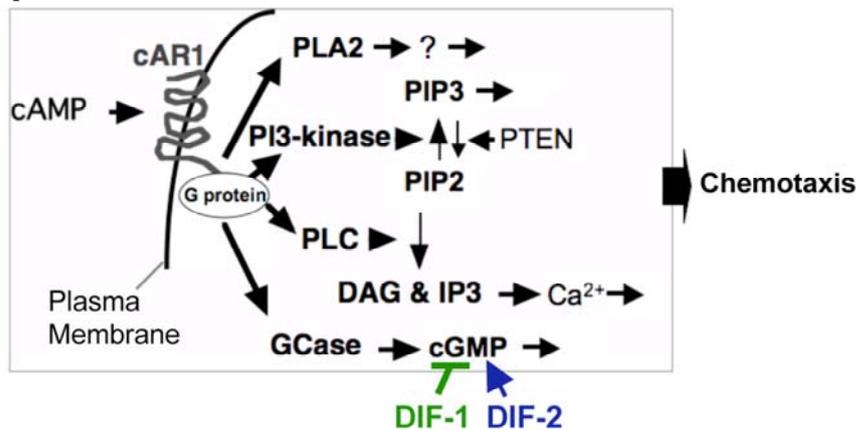
Ax2 細胞の低濃度 cAMP に対する走化性運動の際には、細胞内 cGMP 濃度が一過性に上昇するが、DIF-1 は cGMP 上昇を抑制し、DIF-2 は cGMP 上昇を促進している (図左グラフ)。一方、regA 欠損細胞の走化性運動は、DIF-1 によって阻害されるが、DIF-2 による促進作用は見られない(図中央上)。この時、DIF-1 は細胞内 cGMP の上昇を抑制しているが、DIF-2 は cGMP 濃度に影響していない (図中央下)。これとは対照的に、gbpB 欠損細胞の走化性運動は、DIF-2 によって促進されるが、DIF-1 による阻害作用は見られない (図右上)。この時、DIF-2 は細胞内 cGMP の上昇を促進しているが、DIF-1 は cGMP 濃度に影響していない (図右下)。

3) DIF-1 と DIF-2 の作用機序モデル.

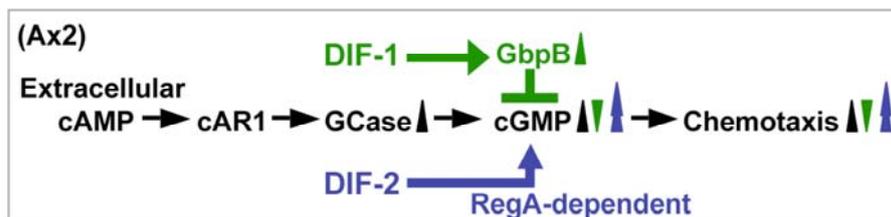
今回の成果から、DIF-1 と DIF-2 による走化性 modulation の機序は以下のように推測される (図 A は全体の概略。図 B は cGMP 濃度の制御に焦点をあてたもの)。

前述のように、通常の走化性運動においては、まず、細胞外の cAMP (走化性誘導因子) は、細胞膜上の受容体(cAR1)に結合し、細胞内の guanylyl cyclase (GSase)、PI3-kinase、PLC などが活性化される。そして、細胞内の cGMP や calcium 濃度、PIP3 量が上昇し、それらのシグナルが細胞骨格系に伝わり、効率の良い走化性運動が引き起こされる。DIF-1 は、何らかの機序で cGMP 分解酵素の 1 つ GbpB を活性化することによって細胞内 cGMP 濃度上昇を抑えることによって、走化性運動を抑制する。一方、DIF-2 は RegA (cyclic nucleotide 分解酵素の 1 つ) を介した何らかの機序で、細胞内 cGMP 濃度を上昇させ、走化性運動を促進する。

A



B



<まとめ>

今回我々は、粘菌を用いて以下のことを明らかとした。

1) 粘菌細胞における DIF-1 と DIF-2 の新しい機能の発見、すなわち、粘菌走化性運動を制御する低分子物質の発見に至った。

2) DIFs の作用機序の解析を行い、DIFs が粘菌の PDE (cAMP や cGMP の分解酵素) を介して走化性を制御すること (DIFs が細胞内 cGMP 濃度を調節できること) が分かった。

我々の知る限り、走化性運動を正負に modulate する低分子化合物の発見は世界初であり、他の生物種においても同様の発見がなされる可能性がある。

<今後の展望>

1) 走化性運動は、ヒトを含めた多くの生物にとって重要な細胞機能であるが、その仕組みの詳細は不明である。今後、粘菌細胞を利用して走化性運動の仕組みを明らかにする同時に、走化性運動を制御する DIFs の作用機序の詳細も解明したい。

2) 近年我々は、各種 DIF 誘導体 (DIF 類似物質) が哺乳類細胞に対する薬理活性 (抗腫瘍活性や糖代謝促進活性) を有することを報告している。さらに興味深いことに、我々は、DIFs が哺乳類細胞の PDE1 (cAMP と cGMP を分解する酵素) 活性を阻害することも発見している (Shimizu et al. 2004. *Cancer Research*)。これらの事実と今回の研究成果に基づき、今後「(免疫細胞など) 哺乳類の走化性運動を制御する薬剤」を開発できる可能性がある。さらには、がん細胞の浸潤や転移を阻止する薬剤、血管の拡張や収縮 (cGMP が関与) を調節する薬剤を開発できるかもしれない。DIF の構造を参考に、これら薬剤の開発を進めたい。