

新規摂動ツールによる細胞遊走の分子機構解明

井上 尊生

Unraveling Molecular Mechanism of Cell Migration Using Novel Perturbation Tools

Takanari Inoue

*Johns Hopkins University, School of Medicine, Department of Cell Biology;
855 N. Wolfe St., 453 Rangos, Baltimore, MD 21205, USA.*

(Received January 2, 2014)

Complexity in signaling networks is often derived from co-opting particular sets of molecules for multiple operations. Understanding how cells achieve such sophisticated processing using a finite set of molecules within a confined space – what we call the “signaling paradox” – is critical to cell biology and bioengineering as well as the emerging field of synthetic biology. We have recently developed a series of chemical-molecular tools that allow for inducible, quick-onset and specific perturbation of various signaling molecules. The present technique has been employed to unravel several important, previously unresolved questions regarding the regulatory mechanisms of potassium ion channels, the membrane targeting mechanisms of small GTPases and positive feedback machinery in neutrophil migration. Using this novel technique in conjunction with conventional fluorescence imaging and biochemical analysis, we are currently further dissecting intricate signaling networks in living cells. Ultimately, we will generate completely orthogonal machinery in cells to achieve existing, as well as novel, cellular functions. Our synthetic, multidisciplinary approach will elucidate the signaling paradox in cells created by nature.

Key words—chemotaxis; chemically inducible dimerization; feedback signaling; cell polarization; synthetic cell biology

はじめに

細胞走化性は、細胞が外部にある化学物質の濃度勾配を検知し、その情報に基づき適切な方向へ遊走する性質である。血管新生や胚発生、創傷治癒、免疫防御、神経回路形成などを含む様々な生理現象において重要な役割を担っており、その障害は、これら生理現象に異常をきたすだけでなく、がん細胞の転移や関節炎などの進行を促す。細胞走化性は段階的なプロセスで、細胞の極性化、前部での仮足形成、後部の収縮からなる (Fig. 1)。最初の極性化は、環境中の化学物質により誘発される。¹⁾ 非極性細胞は、化学物質の濃度勾配に応じて、一連のシグナル分子 (Rac, PI3K, RhoA, PTEN など) を細胞の片側に蓄積し、極性化する。つづいてこれらの分

子がアクチンの重合・脱重合を促すことにより仮足を形成する。仮足は細胞が前へ進む原動力を与える。最後に細胞の後部が収縮することで一連の走化性プロセスが完結する。好中球は体の中で最も速く遊走する体細胞であり、走化性のモデル系として汎用されている。個体が菌に感染すると、好中球は菌から放出される化学物質をいち早く検出し、その濃度勾配を基に感染部位に到達し、菌を捕食する。好中球の濃度勾配検出感度は非常に高く、細胞の端から端までで1%の濃度勾配であっても高い信頼度をもって遊走の方向を決定する。²⁾ 1%の濃度勾配とは、すなわち細胞の片側で100分子の化学物質があると、反対側に99分子あるという状況である。細胞膜受容体に結合した化学物質の平衡を加味すると、細胞の前後における受容体活性化の揺らぎは、1%の差よりも大きくなる。このようにノイズが優勢となる状況で、いったい好中球がどのようにして化学物質の信号を検出し、堅牢に遊走の方向性を決定しているのかは、細胞遊走の研究において最大の問題の1つとなっている。過去数十年の研究から、

The author declares no conflict of interest.

Johns Hopkins University, School of Medicine, Department of Cell Biology (855 N. Wolfe St., 453 Rangos, Baltimore, MD 21205, USA)

e-mail: jctinoue@jhmi.edu

本総説は、平成25年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

これまでに多数のシグナル分子が細胞走化性の制御に関与していることが明らかにされてきた。また数理モデルによって、細胞遊走の情報処理は、正と負の2つのフィードバックによって説明できることが示された。しかしながら、細胞走化性に関与する分子群が、どのようなシグナル様式でもって化学物質の濃度勾配を検出し、適切な方向へ細胞を遊走させているのかを詳細に記述することはいまだに困難を極めている。その大きな理由の1つに、実験手法の欠如が挙げられる。好中球は秒から分のオーダーで環境情報を処理し、速やかに極性化と遊走を達成するため、それと同等若しくはそれよりも早いオーダーで分子の活性を制御する必要がある。従来の遺伝学的手法（遺伝子ノックアウト、RNAi、タンパク過剰発現など）は、時間解像度が細胞内におけるシグナル伝達のと比べて遅いため、与えられた摂動に対して細胞が2次的、3次的な反応を引き起こした後の状態を観察していることになる。そのため、途中の時間的な情報が失われ、非線形過程を実験的に検証することが難しい。この問題を解決するにあたり、近年のオプトジェネティクスに基づいた細胞内局所での標的タンパク質の素早い活性制御は非常に有効である。例えば Weiner や Hahn らによる光感受性植物タンパクを用いた Rac の活性化が挙げられる。^{3,4)} この手法により、細胞内局所で Rac の活性を瞬時に変えることが可能となったが、一般性は非常に低く、いまだ Rac のみに適用可能で他のタンパク質への応用が阻まれている。つまり、このような高い時空間解像度をもってタンパク質の活性を制御できる手法は残念ながら限られている。そこでわれわれは独自に開発した一連の分子駆動プローブを駆使して、好中球がどのようなシグナル様式でもって環境情報の変化を高感度に検出しているのかを時空間レベルで解明することを目指している。

CRISP の開発

私は大学院生のときに、有機合成化学、光化学及び細胞生物学の技術・知識を結集することで、受容体や酵素活性を生きた細胞内で、任意の時間と場所で瞬時に不活化できる手法、small molecule-based laser inactivation (smCALI) を開発した (Fig. 2)。本手法を用いて、IP₃ 受容体によるカルシウムの放出機構を分子レベルで解明した。また本手法は、時空間的に IP₃ 受容体の生理機能を制御できることか

ら細胞内ネットワーク解析の有力な新手法になり得るもので、将来的には創薬基礎研究にもつながると考えている。しかしながら、細胞遊走に係わるシグナル分子は非常に多様で、こうした広範な分子の活性制御には smCALI は不向きであった。なぜなら、smCALI のプローブ開発において標的分子に結合するが分子活性には直接影響を与えないリガンド分子が必須であり、そうしたリガンド分子は一般的にあまり知られていないからである。例えば、PI3 キナーゼや低分子量 G タンパク質である Rac が代表的な細胞遊走を支配する分子であるが、これらを smCALI で標的とすることは技術上困難であった。

そこで私は博士研究員のときに chemically-triggered, rapidly-inducible, and compartment-specific perturbation (CRISP) を開発した。CRISP の原理は、2種類のタンパク質 (FKBP と FRB) の会合を1つの小分子 (ラパローグ) により誘導するものである [Figs. 3 (a) and (b)]。この原理は20年前の1993年に Schreiber と Crabtree らによって開発された。⁵⁾ CRISP という名前は一般的な名称ではないが、この原稿内で簡便的に使わせて頂く。われわれはこの原理に基づき、多面的に改良を加えることで、生きた細胞内で、任意のタンパク質の活性を秒のオーダーで、任意の細胞内局所で制御できる手法を構築した。^{6,7)} Figure 3 (a) に示すように、CRISP では細胞内に FKBP (濃青色) と任意のタンパク質 (水色) の融合タンパク質 (以後 CRISP プローブと呼ぶ)、そして細胞膜に局在する FRB (赤色) を使用する。ラパローグ添加により FKBP と FRB との会合を誘導すると、結果として CRISP プローブが細胞膜へと移行する。多くの細胞内シグナル分子は、細胞膜の受容体刺激に伴い、細胞膜へ移行することで情報伝達系を開始させるが、ラパローグによる強制的な CRISP プローブの膜移行はこれを模倣しつつも、受容体の活性化を介することなく任意の



井上尊生

2003年に東京大学薬学系研究科博士号取得後、米国スタンフォード大学医学部ケミカル&システムズバイオロジー博士研究員を経て2008年から米国ジョーンズホプキンス大学医学系研究科細胞生物学部で主任研究員として研究室を運営。構成生物学の概念に基づき、摂動ツールを開発・改良し、細胞遊走の分子機構解明及び再構築に取り組む。

<http://www.jhu.edu/inouelab/home.html>

細胞内情報伝達系を活性化することができる。また FRB の局在を変えることで、ミトコンドリアやゴルジ体など様々な細胞内小器官に標的タンパク質を秒のオーダーで移動させることができる。CRISP

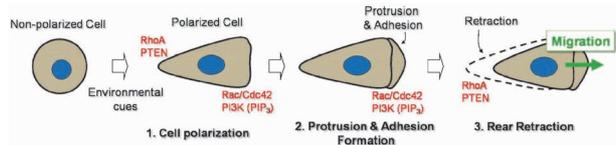


Fig. 1. Three Signature Steps in Cell Migration

Non-polarized cell migrates through three steps upon sensing environmental cues; polarization, protrusion and retraction. Molecules involved in each step are indicated in red.

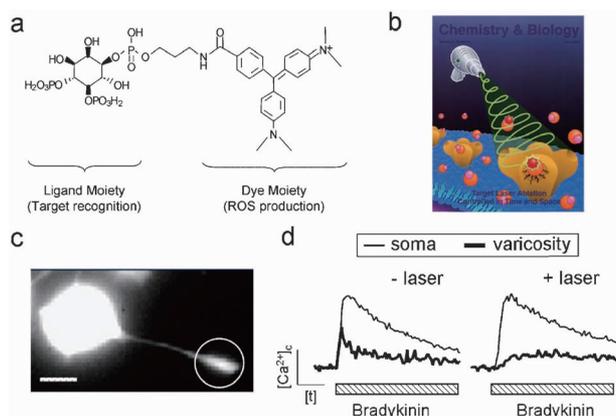


Fig. 2. Spatio-temporal Dissection of IP₃-induced Ca²⁺ Release

(a) Chemical structure of MGIP₃. (b) Cover art from *Chemistry & Biology*. (c) Subcellular region of a PC12 cell (white circle) was illuminated by laser light. Scale bar, 10 μm. (d) Bradykinin-induced intracellular Ca²⁺ was monitored in both soma (thin lines) and varicosity (thick lines) of the same cell in the presence or absence of laser illumination.

の最大の特徴は、速い摂動 (<10 秒) を生きた細胞内で達成できることと、一般性が高いこと、すなわち様々なタンパク質への応用が容易なことである。例えば筆者は、Rac, Cdc42, RhoA などの低分子量 G タンパク質の活性を素早く制御することにより、細胞骨格が直接影響を受け、迅速に細胞の形が変化することを示した [Fig. 3(c)].⁶⁾ また細胞膜の PI(4,5)P₂ や PIP₃ といったリン脂質の濃度を生きた細胞内で瞬時に変化させることで、長年議論の絶えなかったイオンチャネルの活性制御機構⁸⁾ や低分子量 G タンパク質の膜局在機構⁹⁾ を解明した。こうした低分子量 G タンパク質やリン脂質を *in situ* で特異的かつ素早く制御する摂動ツールは前例がなく、CRISP を適用することで得られた上記の知見は、それぞれのコミュニティに大きな影響を与えた。われわれは近年さらに CRISP を改良し、新規に合成した光応答性のラパログを用いて、任意の細胞内局所で分子活性を制御したり、¹⁰⁾ さらにはラパログの系とは完全に独立した、新しい CRISP の系を植物ホルモンであるジベレリンの新規誘導体とその結合タンパク質を用いて確立した。¹¹⁾ ジベレリンとラパログという直交的に機能する 2 つの CRISP の確立により、2 種類の分子活性を同時、又は異なるタイミングで、そして 2 つの場所特異的に制御できるようになった。また、ジベレリンはラパログとは異なり mTOR キナーゼを阻害しないので、オートファジーなど mTOR の係わる情報伝達系への適用が可能である。興味深いことに CRISP によるタンパク質の会合は秒のオーダーと速いのだ

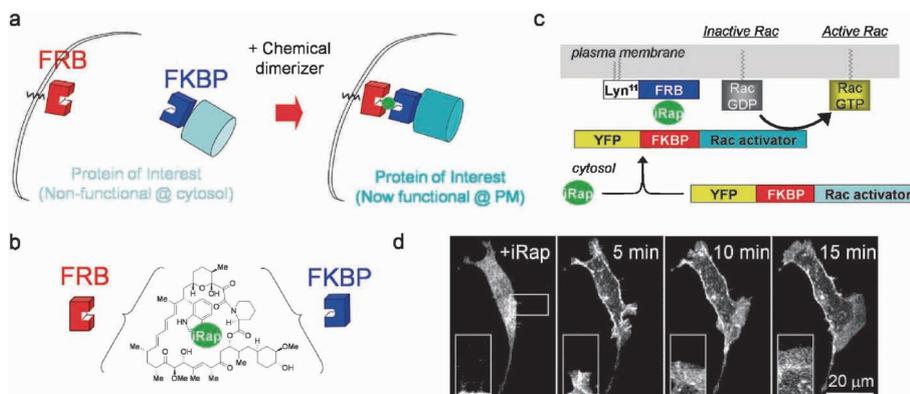


Fig. 3. Basic Principle of Chemically Inducible Translocation Strategy (CRISP)

(a) Chemical dimerizer such as rapamycin or iRap (shown as a green ball) induces membrane translocation of FKBP fusion protein to form tripartite complex with membrane-tethered FRB. (b) Chemical structure of iRap whose one side binds FRB, the other FKBP. (c) Principle of Rac activation with translocatable Rac activator. (d) Inducible Rac activation in fibroblast led to a remarkable lamellipodia formation.

が、細胞内での見かけの解離は非常に遅いことが観察されている。¹²⁾ その理由をはっきりとは分かっていないが、われわれは大きく2つの原因が寄与していると考えている。1つはFKBPとFRBの高い親和性である。ラパローグとの結晶構造解析によると、ラパローグとFKBP、ラパローグとFRB間に密な結合があり個々の結合の親和性も高いのだが、これに加えてFKBPとFRBも直接水素結合しており、強固な複合体を形成している。実際、FKBP・rapamycin・FRB複合体の解離速度定数は、 10^{-2} s^{-1} オーダーであることが報告されており、オフレートは比較的遅い。しかし、解離速度が 10^{-2} s^{-1} 程度であることを鑑みれば、系内からラパローグを完全に除去する条件において計算上では10分程度で99%近くが解離することになる。しかし、細胞外液を繰り返し入れ替えて洗浄を行ったとしても、実際にはそうはならない。細胞内で解離が遅いもう1つの理由は、ラパローグの細胞内のクリアランスが低いことにあると考えられる。クリアランスの低さは、ラパマイシンが高脂溶性の分子で、脂質膜やタンパク質表面など、細胞内外の様々な場所に吸着し、細胞内から洗い出すことが難しいことに由来している。また細胞がこうした化合物を汲み出すポンプを持っていないことも一因であると予想している。これらの効果により堅牢な複合体を形成し、細胞内の異常に遅いオフレートに寄与している。生体内のすべての情報伝達系は可逆的である。よって、より生理的な摂動を与える意味で、また実験手法としても分子活性の可逆的な制御は有用である。そこでわれわれはジベレリンとラパローグの2つの直交した系を有効に活用することで、一度結合したFKBP・ラパローグ・FRB複合体を解離せずに、複合体全体を他の場所へ移動させることにより分子活性をオンそしてオフすることに成功した。¹²⁾ この手法を用いることで可逆的な制御が可能となっただけでなく、タンパク質の局在を細胞質から形質膜、そしてミトコンドリアへと次々と変化させる手品のような楽しさを演出することもできた。

細胞骨格と膜脂質

細胞骨格と細胞膜のイノシトールリン脂質は非常に緊密な関係にあり、またその相互作用は細胞走化性において最も重要な役割の1つを担う。イノシトールリン脂質は8種類知られているが、それらの

化学構造は大変似通っていて、違いはリン酸の数と修飾位置だけである。これら8種の脂質はお互いに基質と生成物の関係にあり、それぞれの反応を担う酵素によって相互変換されている。そのため従来の遺伝子操作を用いてこれらの酵素量を変化させると、細胞を観察する頃には目的の脂質だけでなく他の多種類の脂質にも影響を及ぼしていることが多々あり、こうした実験上の制約が細胞走化性やその他の膜脂質に関連する細胞機能の研究において問題となっていた。われわれの開発するCRISPプローブの標的はタンパク質のみならず、遺伝子ではコードされないような情報伝達因子、例えば膜脂質の成分を瞬時に操作することも可能である。これまでCRISPプローブとして細胞膜上のリン脂質を合成又は分解する種々のプローブの開発に成功しており、これらを用いることでPIP₃、PI(4,5)P₂などの脂質の量を*in situ*で急速に調整することが可能となった。特にPI(4,5)P₂に対するプローブでは、非常に興味深い結果を得ることができたので以下で紹介する。一般的には、PI(4,5)P₂の量を増やすためには、これを合成するためのPI 5キナーゼを過剰発現させる系が用いられるが、われわれはこれをCRISPプローブへと応用することで、任意のタイミングで急速に形質膜上のPI(4,5)P₂の量を制御することに成功した。⁸⁾ またCRISPプローブが、細胞内の任意の場所に移動可能な性質を応用して、新たなPI(4,5)P₂制御法としてPI(4,5)P₂ liberation法を確立した(Fig. 4)。キナーゼによるPI(4,5)P₂ *in situ*合成では、PI(4,5)P₂合成に伴い原料であるPI4Pが消費され濃度が低下するのに対し、PI(4,5)P₂ liberation法では、PI(4,5)P₂をマスクするCRIPSプローブをミトコンドリア上へと格納することで、急速にPI(4,5)P₂をシグナル伝達系へと解放(liberation)でき、PI4Pの量に直接影響を与えずPI(4,5)P₂シグナルを活性化できる。この2つのユニークな摂動法を用い、細胞骨格であるアクチンの再構成系に対する影響を比較したところ、2つのPI(4,5)P₂摂動系が、同程度のPI(4,5)P₂を生み出す一方で、アクチンの骨格に対する表現系は排他的に異なるという非常に興味深い結果を得た。¹³⁾ 原料となるPI4Pの減少を伴う*in situ*合成では剛直なアクチン凝集束であるアクチンコメットを生み出したのに対し、PI4P量に影響を与えないliberation系

では細胞辺縁部の編目状の構造を発達させ膜の波打ち現象を誘起した (Fig. 4). 更なる詳細な検証により, PI(4,5)P₂ 操作によるこれら細胞骨格の排他的な表現系には, 活性が排他的に制御される性質を有する Rac-RhoA と, 細胞内の膜輸送系が関与することが示唆された. これらにより, PI(4,5)P₂ によるアクチン骨格再構成の表現系は, これまで形質膜上での役割がほとんど注目されてこなかった PI4P 量によっても多様化し得るという新しいモデルが提唱された. このような複数のリン脂質のシグナルが相互作用しつつアウトプットを決定するモデルは, PI(4,5)P₂ という 1 種類の分子が情報伝達の中核分子として多種多様な機能を実現し得る根源的な機構として係わると考えている.

細胞走化性の極性化の分子機構解明と再構築へ向けて

CRISP の細胞走化性研究への応用としてまず PI3 キナーゼの活性化を試みた. PI3 キナーゼは細胞走化性を引き起こす中心的な役割をしている. そこで CRISP を用いて PI3 キナーゼの酵素活性ユニットを細胞膜に瞬時に誘導する分子プローブを作製し, 好中球のモデルとして使われる HL-60 細胞に導入した. そしてラパローグを加えると, それまでおとなしかった細胞が急に形態を変化し遊走を始めることが観察された. 画像解析によると, この一連の過程は HL-60 細胞を走化性物質で刺激したとき, ほとんど遜色なかった. つまり, PI3 キナーゼを刺激することと走化性物質を細胞外で受容することは細胞遊走の観点でみればほぼ同義であり, 受容体から PI3 キナーゼをつなぐ G タンパクの経路は単純に外部の刺激情報を細胞内に伝達することのみ貢献していると予測される. またこの実験を発展させることで, ポジティブフィードバックによる PI3 キナーゼの酵素反応物である PIP₃ をリアルタイムに定量化することが可能となった. それにより細胞の先端端の仮足においてポジティブフィードバックにより PIP₃ が活発に産生されることが観察された. 同様の実験を阻害剤存在下で行うことで, こうした PIP₃ 産生がアクチンの重合と PI3 キナーゼの活性化という 2 つの条件が揃って初めて起こることを示した. つまりポジティブフィードバックはブーリアンロジックゲートでいうところの AND ゲートを形成していた.¹⁴⁾

続いてマイクロ流路系をデザイン, 加工し, 流路内においてラパローグの任意の濃度勾配を形成した. 細胞を流路内に閉じ込め, 仮足形成に重要な Rac タンパクを細胞内で勾配を形成するように活性化することで, 細胞がラパローグの濃い方へ遊走することを示した. これは CRISP という構成的手法を用いて, ラパローグという非生理的な化学物質に対する細胞走化性を再構築した, 極めて珍しい例である.¹⁵⁾ またこの実験には HeLa 細胞というもともと走化性が得意ではない細胞を用いている. つまり, われわれは不活性な細胞に最小限の摂動を外部から加えることで, 新しい機能を付与することに成功しており, 将来的には, こうした最小限の摂動による細胞機能の人工的なコントロールシステムが科学技術や医療分野へ応用されることを期待している. マイクロ流路系の大きな特徴の 1 つは, 溶質の濃度及び濃度勾配を比較的自在に変化できることである. 溶質の平均濃度は変えずに濃度勾配を変化させたり, 濃度勾配を変えず平均濃度を変化させたりすることが可能である. そこで, ラパローグの濃度勾配や濃度そのものを変化させることで, 細胞の極性化機構が活性 Rac 分子の濃度又は濃度勾配に支配されているのかを調べた. 具体的には細胞の極性化のタイミングを 2 段階に分けて, 初期の極性化と後期の極性化にかかる時間を様々なラパローグの条件下で蛍光顕微鏡を用いて測定した. すると, 初期の極性化には活性 Rac 分子の濃度勾配が, 後期には活性 Rac 分子の濃度が支配的であることが観察された (Fig. 5). われわれは初期の極性化がアクチン重合に係わる分子の極性化を反映し, 後期の極性が細胞骨格及び細胞膜を含めた形態レベルでの極性化であると考えている.

今後の展開

蛍光イメージングの発達と普及に伴い, 細胞内情報伝達系への理解が一層深まっている. その結果として, 活性化, 不活性化による単純な一次線形的なシグナル様式だけではなく, フィードバック, クロストーク, 時空間制御といった, 複雑な高次非線形的な様式を含むことが明らかとなった. しかしながら, このような複雑な系を検証できる摂動ツールの開発は常にボトルネックとなってきた. 今回紹介した smCALI や CRISP などの技術は, 様々な学問領域 (有機化学, 遺伝学及びそれらの複合領域となる

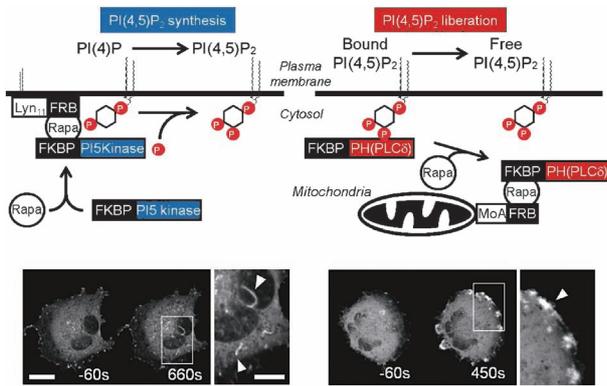


Fig. 4. Schematic Illustration of Two Techniques to Rapidly Manipulate PI(4,5)P₂ Using CRISP

(Top panels) PI(4,5)P₂ synthesis: Upon addition of rapamycin, cytosolic FKBP-PI(4)P5K is recruited to the plasma membrane, resulting in phosphorylation at the D5 position of PI(4)P to produce PI(4,5)P₂. PI(4,5)P₂ liberation: Prior to rapamycin addition, FKBP-PH(PLCδ) is preferentially at the plasma membrane through interaction with PI(4,5)P₂. Upon rapamycin addition, FKBP-PH(PLCδ) gets sequestered from the PM to mitochondria, leading to an increased concentration of free PI(4,5)P₂. (Bottom panels) Time-series confocal fluorescence images of YFP-FKBP-PI(4)P5K before and after induction of actin comets (left) or membrane ruffles (right) as a result of PI(4,5)P₂ synthesis or PI(4,5)P₂ liberation, respectively. Scale bars, 20 μm.

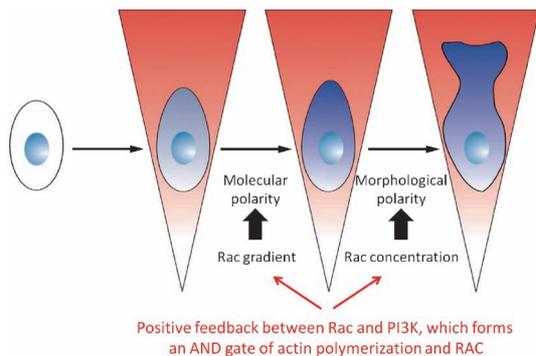


Fig. 5. Molecular Mechanism of Chemotaxis

Using CRISP molecular probes combined with a microfluidics device, we have shown that Rac activity gradient determines molecular polarity inside unpolarized cells, while active Rac concentration regulates ensuing morphological polarity.

ケミカルバイオロジー、分子生物学、細胞生物学、バイオエンジニアリング、光学など)の知識を総動員して達成された新規かつ独創的な摂動ツールであり、上記の複雑なシグナル様式の精査に非常に有用となることが期待される。また細胞走化性に関する一連の研究により、われわれは細胞走化性を引き起こすために必要な最小限のシグナル様式を理解することができた。それは Rac によるアクチン重合の勾配活性である。この知見に基づき、現在 *in vitro* で細胞走化性を再構築することを目指している。細

胞遊走の再構築に関する知見はわれわれの知る限りでは非常に少なく、2000、2009年にZhengと上口らが、細胞内のIP₃及びカルシウム濃度を光で制御し、神経成長円錐の動きを自在に操った報告^{16,17)} 2008年に筆者らによるCRISPにより細胞膜受容体刺激なしに好中球を遊走させた報告¹⁴⁾ 2009–2010年にHahnらのプローブを用いた報告^{4,18,19)}がある。これらはいずれも生きた細胞内の分子活性を光やラパログで直接制御することで細胞遊走を引き起こしている。われわれは、細胞ではなくもっと人工的な系での再構築を目指し、膜工学で多用されている人工巨大小胞膜(GUVとも呼ばれる)を用いている。人工巨大小胞膜は、人工的に作製された脂質二重膜で、タンパク質や脂質が膜構造に与える影響を精査する上で非常に有用なモデルシステムである。²⁰⁾特に膜の構造変化に関する研究で多用されている。²¹⁾人工膜の脂質組成は自在に変えることができ、またタンパク質の導入方法も膜タンパク質を含めて技術的に確立されている。まず第一段階として、FRBを人工膜へ局在させるために必要な脂質修飾の最適化を行い、人工膜上でCRISPプローブが適切に機能するか確認する。次に必要な最小限の分子群(Rac, WAVE, アクチンとその結合タンパクなど)を個々に精製し、好中球と同程度の20 μm前後の大きさの人工膜内に導入する。最終的にはラパログへの走化性を達成するため、人工巨大小胞膜をマイクロ流路系に導入し、ラパログを勾配状に加え、人工膜の運動を経時的に蛍光観察する。こうした構成的理解に務める研究は米国ではまだ認知が乏しく、研究費の取得が極めて難しい。われわれの場合は非常に幸運なことに、日本科学技術機構の支援を頂くことできた。

結論

近年の確立されたジェネティクス、発展した生化学的手法、そして蛍光イメージングの普及に伴い、ある特定の数少ない情報伝達分子が、多様な細胞機能を担うことが明らかになってきた。Ras、細胞内カルシウム、p53、PI(4,5)P₂、PIP₃などはその一例である。細胞は時々刻々と変化する環境に応じて、最も適切な機能を選択し生き延びていく。これらの環境要因には栄養素、温度、pH、光、数百種類の化学物質などがあり、それらすべての組み合わせは膨大な数となる。すなわち細胞とは、非常に小さな

空間で、膨大なインプットに対応し、限られた数の素子を用いて、適切なアウトプットを生み出す精巧なデバイスと考えられる。しかしながら、上記の情報伝達分子は、一般的に活性型と不活性型の2つの状態しかとらない。このように単純なバイナリースイッチの集合がいかにして複雑な情報処理を行っているのかは生物の根源的な問題である。これをわれわれはシグナリングパラドクスと呼んでいる。細胞遊走も、限られた分子で非常に複雑な情報処理を行うことが知られている。そこでCRISPのように生きた細胞内でシグナル様式を自在に操る技術は、シグナリングパラドクスを解く鍵として細胞生物学への多大な寄与が予測される。さらにCRISPは細胞がどのようにして非線形フィードバックシグナルを作り上げているのか？ また様々な環境下でどのようにしてそれを使い分けているのか？ 細胞遊走以外の細胞機能においても同様のシグナル様式が利用されているのか？ などの新たな疑問を検証するプラットフォームを提供する。もちろん細胞走化性だけでなく、秒から分のオーダーで起こる速い細胞機能（細胞分裂、細胞融合、細胞輸送など）の研究にも有用であると考えている。今後の研究も含めて、われわれは細胞遊走をモデル系として、構成生物学の概念を基にシグナリングパラドクスの解を探索していく。こうした研究により得られた知見と開発された技術は、細胞遊走に関連した病態である免疫疾患やがんの治療戦略にも大いに役立つことを期待する。

謝辞 ここで紹介した研究成果は、独創的なアイデアと活力に溢れた井上研究室の研究者のおかげである。特に、CRISPの開発にはポストクの小松徹氏、Yu-Chun Lin氏、宮本崇史氏、大学院生の梅田暢大氏らが大きな寄与をしてくれた。またポストクの上野匡氏は細胞骨格と膜脂質、大学院生のBen Lin氏はマイクロ流路系を用いた細胞走化性の研究を担当し多大な成果を挙げた。また上野氏と宮本氏には本原稿に対する建設的な意見だけでなく、校正もして頂き大変感謝している。最後に日本薬学会には若手奨励賞という過分な評価を頂き、身に余る思いである。

REFERENCES

- 1) Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R., *Science*, **302**, 1704–1709 (2003).
- 2) Zigmond S. H., *J. Cell. Biol.*, **75**, 606–616 (1977).
- 3) Levskaya A., Weiner O. D., Lim W. A., Voigt C. A., *Nature*, **461**, 997–1001 (2009).
- 4) Wu Y. I., Frey D., Lungu O. I., Jaehrig A., Schlichting I., Kuhlman B., Hahn K. M., *Nature*, **461**, 104–108 (2009).
- 5) Spencer D. M., Wandless T. J., Schreiber S. L., Crabtree G. R., *Science*, **262**, 1019–1024 (1993).
- 6) Inoue T., Heo W. D., Grimley J. S., Wandless T. J., Meyer T., *Nat. Methods*, **2**, 415–418 (2005).
- 7) Komatsu T., Kukelyansky I., McCaffery J. M., Ueno T., Varela L. C., Inoue T., *Nat. Methods*, **7**, 206–208 (2010).
- 8) Suh B. C., Inoue T., Meyer T., Hille B., *Science*, **314**, 1454–1457 (2006).
- 9) Heo W. D., Inoue T., Park W. S., Kim M. L., Park B. O., Wandless T. J., Meyer T., *Science*, **314**, 1458–1461 (2006).
- 10) Umeda N., Ueno T., Pohlmeier C., Nagano T., Inoue T., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12–14 (2011).
- 11) Miyamoto T., DeRose R., Suarez A., Ueno T., Chen M., Sun T.-P., Wolfgang M. J., Mukherjee C., Meyers D., Inoue T., *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 465–470 (2012).
- 12) Lin Y. C., Nihongaki Y., Liu T. Y., Razavi S., Sato M., Inoue T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 6450–6454 (2013).
- 13) Ueno T., Falkenburger B. H., Pohlmeier C., Inoue T., *Sci. Signal.*, **4**, ra87 (2011).
- 14) Inoue T., Meyer T., *PLoS ONE*, **3**, e3068 (2008).
- 15) Lin B., Holmes W. R., Wang C. J., Ueno T., Harwell A., Edelstein-Keshet L., Inoue T., Levchenko A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E3668–E3677 (2012).
- 16) Akiyama H., Matsu-ura T., Mikoshiba K., Kamiguchi H., *Sci. Signal.*, **2**, ra34 (2009).
- 17) Zheng J. Q., *Nature*, **403**, 89–93 (2000).

-
- 18) Wang X., He L., Wu Y. I., Hahn K. M., Montell D. J., *Nat. Cell Biol.*, **12**, 591–597 (2010).
 - 19) Yoo S. K., Deng Q., Cavnar P. J., Wu Y. I., Hahn K. M., Huttenlocher A., *Dev. Cell*, **18**, 226–236 (2010).
 - 20) Menger F. M., Keiper J. S., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 726–732 (1998).
 - 21) Baumgart T., Capraro B. R., Zhu C., Das S. L., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **62**, 483–506 (2011).