

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05593

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達に働く膜電位制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on the signal transduction modulated by membrane potential

研究代表者

森本 雄祐 (Morimoto, Yusuke)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・助教

研究者番号：50631777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、細胞性粘菌のcAMPに対する走化性シグナル伝達機構をモデルとして、分子生物学的手法とオプトジェネティクスを用いた生物物理学的手法により、真核生物のシグナル伝達における膜電位の重要性を明らかにすることを目的とした。研究結果から、細胞性粘菌の集合期における周期的なcAMPシグナル伝達に追従したリズム的な膜電位変化が自発的に発生していることを、本研究で確立した高感度な蛍光イメージング手法によって明らかにした。また、膜電位の光操作により、複合的なイオンの流れによって引き起こされる膜電位変化が、cAMPシグナルリレーを直接的に調節していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasma membrane potential is required for various cellular functions. The social amoebae *Dictyostelium discoideum* has been studied as a eukaryotic model organism to investigate chemotaxis, directed cell migration and differentiation. Chemotactic stimulation by cAMP is known to elicit cationic fluxes, involving proton and calcium ion, across the plasma membrane in *Dictyostelium* cells. This suggests that the membrane potential is also changed by cAMP stimulation. However it remains unknown how the membrane potential works in the eukaryotic signal transduction. In this study, we established the method to monitor the plasma membrane potential of *Dictyostelium* cells by fluorescence microscopy using a highly sensitive membrane potential dye. Then we found that the membrane potential of *Dictyostelium* cells was periodically changed depending on the cAMP signal relay in the aggregation stage. Results indicate that the membrane potential change regulate the cAMP signaling relay.

研究分野：生物物理学

キーワード：シグナル伝達 膜電位 走化性 蛍光イメージング 光操作

1. 研究開始当初の背景

バクテリアからヒト細胞に至るまで、細胞は自身にとってより良い環境へと移動するために走化性運動を行っていることはよく知られている。しかし、走化性を引き起こすシグナル伝達の経路は非常に複雑であり、特に真核生物のシグナル伝達経路は未解明な部分が多いのが現状である。走化性シグナル伝達経路が比較的簡素で理解が進んでいる大腸菌などの原核生物においても、細胞内でシグナルをどのように同期して効率よく運動方向を変えているのかなどはわかっていない。これに対し、大腸菌などのバクテリアから哺乳類細胞までにおいて、走化性のシグナル伝達自体やシグナルの同期に、膜電位のゆらぎを利用していることが理論的に示唆されている。これまでに、大腸菌やらせん菌の一種においては実際に膜電位ゆらぎと走化性の関連が実験的に示されている (Goulbourne and Greenberg, *J Bacteriol.* 1983; Kralj *et al.*, *Science* 2011)。しかし、真核生物においても同様の仕組みがあるかは十分には分かっていない。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壌中に生息する真核生物で、通常はアメーバ状の単細胞生物として分裂増殖しているが、飢餓状態になると自身が産生する cAMP をシグナルとして集合し、多細胞体を形成する。cAMP に対する走化性運動は GPCR 型受容体と G タンパク質を介したシグナル伝達経路のモデルとして、国内外の研究者によって盛んに研究されている (Swaney *et al.*, *Annu Rev Biophys.* 2010)。しかし、その経路は複数のパラレルな経路に別れており、十分な理解が得られていないと言えない。また、よりグローバルに働く経路の存在も疑われているが、有力な候補は見つかっていない。一方、研究代表者はこれまでに、膜電位感受性色素を用いた蛍光イメージングにより、細胞性粘菌の集合期における cAMP シグナル伝達に伴って周期的な膜電位変化が起こっていることを示唆する結果を得ていた。このことは、真核生物の走化性シグナル伝達経路においても、膜電位変化が重要な因子として働いていることを強く示唆するものである。しかし、膜電位が走化性のシグナル伝達にどのように働いているのかは分からない。膜電位変化と走化性シグナル伝達の直接的な関係を示すためには、膜電位を人為的に制御し、膜電位変化と走化性運動を高時空間分解能で同時計測する必要があった。

2. 研究の目的

膜電位変化は細胞のシグナル伝達において重要な要因の一つとして働いていると考えられている。しかし、実際にはシグナル伝達における膜電位の詳細な役割は明らかではない。その理由の一つが、細胞内でシグナルとして働く Ca^{2+} 、イノシトールリン脂質などのセカンドメッセンジャーの伝達による二次的な現象とされていることが多いためである。研究

代表者はこれまでに、膜電位感受性色素を用いて、細胞性粘菌の集合期における周期的な膜電位変動をイメージングすることに成功している。本課題では、膜電位の人為操作と計測を高時空間分解能で行うことにより、真核生物の細胞内シグナル伝達における膜電位変化の役割を明らかにすることを目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

本研究では、細胞性粘菌の走化性シグナル伝達の分子機構をモデルとして、真核生物のシグナル伝達における膜電位の役割を解明することを目的とし、オプトジェネティクスを応用した光刺激による膜電位の人為制御と、高時空間分解能での膜電位計測を行う。膜電位の光操作には、バクテリオロドプシンおよびチャンネルドロプシンをベースにした光駆動型タンパク質ツールを用いる。膜電位の計測には、膜電位感受性有機色素または、ホヤ由来膜電位センサータンパク質 Ci-VSP を利用した膜電位感受性蛍光タンパク質を用いる。また、自発的に膜電位変化を引き起こすイオンおよびイオン輸送体の特定を行い、シグナル伝達における膜電位変化の直接的な役割を明らかにすることを目指す。以上の結果をもとに、膜電位変化を含んだ走化性シグナル伝達機構のモデルを構築する。実際の研究は下記各項目内容に従って、実施した。

(3-1) 膜電位感受性蛍光タンパク質発現株の構築

これまでに膜電位感受性色素を利用した膜電位計測を行っているが、色素が若干の細胞毒性を持っていることと、色素の特性により溶液中でしか計測できないという欠点がある。そこで、本研究ではホヤ由来の膜電位センサータンパク質 Ci-VSP を利用した FRET 型膜電位蛍光プローブを用いるため、プローブの恒常発現株を構築する。細胞性粘菌の遺伝子操作手法は確立されているため、容易に発現系の作成が可能である。

(3-2) 膜電位と他シグナルの同時イメージング

cAMP の刺激を加えたときに起こる膜電位変化がどのようなイオンの流れによって生じるものなのか、またはどのようなシグナル経路と関連しているのかを明らかにするために、各種イオンや他シグナルと膜電位の同時計測を行う。各シグナルの計測はこれまでも行われているが、より高感度なイメージング手法を確立することで、各シグナルの関係性をより明確にすることを目指す。また、この手法検討により、シグナルのダイナミクスと膜電位変化を高時空間分解能で同時計測することが可能となる。

(3-3) 光遺伝学による膜電位の制御

膜電位変化が直接的にアメーバ運動を制御

しているかを調べるためには、膜電位を人為的に制御する必要がある。チャンネルロドプシンは、 H^+ や Na^+ , K^+ といった陽イオンを光刺激に応じて効率よく細胞内へと流入させ、細胞の膜電位を脱分極させることが可能である。また、バクテリオロドプシンは光刺激によりプロトン(H^+)等の陽イオンを細胞外へと排出するプロトンポンプとして働くため、膜電位の過分極制御に利用できる。以上のように、チャンネルロドプシンとバクテリオロドプシンをそれぞれ使い分けることにより、膜電位の脱分極、過分極の制御を行う。

(3-4) 膜電位制御に応答した細胞運動の計測

膜電位の変化が走化性運動に影響を与えるかを明らかにするために、作成したロドプシン発現株を用いて、光刺激により膜電位を過分極させたとき、または脱分極させたとき、それぞれにおける運動速度および運動方向の変化を計測する。また、細胞の局所に光刺激を与えることにより、1細胞内の膜電位分布に人為的に極性を持たせ、運動方向との相関を調べる。

(3-5) 膜電位と cAMP 合成酵素の関係解明

膜電位調節に働くイオンの濃度を変化させたとき、または膜電位自体を直接的に人為制御したとき、細胞内の cAMP 産生量がどのように変化するかを計測する。cAMP 産生量と膜電位の関係を明らかにすることで、膜電位変化が cAMP 合成酵素の活性化を担っていることを示す。

以上の実験で得られたデータをもとに、膜電位変化をシグナルとして含む走化性シグナル伝達機構のモデルを構築する。構築したモデルを既存のシグナル伝達機構のモデルと比較することにより、細胞内シグナル伝達における膜電位変化のグローバルな役割を明らかにする。

4. 研究成果

これまでの研究結果から、細胞性粘菌の集合期において、周期的な cAMP シグナル伝達に追従してリズム的な膜電位変化が自発的に発生していることが明確となった。本研究では、蛍光タンパク質ベースの膜電位プローブの利用を検討したが、細胞性粘菌の細胞が膜電位プローブタンパク質を積極的に分解してしまうことが明らかとなり、計測に十分な蛍光輝度を得ることができなかった。プローブの配列等の改良も行ったが、十分な成果は得られなかった。一方、膜電位感受性色素の利用はプローブの種類と計測条件の検討により、1細胞レベルでの安定な膜電位計測ができるようになり、cAMP 刺激による一過的な脱分極応答を高感度で捉えることが可能となった(図1)。

また、走化性シグナル伝達における cAMP リレーと膜電位変化の関係性を明らかにするために、膜電位と他の様々なシグナルとのタ

イムラプス同時計測を高感度で行うための計測系を確立し、cAMP、カルシウムイオン、pHなどのシグナルを高感度で可視化することができるようになった。この成果により、さまざまなシグナルについてこれまでに無い高い感度でイメージングすることが可能となったため、それぞれのシグナルにおいても新しい知見が得られるようになり、今後の研究の発展へとつながる技術基盤を確立することができた (Pervin MS *et al.*, Scientific Reports 2018)。

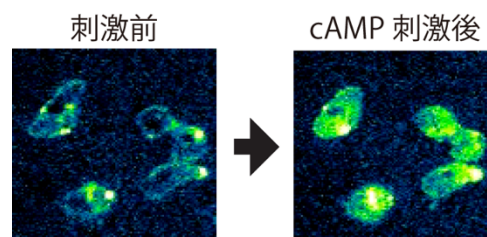


図1. cAMP 刺激による膜電位の一過的脱分極の蛍光イメージング

さらに、オプトジェネティクスの技術を取り入れ、細胞性粘菌において高効率な光操作手法を確立することにより、各シグナルの光操作も徐々にではあるが可能となってきている。イオンイメージングと光刺激による膜電位などのシグナルの人為操作の実験結果から、複数種類の陽イオンが自発的膜電位変化に関わっており、これらのイオンの流れによって引き起こされる膜電位変化が cAMP シグナルリレーに直接的に関与していることが示唆された。本研究期間中に、バクテリアのバイオフィーム内の細胞間シグナル伝達に膜電位変動が大きく働いていることが報告された (Prindle *et al.*, Nature 2015)。このことは、本研究成果で見つかった膜電位を伴う細胞間シグナル伝達が、原核生物から真核生物まで共通して保存されたシステムであることを強く支持するものである。

本研究で確立したイメージングや光操作技術についても、細胞性粘菌の研究だけではなく、原核生物から真核生物に至るまでの幅広い研究に応用できるものである。実際に、膜電位やイオンのイメージング技術は、その一部を応用させることにより、バクテリアにおける計測においても成果を得ている (Morimoto *et al.*, mBio 2016; Minamino *et al.*, PLOS Pathogens 2016)。今後はこれらの計測技術をヒト細胞などへ応用させるなど展開させていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件)

① Mst. Shaela Pervin, Go Itoh, Md.

Shahabe Uddin Talukder, Koushiro Fujimoto, Yusuke V. Morimoto, Masamitsu Tanaka, Masahiro Ueda and Shigehiko Yumura (2018) A study of wound repair in *Dictyostelium* cells by using novel laserporation. **Scientific Reports** 8(1):7969. (査読有)
DOI: 10.1038/s41598-018-26337-0.

- ② Yusuke V. Morimoto, Nobunori Kami-ike, Tomoko Miyata, Akihiro Kawamoto, Takayuki Kato, Keiichi Namba and Tohru Minamino (2016) High-resolution pH imaging of living bacterial cell to detect local pH differences. **mBio** 7: e01911-16. (査読有)
DOI: 10.1128/mBio.01911-16.
- ③ Tohru Minamino, Yusuke V. Morimoto, Noritaka Hara, Phillip D. Aldridge and Keiichi Namba. (2016) The bacterial flagellar type III export gate complex is a dual fuel engine that can use both H⁺ and Na⁺ for flagellar protein export. **PLOS Pathogens** 12: e1005495. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.ppat.1005495.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞内シグナル伝達における膜電位の役割, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本, 熊本大学, 2017 年 9 月 19 日
- ② 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞の集団運動に関わる電気化学ポテンシャル変化の高感度イメージング, 日本物理学会第 72 回年次大会 (招待講演), 大阪, 豊中, 大阪大学豊中キャンパス, 2017 年 3 月 18 日
- ③ 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞機能に関わる細胞内 pH の計測, 第 54 回日本生物物理学会年会 (招待講演), 茨城, つくば, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 26 日
- ④ 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞性粘菌における膜電位の計測と制御, 日本細胞性粘菌学会第 6 回例会, 東京, 上智大学, 2016 年 10 月 15 日
- ⑤ 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞性粘菌における多細胞動態イメージング, The 2nd RIKEN Quantitative and Developmental Biology Joint Workshop (招待講演), 神戸, 理化学研究所神戸キャンパス, 2016 年 4 月 15 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/yvmorimoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 雄祐 (MORIMOTO, Yusuke)

九州工業大学・大学院情報工学研究院

助教

研究者番号 : 50631777