

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14498

研究課題名(和文)細胞質pH変化による細胞分化の光刺激人為制御

研究課題名(英文)Control of cell differentiation by the cytoplasmic pH change

研究代表者

森本 雄祐 (Morimoto, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：50631777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の分化制御機構の解明は発生生物学、さらには再生医療の分野において必須の課題である。本研究課題では、細胞分化における細胞質pH変化の役割を解明し、細胞分化制御の分子機構を明らかにすることを目指した。pH感受性蛍光タンパク質を用いた高感度細胞内pH測定により、細胞性粘菌の柄細胞分化に伴う細胞質pH変化を可視化することに成功した。また、オプトジェネティクスの応用として、チャネルドロブシンの改変型タンパク質を発現する細胞株を構築し、細胞性粘菌の細胞質pHを光刺激によって人為制御することが可能となった。しかし、光刺激による分化誘導にまでは至っていないため、実験条件をより精査していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Intracellular pH plays important roles in the signal transduction for cell differentiation. However it remains unknown how intracellular pH change works in the cell differentiation. To investigate the role of intracellular pH, we constructed Dictyostelium discoideum strain expressing pH-sensitive fluorescent protein and observed cytoplasmic pH changes in the multicellular stage by fluorescence microscopy. And we could regulate the cytoplasmic pH of Dictyostelium cells expressing channelrhodopsin by photostimulation. We will try to control the cell differentiation by photostimulation.

研究分野：生物物理

キーワード：シグナル伝達 細胞内pH 蛍光イメージング 細胞分化 光遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内 pH の制御は、生命にとって必須のメカニズムである。細胞中の細胞質 pH は中性付近に保たれており、細胞内小器官によっては特有の pH 環境を保持することによって、各器官の機能を維持していることが知られている。このような細胞内 pH 制御は、細胞の発生や分化において重要な要因の一つとして働いている。しかし、実際には細胞分化における細胞内 pH の詳細な役割は明らかではない。その大きな理由の一つが、生細胞における細胞内 pH 変動を高時空間分解能で経時的に計測する技術が成熟していないためである。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壤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。しかし、飢餓状態に陥ると cAMP を分泌することで周辺の細胞同士が集合して移動体と呼ばれる多細胞体を形成する。移動体は最終的に胞子と柄からなる子実体を形成する。このような生活環をもつことから、細胞性粘菌は細胞分化の優れたモデル生物として扱われている。子実体の形成過程において、柄細胞と胞子への分化は、細胞質 pH の変化が鍵となって時間的および空間的に厳密に制御されているものと考えられている。つまり、細胞質 pH が高いと柄細胞への分化が抑制され、細胞質 pH が低下すると柄細胞分化が誘導されるというモデルが考えられている (Gross *et al.*, 1983; Inouye, 1988)。一方、研究代表者らはバクテリア細胞や細胞性粘菌を対象として、pH 感受性蛍光タンパク質を利用した高感度な細胞内 pH イメージング手法の開発を行うとともに、細胞内 pH の細胞機能における役割について研究を進めている。また、チャンネルドロプシンの利用などによるオプトジェネティクスが急速な発展を見せており、これを応用することにより細胞内 pH の人為制御が可能である。高感度細胞内 pH イメージングと細胞内 pH の制御手法を組み合わせることで、細胞性粘菌の細胞分化における細胞質 pH の役割を明らかにすることができると考えられる。

## 2. 研究の目的

細胞の分化制御機構の解明は発生生物学、さらには再生医療の分野において必須の課題である。また、細胞内 pH は細胞の分化やシグナル伝達において、重要な働きをしていることが知られているが、細胞分化や発生における細胞内 pH の詳細な役割は明らかではない。これを明らかにするためには、生細胞における細胞内 pH を高時空間分解能で経時的に計測および制御する技術を確認することが有用である。研究代表者らはこれまでに、新規に開発した高感度 pH プロブやイメージングシステムを用いて、細胞性粘菌の細胞内 pH 変化を計測している。本研究課題では、オプトジェネティクスの応用による細胞内 pH の光刺激制御によって、細胞性粘菌の細

胞分化を人為制御することにより、分化の分子機構における細胞内 pH の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、高感度 pH 感受性蛍光タンパク質を用いた高時空間分解能での細胞内 pH 測定により、細胞性粘菌の柄細胞および胞子への分化に伴う細胞質 pH の変化量を定量した。さらに、オプトジェネティクスの応用として、チャンネルドロプシンおよびバクテリオドロプシンの改変型タンパク質を発現する細胞株を構築し、細胞質 pH を光刺激によって人為的に制御することにより、任意の運命への細胞分化を引き起こすことを検討した。以上の新規計測・制御技術を利用した結果から、細胞分化における細胞質 pH 変化の役割を解明し、細胞分化制御の分子機構を明らかにすることを目指した。

### (1) 細胞分化の高感度タイムラプス pH イメージング

非侵襲な状態での細胞内 pH を測定するためには、pH 感受性蛍光タンパク質の利用が最適である。細胞性粘菌の細胞質 pH が 6.5~7.5 程度であることに対し、この pH 領域で感受性が高い緑色蛍光タンパク質および赤色蛍光タンパク質を用いて計測を行った。これらの pH プロブを発現する細胞性粘菌株を構築して高感度でのタイムラプス計測を行うことにより、移動体から柄細胞および胞子への分化に伴う pH 変化量を定量した。また、測定に用いる蛍光プロブはレシオメトリック測定が可能のため、プロブの発現量等に依存せず定量的な計測が可能である。細胞性粘菌の多細胞体は厚さが 100  $\mu\text{m}$  以上になるため、高時空間分解能で光学切片像からの pH 計測を実施するためにはニポウディスク型共焦点顕微鏡を用いた。研究代表者らはバクテリア細胞内での高分解能 pH イメージング手法を確立しており (Morimoto *et al.*, mBio. 2016)、バクテリア (1  $\mu\text{m}$ ) よりも細胞のサイズが大きい細胞性粘菌 (10  $\mu\text{m}$ ~) であれば、S/N 比の高い蛍光像が得られるため、より高精度な pH 測定を行うことが可能である。

### (2) オプトジェネティクスによる細胞内 pH の制御

細胞内 pH の人為制御には、バクテリオドロプシンおよびチャンネルドロプシンの改変型タンパク質等を用いた。バクテリオドロプシンは光刺激によりプロトン ( $\text{H}^+$ ) を特異的に細胞外へと排出するプロトンポンプとして働くため、細胞内 pH を上昇させる制御に有用である。また、チャンネルドロプシンなどは、プロトンを主に流す光駆動型カチオンチャンネルとして働くことが知られている。以上のように、バクテリオドロプシンとチャンネルドロプシンそれぞれの発現株を作成して使い

分けることにより、細胞内 pH の上昇および低下の光刺激による制御を行うことを検討した。バクテリオロドプシンは波長 560nm のレーザーで刺激を行い、チャンネルロドプシンは波長 488nm のレーザーで刺激することにより、同一細胞内で pH の上昇と低下を制御することが可能であると考えられる。チャンネルロドプシントタンパク質は、発現効率が細胞種によって大きく異なることが知られており、オプトジェネティクスの実験において、安定した発現系が構築できるかが大きな問題となる。そのため、流行によって次々と開発が報告されている最新のプローブやツールの情報を柔軟に適用させていった。

### (3) 光刺激 pH 制御による柄細胞分化の制御

細胞内 pH の計測および光刺激人為制御システムを確立した後、柄細胞分化に伴う pH 変化量と同様の変化を分化前の細胞に与えたときに、分化が誘導されるかを検証した。通常は移動体の進行方向前方部分のみが予定柄細胞へと分化するが、それ以外の部分を光刺激によって pH 変化させたときに分化が引き起こされるかを調べた。また、光刺激による pH 制御によって分化を引き起こしたときの細胞内 pH 変化量を定量し、通常の分化における pH 変化量との比較を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 柄細胞分化にともなう細胞質 pH 変化の可視化

細胞性粘菌が飢餓によって多細胞体を形成すると、多細胞体前方部の細胞群が次に柄細胞となる予定柄細胞柄へと分化することが知られている。pH 感受性蛍光タンパク質を発現する細胞が形成した多細胞体を蛍光顕微鏡下で観察したところ、多細胞体中の予定柄細胞領域において、顕著な細胞質 pH の低下が観察された (図 1)。このことは、柄細胞への分化にともなって細胞質 pH の自発的な変化が起こっていることを明確に示す結果である。また、この細胞質 pH の低下がいつどのタイミングで起こるのかを明らかにするために、発生より早い段階からの長時間タイムラプス計測を行った。その結果、数万個体の細胞が集まって多細胞体へと移行する初期段階に形成されるマウンドと呼ばれる時期において、明確な細胞質 pH の低下が見られる細胞が観察されるようになることが明らかとなった。分化によって pH が低下した細胞の多くは、マウンド内で回転運動する細胞群の回転中心に存在していた。また、マウンド期において回転中心の数個体だけが pH 変化している様子が観察されていることから、細胞分化が早く進んだ数個体が中心となることで、多細胞体内における個々の細胞の振る舞いを統制しているものと考えられる。

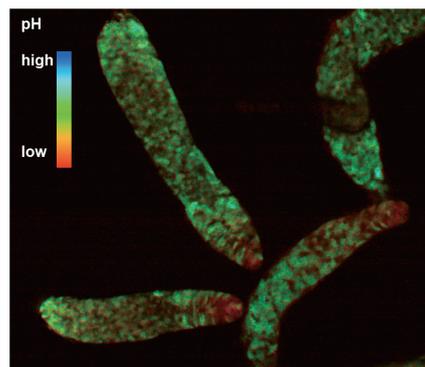


図 1. 細胞性粘菌の多細胞体における細胞質 pH イメージング

### (2) 光刺激による細胞質 pH の人為制御

柄細胞分化に伴って観察された細胞質 pH の低下を踏まえ、細胞質 pH の人為制御系の確立を行った。観察された pH 変化と同様の変化を引き起こすために、プロトン細胞質に取り込むことで細胞質 pH を低下させることが可能であるチャンネルロドプシンの発現系構築を行った。しかし、細胞性粘菌の細胞内ではチャンネルロドプシントタンパク質が著しく不安定なことが分かり、機能状態で形質膜に局在する割合は非常に低かった。これを解決するために、チャンネルロドプシンを細胞性粘菌由来の膜タンパク質に融合させた。この融合タンパク質は、細胞性粘菌の細胞内でも比較的安定な状態で形質膜に局在し、チャンネルロドプシンが光に応答してイオンを流すことも確認できた。この発現系を用いることにより、細胞質 pH の低下を光刺激によって誘導することが可能となった。しかし、光操作による細胞内 pH 制御は可能となったが、細胞分化を人為制御するには至っていない。今後は光刺激の実験条件の検討をより進めるとともに、pH 以外のシグナルも含めた複合的な刺激による操作も考慮すべきだと考えられる。

## 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 9 件)

- ①. Arata Furukawa, Kunihiro Yoshikaie, Takaharu Mori, Hiroyuki Mori, Yusuke V. Morimoto, Yasunori Sugano, Shigehiro Iwaki, Tohru Minamino, Yuji Sugita, Yoshiki Tanaka and Tomoya Tsukazaki (2017) Tunnel formation inferred from the I form structures of the proton-driven protein secretion motor SecDF. **Cell Reports** 19: 1-7. (査読有)

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.030.

- 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<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> for flagellar protein export. **PLoS Pathogens** 12: e1005495. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1005495.
- ④. Md. Shafiqul Islam, Yusuke V. Morimoto, Kudo Seishi and Shuichi Nakamura (2015) H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> are involved in flagellar rotation of the spirochete *Leptospira*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 466: 196-200. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.004.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞内局所 pH と細胞機能の関係, 分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」, 愛知, 岡崎, 岡崎コンファレンスセンター, 2015年4月20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

<http://www.qbic.riken.jp/csd/ja/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 雄祐 (MORIMOTO, Yusuke)  
理化学研究所・生命システム研究センター  
研究員  
研究者番号: 50631777

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし