

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14914

研究課題名(和文) ライブイメージング視野中の局所pHを評価しうる新規蛍光測定系の構築

研究課題名(英文) Construction of a novel fluorescent measurement system to evaluate pH values in fluorescent imaging analysis

研究代表者

三坂 巧 (MISAKA, Takumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：40373196

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)：培養細胞を用いた蛍光イメージングにおいて、細胞近傍の外液pHを蛍光イメージングにより測定可能な新規細胞評価系の構築を行った。新規プロトンチャンネルと蛍光タンパク質(EGFP)を共発現させた細胞を用いることで、細胞外のpH低下を、蛍光タンパク質の蛍光強度変化によって測定することが可能となった。またプロトンチャンネルの発現量を変えることにより、検出感度が異なるセンサー細胞の構築にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We planned to construct a novel evaluation system to detect a decrease in pH value of extracellular solution by fluorescent imaging analysis. Extracellular pH decrease could be clearly detected by the change of fluorescent intensities of EGFP by using cultured cells that express both a novel proton channel and EGFP. It was also shown that sensitivities of sensor cell lines against pH decrease depend on the expression level of a novel proton channel.

研究分野：食品科学

キーワード：培養細胞 pH 蛍光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、味覚受容体を発現させた培養細胞を用いて、客観的呈味強度測定に関する研究を継続的に行ってきた。ヒトをはじめとした種々の脊椎生物に由来する味覚受容体を対象とし、高感度測定系の開発や受容体活性化メカニズムの解明にも成功している (*Science* 2014, *J. Biol. Chem.* 2014 等)。またこのような測定系を利用することで、味覚に関する複雑な現象の解明も可能となってきた。例えば、酸性 pH において甘味を示す味覚修飾タンパク質ミラクリンについても、中性条件下でヒト甘味受容体に結合したミラクリンが pH 低下によってヒト甘味受容体を直接活性化する分子メカニズムを明らかにした (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011)。

味覚受容体は口腔内に存在する味細胞に発現しているため、実際の生体環境においては様々な pH 条件下 (特に炭酸や有機酸に由来する酸性 pH) にさらされる。培養細胞評価系における測定においても、生態環境を模倣した条件では細胞外液の pH を変化させながら測定する場合がある。このとき、細胞外液の pH を直接モニタリングしながら蛍光イメージングを行うことが可能となれば、大きな利点となる。

## 2. 研究の目的

本研究においては、培養細胞を用いた蛍光イメージングにおいて、細胞近傍の外液 pH を蛍光イメージングにより測定可能な新規細胞評価系を構築することを目的とする。具体的には、細胞膜内外の pH 差に従ってプロトン透過する新規プロトン透過性チャネル (論文準備中) と EGFP などの蛍光タンパク質を組み合わせ、細胞近傍の外液 pH (プロトン濃度) を蛍光タンパク質の蛍光強度変化によって測定しようとするものである。新規プロトン透過性チャネルと蛍光タンパク

質を組み合わせた新たな手法を開発することで、pH 変化を伴う細胞イメージングに新たな方法論を提案することが可能となることが期待される。

## 3. 研究の方法

本研究においては、培養細胞に新規プロトン透過性チャネルを単独で、あるいは EGFP などの蛍光タンパク質を共発現させ、細胞近傍の外液 pH (つまり外液のプロトン濃度) を、細胞内に存在する pH 感受性色素あるいは蛍光タンパク質の蛍光強度変化によって測定しようとするものである。細胞外液を中性 酸性 中性と変化させた際に生ずる蛍光強度変化をイメージングにより記録し、外液 pH と蛍光強度変化に相関があり、かつ、pH に対する検量線が描けるような条件設定を検討する。

また安定的な pH 検出のため、蛍光タンパク質の種類、発現量、ならびにプロトン透過性チャネルの細胞膜上における発現密度などが異なる複数種類の安定発現細胞株を構築し、本手法による細胞外 pH 測定の妥当性の検証を行うとともに、将来的には他の蛍光指示薬と組み合わせたイメージング手法の構築を目指すことにする。

## 4. 研究成果

### (1) 新規プロトン透過性チャネル発現細胞におけるチャネル発現量が細胞内 pH 変化に及ぼす影響

外液のプロトン濃度依存的に、細胞内へプロトンを透過することのできる新規プロトン透過性チャネルを発現させた細胞において、細胞内 pH 変化をイメージングにより観察した。プロモーターの種類を変えた複数種類の発現ベクターを用いて当該チャネルを高発現・低発現させた細胞に、pH 感受性色素である BCECF をそれぞれ負荷し、細胞外液を様々な pH に置換した直後からの細胞内

pH 変化について、蛍光イメージングにより測定を行った。

その結果、プロトンチャネルを高発現させた場合には細胞内 pH の変動が速く、低発現に抑えた場合には細胞内 pH の変動が遅いことが観察された。BCECF の観察により検出された細胞内 pH 変動速度は両条件で大きく異なったため、蛍光イメージングより明確に区別することが可能であった。

すなわち、プロトン透過性チャネルを細胞膜に発現させることで、細胞内へのプロトン流入を促し、細胞外 pH 低下を細胞内 pH 感受性色素の蛍光強度変化により検出することができることが明らかになった。

## (2) pH 感受性蛍光タンパク質による細胞内 pH 変化の検出

EGFP は pH 依存的な蛍光強度変化を示すという知見があるため、プロトンチャネル発現細胞に酸性刺激を行った際の細胞内 pH 変化を、EGFP の蛍光強度変化から観察可能であることが期待された。そこで培養細胞にプロトンチャネルおよび EGFP を共発現させ、細胞外液を様々な pH に置換した際の EGFP の蛍光強度変化について、蛍光イメージングにより測定を行った。

細胞外 pH に伴い、細胞内に発現した EGFP の蛍光強度の減少が認められ、EGFP を pH 指示薬のように用いることができることが示された。細胞外液を中性 酸性 中性と変化させた場合には、徐々に蛍光強度の減少が見られた後に、初期値に近い値まで蛍光強度の回復が見られたことから、細胞外 pH の変化がある程度、把握できることも判明した。

## (3) 安定発現細胞株を用いたイメージング解析

EGFP およびプロトンチャネルを安定的に共発現させることによって、細胞外の pH

低下を細胞内の蛍光強度減少から検出可能なセンサー細胞の作製を試みた。安定発現細胞株におけるプロトン透過性チャネルおよび EGFP の発現量比が異なった細胞株を構築するため、発現コンストラクトのデザインを行った。EGFP を CMV プロモーターで発現させ、同時にプロトン透過性チャネルを IRES 配列を用いたバイシストロニック発現、低発現プロモーターによる発現誘導、強発現プロモーターによる発現誘導、という異なる発現量が可能となるように、各種安定発現細胞株を構築した。

プロトン透過性チャネルの細胞あたりの発現量は の順に多くなることが予想されたため、それに従い応答強度の変化が認められることが想定された。実際、外液の pH を様々な pH に置換したときの経時的な細胞内 EGFP の蛍光強度変化を測定したところ、前述のプロトン透過性チャネルの発現量に依存して、蛍光強度変化速度に差異が認められた。

すなわち、今回構築した安定発現細胞について、プロトン流入量の異なる 3 種の細胞株の作製に成功したといえるとともに、その蛍光強度変化を用いて、細胞外 pH 低下を異なる感度でモニターする系の構築に成功したといえる。

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

三島誠、三坂巧

「プロトン透過性膜タンパク質を利用した細胞外 pH 低下検出系の開発」日本農芸化学

会 2016 年度大会、2016/03/28、札幌コンベンションセンター（札幌）

〔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

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biofunc/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

三坂 巧（MISAKA, takumi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40373196

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし