

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14721

研究課題名(和文) 幹細胞分化過程における代謝変化の単一細胞経時解析

研究課題名(英文) Single-cell Timelapse measurement of metabolic change during stem cell differentiation

研究代表者

柳沼 秀幸 (Yaginuma, Hideyuki)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任研究員

研究者番号：10733222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸化リン酸化や解糖系といった、細胞内でエネルギーを作る経路は、細胞内の代謝状態と密接に関連している。従来のATP計測手法では細胞内ATP濃度を一細胞レベルで正確に定量計測することが困難であった。本研究では、これまで独自に開発してきた、細胞内ATP濃度をレシオメトリックな蛍光変化で定量計測する単一蛍光色素型の蛍光ATPプローブ"QUEEN"を用いて、未文化の細胞が培養状態や分化状況に応じて代謝状態がどのように変化をするのかを検証した。細胞の培養状態によって代謝状態が大きく変化することを見出すことに成功したほか、ES細胞間の代謝状態の相互作用の可能性についても解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATPは、さまざまな細胞内の反応の進行に必要であり、細胞の代謝状態のパラメーターとして重要である。ATPのような代謝物質の濃度は細胞の運命決定に大きく関わっていると考えられる。本研究により、細胞が性質をかえていくに従って細胞内の代謝状態に多様な状態が現れることを単一細胞計測により明らかにした。また、細胞同士が作用しあうことによって代謝状態が変化する可能性も示された。これらの結果から、生物の細胞集団がどのように多様な細胞種が生み出されるか、またそれらが協調して個体を作り上げていくか、というメカニズムの解明に寄与したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intracellular energy production pathways, such as oxidative phosphorylation and glycolysis, are closely related to intracellular metabolic conditions. With conventional ATP measurement methods, it has been difficult to accurately quantify intracellular ATP concentration at the single cell level. In this study, we examined how the metabolic state changes depending on the culture and differentiation status of cells using a ratiometric fluorescent ATP indicator protein "QUEEN" that quantitatively measures the intracellular ATP concentration. In this study, we examined how the metabolic state of undifferentiated cells changes depending on their culture and differentiation status. We succeeded in finding that the metabolic state changes significantly depending on the culture state of the cells, and also elucidated the possibility of interaction of the metabolic state between embryonic stem cells.

研究分野：生物物理学

キーワード：ATP 細胞イメージング 代謝計測 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

細胞の運命決定、たとえば細胞が特定の細胞種に分化するかどうかは細胞の内部の遺伝子発現によりコントロールされていると思われる。だがどのようにして均一な集団から異なる種類の細胞が分化してくるのか、詳細は明らかではない。近年の研究では、細胞の代謝状態がこうした細胞の運命決定に密接に関わっていることを示唆することが判明してきているが、いまだに多くの未解明の部分が残されていた。

ATP は、細胞の機能や増殖に必要なエネルギー物質である。アデノシン三リン酸(ATP)は細胞の活動に重要なエネルギー通貨である。ATP の合成・消費のバランス機構は未だに解明されていない点が多く残されている。従来の ATP 計測手法では細胞内 ATP 濃度を一細胞レベルで正確に定量することが困難であった。私は過去に、バクテリアの細胞内 ATP 濃度をレシオメトリックな蛍光変化で定量する単一蛍光色素型の蛍光 ATP プロブ"QUEEN"を開発した(図1)。最近、われわれは 25 °C での使用に限定されていた以前の QUEEN に変異を加え、さまざまな温度条件に対応した QUEEN のシリーズを開発した。37 °C に対応した QUEEN を用いて、動物細胞の ATP 濃度を一細胞レベルで測定することが可能になった。この新しい QUEEN の計測結果は、ルシフェラーゼアッセイを使ったスタンダードな ATP 定量方法ともよく一致することを示すことに成功していた。

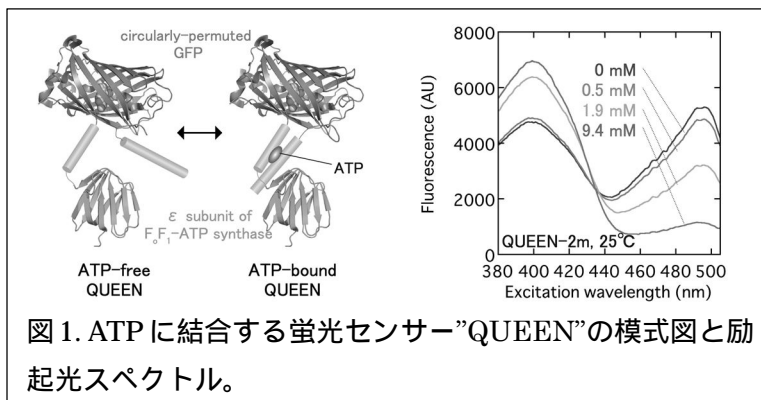


図1. ATP に結合する蛍光センサー"QUEEN"の模式図と励起光スペクトル。

ATP は、さまざまな細胞内の反応の進行に必要であり、細胞の代謝状態のパラメータとして重要である。近年では、細胞内の ATP 合成経路の変化が、細胞の運命決定において大きな役割を果たしていることを示す結果が、他のグループからも報告されている。そこで我々は、新規に開発した 37 °C 用の ATP 計測タンパク質 QUEEN を用い、独自に開発した代謝経路阻害剤と組み合わせたアッセイを行うことで、細胞の運命が変化する際に起きている細胞内の代謝変化を定量的に計測して解明することを試みた。

2. 研究の目的

ATP は、さまざまな細胞内の反応の進行に必要であり、細胞の代謝状態のパラメータとして重要である。近年では、細胞内の ATP 合成経路の変化が、細胞の運命決定において大きな役割を果たしていることを示す結果が、他のグループからも報告されている。そこで我々は、新規に開発した 37 °C 用の ATP 計測タンパク質 QUEEN を用い、独自に開発した代謝経路阻害剤と組み合わせたアッセイを行うことで、細胞の運命が変化する際に起きている細胞内の代謝変化を定量的に計測して解明することを試みた。

3. 研究の方法

以下の方法により、細胞が分化する際に細胞内で起きている代謝変化について研究を行なった。

- (1) 正確な ATP 定量のための細胞内 pH の計測方法の開発
- (2) 細胞集団の持つ多様性やその変化の計測
- (3) 細胞周期と細胞の代謝状態の同時計測
- (4) Wound Healing 処理後の細胞の代謝状態の変化の計測

4. 研究成果

(1) 正確な ATP 定量のための細胞内 pH の計測方法の開発

細胞の内部の ATP 濃度を正確に定量するにあたって、細胞内の pH を決定する必要がある。これは、ATP センサーである QUEEN タンパク質の応答が、環境が大きく酸性に傾いている場合は影響をうけてしまう場合があるからである。そこで、我々は pHrodo、pHRed、pHluorin などのいくつかの pH 応答蛍光センサータンパク質を培養細胞の内部で発現させた。つづいて、バリノマイシンやナイジェリシンといったイオノフォアを用いて、細胞内の pH を変化させる系を確立した。この系を用いてさまざまな pH 応答蛍光センサータンパク質を評価した結果、pHluorin を用いる場合に最も正確に pH に対する応答が見られることがわかった。他の pH センサータンパク質は、シグナルが弱かったり、レシオによる評価でないために定量評価が難しいという問題が存在することがわかった。そこで、我々は pHluorin と QUEEN を併用して細胞内の pH と ATP 濃度を同時に定量するを行なった。この際に、pHluorin と QUEEN は使用する励起・蛍光波長が類似しているため、二つのシグナルの分離が困難であるという問題があったが、我々はこの問題を回避する測定技術の確立に成功している。この結果を用いて、QUEEN による測定結果が細胞内では pH による影響を実質的にほとんど受けないということを示すことができている。

(2) 細胞集団の持つ多様性やその変化の計測

新規 QUEEN による定量性を生かして、我々は動物細胞、特にイヌ腎臓由来の培養細胞 (MDCK 細胞) やマウス由来の ES 細胞で ATP 濃度の多様性が見られることについて計測を行なった。それぞれの細胞種において QUEEN 遺伝子を導入し恒久的に発現をさせることに成功した。また、フローサイトメトリーを用いた細胞分離技術を活用し、発現量の多い細胞系統を樹立することに成功した。こうした細胞を用いて様々な検討を行った結果、MDCK 細胞

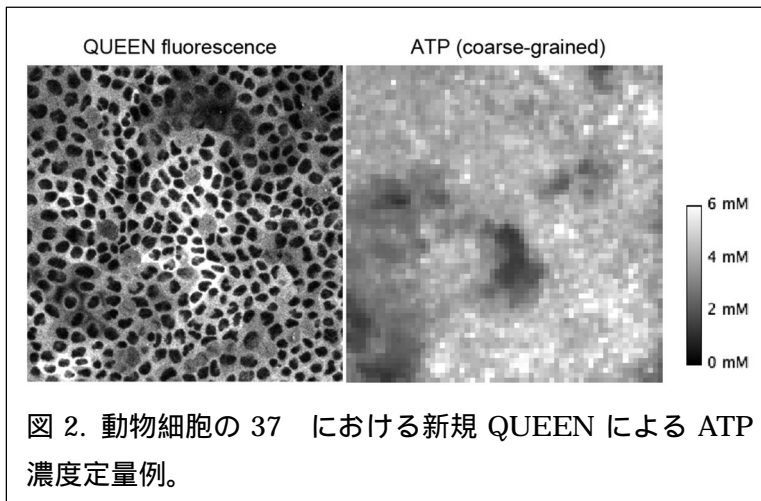


図 2. 動物細胞の 37 における新規 QUEEN による ATP 濃度定量例。

細胞においては、細胞の培養状態によって代謝状態が大きく変化することを見出すことに成功した (図 2)。加えて、細胞間の代謝状態の相互作用の可能性について詳細に検討した。また、マウス ES 細胞においては、分化抑制条件で培養したのちに分化抑制因子を除いた培地に交換し、細胞の分化状態が進行するような条件で培養を行なった。分化が進行すると、細胞ごとの代謝状態は広がる傾向にあることが示唆されるデータを得ることができた。これは、均一だった ES 細胞集団が、分化抑制を解除するような培養条件に移したことによりさまざまな細胞種に分化を開始したため、細胞内の状態が多様化したものだと考えられる。こうした代謝的な細胞内状態の多様化の発生のメカニズムが、均一な状態かつ遺伝的に均質な細胞群においてもさまざまな分化状態を作り出す仕組みの一端をになっていると考えられる。

(3)細胞周期と細胞の代謝状態の同時計測

最近、理研において開発された FUCCI と呼ばれる蛍光タンパク質は、細胞周期に応じて細胞内の局在が変化する。これをイメージングすることで、細胞周期が G1 期にあるのか、S/G2/M 期にあるのかを蛍光画像から自動的に判定することが可能である。この細胞周期マーカーを QUEEN の計測と併用する系を開発した。QUEEN の波長とクロストークしない赤色や赤外領域の蛍光タンパク質を FUCCI と組み合わせ、合計 4 つの波長でイメージングをすることで、細胞周期と ATP 濃度定量の両方を同時に行うことができるようになった。これを用いて長時間にわたって分裂する細胞を顕微鏡撮影し解析した結果、G1 期の細胞とそれ以外の細胞周期にある細胞とでは、ATP 濃度に関して大きな差が見られないことを示唆する予備的な結果を得ている。現在、細胞周期の違いが細胞内代謝状態に与える影響についてより詳細に解明するため、阻害剤を用いた代謝阻害実験を行っている。

(4)Wound Healing 処理後の細胞の代謝状態の変化の計測

MDCK 細胞のような上皮細胞は、培養中においては細胞のない空白領域を埋めるように分裂し増殖する。この性質を利用して、細胞の状態の異なる細胞を作り出すことが可能である。すなわち、一度隙間のない状態まで培養したのちに、メスなどで細胞のシートをひっかくことで、細胞の間に隙間を新たにつくりだすことができる。この状態から培養を再開すると、作成した隙間部分の細胞が隙間を埋めようと活動を活発化させる。つまり、系の中に隙間のない状態まで培養された細胞と、新たにできた隙間を埋めようと活発に移動と分裂を行う細胞の、大きく分けて 2 種類の細胞が出現することになる (Wound Healing 実験)。私はこの状態の細胞の ATP 濃度を QUEEN-37C を用いて観察した。

引っ掻いて隙間ができた直後の細胞は、ほぼ一様の ATP 濃度であった。次に、この状態の細胞で解糖系の ATP 合成を阻害したところ、活動を活発化させていない後背領域の細胞では ATP 濃度が細胞の隙間を埋めようとする先端部分の細胞では ATP 濃度の低下が著しかった。また、酸化的リン酸化による ATP 合成の阻害を行うと、これとは逆の傾向がみられることも判明した。すなわち、Wound Healing の際に活発化する細胞では、酸化的リン酸化が抑制され解糖系に偏った代謝状態になっていることが判明した。

また、プレビスタチンなどのアクチンフィラメントの構造を破壊する薬剤や、ノコダゾールなどの微小管のターンオーバーを阻害する薬剤を添加しておく、解糖系阻害剤による ATP 濃度低下がより強化されることがわかった。こうした結果から、細胞内の ATP 消費は細胞骨格の活動を阻害すると解糖系により傾くことが示唆された。細胞骨格構造の存在は、細胞内の代謝状態を酸化的リン酸化依存に傾かせる作用があると考えられるが、この点についてはさらに検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang C, Taki M, Sato Y, Tamura Y, Yaginuma H, Okada Y, Yamaguchi S.	4. 巻 116
2. 論文標題 A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 15817-15822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1905924116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondratiev Alexandr Yu., Yaginuma Hideyuki, Okada Yasushi, Sorokin Dmitry V.	4. 巻 1
2. 論文標題 A Method for Automatic Tracking of Cell Nuclei in 2D Epifluorescence Microscopy Image Sequences	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 2018 Eighth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA)	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/IPTA.2018.8608156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideyuki Yaginuma
2. 発表標題 細胞のエネルギー状態の定量的単一細胞解析を可能にするATPセンサー蛍光タンパク質“QUEEN”
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Yaginuma
2. 発表標題 定量的ATPイメージングを用いた細胞の代謝状態の空間的相関の解析
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳沼秀幸、岡田康志
2. 発表標題 単一細胞ATP イメージングにより明らかになった不均一な代謝状況下での頑健なエネルギー量調節
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideyuki Yaginuma, Yasushi Okada
2. 発表標題 Quantitative ATP imaging as a tool for investigating distribution, cell cell correlation and rapid dynamics of energy level at single cell resolution.
3. 学会等名 ASCB EMBO 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Alexandr Yu. Kondratiev, Hideyuki Yaginuma, Yasushi Okada, Dmitry V. Sorokin
2. 発表標題 A Method for Automatic Tracking of Cell Nuclei in 2D Epifluorescence Microscopy Image Sequences.
3. 学会等名 Eighth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA). 2018 Eighth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA). 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ロシア連邦	Lomonosov Moscow State University			