

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06099

研究課題名(和文) 真核生物の脱分化マーカーとしての細胞内pH計測

研究課題名(英文) Measurement of intracellular pH as a marker of dedifferentiation in eukaryotes

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・教授

研究者番号：50631777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性粘菌の多細胞体における柄細胞分化をモデルとし、分化と脱分化に伴うpH変化をイメージングすることで、真核生物の高感度な分化・脱分化マーカーとして捉える計測手法を確立した。タイムラプスpHイメージングにより、予定柄細胞への分化に伴う細胞質pHの低下、予定柄細胞から成長細胞への脱分化に伴う細胞質pHの上昇を捉えることに成功した。また、pHと同様に細胞性粘菌の柄細胞分化に働くと考えられているc-di-GMPシグナルの可視化を行い、発生過程におけるc-di-GMPシグナルの時空間ダイナミクスを明らかにした。これは世界で初めて真核生物内で働くc-di-GMPシグナルを可視化した成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞性粘菌の柄細胞分化をモデルとし、pH変化を高感度な分化・脱分化マーカーとして捉える計測手法を確立した。細胞質pH変化は細胞内の物理量の変化であり、細胞内のタンパク質、脂質等、さまざまな機能を変化させるため、細胞性粘菌の発生機構に限らず、細胞分化のグローバルなトリガーとして働いている可能性があり、他の真核生物種への応用が期待される。また、もう一つの成果として、世界で初めて真核生物内で働くc-di-GMPシグナルの可視化に成功した。c-di-GMPは原核生物のグローバルシグナルであるとともに、ヒト細胞において自然免疫応答を引き起こすことも知られているため、幅広い応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using stalk cell differentiation in a cellular slime mold as a model, we established an imaging method to capture pH changes associated with differentiation and dedifferentiation as a highly sensitive marker of differentiation and dedifferentiation in eukaryotes. By time-lapse pH imaging, we succeeded in capturing the decrease in cytosolic pH associated with differentiation into prestalk cells and the increase in cytosolic pH associated with dedifferentiation from prestalk cells to growing cells. In addition, we visualized c-di-GMP signaling, which is thought to be involved in the stalk cell differentiation in cellular slime molds as well as pH, and clarified the spatiotemporal dynamics of c-di-GMP signal during development. This is the first achievement in the world to visualize c-di-GMP signal working in eukaryotes.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞分化 脱分化 細胞内pH シグナル伝達 蛍光イメージング c-di-GMP

1. 研究開始当初の背景

細胞内 pH の制御は、細胞にとって必須のメカニズムである。生細胞の細胞質 pH は、種を問わず中性付近の pH7.5 程度に保たれている。一方、細胞内小器官によっては特有の酸性環境を保つことで、各器官の機能を維持していることが知られている。このような細胞内の pH 制御機構は、細胞の発生や分化においても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。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壤中に生息する真核微生物で、通常はアメーバ状態の単細胞生物として分裂増殖しているが、飢餓に陥ると、cAMP を分泌することで周辺の細胞どうしが集合して移動体と呼ばれる多細胞体を形成する。移動体は最終的に孢子として生き残る細胞と、それを支えるために細胞死する運命の柄細胞からなる子実体を形成する。このような大きく 2 状態へのシンプルな細胞分化を含む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。さらに、細胞性粘菌の多細胞体を物理的に個々の細胞に解離させることで、遺伝子発現が単細胞状態へと脱分化することが知られている。子実体の形成過程における柄細胞と孢子への分化は、細胞質 pH 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と考えられている。つまり、細胞質 pH が低下すると柄細胞への分化が誘導され、細胞質 pH が高いと柄細胞への分化が抑制されることが侵襲的な実験により示唆されている [1]。しかし、インタクトな細胞内での pH 変化の存在は未解明であった。我々はこれまでに、自ら開発した高感度 pH 感受性蛍光タンパク質プローブを利用することで、高時空間分解能での細胞質 pH 変化のタイムラプス計測を可能にし、細胞性粘菌の予定柄細胞分化に伴う細胞質 pH の低下を可視化することに成功している (図 1)。このことは細胞質 pH を指標とすることで、細胞分化および脱分化における細胞間の違いを明確に可視化できることを強く示唆している。

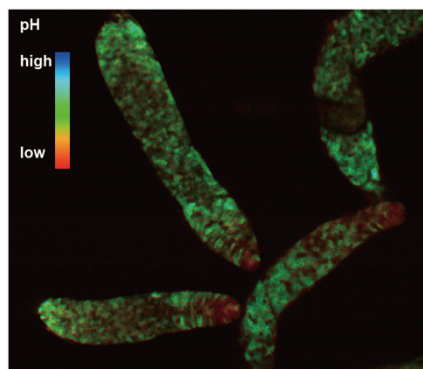


図 1. 細胞性粘菌の多細胞体における細胞質 pH イメージング

2. 研究の目的

細胞質 pH 変化は細胞内の物理量の変化であり、細胞内のタンパク質、脂質、小分子化合物等、さまざまな機能を変化させることになるため、細胞性粘菌の発生機構に限らず、細胞分化のグローバルなトリガーとして働いている可能性がある。本研究では、細胞性粘菌の柄細胞分化をモデルとし、真核生物の分化と脱分化に伴う pH 変化を、高感度な分化・脱分化マーカーとして捉える計測手法を確立し、pH を指標とした分化・脱分化の解析により、分化・脱分化の分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、細胞性粘菌の柄細胞分化と、予定柄細胞から成長細胞への脱分化を細胞質 pH を指標として可視化する。研究は以下の研究計画に従って実施した。

(1) pH 感受性蛍光タンパク質を用いた分化・脱分化過程の 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。我々はこれまでに、pH 感受性赤色蛍光タンパク質と緑色蛍光タンパク質を融合した新規の高感度レシオメトリックプローブを開発しており、細胞質 pH が 6.5~7.5 程度の細胞性粘菌内で非常に高感度な pH イメージングを達成している [Morimoto *et al.*, 投稿準備中] (図 1)。これを用いることで、長時間タイムラプス pH 計測が可能であるため、細胞性粘菌の孢子と柄細胞への発生に伴う細胞質 pH 変化を 1 細胞レベルでの高時空間分解能タイムラプス計測を行った。細胞性粘菌は飢餓状態にして細胞が集まり始めてから 5 時間程度で細胞競合を経た分化が完了するため、十分に計測可能である。また、多細胞体を解離させることで予定柄細胞と予定孢子細胞に分化した細胞群を脱分化させ、脱分化の過程で、細胞質 pH がどのように変化するかを計測した。

(2) 柄細胞分化シグナル c-di-GMP の可視化

サイクリック di-GMP (c-di-GMP) は、原核生物であるバクテリアのセカンドメッセンジャーとして広く機能しており、バイオフィーム形成、べん毛運動など、さまざまなバクテリアの機能に働いているが、これまで c-di-GMP は原核生物のみにおいて合成される物質だと考えられていたため、微生物学においてのみ注目されていた。しかし、近年、c-di-GMP 自体がヒト細胞において自然免疫応答を引き起こすことや、真核生物である細胞性粘菌が分化制御のために c-di-GMP の合成経路をもっていることなどが明らかとなり [2]、c-di-GMP シグナル研究の領域が広

がりつつある。本研究では、**c-di-GMP** シグナルと **pH** シグナルが柄細胞分化に対して同じような働きをしているのかを分子機構から明らかにするため、バクテリア細胞内の **c-di-GMP** 濃度を検知するために開発された **FRET** プローブ[3]を細胞性粘菌に導入し、発生過程における **c-di-GMP** シグナルの変化をタイムラプス計測した。

4. 研究成果

(1) 分化・脱分化過程の pH イメージング

細胞性粘菌は飢餓状態になると約 10 万個の細胞が 1 箇所に集まって、マウンドと呼ばれる細胞塊を形成し、次第に前後極性を持って移動する移動体へと移行する。移動体前方部の細胞群は後に柄細胞となる予定柄細胞へと分化し、後方は予定胞子細胞となる。pH 感受性蛍光タンパク質を発現させた細胞の発生過程をタイムラプス計測することにより、マウンド後期から一部の細胞で明確な細胞質 pH の低下が見られようになり、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。さらに分化が進み、移動体中では、前方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、予定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、移動体になって予定柄細胞と予定胞子細胞へと分化した多細胞体を解離させ、脱分化を誘導した前後での細胞質 pH を時系列計測したところ、解離直後は、予定胞子細胞群と予定柄細胞群に該当する細胞質 pH のピークが 2 つあったものが、脱分化が進んだ数時間後には、予定柄細胞群に対応する低 pH 細胞のピークが激減した。これは、予定柄細胞の脱分化にともなって細胞質 pH が上昇していることを示している。

(2) 柄細胞分化シグナル c-di-GMP の可視化

分化マーカーのコントロールとして、柄細胞への分化トリガーとして働くことが知られている **c-di-GMP** の多細胞体内での可視化を行った。バクテリア由来の **FRET** 蛍光プローブを細胞性粘菌に導入し、発生に伴う **c-di-GMP** シグナルの変動を計測したところ、移動体の先端で **c-di-GMP** シグナルが局所的に上昇することを明らかにした (図 2) [4]。また、発生過程におけるタイムラプス計測から、多細胞体先端 (tip 領域) での **c-di-GMP** シグナルの上昇は、飢餓処理から 20 時間ほど経った移動体後期の柄細胞形成期に起こっていることが明らかとなった (図 3)。過去の研究報告から **c-di-GMP** 合成酵素である **DgcA** の遺伝子発現は予定柄細胞領域全体で活性化していることがわかっており [2]、これは、今回の tip 領域のみでのシグナル上昇とは空間的に一致しない。一方で、**c-di-GMP** シグナルの下流で柄細胞分化の直接的なトリガーとなる **cAMP** シグナルの合成酵素は tip 領域に強く局在することが示されており [5]、今回の結果はこの空間的配置と一致する。これらのことから、**DgcA** が局所的に活性化することで **c-di-GMP** シグナルが tip 領域でのみ合成され、この局在性が **cAMP** 合成の局在性につながっているものと考えられる。

これまでに **c-di-GMP** 合成酵素をもつ真核生物として知られているのは、細胞性粘菌だけであるため、今回の成果は、世界で初めて真核生物内で働く **c-di-GMP** シグナルを可視化したものである [4]。tip 領域のみで活性化する **c-di-GMP** シグナル (図 2) に対して、細胞質 pH の低下は比較的に予定柄細胞領域全体で起こるため (図 1)、シグナルの局在性は一致しておらず、細胞分化に伴う pH 変動は、**c-di-GMP** シグナルとは異なるシグナル由来であることが示唆された。今後は、両者の同時計測を進め、分化・脱分化機構のさらなる分子機構の解明を行っていく。

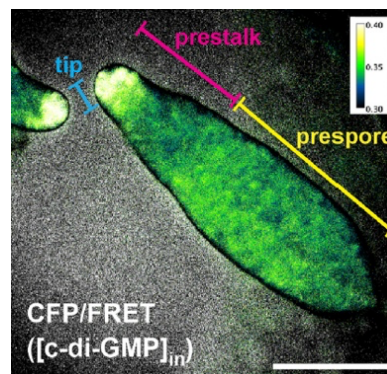


図 2. 細胞性粘菌の多細胞体における **c-di-GMP** イメージング

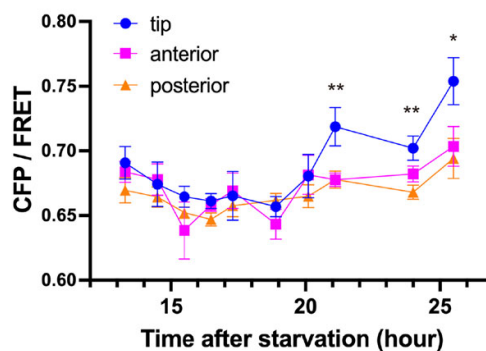


図 3. 細胞性粘菌の分化過程における **c-di-GMP** シグナルの変動

<引用文献>

1. Gross *et al.*, Nature. 303: 244–245 (1983)
2. Chen *et al.*, Nature 488: 680–683 (2012)
3. Christen *et al.*, Science 328: 1295–1297 (2010)
4. Ide *et al.*, Front Cell Dev Biol. 11:1237778 (2023)
5. Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114: 516–521 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Morimoto Yusuke V., Minamino Tohru	4. 巻 2646
2. 論文標題 Measurements of the Ion Channel Activity of the Transmembrane Stator Complex in the Bacterial Flagellar Motor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology	6. 最初と最後の頁 83-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3060-0_8	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 Minamino Tohru, Kinoshita Miki, Morimoto Yusuke V., Namba Keiichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Activation mechanism of the bacterial flagellar dual-fuel protein export engine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v19.0046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimura Hidenori, Morimoto Yusuke V., Hirayama Yusei, Ueda Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Calcium responses to external mechanical stimuli in the multicellular stage of Dictyostelium discoideum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16774-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu Jun, Koizumi Nobuo, Morimoto Yusuke V., Ozuru Ryo, Masuzawa Toshiyuki, Nakamura Shuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Light dependent synthesis of a nucleotide second messenger controls the motility of a spirochete bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10556-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Tohru, Morimoto Yusuke V., Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 118
2. 論文標題 Membrane voltage-dependent activation mechanism of the bacterial flagellar protein export apparatus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2026587118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2026587118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Tohru, Morimoto Yusuke V., Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Multiple Roles of Flagellar Export Chaperones for Efficient and Robust Flagellar Filament Formation in Salmonella	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 756044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.756044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ide Hayato, Hayashida Yukihisa, Morimoto Yusuke V.	4. 巻 11
2. 論文標題 Visualization of c-di-GMP in multicellular Dictyostelium stages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1237778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1237778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Tohru, Nakane Daisuke, Nakamura Shuichi, Kiyama Hana, V. Morimoto Yusuke, Miyata Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Frontiers of microbial movement research	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e200033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v20.0033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 森本雄祐, 橋村秀典	4. 巻 55
2. 論文標題 細胞性粘菌におけるシグナル伝達の高感度な可視化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 林田 幸久, 森本 雄祐
2. 発表標題 シグナル伝達機構解明のための巨大細胞利用
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手 捷人, 森本 雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌におけるc-di-GMPシグナルの解析
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山 一樹, 森本 雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌のcAMPシグナルにおけるレチナールの効果
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山 信司, 森本 雄祐
2. 発表標題 光照射による多細胞システムの運動制御
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山 信司, 森本 雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌による移動経路判断に関する研究
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第12回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林田幸久, 森本雄祐
2. 発表標題 シグナル伝達機構解明のための巨大化細胞利用
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第12回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林田幸久, 森本雄祐
2. 発表標題 シグナル伝達機構解明のための巨大化細胞の利用
3. 学会等名 第64回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山 信司, 森本 雄祐
2. 発表標題 光照射による多細胞システムの運動制御
3. 学会等名 第64回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手 捷人, 森本 雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌におけるc-di-GMPシグナルの解析
3. 学会等名 第64回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本雄祐, 橋村秀典, 平山悠成, 上田昌宏
2. 発表標題 細胞性粘菌の多細胞システムにおける機械刺激応答の分子機構
3. 学会等名 日本顕微学会 第77回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手捷人, 森本雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌における細胞内c-di-GMPシグナルの解析
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第11回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山一樹, 森本雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌の飢餓状態におけるレチナールの作用
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第11回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本雄祐
2. 発表標題 サルモネラのべん毛運動と走化性
3. 学会等名 第59回日本生物物理学学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林田幸久, 森本雄祐
2. 発表標題 シグナル伝達機構解明のための巨大化細胞の利用
3. 学会等名 2022年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本雄祐
2. 発表標題 バクテリアべん毛関連タンパク質の光操作ツールへの応用
3. 学会等名 2021年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukihisa Hayashida, Yusuke V. Morimoto
2. 発表標題 Use of giant cells to study intracellular signal transduction mechanisms
3. 学会等名 The 20th International Microscopy Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinji Yokoyama, Yusuke V. Morimoto
2. 発表標題 Control of cell motility in a multicellular system by photodamage
3. 学会等名 The 20th International Microscopy Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田幸久, 森本雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌における1細胞内シグナル伝達の解析
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会第13回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田幸久, 森本雄祐
2. 発表標題 巨大化細胞を用いた一細胞内シグナル伝達機構の研究
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五味淵由貴, 林田幸久, 森本雄祐, 安永卓生
2. 発表標題 単細胞期・多細胞期における細胞内構造の可視化
3. 学会等名 第65回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田幸久, 森本雄祐
2. 発表標題 1 細胞内シグナル伝達機構解明のための巨大化細胞の利用
3. 学会等名 第65回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田幸久, 五味淵由貴, 安永卓生, 森本雄祐
2. 発表標題 巨大化細胞を用いた細胞内シグナル伝達の拡張計測
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森本雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌の単細胞と多細胞体におけるシグナル伝達を見る
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke V. Morimoto
2. 発表標題 Signal transduction in unicellular and multicellular stages of Dictyostelium
3. 学会等名 NanoBioCoM2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森本雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌の単細胞と多細胞体におけるシグナル伝達の可視化
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>細菌の“毒針”は「膜電位」の上昇で動き出す https://www.iizuka.kyutech.ac.jp/news/to-alumni/2021/0528-75776.html</p>

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
---------	---------