

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840062

研究課題名(和文)細胞内pHとセカンドメッセンジャーの協調的な振る舞いの解析

研究課題名(英文)Study on the coordinated roles of intracellular pH and second messenger

研究代表者

森本 雄祐 (Morimoto, Yusuke)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50631777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、cAMP、カルシウムイオン、イノシトールリン脂質などのセカンドメッセンジャーを介した細胞内シグナル伝達において、細胞内pHがどのような役割を担っているかを解明することを目的とし、蛍光イメージングを中心とした技術を用いて、1細胞レベルでの細胞内pHとセカンドメッセンジャーの同時計測を行った。研究の過程において、高感度でのpH計測が可能な新規FRET型pH感受性蛍光タンパク質を開発することができた。本プローブ等を用いた実験により、細胞性粘菌の1細胞期や集合期における自発的cAMP振動に対応して、プロトンなど細胞内イオン濃度の周期的変化が計測された。

研究成果の概要(英文)：Intracellular pH plays important roles in the signal transduction via second messengers such as cAMP, calcium ion and phosphatidylinositol. However it remains unknown how intracellular pH change works in the cellular signal transduction. To investigate the role of intracellular pH, we constructed Dictyostelium discoideum strain expressing pH-sensitive fluorescent protein and observed cytoplasmic pH changes and second messengers simultaneously by fluorescence microscopy. And we developed new FRET based pH-sensitive fluorescent protein, which works as a highly sensitive pH probe. We could observe periodical changes of intracellular ion concentrations following spontaneous cAMP oscillations.

研究分野：生物物理

キーワード：生物物理 シグナル伝達 細胞性粘菌 細胞内pH セカンドメッセンジャー

1. 研究開始当初の背景

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壤中に生息する真核微生物で、通常はアメーバ状の単細胞生物として分裂増殖しているが、飢餓状態に陥ると、cAMP を分泌することによって細胞が集合して多細胞体を形成する。このことから細胞性粘菌は、分化や走化性研究のモデル生物として扱われており、国内外の研究グループによって、その細胞内シグナル伝達機構について生化学的、生物物理学的手法によって活発に研究がなされている。細胞性粘菌の単細胞は、cAMP を感受するとそれに応答して細胞内 pH が上昇し、細胞の運動速度が上昇する。逆に細胞内 pH が低下すると、運動速度も低下することが知られている (van Duijn and Inouye, PNAS. 1991)。細胞内 pH の制御に大きく寄与しているとされる Na^+/H^+ 交換輸送体 NHE1 が細胞前方に局在していることから、細胞内で pH 勾配を形成し、細胞極性が形成されていると考えられる。これらのことから、細胞性粘菌の走化性には、細胞内 pH 変化が重要な要因として働いていると考えられる。また、細胞が集合する際に cAMP を感受すると、 Ca^{2+} の細胞内への流入が引き起こされ、それが細胞から細胞へと伝わる時に Ca^{2+} 濃度の変化が周期的な波形振動として伝わるのが Ca^{2+} 蛍光プローブを用いて可視化されており、この Ca^{2+} 流入に伴ってプロトン(H^+)の排出が起こっているとされているが、それぞれのイオン濃度変化を実際に 1 細胞レベルで可視化することは行われていない。

以上のように、細胞内 pH 変化およびセカンドメッセンジャーは細胞内のシグナル伝達に非常に重要であることが示唆されるが、pH 変化とセカンドメッセンジャーがどのようにして協調的に働いているのか、詳細なシグナル伝達の分子機構は未解明である。

2. 研究の目的

細胞内 pH は細胞のシグナル伝達にとって、重要な要因の一つとして働いている。しかしながら、実際にはシグナル伝達における細胞内 pH 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 cAMP、 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と細胞内 pH の関係が明らかでないためである。本研究課題では、細胞内 pH と cAMP、イノシトールリン脂質などのシグナル伝達物質を同時計測することにより、細胞内 pH の細胞内シグナル伝達における役割を明らかにすることを目的として、研究計画を実施した。

3. 研究の方法

(1) pH 感受性蛍光蛋白質を用いた高感度細胞内 pH イメージング

過去の細胞性粘菌研究における細胞内 pH 計測には、pH 感受性蛍光色素が主に用いられている。しかし、色素を導入する作業を省き、

より非侵襲な状態での細胞内 pH を測定するためには、pH 感受性蛍光蛋白質の利用が最適である。緑色蛍光蛋白質フルオリンは pH 感受性が高く、レシオメトリック蛍光 pH プローブとしての利用が可能である (Miesenböck *et al.*, Nature. 1998)。細胞性粘菌の細胞内 pH が 6.5~7.5 程度であることに對し、フルオリンは pH5.5~8.5 において高い pH 感受性を示すため、細胞内 pH の計測に最適である。細胞性粘菌の遺伝子操作手法はすでに確立されているため、容易に発現系を作成できる。本研究では、顕微鏡下での厳密な検量線を作成し、細胞内 pH 変化を定量的に経時計測可能にする。また、より高感度な pH 感受性蛍光タンパク質プローブを開発することにより、高時空間分解能 pH 計測を目指す。

(2) 細胞内 pH とセカンドメッセンジャーの蛍光顕微鏡を用いた計測

細胞内 pH 変化とセカンドメッセンジャーを同時計測するための細胞株を構築する。イノシトールリン脂質については、PIP3 に結合する PH ドメインに蛍光蛋白質を融合したものをプローブとして用いる。

また、cAMP の刺激を加えたときに細胞内 pH がどこから変化し、どのように変化が伝播するかを可視化する。より詳細な解析を行うために、cAMP 受容体 cAR1 にフルオリン蛋白質を融合させた cAR1-pHluorin 発現細胞株を用いて、cAMP と細胞内 pH の関係をより高空間分解能にて計測する。さらに、細胞内 pH 勾配の形成に寄与すると考えられている遺伝子を欠損した細胞株に pH プローブタンパク質を発現させ、上記と同様の pH 応答を計測することにより、細胞内 pH 制御機構の詳細を解明する。

蛍光イメージングを中心とした実験によって得られた結果をもとに、細胞内 pH 変化を含むシグナル伝達機構のモデルを構築し、細胞内シグナル伝達における細胞内 pH とセカンドメッセンジャーの協調的な関係を明らかにすることを目指す。

4. 研究成果

(1) pH 感受性蛍光タンパク質フルオリンを用いた細胞内 pH 測定

細胞内 pH 測定を顕微鏡下で行うために、pH 感受性蛍光タンパク質フルオリンを細胞質中に発現する細胞株を作製した。これにより、細胞性粘菌の細胞内 pH を 1 細胞レベルで定量的にタイムラプス計測することが可能となった (図 1)。この計測系を用いて、イノシトールリン脂質が自発的な局在を示す条件や、cAMP の刺激を加えた際などの pH 変化の計測を行ったが、顕著な pH 変化が見られる条件は見つからなかった。可能性としては、pH 変化の計測を行う条件検討が不十分であるか、もしくは pH プローブが十分な感度をもっていないことが考えられる。

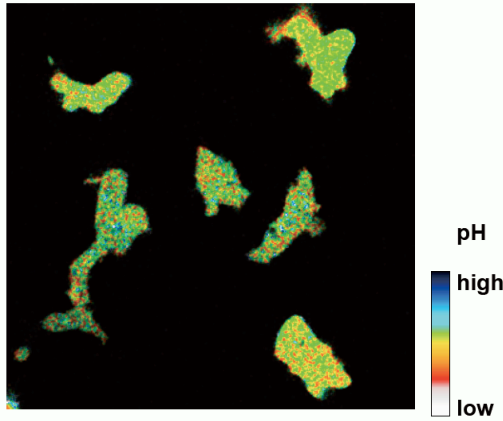


図1. フルオリン発現株による細胞内 pH イメージング

(2) 高感度 pH 感受性蛍光タンパク質プローブの開発

pH 計測の精度を向上させることを目的として、より高感度での pH 計測が可能な pH プローブの開発に取り組んだ。1 細胞内の細胞内 pH の定量計測は、pH 感受性蛍光タンパク質を用いたレシオメトリックイメージング法によって可能である。これまでに、緑色蛍光タンパク質フルオリン、赤色蛍光タンパク質 Keima-Red などが 2 波長励起 1 波長蛍光型の pH プローブとして広く利用されている。しかし、この特性のプローブは 2 波長励起を行うために励起光の切り替えを行うことで時間ズレがどうしても生じてしまうため、細胞動態などとの高速度での同時計測が困難である。そこで、高時間分解能での定量計測のためには、検出器を 2 つにすることで完全に同時計測が可能な 1 波長励起 2 波長蛍光法による計測が有用である。そこで、細胞動態と細胞内 pH の高時空間分解能計測のために、1 波長励起 2 波長蛍光型の蛍光タンパク質 pH プローブの開発を行った。これによって作成された新規 FRET 型 pH 感受性蛍光タンパク質は、pH5~9 の間において、pH 変化を目視でも確認できるほどの蛍光輝度変化を示す pH プローブとなった。今回開発したプローブは、様々な生物試料でのタイムラプス pH 計測に有用なプローブとして応用が期待できる。

(3) セカンドメッセンジャーと細胞内 pH の同時計測

pH 感受性蛍光タンパク質と、PIP3 が結合する PH ドメインを蛍光蛋白質でラベルした融合タンパク質を共発現する細胞株を作製し、細胞内 pH とイノシトールリン脂質の同時計測を行った。こちらの実験では、PIP3 の局在に相関した細胞質 pH の変化はやはり観察されなかった。一方、開発したプローブを用いた実験により、細胞性粘菌の 1 細胞期や集合期における自発的 cAMP 振動に対応した細胞内 pH の周期的変動らしき変化が計測さ

れた。しかし、非常に微弱な変動であるため、cAMP 振動にともなう運動変化が蛍光強度等に影響している可能性もあり、明確な結果とは言えない。以上のように、pH 計測の視点からだけでは明確な結果を得ることが難しいと判断し、膜電位の計測系の確立を検討した。細胞性粘菌の静止膜電位の大部分は、プロトンの濃度勾配によって形成されているものと考えられている (van Duijn and Vogelzang, 1989)。このため、膜電位の計測により間接的にプロトンの移動、つまり pH 変化を計測できるのではと考えた。膜電位感受性色素を用いた実験の結果、cAMP 振動にともなって、膜電位が周期的に脱分極する様子が明確に観察された。この結果は、cAMP の細胞内シグナル伝達にともなって、プロトンを中心としたイオンの移動が起こっていることを示唆する結果である。しかしながら、この変化がプロトンの移動だけに寄与するものなのか、他のイオンの移動が大きく寄与しているのかが明らかにできていない。今後はプロトンだけではなく、他のイオン濃度変化との関わりも明らかにすることによって、シグナル伝達における細胞内 pH 変化の役割を明らかにしていく必要がある。

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 8 件)

- ① Shuichi Nakamura, Yusuke V. Morimoto and Kudo Seishi (2015) Lactose fermentation product by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, acetate, inhibits the motility of flagellated pathogenic bacteria. **Microbiology** 161:701-707. (査読有)
DOI: 10.1099/mic.0.000031
- ② Tohru Minamino, Yusuke V. Morimoto, Miki Kinoshita, Phillip D. Aldridge and Keiichi Namba (2014) The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. **Scientific Reports** 4: 7579. (査読有)
DOI: 10.1038/srep07579
- ③ [#]Fan Bai, [#]Yusuke V. Morimoto, Shinsuke D. J. Yoshimura, Noritaka Hara, Nobunori Kami-ike, Keiichi Namba and Tohru Minamino (2014) Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. **Scientific Reports** 4: 6528. ([#]These authors contributed equally.) (査読有)
DOI: 10.1038/srep06528
- ④ Yusuke V. Morimoto, Mariko Ito, Koichi D. Hiraoka, Yong-Suk Che, Fan Bai, Nobunori Kami-ike, Keiichi Namba and

- Tohru Minamino (2014) Assembly and stoichiometry of FliF and FlhA in *Salmonella* flagellar basal body. **Molecular Microbiology** 91:1214-1226. (査読有)
DOI:10.1111/mmi.12529
- ⑤ Yong-Suk Che, Shuichi Nakamura, Yusuke V. Morimoto, Nobunori Kami-ike, Keiichi Namba, and Tohru Minamino. (2014) Load-sensitive coupling of proton translocation and torque generation in the bacterial flagellar motor. **Molecular Microbiology** 91: 175-184. (査読有)
DOI: 10.1111/mmi.12453
- ⑥ Yusuke V. Morimoto and Tohru Minamino (2014) Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. **Biomolecules** 4: 217-234. (査読有)
DOI:10.3390/biom4010217
- ⑦ David J. Castillo, Shuichi Nakamura, Yusuke V. Morimoto, Yong-Suk Che, Nobunori Kami-ike, Seishi Kudo, Tohru Minamino and Keiichi Namba (2013) The C-terminal periplasmic domain of MotB is responsible for load-dependent control of the number of stators of the bacterial flagellar motor. **BIOPHYSICS** 9: 173-181. (査読有)
DOI: 10.2142/biophysics.9.173
- ⑧ Akihiro Kawamoto, Yusuke V. Morimoto, Tomoko Miyata, Tohru Minamino, Kelly T. Hughes, Takayuki Kato, and Keiichi Namba (2013) Common and distinct structural features of *Salmonella* infectisome and flagellar basal body. **Scientific Reports** 3: 3369. (査読有)
DOI: 10.1038/srep03369

[学会発表] (計12件)

- ① 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞性粘菌の走化性における細胞内 pH の役割, 日本細胞性粘菌学会第4回例会, 仙台, 東北大学片平さくらホール, 2014年10月11日
- ② 森本雄祐, 上田昌宏. Effect of cytoplasmic local pH on the cell migration, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 札幌コンベンションセンター, 2014年9月27日
- ③ 森本雄祐, 上田昌宏. Changes in intracellular pH mediate the cell migration, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 国立京都国際会館, 2013年10月28日
- ④ 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞性粘菌における細胞内 pH と細胞運動の関係, 日本細胞性粘菌学会第3回例会, 京都, 京都大学理学研究科セミナーハウス, 2013年10月12日

- ⑤ 森本雄祐, 上田昌宏. 細胞内 pH をシグナルとした細胞運動, 日本顕微鏡学会第69回学術講演会, 大阪, ホテル阪急エキスポパーク, 2013年5月21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
基礎科学特別研究員
研究者番号: 50631777

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし