

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06159

研究課題名(和文)シグナル伝達に働くイオン選択性の解明

研究課題名(英文)Studies on ion selectivity in cellular signaling

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・准教授

研究者番号：50631777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、細胞性粘菌のシグナル伝達機構をモデルとして、分子生物学的手法と光遺伝学および生物物理学的手法により、真核生物のシグナル伝達におけるイオン選択的な膜電位や細胞質イオン濃度変化の役割を明らかにすることを目的とした。高感度イメージング技術の確立し、さまざまな生命現象とイオン濃度変動の同時計測を実施したことにより、細胞性粘菌の機械刺激に関わるカルシウムシグナル経路を特定した。また、細胞性粘菌の分化および脱分化における細胞質pH変化を検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したイメージング技術は、細胞性粘菌の研究だけでなく、原核生物から真核生物に至るまでの幅広い研究に応用できるものである。実際に本課題において、バクテリアの計測に応用した研究によって成果が得られている。そのため、基礎生命科学から臨床研究までの幅広い分野での応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using the signal transduction mechanism of cellular slime mold as a model, we aimed to clarify the role of ion-selective membrane potential and cytoplasmic ion concentration changes in eukaryotic signal transduction. Simultaneous measurements of various biological phenomena and ion concentration fluctuations were performed to identify the calcium signaling pathway involved in mechanical stimulation of cellular slime mold. We also succeeded in detecting cytoplasmic pH changes during differentiation and dedifferentiation of cellular slime mold.

研究分野：生物物理学

キーワード：シグナル伝達 膜電位 蛍光イメージング 走化性 光遺伝学 イオン選択性 細胞運動 細胞分化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質などを介した細胞膜内外へのイオンの流れが発生すると、膜電位の変化だけではなく、イオンの流れ自体または特定のイオンの細胞内濃度変化が細胞機能へと影響を与える。しかし、生細胞内において、膜電位およびイオン濃度変化それぞれがどのような働きを担っているかを明らかにするには阻害剤などを用いる大まかな実験系が主体であり、さまざまなイオンの細胞内濃度を選択的に操作および計測するという実験はあまり行われていない。

細胞性粘菌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、飢餓状態になると自身が産生する走化性物質である cAMP に対して集まることで多細胞体を形成するため、走化性および発生のモデル生物として扱われている。研究代表者らはこれまでに、細胞性粘菌における高感度な膜電位イメージング法の確立により、走化性シグナル伝達に伴ってダイナミックな膜電位変化が起こることを明らかにしている。この自発的膜電位変化は細胞性粘菌どうしの cAMP シグナル伝達に追従して、複数種類の細胞質イオン濃度が周期的に変動することによるものである。しかし、複数種類のイオンそれぞれが走化性シグナル伝達や、その他の細胞ダイナミクスにどのように働いているのか、さらにはその分子機構の詳細は未解明であった。

## 2. 研究の目的

シグナル伝達などの生命現象に伴って、細胞膜を介したイオンの流れが生じることはバクテリアからヒト細胞に至るまで幅広く知られているが、これによって起こる膜電位や細胞質イオン濃度の選択的な変動が細胞機能へどのように影響しているかは解明できていない。本課題では、研究代表者がこれまでにバクテリアや細胞性粘菌を用いて開発してきた膜電位および各種イオンの高感度イメージング手法と、細胞性粘菌への応用を確立している細胞内イオン濃度の光操作手法を組み合わせることにより、膜電位変動に関わるイオン流と細胞機能の関係を分子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 高感度イオンイメージング

細胞内の各イオン濃度を最も高感度で定量的に計測できる手法を確立することを目指した。細胞質 pH と  $\text{Ca}^{2+}$  の計測については、これまでの研究から蛍光タンパク質プローブが最も有用であることが明らかになっており、細胞質 pH については新規レシオメトリックプローブを用いた高感度な定量計測手法を適用する。一方、膜電位、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  については有機色素プローブを用いた計測手法をバクテリアの実験系で確立しており、本研究では、バクテリアでの計測手法を応用することにより、細胞性粘菌においても高感度での定量計測手法を確立する。

### (2) イオン選択的な光操作

細胞機能とイオン濃度の関係を明確にすることを目的とし、イオン選択性を考慮した光操作を行う。チャネルロドプシン 2 (ChR2) は、光刺激に応じて陽イオンを効率よく細胞内へと流入させ、細胞の膜電位を脱分極させることが可能である。また、バクテリオロドプシンは光刺激によりプロトン ( $\text{H}^+$ ) 等の陽イオンを細胞外へと排出するプロトンポンプとして働くため、膜電位の過分極制御に利用できる。ChR2 は形質膜への移行効率が低いことで知られているが、研究代表者らは、細胞性粘菌がもつ膜タンパク質と融合させることにより、粘菌細胞内で安定化した ChR2 発現系を作成することに成功している。複数種類の光操作ツールを複合的に用いて、細胞応答の違いを比較することにより、細胞機能とイオン選択性の関係を明らかにする。さらに、各種光操作ツールタンパク質を発現する細胞を光刺激したときに変化する細胞内イオン濃度を高時空間分解能で経時計測する。イオンチャネル型ツールを用いた計測において最も影響を考慮しなければいけないことは、 $\text{H}^+$  の流れによる pH 変化である。これに対し、研究代表者がこれまでに開発した高感度計測手法を応用することにより、高い精度で pH の影響を測定・排除することが可能である。

### (3) イオン選択的な光刺激による細胞機能の操作

イオン選択的な光操作手法を確立した後、光操作が細胞機能にどのような影響を与えるかを観察・計測することによって、細胞機能の分子メカニズムを明らかにする。

#### 【(3)-1. 細胞運動への影響】

これまでの計測結果から、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}^+$  の細胞内濃度変化は細胞運動へ影響することが示唆されている。しかし、詳細な分子機構は未解明であるため、これの解明を目的とし、光操作による細胞運動への影響を 1 細胞レベルで計測する。運動などの細胞機能への効果を観察する際には、実際に細胞内イオン濃度変化との同時計測を行うことにより、光操作の影響を明確にする。光刺激量に従った細胞の運動速度および直進性の変化を定量し、細胞運動に影響を及ぼすイオン濃度変化量を明らかにする。また、LifeAct を用いた F-アクチンの蛍光観察を光刺激と同時にすることで、光刺激の細胞骨格への影響を明らかにする。

### 【(3)-2. cAMP 合成への影響】

各イオン流の光操作と細胞内 cAMP 濃度の同時計測を行うことで、cAMP 合成へのイオン濃度変化の影響を明確にする。cAMP のモニターには細胞性粘菌の計測に最適であることが判明している cAMP プロブ Flamindo2 (緑色) および Pink-Flamindo (赤色) を用いる。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内カルシウムイオン濃度変動の役割

蛍光プローブタンパク質 GCaMP6s を用いたイメージングにより、外部から機械刺激を与えることで、細胞性粘菌の多細胞体を構成する各細胞の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が一過的に上昇することが明らかになった (図 1)。また、機械刺激に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  の流入経路を特定するために、小胞体に存在する IP3 受容体 IplA を欠損した株を用いて多細胞体の計測を行ったところ、野生型株に比べて  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの応答効率が顕著に低下した。また、細胞外部からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の寄与を確認するために、 $\text{Ca}^{2+}$  のキレート剤として働く EGTA を添加した寒天培地上で多細胞体に機械刺激を加えると、刺激に応答した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇のピークが遅延する傾向が見られた。ヒト細胞にも保存されている機械受容チャネル Piezo を欠損した株の計測もまた、EGTA を用いた計測と同様の結果が得られた。さらに、EGTA を加えた寒天培地上で *iplA* 欠損株の多細胞体に機械刺激を与えた場合には、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化は見られなかった。これらの結果により、多細胞体の機械刺激応答に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇には、Piezo を介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が早い応答を可能にしており、IP3 受容体による小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  の流れが応答効率を上げていることが示唆された。機械刺激に応答して、多細胞体全体のダイナミクス制御が行われていることから、今後は、メカノセンシングと通常の細胞集団運動において  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルをどのように使い分けているのか、または  $\text{Ca}^{2+}$  とそれ以外のシグナルをどのように併用しているのかを明らかにすることにより、多細胞システムの細胞集団運動におけるシグナル分子機構を解明していく必要がある。

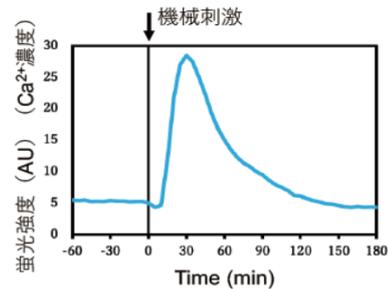


図 1. 細胞性粘菌多細胞体への機械刺激による細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の一過的上昇

### (2) 細胞内カルシウムイオン濃度の計測と応用

新規高感度 pH 感受性蛍光タンパク質プローブを利用した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行うことにより、細胞性粘菌の予定柄細胞分化に伴ってダイナミックな pH 変化が起きることを明らかにした。また、細胞性粘菌の多細胞体を乖離させて単細胞ごとに分けると、脱分化が誘導されることが知られている。このときの細胞質 pH をモニターすることにより、細胞性粘菌の脱分化過程においても、細胞質 pH が大きく変化していることが計測された。これらの結果は、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。

### (3) 細胞内 pH と膜電位の計測の応用

これまでに研究代表者らは、蛍光タンパク質を用いた細胞内 pH 計測と、蛍光色素を利用した膜電位計測を組み合わせることで、バクテリアの定量的な電気化学ポテンシャル計測手法を開発してきた。これらの計測手法を組み合わせることで、サルモネラの III 型タンパク質輸送装置の駆動エネルギーとして働くプロトン駆動力を異なる pH 条件下で定量した。プロトン駆動力は細胞内外の水素イオン濃度差による化学ポテンシャル勾配と細胞膜が保持する膜電位としての電気ポテンシャルの和である。細胞外 pH を 7.0 から 8.0 程度に上昇させても、生細胞の細胞内 pH は pH 恒常性によってほとんど変化しないため、化学ポテンシャル勾配 ( $\Delta\text{pH}$ ) は低下する。しかし、これに反して膜電位は上昇することが計測された。このとき、プロトン駆動力全体の値は低下するにも関わらず、III 型タンパク質輸送装置の活性が上がることを明らかにした (Minamino *et al.*, PNAS. 2021)。このことは、タンパク質輸送装置がイオンチャネルのように膜電位依存的に活性化する仕組みを持っていることを初めて明らかにしたものである。このことは、真核生物においてもタンパク質輸送やシグナル伝達を行っている膜タンパク質の中にも膜電位依存的に活性化しているものが存在していることを示唆する結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shin-Ichi Yamazaki, Hidenori Hashimura, Yusuke V. Morimoto, Yukihiro Miyanaga, Satomi Matsuoka, Yoichiro Kamimura, Masahiro Ueda	4. 巻 525
2. 論文標題 Talin B regulates collective cell migration via PI3K signaling in Dictyostelium discoideum mounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 372-377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.060	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 Mst Shaela Pervin, Go Itoh, Md Shahabe Uddin Talukder, Koushiro Fujimoto, Yusuke V Morimoto, Masamitsu Tanaka, Masahiro Ueda, Shigehiko Yumura	4. 巻 8
2. 論文標題 A study of wound repair in Dictyostelium cells by using novel laserporation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 7969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-26337-0	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 Yuya Suzuki, Yusuke V Morimoto, Kodai Oono, Fumio Hayashi, Kenji Oosawa, Seishi Kudo, Shuichi Nakamura	4. 巻 201
2. 論文標題 Effect of the MotA (M206I) mutation on torque generation and stator assembly in the Salmonella H <sub>+</sub> -driven flagellar motor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of bacteriology	6. 最初と最後の頁 JB. 00727-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00727-18	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 Hidenori Hashimura, Yusuke V. Morimoto, Masato Yasui, Masahiro Ueda	4. 巻 2
2. 論文標題 Collective cell migration of Dictyostelium without cAMP oscillations at multicellular stages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-018-0273-6	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 Yusuke V. Morimoto, Keiichi Namba, Tohru Minamino	4. 巻 10
2. 論文標題 GFP fusion to the N-terminus of MotB affects the proton channel activity of the bacterial flagellar motor in Salmonella	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10091255	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 Tohru Minamino, Yusuke V. Morimoto, Miki Kinoshita, Keiichi Namba	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 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 森本雄祐
2. 発表標題 生命機能を理解するための高感度細胞質pHイメージング
3. 学会等名 第43回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke V. Morimoto, Takuro Kawada, Masahiro Ueda
2. 発表標題 Detection of cell differentiation states without known signals in Dictyostelium
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本雄祐, 上田昌宏
2. 発表標題 細胞性粘菌のcAMPシグナルリレーを調節する膜電位変化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山悠成, 橋村秀典, 上田昌宏, 森本雄祐
2. 発表標題 細胞細胞性粘菌における機械刺激応答メカニズムの解明
3. 学会等名 第61回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井友美, 森本 雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌の脱分化過程における細胞質pH変化の計測
3. 学会等名 第61回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本雄祐, 川田拓朗, 上田昌宏
2. 発表標題 細胞性粘菌の分化に伴った細胞内環境遷移の可視化
3. 学会等名 第61回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山悠成, 橋村秀典, 上田昌宏, 森本雄祐
2. 発表標題 細胞細胞性粘菌における機械刺激応答メカニズムの解明
3. 学会等名 日本生体工ネルギー研究会第45回討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井友美, 森本 雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌の脱分化過程における細胞質pH変化の計測
3. 学会等名 日本生体工ネルギー研究会第45回討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋村秀典, 平山悠成, 上田昌宏, 森本雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌の多細胞体における機械刺激受容メカニズム
3. 学会等名 2020年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本雄祐, 上田昌宏
2. 発表標題 細胞性粘菌のcAMPシグナルリレーを調節する膜電位変化
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本雄祐, 上田昌宏
2. 発表標題 細胞性粘菌の細胞分化に伴う細胞質pH変化
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井友美, 森本雄祐
2. 発表標題 細胞性粘菌の脱分化に伴う細胞内pH変化の計測
3. 学会等名 日本顕微学会 第76回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomomi Usui, Yusuke V. Morimoto
2. 発表標題 Measurement of cytosolic pH changes during dedifferentiation of Dictyostelium cells
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会(国際学会)
4. 発表年 2020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機構
3. 学会等名 第62回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2020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体における機械刺激応答機構
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第46回討論会
4. 発表年 2020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