

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06873

研究課題名（和文）細胞内膜の膜電位イメージング法の確立とその生理機能の解明

研究課題名（英文）Establishment of endomembrane potential optical imaging

研究代表者

大河内 善史 (Okochi, Yoshifumi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90435818

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）：近年、細胞内小器官で機能する様々なイオンチャネルが同定され、その中には電位依存性イオンチャネルも存在することが明らかになった。これらの事実は、細胞膜と同様、細胞内膜においても膜電位シグナルが存在し、細胞機能を制御する可能性を示唆する。しかし、細胞内膜の膜電位を定量的に測定する技術が確立していない。本研究では、貪食細胞が病原菌を除去するために形成する食胞（ファゴソーム）に着目し、膜電位感受性蛍光タンパク質Merm2を発現するマクロファージ系培養細胞を作成した。そして、ファゴソームの膜電位変化を可視化し、おおよその膜電位を見積もることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、初めてファゴソームの膜電位がダイナミックに変化することが明らかになった。この結果は膜電位シグナルがファゴソーム機能を制御する可能性を示唆する。今後、この方法を用いてファゴソーム機能異常の原因を膜電位の観点から調べることで、ファゴソーム機能異常に起因する病気の原因の詳細を明らかにできると期待される。この結果は、また、リソソームなどの細胞内小器官の膜電位を測定する技術への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Several ion channels including voltage-gated ion channel has been identified in organelles, which suggests that membrane potential in endomembranes regulates organelle and whole cell functions. However, no reliable technique measuring membrane potential quantitatively has been established. In this study, we have developed a method measuring membrane potential in a living cell by using voltage probe Merm2. By focusing on phagosome, which is formed in phagocytes to eliminate pathogens from our body, we successfully visualized membrane potential change on phagosome and estimated membrane potential from fluorescent signal obtained.

研究分野：生理学

キーワード：膜電位 voltage probe ファゴソーム膜

1. 研究開始当初の背景

膜電位が細胞の恒常性維持に必要なだけでなくシグナルとして機能することは、細胞膜電位を詳細に記録することができる電気生理学的手法により明らかにされてきた。近年の遺伝学、分子生物学的アプローチにより、細胞内で機能する分子が次々と明らかにされ、その機能解析の結果、細胞内小器官にも固有の膜電位が存在していること、かつ、細胞内小器官の膜電位が変化する可能性が示唆された。すなわち、細胞膜と同様に、細胞内小器官においても、膜電位がその小器官の機能維持に関与するのみならず、膜電位シグナルを発信する場として機能する可能性が浮上した。しかしながら、細胞内小器官の膜電位を定量的に計測する技術は確立されておらず、in vitro系での評価、膜透過性の蛍光色素を用いた定性的な評価、そして、分子の機能から膜電位が推測されるに留まっている。したがって、本研究では、細胞内小器官の膜電位を定量的に計測できる系を確立し、膜電位と機能の機能連関を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 細胞内小器官の膜電位を計測するモデルとして貪食細胞の食胞(ファゴソーム)に着目し、細胞生理学的手法により細胞内の食胞の膜電位を測定する実験系を確立する、(2) この方法を用いてファゴソーム膜の膜電位変化を計測し、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ファゴソーム膜電位の可視化と蛍光強度の計測

当研究室で開発された FRET(Förster Resonance Energy Transfer)ベースの膜電位感受性蛍光タンパク Merm2 をマウスマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 に遺伝子導入し、安定株を樹立した(Merm2-RAW)。約 4 μ m のラテックスビーズを BSA 溶液と混ぜ、BSA を非特異的にビーズに結合させた後、抗 BSA 抗体を添加し、BSA 抗体付 IgG ビーズを作成した。このビーズを用いて Fc 受容体依存的なファゴサイトーシスを誘導した。カバーガラスに接着した Merm2-RAW 細胞をマグネットチャンバーに設置し、温度制御機能付き蛍光顕微鏡下で蛍光を観察した。CFP(Ex420-440, DM465, Em483/32)および YFP(Ex420-440, DM465, Em542/27)の各蛍光は、フィルターホイール内に設置した蛍光フィルターを切り替えることで取得した。実験はチャンバー内の温度を 37 に設定して行った。画像は Metafluor ソフトウェアを用いて 2 分ごとに取得した。次に Metamorph ソフトウェアを用いて取得した画像から背景光を除いた後、細胞膜、ファゴソーム膜の各蛍光強度を測定し、レシオ値(YFP/CFP)を算出した。また、背景光を除いた画像を用いてレシオ画像を作成した。

蛍光から膜電位(mV)を概算する：検量線の作成

計測した蛍光強度から膜電位を推定するために、ホールセルパッチクランプ法を適用し、Merm2-RAW 細胞の細胞膜を任意の膜電位に固定し、CFP と YFP の画像を取得した。取得した画像から細胞膜の CFP と YFP の蛍光強度を測定し、レシオ値を計算後、蛍光のレシオ値から膜電位を計算するための検量線を作成した。

4. 研究成果

ファゴソーム膜電位の動的変化

Merm2 は細胞膜によく局在する一方で、細胞内への局在は僅か、もしくは、ほとんど見られない特性を持つ(Tsutsui JP2013)。この特性を利用して、ファゴソーム膜に voltage probe を局在させることができるのではないかと考えた。

まず、実験系を確立するために、遺伝子導入が比較的容易なマウスのマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 に Merm2 をコードする遺伝子を導入し、Merm2 を安定発現する細胞株を樹立した(Merm2-RAW)。次に、IgG でコートされたビーズを Merm2-RAW 細胞が培養されている細胞外液に添加し、ファゴサイトーシスを誘導し、蛍光を観察した。その結果、IgG ビーズを貪食した Merm2-RAW 細胞のファゴソームにおいて蛍光が観察され、かつ、細胞膜の蛍光と区別することができた(図 1A)。この系を用いて、ファゴソームの膜電位変化(レシオ値の変化)を調べた。その結果、ファゴソーム膜

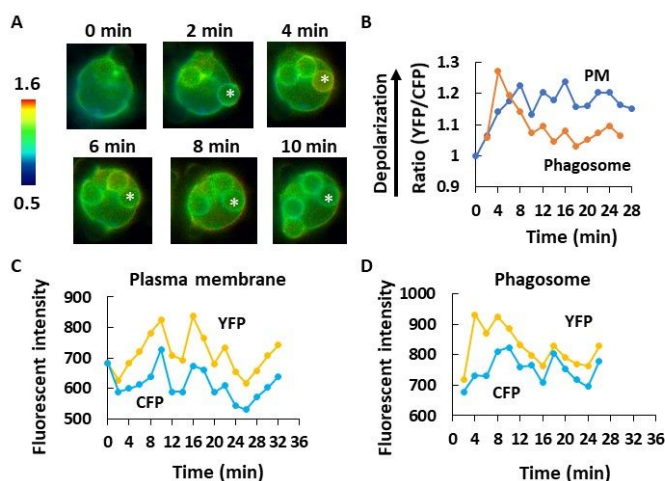


図1. ファゴソーム膜電位の一過的な脱分極応答と細胞膜電位の脱分極応答。A. レシオ画像。Asteriskで示したファゴソームの膜電位の時間変化をBに示した。B. ファゴソームと細胞膜の膜電位の時間変化。レシオ値の増加は脱分極を意味する(赤矢印)。PM: plasma membrane。C, D. CFPとYFPの蛍光強度の時間変化。Cは細胞膜、Dはファゴソーム膜。Bのレシオ値はCとDの値から算出した。

を用いて、ファゴソームの膜電位変化(レシオ値の変化)を調べた。その結果、ファゴソーム膜

電位がダイナミックに変化する様子を捉えることができた(図1A, B)。細胞膜電位は複数のピーズを持続的に貪食する時間範囲において持続的な脱分極応答(レシオ値の増加)を示す一方で、**Asterisk**で示されたファゴソームではファゴソームが形成されてから2分後に一過的で、かつ、大きな脱分極応答が見られ、その後過分極(レシオ値の低下)する様子が観察された(図1A, B)。

次に、ファゴソーム膜電位の時間変化の平均値を計算した(図2)。その結果、ファゴソーム膜電位はファゴソーム形成時には脱分極傾向にあり、その後過分極することが分かった(図2B)。一方、細胞膜電位は貪食開始後脱分極し、貪食が終わると元のレベルまで過分極することが分かった(図2A)。すなわち、**IgG** ピーズの貪食は細胞膜およびファゴソーム膜の膜電位を脱分極させること、貪食終了後には両膜電位を過分極させることが明らかになった。

これまで観察された **Merm2** の蛍光変化が膜電位変化にตอบสนองした蛍光変化であることを確認するために、電位非依存性 **Merm2(D129R)** を用いて同様の実験を行った(図3)。電位非依存性 **Merm2(D129R)** を安定発現する RAW 細胞に **IgG** ピーズを貪食させ、蛍光変化を観察した。その結果、ピーズの貪食前後において細胞膜およびファゴソーム膜のレシオ値の変化は観察されなかった(図3A, B)。1つのファゴソームに着目した結果を見ても、そのレシオ値が変化の様子は確認されなかった(図3C, D, E)。すなわち、**Merm2-RAW** 細胞で観察された結果は、膜電位にตอบสนองした変化であることが明らかになった。

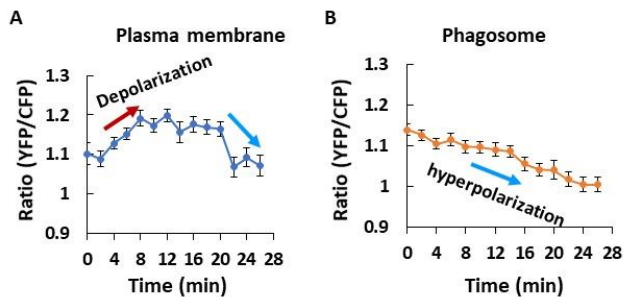


図2. ファゴソーム膜電位と細胞膜電位の時間変化の平均値。A, B. 細胞膜(A, n=25)とファゴソーム膜(B, n=57)の膜電位の時間変化。mean±SEM。細胞膜電位の測定では貪食を開始した時間を0とした。ファゴソーム膜電位の測定ではファゴソームが形成された時間を0とした。

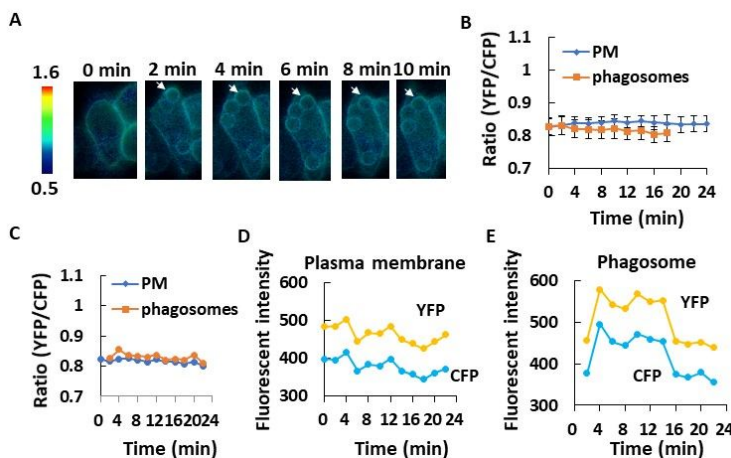


図3. 電位非依存性 **Merm2** プローブを用いたファゴソーム膜電位の測定。A. レシオ画像。B. ファゴソーム(n=32)と細胞膜(n=18)の膜電位の時間変化の平均値。mean±SEM。PM: plasma membrane。C, D, E. Aの矢印で示したファゴソーム膜と細胞膜のレシオ値(C)、細胞膜(D)およびファゴソーム膜(E)におけるCFPとYFPの蛍光強度の時間変化。

レシオ値から膜電位(mV)を推定する

得られたレシオ値では、どの程度膜電位(mV)が変化するか不明である。得られたレシオ値から膜電位を推定するために、**Merm2-RAW** 細胞に対してホールセルパッチクランプ法を適用し、任意の膜電位固定下で蛍光強度を測定し、膜電位に対するレシオ値をプロットして検量線を作成した(図4A, B)。この検量線から得られた式に図1B、図2に示したレシオ値を代入し、膜電位を計算した。その結果、図1Bに示したファゴソームの膜電位は凡そ-80 mVから-20 mV付近まで脱分極すると見積もられた(図4C)。細胞膜電位は凡そ-80 mVから脱分極し、その後-60 mVから-40 mVの範囲で維持されることが分かった(図4C)。図2に示したファゴソーム膜電位は、ファゴソーム形成時に凡そ-60 mVまで脱分極し、その後徐々に過分極することが分かった(図4D)。細胞膜電位の時間変化の平均値は、図4Cに示された細胞膜電位と似た膜電位変化を示した(図4D)。

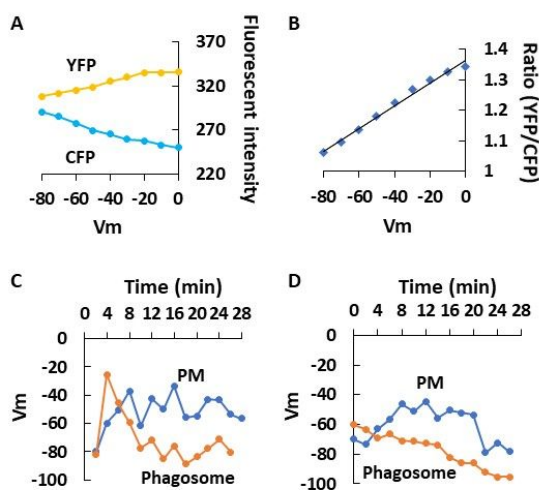


図4. 蛍光強度から膜電位(mV)を推定する方法。A, B. ホールセルパッチクランプ法による膜電位固定下におけるYFPおよびCFPの蛍光強度の測定(A)と膜電位に依存したレシオ値の変化(B)。エクセルを用いて線形近似を算出(黒線, $y=0.0037x+1.365$ ($R^2=0.9873$))。C, D. Bの検量線をもとに算出したファゴソーム膜と細胞膜の膜電位の時間変化。Cは図1B, Dは図2のデータをもとに算出した。

薬理学的手法を用いたファゴソーム膜電位の操作

ファゴソーム膜電位制御に関わる分子を明らかにすることは、ファゴソーム膜電位形成機構を理解する上で必須である。そこで、質量分析装置を用いてファゴソーム膜に局在する分子の同定を試みた。IgG ビーズを貪食した RAW 細胞を破碎後、シヨ糖密度勾配遠心分離によりファゴソーム画分を分離した (Shui et al., PNAS 2008)。分離したファゴソームから細胞膜画分のみを分離し、質量分析装置で分子を同定した。同定した分子の中には、過分極応答に関わる可能性のあるクロライドイオンチャンネル、カリウムチャンネルが含まれていた。これらの分子の阻害剤を用いて Merm2-RAW 細胞におけるファゴソーム膜電位の時間変化を観察したが、変化は誘導されなかった。

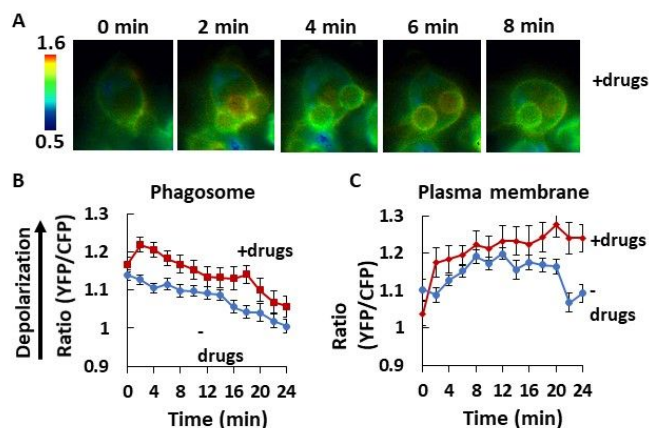


図5. 薬理学的手法によるファゴソーム膜電位の過分極の抑制。
A. Paxilline (5 μ M)およびniflumic acid (NFA, 10 μ M)で前処理された細胞のレシオ画像。B, C.平均化されたファゴソーム(B, 薬剤処理群n=47, 非薬剤処理群n=57)と細胞膜(C, 薬剤処理群n=14, 非薬剤処理群n=25)の膜電位の時間変化。mean \pm SEM。

RAW 細胞を含むマクロファージにおいて BK チャンネル (Sl α 1) が貪食機能に関わることが報告された (Sun et al., Scientific Reports 2020)。BK チャンネルを阻害する薬剤 paxilline を用いてファゴソーム膜電位の時間変化を観察したが過分極応答を抑制する結果は得られなかった。しかし、注意深く結果を見ると、時折、細胞膜およびファゴソームの膜電位が大きく脱分極する細胞が観察された。この結果は Paxilline が過分極応答を部分的に抑制するが、抑制効果は弱いことを示唆した。そこで、クロライドチャンネルを阻害する薬剤 niflumic acid (NFA) と paxilline の両方で細胞を処理した後、膜電位の時間変化を観察した。その結果、薬剤で処理されていない細胞から得られた結果と比較して、薬剤処理群ではファゴソーム膜電位の過分極が部分的に抑制された。さらに、ファゴソーム形成後に一過的に脱分極する様子が観察された。細胞膜電位も同様に、貪食直後から脱分極応答が見られ、薬剤非処理群よりも時間的に早く脱分極する様子が観察された。この結果から、何らかのクロライドイオンチャンネルと BK チャンネルが RAW 細胞において過分極応答に関与する可能性が示唆された。

まとめ

本研究により、初めてファゴソーム膜電位の時間変化を記載することができた。平均的なファゴソーム膜電位の時間変化を見ると、わずかな脱分極後に過分極応答することが分かった。1つのファゴソームに注目してみると、ファゴソーム膜電位はファゴソーム形成直後の -80 mV から一過的に -20 mV 程度まで脱分極し、元の膜電位に戻る様子が観察され、ファゴソーム膜電位がダイナミックに変動することが分かった。ファゴソーム膜電位制御に関わる分子を、質量分析法および薬理学的手法を用いて探索した結果、クロライドイオンチャンネルと BK チャンネルが過分極応答に関与する可能性が示唆された。これらの結果は、ファゴソームの膜電位形成を担う分子の同定を進める知見を与えるだけでなく、ファゴソームの膜電位が変化する生理学的な意義の解明につながると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okochi Yoshifumi, Umemoto Eiji, Okamura Yasushi	4. 巻 107
2. 論文標題 Hv1/VSOP regulates neutrophil directional migration and ERK activity by tuning ROS production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 819 ~ 831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jlb.2a0320-110rr	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 Sakaguchi Taiki, Okumura Ryu, Ono Chisato, Okuzaki Daisuke, Kawai Takafumi, Okochi Yoshifumi, Tanimura Natsuko, Murakami Mari, Kayama Hisako, Umemoto Eiji, Kioka Hidetaka, Ohtani Tomohito, Sakata Yasushi, Miyake Kensuke, Okamura Yasushi, Baba Yoshihiro, Takeda Kiyoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 TRPM5 Negatively Regulates Calcium-Dependent Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated B Lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107755 ~ 107755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107755	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 Kawai Takafumi, Kayama Kento, Tatsumi Shoki, Akter Sharmin, Miyawaki Nana, Okochi Yoshifumi, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Yamamoto Hiroyasu, Kihara Shinji, Okamura Yasushi	4. 巻 34
2. 論文標題 Regulation of hepatic oxidative stress by voltage gated proton channels (Hv1/VSOP) in Kupffer cells and its potential relationship with glucose metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 15805 ~ 15821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001056RRR	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 Okochi Yoshifumi, Okamura Yasushi	4. 巻 22
2. 論文標題 Regulation of Neutrophil Functions by Hv1/VSOP Voltage-Gated Proton Channels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2620 ~ 2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052620	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 Mizutani Natsuki, Okochi Yoshifumi, Okamura Yasushi	4. 巻 7
2. 論文標題 Distinct functional properties of two electrogenic isoforms of the SLC 34 Na Pi cotransporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14156	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大河内 善史, 筒井 秀和, 岡村 康司
2. 発表標題 マクロファージのファゴソーム膜電位変化を可視化し、膜電位の役割を探索
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okochi Y, Tsutsui H, Okamura Y.
2. 発表標題 Establishment of a method measuring membrane potential in phagosomes.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okochi Y, Tsutsui H, Okamura Y.
2. 発表標題 Analysis of membrane potential of phagosome in phagocytes.
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshifumi Okochi, Hidekazu Tsutsui and Yasushi Okamura
2. 発表標題 Measurement of membrane potential change in phagosome of phagocytes
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshifumi Okochi, Hidekazu Tsutsui, Yasushi Okamura
2. 発表標題 Toward understanding of membrane potential in phagosomal membrane
3. 学会等名 The 49th NIPS International Symposium: Ion channels: looking back, seeing ahead (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshifumi Okochi, Hidekazu Tsutsui, Yasushi Okamura
2. 発表標題 Method of measuring the membrane potential of phagosomes by optical imaging
3. 学会等名 74th Annual Meeting and Symposium of the Society of General Physiologists Ion Channels & Transporters in Immunity, Inflammation and Antitumor Immunity
4. 発表年 2021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
研究協力者	筒井 秀和 (Tsutsui Hidekazu)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岡村 康司 (Okamura Yasushi)		

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