様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ８ 月 １６ 日現在

機関番号：２３８０３
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ１４４３６

研究課題名（和文）細胞内pH自在制御技術の開発と細胞内pH応答のプロファイリング

研究課題名（英文）Development of intracellular pH regulation and profiling of cellular pH response

研究代表者
原　清敬（Hara, Kiyotaka）

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：４０４３４３７８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、細胞内pH自在制御技術を開発するため、出芽酵母の細胞内オルガネラに高度好塩菌由来の光駆動プロトンポンプであるデルタロドプシンを機能的に発現させた。ミトコンドリア移行シグナルを有するデルタロドプシンを出芽酵母内に発現させたところ、光照射によりミトコンドリアのプロトン輸送が活性化し、それに伴い細胞内ATP濃度が上昇した。本研究によって、光照射によりミトコンドリア内膜へのプロトン輸送活性を制御することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：Here, we described the functional expression of delta rhodopsin which is a light-powered proton pump in intracellular organelle of Saccaromyces cerevisiae to develop the intracellular pH control technology. By fusing delta rhodopsin with a mitochondria-localizing protein, it was redirected to the mitochondria. This mitochondria-localized light-driven pump created a proton motive force and produced more ATP through mitochondrial ATP synthase.
This study showed that we become to be able to control proton transportation activity through mitochondrial inner membrane by using light energy.

研究分野：生物機能科学

キーワード：ATP　酵母　液胞　光　デルタロドプシン　pH　ミトコンドリア

１．研究開始当初の背景

真核生物のオルガネラはエネルギー生産にかかわるミトコンドリアや有害物質の輸送と分解、有用物質の蓄積と分泌を行うリソソーム（液胞）など、細胞内機能の分業化に必須である。

応募者らは、光駆動プロトンポンプの１つである高度好塩菌由来のデルタロドプシンを哺乳類細胞のミトコンドリアにて機能的に発現させ、光でミトコンドリアのプロトン輸送を活性化し、呼吸鎖電子伝達系のプロトン輸送阻害剤による細胞死を抑制することに成功した（Hara et al, Sci.Rep.2013;3:1635)。この成果から「デルタロドプシンを出芽酵母のオルガネラに機能的に発現させれば、光の強度を調整し、オルガネラ内部へのプロトン輸送を制御することで、細胞質の pH をコントロールすることができ、細胞内 pH に対する細胞応答を見ることができるのではないか」という着想に至り、本研究の提案を行った。

２．研究の目的

細胞内の pH は遺伝子発現や代謝制御など、様々な生命活動に根源的に影響を与えているにもかかわらず、細胞内 pH の外部制御の難しさから、その全貌は未だ明らかになっていない。そこで、本研究では、細胞内 pH 自在制御技術の開発を行う。具体的には、出芽酵母の細胞内オルガネラ膜に光駆動プロトンポンプの１つであるデルタロドプシンを機能的に発現させ、プロトン輸送活性を外部からの光照射により制御する。これによって、細胞内の pH を自在にコントロールする技術の確立を目指した。さらに本技術を用いて、細胞内 pH の変動に対する遺伝子発現や代謝産物の変化を調べることにより、細胞内 pH に対する細胞応答のプロファイリングを目的とした。

３．研究の方法

(1) 使用菌株と培養条件

出芽酵母 BY4741(*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)由来株を利用し、SD 培地(6.7g/L yeast nitrogen without amino acids, 20 g/L glucose, 必要アミノ酸)もしくは、YPD 培地(10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose)に 10 μ M のレチナールを加え、0.04 μ mol / m^2s の光照射条件にて 30℃、撹拌速度 175rpm の好気条件にて一晩培養した。

(2) デルタロドプシンを用いた光駆動プロトン輸送オルガネラの創製

Hltaloterigena.turkmenica(JCM9743, Riken BRC, Tsukuba, Japan)よりデルタロドプシンをクローニングし、デルタロドプシンのN末端にオルガネラ移行シグナルペプチドを融合させた。さらに出芽酵母内で高い発現量を得るために、デルタロドプシンのコドン Usage を出芽酵母に最適化した。

(3) デルタロドプシンの機能的発現

ミトコンドリア内でのデルタロドプシンの機能的な発現は、細胞内の ATP 濃度を計測することで確認した。細胞は、shake master neo (bms: bio medical science) にて、1500 rpm, 10 分、bead(ϕ = 0.6 mm)で破砕処理し、遠心後の上清の ATP 濃度をルシフェリン/ルシフェラーゼ発光法にて、マイクロプレートリーダーにより発光定量した。ルシフェリン/ルシフェラーゼ反応溶液の組成は、25mM Tris-HCl, 5mM $MgSO_4$,100mM EDTA(pH8.0), 1mM DTT, 0.4mM Luciferin (Nacalai), 5 μg/ml Luciferase (Promega)とし、150μl 反応液に 50μl の細胞破砕液を加えて、溶液中の発光量を測定した。

４．研究成果

デルタロドプシンは光受容体タンパク質であり、その活性中心部位にレチナールを配位させることで、光照射によりプロトンを高度好塩菌の内側から外側へくみ出す機能を元来有する。出芽酵母の細胞内オルガネラにデルタロドプシンを機能的にさせることができれば、光照射により、プロトン輸送オルガネラを活性化し、それに伴う細胞内のダイナミックな変化を追跡することができる。細胞内の pH を制御するため、デルタロドプシンに数種類の液胞膜局在化シグナルペプチドを融合し、目的タンパク質を液胞膜内で発現させたが、液胞での特異的な発現は見られなかった。使用した液胞膜局在化シグナルは ER、ゴルジ体を経由して液胞に到達すると予想したが、液胞への特異的な局在は見られなかった。現在、液胞膜タンパク質であり液胞からのアミノ酸排出を担っている Avt4 の液胞移行シグナルを N 末端に付加したデルタロドプシンと GFP の融合タンパク質を細胞内で発現させ、その局在を検討している。液胞でのデルタロドプシンの発現に先立ち、ミトコンドリアでのデルタロドプシンの発現を試みた。具体的には、細胞内の動的変化の指標として、細胞内エネルギー通貨である ATP の光による外部制御を行い、ミトコンドリア移行シグナルペプチドを付加したデルタロドプシンを作製し、作製したデルタロドプシンがミトコンドリア内膜で機能的に発現するかを調べた(図 1)。

ミトコンドリア移行シグナルとしては、ヘム合成経路の酵素である 5-アミノレブリン酸シンターゼ（ALA 合成酵素）HemI の N 末シグナル配列を用い、これをデルタロドプシンの N 末に融合させた。

作製した出芽酵母 BY4741 形質転換体の細胞内 ATP 濃度を計測したところ、24 時間好気培養後の出芽酵母 BY4741 形質転換体の ATP 濃度は、ベクターコントロール株に比べて SD 培養液中で 3 倍、YPD 培養液中で 6.6 倍であることが確認された(図 2)。現在、呼吸鎖阻害剤を加えた際の ATP 濃度変化を調べ、この ATP 濃度の上昇が、デルタロドプシンのプロトン輸送に由来するのかどうか検討している。

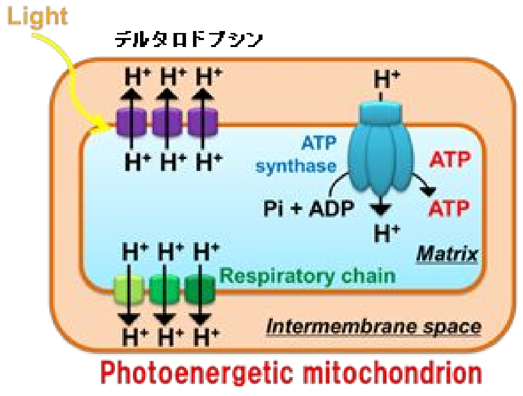
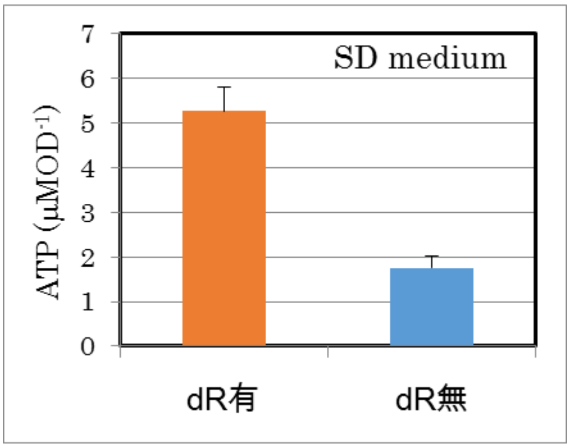


図１ 光駆動プロトン輸送ミトコンドリアの概略



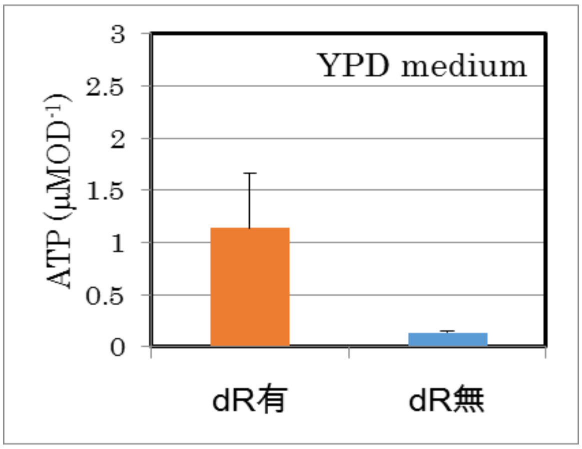


図 2　光照射後の細胞内の ATP 濃度

酸化的リン酸化によってミトコンドリア内で生成した ATP は速やかに細胞質中に放出

されることが知られており、得られた ATP 量はミトコンドリアで生成した量を反映しているため、ミトコンドリア膜中に発現したデルタドロプシンが光照射によってプロトンを膜間部分に取り込み、プロトン輸送にカップリングして ATP 合成酵素が多くの ATP を合成したため細胞内の ATP 濃度が上昇したと考えられる。

この結果は光照射によって細胞内の ATP 濃度を制御できることを示し、今後、細胞内の生育速度や最終密度の増加、酵素量の増加や代謝全体の改善などを光エネルギーによって外部制御するシステムとして利用できる非常に重要な成果である。

<引用文献>
なし

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　1　件）

Hara KY, Kondo A. (2015) ATP regulation in bioproduction. *Microb. Cell. Fact.* **14**, 198-207.

〔学会発表〕（計　0　件）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~env-bioeng/

６．研究組織
(1)研究代表者
原　清敬　（HARA, Kiyotaka）
静岡県立大学・食品栄養科学部環境生命科学科・准教授
研究者番号：４０４３４３７８

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
弘埜（原）　陽子（HIRONO-HARA, Yoko）