

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01351

研究課題名(和文)細胞内イオン環境の時空間変動による細胞可塑性の光制御

研究課題名(英文)Cell plasticity using spatiotemporal oscillation of intracellular ion environment

研究代表者

浅野 豪文 (ASANO, Toshifumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30552476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞内のイオン動態に着目して、それぞれのイオン輸送が細胞機能に果たす役割を明らかにすることを目的とした。細胞内カルシウムストアである小胞体のカルシウムを光で直接操作するために小胞体に特異的に発現する光スイッチを開発した。小胞体内腔から細胞質へのカルシウムイオン放出を高い時間分解能で光で引き起こすことに成功した。細胞活動を規定する細胞内のイオン輸送を光で誘導すると、骨格筋細胞の分化を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内にカルシウムを貯蔵する小胞体は分泌や代謝、筋収縮、神経の信号伝達など様々な組織、細胞において重要な働きを持っている。しかし、小胞体におけるカルシウムイオンの放出と充填を担う分子は同定されているものの、その制御機構については不明な点が多い。我々が開発した小胞体光スイッチは細胞内のカルシウムイオンを正確に制御することができる手段である。細胞の増殖、分化機構を明らかにすることは発生や再生の生命起源を理解する上で重要であり、新たな細胞制御技術や創薬の基盤技術の構築に寄与するものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of intracellular ion dynamics for cell functions. To manipulate the Ca²⁺ release from the intracellular stores under high spatiotemporal precision, we developed a novel optogenetics tool specifically targeted to endoplasmic reticulum. This organelle photoswitch effectively manipulated Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol by light. Our results suggested that the optical induction of intracellular ion dynamics regulating the cell activity promoted differentiation of skeletal muscle cells.

研究分野：細胞工学

キーワード：筋分化 小胞体カルシウム 光遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の生存、活動にとって細胞内外環境の恒常性が本質的な意味を持っているが、細胞内イオン動態との連関については明らかとなっていない。幹細胞は増殖性の未分化細胞であり、その不均等分裂で生じた一方の細胞のみが分化経路に入ることによって、永続的な組織産生を行うことができる。これまでに未分化能維持や分化誘導法などの研究が盛んに行われ、関連遺伝子や誘導因子の同定など多くの知見が蓄積されている。様々な細胞外環境からのシグナルを受けて細胞の挙動が制御されているが、細胞の電氣的活動との関係については不明な点が多い。また特定の細胞への分化や成熟化に要する時間は個々の細胞において内因性に決定され、任意の時間、場所で思いのまま操作できる技術は未だ確立していない。

2. 研究の目的

細胞活動に伴い細胞内イオンの変化が生じるが、異なる経路を介したイオン輸送が異なる細胞機能を調節しているのか、またどのように制御されているのかを明らかにすることを目的とする。細胞内イオンの時間的、空間的な変動が細胞機能に果たす役割について、筋をモデルとして細胞の増殖と分化、成熟における細胞活動との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内に流入するイオン輸送を区別して制御するために細胞内小器官である小胞体に局在させた光スイッチを開発する。小胞体膜上に存在するカルシウムイオンチャネルの一つにリアノジン受容体 (RyR) がある。このタンパク質を小胞体膜に保留させるシグナル配列が保存されている。光受容イオンチャネルである channelrhodopsin (ChR) を小胞体膜に局在させるために RyR の小胞体保留シグナルを用いる。ChR は緑藻類クラミドモナスに由来し、青色光 (470 nm) に応答して陽イオンを非選択的に透過させる光受容体である。小胞体局在光スイッチにより小胞体から細胞質へのカルシウムイオン放出を光で制御する。

(2) 活動を規定する細胞内のイオン輸送の変動が細胞の分化にどのような変化を及ぼすかを調べる。光に対して応答する筋細胞を作製するために ChR 遺伝子をマウス骨格筋由来の筋芽細胞 (C2C12) に導入する。ChR を組み込んだ筋芽細胞を分化誘導培地に置き換えることで、筋分化を誘導する。筋芽細胞は MyoD や myogenin などの筋特異的な転写制御因子により調節され、互いに融合して多核の合胞体である筋管細胞を形成するとともに収縮タンパクの産生を行う。分化培養中に異なるパラメータの光パルス照射して、その変化を調べる。

(3) 神経細胞、筋細胞を特異的に光刺激することができる神経筋接合部 (NMJ) 形成モデルを構築する。運動神経と骨格筋との間には NMJ が形成され、1本の筋線維に対して1つのシナプスを形成し、その筋細胞側にはアセチルコリン受容体 (AChR) などのシナプス形成タンパク質を高密度に集積する。成熟した筋の性質の維持と同様に、NMJ の形成・維持の過程においても神経細胞と筋細胞間の活動依存的な調節機構が働いているかについて調べる。マウス神経芽細胞腫 (NG108-15) もしくは筋芽細胞 (C2C12) に ChR 遺伝子を組み込み、筋管細胞を形成後、神経細胞を共培養し、光刺激を加える。形成された AChR の局在および神経突起を評価する。

4. 研究成果

(1) これまでの光スイッチにより引き起こされるイオン輸送は細胞外からのものと細胞内小器官からのものを区別することが難しかった。細胞内カルシウムストアである小胞体内のカルシウムを直接操作するために小胞体膜に特異的に発現する光スイッチ (ChR_{ER}) を開発した。細胞に導入し発現を確認すると ChR_{ER} と融合させた蛍光タンパク質タグ EGFP の蛍光は細胞膜には見られず、核周辺に局在していた。超解像度顕微鏡を用いてその局在を詳細に調べたところ、小胞体マーカー KDEL と共局在することが認められた。パッチクランプ法により電気生理測定を行うと、ホールセル電位固定下で光を照射しても光電流は観察されず、原形質膜を介した細胞外から細胞内へ向かう電流が発生していないことが分かった。原形質膜または小胞体膜のそれぞれの膜を介するイオン輸送を選択的に制御できるか検討を行った。同一細胞における細胞質内および小胞体内のカルシウム変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いてカルシウム感受性蛍光プローブ YCaMP および R-CEPIA1er による蛍光イメージングを行った。形質膜型 (野生型) の ChR を導入した細胞は光の照射に伴い YCaMP の蛍光強度の上昇が観察された。小胞体局在型 ChR_{ER} を導入した細胞においては、YCaMP の蛍光強度の上昇と同時に R-CEPIA1er の低下が観察された。カルシウムフリーの細胞外液においても同様の応答が見られた。従来の電氣的な方法や薬理学的な方法では困難であった小胞体内腔から細胞質へのカルシウムイオンの放出を直接的に高い時間分解能で光で操作することに成功した。

(2) 細胞に対してイオン輸送を生じさせる刺激に対する筋分化誘導時の遺伝子発現を検討した。ChR を発現させた筋芽細胞に光刺激するといくつかの筋分化制御因子の発現量やパターンの変化が見られた。刺激を与える時期や時間を検討したところ、細胞融合に関与する転写調節因子の発現亢進が認められた。刺激を与えて培養 5 日目の筋管細胞を詳しく調べると、形成された細胞はコントロール群と比較して、取り込まれた核の数や太さ、長さが増加しており、肥

大化していることが認められた。光刺激が筋芽細胞の融合を促進させて筋管細胞の形成、肥大化を引き起こしたことが示唆された。

(3) 神経細胞もしくは筋芽細胞に個別に ChR 遺伝子を組み込み、筋管細胞を形成後、神経細胞を共培養して、それぞれの細胞を刺激した際の NMJ 形成の変化を調べた。カルシウム蛍光プローブ R-GECO1 を用いてカルシウム変化を観察したところ、光照射に同期した細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。その応答は照射した光の強度依存的に変化し、シグナルの大きさを光強度によってコントロールできることを確認した。免疫蛍光染色による AChR の局在を調べたところ、筋細胞刺激群において AChR クラスターの総数の増加が認められた。一方、神経細胞刺激群においては AChR クラスター数、面積、長さに関して刺激との相関は見られなかったが、神経突起と隣接して局在するクラスターの割合が増加していた。また神経細胞を刺激し、生じる筋収縮を観察すると神経細胞刺激群において刺激に対する応答性が向上していた。以上から前シナプスである神経細胞と後シナプスである筋細胞をそれぞれ特異的に任意の時間やパターンで独立して光刺激することができる NMJ 形成モデルの系を構築することができた。神経筋共培養下での AChR の集積は筋細胞特異的に、NMJ の発達には神経細胞特異的にそれぞれの活動依存性に亢進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Moe Sato, Toshifumi Asano, Jun Hosomichi, Takashi Ono, Takao Nakata, Optogenetic manipulation of intracellular calcium by BACCS promotes differentiation of MC3T3-E1 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 506, 716-722 (2018)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.107
- ② Toshifumi Asano, Hiroyuki Igarashi, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, Organelle Optogenetics: Direct Manipulation of Intracellular Ca²⁺ Dynamics by Light, *Frontiers in Neuroscience*, 査読有, 12, 561 (2018)
DOI: 10.3389/fnins.2018.00561
- ③ Toshifumi Asano, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, Myogenic maturation by optical-training in cultured skeletal muscle cells, *Methods in Molecular Biology*, 査読無, 1668, 135-145 (2017)
DOI:10.1007/978-1-4939-7283-8_10

[学会発表] (計 6 件)

- ① 佐藤 萌、浅野 豪文、細道 純、小野卓史、中田 隆夫、光遺伝学ツール BACCS を用いた骨芽細胞分化メカニズムの制御、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、2019 年 3 月 27-29 日。
- ② 宮本孝則、浅野 豪文、中田 隆夫、細胞活動依存的な神経筋接合部形成の検討、第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、2019 年 3 月 27-29 日。
- ③ 佐藤 萌、浅野 豪文、細道 純、石田 雄之、臼見 莉沙、清水 康広、金香 佐和、中田 隆夫、小野 卓史、光遺伝学を用いた骨芽細胞分化メカニズムの制御、第 77 回日本矯正歯科学会学術大会、パシフィコ横浜、2018 年 10 月 30 日-11 月 1 日。
- ④ 青木 結香、浅野 豪文、中田 隆夫、神経筋接合部形成における神経細胞活動依存性の検討、第 123 回日本解剖学会総会・学術集会、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学、2018 年 3 月 28-30 日。
- ⑤ 浅野 豪文、中田隆夫、筋細胞分化の活動依存的な調節機構、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 6-9 日。
- ⑥ 浅野 豪文、中田隆夫、細胞活動の動的制御による筋分化調節、第 16 回日本再生医療学会総会、仙台国際センター、2017 年 3 月 7-9 日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cbio/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：青木 結香

ローマ字氏名：(AOKI, yuka)

研究協力者氏名：宮本 孝則
ローマ字氏名：(MIYAMOTO, takanori)

※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、研究者個人に帰属されます。