| 181　細胞質pHの光操作によるがん細胞抑制手法の開発 | 森本　雄祐 |
|---|---|

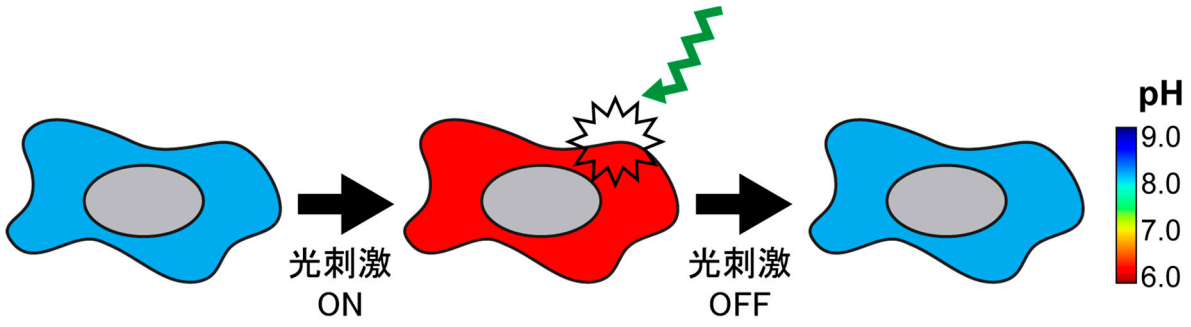
**【目的】**抗がん剤の多くはがん細胞において特徴的なシグナル経路に働く分子標的型のものである。しかし、標的となるシグナル経路は正常な生命活動にも必須な場合が多い。そこで、分子標的型ではないが、がん特異的な特徴を捉えた、より汎用的ながん治療法が望まれている。本研究課題では、ほとんどのがん細胞が正常細胞よりも高い細胞質 pH を保持していることに注目した。我々はこれまでに高感度な pH イメージング手法を開発するなど、細胞内 pH の定量計測を広く実施しており、細胞内 pH が実際に細胞機能へどのように働いているかを明らかにしてきた。そこで本研究課題では、高感度 pH イメージングとオプトジェネティクス技術の応用によってがん細胞の細胞質 pH を光操作し、細胞質 pH と細胞機能の関係を明確にするための新規光操作技術の確立を目的とした。

**【方法】**本研究では、生細胞の細胞質 pH を定量的に光操作する手法の開発を進めた。我々はこれまでに独自で開発・改良を行なった pH プローブを用いた高感度 pH イメージング計測手法を確立しており、1 細胞局所の pH 変化や pH を指標とした 1 細胞レベルでの分化のモニター等を可能としている。これまでに開発したプローブの高感度化および計測手法の改良により、生細胞内 pH 測定の定量性を向上させる。遺伝子操作が容易な大腸菌や細胞性粘菌を用いることで、プローブの性能や計測技術の効率的な改良を進める。

また、バクテリオロドプシンの一種であるプロテオロドプシンは光刺激により $H^+$を特異的に細胞外へと排出するため、細胞内 pH を任意に上昇させることができる。また、チャネルロドプシン 2 は光刺激により $H^+$を細胞内に取り込むため、細胞内 pH を低下させることが可能である。以上のように、プロテオロドプシンとチャネルロドプシン発現株をそれぞれ使い分けることにより、細胞内 pH の上昇および低下の光刺激制御を行うことができる。光刺激によって変化する細胞内 pH を高感度イメージングによって定量することにより、細胞内 pH を任意の値へと光操作することができ、細胞機能と細胞内 pH の関係を正確に理解することが可能となる。

**【結果】**本研究によって、チャネルロドプシン 2 を用いることで細胞内 pH を任意に低下させ、その pH 変化量を定量的に計測することが可能となった。本技術はがん細胞研究だけにとどまらず、さまざまな生命科学研究への応用が可能な技術である。一方、プロテオロドプシンを用いた細胞内 pH を上昇させる手法は確立できておらず、光操作ツールタンパク質のさらなる検討、および異なる細胞系での計測が必要である。

細胞質 pH の定量的な光操作手法



# 181. 細胞質 pH の光操作によるがん細胞抑制手法の開発

森本　雄祐

九州工業大学 大学院情報工学研究院 生命情報工学研究系

Key words：細胞内 pH，光操作，蛍光イメージング，がん細胞

## 緒　言

日本人の死因１位である「がん」のメカニズム解明は、生命科学研究において最も重要な課題の１つである。そのため、がん克服のための抗がん剤の開発を目指した研究は国内外の研究者によって幅広く進められている。抗がん剤の多くはがん細胞において特徴的なシグナル経路に働く分子標的型のものである。しかし、標的となるシグナル経路は正常な生命活動にも必須な場合が多く、抗がん剤の副作用やその効果に個人差があることが大きな課題となっている。そこで、分子標的型ではないが、がん特異的な特徴を捉えた、より汎用的ながん治療法が望まれている。本研究課題では、ほとんどのがん細胞が正常細胞よりも高い細胞質 pH を保持していることに注目した［1］。この異常な pH のため、組織中では細胞内外の pH 勾配が正常細胞と逆転してしまうことがある。このような状態ががん細胞の異質な性質を生み出している要因の１つではないかと考えられている。しかし、正常な細胞の細胞質 pH だけをがん細胞と同じ状態にすることが困難であるため、細胞質 pH と細胞機能がどのような関係にあるのかは十分に解明されていない。

細胞内にはさまざまなイオンやタンパク質が混在していることから、タンパク質機能の pH 依存性などを調べる手段としては *in vitro* の実験系が有力な手法として主に用いられている。一方、近年チャネルロドプシンなどの光操作が可能なチャネルタンパク質の利用により、神経科学を中心に光遺伝学（オプトジェネティクス）が急速に発展している。また、我々はこれまでに $H^+$、$Na^+$、$Ca^{2+}$などの細胞内イオン濃度や膜電位について、高精度な定量計測法をバクテリアや真核細胞で確立している［2，3］。その中でも特に、高感度な pH イメージング手法の開発を長年行っており、大腸菌などのバクテリア生細胞内におけるチャネルタンパク質の機能解明のために、細胞膜上で機能する直径 45 nm のモータータンパク質複合体の近傍局所では細胞質全体と異なる局所 pH 値を示すことを明らかにしている［4］。そこで本研究課題では、高感度 pH イメージングとオプトジェネティクス技術の応用によって、がん細胞の細胞質 pH を定量的に光操作し、細胞質 pH と細胞機能の関係を明確にすることができる新規光操作技術の開発を行い、がん抑制治療および創薬研究につなげることを目的とした。

## 方　法

### 1.　高感度 pH イメージング

これまでに開発･改良を行なった pH プローブを用いることで､高感度な pH イメージング計測手法を確立しており、1 細胞局所の pH 変化や pH を指標とした 1 細胞レベルでの分化のモニター等が可能となっている。しかし、これまでに開発したレシオメトリック pH プローブは退色が早いことが問題であったため、より退色に強い pH 感受性蛍光プローブの導入により、長時間のタイムラプス pH 計測を定量的に行うことができるようにする。また、遺伝子操作が容易な大腸菌や細胞性粘菌を用いることで、プローブの性能確認を素早く実施することが可能である。

**2. 細胞内 pH の光操作**

バクテリオロドプシンの一種であるプロテオロドプシンは、光刺激により $H^+$を特異的に細胞外へと排出するため、細胞内 pH を任意に上昇させることができる。また、チャネルロドプシン 2 は光刺激により $H^+$を細胞内に取り込むため、細胞内 pH を低下させることが可能である。以上のように、プロテオロドプシンとチャネルロドプシン発現株をそれぞれ使い分けることにより、細胞内 pH の上昇および低下の光刺激制御を行うことができる。光刺激によって変化する細胞内 pH を高感度 pH イメージングによって定量することにより、細胞内 pH を任意の値へと光操作することができる。

**3. 光刺激による pH 変化を介した細胞機能の操作**

細胞内 pH の上昇および低下の定量的な制御を行うことにより、細胞のがん化を引きおこす pH 変化量を決定する。また、神経芽細胞腫では *MYCN* 遺伝子が増幅し、神経膠腫などでは上皮成長因子受容体（EGFR）の発現量が増大することが知られている。このようながん細胞特有の変化として知られている増幅遺伝子について、光操作による定量 pH 操作前後における発現量の変化および細胞機能の解析を行う。

## 結果および考察

**1. 高感度タイムラプス pH イメージング**

非侵襲な状態での細胞内 pH を測定するためには、pH 感受性蛍光タンパク質の利用が最適である。我々はこれまでに赤色蛍光タンパク質 mNectarine［5］と緑色蛍光タンパク質 pHluorin［6, 7］を融合した新規の高感度レシオメトリックプローブを開発しており、細胞質 pH が 6.5～8.0 程度の真核培養細胞内で非常に高感度な pH イメージングを達成している。しかし、mNectarine は光励起による退色速度が早く、長時間のタイムラプス計測に適さない。そこで、mNectarine をより退色に強い pH 感受性赤色蛍光タンパク質である pHuji［8］に置き換えることにより、長時間タイムラプス計測が可能な高感度 pH プローブを構築することを検討した。

新規プローブ構築の検討の結果、高感度なレシオメトリック pH プローブとして機能する pHuji と pHluorin の融合タンパク質の作製に成功した。この新規レシオメトリックプローブと既存のプローブを真核培養細胞である細胞性粘菌に発現させ、蛍光顕微鏡下でのタイムラプス計測を行った。蛍光強度比のタイムラプス計測の比較により、mNectarine では 10 分程度の計測で退色が蛍光強度比に影響を与えていたが、pHuji では 1 時間以上の計測でも退色がほとんど影響しないことが明らかとなった（図 1）。このことは、新規レシオメトリック pH プローブが長時間の pH 計測に適しており、光刺激によって細胞質 pH がどのように変化するかなどの定量的な計測に利用可能であることを示している。

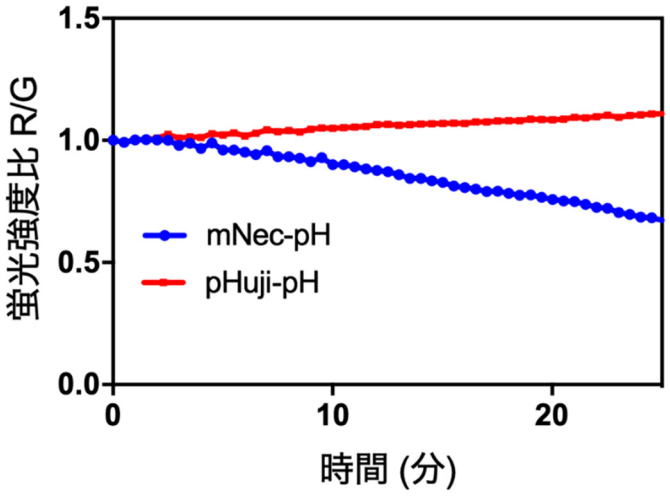



図 1. 蛍光 pH プローブの退色特性

mNectarine-pHluorin または pHuji-pHluorin を発現する細胞性粘菌株を蛍光顕微鏡下でタイムラプス撮影し、赤色蛍光と緑色蛍光の蛍光強度比（R／G）への退色による影響を評価した。

## 2. オプトジェネティクスによる細胞内 pH の制御

細胞内 pH の人為制御には、プロテオロドプシン（PR）およびチャネルドロプシン 2（ChR2）を用いた。プロテオロドプシンは光刺激によりプロトン（$H^+$）を特異的に細胞外へと排出するプロトンポンプとして働くため、細胞内 pH を上昇させる制御に有用である。また、チャネルロドプシン 2 は、細胞内 pH を低下させることが可能である。以上のように、PR と ChR2 それぞれの発現株を作製して使い分けることにより、細胞内 pH の上昇および低下の光刺激による制御を行うことを検討した。

がん細胞特異的な高い細胞質 pH を正常値に戻す制御をするために、プロトンを細胞質に取り込むことで細胞質 pH を低下させることが可能であるチャネルロドプシン 2 の発現系構築を行った。しかし、培養細胞内ではチャネルロドプシンタンパク質が著しく不安定なことが分かり、機能状態で形質膜に局在する割合は非常に低かった。これを解決するために、チャネルロドプシン 2 の配列の改良を行った。この改良タンパク質は、培養細胞内でも比較的安定な状態で形質膜に局在し、チャネルロドプシン 2 が光に応答してイオンを流すことも確認できた。さらに実験条件の検討の結果、効率的に細胞内 pH の低下を人為制御することが可能になった（図 2）。

一方、プロテオロドプシンを用いた細胞質 pH を上昇させる系の構築も検討したが、これまでに効率的に pH 上昇の制御が可能な細胞株を構築するまでには至っていない。形質膜上でのプロテオロドプシン発現量は十分であることが確認できているため、細胞質 pH の恒常性を壊すほどのイオン流の制御ができていないためと考えられる。そのため今後は、より多くの他の光操作ツールタンパク質を検討していく必要がある。

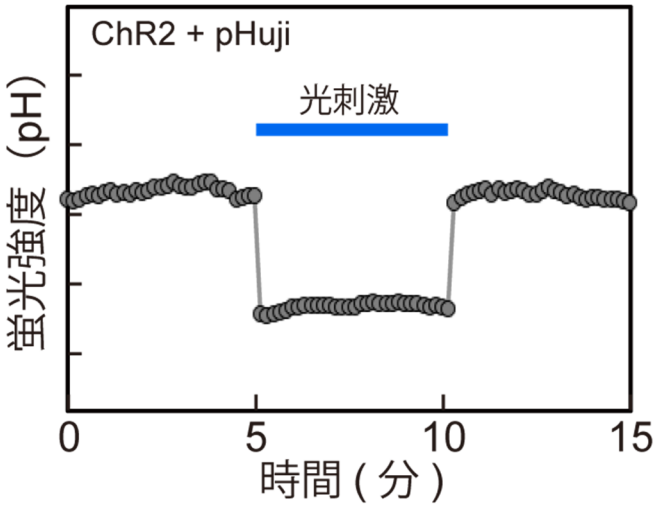



図 2. チャネルロドプシンを用いた細胞質 pH の光制御

チャネルロドプシン 2 と赤色蛍光 pH プローブ pHuji を発現する細胞性粘菌株を用いて、青色光刺激による細胞質 pH への影響を計測した。計測開始 5 分後から 10 分後まで青色光での刺激を行った。pHuji の赤色蛍光を蛍光顕微鏡下でタイムラプス計測することにより、細胞質 pH の変化をモニターした。

## 3. 光操作実験系のがん細胞への導入

細胞内pHの低下を定量的に制御することが可能になったため、マウス由来神経芽細胞およびHeLa細胞への実験系の導入を検討した。細胞株の確立の過程において、細胞種によってツールタンパク質やpHプローブの発現効率が変化するため、実験系ごとの最適化が必要であることが明らかとなった。このことから、効率的な光操作が可能な細胞株の確立を行うこととともに、実験系ごとでの発現量の制御が容易なツールタンパク質の発現系の作製も進めていく必要がある。より効率的な実験系を確立することにより、がん細胞の細胞機能と細胞質pHの関係を今後明らかにしていくことできるだろう。

## 謝　辞

本研究の一部は、大阪大学大学院生命機能研究科上田昌宏研究室および九州工業大学大学院情報工学研究院安永卓生研究室にて行った。

## 文　献

1） Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. Nat Rev Cancer. 2011. 11:671-677. PMID: 21833026 DOI: 10.1038/nrc3110.

2） Morimoto YV, Namba K, Minamino T. Bacterial Intracellular Sodium Ion Measurement using CoroNa Green. Bio-protocol 2017. 7(1): e2092. DOI: 10.21769/BioProtoc.2092.

3） Morimoto YV, Kami-ike N, Namba K, Minamino T. Determination of Local pH Differences within Living Salmonella Cells by High-resolution pH Imaging Based on pH-sensitive GFP Derivative, pHluorin(M153R). Bio-protocol 2017. 7(17): e2529. DOI: 10.21769/BioProtoc.2529.

4） Morimoto YV, Kami-ike N, Miyata T, Kawamoto A, Kato T, Namba K, Minamino T. High-resolution pH imaging of living bacterial cells to detect local pH differences. mBio. 2016. 7(6). pii: e01911-16. PMID: 27923921 DOI: 10.1128/mBio.01911-16.

5） Johnson DE, Ai HW, Wong P, Young JD, Campbell RE, Casey JR. Red fluorescent protein pH biosensor to detect concentrative nucleoside transport. J Biol Chem. 2009. 284(31):20499-20511. PMID: 19494110 DOI: 10.1074/jbc.M109.019042.

6） Miesenböck G, Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature. 1998. 394:192-195. PMID: 9671304 DOI:10.1038/28190.

7） Morimoto YV, Kojima S, Namba K, Minamino T. M153R mutation in a pH-sensitive green fluorescent protein stabilizes its fusion proteins. PLoS One. 2011. 6:e19598. PMID: 21559297 DOI: 10.1371/journal.pone.0019598.

8） Shen Y, Rosendale M, Campbell RE, Perrais D. pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. J Cell Biol. 2014 207(3):419-432. PMID: 25385186 DOI: 10.1083/jcb.201404107.