

高速な細胞内分子クラウディングセンサーの開発に成功

～高浸透圧ストレス下における分子クラウディング状態変化の解明に期待～

ポイント

- ・高浸透圧ストレス下における細胞内分子クラウディング状態変化のリアルタイム計測に成功。
- ・核質内と細胞質内のわずかな分子クラウディング度の違いが測定可能なことを実証。
- ・細胞内クラウディングの迅速状態変化測定などの進展に期待。

概要

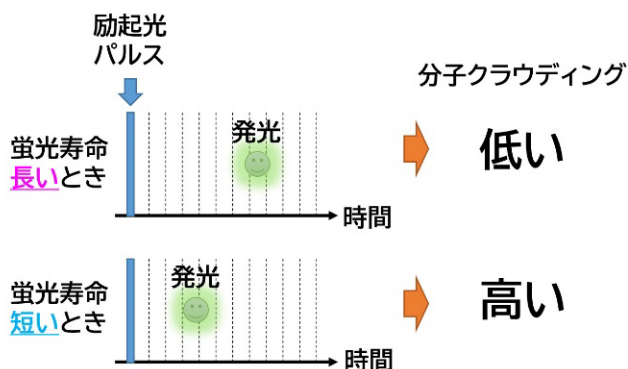
北海道大学大学院先端生命科学研究院の北村 朗講師らの研究グループは、単量体緑色蛍光タンパク質（以下 eGFP^{*1}）の蛍光寿命^{*2} 測定を用いて迅速・高感度で高浸透圧ストレス下における細胞内分子クラウディング状態変化測定系の開発に成功しました。本成果は、スウェーデン・カロリンスカ研究所臨床神経科学部門のヴラダナ ヴゴジェビク准教授らとの国際共同研究によるものです。

細胞が高塩濃度などの環境にさらされると、細胞内の水分子が細胞外へ漏出し、細胞内のタンパク質など生体分子濃度が高くなります。このような状態は分子クラウディング（分子こみあい）の上昇と言われ、特に細胞内のようにもともと分子クラウディング度が高い分子が高密度に存在する空間においては様々な細胞内容物の構造や集積状態の変化を産み出すことが知られています。

本研究では、生きている細胞内において eGFP の蛍光寿命を、カロリンスカ研究所にて独自に開発された蛍光寿命イメージング装置を用いて二次元空間的に測定することで、高浸透圧ストレス下における細胞内分子クラウディング度がストレス直後に最大となり、その後下降するがストレス前の状態には戻らず安定状態になることを示しました。また、この分子クラウディング状態の応答変化は、従来型のクラウディング蛍光センサーよりも高速に検出できることが分かりました。

本研究により開発された測定系は今後、様々な細胞内分子クラウディング上昇を伴う変化の解析に応用可能であると考えられます。また未開な細胞内分子クラウディングの全貌を解明するための重要なツールとなることが期待されます。

なお、本研究成果は、2023年7月22日（土）公開の Scientific Reports 誌にオンライン掲載されました。



蛍光寿命の長短の意味と分子クラウディング状態の関係を表した図。蛍光寿命が長いとは、蛍光分子が励起されてから蛍光を発するまでの時間が相対的に長く（上）、逆に蛍光寿命が短いとは、蛍光分子が励起されてから蛍光を発するまでの時間が相対的に短いこと（下）を意味する。またこの蛍光寿命は細胞内分子クラウディングの状態を反映する。

【背景】

細胞は常に周辺環境の変化にさらされています。また細胞は周辺環境の変化に迅速に対応するため、細胞内環境を調整、適応することを行っています。例えば細胞が細胞内よりも高い塩濃度にさらされると細胞内の水が細胞外へ出ていき細胞内のタンパク質など生体分子濃度が上昇します。これは細胞の生存にとって放置できる状況ではないため、これを細胞はストレスと感じ、細胞内水分子の減少に対して適応可能な細胞内環境を作り出し始めます。この応答は一般にストレス応答と呼ばれ、様々なストレス応答の仕組みが知られています。高塩濃度環境は細胞にとって高浸透圧なため、高浸透圧ストレスと呼ばれています。

このような高浸透圧ストレスにさらされた細胞内でどのような環境変化が起こっているのかという事は長年研究されており、例えば細胞膜のチャンネルを介してイオン濃度が変化するなどの応答が古典的によく知られた高浸透圧ストレス応答現象です。このとき、細胞内において水分子の急速な減少も起こるため、タンパク質など生体分子の濃度が上昇し、分子クラウディングが上昇することが知られています。また高浸透圧ストレスが数時間程度持続すると、細胞質などにタンパク質や核酸が集積したストレス顆粒という構造体が出現することが知られています。このストレス顆粒にはタンパク質翻訳に必要なリボソームやタンパク質の鋳型となるメッセンジャーRNA なども含まれていることから、ストレス応答下においてタンパク質の翻訳が抑制されているということも知られています。

しかしながら、このような高浸透圧ストレス下において迅速に分子クラウディング状態の変化をリアルタイムに追跡できる計測手法は限定的なものでした。

【研究手法】

高浸透圧ストレス下における分子クラウディング度の上昇を解析するためのプローブとして、単量体の改変型緑色蛍光タンパク質である eGFP を用いました。さらに分子クラウディング度の上昇により eGFP の発光が不安定になる現象に着目しました。この発光の不安定さを二次元空間で測定するために、細胞内の eGFP 蛍光寿命を多点計測することにしました。その多点蛍光寿命計測は、スウェーデン・カロリンスカ研究所で独自に開発された大量の光子計測情報を同時測定可能な蛍光寿命イメージングシステムを用いて行いました。高塩濃度培地に暴露した前後の eGFP 発現細胞をリアルタイムに蛍光寿命計測することで、高塩濃度にさらされた細胞内における数秒ごとの蛍光寿命を計測しました。

【研究成果】

高塩濃度ストレス下にある細胞内の分子クラウディング度の変化を eGFP の蛍光寿命変化から計測することに成功しました。高浸透圧ストレスにさらされた直後は分子クラウディング度が最も上昇しますが、100 秒以内に非ストレス下よりは高いものの安定状態に達することが分かりました。

また、これまでにクラウディング状態の蛍光センサーとして知られていた GimRET^{*3} では数百秒以上経過しないと安定に達しませんでした。eGFP の蛍光寿命測定を用いると GimRET よりもはるかに速い細胞内分子クラウディング変化応答を追跡できることも分かりました (図 1)。また核質では、細胞質よりもわずかに高い分子クラウディング状態となっていることも検出できました。

すなわち、eGFP の蛍光寿命は、よりシンプルで高感度かつ高性能な分子クラウディングセンサーであることが分かりました。

【今後への期待】

本研究では細胞内の細胞質と核質に着目し、分子クラウディングの変化を解析しました。今後、その他の細胞内小器官（オルガネラ）における分子クラウディング上昇を解析する重要なセンサーへの応用が考えられます。またこの応答の速さから、例えば高浸透圧ストレスを短い時間間隔で細胞へ与えた時の分子クラウディング変化の解析などに利用が可能と考えられます。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業・国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）（課題名：タンパク質恒常性による運動機能および寿命制御機構の解明、代表者：北村 朗）（16KK0156）、新学術領域研究『情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理』・公募研究（課題名：蛍光動的消光測定による生細胞内 RNA 立体構造の情報物理解析、代表者：北村 朗）（22H04826）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構・革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ（AMED-PRIME）・研究開発領域「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」（課題名：細胞内プロテオスタシスを維持するシャペロン RNA の作動機序解明、代表者：北村 朗）（JP22gm6410028）、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）・研究成果最適展開支援プログラム（A-STEP）・機能検証フェーズ（課題名：高感度蛍光測定に応用可能なプログラミング相関解析装置開発、代表者：北村 朗）（VP30318089120）、公益財団法人「蓬庵社」・研究助成（代表者：北村 朗）、公益財団法人「萩原学術振興財団」・研究助成（代表者：北村 朗）、公益財団法人「中谷医工計測技術振興財団」・技術開発研究助成（代表者：北村 朗）、公益財団法人「キャノン財団」・研究助成（代表者：北村 朗）、北海道大学 L-Station 研究支援（代表者：北村 朗）などの支援を受けて行われました。

論文情報

論文名	Increased intracellular crowding during hyperosmotic stress（高塩濃度ストレス下における細胞内高分子こみあい度の上昇）
著者名	北村 朗 ¹ 、大浅 翔 ² 、川口遥香 ¹ 、逢坂美聖 ¹ 、Vladana Vukojević ² 、金城政孝 ¹ （ ¹ 北海道大学大学院先端生命科学研究院、 ² スウェーデン・カロリンスカ研究所臨床神経科学部門）
雑誌名	Scientific Reports（自然科学分野の学術誌）
DOI	10.1038/s41598-023-39090-w
公表日	2023年7月22日（土）（オンライン公開）

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 講師 北村 朗（きたむらあきら）

T E L 011-706-9542 F A X 011-706-9045 メール akita@sci.hokudai.ac.jp

U R L <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/index.html>

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

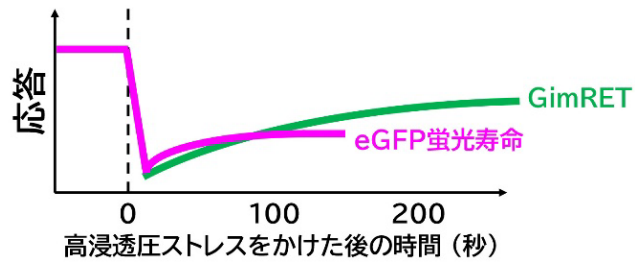


図 1. 細胞に高浸透圧ストレスをかけた時の eGFP 蛍光寿命と GimRET の応答比較

【用語解説】

- *1 eGFP … オワンクラゲの野生型 GFP に対し 64 番目のフェニルアラニンがロイシンに、かつ 65 番目のセリンがスレオニンに変異を導入したもの。
- *2 蛍光寿命 … 蛍光分子が励起されてから発光するまでの平均時間のこと。
- *3 GimRET … 2016 年に発表された分子クラウディングを定量解析可能な蛍光タンパク質型センサーのこと。2016 年の発表において北村は GimRET の定量解析を一部担当した。GimRET の特徴については当時の下記プレスリリースも参考となる。

2016 年 3 月 10 日付けプレスリリース

分子混雑が計測できる蛍光タンパク質「GimRET」の開発-定量評価の実現により、分子混雑と細胞機能の関連の議論が可能に-

<https://life.sci.hokudai.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2018/03/160311-publication-kinjyo.pdf>