

研究報告書

「蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝の解析」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：今村 博臣

1. 研究のねらい

アデノシン三リン酸(ATP)は細胞内の主要なエネルギー通貨であり、筋肉の収縮や細胞運動、膜輸送、代謝反応、タンパク質分解といった様々な生体内の反応を進行させるために不可欠である。また、ATPは細胞内外のシグナル伝達物質としての役割も持っており、例えば細胞内では K_{ATP} チャンネルやAMP-activated protein kinase (AMPK)に作用してインスリンの分泌や細胞機能の制御を行い、細胞外ではイオンチャンネル型のP2X受容体あるいは7回膜貫通型のP2Y受容体に結合して神経伝達や発生、細胞の走化性に関与していることが知られている。細胞内外のATPの振る舞いを知ることは、生命の機能を理解する上で非常に重要である。従来、細胞内のATP量を分析する方法としては、細胞破碎液に含まれるATP量をホタルのルシフェラーゼによる発光、もしくは高速液体クロマトグラフィーによって計測する方法が広く用いられてきた。しかし、細胞を破壊してしまうため、細胞内コンパートメントや細胞ごとのATP濃度の分布やダイナミクスを調べることはできない。そのため、生きた細胞や組織・生体におけるATPの時空間的な動態の理解はほとんど進んでいなかった。本研究では、個々の生きた細胞内のATP濃度を可視化・定量する技術を確認し、細胞内ATPの基本的性質や制御機構、さらに生命現象(特に細胞死、細胞周期、インスリン分泌)におけるATPの役割を明らかにすることを目指した。

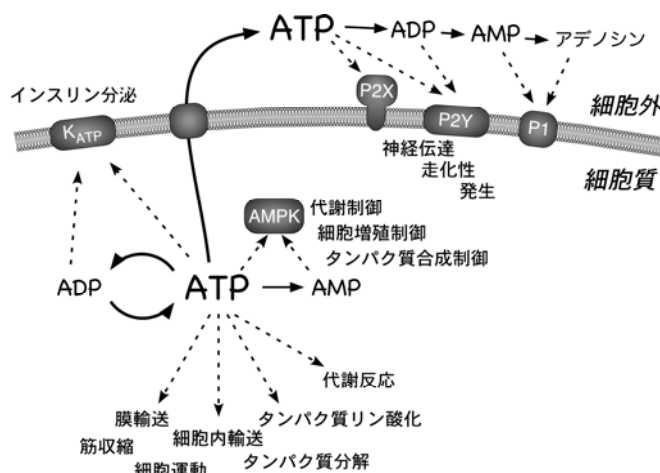


図1. 細胞内外における ATP の多様な役割

2. 研究成果

2-1 蛍光 ATP プローブ (ATeam) の開発

生細胞内ATP濃度を可視化・定量するために、ATP濃度に応じてフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)効率が変化する蛍光プローブの開発をおこなった。FRETは2つの蛍光物質の間で距離と相対角度に応じて励起エネルギーが移動する物理現象であり、タンパク質内の構造変化やタンパク質間の相互作用を測定する手法として適している。開発にあたり、バクテリア F_0F_1 -ATP合成酵素の調節サブユニットである ϵ に着目した。 ϵ サブユニットは、ATPを特異的に結合する、ATPを加水分解しない、ATPの結合によって大きな構造変化を起こす、という特徴を備えている。 ϵ サブユニットのATP結合に伴う構造変化をFRET効率の変化という形に変換できれば、 ϵ サブユニットとATPの結合・解離平衡の変化(すなわちATP濃

度の変化)を蛍光で可視化できると考えた。そこで、 ϵ サブユニットをシアン色蛍光タンパク質 (CFP) および黄色蛍光タンパク質 (YFP) ではさんだ融合タンパク質を作成した。この融合タンパク質では ϵ サブユニットの構造の変化によって CFP と YFP の距離と向きが変化し、CFP から YFP への FRET 効率が変化すると予想された。蛍光タンパク質の種類や ϵ サブユニットの生物種を変えて作製した様々な融合タンパク質の性質を蛍光分光器を用いて調べた。その結果、枯草菌由来 ϵ サブユニット、CFP として単量体化 super enhanced CFP (mseCFP)、YFP として 173 番目のアミノ酸が先頭になるように円順列変異を導入した単量体化 Venus (cp173-mVenus) を用いたときに、ATP 濃度変化に対応した FRET 効率の大きな変化が観察された。ATP 濃度が高い時には FRET 効率が上昇して YFP/CFP 比は高くなり、逆に ATP 濃度が低ければ FRET 効率が下がり YFP/CFP 比は低くなった。筆者らはこのプローブを ATeam (adenosine 5'-triphosphate indicator based on epsilon subunit for analytical measurements) と名付けた。ATeam は ATP に対する解離定数が 3.3 mM であり、これまでに報告されている細胞内 ATP 濃度の範囲に適していると考えられた。しかも、少なくとも 10 mM 以下の dATP, ADP, GTP には反応せず、ATP を選択的に検出できることも確認された。pH 7 以上では pH の変化に対して安定であることから、通常の細胞質の pH (約 7.3~7.5) やミトコンドリア内の pH (8.0~8.5) の範囲では多少の pH の変化があってもシグナルが影響を受けない。ATP に対する反応速度定数は 10 秒程度であり、それ以上遅い ATP 濃度の変化であれば追従することが可能であることがわかった。

2-2 ATP の細胞内分布

真核細胞に存在する細胞内小器官は、基本的には脂質の膜で囲まれ隔離された区画である。極性の高い ATP は脂質二重膜を通過できないため、特定のタンパク質の助け無しにこれらの区画の間を行き来できない。しかし、細胞を破碎する従来の ATP 測定法ではこれらの区画間の ATP 濃度の違いを検出することは不可能であった。特に着目したのは、細胞質、核、ミトコンドリアの違いである。核は DNA や RNA を合成するために大量に ATP を消費する区画であり、ミトコンドリアは細胞の ATP 合成の一端を担う区画である。そこで、HeLa 細胞の細胞質、核、そしてミトコンドリアマトリックスに ATeam を発現させてそれぞれイメージングを行い、ATeam の FRET シグナルを比較した。その結果、細胞質と核では YFP/CFP 比に大きな違いは見られなかった。一方、ミトコンドリアマトリックスでは細胞質や核と比べて YFP/CFP 比が顕著に低く、ATP 濃度が低く保たれていることが明らかとなった。おそらくミトコンドリアで合成された ATP がミトコンドリア内膜に存在する ATP:ADP 輸送体によってすみやかに排出されるのだろう。この結果はミトコンドリアの主な役割が ATP 合成であることと一見矛盾するよう見えるが、ATP をミトコンドリア内に溜め込まずに、その主要な消費場所である細胞質に運ばれるのは理にかなっている。脱共役剤である CCCP を加えると濃度差が解消したことから、細胞質とミトコンドリアの ATP 濃度差はミトコンドリア膜電位依存的に保たれている事が明らかとなった。

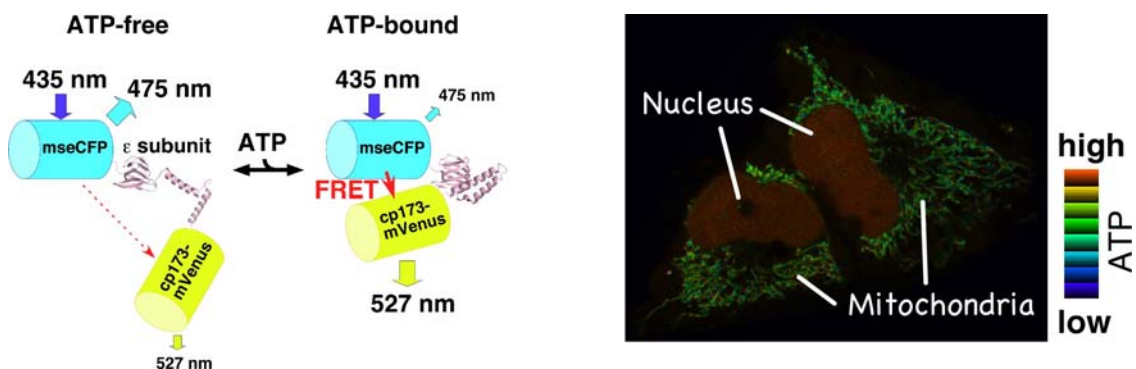


図2. 蛍光 ATP プローブ「ATeam」(左)および ATeam を用いた細胞内 ATP 濃度の可視化(右)

2-3 癌細胞内 ATP 濃度の薬剤感受性

好気的な条件下では、動物細胞の ATP は主として酸化的リン酸化によって合成される。しかし、虚血時などの嫌気的な条件では、酸化的リン酸化は働けないため解糖系が ATP 合成の大部分を担う。解糖系のみでの ATP の合成効率は非常に低く、酸化的リン酸化が働いてグルコースを完全酸化できる場合の 20 分の 1 程度である。ところが、癌細胞のエネルギー代謝は特徴的であり、好気条件であっても解糖系に ATP 合成を頼っていることが知られている。しかし、どのような仕組みで解糖系と酸化的リン酸化のスイッチが起きているかはほとんどわかっていない。ヒト癌由来の細胞株である HeLa 細胞の細胞質 ATP 濃度が、解糖系あるいは酸化的リン酸化の阻害剤に対して示す応答を、ATeam を用いたリアルタイムイメージングによって調べた。グルコースを含む通常の培地で培養した細胞に酸化的リン酸化の阻害剤であるオリゴマイシンあるいは CCCP を加えても、ATP 濃度の変化はほとんど観察されなかった。このことから、HeLa 細胞における ATP 合成の酸化的リン酸化への依存度は非常に低く、解糖系だけでも十分細胞内 ATP 濃度を維持できることがわかった。一方で、解糖系の阻害剤を加えた場合は顕著な ATP 濃度の顕著な低下が観察された。ところが、培地に含まれるグルコースをガラクトースに代えて同様の実験を行ったところ、酸化的リン酸化の阻害剤によって HeLa 細胞の ATP 濃度は速やかに減少し、10 分程度でほぼ枯渇した。この結果は、解糖系を主とした HeLa 細胞のエネルギー代謝が一つの培地成分の違いによって酸化的リン酸化を主としたものに変換したことを示しており、癌細胞の特徴的なエネルギー代謝を考える上で興味深い。

2-4 改変 ATeam を用いたカルシウムによるミトコンドリア ATP 合成活性化の可視化

カルシウムは細胞内メッセンジャーとして様々な細胞の活動を制御しており、細胞内カルシウム濃度の上昇は ATP 消費を亢進させる。ミトコンドリアの ATP 合成に参与する酵素がカルシウムによって活性化されるというこれまでの知見から、細胞内カルシウムの上昇は ATP 消費の亢進と平行して ATP の合成を上昇させる事で ATP の恒常性を保っていると考えられてきた。しかし、実際に生きた単一の細胞内で ATP とカルシウムを同時に計測した研究はなかった。一方、CFP-YFP の FRET を利用した ATeam は紫外領域の光で励起されるために、既存の蛍光カルシウムプローブとの併用には問題があった。

そこで、より長波長の蛍光を発する蛍光タンパク質の FRET ペアを探索し、オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) の変異体である cp173-mEGFP とサンゴ由来オレンジ蛍光タンパク質 (OFP) の変異体である mKO κ のペアを用いた時に、CFP-YFP ペアの場合と同様に ATP 濃度に応じた大きな FRET シグナルの変化が起こる事を見いだした。この新しい ATP バイオセンサーを GO-ATeam と名付けた。GO-ATeam は紫外領域の光でほとんど励起されないため、最も広く用いられる蛍光カルシウムセンサーである fura-2 との蛍光のクロストークはほとんどみられなかった。そこで、ミトコンドリアに GO-ATeam を発現させた HeLa 細胞に fura-2 をロードし、ミトコンドリア内 ATP と細胞内カルシウムの同時イメージングをおこなった。細胞をヒスタミンで刺激したところ、急速なカルシウムの上昇に続いてゆっくりとしたミトコンドリア ATP の上昇が観察された。また、細胞あたりのカルシウム上昇と ATP 上昇の幅には正の相関が見られた。この結果から、カルシウムが実際に細胞内でもミトコンドリア ATP 合成を亢進していることが明らかとなった。

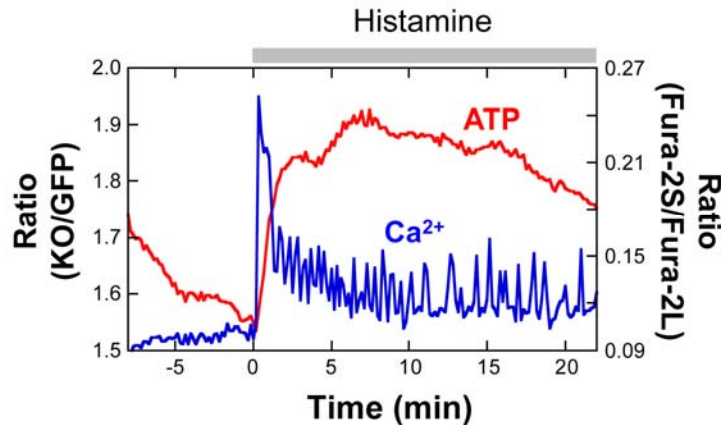


図3. ATP 濃度とカルシウム濃度の同時計測結果

2-5 細胞死におけるATPのダイナミクスの解析

これまでの研究から、細胞内ATPがアポトーシスの制御にも深く関わっている事が強く示唆されている。しかし、細胞死のどのタイミングでATP濃度が変化しているのかという知見は全くなかった。そこでATeamを用いて細胞死におけるATPのイメージングを試みたが、ATeamはアポトーシスで活性化されるカスパーゼによって分解を受ける事が判った。そこでカスパーゼによって分解を受ける部位を同定し、カスパーゼに耐性なプローブATeam^{DNDG}を開発した。ATeam^{DNDG}を用いて単一のHeLa細胞のアポトーシスの進行とATPの変化を同時に計測した結果、いくつかの事が明らかとなった。まず、細胞質ATP濃度は、ミトコンドリアからのチトクロムcの放出に続くミトコンドリア膜電位の消失が起こった後に徐々に低下を始め、数時間かかって枯渇することが明らかとなった。ガラクトース培地を用いた場合は膜電位の消失によって細胞質ATPは急速に枯渇することから、アポトーシスにおけるミトコンドリア膜電位の消失によって細胞のATP合成が解糖系のみ依存することが改めて確認された。また、細胞質ATPの低下には細胞膜の透過性の亢進は伴わなかったことから、ATPが細胞膜から漏れでているわけではない。上記のようにHeLa細胞ではCCCpでミトコンドリア膜電位を消失させた際には細胞質ATPの減少はみられない事から、アポトーシス細胞においてはATP合成と消費のバランスが崩れていると考えられた。

3. 今後の展開

ATPは細胞内のエネルギー通貨としての役割が強調され、注目される事は多くなかった。しかし、細胞内外のシグナルとしての役割やエネルギー代謝の破綻と疾患の関連が明らかになるにつれ、生体内のATPを視ることの重要性は近年増して来ている。本さきがけ研究によって、培養細胞を用いた細胞内ATPイメージングの方法論をほぼ確立出来たと考えられる。今後はこの手法を用いる事によって、細胞内のエネルギー代謝状態をより詳細に解析する事が可能になると期待される。また、個体・組織レベルでのATPイメージング法も確立することにより、より高次の空間階層におけるエネルギー代謝制御機構を明らかにしていく必要があるだろう。さらに、細胞外ATPシグナリング機構を明らかにするため、この手法を細胞外ATPのイメージングにも応用する必要がある。最終的にはATeamの技術を用いて、オルガネラレベルから個体レベルまで階層をまたいでATPの役割が理解される事を期待したい。

4. 自己評価

ATeamを用いて細胞の様々な場所におけるATP濃度をリアルタイムに測定する系を確立したことから、細胞内ATPイメージングの手法を確立するという第一の目標は達成出来たと考えている。また、ATPとカルシウムの同時イメージングの手法を確立し、カルシウムによるミトコンドリアATP合成の活性化を証明したことから、ATP代謝制御機構を明らかにするという第二の目標は部分的には達成出来たと考えている。しかし、当初はRNAiによる遺伝子ノック

アウトと ATP イメージングを組み合わせる事で、より詳細なメカニズムに迫る事を想定していたが、そこまでには至らなかった。また、第三の目標である生命現象における ATP の役割についての研究は、期間中に成果を挙げることが出来なかったが、研究自体は既にスタートしており、今後成果を報告出来ると確信している。

計画に多少無理があり予定していた研究全てをおこなう事は出来なかったのは反省点であるが、生細胞内蛍光 ATP イメージングという新しい手法を開発し、今後の研究の礎を築く事が出来たと評価している。

5. 研究総括の見解

ATP 合成酵素の ϵ サブユニットに着目して、細胞内の ATP 濃度をリアルタイムで測定するプローブを開発した成果は、オリジナリティーが極めて高いものと評価する。このプローブを用いることにより、より分解能の高い方法を確認するなどし、細胞内の種々のオルガネラや細胞内局所における ATP の測定に取り組んで欲しい。このためには多くの研究者との共同研究も必要と考える。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nakano, M, <u>Imamura, H</u> , Toei, M, Tamakoshi, M, Yoshida, M, Yokoyama, K. "ATP hydrolysis and synthesis of a rotary motor V-ATPase from <i>Thermus thermophilus</i> ." <i>J Biol Chem</i> , 283, 20789-20796 (2008)
2. Okuno, D, Fujisawa, R, Iino, R, Hirono-Hara, Y, <u>Imamura, H</u> , Noji, H. "Correlation between the conformational states of F_1 -ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 105, 20722-20727 (2008)
3. <u>Imamura, H</u> , Huynh Nhat, KP, Togawa, H, Saito, K, Iino, R, Kato-Yamada, Y, Nagai, T, Noji, H. "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators". <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 106, 15651-15656 (2009)
4. Kotera, I, Iwasaki, T, <u>Imamura, H</u> , Noji, H, Nagai, T. "Reversible dimerization of <i>Aequorea victoria</i> fluorescent proteins increases the dynamic range of FRET-based indicators." <i>ACS Chem Biol</i> , 5, 215-222 (2010)

(2) 特許出願 なし

(3) その他 招待講演

1. 今村博臣「 F_0F_1 -ATP合成酵素 ϵ サブユニットを用いた蛍光ATPプローブの開発」
第8回日本蛋白質科学会年会(東京)(2008年6月11日)
2. 今村博臣「新規ATPプローブを用いた細胞内ATP動態の計測」
第1回定量生物学の会年会(東京大学)(2009年1月12日)
3. 今村博臣「蛍光プローブを利用した細胞内ATPイメージング」
第1回光塾(情報通信総合研究機構)(2009年8月15日)
4. 今村博臣「イメージングによる細胞内ATPダイナミクスの計測」
第49回生命科学夏の学校(神戸セミナーハウス)(2009年8月28日)
5. 今村博臣「細胞内ATP濃度を可視化する」
特定領域研究-NAIST 植物科学研究教育推進事業「視る生物学4-進化するイメージング」(奈良先端科学技術大学院大学)(2009年11月25日)

受賞

1. 日本生物物理学会 若手奨励賞「細胞内ATPを蛍光で可視化する研究」(2007年)

12月22日)

著作物

1. 今村博臣, 野地博行, 「新規蛍光プローブを用いた細胞内ATPイメージング」**蛋白質・核酸・酵素** 2009; 54 巻 15 号: 1937-1944.
2. 今村博臣. 「新規FRETプローブを用いた生細胞内ATP濃度イメージング法」**実験医学** 2010; 28 巻 8 号: 1303-1308.
3. 今村博臣. 「蛍光イメージングによる細胞内および細胞外ATPの可視化」**生化学** 2010; 82 巻 11 号: 1056-1060.