

研究報告書

研究課題名：
蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝の解析

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名: 今村 博臣

(研究期間: 2007 年 10 月 1 日～ 2011 年 3 月 31 日)

研究報告書

1. 研究課題名

蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝の解析

2. 氏名

今村 博臣

3. 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。

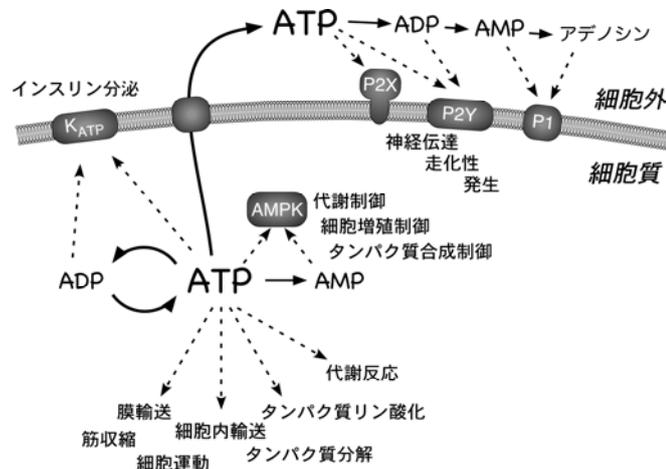


図1. 細胞内外における ATP の多様な役割

4. 研究成果

4-1 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。

4-2 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。

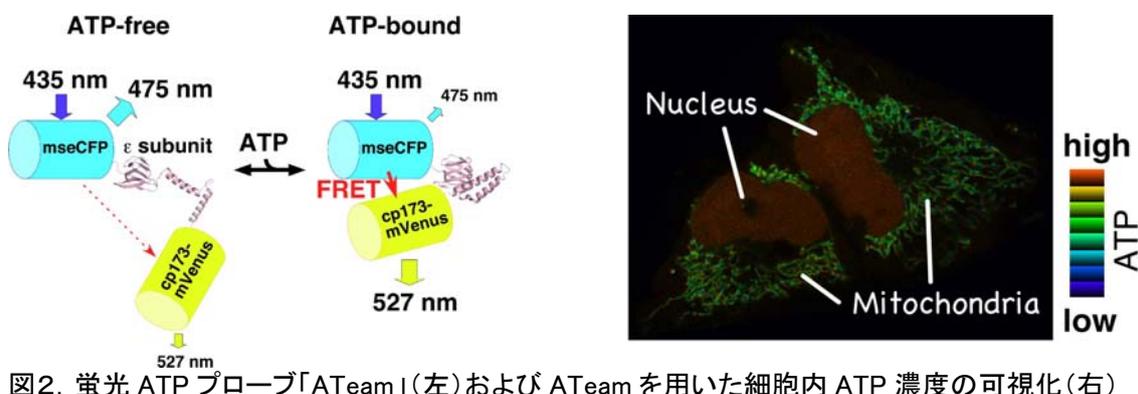


図2. 蛍光 ATP プローブ「ATeam」(左)および ATeam を用いた細胞内 ATP 濃度の可視化(右)

4-3 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。

4-4 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 合成に関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。

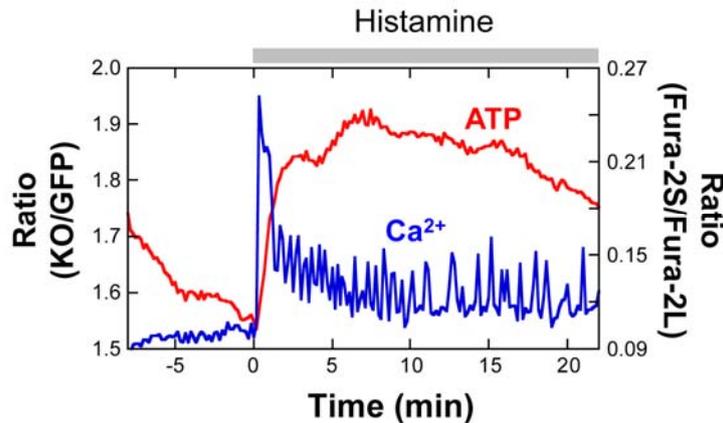


図3. ATP 濃度とカルシウム濃度の同時計測結果

4-5 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 濃度に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。

5. 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。

6. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Masahiro Nakano, Hiromi Imamura, Masashi Toei, Masatada Tamakoshi, Masasuke Yoshida, Ken Yokoyama, ATP hydrolysis and synthesis of a rotary motor V-ATPase from *Thermus thermophilus*, J. Biol. Chem., vol. 283, 20789–20796 (2008)
2. Daichi Okuno, Ryo Fujisawa, Ryota Iino, Yoko Hirono-Hara, Hiromi Imamura, Hiroyuki Noji,

Correlation between the conformational states of F₁-ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 105, 20722-20727 (2008)

3. Hiromi Imamura, Kim P. Huynh Nhat, Hiroko Togawa, Kenta Saito, Ryota Iino, Yasuyuki Kato-Yamada, Takeharu Nagai, Hiroyuki Noji, Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 106, 15651-15656 (2009)
4. Ippei Kotera, Takuya Iwasaki, Hiromi Imamura, Hiroyuki Noji, Takeharu Nagai, Reversible Dimerization of *Aequorea victoria* Fluorescent Proteins Increases the Dynamic Range of FRET-Based Indicators, ACS Chemical Biology, vol. 5, 215-222 (2010)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果

(A)学会発表

1. 今村博臣、Kim P. Huynh Nhat、齊藤健太、飯野亮太、山田康之、永井健治、野地博行、細胞内 ATP の可視化、生体エネルギー研究会第 33 回討論会(山口)(2007 年 11 月 15 日)
2. 今村博臣、齊藤健太、永井健治、野地博行、FRET プローブを用いた生細胞内 ATP の蛍光イメージング、日本光学会年次学術講演会シンポジウム「バイオイメージング技術の現状と将来展望」(大阪)(2007 年 11 月 28 日)
3. 今村博臣、細胞内 ATP を蛍光で可視化する、日本生物物理学会第 45 回年会(横浜)(2007 年 12 月 21 日)
4. Hiromi Imamura, Kenta Saito, Kim P Huynh Nhat, Ryota Iino, Yasuyuki Yamada, Takeharu Nagai, Hiroyuki Noji, Fluorescence imaging of intracellular ATP using a FRET-based probe, Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting and 16th International Biophysics Congress, Long Beach, California, USA (2008/2/3)
5. 今村博臣、F₀F₁-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)
6. 今村博臣、齊藤健太、飯野亮太、山田康之、永井健治、野地博行、蛍光 ATP プローブを用いたアポトーシスにおける ATP の時空間ダイナミクスのイメージング、第 64 回日本生物物理学会年会(福岡)(2008 年 12 月 5 日)
7. 今村博臣、細胞内 ATP 濃度を可視化するための新技術の開発、第 64 回大阪大学産業科学研究所学術講演会(大阪)(2008 年 12 月 1 日)
8. 今村博臣、蛍光 ATP 指示薬を用いたアポトーシスにおける細胞内 ATP ダイナミクスの計測、BMB2008(神戸)(2008 年 12 月 12 日)
9. 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)(2009 年 1 月 12 日)
10. 今村博臣、齊藤健太、永井健治、野地博行、アポトーシスにおける細胞内 ATP ダイナミクスの可視化、特定領域研究「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」第 4 回班会議(沖縄)(2009 年 6 月 17 日)
11. 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(神戸)(2009 年 8 月 15 - 16 日)
12. 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)(2009 年 8 月 28 日)
13. Hiromi Imamura, Kim P. Huynh Nhat, Hiroko Togawa, Kenta Saito, Ryota Iino, Yasuyuki Yamada, Takeharu Nagai, Hiroyuki Noji, Imaging of intracellular ATP using FRET-based indicators, International symposium of Post-Silicon Materials and Devices Research

- Alliance Project, Osaka, Japan (2009/9/5)
14. Hiromi Imamura, Kim P. Huynh Nhat, Hiroko Togaw, Kenta Saito, Ryota Iino, Yasuyuki Yamada, Takeharu Nagai, Hiroyuki Noji, Imaging of intracellular ATP using FRET-based indicators, Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes, Kyoto, Japan (2009/9/9)
 15. Keisuke Tomiyama, Masahiro Nakano, Hiromi Imamura, Hiroyuki Noji, バクテリアー細胞レベルでの細胞内 ATP イメージング、第 47 回日本生物物理学会年会(徳島)(2009 年 10 月 30 日)
 16. Hiromi Imamura, Hiroyuki Noji, 細胞分裂周期における細胞内 ATP ダイナミクスのイメージング、第 47 回日本生物物理学会年会(徳島)(2009 年 11 月 1 日)
 17. 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「見る生物学4—進化するイメージング—」(生駒)(2009 年 11 月 25 日)
 18. 今村博臣、野地博行、蛍光 ATP プローブを用いたミトコンドリア内 ATP 濃度の解析、日本生体エネルギー研究会第 35 回討論会(旭川)(2009 年 12 月 20 日)
 19. Hiromi Imamura, Hiroyuki Noji, ATP gradient across the innermitochondrial membrane, Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA (2010/2/23)
 20. J. Kishikawa, M. Fujikawa, H. Imamura, K. Yasuda, N. Ishii, S. Mitani, H. Noji, K. Yokoyama, ATP concentration change in *Caenorhabditis elegans*, 16th Europe Bioenergetics Conference 2010, Warsaw, Poland (2010/7/19)
 21. H. Imamura, M. Nakano, H. Noji, Simultaneous ratiometric imaging of ATP and Ca²⁺ concentrations inside single living cells, 16th Europe Bioenergetics Conference 2010, Warsaw, Poland (2010/7/21)
 22. 中野雅裕、今村博臣、野地博行、Red-shifted genetically-encoded fluorescent ATP indicators enabled simultaneous imaging of ATP and Ca²⁺ inside single living cells、第 48 回日本生物物理学会年会(仙台)(2010 年 9 月 20 日)
 23. 中野雅裕、今村博臣、野地博行、赤色シフトした蛍光 ATP バイオセンサーを用いた単一細胞内 ATP およびカルシウムの同時イメージング、第 36 回日本生体エネルギー研究会(大阪)(2010 年 11 月 20 日)
 24. 中野雅裕、今村博臣、野地博行、細胞内 ATP とカルシウムの同時イメージング、第 2 回光塾(大阪)(2010 年 12 月 11 日)
- (B)受賞
1. 日本生物物理学会若手奨励賞(2007 年 12 月 22 日)
- (C)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, vol. 54, 1937-1944 (2009)