

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18522

研究課題名(和文)動物細胞内におけるATPの供給・消費バランス機構の解明

研究課題名(英文)Balancing mechanism of ATP synthesis and consumption in mammalian cells

研究代表者

柳沼 秀幸(Yaginuma, Hideyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：10733222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞の活動に重要なエネルギー物質であるアデノシン三リン酸(ATP)の合成や消費のバランス機構の解明を目的に、過去に開発したATP濃度を定量することのできる蛍光タンパク質“QUEEN”の改良と単一動物細胞測定に適した実験系の開発を行った。37℃測定に適した改良版のQUEENを作成に成功し、動物細胞内において発現させ観察する系を開発した。また、既存の別手法との比較により測定されたATP濃度が十分信頼できるを示すことができたほか、単一細胞で薬剤応答を観察する系も確立した。今後は開発された系を様々な条件下の細胞に活用して、エネルギーバランスの仕組みの解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：Until now, how synthesis and consumption of ATP is balanced inside mammalian cells is unclear. Recently, I invented an ATP indicator fluorescent protein “QUEEN”, which can be used to quantify ATP concentration in single cells. Here, I improved QUEEN and developed a method for usage in mammalian cells. The new version of QUEEN was optimized for measurement at 37 °C and was able to express and observe in mammalian cells. I compared QUEEN signal with another previous method and showed that ATP concentration measured by QUEEN is reliable indeed. I also developed a method to monitor the cell response to metabolic inhibitors. By applying this approach to several conditions and cell species, I aim to make clear the energy balance mechanism in the cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ATP 蛍光イメージング 代謝

1. 研究開始当初の背景

ATP は細胞のエネルギー通貨といわれ、細胞内で最も重要な代謝物質である。しかし、その細胞内での動態は不明な点が多い。従来、ATP は主にミトコンドリアでの好氣的呼吸により産生され、速やかに細胞内で拡散するとされてきた。一方、神経細胞のシナプスや上皮細胞の基底陥凹など、エネルギー消費が激しい局所にミトコンドリアが集積していることが知られている。また、近年、神経細胞で活動依存的なミトコンドリアの局在の変化が報告され、その異常が神経変性疾患との関連で注目されている。これらの所見は、ATP 消費の大きい局所で ATP を産生することの重要性を示唆する。すなわち速やかな拡散で細胞内で一様に分布するという古典的で単純な描像を越えて、細胞内で ATP の産生と消費の時空間動態を定量的に理解することが重要である。

動物細胞あるいはミトコンドリアにおいて、ATP 濃度を一定に維持するシステムの存在が考えられる。たとえば、一定濃度以上の ATP は速やかにミトコンドリアから細胞質へと放出するシステムが存在すれば、ミトコンドリア内の ATP 濃度は ATP 産生能によらずほぼ一定となるだろう。細胞質においても同様に、フリーの ATP 濃度を一定に保つ一種のバッファのようなシステムが存在するのかもしれない。しかし、そうしたシステムの実態はいまだに明らかになっていない。

細胞のエネルギー通貨である ATP は、あらゆる細胞機能に直結する。定量計測が可能になることによって、さまざまな病態の理解においても、基礎的で重要な情報を提供できるものであると予想される。実際、近年ではさまざまな疾患とミトコンドリア動態の関連が指摘されており、その背景としてミトコンドリアからの ATP 供給の異常が考えられている。疾患が進行する過程で細胞内の ATP 供給戦略はいかなる変化をたどるのかといった基礎的な知見は、治療の方針を立てる上でも有用であると考えられる。

2. 研究の目的

ATP (アデノシン三リン酸) はあらゆる生体反応に関与する重要なエネルギー通貨であるにも関わらず、その濃度の時空間動態及びその調節機構はほとんどわかっていない。申請者は既存の ATP センサーの問題点を解決する単一 GFP の蛍光変化を利用した新規 ATP センサー「QUEEN」の開発に成功し、大腸菌一細胞内での ATP 濃度の定量計測に成功した (図 1)。本研究ではこの技術を哺乳類細胞に応用し、代謝状態への摂動の応答を時間的空間的に定量計測することで、生命機能のエネルギー基盤である ATP の時間的空間的調節システムのアッセイ系を確立し、これを利用して分子の実態の検索を行う。

3. 研究の方法

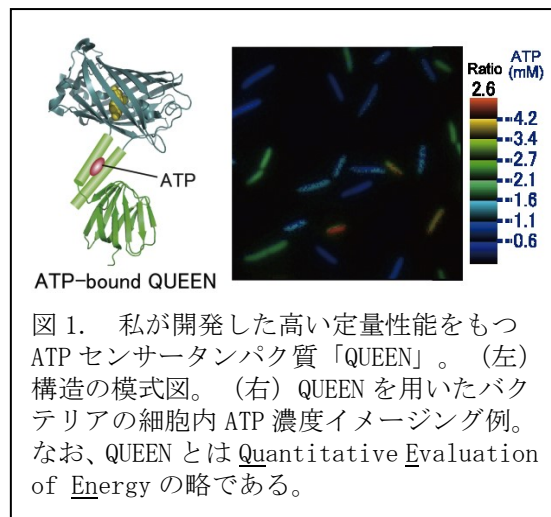


図 1. 私が開発した高い定量性能をもつ ATP センサータンパク質「QUEEN」。(左) 構造の模式図。(右) QUEEN を用いたバクテリアの細胞内 ATP 濃度イメージング例。なお、QUEEN とは Quantitative Evaluation of Energy の略である。

(1) 定量的 ATP バイオセンサー QUEEN の改良と、動物細胞への最適化

申請者らの QUEEN は、応答性が高く定量性に優れるが、ダイナミックレンジすなわち計測可能な ATP 濃度域が狭い。そのため、哺乳類細胞の培養温度・ATP 濃度に応じて応答性を最適化する必要がある。最適化した QUEEN の配列を得るために変異を導入して改良を行う。また、改良した QUEEN の評価を *in vitro* の蛍光分光器を用いた実験系、あるいは細胞を用いた顕微鏡下における実験系を用いて評価する。

加えて、細胞内で ATP を多量に消費する場所を変化させ、その際に ATP 濃度がどのように変動するかを観察することを観察することが必要となる。これを達成するため、まずは細胞内のさまざまな部位の ATP 濃度を個別に計測できるようにする必要がある。QUEEN は、別種のタンパク質やターゲティングシグナル配列と結合させて細胞内で発現させることにより、任意のオルガネラや構造で特異的に光らせることができる。細胞内のさまざまな局所における ATP 濃度を測定可能にするため、例えばミトコンドリア、核、アクチン等に局在させた QUEEN のバリエーションを作成する。

(2) 動物細胞内 ATP 濃度の定量的一細胞計測

通常型の QUEEN を動物細胞内で発現させ、細胞内 ATP 絶対濃度を定量計測する。顕微鏡下での応答を見るための実験系の構築を行う。蛍光照射による細胞に対するダメージを最小限に抑えるために、観察条件を検討する。また、様々な細胞において QUEEN を発現させて、それらの違いを観察する。発現させるにはトランスポゾン配列による組み換えやレンチウイルスなどを利用する。細胞ごとの ATP 濃度の違いや細胞周期に伴う時間変動などを計測する。

(3) 薬剤投与による代謝状態の摂動への応答の計測

代謝経路阻害剤など薬剤投与による ATP 代謝系への摂動を試みる。たとえば、ミトコンドリアではミトコンドリア外へ ATP を輸送するキャリアタンパク質の作用が強力で、ミトコンドリア内の ATP 濃度がキャリアの K_m を反映している可能性がある。このため、個別ミトコンドリアの ATP 産生能の比較では、薬剤等による ATP キャリアの阻害を試み、阻害剤添加前と比較する。また、細胞では ATP の産生は解糖系や酸化的リン酸化により行われている。それぞれの ATP 合成量への影響をみるために阻害剤を添加する実験を行う。さらに、培地中の栄養成分の変化が ATP 合成に寄与するかどうかを調べるため、栄養成分を抜いたり変化させた培地に交換したうえで ATP 濃度変化を計測する。

(4) 上皮間葉転換のモデル系等を利用した細胞の形態・状態変化における ATP 濃度変動の計測

極性を持った上皮細胞のモデルである MDCK 細胞は、HGF 刺激で上皮間葉転換 (EMT) を起こす。大きな細胞形態変化を伴うこの過程を利用して、細胞内の ATP 濃度の変動を計測する。EMT は、発生・創傷治癒や癌の浸潤・転移の重要な過程であるため、本計測結果は基礎生物学的興味に留まらず、発生・再生あるいは癌の研究にも貢献が期待される。

4. 研究成果

(1) 動物細胞に適した新規 ATP センサータンパク質の開発、及び動物細胞の測定系の開発

動物細胞の標準的な培養温度である 37°C で ATP 濃度を計測することができる QUEEN を開発するため、QUEEN タンパク質内の ATP 結合部位に相当する配列に変異を起こし、37°C において生理的 ATP 濃度によく応答する配列の探索を行った。作成した候補が ATP 濃度やその他の細胞内のパラメータでどのように変化するかを蛍光分光器を用いて測定を行った。多数の変異体に対して探索を行った結果、動物細胞内において良好な応答性を持つ ATP センサーを得ることができた。また、さまざまなバッファーの条件下や他のヌクレオチドの存在下の測定によって、この ATP センサーは細胞内の測定耐えるだけの性能を持つことが明らかになった。このようにして、動物細胞で使うことのできる改良型の QUEEN を得た。

(2) 新規 ATP センサーを用いた動物細胞内 ATP 測定の実験系の構築

改良された QUEEN をトランスポゾン配列による組み換えやレンチウイルスを用いて動物細胞内に発現させた。その結果、さまざまな種類の細胞で問題なく改良型 QUEEN が発現

し、細胞増殖にもほとんど影響を与えないことがわかった。続いて、改良型 QUEEN の発現した MDCK 細胞を用いて細胞内 ATP 濃度の測定が可能かどうかを検討した。QUEEN のシグナルは 405 nm 付近と 488 nm 付近の二つの波長で励起した蛍光強度の比 (レシオ) である。レシオの値を ATP 濃度に変換する際には、ATP が最大限 QUEEN に結合している場合、及び全く QUEEN に結合していない場合のレシオの値が必要であるが、この値は顕微鏡などの設定により異なるため、キャリブレーションが必要である。顕微鏡下でこのキャリブレーションを行う手法を開発した。既存の ATP 測定法との比較を行った結果、改良型の QUEEN は細胞内 ATP 絶対濃度に対して正確に応答していることが明らかになった。

また、局在シグナルを用いてアクチンフィラメントやミトコンドリアの外膜、核内などに改良型 QUEEN を局在させて、局所的な変化を観察することも可能になった。

(3) 細胞の薬剤代謝阻害に伴う細胞代謝状態の計測

続いて私は、顕微鏡下の励起条件や蛍光取得条件を微調整することで、細胞へのダメージなどの悪影響を最小限に抑えつつ長時間の QUEEN シグナルの変化を追うこともできる実験条件を決定した。この条件のもとで細胞質の改良型 QUEEN のシグナルを取得しつつ代謝を阻害する薬剤を加えて摂動を与えた。阻害剤に対して、ATP 濃度が変動する様子を観察することができた。今後は様々な種類の細胞や、細胞に対して分化を誘導した際の経時的な代謝状態の変化を追っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

① 柳沼秀幸、岡田康志. 「単一動物細胞の ATP 濃度定量イメージングを可能にする蛍光プローブの開発・検証とその応用」第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎大学坂本キャンパス (長崎県長崎市) 2017 年 3 月 29 日

② Hideyuki Yaginuma, Yasushi Okada. "Single-cell quantification of ATP concentrations inside mammalian cells by an improved fluorescent ATP indicator" ASCB 2016 annual meeting, サンフランシスコ (カリフォルニア州、アメリカ合衆国)、2016 年 12 月 4 日

③ 柳沼秀幸、岡田康志. 「改良型蛍光 ATP センサーを用いた一細胞及び細胞内局所 ATP 濃度の測定」第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議展示場 (茨城県つくば市)、2016 年 11 月 26 日

④ 柳沼秀幸、岡田康志. 「動物細胞内エネルギー

ギーバランス機構の解明を目的とした定量的 ATP センサー QUEEN の改良」第 68 回日本細胞生物学会大会、京都テルサ（京都府京都市）、2016 年 6 月 15 日

⑤柳沼秀幸、岡田康志. 「アクチンフィラメント近傍の ATP 濃度の蛍光イメージング」第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 ビッグパレットふくしま（福島県郡山市） 2016 年 3 月 29 日

⑥柳沼秀幸、河合信之輔、田端和仁、富山佳祐、垣塚彰、小松崎民樹、岡田康志、今村博臣、野地博行. 「一細胞計測で見えてきたバクテリア細胞内 ATP 濃度の多様性」第 67 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀（東京都江戸川区）、2015 年 6 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳沼 秀幸 (YAGINUMA, Hideyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：0733222