

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14024

研究課題名(和文)1細胞エネルギーマップ作成のための頑強な定量性を担保するATPセンサーの開発

研究課題名(英文)Development of a robust fluorescent ATP sensor and its application for quantitative analysis

研究代表者

新井 敏(Arai, Satoshi)

早稲田大学・総合研究機構・次席研究員(研究院講師)

研究者番号：70454056

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): アデノシン三リン酸(ATP)は、エネルギー代謝の研究において、最も大事な分子の一つである。本研究課題では、細胞内のATPの空間的な分布に加えて、標的とする場所のATPの絶対濃度を定量的に解析出来る手法の開発を目的とする。緑色蛍光タンパク質の変異体に、ATP結合タンパク質であるATP合成酵素の一部のユニット(イプシロンサブユニット)を挿入し、ATP結合に伴い、蛍光寿命の値が変化する蛍光センサーの開発に成功した。これを用いて、ATP産生系の特徴が異なる様々な細胞種のミトコンドリアと細胞質のATPの濃度の違いを見ることに成功した。

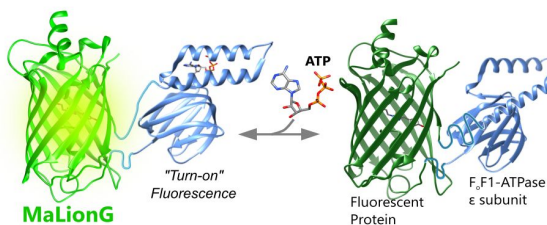
研究成果の概要(英文): An adenosine triphosphate (ATP) is considered to a most important molecule as a molecular unit of currency in biological studies on energy metabolism. Our study is aimed at establishing a method that allows quantitative analysis of intracellular ATP level at targeted place at single cellular resolution. We generated a genetically encoded fluorescent sensor which comprises a green fluorescent protein variant and the part of the bacterial FoF1-ATP synthase. It exhibited the change in fluorescence as well as fluorescent lifetime in response to the change in ATP concentration. Thanks to this unique property, we were able to obtain the spatio-temporal information regarding ATP dynamics and analyse its concentration quantitatively at the same time at the same cell. More specifically, we succeeded to observe the difference of intra/sub-cellular ATP level between different cell types and organelles.

研究分野: Chemical Biology

キーワード: Fluorescent protein Fluorescent sensor ATP Bioimaging Quantitative analysis Single cell

1. 研究開始当初の背景

エネルギーの通貨と呼ばれるアデノシン 3リン酸 (以下、ATP) は、生物学の研究で最も大事な分子の1つと断言していい。細胞内の様々な化学反応、モータータンパク質を介した能動輸送の為にエネルギー、また、時にシグナル分子として機能するなど、その役割は多岐に渡る。その ATP の細胞内での時空間分布を知ることは、生物学の研究を大きく前進させるために欠かせない。細胞内の低分子のダイナミックな変化を捉えるためには、蛍光センサー技術が最も、簡便で、汎用性が高い。現在までに、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく蛍光タンパク質をベースにしたセンサー (ATeam, Imamura et al., PNAS, 2009) 或いは、レシオメトリックな蛍光強度の変化として検出できるセンサー (QUEEN, Yaginuma et al., Sci. Rep., 2014) などが報告されている。最近では、研究代表者と同所属の北口ら (現: 東工大) と共に、赤、緑、青の3種類の単色型の輝度変化型 ATP センサーを開発し、細胞内の異なる場所の ATP 動態を同時に計測することも可能になってきた (論文投稿中: 下、概念図)。



これらの一連の蛍光センサーは、現在の生物学研究を行う大学・企業などでは一般的に普及しつつある蛍光顕微鏡さえあれば使用できる。また、有機合成を必要とする化学系の低分子の蛍光センサーと異なり、遺伝子コード型のセンサーは、プラスミドを容易に譲渡できるという簡便性も相まって、世界中で使われるようになってきている。

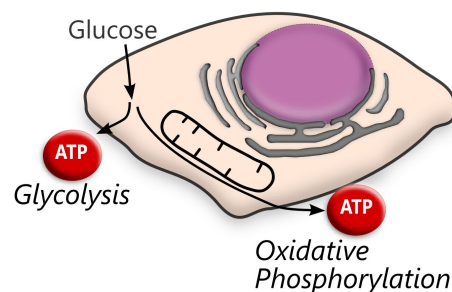
1細胞レベルでのATPの空間分布を顕微鏡の解像度で観察できるようになってきた一方で、ATPがどこに「どれくらいの量」存在しているかを知るための定量的な解析手法には、未だに大きな問題がある。前述のFRET型やレシオ型のセンサーは、単色型のセンサーに比べると、アーティファクトも少なく、相対的な定量解析には優れている。しかしながら、蛍光タンパク質の発現量やクロモフォア (色素) の成熟度 (Maturation) が異なることがあり、データのばらつきの大きな原因となる。また、励起波長に依存して、輝度の

値が著しく変わってしまうことから、仮に同じ蛍光センサー・同じ顕微鏡を使っている、逐次、検量線を描かねばならない煩わしさを伴う。最近ではルシフェリン・ルシフェラーゼを使った生物発光による手法により、これが細胞の中で適用できるようにもなってきたが、定量性には優れるものの、十分な発光量を獲得するのに長時間の露光が必要などの問題点がある (Yoshida et al., Sci. Rep.2016)。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞内の ATP の空間的な分布と同時に、「狙った場所」の ATP の濃度を定量的に解析出来る手法の開発を目的とする。これに今までの輝度変化に基づくレシオ測定や、生物発光ではない手法として、蛍光寿命を使ったイメージング手法を導入する。蛍光寿命は、蛍光タンパク質の発現量の違い (センサー濃度の違い)、ドリフト等の顕微鏡のアーティファクト、励起波長の強度の違い等の影響からは独立した値であり、ほとんど影響を受けない。従って、仮に、蛍光 ATP センサーが、ATP の濃度依存的に蛍光寿命が変化するような作動原理に基づくものであれば、世界中の研究者が再現性をとりやすい非常に頑強な ATP センサーとなりうる。つまり、ATP 1 mM = 寿命 x [ns] という1対1の対応が紐づけられれば、定量的な解析が可能になる。これを本課題では、ATP の絶対濃度解析と定義した。

これまでに、蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーで蛍光寿命が変化するセンサーは、あまり知られていない。そこで、本課題では、センシングする分析対象の濃度依存的に蛍光寿命が変化するセンサー原理を追求すると共に、これに基づく ATP センサーを開発した。続いて、これを用いて、細胞の中の ATP の絶対濃度定量に挑戦した。具体的には、細胞の中の ATP の産生系に着目し、解糖系 (細胞質) と酸化的リン酸化の両面から、細胞内の局所の ATP 濃度について考察した (下図)。



3. 研究の方法

前述の我々が開発してきた ATP センサーの骨格を元に研究を進めた。緑色蛍光タンパク質の変異体 (X) を元に、Y 番目のアミノ酸残基の部分に、ATP 結合タンパク質を挿入する。ATP 結合タンパク質には、Imamura らと同じ、ATP 合成酵素の ϵ サブユニットを使用した。これが ATP と結合することで、大きな構造変化を起こすことが知られていることから、ATP 結合に伴うコンフォメーション変化が、近接する蛍光タンパク質のパレル構造 (樽構造) の内部の色素の周りのミクロな化学環境に変化を引き起こすものと予想される。まず、本研究では、ATP 結合に伴い、蛍光寿命が変化する変異体の探索のためのスクリーニングを行った。このために、サブユニットの挿入位置 (Y 番目) を複数箇所、検討した。更に、 ϵ サブユニットと蛍光タンパク質をつなぐリンカーペプチドの長さやアミノ酸の種類等をランダムスクリーニングにより改変しながら、試験管内で最適化を行った。

最適化したコンストラクトに関して、動物細胞用のベクターを作成し、様々な細胞種についての定常状態での ATP 濃度の定量、刺激の有無による ATP の濃度変化等を、共同研究者らと共に蛍光寿命顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

今までに得られている単色の輝度変化型の緑色蛍光タンパク質変異体 (X) の Y 番目の位置に挿入していた MaLionG は、ATP 結合前後で、ほとんど、蛍光寿命の値に変化が見られなかった。そこで、Y 番目の位置から、挿入位置を 1 つずつ Y+n 番目に (n=-4, -3, ..., 0, +1, +2, ...) ずらしたコンストラクトを作成し、更に、前述の通り、蛍光タンパク質と ATP 結合タンパク質 (サブユニット) を繋ぐペプチドリンカーの種類を複数変化させながら、最適化を行った。試験管内のスクリーニング実験の結果、Y+c 番目の残基の位置に挿入し、ある長さで、かつ強直なペプチドのリンカーを導入した際、ATP 結合に伴い、蛍光強度が下がる Turn-off 型のセンサーが得られた。興味深いことに、吸収スペクトルを確認したところ、今まで得られてきた蛍光センサーとは全く異なる挙動を示した。Turn-on 型の MaLionG は、ATP 結合に伴い、色素の非蛍光性のプロトン化したフォームに帰属される吸収帯が減少する一方、蛍

光性のアニオン種の吸収帯が増加する。このタイプの挙動を示すセンサーは蛍光寿命の ATP 濃度の依存性が無い。

一方、Turn-off 型の今回見つかった Construct は、従来のアニオンプロトン化の平衡の変化を伴わず、ATP 結合に際し、若干の吸収波長のシフトが起きたが、これに応答して、大きく蛍光寿命も変化した。

続いて、精製したこのセンサータンパク質を用いて、ATP の濃度依存性、基質特異性等を調べた。結果、mM オーダーの生理条件下で作動すること (ATP の濃度の増加に伴い、蛍光寿命は減少) ATP と構造が良く似た他の核酸塩基にはほとんど応答せず、高い基質特異性を示した。

更に、動物細胞用のベクターを作成し、トランスフェクションし、2-3 日インキュベートした後、顕微鏡観察した (細胞は HeLa)。蛍光タンパク質の発現量も、明るさも、顕微鏡観察に十分な輝度値を得ることができた。これを HeLa 細胞の細胞質に発現させ、解糖系の阻害剤 (NaF) を加えたところ、蛍光寿命の値が、顕著に増大した (ATP の減少に相当)。更に、このセンサーにターゲットシグナルを導入し、ミトコンドリア、核、細胞膜など複数の場所に配置できるようにプラスミドを作成した。次に、細胞質とミトコンドリアにこのセンサーを発現させ、様々な動物細胞を始めとした細胞 (がん細胞、褐色脂肪細胞など) の ATP 濃度 (ミトコンドリア vs 細胞質) を計測した。

試験管内で作成した検量線 (横軸: ATP 濃度 [mM]、縦軸: 蛍光寿命 [ns]) を用いて、ミトコンドリアと細胞質の ATP 濃度を見積もったところ、数種類の細胞株において、ミトコンドリアの方が、細胞質より ATP 濃度が低いことが分かった。また、解糖系が亢進しているがん細胞 (ワーブルグ効果) と、ミトコンドリアによる ATP 産生が主要経路である正常な細胞の間に、ATP 濃度に関して、顕著な差が見られた。

現在、細胞間、或いは、オルガネラの間における ATP 濃度のばらつき、その時空間情報を解析中であり、論文準備中である。以上、当初予定していたコンセプトに合致する蛍光タンパク質の ATP センサーの作製に成功した。このセンサーの作動原理は、ATP に限らず、あらゆるセンサーへの適用することのできる波及効果の高い成果であるに違いない。

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4件)

(1)(ポスター発表) Satoshi Arai, Takashi Tsuboi, Madoka Suzuki, Tetsuya Kitaguchi, Colorful Fluorescent Indicators Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP and Temperature in Living Organism, Light Sheet Fluorescence Microscopy International Conference (LSFM) (国際学会)2017年6月14 - 17日

(2)(ポスター発表) Satoshi Arai, Takashi Tsuboi, Tetsuya Kitaguchi. RGB-color Fluorescent Genetically-encoded ATP indicators for Energy Metabolism Research, Joint Symposium on Bioimaging between Singapore and Japan (国際学会) 2017年5月20 - 21日

(3)(招待講演) Satoshi Arai. Spatiotemporal imaging of subcellular ATP using RGB-colorful fluorescent protein based indicators, International Chemical Biology and Molecular Imaging Conference (国際学会) 2017年2月26日 Singapore

(4)(招待講演) Satoshi Arai, Hideki Itoh, Thankiah Sudhaharan, E. Birgitte Lane, Tetsuya Kitaguchi. RGBカラーの蛍光タンパク質センサーによる細胞内ATPの時空間イメージングと定量解析, 生物物理学会第54回年会, 2016年11月26日つくば国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 敏 (ARAI SATOSHI)

早稲田大学・総合研究機構・次席研究員(研究院講師) 研究者番号: 70454056

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

無し