

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14709

研究課題名(和文)新規発光型ATPバイオセンサーによる光合成生物内ATP動態の定量的解析

研究課題名(英文)Quantitative analysis of ATP dynamics in photosynthetic organisms by a novel bioluminescence ATP biosensor

研究代表者

今村 博臣 (Imamura, Hiromi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20422545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規BRET型ATPバイオセンサーであるBTeamを開発した。BTeamはATPに特異的に反応し、37°Cにおいては約0.5-6.0 mMの範囲のATP濃度をBRET効率の違いとして検出することが可能であった。BTeamを発現させた培養動物細胞のBRET効率を測定することで、生きた細胞のATP濃度を極めて高い定量性で経時的に測定できることが示された。また、ゼブラフィッシュを用い、個体レベルでATP濃度を測定できることが示された。現在、BTeamを発現する植物個体を構築中である。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel genetically encoded BRET-based ATP biosensor, BTeam. It reacts specifically to ATP, and reports ATP concentrations in a range of 0.5 - 6.0 mM as BRET efficiencies. By measuring BRET efficiencies of BTeam-expressing cultured cells, we were able to quantitatively estimate ATP concentrations inside living cells. We also demonstrated that BTeam can report ATP concentrations inside a living organism using a zebrafish expressing BTeam. Currently, we are constructing a plant expressing BTeam in order to monitor ATP dynamics in plants during photosynthesis.

研究分野：バイオイメージング、生物物理学、生化学

キーワード：生物発光 BRET イメージング 光合成 ATP

1. 研究開始当初の背景

植物をはじめとする光合成生物の光合成量は光の強さに依存するが、ある一定の強さを越えた光はその増大につながらない。これは光飽和と呼ばれ、光飽和量は炭酸同化量に依存するとされる。炭酸同化では葉緑体の電子伝達系において生産された NADPH や ATP を利用して二酸化炭素を固定する。従って、光合成効率の決定因子として ATP は非常に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、光合成生物個体における光照射量と ATP 増加量の定量的な関係は、これまで適切な解析手法がなかったため定かではない。

申請者らは本研究開始にいたるまで、遺伝子コード可能な蛍光 ATP バイオセンサーである「ATeam」および「QUEEN」を開発し、生きた動物細胞・個体およびバクテリア細胞の ATP 濃度をイメージングすることを可能としてきた。これらの技術を用いた研究によって、動物細胞では ATP が細胞内に不均一に分布していること、膵島細胞によるインスリン分泌において、細胞外グルコース濃度の上昇に伴う ATP 濃度の上昇と維持がインスリンの分泌に重要であること、アポトーシス誘導性の細胞死において積極的に ATP 濃度の低下させる機構が働いていること等が見出されてきた。また、同じ遺伝子型を有し、同一条件で培養した大腸菌集団においても個々の細胞の ATP 濃度は大きくばらついてる事を発見した。

一方、光合成生物は光が照射されると ATP を合成するため、蛍光バイオセンサーを励起するための強力な光が細胞内 ATP 濃度を乱してしまう可能性が非常に高い。さらに、植物は励起光により強い自家蛍光を発生し、蛍光バイオセンサーのシグナルを大きく乱してしまう。そのために、蛍光 ATP イメージング手法を植物に適用しても、光合成に伴う ATP 濃度変化を正確に捉えることが困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、生きた光合成生物の ATP をリアルタイムで定量イメージング可能な新規蛍光型 ATP バイオセンサーを開発することを第一の目的とした。さらに、開発した蛍光型 ATP バイオセンサーを用いて、光合成時における細胞内の ATP 動態を細胞小器官レベルで解析し、光飽和と細胞内 ATP 濃度との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規蛍光型 ATP バイオセンサーの開発

ATP をリアルタイムで定量可能な蛍光型 ATP バイオセンサーを人工タンパク質として構築する。バイオセンサーには、ATP 非消費型ルシフェラーゼと蛍光タンパク質及び、ATP 濃度依存的構造変化を引き起こす タ

ンパク質の三つを結合させる。ルシフェラーゼ蛍光基質を加えると、ATP 濃度が低い環境下ではルシフェラーゼの蛍光波長しか検出されないが、高い環境下ではタンパク質の構造変化が生じ、ルシフェラーゼと距離的に近くなった蛍光タンパク質へ共鳴エネルギー移動が生じ、蛍光タンパク質由来の蛍光が検出される仕組みとなる。すなわち、ATP 濃度をそれらの波長変化率として算出することが可能である。大腸菌で発現させたプロンプを抽出・精製し、新規プロンプの特性を明らかとするとともに、プロンプの改良を行う。

(2) 培養動物細胞を用いた蛍光型 ATP プロンプの性能の検証

得られたプロンプは、順次、培養動物細胞への導入を試み、細胞内において ATP プロンプとして機能するかどうかの動作確認実験を行う。既存の ATP 測定技術との比較を行い新規蛍光 ATP プロンプの信頼性について検証する。異なる細胞内区画に発現させ、細胞内区画による ATP の違いを明らかにする。

(3) 蛍光型 ATP バイオセンサーを発現する動植物の開発

蛍光型 ATP バイオセンサー遺伝子をゲノムに組み込むことで、蛍光型 ATP バイオセンサーを細胞内に恒常的にゼブラフィッシュとゼニゴケを開発する。

4. 研究成果

(1) BRET型 ATP バイオセンサー「BTeam」の開発

枯草菌 ATP 合成酵素のサブユニットを介して、黄色蛍光タンパク質 mVenus と小型蛍光タンパク質 NLuc を融合させた BRET 型 ATP バイオセンサー「BTeam」を遺伝子工学的に作成した (図 1)。

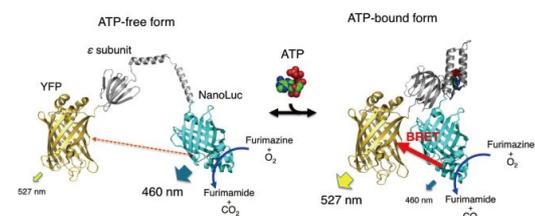


図 1. BTeam の模式図。ε への ATP 結合によって NLuc と YFP 間の距離が変化することで、BRET 効率が変化する。ATP 濃度が高いほど平衡は右に偏り、NLuc からの発光は弱まり、YFP からの発光が強まる。

NLuc は ATP を消費しない小型の蛍光タンパク質であり、高い輝度と pH 安定性を有することが知られている。BTeam は、NLuc の蛍光基質であるフリマジン存在下で、NLuc 由来の 455 nm および YFP 由来の 527 nm に発光のピークを示した。YFP の発光は NLuc からの BRET によって生じたものであり、BRET 効率が高くなるほど YFP/NLuc の発光強度比が増大する。BTeam の BRET 比 (YFP/NLuc 発光強度比) は ATP 濃度に依存して増大した一方、に ATP が結合でき

なくなった変異 BTeam においては、BRET 効率の増大は観察されなかった。このことは、BTeam の BRET 比の変化は ATP 結合に伴った構造変化に依存していることを示している。

次に、精製した BTeam の化学的な特性を調べた。まず、BTeam に様々なヌクレオチド (ATP、ADP、UTP、GTP、および CTP) を加えたが、ATP 以外のヌクレオチドでは BRET 比の増加は確認されなかった。これは同じ を利用した FRET 型 ATP バイオセンサーである「ATeam」と同様であり、BTeam が ATP に対する高い選択性を持っている事を示している。ATP 濃度を一定にし、pH のみを変化させたところ、BTeam の BRET 比は pH7.1 から 8.3 の間で安定であった。すなわち、細胞質 (pH 7.3) やミトコンドリア (pH 8.0) の pH 環境においては問題なく使用できると考えられた。BTeam の解離定数は 37 において約 3.0 mM であったが、25 においては約 1.7 mM であった。

(2) 生きた培養哺乳類細胞内の ATP 濃度の定量的計測

BTeam が生きた細胞内でも機能するかを調べるため、培養哺乳類細胞に BTeam を発現させた。局在化シグナル配列を付加せずに発現させた場合、BTeam は主に細胞質へと局在することがわかった。細胞培養液に NLuc の発光基質を加えたところ、細胞からの発光が検出され、その後、発光強度は徐々に低下していく様子が発光プレートリーダーを用いた測定で観察された。重要なことに、発光強度は低下したものの、BTeam の BRET 比は一定に保たれていた。発光基質の濃度や細胞の密度も、BRET 比には影響を与えなかった。ホタルルシフェラーゼに代表される既存の発光 ATP アッセイでは、細胞の数や発光基質の濃度等に大きく影響を受けてしまうという問題があった。BTeam の BRET 比が、こうした要因に影響を受けにくい特性を有しているという点は、既存のアッセイ法からの大きな改善である。

次に我々は、BTeam を用いて幾つかの細胞株の細胞内 ATP 濃度を調べた。BTeam を一過性に発現させた細胞を 96 ウェルプレートで培養し、発光プレートリーダーでその BRET 比を測定した。そして、精製した BTeam を用いて得られた検量線を用い、BRET 比から細胞質 ATP 濃度を計算した結果、HeLa、COS7、HepG2、HEK293、PC12、B16F10 細胞ではそれぞれ、3.8 mM、3.7 mM、4.1 mM、3.7 mM、3.9 mM、3.7 mM と見積もられた (図 2 A)。これらの値は、別の生化学的手法を用いて得られた値とほぼ等しかったことから、BTeam を用いることで、かなり正確に生細胞内の ATP 濃度を見積もることが可能であることが示された。次に、BTeam にミトコンドリアマトリックスへの局在化シグナルを付加した mit-BTeam を用いて、細胞質の場合と同様に、ミトコンドリア

マトリックス内の ATP 濃度を調べた。その結果、HeLa、HepG2、PC12、B16F10 細胞のミトコンドリアマトリックス内 ATP 濃度は、それぞれ 2.5 mM、2.4 mM、2.5 mM、2.7 mM であると見積もられた。ミトコンドリアマトリックスの ATP 濃度が細胞質より低いという結果は、過去の研究結果と一致している。おそらく、ミトコンドリア内膜に存在する ATP:ADP 交換輸送体のはたらきによって細胞質 ADP とミトコンドリアマトリックス内 ATP が速やかに交換されることにより、ミトコンドリアマトリックスの ATP 濃度が低く保たれているのだと予想される。BTeam は細胞を生かしたまま ATP 濃度を測定することができる。そこで、同じ細胞集団の細胞質 ATP 濃度の経時変化を測定した。通常の培地 (DMEM) から栄養素が無い培地 (グルコース除去 EBSS) に置換したところ、徐々に細胞質 ATP 濃度が低下していった。6 時間後に元の培地に戻したところ、3 時間ほどかけて元の ATP 濃度に戻っていく様子が観察された (図 2 B)。この結果は、BTeam を使うことで長時間にわたって同じ細胞集団の ATP 濃度を高い精度で追跡することが可能である事を示している。

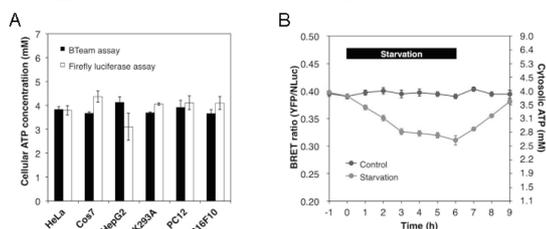


図 2. BTeam を用いた培養哺乳類細胞内 ATP 濃度の測定。BTeam を発現させた細胞集団の BRET 比を発光プレートリーダーで測定した。(A) 細胞内 ATP 濃度の定量結果。6 種類の細胞株について、BTeam での測定から得られた ATP 濃度 (黒いバー) とホタルルシフェラーゼ法と細胞数・細胞体積測定に基づいて計算された ATP 濃度 (白いバー) を示す。(B) 細胞に飢餓を誘導した際の細胞内 ATP 濃度の変化。細胞を 6 時間のあいだ栄養飢餓状態に置いた。

続いて、顕微鏡を用いて単一の生細胞内 ATP 濃度のイメージングを試みた。ガラスボトムディッシュ上で培養した BTeam 発現細胞をインキュベーター付きの倒立顕微鏡に置き、細胞からの NLuc および YFP の発光を、2 分割光学系で分離した上で、EMCCD カメラによって同時に撮影した。発光マイクロプレートリーダーでの結果と同様、単一細胞レベルであっても、細胞質 ATP 濃度はミトコンドリアマトリックスよりも高い値を示した。最後に、単一細胞の ATP 濃度の経時変化を観察した。解糖系の阻害剤である 2-デオキシグルコースと酸化リン酸化の阻害剤であるオリゴマイシン A を加えたところ、急速な BRET 比の減少が観察された。すなわち、BTeam は、細胞集団のみならず、単一細胞レベルでの ATP 濃度のダイナミクスを測定することも可能であることが示された。

(3) BTeam を発現する動植物の開発
現在、アグロバクテリウムを用いてゼニゴケへの BTeam 遺伝子の導入を試みている。また、BTeam 遺伝子が導入されたゼブラフィ

ツッシュはF1世代まで確立しており、BTeamがゼブラフィッシュ内で機能することもATP合成阻害剤を用いて既に確認している。

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)

〔雑誌論文〕(計14件) 全て査読有

Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S, Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito MK. Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 497(2): 719-725, 2018. Doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.139.

Maeshima K, Matsuda T, Shindo Y, Imamura H, Tamura S, Imai R, Kawakami S, Nagashima R, Soga T, Noji H, Oka K, Nagai T. A transient rise in free Mg²⁺ ions released from ATP-Mg hydrolysis contributes to mitotic chromosome condensation. *Curr Biol*, 28(3): 444-451, 2018. Doi: 10.1016/j.cub.2017.12.035.

Matsubara M, Kanda H, Imamura H, Inoue M, Noguchi M, Hosoda K, Kakizuka A, Nakao K. Analysis of mitochondrial function in human induced pluripotent stem cells from patients with mitochondrial diabetes due to the A3243G mutation. *Sci Rep*, 8: 949, 2018. Doi: 10.1038/s41598-018-19264-7.

Kishikawa J, Inoue Y, Fujikawa M, Nishimura K, Nakanishi A, Tanabe T, Imamura H, Yokoyama K. General anesthetics cause mitochondrial dysfunction and reduction of intracellular ATP levels. *PLoS ONE*, 13: e0190213, 2018.

Doi: 10.1371/journal.pone.0190213.

Matsui Y, Funato Y, Imamura H, Miki H, Mizukami S, Kikuchi K. Visualization of long-term Mg²⁺ dynamics in apoptotic cells using a novel targetable fluorescent probe. *Chem Sci*, 8: 8255-8264, 2017. Doi: 10.1039/c7sc03954a.

Hayashi S, Nakazaki Y, Kagii K, Imamura H, Watanabe YH. Fusion protein analysis reveals the precise regulation between Hsp70 and Hsp100 during protein disaggregation. *Sci Rep*, 7(1): 8648, 2017. Doi: 10.1038/s41598-017-08917-8.

Nakano M, Imamura H, Sasaoka N, Yamamoto M, Uemura N, Shudo T, Fuchigami T, Takahashi R, Kakizuka A. ATP maintenance via two types of ATP regulators mitigates pathological phenotypes in mouse models of Parkinson's disease. *EBioMedicine*, 22: 225-241, 2017. Doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.024.

Yoshizumi T, Imamura H, Taku T, Kuroki T, Kawaguchi A, Ishikawa K, Nakada K, Koshiba T. RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. *Sci Rep*, 7(1): 5379, 2017. Doi: 10.1038/s41598-017-05808-w.

Trevisiol A, Saab A, Winkler U, Marx G, Imamura H, Möbius W, Kusch K, Nave KA, Hirrlinger J. Monitoring ATP dynamics in electrically active white matter tracts. *eLife*, 6: e24241, 2017. Doi: 10.7554/eLife.24241.

Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Shirai T, Tanaka S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A, Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Narumi R, Morita T, Sasaki Y,

Enoki R, Honma S, Imamura H, Oshima M, Soga T, Miyazaki JI, Duchen MR, Nam JM, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida E, Fujioka Y, Ohba Y, Sato T, Fujita Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nature Cell Biol*, 19(5): 530-541, 2017. Doi: 10.1038/ncb3509.

Yoshida T, Alfaqaan S, Sasaoka N, Imamura H. Application of FRET-based biosensor "ATeam" for visualization of ATP levels in the mitochondrial matrix of living mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 1567: 231-43, 2017. Doi: 10.1007/978-1-4939-6824-4_14.

Suzuki M, Sato M, Koyama H, Hara Y, Hayashi K, Yasue N, Imamura H, Fujimori T, Nagai T, Campbell RE, Ueno N. Distinct intracellular Ca^{2+} dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure. *Development*, 144(7): 1307-1316, 2017. Doi: 10.1242/dev.141952.

Tsuyama T, Tsubouchi A, Usui T, Imamura H, Uemura T. Mitochondrial dysfunction induces dendritic loss via eIF2 α phosphorylation. *J Cell Biol*, 216(3): 815-34, 2017. Doi: 10.1083/jcb.201604065.

Yoshida T, Kakizuka A, Imamura H. BTeam: A novel BRET-based biosensor for the accurate quantification of ATP concentration within living cells. *Sci Rep*, 6: 39618, 2016. Doi: 10.1038/srep39618.

[学会発表] (計 16 件)

今村博臣 . 生細胞 ATP イメージングから酸素と ATP の関係を探る . 第 16 回日本蛋白質科学会年会 . 2016 年 6 月

Imamura H, Sakamoto S, Yoshida T, Kakizuka A. Molecular mechanism underlying intracellular ATP changes during apoptosis. *European Bioenergetics Conference* 2016.

2016 年 7 月

Yoshida T, Kakizuka A, Imamura H. Development of a new BRET-based ATP indicator for quantitative intracellular ATP assay. *European Bioenergetics Conference* 2016. 2016 年 7 月

今村博臣 . ATP imaging revealed a mechanism of intracellular ATP changes during apoptosis . 第 54 回日本生物物理学会年会 . 2016 年 11 月

吉田有希、今村博臣 . 新規発光型 ATP バイオセンサーの開発 . 日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会 . 2016 年 12 月

今村博臣 . 蛍光バイオセンサーを用いた生細胞内可視化技術 . 日本農芸化学会 2017 年度大会 . 2017 年 3 月

高橋世菜、垣塚彰、今村博臣 . 分岐鎖アミノ酸に対する FRET 型蛍光バイオセンサーの開発 . 日本農芸化学会 2017 年度大会 . 2017 年 3 月

今村博臣 . アポトーシスにおける細胞内 ATP ダイナミクスのイメージング . 第 94 回日本生理学会大会 . 2017 年 3 月

Imamura H, Sakamoto S, Yoshida T, Kakizuka A. Imaging of intracellular ATP level revealed pannexin1-mediated programmed ATP decrease in apoptosis. 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress / 11th European Biophysics Congress. 2017 年 7 月

津山泰一、坪内朝子、碓井理夫、今村博臣、上村匡 . FRET 型 ATP センサーを用いたシヨウジョウバエ神経細胞における ATP の濃度と消費速度の可視化 . 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 . 2017 年 12 月
松岡篤志、垣塚彰、今村博臣 . ルシフェラーゼ断片の相補的再構成を用いた新規発光 ATP バイオセンサーの開発 . 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 . 2017 年 12 月

井尻貴之、岸川淳一、今村博臣、上野秀一、岩尾康宏、横山謙、佐藤賢一 . ツメガエル卵細胞における ATP の役割の検証 . 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 . 2017 年 12 月

中嶋瞳、吉田有希、垣塚彰、今村博臣 . FRET 型蛍光バイオセンサーを用いたミトコンドリア分岐鎖アミノ酸輸送体の探索 . 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 . 2017 年 12 月

吉田有希、今村博臣 . 分岐鎖アミノ酸蛍光バイオセンサーの開発 . 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 . 2017 年 12 月

中野将希、今村博臣、笹岡紀男、山本正道、上村紀仁、首藤敏之、淵上智弘、高橋良輔、垣塚彰 . MPTP パーキンソン病モデルにおける ATP 制御薬の発症緩和効果 . 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 . 2017 年 12 月

高稲正勝、今村博臣、吉田知史 . 出芽酵母

の細胞内 ATP 濃度変動を制御する仕組み .
日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会 .
2017 年 12 月
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

今村 博臣 (IMAMURA, Hiromi)
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号 : 2 0 4 2 2 5 4 5