

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06654

研究課題名(和文) 高濃度ATPが変性タンパク質の蓄積を抑制する仕組みの解明

研究課題名(英文) Elucidating mechanisms by which high levels of ATP prevent accumulation of aberrant protein aggregation

研究代表者

高稲 正勝 (Takaine, Masakatsu)

群馬大学・未来先端研究機構・助教

研究者番号：20573215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アデノシン三リン酸(ATP)は細胞の最も主要なエネルギー運搬体である。我々はこれまで細胞内ATP濃度が常にエネルギー需要に対して、必要以上に高く保たれていることを発見し、ATP恒常性と名付けたがその生理的な意味は不明であった。本研究ではまずATP恒常性に関する遺伝子を複数同定した。それら遺伝子の変異株(ATP変異株)の解析からATP恒常性は細胞内タンパク質の安定化と異常なタンパク質凝集体の分解に重要であることが明らかになった。さらにATP変異株を一細胞レベルで解析した結果、細胞内ATP濃度の一過的な低下が異常なタンパク質凝集体形成を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞内ATP濃度が一過的にでも低下してしまうと、タンパク質の異常な凝集体形成を誘導する可能性があるため、細胞は常に高濃度のATPを保とうとする、というATPのエネルギー以外の役割を初めて示した。アルツハイマー病等の神経変性疾患を初めとした多くの疾患では、タンパク質の異常な凝集体が毒性を発揮して発症要因になる。本研究で示した、ATP恒常性の破綻による細胞内ATP濃度の変動は、これらのタンパク質凝集体が誘導する疾患の発症機序の一端を説明する可能性がある。このためATP恒常性の仕組みを追求することは、細胞内での異常なタンパク質凝集体形成を抑制する薬の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cells use a chemical called adenosine triphosphate (ATP) as a controllable source of energy. Like a battery, each ATP contains a specific amount of energy that can be released when needed. Cells just need enough ATP to survive, but most cells store a lot more than they need. It is unclear why cells keep so much ATP, or whether this excess ATP has any other purpose.

To answer these questions, we identified mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that had low levels of ATP and examined these cells. In *S. cerevisiae* cells with lower and changeable levels of ATP, proteins stick together, forming clumps. When they clump together, they stop working and can cause cells to die. Further experiments showed that reducing the levels of ATP just for a short time increased the rate at which proteins stick together.

Taken together, these results suggest that ATP plays a role in stopping proteins from sticking together, explaining why cells may store excess ATP, since it could aid survival.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ATP エネルギー代謝 酵母 バイオセンサー AMPK アデニレートキナーゼ 恒常性 タンパク質凝集

1. 研究開始当初の背景

細胞のエネルギー通貨と称されるアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) は、細胞運動や細胞内輸送等の力学的仕事に必要なだけでなく、細胞内代謝反応やシグナル伝達にも深く関与している。したがって、細胞内 ATP 濃度の動的変化を解明することはエネルギー代謝機構や、ATP による細胞機能調節を理解するために必要である。しかし旧来の生化学測定ではある時点での細胞集団の平均 ATP 濃度しか測定できないため、生細胞内 ATP の動態を観察するのは不可能であった。この技術的問題を克服すべく、数種類の ATP バイオセンサーが開発され、様々な細胞で細胞内 ATP が可視化・観測されつつある。申請者は ATP バイオセンサー QUEEN を使用して出芽酵母の生細胞内 ATP 濃度を観測し、それが培地の糖源や細胞周期に依存せず高濃度に保たれていることを発見した。この結果は真核細胞における ATP 濃度を安定に維持する機構 (ATP 恒常性) の存在を強く示唆する。興味深いことに、アデニレートキナーゼや AMP キナーゼといった、平均細胞内 ATP 濃度が低下し、バラつき (変動) が増大する遺伝子変異株 (以下 ATP 変異株) は野生株と同等の速度で生育するが、各種ストレス、特にタンパク質毒性ストレスに感受性を示した。さらにこれらの変異株では細胞内に変性タンパク質の凝集体が蓄積していた。これは真核細胞においては、生育に必須な量を超えた余剰の ATP によりタンパク質恒常性が維持され、細胞毒性を持つ異常なタンパク質の蓄積を防いでいることを示唆する。その制御機構としては (1) 分子シャペロンや ATP の hydrotrope (溶解補助剤) 効果によるタンパク質の凝集抑制、(2) オートファジーやプロテアソーム等の ATP 要求性の変性タンパク質の分解除去、(3) ストレス下におけるタンパク合成を抑制して異常タンパク質の産生を防ぐ、ストレス顆粒の形成や維持、等が考えられた。これらは広義の細胞内タンパク質品質管理機構と言える。そこで「細胞は高濃度の余剰な ATP を維持することでタンパク質の品質管理を行う」という仮説を検証すべく、本研究を提案した

2. 研究の目的

上述の通り、申請者はこれまでに細胞内 ATP 濃度恒常性とタンパク質恒常性の強い関連を発見したが、なぜ ATP 動態の異常が異常タンパク質の蓄積を惹起するのかは不明であった。そこで本研究ではタンパク質恒常性を①タンパク質凝集の抑制、②変性タンパク質の分解の 2 つの仕組みに区分して、それぞれの活性に対する ATP の寄与を検証し、その分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

細胞内 ATP によるタンパク質恒常性の制御機構を明らかにするため、以下の 3 つのサブプロジェクトに大別して本研究を進めた：

(1) 人為的な ATP 濃度低下がタンパク質凝集を誘導する可能性の検証
タンパク質の構造が不安定化したり溶解度が低下すると、細胞内で変性タンパク質の凝集体を形成する。本実験ではまず、細胞内 ATP 濃度を人為的に低下させた際に、タンパク質が凝集するか否かを検証した。酵母細胞を解糖系阻害剤 2-deoxyglucose (2DG) で処理すると細胞内 ATP 濃度が急速に低下することは予備実験で確認しており、その系を利用した。

(2) 変性タンパク質凝集体の分解・除去における高濃度 ATP の重要性の検証
ATP 変異株ではプロテアソームやオートファジーの活性が低下して、変性タンパク質の恒常的な分解・除去が追いつかず、凝集体が蓄積する可能性が考えられた。そこでどちらの分解系がより細胞内 ATP に影響を受けているかを次の実験で明らかにすることを目指した：ATP 変異株に細胞内プロテアソーム量が半減する *rpn4Δ* 変異、あるいはオートファジー不能になる *atg1Δ* 変異を追加導入して二重変異株を作成し、(i) タンパク質毒性ストレスに対する感受性がさらに増悪するか、(ii) 変性タンパク質凝集体がさらに蓄積するか観察する。

(3) 細胞内 ATP 濃度とタンパク質凝集体形成の同時観察

本実験では実際に細胞内 ATP 濃度低下によりタンパク質凝集体形成が起こるかを検証した。具体的には、ATP 濃度が時間的に変動する変異株において、細胞内 ATP 濃度とタンパク質凝集体を同時かつ経時的に観測する系を構築した。構築した実験系において ATP 濃度とタンパク質凝集体の両方の動態を定量的に解析した。

4. 研究成果

※括弧付きの番号は上述した「研究の方法」における各サブプロジェクトに対応する。

(0) 酵母生細胞における細胞内 ATP 濃度高精度計測系の確立

本研究プロジェクト開始までに構築していた、ATP バイオセンサー QUEEN を出芽酵母および分裂酵母に導入して高精度で細胞内 ATP 濃度を計測する手法およびその有用性を論文としてまとめ、国際誌上で発表した。またより詳細な実験プロトコルも論文として公表した。

(1) 人為的な ATP 濃度低下はタンパク質凝集体形成を誘導する

酵母細胞を 2DG 処理すると約 30 分以内に内在性タンパク質が異常な凝集体を形成したことから、高濃度の ATP は細胞内タンパク質の安定な構造と溶解性を維持するために必要であることが示唆された。

(2) 異常タンパク質凝集体の分解・除去にはプロテアソーム活性が関与する

*rpn4Δ*株と ATP 変異株との二重変異株ではタンパク質毒性ストレスに対する感受性が増大したが、*atg1Δ*株との二重変異ではそのような相乗効果は確認できなかった。したがって細胞内 ATP 濃度の維持はオートファジーよりもプロテアソーム活性に重要であると示唆された。またプロテアソーム阻害剤を使用した実験から、ATP 枯渇により誘導されたタンパク質凝集体の除去にはプロテアソーム活性が必要であることが確認された。

(3) 細胞内 ATP 濃度の変動は異常なタンパク質凝集体生成と密接に関連する

ATP 濃度とタンパク質凝集体を同一細胞で十数時間に渡り同時観察したところ、野生株では安定して一定の ATP 濃度を示し、タンパク質凝集体が極めて緩やかに、時間に比例して蓄積する様子が観察された【図 1】。一方で ATP 変異株においては、ATP 濃度が一定に保持されている期間では野生株と同様の緩やかなタンパク質凝集体の蓄積が見られたが、ATP 濃度が一過的に低下した後の数時間以内に、タンパク質凝集体が急激に蓄積する様子が観察された【図 2】。

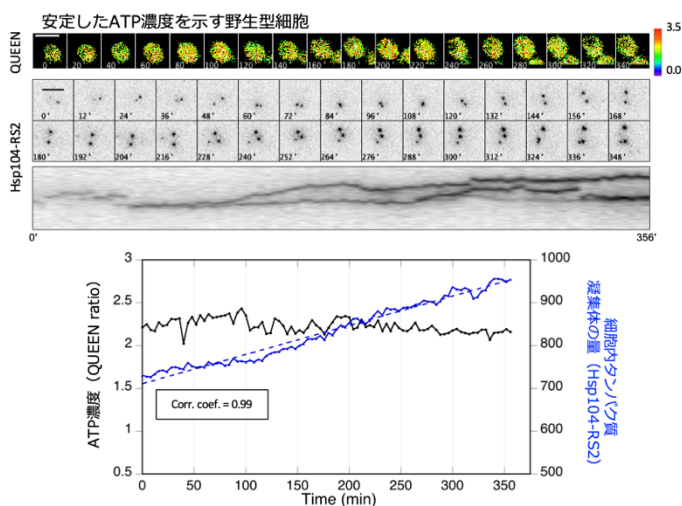


図1: 野生型細胞における細胞内ATP濃度とタンパク質凝集体の同時観察

細胞内ATP濃度はバイオセンサーQUEENで、細胞内凝集体はHsp104-RS2でそれぞれ可視化。上段はそれぞれの時間における細胞の写真、下段はATP濃度とタンパク質凝集体量を定量化したグラフを表す。グラフの点線は細胞内タンパク質凝集体量の線形回帰直線。

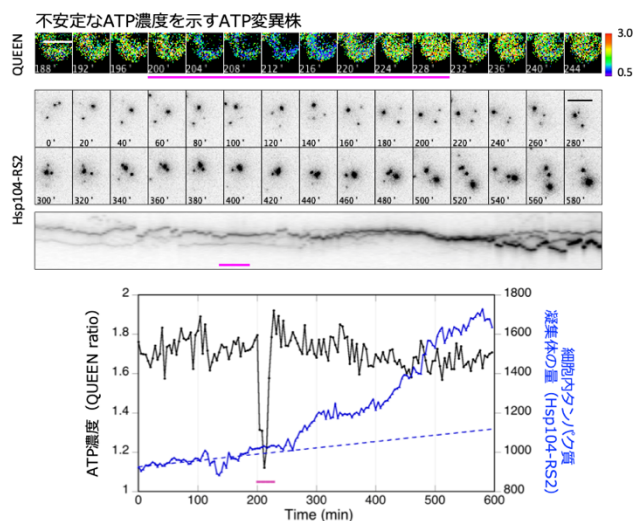


図2: ATP変異株細胞における細胞内ATP濃度とタンパク質凝集体の同時観察

細胞内ATP濃度はバイオセンサーQUEENで、細胞内凝集体はHsp104-RS2でそれぞれ可視化。上段はそれぞれの時間における細胞の写真、下段はATP濃度とタンパク質凝集体量を定量化したグラフを表す。マゼンタは細胞内ATP濃度が

一過的に低下した区間を表す。グラフの点線は一過的なATP濃度低下が起こる直前までのデータを使用した、細胞内タンパク質凝集体量の線形回帰直線。

(4) ATP 変異株は神経変性疾患関連タンパク質の毒性に感受性を示す

当初の計画には無かったが、パーキンソン病の原因タンパク質 α -Synuclein とハンチントン病の原因タンパク質であるハンチンチンの毒性を評価したところ、ATP 変異株においてはどちらのタンパク質の毒性も増大していた【図 3A】。特に α -Synuclein は ATP 変異株で異常な凝集体を形成する傾向にあった【図 3B】。さらに薬剤処理により細胞内 ATP 濃度を人為的に増大させると、 α -Synuclein の凝集体や毒性が解消された (data not shown)。

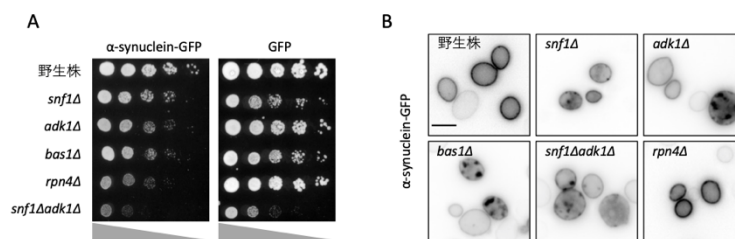


図3: ATP変異株細胞における α -Synucleinの発現

A. α -Synucleinの細胞毒性の評価。野生株およびATP変異株にGFP（陰性対照）または α -Synuclein-GFPを発現させてコロニーの生育状況を観察。B. α -Synucleinの細胞内局在の観察。各株における α -Synuclein-GFPの局在を蛍光顕微鏡観察。*rpn4Δ*はプロテアソーム活性が半減する変異株で対照として観察。

以上の結果は細胞内 ATP 濃度が一過的にでも低下してしまうと、タンパク質の異常な凝集体形成を誘導する可能性があるため、細胞は常に高濃度の ATP を保とうとする、という ATP 恒常性の生理的意義を示唆している。高濃度の ATP が実際にタンパク質凝集を抑制するメカニズムについてはまだ定かではないが、細胞内の異常なタンパク質凝集体を分解・除去するための装置であるプロテアソームを駆動するには大量の ATP を必要とすることが古くから知られている。本研究においても細胞内の異常なタンパク質凝集体を除去するのにプロテアソーム活性が重要であり、また ATP 変異株ではプロテアソーム活性が低下していることが示唆された。さらに最近の研究で、試験管内において数 mM 程度の ATP がタンパク質の溶解補助剤として直接作用して、タンパク質の熱変性と凝集を抑制することが示されている。これらの知見も総合すると、細胞内の ATP を高濃度に保つことで、細胞内のプロテアソームの活性を担保すると共に、タンパク質の可溶化を促進してタンパク質凝集を防いでいると推察される【図 4】。

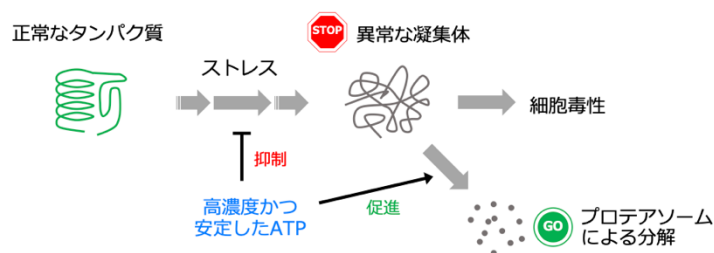


図4: 本研究成果の概念図

アルツハイマー病等の神経変性疾患を初めとした多くの疾患では、タンパク質の異常な凝集体が毒性を発揮して発症要因になると考えられている。今回の研究で明らかになった、ATP 恒常性の破綻による細胞内 ATP 濃度の変動は、これらのタンパク質凝集体が誘導する疾患の発症メカニズムの一端を説明する可能性がある。このため ATP 恒常性の仕組みを追求することは、私たちの細胞内での異常なタンパク質凝集体形成を抑制する薬の開発に繋がると期待される。

アデニレートキナーゼが ATP 濃度を高く保とうとする作用は、その酵素活性から自明である一方、AMP キナーゼがどのように ATP 濃度を保持しているかは未だ不明である。今後は AMP キナーゼが細胞内 ATP 濃度を感知する仕組み、および AMP キナーゼの下流因子が実際に ATP 濃度を制御する分子メカニズムの解明を目指したい。また細胞内には ATPase である分子シャペロン HSP70 が存在し、ミスフォールドしたタンパ

ク質をリフォールドしている。HSP70 の多くはストレス依存的に発現が誘導されるが、HSP70 の恒常的な働きにより細胞内タンパク質の安定性や溶解度が保たれている可能性もまだ残されている。今後は ATP 変異株における HSP70 の活性を解析して、ATP 恒常性によるタンパク質凝集抑制における、HSP70 の寄与を検証したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takaine Masak, Imamura Hiromi, Yoshida Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 High and stable ATP levels prevent aberrant intracellular protein aggregation in yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e67659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.67659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morita Rikuri, Numata Osamu, Nakano Kentaro, Takaine Masak	4. 巻 534
2. 論文標題 Cell cycle-dependent phosphorylation of IQGAP is involved in assembly and stability of the contractile ring in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1026 ~ 1032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hoshino Soichiro, Kanemura Ryohei, Kurita Daisuke, Soutome Yukihiro, Himeno Hyouta, Takaine Masak, Watanabe Masakatsu, Nameki Nobukazu	4. 巻 4
2. 論文標題 A stalled-ribosome rescue factor Pth3 is required for mitochondrial translation against antibiotics in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01835-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takaine Masak	4. 巻 9
2. 論文標題 QUEEN-based Spatiotemporal ATP Imaging in Budding and Fission Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaine Masak, Imamura Hiromi, Yoshida Satoshi	4. 巻 none
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase and adenylate kinase prevent the ATP catastrophe and cytotoxic protein aggregation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 none
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/801738	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaine Masak, Ueno Masaru, Kitamura Kenji, Imamura Hiromi, Yoshida Satoshi	4. 巻 132
2. 論文標題 Reliable imaging of ATP in living budding and fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.230649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaine Masak	4. 巻 2322
2. 論文標題 Assessment of Cytotoxicity of in Budding Yeast Using a and Fluorescent Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 163 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高稲 正勝
2. 発表標題 出芽酵母Ade4の細胞内顆粒が形成されるメカニズムの解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高稲正勝
2. 発表標題 細胞内ATP濃度と細胞死の関係
3. 学会等名 日本農芸化学 2021年度 仙台大会（オンライン）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高稲正勝, 森田陸離
2. 発表標題 TOR複合体活性により酵母Ade4の細胞内顆粒が形成されるメカニズムと生理的意義の解明
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム（オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高稲正勝, 森田陸離
2. 発表標題 TOR複合体活性により酵母Ade4の細胞内顆粒が形成されるメカニズムと生理的意義の解明
3. 学会等名 第10回TOR研究会（オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高稲正勝
2. 発表標題 出芽酵母および分裂酵母の生細胞内におけるATP動態高精度観測系の確立
3. 学会等名 NBRP公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高稲正勝
2. 発表標題 TOR複合体活性により酵母Ade4の細胞内顆粒が形成されるメカニズムの解明
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究成果に関するプレスリリース：高濃度のATPがタンパク質の異常な凝集を防ぐ 細胞内ATPの新たな役割を発見、神経変性疾患の発症に關与する可能性
<https://www.gunma-u.ac.jp/information/127008>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に關連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------