

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22513

研究課題名（和文）マウス生体内のミトコンドリア内ATP産生速度の定量的計測法開発

研究課題名（英文）Development of quantitative measurement method of ATP production rate in mitochondria in mouse

研究代表者

山本 正道（Yamamoto, Masamichi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任部長

研究者番号：70423150

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：生命科学分野で「生体内でミトコンドリア内ATP産生速度を定量的に計測することが可能なロバストな技術」に対するニーズは極めて高いが、基幹技術がなかった。その理由は、ミトコンドリア内のATP量を直接計測する事ができないためである。今回、ミトコンドリア内ATP動態を計測する技術として、ATeamの輝度値を改善する様々な蛍光タンパク質を試行する事で、新たなATPセンサータンパク質CR-ATeamを作出した。様々なコンストラクトを作成して、マウス作成を試みた結果、ミトコンドリアマトリックス内にてATeamを発現する新規のマウス作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高輝度のATPセンサー蛍光タンパク質であるCR-ATeamが作成され、低発現量でATP動態をFRET変化として計測できるプローブができた。

また、世界で初めて、ミトコンドリアマトリックス内で産生されるATP動態を生体内で計測できるマウスを作出した。これにより、生体内のミトコンドリア内ATP動態をin vitroだけでなくin vivoでも定量的に解析できるようになる。このマウスを用いれば、様々な疾患評価だけでなく薬剤評価などへも応用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：There is a great need in the life science field for "a robust technology that can quantitatively measure the rate of ATP (adenosine triphosphate) production in mitochondria in vivo," but there has been no core technology to meet this need. The reason for this is that it is not possible to directly measure the amount of ATP in mitochondria.

In this study, we created a new ATP sensor protein, CR-ATeam, as a technology to measure ATP dynamics in mitochondria by experimenting with various fluorescent proteins that improve the brightness value of ATP. We also tried to generate mice by using various constructs. As a result, we succeeded in generating a new mouse that expresses ATeam in the mitochondrial matrix.

研究分野：代謝イメージング

キーワード：アデノシン三リン酸 エネルギー代謝 イメージング

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは好気性細菌(アルファプロテオバクテリア)が細胞の中で適応した結果、細胞に不可欠な細胞小器官(オルガネラ)として共生したものと細胞内共生説では考えられている。このミトコンドリアは独自にDNAを所有してタンパク質合成を行うことができ、半自律的に増殖し、平均的に細胞あたり数百個存在している。

一方で、ミトコンドリアの生理機能はエネルギー産生、ステロイドやヘムなどの合成、カルシウムや鉄の細胞内濃度の調整、細胞周期やアポトーシスの調整など共生している細胞自身の生命活動にとって重要な役割を担っている。

したがって、これらのミトコンドリア機能の低下は細胞や個体の機能低下を想像させるが、実際に加齢や神経疾患などさまざまな疾患でミトコンドリア機能低下が報告されてきている。

この生体の機能低下に直結すると考えられているミトコンドリアの機能を評価する複数の方法がこれまで開発されてきた。

方法としては、①ミトコンドリア形態を電子顕微鏡や蛍光顕微鏡を用いて解析する方法、②ミトコンドリア内膜の電位を蛍光色素や遺伝子改変できる蛍光タンパク質を組み込んで解析する方法、③ATP量を生化学的方法や紫外可視吸収法、磁気共鳴法などにより解析する方法がある。

しかしながら、方法①は、*in vitro*, *in vivo* のどちらでも利用できるが、細胞小器官レベルでの解析が必要なため、マクロな解析には向かない。方法②は、特に化合物を利用した場合、蛍光色素が組織へ取り込まれる効率や化合物特有の凝集などの特性を十分加味した上で注意深く使用する必要がある。方法③は、酸素濃度とpHに依存して変化する問題点や、1細胞レベルで高解像度に定量する事はできない。

2. 研究の目的

生命科学分野で「生体内でミトコンドリア内ATP(アデノシン三リン酸)産生速度を定量的に計測することが可能なロバストな技術」に対するニーズは極めて高いが、それを満たす基幹技術がなかった。その理由は、ミトコンドリア内のATP量を直接計測する事ができないためである。それ故、ミトコンドリア膜電位など定性的評価に留まっていた。

私達はこれまでに細胞質内に存在するATPをマウス生体内全細胞で定量的に可視化できるマウスの開発に世界で初めて成功してきた。この技術を応用し、更にATP合成系の制御システムを組み込めばミトコンドリア内ATP産生速度を定量的に計測できる可能性が推測された。

そこで、本研究ではイメージング技術を用いてマウス生体内全細胞で臓器から細胞レベルに至るまで、ミトコンドリアのエネルギー産生機能を直接評価できる、非侵襲的・経時的かつ定量的に計測するシステムを開発する事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ミトコンドリア内で産生されるATP合成速度を計測するため、ミトコンドリアのマトリックス内だけにATP量依存的に蛍光波長を変化させるATPセンサー(*ATeam*, Imamura, H. et al. *PNAS* 2009)を発現するトランスジェニックマウスを作出する事で定常状態のミトコンドリア内ATP量を定量的に可視化できるようにする。

1) 高輝度型の新規 *ATeam* (*CR-ATeam*) の開発

ATeam は輝度値が低いいため、マウス生体内へ応用するためには発現量を上げる必要があった。しかし、過剰発現させると *ATeam* がATPをキレートする可能性があり、実際に細胞内ATP枯渇状態へ陥る事をこれまで見出してきた。そこで、これを解決するため、既存の *ATeam* よりも高輝度の新規 *ATeam* の作出を試みた。方法としては、既存の様々な蛍光タンパク質をεサブユニットの両端に結合させた後に、HeLa細胞へトランスフェクションして、R側の蛍光輝度値およびFRET輝度値を計測する事で高輝度型の新規 *ATeam* 作出を試みた。

2) ミトコンドリア内に存在する ATP 量を非侵襲的かつ定量的に計測する。

独自に開発した高輝度型新規 CR-ATeam にミトコンドリア移行シグナル配列 (COX8 由来) を結合させる事でミトコンドリア内膜内側にのみ発現させる。上記候補遺伝子の発現制御を様々なプロモーター (CAG, EF1 α , CMV, PGK) 及び RNA 安定化シグナル (WPRE) の組合せを検討する事で、ATP 枯渇回避や蛍光波長変化の計測可能な発現量の最適化を行い、ミトコンドリア内の ATP 量を可視化できるマウスを開発することを試みた。

図4:各 ATeam と総輝度値

4. 研究成果

1) 高輝度型の新規 ATeam (CR-ATeam) を開発した。

ATP 結合配列である ϵ サブユニットの両端に ECFP, EGFP, Venus, EYFP, mCherry, TFP1, Citrine, Clover, Ruby を結合させた様々なコンストラクトを作成した。これらを HeLa 細胞へ遺伝子導入した後に、長波長側の蛍光タンパクを励起させる事でタンパク量と輝度値を計測した。また、短波長側の蛍光タンパクを励起させて両蛍光タンパク質の吸収光を計測する事で、FRET ratio 値とその効率を計測した。その結果、Clover と Ruby2 を用いた新規 ATeam (CR-ATeam) が ATeam より約 10 倍以上の輝度値を有している事を見出した。

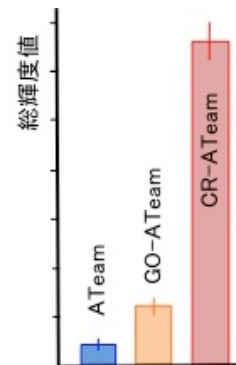


図1:各 ATeam1 分子と輝度値の相対関係
CR-ATeam は ATeam の約 10 倍の輝度値を有する

2) ミトコンドリアマトリックス内で ATeam を局在させたマウス作出に成功した。

既存の GO-ATeam および新規作成に成功した CR-ATeam にミトコンドリアマトリックス内移行型シグナルである Cox8 のミトコンドリア移行シグナルを結合させた。これを全身で発現させるため、CAG, EF1 α , CMV, PGKなどを結合させて、ミトコンドリアマトリックス内で様々な発現量の ATeam マウスが得られるのかを検討してみた。結果、ミトコンドリアマトリックス内で ATeam を発現するマウスを樹立する事に成功した。

3) ミトコンドリア内 ATP 量は心疾患時には低下した。

心不全時の心臓では、エネルギー代謝が電子伝達系優位から解糖系優位に切り替わる事が知られている。そこで、ミトコンドリア内 ATP 量を計測できる本マウスに体重当たりイソプロテレノール 50mg/kg を 1 週間皮下注射する事で投与し続けて心肥大モデルを作出する事にした。このマウスでは、ミトコンドリア内の ATP 量が低下している事を確認でき、これまでの報告でエネルギーが電子伝達系優位から解糖系優位にシフトしていることを確認する事に成功した。

今回、ミトコンドリア内の ATP 動態をマウス生体内にて計測する事ができるマウス開発に成功した。

今後、様々な疾患などへの適応や薬物への反応性などを詳細に検討していきたい。

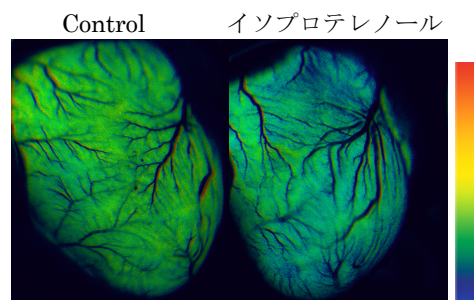


図 2:イソプロテレノール誘導型心不全モデルでのミトコンドリア内 ATP 動態。イソプロテレノール誘導型心不全モデルでは、control と比較してミトコンドリア内 ATP 量が低下している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Nishikawa Keizo, Seno Shigeto, Yoshihara Toshitada, Narazaki Ayako, Sugiura Yuki, Shimizu Reito, Kikuta Junichi, Sakaguchi Reiko, Suzuki Norio, Takeda Norihiko, Semba Hiroaki, Yamamoto Masamichi, et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 Osteoclasts adapt to physioxia perturbation through DNA demethylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e53035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202153035	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 He Jiazhou, Yamamoto Masamichi, Sumiyama Kenta, Konagaya Yumi, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki, Sato Shinya	4. 巻 35
2. 論文標題 Two photon AMPK and ATP imaging reveals the bias between rods and cones in glycolysis utility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101121R	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 Ohnishi Yuichiro, Yamamoto Masamichi, Sugiura Yuki, Setoyama Daiki, Kishima Haruhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Rostro-caudal different energy metabolism leading to differences in degeneration in spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 fcab058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/braincomms/fcab058	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内におけるATP動態の可視化
3. 学会等名 第99回日本生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス生体内におけるATP動態の可視化と応用
3. 学会等名 第94回 生化学学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本正道
2. 発表標題 マウス全身におけるATP代謝動態の可視化
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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. 本研究に関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