

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657144

研究課題名(和文) 生体内で細胞外ATPの高感度・高解像度検出と発生期におけるATPシグナルの探索

研究課題名(英文) Development of High sensitive and high-resolution detection of extra-cellular ATP in mouse and searching ATP signal in mouse embryo

研究代表者

山本 正道 (Yamamoto, Masamichi)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号：70423150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：低濃度で存在する細胞外アデノシン三リン酸(以下ATP)を検出するため、低濃度のATPに対してFRETを起こすATeamLをATPに高親和性であるBacillus由来のATP合成酵素を構成するタンパク質の一つであるサブユニット(ATP結合タンパク質)を介してGFPとKusabiraOrangeを結合させて作製した。このATeamLを細胞外へ掲示するように施したベクターを作製し、HeLa細胞へ導入するとATeamLは細胞外へ掲示された。この構築を利用して細胞外のATPを検出できるマウスを作製している。

研究成果の概要(英文)：To detect the low density and extra-cellular ATP, ATeamL was developed. ATeamL was constructed in FRET-based ATP indicator by genetically linking GFP and Kusabira Orange with epsilon subunit, which was derived from Bacillus (high affinity to ATP). ATeamL, connected to membrane anchoring sequence, was displayed on extra-cellular region in HeLa cell. Now, I generate the transgenic mouse using this construct to be able to detect the extra-cellular ATP in vivo.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：アデノシン三リン酸 細胞外

1. 研究開始当初の背景

アデノシン 3 リン酸(ATP)は全ての生物に共通する「細胞のエネルギー通貨」と呼ばれており、ATPは細胞活動に重要である。一方、ATPは細胞外にも存在し、神経細胞間や神経-グリア細胞間の情報伝達を調整し、睡眠・記憶・学習・運動などの脳活動に関与している。またその過剰伝達はてんかんや精神疾患に関与している事が受容体の解析より報告されている。これは細胞外 ATP が不安定かつ低濃度であるのに対して高感度の検出法が開発されてこなかったためである。

これまで細胞外の ATP 濃度測定法はルシフェラーゼ法が使用されており、基質(ルシフェリン)と酵素(ルシフェラーゼ)の反応時に ATP が必要である事を利用している。しかし、ルシフェラーゼ濃度・ルシフェリン濃度・pH などの周辺環境にも依存して変化するため正確な測定が困難であった。また検出方法が発光強度を利用しているため、細胞外 ATP 濃度が低い部位では発光が弱くなり、数細胞レベルでの位置特定が限界で、空間解像度も低くて ATP を細胞外へ分泌する細胞と分泌された ATP を受け取る細胞の特定は困難であった。また、発光が弱い時は露光時間を上げる事により検出するため、時間的分解能も低かった。更に細胞へ作用する細胞膜近傍の ATP だけでなく、機能が不明な細胞膜から離れた ATP を検出するため、ルシフェラーゼ法では細胞外 ATP が機能している部位は正確に特定できない問題を有していた(図 1)。

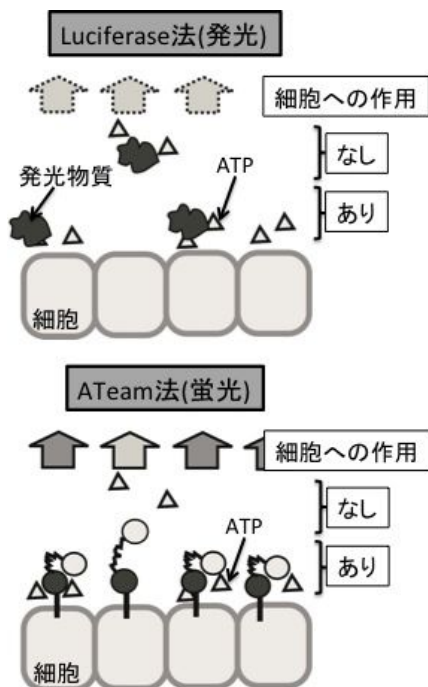


図 1: 細胞外 ATP の Luciferase 法と ATeam 法との検出方法の違い

2009 年に開発された ATP 濃度を可視化する

プローブ(ATeam)は細菌の ATP 合成酵素を構成するタンパク質の一つである サブユニット(ATP 結合タンパク質)を介して *mseCFP* と *cp173mVenus* を結合させて作成されている。これは ATP 濃度が上昇すると サブユニット部分が構造変化して CFP を励起する 435nm の光を当てても GFP から Venus への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こり、CFP 由来の蛍光が減少して Venus 由来の蛍光が主に発せられるようになる(図 1)。

2. 研究の目的

アデノシン 3 リン酸(ATP)は生物共通のエネルギーだけでなく、細胞外に放出され神経などに作用している。細胞外 ATP は不安定かつ高感度検出法がないため既知受容体の解析に留まっている。2009 年に ATP 濃度を可視化する蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)蛍光タンパク質として ATeam が開発され、細胞株内部の ATP 分布と変動が報告された。そこで本研究ではこの ATeam を利用して(1)低濃度の ATP を測定できる ATeam を開発した。(2)マウス生体内で細胞外 ATP の分布や変動を 1 細胞毎に高感度で測定できるシステムを構築する。更にこれを利用して(3)マウス発生過程における細胞外 ATP が機能する局面を探索する。

3. 研究の方法

(1)低濃度 ATP を測定できる ATP プローブの作製

低濃度 ATP を測定できる ATP プローブは ATP に高親和性である *Bacillus* 由来の ATP 合成酵素を構成するタンパク質の一つである サブユニット(ATP 結合タンパク質)を介して GFP と *KusabiraOrange* を結合させて作成した (ATeamL)。

作製した ATeamL の細胞外での機能を確認するために細胞外提示ベクターに組込んだ (ATeamL/display)後に HeLa 細胞へ遺伝子導

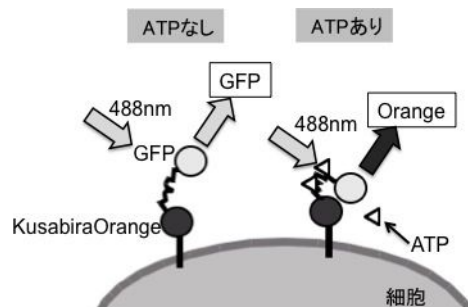


図 2: 細胞外 ATP を検出するプローブの模式図

入した(図 2)。

Calibration buffer (140mM KCl, 6mM NaCl, 0.5mM MgCl2, 10mM HEPES (pH7.4))に細胞を

なじませた後に各濃度にあわせた Mg-ATP を buffer へ溶解して HeLa の細胞膜上で発現する ATeamL が発する蛍光を測定した。測定は蛍光顕微鏡を用いて、488nm で励起した後にバンドフィルター FF02-520/35 とダイクロイックミラーにて分光した 552nm 以上の蛍光を BLP01-532R のロングパスフィルターにて得た。得られた GFP の蛍光画像と Kusabira Orange の蛍光画像を Metamorph にて解析して FRET ratio 画像を得た。

#### (2) ATeamL による生体内 ATP 可視化マウス作製

ATP プローブが細胞外へ掲示されるように、ATeamL/Display カセットをマウスの ROSA26 領域に挿入し、その制御を強力なプロモーターで行った。また、ATP プローブの機能を時空間制御するために *LoxP* で挟まれたストップ配列と *Neomycin* 耐性遺伝子を挿入し、*Cre* が発現する時空間でのみで ATeamL が発現し得る構築を施した。

細胞外 ATP 可視化マウスは C57BL/6 と 129sv のハイブリット ES 細胞である G4 細胞を用いて、エレクトロポレーション法にてターゲティングを行った。Neomycin 耐性細胞を取得するため、薬剤 G418 を 200ug/ml の濃度で添加した ES 細胞培養液にて選択し、得られたクローンからゲノム DNA を取得後に PCR 法、real-time PCR 法、Southern Blotting 法によって、マウス ROSA26 領域に 1 コピーだけノックインされた ES 細胞株を取得した。このターゲティングされた ES 細胞を用いて、酸性タイロードで透明体を除去したモルラ期のマウス胚とアグリゲーション法を用いて凝集させた後に 1 日 M16 培養液中にて培養を行い、胚盤胞になった凝集体を偽妊娠マウスの子宮へ移植する事でキメラマウスを得た。キメラマウスと C57BL/6 マウスを交配する事でノックインマウスを得た。更に、このノックインマウスと C57BL/6 マウスを交配させて得た受精卵へ *CAG-Cre* の RNA を顕微注入することで ATeamL を発現するノックインマウス(生体内 ATP 可視化マウス)を作製した。

#### 4. 研究成果

低濃度 ATP を計測できる ATeamL の特性 ATP センサー (ATeamL) が細胞外の細胞膜近傍での ATP 濃度変化を検出できるかを検討するため、ATeamL/Display を HeLa 細胞へ一過的に発現させて機能を検討した(図 3a)。このベクターは ATeamL を HeLa 細胞の細胞膜直上へ局在させている事が確認された(図 3b)。更に、細胞外の ATP 濃度を 0  $\mu$ M から 192  $\mu$ M まで段階的に変化させると 4  $\mu$ M では FRET ratio が約 0.7、64  $\mu$ M では約 1.4 の値を示し、4  $\mu$ M から 50  $\mu$ M までは ATP 濃度と FRET ratio 値が比例関係である事が示された(図 3d)。更

に高濃度 ATP を添加すると約 10 秒後には FRET ratio の変化を観察した(図 3c)。この結果は ATeamL が 4  $\mu$ M から 50  $\mu$ M までの ATP 量の変化を定量的かつ数秒以下で測定できる事を示している。

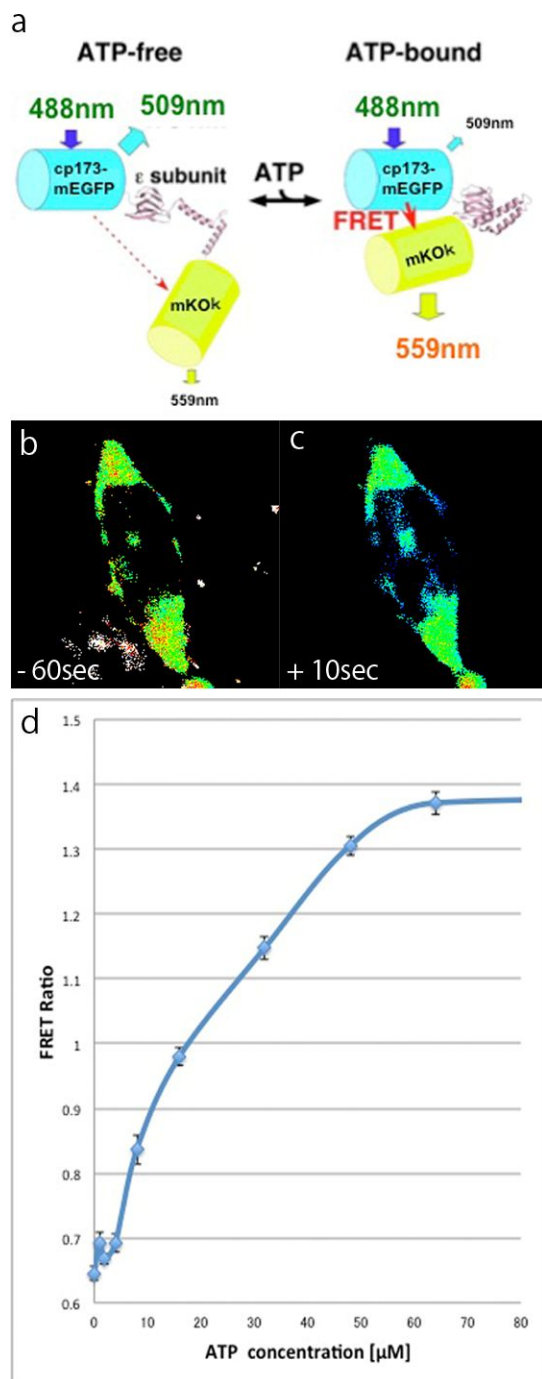


図 3: HeLa 細胞における ATeamL/Display の挙動。

a) ATeamL の模式図。b) HeLa 細胞の細胞膜上に ATeamL が局在している FRET ratio 図。Metamorph の IMD イメージで示している。c) ATeamL が細胞膜上に局在している HeLa 細胞に高濃度 ATP を添加して 10 秒後の FRET ratio 図。d) ATeamL が細胞膜上に局在している HeLa 細胞を用いて、培養液中の ATP 濃度(X 軸)と FRET ratio 値(Y 軸)をとったグラ

フ。

#### 細胞外 ATP 可視化マウスの経過

*ATeamL/Display* の構築を利用して、マウス *ROSA26* 領域に挿入した形で定法により Knock-in マウスを作製した。現在キメラマウスを取得中である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

山本正道

マウス発生過程及び心臓を含む疾患における ATP 代謝、第 3 回 発生過程におけるエネルギー代謝を考える会、2014 年 2 月 14 日、熊本大学(熊本県)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: ATP 可視化動物およびその用途

発明者: 山本正道

種類: 特許

番号: 特願 2014-005429

出願年月日: 平成 26 年 1 月 15 日

国内外の別: 日本

[その他]

ホームページ等

[http://asr1du.dept.med.gunma-u.ac.jp/myamamoto/masamichi\\_yamamoto.html](http://asr1du.dept.med.gunma-u.ac.jp/myamamoto/masamichi_yamamoto.html)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 正道 (YAMAMOTO MASAMICHI)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号: 70423150