

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350970

研究課題名(和文) グルコース非依存的エネルギー産生機構による細胞生理機能の解明

研究課題名(英文) Development of genetically-encoded multi-color ATP sensors for clarification of energy metabolism.

研究代表者

北口 哲也 (KITAGUCHI, TETSUYA)

早稲田大学・総合研究機構・主任研究員(研究院准教授)

研究者番号：60432374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：地球上に生息する生物は、動物の場合は食物からエネルギーを獲得し、植物の場合は光合成によりエネルギーを獲得している。本研究では、遺伝子コード型ATPセンサーを開発し、さまざまな生物の細胞や個体を光学顕微鏡下で可視化することで、ATPを基盤としたエネルギー代謝を解析した。ATPを産生する経路は複数存在しており、グルコース代謝はもちろんのこと、それ以外のATP産生機構についても可視化した。

研究成果の概要(英文)：Adenosine triphosphate (ATP) is an energy currency for living organisms. Therefore, we are able to clarify the mechanism of energy metabolism by visualizing ATP dynamics in the living cells. To achieve this objective, we developed a genetically-encoded fluorescent indicator for ATP. These indicators are single-fluorescent protein (FP) based, therefore change their intensity respond to ATP. We employed a green FP variant, Citrine as transmitter domain and a subunit of ATP-binding region on the bacterial FoF1-ATP synthase as sensing domain. Likewise, we employed blue FP and mApple to develop blue or red emitted indicators, respectively. Based on these indicators, we have monitored ATP dynamics in living cells by multi-color imaging.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：GFP

### 1. 研究開始当初の背景

生物のエネルギーの代謝は、さまざまな栄養素が合成、分解されて産生される代謝産物の検出、熱量測定、酸素・二酸化炭素の容積から解析されることが多い。しかしながら、これらの手法は時間空間分解能が低いことや、動物場合エネルギー源はさまざまな栄養素であるのに対して、植物の場合光がエネルギー源であることから、あらゆる生物種の異なるエネルギー代謝を細胞レベルで検出するのは困難であった。

生物においてエネルギーはATPとして貯蔵されている。これは動物や植物のみならず微生物においても同じである。そしてリン酸1分子の分解がエネルギーを供給することで、個体としての活動や恒常性の維持を可能としている。したがって、細胞内のATPの濃度変化を検出することで、すべての生物やさまざまなソースからのエネルギー代謝を明らかにできると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では細胞内でのエネルギー代謝を検出するためにATP濃度変化を可視化するセンサーを開発する。そして開発したセンサーを動物や植物、培養細胞や個体に導入し、ATPの動態を可視化することで、エネルギー動態を解析する。また、エネルギー産生を促進または阻害する刺激により、ATPの動態がどう変化するかを検出する。さらに、センサーのマルチカラー化にも挑戦し複数の分子の動態を同時に可視化することを試みる。

### 3. 研究の方法

蛍光タンパク質GFPの変異体のCitrineの発色団の近傍(アミノ酸配列の145番目のチロシン)に枯草菌のF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthaseのサブユニット由来するATP結合ドメインを導入した。これはATPが結合ドメインに結合したときに起こす構造変化を発色団近傍の環境の変化に変換することで、蛍光強度が変化することを期待している。

一番最初に作製したプロトタイプセンサー候補は通常ダイナミックレンジが小さいため、センサーとして簡便に使用することが困難である。そこで蛍光タンパク質と結合ドメインをつないでいる2つリンカーの長さを変更することでダイナミックレンジが増大するかを検討した。次に、そのリンカーをさらに最適化するためにアミノ酸変異を導入することにした。部位特異的にランダムに変異を導入し、一番ダイナミックレンジが大きかったものをテンプレートにして、さらにランダム変異を導入することを繰り返すことでダイナミックレンジを増大させた。

十分なダイナミックレンジが得られたら、タンパク質を精製し、吸収スペクトル、励起蛍光スペクトル、濃度依存曲線、pH感受性を検討した。

蛍光ATPセンサーのin vitroでの性能を

検証後、細胞への導入を試みた。植物や線虫にも導入し、さまざまな刺激によるエネルギー動態を検出した。最後に、使う蛍光タンパク質をGFP(緑)からBFP(青)、RFP(赤)へ変更し、異なる色のATPセンサーを開発した。

### 4. 研究成果

ATP結合ドメインをCitrineに挿入したところ、20%程度の輝度変化を起こすプロトタイプセンサーができた。このプロトタイプは輝度変化が小さいためイメージングには使用困難であると考えられた。そこで蛍光タンパク質と結合ドメインのつなぎ目(リンカー部位)の長さのアミノ酸配列を最適化したところ、最終的に5倍程度(400%程度)の輝度上昇を起こす緑色のATPセンサーを獲得できた。

この緑色ATPセンサーの励起、蛍光スペクトルを測定したところ、それぞれ505nm、522nmにピークがあった。次に、吸収スペクトルを測定したところ400nmと500nmあたりにピークが見られ、ATPの添加により、400nmのピークが減少し、500nmのピークが上昇した。400nmのピークはプロトン化、500nmの脱プロトン化したピークであると考えられるため、ATP添加により発色団のプロトン化が変化することで輝度変化を起こしていると考えられた。そして、このセンサーの特異性を検討したところdATP、ADP、AMP、GTPに比較して特異的にATPに結合することが判明した。またpH感受性を検討したところ、pHが上昇するに伴って、輝度が上昇した。したがって、細胞内のpH変化に注意する必要があることが判明した。

緑色ATPセンサーを培養細胞に導入し蛍光顕微鏡下でイメージングを行った。HeLa細胞にATPセンサーを発現させ、解糖系の阻害薬であるフッ化ナトリウムを添加したところ、輝度低下が見られた。このことからこのセンサーは細胞質でのATPの動態を検出することができることが証明された。次に、遺伝子コード型であるメリットを生かし、このセンサーをミトコンドリアに発現させ、酸化リン酸化の阻害薬であるオリゴマイシンで刺激したところ、予想どおり輝度低下をイメージングすることができた。おもしろいことに、細胞質に発現しているセンサーはオリゴマイシン刺激により一過的な輝度上昇がみられた。これはミトコンドリアのATP産生が阻害されたことを補うために、細胞質での解糖系が亢進したためと推測している。同様の実験を体温維持に関わっている褐色脂肪細胞で行ったところ、ミトコンドリアでは輝度低下を検出できたが、細胞質において輝度上昇は見られず、輝度低下だけが観察された。これは、細胞の由来や性質により解糖系と酸化リン酸化の相互作用が異なることを意味している。

植物でのエネルギー代謝を検出できるか

検討した。コドンを植物化した ATP センサー DNA をシロイヌナズナのプロトプラストに導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。動物細胞と同様にオリゴマイシン刺激したところミトコンドリアでの輝度低下を検出でき、この ATP センサーは植物細胞でも機能することがわかった。さらに 458nm で光照射したところ、輝度上昇が見られたことから、光合成による ATP 産生も検出することができた。

個体での ATP 動態を検出できるかどうかを検討するために線虫個体に導入した。myo-2 プロモーターの制御下で ATP センサーを咽頭筋に発現させ、麻酔薬である 1-phenoxy-2-propanol を添加したところ、輝度低下が検出され、予想通り ATP 産生が阻害されている様子を観察できた。

蛍光色の多色化を目指した。センサーの蛍光タンパク質の部分を BFP、mApple に変更した。両蛍光タンパク質とも Citrine と同様のバレル構造を持っているにも関わらず、ATP 添加による蛍光輝度変化がほとんど失われてしまった。そこで再び、リンカー長調整およびアミノ酸変異を導入したところ、青色は 2 倍程度、赤色は 4 倍程度の輝度変化を引き起こす ATP センサーの作出に成功した。残念なことに、最適化した緑、赤、青のセンサーのリンカー長やリンカーのアミノ酸配列は異なっており、統一的なリンカー配列を見つけることはできなかった。

センサーの多色化に成功したため、マルチカラーイメージングへの適用が可能か検討した。先ほどの実験でも用いた褐色脂肪細胞にさまざまな細胞内情報伝達物質に対するセンサーを導入し、熱産生刺激を与えたときの ATP、cAMP、Ca<sup>2+</sup> の動態をそれぞれ、赤、緑、青色の蛍光で検出した。3 アドレナリン受容体をイソプロテレノールで刺激したところ、cAMP の上昇、ATP の低下、Ca<sup>2+</sup> の上昇が引き起こされていることを同時に単一細胞で可視化することに成功した。したがって、本研究課題で開発した ATP センサーはさまざまな分子に対するセンサーとの併用も可能であり、マルチカラーイメージングにも適用できることが証明された。

## 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 4 件)

北口哲也「蛍光・発光プローブ」光アライアンス 27、15-19、2016. 査読無

Manami Oya, Tetsuya Kitaguchi, Kazuki Harada, Rika Numano, Takahiro Sato, Masayasu Kojima and Takashi Tsuboi. Low glucose-induced ghrelin secretion is mediated by ATP-sensitive potassium channel. J Endocrinol 226, 25-34, 2015. 査読有

doi: 10.1530/JOE-15-0090

Haruki Odaka, Satoshi Arai, Takafumi Inoue and Tetsuya Kitaguchi. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. PLoS One 9, e100252, 2014. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0100252

Manami Oya, Tetsuya Kitaguchi, Yu Yanagihara, Rika Numano, Masaki Kakeyama, Kazuya Ikematsu and Takashi Tsuboi. Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. Biochem Biophys Res Commun 438, 145-151, 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.043

〔学会発表〕(計 8 件)

新井敏、伊藤寿朗、坪井貴司、北口哲也「RGB カラーの蛍光 ATP センサーが切り拓くエネルギー代謝研究」第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 日、横浜

Satoshi Arai, Hideki Itoh, Thankiah Sudhakaran, E. Birgitte Lane and Tetsuya Kitaguchi. Spatiotemporal imaging and quantitative analysis of subcellular ATP using RGB-colorful fluorescent protein based indicators. 第 54 回日本生物物理学会、平成 28 年 11 月 25 日、つくば

Satoshi Arai, Liang-Sheng Looi, Wan-Yi Wee, Toshiro Ito and Tetsuya Kitaguchi. Visualization of subcellular ATP dynamics in Arabidopsis protoplasts with an intensimetric fluorescent protein-based indicator. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会・合同大会、平成 27 年 12 月、神戸

Haruki Odaka, Satoshi Arai, Takafumi Inoue and Tetsuya Kitaguchi. Improvement of genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator for dual-color imaging. 第 37 回日本分子生物学会年会、平成 26 年 11 月、横浜

Satoshi Arai, Rokus Gyorgy Kriszt, Michael Raghunath and Tetsuya Kitaguchi. An intensimetric fluorescent protein-based indicator visualizes ATP dynamics in intracellular compartments. 第 37 回日本分子生物学会年会、平成 26 年 11 月、横浜

Takashi Tsuboi, Manami Oya and Tetsuya Kitaguchi. Vesicular nucleotide transporter regulates ATP storage in

secretory lysosome in astrocyte. 第 91 回  
日本生理学会大会、平成 26 年 3 月、鹿児島

Satoshi Arai, Manami Oya, Takashi Tsuboi  
and Tetsuya Kitaguchi. Development of  
intensiometric fluorescent indicators for  
sensing the dynamics of intracellular ATP.  
第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12  
月、神戸

新井敏、北口哲也「タンパク質の構造変化を  
光情報に変換するバイオセンサーの創出」高  
分子学会 第 62 回高分子討論会、平成 25 年  
9 月、金沢

〔図書〕(計 1 件)

『みんなの生命科学』北口哲也、塚原伸治、  
坪井貴司、前川文彦、2016 年 1 月 10 日刊行、  
化学同人、

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：リガンド蛍光センサータンパク質とそ  
の使用

発明者：北口哲也、坪井貴司、上田宏、新井  
敏

権利者：国立大学法人東京大学・学校法人早  
稲田大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/ 85902

出願年月日：平成 28 年 12 月 2 日

国内外の別： 国外

名称：ATP 蛍光センサータンパク質

発明者：北口哲也、新井敏、坪井貴司

権利者：学校法人早稲田大学・国立大学法人  
東京大学

種類：特許

番号：特願 2015-237524

出願年月日：平成 27 年 12 月 4 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.waseda.jp/WABIOS/index\\_ja.htm](http://www.waseda.jp/WABIOS/index_ja.htm)  
|

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

北口 哲也 (KITAGUCHI TETSUYA)

早稲田大学・総合研究機構・研究院准教授  
研究者番号：60432374

### (2)研究分担者

新井 敏 (ARAI SATOSHI)

早稲田大学・総合研究機構・研究院講師

研究者番号：70454056

坪井 貴司 (TSUBOI TAKASHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授  
研究者番号：80415231