

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03654

研究課題名(和文) 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同定およびその解析

研究課題名(英文) Study of mitochondrial transporters branched-chain amino acids using genetically encoded fluorescent biosensors

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：分岐鎖アミノ酸はBCAAとも呼ばれ、様々な生理機能や疾患に関わる重要な栄養素です。細胞に取り込まれた分岐鎖アミノ酸はミトコンドリア内に運ばれて代謝されますが、これまでどのような仕組みでミトコンドリア内に運ばれるかはよくわかっていませんでした。我々は、細胞質およびミトコンドリア内の分岐鎖アミノ酸濃度をイメージングするための新しい蛍光バイオセンサーOLIVEを開発し、単一の生きた細胞内部の分岐鎖アミノ酸動態を調べることを可能にしました。この技術を用いてミトコンドリアの分岐鎖アミノ酸輸送体分子のスクリーニングをおこない、候補となる3種類の遺伝子を見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において我々が開発した蛍光バイオセンサーは、オートファジー研究を始め分岐鎖アミノ酸が関与する幅広い生物学領域において重要な研究ツールとなることが期待されます。分岐鎖アミノ酸は様々な生理機能や疾患に関与することから、分岐鎖アミノ酸の生体内動態の理解の増進は、将来的には病気の理解や健康に大きく寄与する可能性が高いと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Branched-chain amino acids, also known as BCAAs, are important nutrients involved in a variety of physiological functions and diseases. The branched-chain amino acids incorporated into the cell are transported into the mitochondria for metabolism, but the mechanism by which they are transported into the mitochondria has been unclear. We have developed a new fluorescent biosensor, OLIVE, for imaging branched-chain amino acid concentrations in the cytosol and mitochondria, allowing us to examine spatiotemporal dynamics of the amino acids inside a single living cell. This technique was used to screen mitochondrial branched-chain amino acid transporters, and three candidate genes were identified.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：分岐鎖アミノ酸 BCAA イメージング FRET 蛍光 トランスポーター siRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真正細菌の細胞内共生によって生じたミトコンドリアは、内部に独自のゲノム DNA (mtDNA) を持ち、細胞内エネルギー通貨である ATP の産生をはじめとする極めて多彩な機能を担う細胞内小器官である。ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子の大部分は進化の過程で核に移行した。しかし、ミトコンドリア機能維持に重要な呼吸鎖複合体の構成サブユニットをコードする遺伝子の一部は mtDNA に残されており、これら mtDNA にコードされたタンパク質の合成はミトコンドリア内でおこなわれる。mtDNA 上の tRNA 遺伝子の変異が、ミトコンドリア機能障害とそれに起因する幅広い疾病の原因となることがよく知られているように、ミトコンドリア内において正しくタンパク質合成がおこなわれることは、生体の恒常性に必要なミトコンドリア機能を維持する上で非常に重要である。ミトコンドリア内において正常にタンパク質合成がおこなわれるためには、タンパク質の材料となる全てのアミノ酸がミトコンドリア内に十分量存在する必要がある。また、一部のアミノ酸はミトコンドリア内で代謝されることが知られている。様々な生理機能や疾病との関連が報告されている分岐鎖アミノ酸 (ロイシン、イソロイシン、バリン) もミトコンドリア内で代謝され、その代謝酵素の異常が遺伝疾患であるメープルシロップ尿症を引き起こすことが知られている。しかし、アミノ酸を細胞質からミトコンドリア内に輸送する分子とそのメカニズムについてはほとんど理解が進んでいない。タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のうち、ミトコンドリア内膜の輸送体が同定されているものは、グルタミン酸とアスパラギン酸の 2 種類 (グルタミン酸輸送体およびグルタミン酸:アスパラギン酸輸送体) のみであり、他の 18 種類のアミノ酸を輸送する分子の実態は不明である。研究が進んでいない理由としては、ミトコンドリアへのアミノ酸輸送活性を指標にした適切なスクリーニング系が存在しないためだと考えられる。

近年、蛍光タンパク質を利用した遺伝子コード型蛍光バイオセンサーの開発が盛んになっている。特に、ATP や NADH といった代謝物に対する蛍光バイオセンサーを利用した生細胞内代謝物イメージング技術は、細胞内代謝物を時空間的な動態の観点から研究することを可能にしてきた。これらの技術と同様に分岐鎖アミノ酸のイメージング手法を確立することができれば、ミトコンドリアへの輸送を含め、ほとんど理解が進んでいない細胞内における分岐鎖アミノ酸の動態に関して重要な知見が得られることが期待された。

### 2. 研究の目的

以下の 2 点を目的として本研究を進めた。

(1) 細胞質およびミトコンドリア内の分岐鎖アミノ酸濃度をイメージングする手法の確立  
生細胞内部の分岐鎖アミノ酸濃度をリアルタイムに計測する技術はこれまで報告されていなかった。そこで、まず分岐鎖アミノ酸に特異的に応答する遺伝子コード型の蛍光バイオセンサーを開発し、この蛍光バイオセンサーを用いることで細胞質およびミトコンドリア内の分岐鎖アミノ酸濃度を単一細胞レベルの解像度でイメージングする手法を確立することが第一の目的である。

(2) ミトコンドリア内膜における分岐鎖アミノ酸輸送体の同定  
上記 (1) で開発する生細胞内分岐鎖アミノ酸イメージング技術を利用して網羅的なスクリーニングを実施することでミトコンドリア内への分岐鎖アミノ酸流入に関わる遺伝子を同定し、更にその機能を詳細に解析することが第二の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 分岐鎖アミノ酸に対する FRET 型蛍光バイオセンサーの構築と *in vitro* での機能評価  
分岐鎖アミノ酸結合タンパク質 LIVBP、シアン色蛍光タンパク質 (CFP) および黄色蛍光タンパク質 (YFP) の様々な融合体の cDNA を PCR あるいは遺伝子合成によって作製した。これらの cDNA を載せた pRSET-B ベクターを保持する大腸菌 JM109(DE3) 株を 24°C で 2 日間培養することで、融合タンパク質を発現させた。発現したタンパク質は Ni-NTA カラムおよび Superdex200 ゲルろ過カラムによって精製し、4°C で保存した。精製したバイオセンサーの蛍光スペクトルは、10% スクロース、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% NP-40、100  $\mu$  M TCEP を含む 10mM のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4) 中で分光光度計を用いて 37°C で測定した。励起波長は  $435 \pm 2.5$  nm で、460~600 nm の蛍光波長を走査した。

#### (2) 細胞培養

HeLa 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS, Sigma-Aldrich) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 1g/L グルコース) 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。バイオセンサーは、リポフェクタミン 2000 試薬を用いて、バイオセンサー cDNA を担持したプラスミドをトランスフェクションすることによって細胞に一過的に発現させた。また、プラスミドを導入した細胞を 700  $\mu$ g/mL の G418 を含む培地中で培養することにより、バイオセンサーを安定的に発現する細胞を単離した。

#### (3) 顕微鏡

イメージングに先立ち、培養培地を 5% FBS を添加したビタミン B2/フェノールレッド不含 DMEM に変更し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 5~10 時間インキュベートした。細胞の蛍光像は、CFI Plan Apo 20 $\times$  (NA 0.75)、CFI Apo TIRF 60 $\times$  (NA 1.49)、または CFI Plan Apo  $\lambda$  40 $\times$  (NA 0.95) 対物

レンズを用い、ニコン Eclipse Ti-E 倒立顕微鏡上で、Andor Technologies Zyla4.2 sCMOS カメラ、または浜松ホトニクス ORCA-AT CCD カメラに 400~600 ms の露光時間で撮影した。撮影中、細胞の環境はステージトップインキュベーターによって 37°C、5%CO<sub>2</sub> に保持した。FF01-427/10 励起フィルタ、FF458-Di01 ダイクロイックミラー、および 2 つの発光フィルタ(CFP の場合は FF 01-483/32、YFP の場合は FF 01-542/27)から構成されるフィルタセットをイメージングに使用した。FRET シグナルは、YFP/CFP 蛍光比により評価した。画像の分析は MetaMorph を用い、バックグラウンド除去はバックグラウンド信号として細胞のない領域内の蛍光信号を用いて行った。

#### (4) RNA 干渉

ミトコンドリアに局在すると決定あるいは予測されている 1158 個の遺伝子のうち、アミノ酸輸送を担う可能性があると考えられる SLC ファミリー輸送体および ABC ファミリー輸送体をコードする計 69 個の遺伝子に対してそれぞれ 2 種類ずつの計 138 個の siRNA を含むライブラリーを作製した。ミトコンドリアに分岐鎖アミノ酸バイオセンサーを恒常的に発現する細胞へ、RNAiMax を用いて siRNA の導入をおこなった。siRNA の導入から 2 日後にミトコンドリア内分岐鎖アミノ酸イメージングをおこなった。

### 4. 研究成果

#### (1) FRET 型分岐鎖アミノ酸バイオセンサーの開発

大腸菌由来のロイシン/イソロイシン/バリン結合タンパク質 (LIVBP) 遺伝子と seCFP (CFP の一種) と cp173-Venus (YFP の一種) をそれぞれドナーおよびアクセプターとして組み合わせることで、FRET ベースの分岐鎖アミノ酸バイオセンサー (OLIVe) を開発した。以前に行われた LIVBP の結晶学的研究では、大きなグローバルな構造変化にもかかわらず、分岐鎖アミノ酸の結合により、タンパク質の N 末端と C 末端の間の距離がほとんど変化しないことが明らかとなっていた。単純に 2 つの蛍光タンパク質を LIVBP の N 末端と C 末端に融合させた場合、リガンド結合時に大きな FRET 変化が得られないと予想されたことから、大きな FRET 変化が期待できる位置 (LIVBP のアミノ酸位置 180 と 181 の間および 269 と 271 の間) に cp173-Venus と seCFP を短いグリシンベースのリンカーを介して、それぞれ挿入した。

435 nm で励起した際の精製 OLIVe の蛍光スペクトルは分岐鎖アミノ酸濃度に依存して変化し、YFP 強度の増加は CFP 強度と逆相関した。すなわち、このバイオセンサーからの FRET シグナルは分岐鎖アミノ酸濃度を反映しており、YFP/CFP の蛍光強度比で評価することが可能であることが示された。10 mM のロイシンを加えた際の YFP/CFP 比の増加は約 105% と、一般的な FRET 型バイオセンサーと比較して十分大きいものであった。OLIVe のロイシン、イソロイシン、バリンに対する解離定数は、それぞれ 97、83、および 589  $\mu$ M であった。また、分岐鎖アミノ酸以外のアミノ酸への反応性は全く無いか、非常に弱いものであった。分岐鎖アミノ酸の代謝産物も FRET シグナルを増加させなかった。pH の影響を調べた結果、通常細胞質 pH 付近の僅かな pH 変化であれば、FRET シグナルにほとんど影響を与えないことが示された。

#### (2) 単一の生細胞における細胞質内分岐鎖アミノ酸濃度のイメージング

細胞内で発現させたバイオセンサーの大部分は細胞質に局在し、一部は核内に局在した。まず、様々な培養条件で単一細胞における FRET シグナル (YFP/CFP 比) を計測した。通常培地 (DMEM) で培養した細胞は安定した FRET シグナルを示したが、そこに過剰量の分岐鎖アミノ酸を培地に添加すると、FRET 信号は徐々に増加した。一方、培地を DMEM からアミノ酸飢餓培地 (EBSS) に置き換えると、FRET シグナルは急速に減少し、EBSS への分岐鎖アミノ酸の添加後に数時間かけて回復した。

次に、単一の OLIVe 発現細胞からの FRET シグナルと、HPLC を用いて細胞集団から計算したバルクの細胞内分岐鎖アミノ酸濃度を、培地中の分岐鎖アミノ酸濃度を変えて比較した。HPLC の結果から計算した細胞内分岐鎖アミノ酸濃度は培地中の分岐鎖アミノ酸量に強く依存した。OLIVe 発現細胞からの FRET シグナルも培地中の分岐鎖アミノ酸量に依存しており、HPLC から求められた分岐鎖アミノ酸濃度と高い相関を示した。この結果は、単一細胞で発現した OLIVe からの FRET シグナルが細胞内分岐鎖アミノ酸レベルを反映することを明確に示している。HPLC によって決定された値から、OLIVe によって約 200  $\mu$ M から 2 mM 程度の細胞内の分岐鎖アミノ酸の測定が可能であると推定された。

#### (3) ミトコンドリア内分岐鎖アミノ酸濃度のイメージング

分岐鎖アミノ酸はミトコンドリア内部においてタンパク質合成に利用されるほか細胞のエネルギー源として代謝されるため、細胞質分岐鎖アミノ酸の一部はミトコンドリアマトリックスに輸送されるはずである。しかし、ミトコンドリアマトリックス中の分岐鎖アミノ酸レベルを特異的にモニターすることは従来不可能であった。我々は、シトクロム c 酸化酵素サブユニット VIII のミトコンドリア局在化シグナルを 2 つ直列に OLIVe の N 末端に融合させ、ミトコンドリアマトリックスへの OLIVe の局在化を試みた。その結果、融合タンパク質である mit-OLIVe は、ミトコンドリアマーカーである mitotracker-red と蛍光が共局在し、適切にミトコンドリアマトリックスに局在化することが示された。OLIVe の結果と同様に、培養液中の分岐鎖アミノ酸量と一致した mit-OLIVe からの FRET シグナルの変化が観察された。また、アミノ酸を含まない DMEM で培養した細胞は、個々の分岐鎖アミノ酸を培地に補充することに応

答して、mit-OLIVEのFRETシグナルの増加を示した。これらの結果から、mit-OLIVEはミトコンドリアの分岐鎖アミノ酸レベルをモニタリングすることができることと我々は結論づけた。

#### (4) 細胞の栄養環境による細胞内分岐鎖アミノ酸濃度の制御

細胞内の分岐鎖アミノ酸レベルへの他のアミノ酸の潜在的な影響を調べるために、バリンを補充したアミノ酸フリーDMEMで培養したOLIVE発現細胞およびmit-OLIVE発現細胞のFRETシグナルの、非分岐鎖アミノ酸アミノ酸の添加への応答を定量した。興味深いことに、細胞内の分岐鎖アミノ酸レベルは、どのアミノ酸を添加したかによって有意に変化した。このうち、グルタミンは細胞質とミトコンドリアの両方の分岐鎖アミノ酸量を有意に増加させた。また、細胞質とミトコンドリアの分岐鎖アミノ酸レベルの間には強い正の相関が見られた。興味深いことに、セリンが添加された場合には、細胞質とミトコンドリアの間に大きな差が観察された。この不一致は、HeLa細胞のミトコンドリア内膜には、細胞質膜とは性質の異なるアミノ酸輸送システムが存在する可能性を示唆している。

これまでに、L型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) が、HeLa細胞を含むがん細胞において外部からの分岐鎖アミノ酸取り込みの大部分を担っていることが報告されていた。実際、LAT1をノックダウンしたところ、対照細胞に比べてFRETシグナルが有意に減少した。これまでの報告では、グルタミンの流入は、LAT1交換体を介して分岐鎖アミノ酸の流入を誘発することが示唆されていたことから、上で観察されたグルタミンを介した細胞内分岐鎖アミノ酸量の増加は、LAT1の活性によるものではないかと考えた。実際に、LAT1のノックダウンによってグルタミン添加によるFRET信号の増加が有意に抑制されることが確認された。これらの結果は、LAT1がHeLa細胞の細胞内分岐鎖アミノ酸レベルを決定する重要なトランスポーターであることを明確に示している。

分岐鎖アミノ酸は、グルコースやタンパク質合成などの細胞内代謝プロセスを制御する強力な栄養シグナル分子であるため、細胞の恒常性を維持するために、環境中のエネルギー源の利用可能性に応じて、細胞の分岐鎖アミノ酸の利用が制御されている可能性がある。そこで、グルタミン、グルコース、ピルビン酸が細胞内分岐鎖アミノ酸レベルに及ぼす影響を、分岐鎖アミノ酸イメージングを用いて調べた。バリンを添加した無栄養培地で培養したHeLa細胞は、時間の経過とともに徐々に細胞質の分岐鎖アミノ酸を失っていった。一方、グルタミンの存在下では、上での観察結果と一致し、分岐鎖アミノ酸レベルが有意に高く維持されることが観察された。興味深いことに、細胞は飢餓状態の間、グルコースまたはピルビン酸の存在下でわずかに高い分岐鎖アミノ酸レベルを保持していた。HeLa細胞は分岐鎖アミノ酸を合成することができないことから、この観察結果は、グルタミンだけでなく、グルコースとピルビン酸も細胞への分岐鎖アミノ酸の取り込みを促進することを示唆している。一方、バリンが存在しない場合には、このような分岐鎖アミノ酸レベルの増加は観察されなかった。

我々の結果は、細胞内の分岐鎖アミノ酸レベルは、環境中の分岐鎖アミノ酸レベルやトランスポーター活性だけでなく、環境中の他の栄養素によっても決定されることを示している。蛍光バイオセンサーを用いた細胞内分岐鎖アミノ酸レベルのイメージングは、細胞内の分岐鎖アミノ酸のこのような複雑な挙動を理解するための重要な技術となると期待される。

#### (5) イメージングを用いたミトコンドリアの分岐鎖アミノ酸輸送体のスクリーニング

3種類の分岐鎖アミノ酸のミトコンドリア内への取り込みに異なる輸送体が働いている可能性が考えられたため、まず、バリンの輸送体分子をRNA干渉によってスクリーニングした。mit-OLIVEを発現するHeLa細胞にsiRNAを導入したのち、アミノ酸不含DMEMに1mMのバリンとグルタミンを加えた培地に置換して6時間後にFRETシグナルを測定した。その結果、3種類のsiRNAで弱いながらもFRETシグナルの有意な低下が観察された。この研究の途中、米国のグループからヒト褐色脂肪細胞におけるミトコンドリア分岐鎖アミノ酸輸送体としてSLC25A44を同定したという論文が発表された(Nature 572, p614, 2019)。SLC25A44は我々のスクリーニングでヒットした3種類の遺伝子には含まれていなかった。これらの知見は、我々が研究で用いたHeLa細胞においてはSLC25A44が働いていない、あるいはSLC25A44以外にも分岐鎖アミノ酸輸送体が働いている可能性を示唆している。後者の場合、SLC25A44以外の分岐鎖アミノ酸輸送体を同定するためには、SLC25A44のノックアウト細胞をスクリーニングに用いる必要がある。また、我々のスクリーニングでヒットした3遺伝子のうち、2つは既に他の機能が報告されているものであった。これらの正確な機能を知るためには、これらの遺伝子をノックアウトした細胞での詳細な解析が必要であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計24件（うち査読付論文 24件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Inoue Haruki, Kunida Katsuyuki, Matsuda Naoki, Hoshino Daisuke, Wada Takumi, Imamura Hiromi, Noji Hiroyuki, Kuroda Shinya	4. 巻 43
2. 論文標題 Automatic Quantitative Segmentation of Myotubes Reveals Single-cell Dynamics of S6 Kinase Activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 153 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.18012	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 Yamamoto Kimiko, Imamura Hiromi, Ando Joji	4. 巻 315
2. 論文標題 Shear stress augments mitochondrial ATP generation that triggers ATP release and Ca <sup>2+</sup> signaling in vascular endothelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H1477 ~ H1485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00204.2018	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 Sasaoka Norio, Imamura Hiromi, Kakizuka Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 A Trace Amount of Galactose, a Major Component of Milk Sugar, Allows Maturation of Glycoproteins during Sugar Starvation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 211 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.11.035	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 Ito Hiroaki, Sugawara Takeshi, Shinkai Soya, Mizukawa Satoshi, Kondo Ayaka, Senda Hisamichi, Sawai Kengo, Ito Koki, Suzuki Sayaka, Takaine Masakatsu, Yoshida Satoshi, Imamura Hiromi, Kitamura Kenji, Namba Toshinori, Tate Shin-ichi, Ueno Masaru	4. 巻 511
2. 論文標題 Spindle pole body movement is affected by glucose and ammonium chloride in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 820 ~ 825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.128	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, 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 pii: jcs230649
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 Alfaqaan Soaad, Yoshida Tomoki, Imamura Hiromi, Tsukano Chihiro, Takemoto Yoshiji, Kakizuka Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 PPAR $\gamma$ -Mediated Positive-Feedback Loop Contributes to Cold Exposure Memory	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40633-3	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 Matsui Yusuke, Funato Yosuke, Imamura Hiromi, Miki Hiroaki, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Visualization of long-term Mg <sup>2+</sup> dynamics in apoptotic cells using a novel targetable fluorescent probe	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 8255 ~ 8264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7sc03954a	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 Trevisiol Andrea, Saab Aiman S, Winkler Ulrike, Marx Grit, Imamura Hiromi, M?bius Wiebke, Kusch Kathrin, Nave Klaus-Armin, Hirrlinger Johannes	4. 巻 6
2. 論文標題 Monitoring ATP dynamics in electrically active white matter tracts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e24241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.24241	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 該当する

1. 著者名 Suzuki Makoto, Sato Masanao, Koyama Hiroshi, Hara Yusuke, Hayashi Kentaro, Yasue Naoko, Imamura Hiromi, Fujimori Toshihiko, Nagai Takeharu, Campbell Robert E., Ueno Naoto	4. 巻 144
2. 論文標題 Distinct intracellular Ca <sup>2+</sup> dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1307 ~ 1316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.141952	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 該当する

1. 著者名 Kon Shunsuke, Ishibashi Kojiro, Katoh Hiroto, Kitamoto Sho, Shirai Takanobu, Tanaka Shinya, Kajita Mihoko, Ishikawa Susumu, Yamauchi Hajime, Yako Yuta, ほか	4. 巻 19
2. 論文標題 Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 530 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncb3509	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 該当する

1. 著者名 Yoshizumi Takuma, Imamura Hiromi, Taku Tomohiro, Kuroki Takahiro, Kawaguchi Atsushi, Ishikawa Kaori, Nakada Kazuto, Koshiba Takumi	4. 巻 7
2. 論文標題 RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05808-w	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 Nakano Masaki, Imamura Hiromi, Sasaoka Norio, Yamamoto Masamichi, Uemura Norihito, Shudo Toshiyuki, Fuchigami Tomohiro, Takahashi Ryosuke, Kakizuka Akira	4. 巻 22
2. 論文標題 ATP Maintenance via Two Types of ATP Regulators Mitigates Pathological Phenotypes in Mouse Models of Parkinson's Disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 225 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2017.07.024	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 Hayashi Sayaka, Nakazaki Yosuke, Kagi Kei, Imamura Hiromi, Watanabe Yo-hei	4. 巻 7
2. 論文標題 Fusion protein analysis reveals the precise regulation between Hsp70 and Hsp100 during protein disaggregation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08917-8	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 Kishikawa Jun-ichi, Inoue Yuki, Fujikawa Makoto, Nishimura Kenji, Nakanishi Atsuko, Tanabe Tsutomu, Imamura Hiromi, Yokoyama Ken	4. 巻 13
2. 論文標題 General anesthetics cause mitochondrial dysfunction and reduction of intracellular ATP levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0190213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0190213	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 Matsubara Masaki, Kanda Hajime, Imamura Hiromi, Inoue Mayumi, Noguchi Michio, Hosoda Kiminori, Kakizuka Akira, Nakao Kazuwa	4. 巻 8
2. 論文標題 Analysis of mitochondrial function in human induced pluripotent stem cells from patients with mitochondrial diabetes due to the A3243G mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19264-7	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 Oshima Koichi, Saiki Norikazu, Tanaka Michihiro, Imamura Hiromi, Niwa Akira, Tanimura Ayako, Nagahashi Ayako, ほか	4. 巻 497
2. 論文標題 Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 719 ~ 725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.139	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 Maeshima Kazuhiro, Matsuda Tomoki, Shindo Yutaka, Imamura Hiromi, Tamura Sachiko, Imai Ryosuke, Kawakami Syoji, Nagashima Ryosuke, Soga Tomoyoshi, Noji Hiroyuki, Oka Kotaro, Nagai Takeharu	4. 巻 28
2. 論文標題 A Transient Rise in Free Mg <sup>2+</sup> Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome Condensation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 444 ~ 451.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2017.12.035	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 Alfaqaan Soaad, Yoshida Tomoki, Imamura Hiromi, Tsukano Chihiro, Takemoto Yoshiji, Kakizuka Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 PPAR $\gamma$ -Mediated Positive-Feedback Loop Contributes to Cold Exposure Memory	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40633-3	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 Kamikubo Kenta, Kato Hisakazu, Kioka Hidetaka, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Nishida Yuya, Asano Yoshihiro, Imamura Hiromi, Kawahara Hiroyuki, Shintani Yasunori, Takashima Seiji	4. 巻 294
2. 論文標題 A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G0/G1 switch gene 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14562 ~ 14573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008544	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 Murata Michael M., Kong Xiangduo, Moncada Emmanuel, Chen Yumay, Imamura Hiromi, Wang Ping, Berns Michael W., Yokomori Kyoko, Digman Michelle A.	4. 巻 30
2. 論文標題 NAD <sup>+</sup> consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2584 ~ 2597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E18-10-0650	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 該当する

1. 著者名 Yoshida Tomoki, Nakajima Hitomi, Takahashi Sena, Kakizuka Akira, Imamura Hiromi	4. 巻 4
2. 論文標題 OLive: A Genetically Encoded Fluorescent Biosensor for Quantitative Imaging of Branched-Chain Amino Acid Levels inside Single Living Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 3333 ~ 3342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b02067	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 Nagao Takemasa, Shintani Yasunori, Hayashi Takaharu, Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Nishida Yuya, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Yashirogi Shohei, Yazawa Issei, Asano Yoshihiro, Shinzawa Itoh Kyoko, Imamura Hiromi, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu, Goto Yu ichi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800389R	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 Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Fujita Takeshi, Asano Yoshihiro, Shintani Yasunori, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Imamura Hiromi, Kogo Mikihiro, Kitakaze Masafumi, Sakata Yasushi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 In vivo real time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2041 ~ 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901686R	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 Morciano Giampaolo, Imamura Hiromi, Patergnani Simone, Pedriali Gaia, Giorgi Carlotta, Pinton Paolo	4. 巻 155
2. 論文標題 Measurement of ATP concentrations in mitochondria of living cells using luminescence and fluorescence approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 199 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mcb.2019.10.007	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 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松岡篤志、吉田有希、垣塚彰、今村博臣
2. 発表標題 新規発光型ATPバイオセンサーを用いた細胞内および細胞外ATPダイナミクスの定量的観測系の構築
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第44回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imamura H, Sakamoto S, Yoshida T, Kakizuka A
2. 発表標題 Single-cell imaging of intracellular ATP dynamics during apoptosis using a caspase-resistant FRET-based biosensor
3. 学会等名 International Meeting on Optical Biosensors (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imamura Hiromi, Sakamoto Shuichiro, Yoshida Tomoki, Kakizuka Akira
2. 発表標題 Imaging of intracellular ATP level revealed pannexin1-mediated programmed ATP decrease in apoptosis
3. 学会等名 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress / 11th European Biophysics Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津山泰一、坪内朝子、碓井理夫、今村博臣、上村匡
2. 発表標題 FRET型ATPセンサーを用いたショ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
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松岡篤志、垣塚彰、今村博臣
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 ツメガエル卵細胞におけるATPの役割の検証
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋瞳、吉田有希、垣塚彰、今村博臣
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高稲正勝、今村博臣、吉田知史
2. 発表標題 出芽酵母の細胞内ATP変動を制御する仕組み
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今村博臣
2. 発表標題 蛍光バイオセンサーによる生細胞内代謝物イメージング
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Imamura, Tomoki Yoshida, Hitomi Nakajima, Sena Takahashi, Akira Kakizuka
2. 発表標題 Genetically encoded fluorescent biosensor for branched-chain amino acids
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村博臣
2. 発表標題 蛍光バイオセンサーで解き明かす細胞内代謝
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米満茜、垣塚彰、今村博臣
2. 発表標題 蛍光変化のダイナミックレンジを増大させたFRET型バイオセンサーの開発
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第45回討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Imamura
2. 発表標題 Imaging of metabolites inside living cells
3. 学会等名 Academia Sinica - Kyoto University Bilateral Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Imamura
2. 発表標題 Genetically encoded fluorescent biosensors for understanding of metabolism at single cell level
3. 学会等名 2nd WPI-NanoLSI Special Seminar (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
---------	---------------------------	-----------------------	----