総説

細胞内ATPの分布とダイナミクス, その制御

今村博臣 京都大学白眉センター

安東友美 国立感染症研究所ウイルス第二部

藤川 誠 東京理科大学薬学部

ATP is indispensable for all living organisms. Despite its importance, however, distribution and dynamics of ATP level inside living cells still remained unclear. We have developed FRET-based ATP biosensors, “ATeam” and “GO-ATeam”, which enabled us to visualize intracellular ATP level. Using these biosensors, we have successfully evaluated the effect of IF1 protein and Ca^{2+} on regulation of ATP level. Also, we found that replication of hepatitis C virus genome resulted in the declination of cytosolic ATP level of host cells and the formation of putative virus replication sites with high ATP levels.

ATP / calcium / mitochondria / F_0F_1 / IF1 / HCV

1. ATP はまだ理解し尽くされていない

アデノシン三リン酸 (ATP) はよく知られている通り, 細胞の主要なエネルギー通貨あるいは RNA の直接の前駆体として, 生命にとって非常に重要な役割を担っている. ATP が枯渇するというのは細胞にとって大問題であるから, できるだけ細胞内 ATP 濃度が一定に保たれるようにシステムレベルで設計されている, とされている. ところが, 一部の細胞では ATP は細胞内外でシグナルとしても機能していると考えられており, ATP 濃度が一定であるという考えとは反するように見える. ATP 濃度は常に一定なのか, それとも変化するものなのか? 細胞内で局所的に濃度の違う場所は存在するのか? ウイルスの感染などのストレス時はいったいどうなるのか? これまでは生細胞内 ATP 濃度を測定する適切な方法が無かったために, これらの問いにはほとんど答えられなかった. 我々はこうした問題を解決するため, フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した蛍光 ATP バイオセンサーを作るところから研究を開始した.

2. ATeam の開発¹⁾

多くの生物において ADP とリン酸から ATP を合成する反応の大部分は F_0F_1 -ATP 合成酵素 (以降 F_0F_1) に

よって担われており, 哺乳類では, 実に 90% 以上に達する. F_0F_1 は多数のサブユニットから構成されているが, バクテリアの場合, その中に ϵ という分子量 14,000 程度のサブユニットがある. 10 年ほど前, 単離した好熱性細菌 *Bacillus* sp. PS3 の ϵ に ATP 結合活性があることが山田らによって発見された. さらにその後の研究で, ATP の結合と解離によって ϵ の C 末端 α ヘリックスが伸び縮みし, それによって F_0F_1 の活性を調節しているらしいこともわかってきた²⁾.

我々は, ATP 依存的な ϵ の C 末端 α ヘリックスの伸び縮みをバイオセンサーに利用できるのではないかと考えた. まず, ϵ の N 末端側に CFP, C 末端側に YFP を融合させた人工蛋白質を作製した. これまでの構造生物学的知見から, ATP 結合状態と非結合状態では構築した融合蛋白質の FRET 効率が大きく変化するものと予想された. 当初はなかなか思うような FRET 効率の変化は見られなかったが, 蛍光蛋白質の種類やリンカーの長さなどを検討した結果, 幸いにして ATP によって大きく FRET が変化するバイオセンサーを得ることができた. このバイオセンサーは ATP に対して非常に特異性が高く, ADP や GTP, さらには dATP にはほとんど反応しない. また, キネティクスの解析から, 10 秒程度のダイナミクスであれば追従可能であることもわかった. 我々はこのセンサーを「ATeam」と命名した (図 1).

Distribution and Dynamics of Intracellular ATP Level, and their Regulation

Hiromi IMAMURA¹, Tomomi ANDO² and Makoto FUJIKAWA³¹The Hakubi Center for Advanced Research, Kyoto University²Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

※図 2, 図 4 は, 電子ジャーナル (<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています.

図 1
蛍光 ATP バイオセンサー “ATeam” (a) ϵ への ATP の結合と解離によって FRET 効率が変化する。 (b) ATP 結合による ATeam のスペクトル変化。

ATeam をコードする cDNA を導入した動物細胞は、細胞質に ATeam を発現した。ATP 濃度の評価は、蛍光顕微鏡を使ってこの細胞の FRET 画像 (CFP 励起・YFP 蛍光) と CFP 画像 (CFP 励起・CFP 蛍光) を取得し、コンピューターで FRET/CFP 比 (FRET シグナル) を計算することにより行った。FRET シグナルが高いほど ATP 濃度が高いことになる。ATeam を発現する HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来) に ATP 合成阻害薬を加えると FRET シグナルはすみやかに低下したことから、ATeam は細胞内でも機能することが確かめられた。一方、薬剤処理を行わない場合は FRET シグナルはほとんど変動せず、定常状態では細胞内 ATP 濃度は安定に保たれていることがわかった。次に、ATeam にシグナル配列を付加することでミトコンドリアや核の内部へ局在させて ATP レベルを調べたところ、ミトコンドリア内部の ATP 濃度は、細胞質や核に比べて有意に低いことが明らかとなった。ミトコンドリアは ATP 生産工場であるが、人間社会の工場と同様、作った ATP はすぐ出荷して在庫をためないようになっているようだ。

3. IF1 による細胞内 ATP 恒常性維持³⁾

ミトコンドリアでの F_0F_1 による ATP 合成は、電子伝達系と共役している。そのために、電子伝達系を担う呼吸鎖の基質や電子伝達系における電子の最終受容体である酸素の供給が絶たれると緊急事態となる。さらに悪いことに、*in vitro* において、ミトコンドリア膜電位が消失して ATP 合成能を失った F_0F_1 は普段とは逆の ATP 加水分解反応を触媒することが知られている。この加水分解反応はプロトンをマトリックスから膜間腔側にくみ上げる反応と共役しているため、ミトコンドリア膜電位の維持という役割を果たしていると考えられるが、 F_0F_1 による無秩序な ATP 加水分解は生命にとって看過できない状態であることに変わりない。

1963 年に、IF1 (inhibitor of F_1) が F_1 (F_0F_1 の膜外部分。ATP の合成・分解を担う) による ATP 加水分解

を阻害する蛋白質として同定された⁴⁾。これまで、IF1 の F_0F_1 に対する作用機序については多くの知見が得られている。しかし、これらはすべて *in vitro* 実験から得られたものであり、実際の細胞内で IF1 が F_0F_1 に対してどのように作用し、どのような生理的機能を担っているのかについてはほとんど研究がされてこなかった。このような状況の背景には細胞内 ATP レベルを計測するための技術的な制約があった。実際に、2007 年、生細胞内の IF1 の役割に関する報告がはじめてなされたが、細胞内マグネシウム濃度を測定する蛍光プローブを用いて間接的に細胞内 ATP 濃度を見積もっていた⁵⁾。

そこで我々のグループは、ATeam 安定発現 HeLa 細胞を作製し、RNAi によるノックダウンを利用して IF1 の生理的機能を解析することにした。はじめに CCCP という脱共役剤を用いてミトコンドリア膜電位を消失させて細胞内 ATP 動態を解析した (図 2a)。すると、コントロール細胞では見かけ上細胞内 ATP レベルはほぼ一定であったが、IF1 ノックダウン (IF1-KD) 細胞では CCCP 処理後数分間に細胞内 ATP が低下し、その直後に、基底状態へと回復した。 F_0F_1 阻害薬のオリゴマイシン存在下で CCCP を添加すると、IF1-KD 細胞における一過的な ATP レベルの低下が回避されるので、CCCP 単独処理による ATP 減少は F_0F_1 による ATP 加水分解が原因と考えられる (図 2b)。次に、CCCP に加えて 2-deoxyglucose (2-DG: 解糖系の阻害剤) を添加したところ ATP レベルが回復することなく低下し続けたことから (図 2c)、図 2a の IF1-KD 細胞で見られる

図 2
ATP 合成系を阻害した時の IF1 ノックダウン (IF1-KD) 細胞およびそのベクターコントロール (cont.) 細胞の ATP 動態の解析。Time = 0 において、CCCP 単独 (a)、CCCP + oligomycin (b)、CCCP + 2DG (c) を加えて、おのおのの細胞内 ATP レベルを FRET シグナルとして示した。左側は代表的な細胞のレンゾイメージで、右側は 10-20 細胞の FRET 効率の平均値をプロットした (赤色: cont., 黄色: IF1-KD)。

ATP レベルの回復はミトコンドリアでの ATP 供給が滞った後に解糖系が亢進することで補完されたと考えられる。また、このとき (図 2c), コントロール細胞に比べて IF1-KD 細胞において ATP 分解速度が速いことから, IF1 が F_0F_1 による ATP 加水分解を阻害することで細胞内 ATP レベルの低下を遅延させていると見られる。

ATP のほとんどは細胞質内に存在するため, 今回は細胞質 ATP 濃度に対する IF1 の影響に絞って研究を行った。しかし F_0F_1 および IF1 はミトコンドリア内に存在するので, 今後はミトコンドリア内 ATP 動態にも着目した研究が必要だろう。

4. Ca^{2+} によるミトコンドリア ATP 合成の制御⁶⁾

実はミトコンドリアには, 細胞質に高濃度の Ca^{2+} が流入した際に一時的に Ca^{2+} を吸収するという機能がある。ミトコンドリアのエネルギー代謝に関わるいくつかの酵素が生理的な濃度の Ca^{2+} によって活性化されることから, ミトコンドリアに流入した Ca^{2+} が ATP 産生を制御している可能性が考えられてきた。我々は, レシオメトリック計測可能な既存の Ca^{2+} センサーを ATeam と一緒に細胞に導入してイメージングすることで, 同じ細胞で Ca^{2+} シグナルと ATP 産生を同時に計測できないかと考えた。ところが, ATeam と既存の Ca^{2+} センサーを併用することは, 蛍光のクロストークなどの制約があり困難であった。そこで, 既存の Ca^{2+} センサーと併用が可能となるように, ATeam の蛍光蛋白質を CFP-YFP の組み合わせから別の組み合わせに変えることを検討し, 最終的に GFP (cp173-mEGFP) をドナー, OFP (mKOK) をアクセプターとする「GO-ATeam」を開発した。ATeam と比較して, GO-ATeam の励起・発光スペクトルは長波長側にシフトしており, 紫外光で励起される Ca^{2+} センサー fura-2 と蛍光のクロストークがほとんど見られなかった。

GO-ATeam をミトコンドリアに発現している HeLa 細胞に fura-2 をロードしてイメージングすることで, 実際にミトコンドリア ATP 濃度と細胞質 Ca^{2+} 濃度の変化を単一細胞レベルで計測することにも成功した。細胞をヒスタミン刺激するとまず Ca^{2+} 濃度が非常に速やかに上昇し, それに続いてミトコンドリア ATP 濃度の上昇が起こった (図 3)。さらに, Ca^{2+} 濃度の上昇幅と ATP 濃度の上昇幅には正の相関が見られた。どちらの結果も, Ca^{2+} がミトコンドリアでの ATP 産生を促進していることを強く支持するものである。一方, 細胞質 Ca^{2+} 濃度はヒスタミン刺激後 10 分くらいからスパイク状の振動を始めるものの, ミトコンドリア ATP 濃度のダイナミクスには Ca^{2+} 振動との相関がまったく見られなかった。この理由はまだはっきりとはわからない。

図 3 GO-ATeam と fura-2 を利用した, ミトコンドリア ATP と細胞質 Ca^{2+} の同時計測。T = 0 において 100 μ M ヒスタミンを添加して HeLa 細胞を刺激した。

が, いったん Ca^{2+} で活性化されたミトコンドリアは, その後の Ca^{2+} の短時間の増減にあまり影響されずにしばらく活性化状態を維持する仕組みがあるのだろう。

5.

C 型肝炎ウイルスによる 宿主細胞内 ATP 分布の攪乱⁷⁾

ウイルスが宿主細胞内で増殖する際に, ATP が重要であることが複数のウイルスで報告されている。中でも肝炎, 肝硬変, 肝細胞癌の主要な原因ウイルスである C 型肝炎ウイルス (HCV) については, ウイルス蛋白質の酵素活性に ATP の加水分解エネルギーが必要であることや, ATP 濃度が亢進するとウイルスの複製効率が向上することが報告されている⁸⁾。にもかかわらずメタボローム解析の結果では HCV 感染細胞の ATP 濃度は有意に低下していた。ATP 濃度が低下する一方で, HCV の効率的な複製はどのように維持されるのだろうか? HCV は複数のウイルス蛋白質を内包した小胞体膜からなる「複製複合体」を形成し, 核酸分解酵素の攻撃から守られた環境下で遺伝子複製を行う (図 4a)。HCV は, 効率的な複製のために複製複合体内の ATP 濃度を亢進している, という仮説に至り研究を行った。

はじめに, ATeam を用いて, HCV が複製している細胞と複製していない親細胞の ATP レベルを比較した。その結果, 複製細胞の細胞質の ATP レベルは有意に低下しており, メタボローム解析の結果と一致した。続いて, 複製複合体内の ATP レベルの解析を試みた。外来蛋白質は複製複合体内へ移行しない。そこで, 複製複合体を構成するウイルス蛋白質の 1 つ NS5A に ATeam を融合させた HCV 複製系 (HCV/ATeam) を構築した (図 4a)。細胞内で HCV/ATeam が複製すると, 発現した NS5A-ATeam は複製複合体内に局在して顆粒状のパターンを示す (図 4b 上)。一部は細胞質にも局

在する。局在パターンから複製複合体を識別し、その場における FRET シグナルを定量した。コントロールとして NS5A-ATeam の単独発現系を用いた（細胞質にのみ局在する）。HCV/ATeam 複製細胞で細胞質に局在する NS5A-ATeam の FRET シグナルは、NS5A-ATeam 単独発現細胞と比較して低下しており、上述の結果と一致した。一方、顆粒状の局在部位の FRET シグナルは大幅に亢進していた（図 4b 中下）。その ATP 濃度は、細胞質ではおよそ 2 mM から 1 mM に低下する一方、複製複合体ではおよそ 5 mM と大幅に亢進していた。阻害剤を用いて複製を阻害したところ、短時間の阻害では複製複合体・細胞質ともに ATP 濃度が亢進したが、長時間阻害したところ、どちらも NS5A-ATeam 単独発現細胞と同等レベルまで低下した。

以上の結果から、次のようなモデルを考えている。HCV 複製細胞では何らかのメカニズムにより細胞質の ATP が複製複合体に流入し、細胞質の ATP 濃度が低下する。その結果、平衡が崩れ ATP 産生が亢進する。短時間の阻害では ATP の複製複合体への流入と ATP 産生の亢進が維持されているため、複製複合体・細胞質ともに ATP 濃度が亢進したと考えられる。複製複合体へ ATP が流入するメカニズムについて、現在解析を進めている。これまでに、活性化状態にあるミトコンドリアが高い ATP 濃度を示す複製複合体に近接していることが確認されており、ミトコンドリアからの直接的な ATP の流入も考えられる。HCV 複製細胞においてミトコンドリアの形態異常が報告されており、ミトコンドリアと HCV 複製複合体の相互作用は非常に興味深い。

図 4 (a) HCV/ATeam 複製細胞における ATP 分布の概念図。NS5A-ATeam を含む複数のウイルス蛋白質から複製複合体が形成され、内部の ATP 濃度が亢進する。(b) HCV/ATeam 複製細胞の FRET 観察。複製複合体を示す顆粒状の発現部位で強い FRET が観察される。スケールバー、20 μ m。

6.

おわりに

筆者の 1 人が子供の頃楽しみにしていたテレビ番組に「特攻野郎 A チーム」というアメリカのアクションコメディがあった。ベトナム帰りの個性的な 4 人組「A チーム」が、不可能と思えるようなミッションを破天荒な方法で次々に成功させていくのが痛快であった。本稿で紹介した「ATeam」は、ベトナム帰りではないが、開発にはベトナムから来た留学生が関わってくれた。代謝物のバイオセンサーはまだまだ少ないので、個性的といえば個性的である。次々とうまくいくどうかはわからないが、ATP の新しい計測法をもたらしたこのバイオセンサーが今後もさまざまなミッションを成功させてくれると期待している。

最後に、野地博行博士、鈴木哲朗博士、吉田賢右博士、中野雅裕博士、永井健治博士をはじめ本研究に関わった共同研究者、そして常に有用なアドバイスや温かい励ましをくれた同僚に深く感謝致します。

文 献

- 1) Imamura, H. *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 15651-15656.
- 2) 山田康之 (2009) *生化学* **81**, 943-951.
- 3) Fujikawa, M. *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 18781-18787.
- 4) Pullman, M. E., Monroy, G. C. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3762-3769.
- 5) Campanella, M. *et al.* (2008) *Cell Metab.* **8**, 13-25.
- 6) Nakano, M. *et al.* (2011) *ACS Chem. Biol.* **6**, 709-715.
- 7) Ando, T. *et al.* (2012) *PLoS Pathog.* **8**, e1002561.
- 8) Moradpour, D. *et al.* (2007) *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 453-463.

今村博臣

今村博臣 (いまむら ひろみ)

京都大学白眉センター特定准教授
2002 年東京大学農学生命科学研究科応用生命工学専攻博士過程修了, 博士 (農学)
研究内容: 細胞内代謝のイメージング
連絡先: 〒 606-8501 京都市左京区吉田近衛町
E-mail: imamura@lif.kyoto-u.ac.jp

URL: www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/imamura/index.html

安東友美

安東友美 (あんどう ともみ)

国立感染症研究所ウイルス第二部協力研究員
2012 年東京大学新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻博士過程修了, 博士 (生命科学)
研究内容: C 型肝炎ウイルスの病原性および持続感染機構の解析
連絡先: 〒 162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
E-mail: tando@nih.go.jp

藤川 誠

藤川 誠 (ふじかわ まこと)

東京理科大学薬学部助教
2007 年東京工業大学生命理工学研究科生命情報専攻博士後期課程修了, 08 年博士 (理学)
研究内容: ATP 合成と ROS 抑制のファインチューニング
連絡先: 〒 278-8510 千葉県野田市山崎 2641
E-mail: mfujikaw@rs.tus.ac.jp