トピックス

蛍光ATPプローブによるミトコンドリア呼吸活性の評価

小柴琢己 九州大学大学院理学研究院
今村博臣 京都大学大学院生命科学研究科

1. はじめに

ミトコンドリアは、真核細胞内に広く存在する細胞小器官の一つであり、これまでに代謝や細胞死（アポトーシス）などにまつわる多くの研究が行われてきた。一般に、ミトコンドリアは細胞内におけるエネルギー産生工場とも呼ばれ、その機能発現はユニークな二重の膜構造（外膜と内膜）と核染色体とは異なる独自のゲノム（ミトコンドリア DNA: mtDNA）の存在によってもたらされる¹⁾。ヒトの mtDNA は、約 16,500 塩基対からなり、その遺伝情報はミトコンドリア呼吸活性に必須の電子伝達系タンパク質群のうちで 13 種類の構成サブユニットをコードしている。ミトコンドリアの呼吸活性に伴った酸化的リン酸化より造り出されるアデノシン三リン酸（ATP）は、生体内で消費される大部分のエネルギー源として利用されていることから、ミトコンドリアは生命機能の根幹を支えていると言える。近年、著者（今村）が中心となり開発した蛍光 ATP バイオセンサーによって生きた細胞内での ATP 動態を可視化することが可能となり、その結果、培養細胞や個体内における ATP の濃度変化を高い精度で解析することが可能になった^{2), 3)}。

2. 培養細胞内での ATP イメージング

私たちが動物細胞を用いて実験を行う際に、その培養に使用する培地はグルコースを主な炭素源とすることが一般的である。実際に、グルコースを含む培地を用いることで細胞内におけるエネルギー代謝は好気的条件下においても解糖系に依存した状態になることが知られており（好气的解糖）、癌由来の細胞などはその顕著なケースと言える⁴⁾。好气的解糖に依存した細胞では、そのエネルギー産生効率は非常に悪く、また大量のグルコースを消費してターンオーバーの速い ATP 産生を行っている。本稿では、培養細胞内におけ

るエネルギー産生とミトコンドリアの寄与について考察したい。

まず初めに筆者らは、哺乳動物細胞内におけるミトコンドリア依存による ATP 産生条件を調べる目的で、実験に用いる培地中の炭素源をグルコースとガラクトース（**ルロワール経路**を介した解糖中間体の獲得）に限定した二種類の培地を準備し、それぞれの培地下にて培養した細胞内エネルギー代謝をライブで解析した。具体的には、蛍光 ATP バイオセンサー（ATeam1.03; **図 1A**）²⁾ を恒常発現させたヒト腎臓由来培養細胞（HEK293）を、上記のグルコース及びガラクトース含有培地下で培養し、それぞれの細胞内 ATP 濃度をイメージングした。グルコース、及びガラクトース含有の条件共に、細胞内には十分量の ATP を反映した蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）が観察された⁵⁾（**図 1B**）。次に、これら培養条件下においてミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤であるロテノンを添加し、その後の FRET 変化をモニターした。その結果、グルコース含有培地においてはロテノン添加後にもかかわらず十分な ATP 濃度を示す FRET 変化が観察された一方で、ガラクトースを含む培地下ではロテノン添加に伴い劇的な ATP 濃度の減少が確認された（**図 1B**; 右の写真）。この結果は、グルコースを栄養源として培養した細胞内では、ATP 産生がミトコンドリアの呼吸活性にほとんど依存せず、ほぼ解糖系により得られた ATP 産生であったことを示している。一方で、ガラクトース培地下では、解糖系以降のミトコンドリア内における酸化的リン酸化に依存した ATP 産生が主に行われ、その後のロテノンの添加はその生理活性を阻害したことを表していたものと思われた。この結果から、ガラクトース培地下においては、細胞内のエネルギー供給が解糖系のみでは不十分で、結果として効率の良いミトコンドリアに依存した ATP 産生に転換したことが予想された。

Evaluation of Mitochondrial Respiratory Activity Using a FRET-based Indicator for Intracellular ATP

Takumi KOSHIBA¹ and Hiromi IMAMURA²

¹Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University

²Graduate School of Biostudies, Kyoto University

図 1

蛍光 ATP バイオセンサー ATeam1.03 を用いた生細胞内の ATP イメージング。(A) ATeam1.03 の概略図。分子内の ϵ サブユニットは ATP 結合モチーフであり、ATP の結合に伴い構造変化を引き起こし、その結果、CFP と YFP の距離が隣接すると FRET が生じる。(B) ATeam1.03 を恒常発現した HEK293 細胞をグルコース、及びガラクトース含有培地下で培養し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤(ロテノン)を添加した前後(−及び+)での生細胞内における ATP 濃度変化を比較した様子。右側のガラクトース培地下では、ロテノン添加に伴い急激な ATP 濃度の低下が観察された。写真は文献 5 より転載。

3. ミトコンドリア DNA 欠損細胞 (ρ_0) 内での ATP イメージング

ミトコンドリア内での酸化的リン酸化による ATP 産生は、電子伝達系タンパク質群によって行われており、その一部のタンパク質は mtDNA にコードされている¹⁾。したがって、mtDNA が欠損した細胞株 (ρ_0) においては、呼吸鎖複合体は形成されずミトコンドリア依存の ATP 産生が行えない。しかしながら、 ρ_0 細胞でも高グルコース環境下で培養し、かつその際にピルビン酸とウリジンの添加により、解糖系依存によるエネルギー供給で生存可能となる⁶⁾。その事実を検証すべく、筆者らは ρ_0 細胞内での ATP イメージングも行った。

確認実験として、グルコース存在下で培養された ρ_0 細胞及びその親株 (WT) の ATeam1.03 を用いた FRET

図 2

ρ_0 細胞を用いた ATP イメージング解析。 ρ_0 細胞、及びその親株 (WT) に ATeam1.03 を一過性発現させ、炭素源の異なる培地を用いて培養した。右側の ρ_0 細胞では、ガラクトース培地下で ATP 量が枯渇している様子が観察された。写真は文献 5 を一部改変し転載。

測定より、両細胞共に ATP 濃度が高い状態に保たれていることが示された⁵⁾ (図 2; 上段の写真)。そこで、これら細胞株の培養条件をミトコンドリア依存のガラクトース培地にシフトすると、 ρ_0 細胞でのみ ATP 濃度の枯渇が観察された (図 2; 右下の写真)。この結果より、 ρ_0 細胞では予想通りに解糖系依存のエネルギー供給が行われていることが確認できた。

4. ミトコンドリア病関連変異と ATP 産生

最後に、筆者らは本法をミトコンドリア病との関連がある mtDNA 変異株 (サイブリッド) を用いて ATP のイメージング解析を行った。実験では、レーベル遺伝性視神経症 (LHON) の発症に関連する mtDNA 変異 (ND1; 呼吸鎖複合体 I の機能不全) と、ミトコンドリア脳筋症関連の変異 (COX; 呼吸鎖複合体 IV の機能不全) をそれぞれに有した二種類のサイブリッド^{7), 8)} を用いた。ND1 及び COX サイブリッド共に、呼吸鎖複合体を構成する一部のサブユニットに点変異による機能障害が生じるために正常な酸化的リン酸化が行えず、ガラクトース培地下では ATP 濃度が著しく低下している様子が確認できた (図 3; 中列の写真)。特筆すべきは、ND1 サイブリッドにおいて、ガラクトース培地中に呼吸鎖複合体 II の基質であるコハク酸を添加することで細胞内の ATP 濃度が回復した点である (ND1; +コハク酸)。この結果は、コハク酸

図3 mtDNA 変異による ATP 産生の検証実験。ミトコンドリア病関連の mtDNA 変異 (ND1 及び COX) サイブリッドとその親株 (WT) にそれぞれ ATeam1.03 を一過的に発現させ、ATP イメージングを行った様子。ガラクトース培地中にコハク酸を添加した実験では、ND1 サイブリッドにおいて ATP 量の回復が観察された (右側)。写真は文献 5 を一部改変し転載。

の添加により ND1 サイブリッドの障害を受けた呼吸鎖複合体 I をバイパスし、複合体 II 以降の機能亢進に伴う ATP 産生が行われたことを示している。事実、複合体 IV の機能不全変異体 (COX) ではコハク酸添加にもかかわらず ATP 産生能の回復は見られなかった (COX; +コハク酸)。

5. まとめ

本実験では、ミトコンドリア機能障害をもたらす様々な細胞株や薬剤を用いて ATP イメージング解析を行い、細胞内におけるミトコンドリアに依存したエネルギー代謝の動的な振る舞いを明らかにすることができた。ミトコンドリアは近年の研究から、エネルギー産生以外の更なる役割も明らかになっている^{9), 10)}。しかしながら、そのような新たな役割も間接的にはエネルギー代謝と繋がっていることは十分に予想され、このような ATP イメージング解析とのコラボレーションにより今後の更なる理解の進展が期待できる。

謝辞

本稿で紹介した ATP イメージングの解析は、九州大学大学院生・吉住拓馬氏 (学振特別研究員) により

行われた成果です。ρ₀ 細胞、及び mtDNA 変異サイブリッドは筑波大学・中田和人教授と海外研究協力者によりそれぞれ分与頂いた。長崎大学・稲岡健ダニエル博士には御多忙の中、本稿の推敲を快く御引き受け頂き、貴重なコメントを頂戴しました。最後に、本研究は科学研究費補助金 (研究課題番号; JP26291032, JP17H03667)、ライフサイエンス振興財団、ノバルティス科学振興財団、及び株式会社カネカの御援助により行われており、ここに併せて感謝申し上げます。

文献

- 1) Attardi, G., Schatz, G. (1988) Annu. Rev. Cell Biol. **4**, 289-333. DOI: 10.1146/annurev.cb.04.110188.001445.
- 2) Imamura, H. *et al.* (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 15651-15656. DOI: 10.1073/pnas.0904764106.
- 3) Tsuyama, T. *et al.* (2013) Anal. Chem. **85**, 7889-7896. DOI: 10.1021/ac4015325.
- 4) Rossignol, R. *et al.* (2004) Cancer Res. **64**, 985-993. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-110.
- 5) Yoshizumi, T. *et al.* (2017) Sci. Rep. **7**, 5379. DOI: 10.1038/s41598-017-05808-w.
- 6) King, M. P., Attardi, G. (1996) Methods Enzymol. **264**, 304-313. DOI: 10.1016/S0076-6879(96)64029-4.
- 7) Baracca, A. *et al.* (2005) Arch. Neurol. **62**, 730-736. DOI: 10.1001/archneur.62.5.730.
- 8) D'Aurelio, M. *et al.* (2006) Hum. Mol. Genet. **15**, 2157-2169. DOI: 10.1093/hmg/ddl141.
- 9) McBride, H. M. *et al.* (2006) Curr. Biol. **16**, R551-R560. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.054.
- 10) Koshiba, T. (2013) Biochim. Biophys. Acta **1833**, 225-232. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.005.

小柴琢己

小柴琢己 (こしば たくみ)

九州大学大学院理学研究院准教授
2001 年北海道大学大学院理学研究科修士 (理学)。00-02 年日本学術振興会特別研究員、01-05 年カリフォルニア工科大学博士研究員、05 年九州大学大学院理学研究院助教授、07 年より現職。12 年文部科学大臣表彰若手科学者賞、第 14 回花王研究奨励賞、及び日本生化学会奨励賞を受賞。研究内容: ミトコンドリア・ダイナミクスとその生理機能解析
連絡先: 〒819-0395 福岡市西区元岡 744
E-mail: koshiba.takumi.688@m.kyushu-u.ac.jp
URL: <http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~koshiba/index.html>

今村博臣

今村博臣 (いまむら ひろみ)

京都大学大学院生命科学研究科准教授
2002 年東京大学大学院農学生命科学研究科修士 (理学)。02-06 年 JST ERATO 吉田 ATP システムプロジェクト研究員、06-07 年日本学術振興会特別研究員、07-11 年 JST さきがけ研究者、11-15 年京都大学白眉センター特定准教授、15 年より現職。07 年日本生物物理学会若手奨励賞、16 年長瀬研究振興賞を受賞。研究内容: 細胞内代謝をイメージングする蛍光バイオセンサーの開発