マウス運動時における ATP 代謝動態の可視化

山本 正道

Visualization of ATP dynamics during mouse exercise

Masamichi Yamamoto

京都大学大学院医学研究科腎臓内科, 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54 (Department of Nephrology, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin-Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

Received: May 14, 2019 / Accepted: June 26, 2019

Abstract Muscle contraction requires energy. However, the dynamics of adenosine triphosphate (ATP) in the skeletal muscle contraction in vivo is unknown. Therefore, we tried to visualize ATP dynamics in mice. By performing various gene modifications using *Goateam* reported as FRET-type fluorescent protein that senses ATP, we succeeded in creating a mouse that can visualize ATP level in the cytoplasm. By resting the skeletal muscle of this mouse from contraction exercise, it succeeded in capturing in vivo the decrease in the amount of ATP by exercise and the recovery of the amount of ATP by rest. This mouse can be used to evaluate muscle movement in vivo by ATP dynamics.

Jpn J Phys Fitness Sports Med, 68(4): 245-249 (2019)

Keywords : ATP, dynamics, intravital, muscle contraction, visualization

緒言

骨格筋運動とATP 筋肉の収縮運動は、ミクロレベルではアクチン-ミオシンの滑り運動により引き起こされる。この力学的反応の前には①活動電位によるチャネルの開閉、②カルシウム流入による筋小胞体からのカルシウム放出、③カルシウムとトロポニン-トロポミオシン複合体の形成、④アクチンのミオシン結合部位が露出、⑤ATPの加水分解によるエネルギーを利用したミオシン頭部の屈曲運動の5つの連続した化学的反応が起こる。つまり、ATPの加水分解は力学的反応の直前に位置する化学的反応である¹⁻⁴⁾。しかし、細胞レベルおよび臓器レベルでは、収縮運動時のATP動態は全く不明である。近年、MRIの発達により骨格筋内のクレアチンリン酸動態が報告され、間接的にATP動態を推測できるようになった。その結果、クレアチンリン酸は運動直後にリン酸基をADPへ受け渡し、クレアチンに変化するため低下し、休息数分後に回復してくると報告された⁵⁾。しかしながら、ATPが同様の挙動を取るのかは以前不明なままである。

方法

マウスの構築と飼育 すべての実験手順は群馬大学大学院医学研究科、京都大学大学院医学研究科の委員会によって承認された実験における動物の世話および使用の

ためのガイドラインに従って行われている。

ATP感受性のFRET型蛍光タンパク質*Goateam*⁶⁾が発見する構築を大阪大学免疫学フロンティア研究センターの星野および改正によって提供された*R26-CAG*ベクターや*CTV*ベクター (Addgene プラスミド #11739) を用いて行った。上記構築をFuGeneHDやエレクトロポレーション法を用いてES細胞⁷⁾に導入した。ESクローンは、サザンブロット法により確認した。プローブは星野および改正によって提供された。また、PCR、およびqPCRによっても確認した。PCRのプライマーにはP1 5'-AGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCおよびP2 5'-GTGACACTAAGTCAAACGCGAAAを用いた。*Goateam*挿入遺伝子は342-bp断片として増幅された。qPCR反応は、*Kusabira Orange*用のプライマー5'-AGAGATGACACTACGCGTCACAA、5'-GTGACACTAAGTCAAACGCGAAA、およびTaqManプローブ5'-CCGAGGGCGGGCCAATGCを用いて行った。プライマー5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAGおよび5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCAAGAT、ならびにTaqManプローブ5'-TGGTGAAGCAGGCATCTGAGGGCを用いて内部対照配列*Gapdh*を増幅した。

上記で選択されたクローンをICR×ICRマウスの桑実胚胚 (SLC, 静岡, 日本) と凝集させ、キメラを作製した。各ESクローン由来の雄性キメラをC57BL/6J雌と交配

させ、ヘテロ接合F1子孫 (C57BL/6J x 129バックグラウンド) を得た。

骨格筋運動の観察

臓器の生体内イメージング

マウスに麻酔 (イソフルラン, 人工呼吸器を使って1.5%~2.0%) をかけた後に、脚の毛を剃り、脚から皮膚を剥ぎ取った。蛍光を検出するために、脚部を特注の拘束具に固定し、ステージヒーター (東海ヒット) を使用して温めた。露出した前脛骨筋 (TA) をPLAN APO 1.0 × 対物レンズ (Leica) を備えた立体顕微鏡 (M165FC; Leica) を用いて観察した。筋収縮は坐骨神経の電気刺激 (20 Hz) によって誘発した。

画像解析 *Kusabira Orange* と EGFP 蛍光の画像は MetaMorph ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて作成した。タイムラプスシリーズの XY ドリフトを排除するために、ImageJ の StackReg プラグインを使用した。EGFP と *Kusabira Orange* の蛍光強度を測定するために、MetaMorph と ImageJ を使用した。

結 果

マウス生体内での ATP 動態の可視化 骨格筋運動時の ATP 動態を調べるには、ATP 量を感じ取る FRET 型タンパク質の Ateam を利用する事が最有力候補であった (Fig. 1)⁸⁾。そこで、Ateam でも pH により安定で、原理的に組織深部まで計測する事が可能な新規 ATP 感受センサー *Goateam* を用いて検討する事にした。

培養細胞株を用いた研究から、FRET 型タンパク質は十分な輝度値が得られなければ FRET 現象を捉える事ができない事が報告されている。そこで、*Goateam* の十分な輝度値を得るため、マウス生体内で *Goateam* を過剰発現させる戦略を取る事にした。プロモーター *CMV*, *EF1α*, *CAG*, *PGK*, *MCI*, β -actin, または *UbC* の制御下に *Goateam* を結合させて、*Sv40 polyA* をその直下に結合させたプラスミドを FuGENE HD を用いて ES 細胞へトランスフェクションして、合計で 105 クローンの安定発現株を得た。各 ES 細胞クローンから RNA を抽出し、cDNA を合成した後に内在の *Gapdh* と挿入された *Goateam* プロンプの発現量を TaqMan PCR 法を用いて検討を行った。(分子) *Goateam* プロンプ/(分母) *Gapdh* を行う事で細胞数の補正を行った上での各クローンで ATP プロンプの発現量を比較した。その結果、ES 細胞内で発現量が 714 倍差のクローンを得られていることが確認できた (Fig. 2)。

この中から、発現量が多いもの 6 クローン (714 倍, 151 倍, 80 倍, 77 倍, 56 倍, 45 倍) と発現量の中くらいのもの 12 クローン (32 倍, 26 倍, 25 倍, 24 倍, 20 倍, 17 倍, 14 倍,

13 倍, 12 倍, 12 倍, 11 倍, 11 倍), 発現量が少ないもの 8 クローン (5 倍, 3 倍, 3 倍, 2 倍, 2 倍, 1 倍, 1 倍, 1 倍) の合計 25 クローンからアグリゲーション法にてマウスを作成した。

50%~100% キメリズムのマウスが得られ、F1 が得られた 20 クローンは、尾から得たゲノムを用いて PCR 法で ATP センサーの有無を確認した。5 クローン (714 倍, 151 倍, 80 倍, 77 倍, 45 倍) は F1 を得る事ができなかった。F1 が得られた 20 クローンに対して、肝臓での ATP センサーによる蛍光を 2 光子顕微鏡にて調べたが、ほとんど蛍光は得られなかった。また、肝臓に直接 ATP 合成を阻害する薬剤 (2-deoxy glucose と OlygomycinA) を添加したが、ATP 量の低下を蛍光比として捉える事ができなかった。

これより、発現量が多いと個体として致死または遺伝子のサイレンシングが起こる可能性が推測された。また、発現量が少ないと蛍光や ATP 量変化による蛍光変化を捉える事ができないと推測された。

そこで、導入する遺伝子領域・コピー数・プロモーターを制御する事にした。導入する領域はサイレンシングが起こりにくい領域として知られるマウス *Rosa26* 領域を選択した。コピー数は 1 コピーから検討し、プロモーターは前述 7 種類に加えてマウス *Rosa26* の内在性プロモーターも検討した。その結果、*CAG* プロモーター制御下で 1 コピー導入したマウスで *Goateam* の十分な輝度値を得ることに成功した。これより、細胞質内で *Goateam* が発現する事で細胞質内の ATP 量を計測する事ができるマウス個体が作出できた。

骨格筋運動時の ATP 動態 次に、骨格筋運動時の ATP 動態を計測できるかを検討した。蛍光顕微鏡下で骨格筋運動を観察するため、マウスにイソフルラン麻酔を施す事で顕微鏡下に固定し、坐骨神経に直接電気刺激した時に収縮運動が起こる前頸骨筋を高速で撮影した。その結果、電気刺激による筋肉の収縮運動と共に前頸骨筋の ATP 量低下が観察された (Fig. 3)。また、電気刺激中 (30 秒) は前頸骨筋の ATP 量低下が持続した。更に、電気刺激を終えた後には前頸骨筋の ATP 量が回復傾向を示し、約 3 分後には収縮運動前と同様まで回復する事が捉えられた (Fig. 3)。この結果は、骨格筋細胞質内に単独で存在する ATP が骨格筋の収縮運動により消費された事を示唆している。また、骨格筋収縮運動の停止により、骨格筋細胞質内に単独で存在する ATP は回復してくる事を示唆している。

考 察

骨格筋運動にはエネルギーが必要で、アクチン-ミオシンの滑り運動時の ATP 加水分解反応にともなうミオ

Fig. 1 Schematic drawing of Goateam probe
Variants of GFP (cp173-mEGFP) and OFP (mKO κ) were connected by the ϵ subunit of *Bacillus subtilis* F_0F_1 -ATP synthase. When ATP is free (left), ϵ subunit is extended, then separates the 2 fluorescent proteins, resulting in low FRET efficiency. When ATP is binding (right), ϵ subunit breaks, then brings the 2 fluorescent proteins closer together, resulting in increasing FRET efficiency.

Fig. 2 Ateam expression level in ES cell clones
A bar graph showing the expression level of Ateam in 105 ES cell clones (horizontal axis) compared with # 54 clone.

シン動態はこれまで非常に良く調べられ推測されてきていた。今回、世界で初めてマウス個体内の骨格筋運動時におけるATP動態が明らかとなった。

筋収縮時における白筋と赤筋のATP動態 骨格筋は収縮速度の遅いI型線維と、収縮速度が早く収縮力の強い

II型線維に大別できる。更にII型は有酸素的能力の高いIIA型線維と有酸素的解糖能力の低いIIB型線維に分けられる。I型線維とIIA型線維ではミトコンドリア密度と活性が高い。一方、IIB型線維ではミトコンドリア密度と活性が低く、酸素非依存的な解糖系が中心に働いている。しかし、各細胞種の実際のATP動態は不明である。

Fig. 3 ATP Dynamics in ATP Visualization Mice' Muscles

Intravital imaging of FRET/GFP ratios of the tibialis anterior muscle subjected to stimulation (20Hz) of the sciatic nerve (A-E). The anterior tibialis muscle was observed for 10 seconds (A) and then stimulated at 20 Hz for 30 seconds (B). Then, after stopping stimulation, images were recorded for 270 seconds (C: 120 seconds later, D: 270 seconds later). Graph E shows change of the FRET / GFP ratio of anterior tibialis muscle before and after electrical stimulation.

今回のATP可視化マウスは細胞レベルでのATP動態を生体内で調べる事ができる。また、各細胞種はミトコンドリア密度の違いから含有するNADH量が異なるため、SHGにより非侵襲的に区別する事が可能である⁹⁾。この技術を用いれば、マウス個体内で収縮する各骨格筋細胞種の機能を様々な負荷強度と時間軸で生体内エネルギーの側面から詳細に調べる事ができるようになる。

高強度運動中の筋疲労へのATP量低下の役割 全身運動中の筋疲労には細胞のATP供給が寄与している可能性が示唆されている。具体的には、ミオシンATPase機能の障害の原因としてATP量が低下し、ミオシンに即時結合するATPが少なくなる事による効率の低下が示されている¹⁰⁾。また、SERCA機能の障害としては、筋肉の弛緩を遅らせる事が示唆されている。更に筋細胞膜の Na^+/K^+ ATPaseポンプ機能の障害として、線維の興奮性および機能を変化させ、筋疲労を助長する可能性がある。これまで私達の研究で長時間の筋収縮運動によりATP量回復能の低下が観察できてきている。また、神経細胞内のATP量が Na^+/K^+ ATPaseポンプ活性を調節している結果が得られている。これより、骨格筋でも同様の機能を担っている可能性があり、筋疲労助長に関与していると推測される。従って、ATP可視化マウスはサプリメントや食品成分による疲労回復効果を検証する新しいツールになる可能性がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、群馬大学の和泉孝志先生、京都大学の柳田素子先生および研究室の方々、京都大学の今村博臣先生、Nestle Institute of Health Sciencesの坂本啓先生、名古屋工業大学の小笠原理紀先生に多大な協力をして頂きました。また、新学術領域「細胞コミュニティー」と科学技術振興機構さがけに研究費をサポートして頂きました。この場をお借りして感謝申し上げます。

利益相反自己申告：

本研究において、著者に利益相反はない。

引用文献

- 1) Yanagida T, Iwaki M, Ishii Y. Single molecule measurements and molecular motors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 2123-2134, 2008.
- 2) Spudich JA, Sivaramakrishnan S. Myosin VI: an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 128-137, 2010.
- 3) Sweeney HL, Houdusse A. Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* 141: 573-582, 2010.
- 4) Lymn RW, Taylor EW. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10: 4617-4624, 1971.
- 5) Haris M, Singh A, Cai K, Kogan F, McGarvey J, Debrosse C, Zsido GA, Witschey WR, Koomalsingh K, Pilla JJ, Chirinos JA, Ferrari VA, Gorman JH, Hariharan H, Gorman RC, Reddy R. A technique for in vivo mapping of myocardial creatine kinase

- metabolism. *Nat Med* 20: 209–214, 2014.
- 6) Nakano M, Imamura H, Nagai T, Noji H. Ca^{2+} regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level. *ACS Chem Biol* 6: 709–715, 2011.
- 7) George SH, Gertsenstein M, Vintersten K, Korets-Smith E, Murphy J, Stevens ME, Haigh JJ, Nagy A. Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4455–4460, 2007.
- 8) Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15651–15656, 2009.
- 9) Konagaya Y, Terai K, Hirao Y, Takakura K, Imajo M, Kamioka Y, Sasaoka N, Kakizuka A, Sumiyama K, Asano T, Matsuda M. A Highly Sensitive FRET Biosensor for AMPK Exhibits Heterogeneous AMPK Responses among Cells and Organs. *Cell Rep* 21: 2628–2638, 2017.
- 10) Fujii T, Namba K. Structure of actomyosin rigour complex at 5.2 Å resolution and insights into the ATPase cycle mechanism. *Nat Commun* 8: 13969, 2017.