蛍光イメージングによる細胞内および細胞外ATPの可視化

1. はじめに

アデノシン三リン酸(ATP)は細胞内の主要なエネルギー通貨であり，筋肉の収縮や細胞運動，膜輸送，代謝反応，タンパク質分解といった様々な生体内の反応を進行させるために不可欠である．また，ATPは細胞内外のシグナル伝達物質としての役割も持っており，例えば細胞内ではK_{ATP}チャンネルやAMPキナーゼに作用してインスリンの分泌や細胞機能の制御を行い，細胞外ではイオンチャンネル型のP2X受容体あるいは7回膜貫通型のP2Y受容体に結合して神経伝達や細胞の走化性に関与していることが知られている（**図1**）．細胞内外のATPの振る舞いを知ることは，生命の機能を理解する上で非常に重要である．従来，細胞内のATP量を分析する方法としては，細胞破砕液に含まれるATP量をホタルのルシフェラーゼによる発光，もしくは高速液体クロマトグラフィーによって計測する方法が広く用いられてきた．しかし，細胞を破壊してしまうため，細胞内の場所や細胞ごとの濃度の違い，個々の細胞でランダムに生じるような変化を調べることはできない．それは，細胞外のATP量を分析する場合にも同様である．そのため，生きた細胞や組織・生体におけるATPの時空間的な動態の理解はほとんど進んでいなかった．ところが，ようやく最近になって，生きた細胞の内部もしくは外部のATPレベルを，蛍光イメージングを用いて高い空間分解能と時間分解能で計測する手法が開発されてきた．本稿では，筆者らが開発した蛍光ATPプローブを中心にこれらの手法と研究例を紹介する．

2. 細胞内蛍光ATPイメージング[1]

2-1. 蛍光ATPプローブ（ATeam）の開発

ATP合成酵素（F_oF_1-ATP合成酵素）は真正細菌では細胞膜，真核生物ではミトコンドリア内膜に局在する巨大タンパク質複合体であり，膜を介したプロトン駆動力を利用して，ADPとリン酸からATPを作り出している[2]．面白いことに，一部の真正細菌ではATP合成酵素のサブユニットの一つであるεサブユニットが，触媒サブユニットでないにも関わらずATPを結合することが知られている[3,4]．ATPを結合するタンパク質は一般的に，ATP以外にもADPやGTPといった類似ヌクレオチドも結合してしまうが，εサブユニットはATP以外のヌクレオチドに対する親和性が非常に低いという特徴を持っている．さらに，ATPを結合すると大きく構造変化するという性質が知られている[5,6]．筆者らはこの構造変化をFörster共鳴エネルギー移動（FRET）効率の変化という形に変換できれば，εサブユニットとATPの結合・解離平衡の変化（すなわちATP濃度の変化）を蛍光で可視化できると考えた．そこで，εサブユニットをシアン色蛍光タンパク質（CFP）

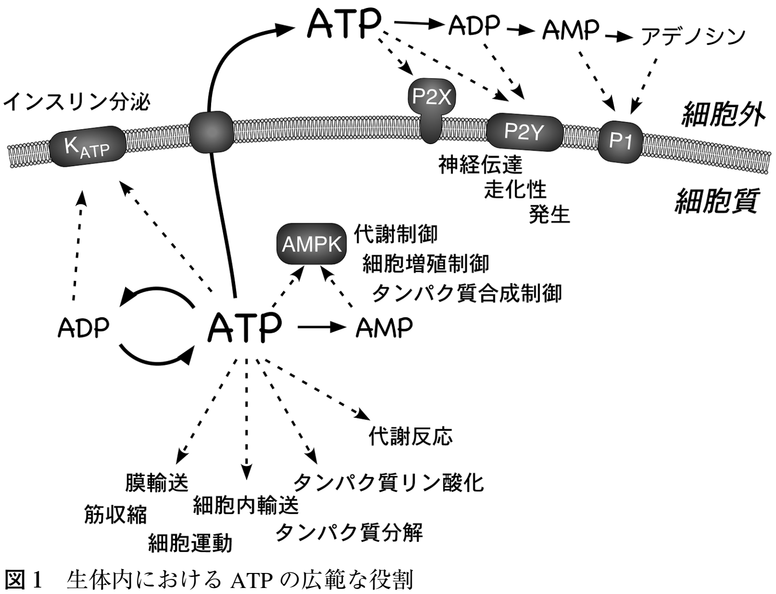

図1 生体内におけるATPの広範な役割

および黄色蛍光タンパク質（YFP）ではさんだ融合タンパク質を作成した．この融合タンパク質ではεサブユニットの構造の変化によってCFPとYFPの距離と向きが変化し，CFPからYFPへのFRET効率が変化すると予想された．蛍光タンパク質の種類やεサブユニットの生物種を変えて作製した様々な融合タンパク質の性質を蛍光分光器を用いて調べた．その結果，枯草菌由来εサブユニット，

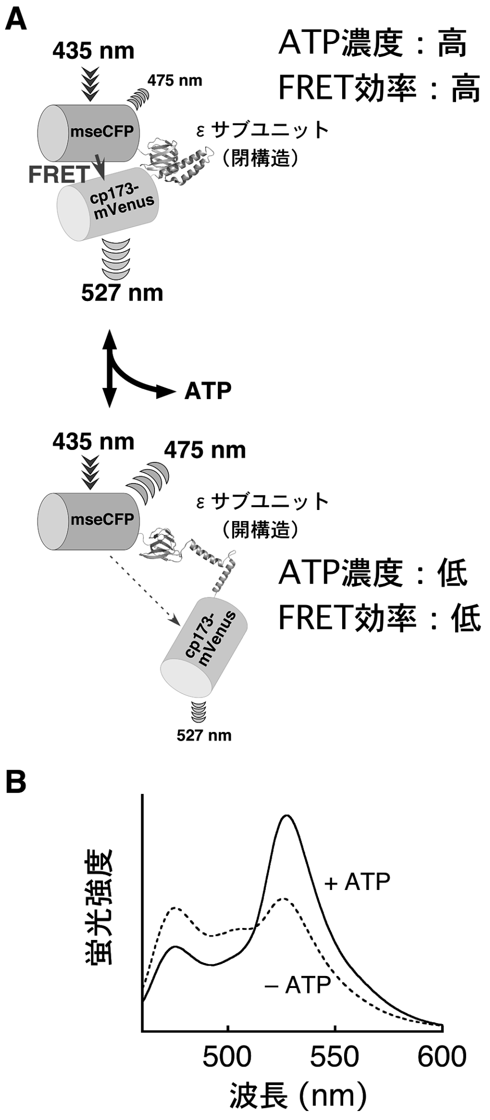

図2　蛍光ATPプローブ（ATeam）
(A)ATeamの仕組み．ATPの結合がεサブユニットの構造変化を引き起こし，FRET効率が変化する．(B)実際のATeamのスペクトル変化．ATPを加えた後（実線）ではATPを加える前（点線）と比較し，CFPの蛍光が減少し，YFPの蛍光が増加している．

CFPとして単量体化super enhanced CFP（mseCFP），YFPとして173番目のアミノ酸が先頭になるように円順列変異を導入した単量体化Venus（cp173-mVenus）を用いたときに，ATP濃度変化に対応したFRET効率の大きな変化が観察された（**図2**）．ATP濃度が高い時にはFRET効率が上昇してYFP/CFP比は高くなり，逆にATP濃度が低ければFRET効率が下がりYFP/CFP比は低くなった．筆者らはこのプローブをATeam（adenosine 5′-triphosphate indicator based on epsilon subunit for analytical measurements）と名付けた．ATeamはATPに対する解離定数が3.3 mMであり，これまでに報告されている細胞内ATP濃度の範囲に適していると考えられた．しかも，少なくとも10 mM以下のdATP，ADP，GTPには反応せず，ATPを選択的に検出できることも確認された．pH 7以上ではpHの変化に対して安定であることから，通常の細胞質のpH（約7.3〜7.5）やミトコンドリア内のpH（8.0〜8.5）の範囲では少々のpHの変化によってはシグナルが影響を受けない．ATPに対する反応速度定数は10秒程度であり，それ以上遅いATP濃度の変化であれば追随することが可能であることがわかった．また，最近，蛍光タンパク質同士の相互作用を高めることによって，FRET効率変化を増大させることにも成功している[7]．

2-2.　ATeamを用いた細胞内ATPのイメージング

ATeamの細胞内への導入は，ATeam発現プラスミドを細胞にトランスフェクションさせることにより行った．次に，蛍光顕微鏡を用いて細胞をイメージングすることで，細胞内に発現させたATeamのFRETシグナルを取得した．簡単に述べると，ATeamに含まれるCFPを紫色の光で励起し，CFP由来のシアン色蛍光像とYFP由来の緑黄色蛍光像を別々に撮影する．このようにして取得した画像をコンピューターで解析して，個々の細胞，あるいはその一部のYFP/CFP蛍光強度比を計算する（詳細は別の解説を参照[8]）．

筆者らは最初に，ATPの細胞内における分布を調べた．真核細胞は脂質二重膜で囲まれた単純な袋ではなく，内部には非常に多くの細胞内小器官が存在している．これらの細胞内小器官は，基本的には脂質の膜で囲まれた外部と遮断された区画である．極性の高いATPは脂質二重膜を通過できないため，特定のタンパク質の助け無しにこれらの区画の間を行き来できない．しかし，細胞を破砕する従来のATP測定法ではこれらの区画間のATP濃度の違いを検出することは不可能であった．筆者らが特に着目したの

は，細胞質，核，ミトコンドリアの違いである．核はDNAやRNAを合成するために大量にATPを消費する区画であり，ミトコンドリアは細胞のATP合成の一端を担う区画である．そこで，HeLa細胞の細胞質，核，そしてミトコンドリアマトリックスにATeamを発現させてそれぞれイメージングを行い，ATeamのFRETシグナルを比較した．その結果，細胞質と核ではYFP/CFP比に大きな違いは見られなかった．これは，ATPは核膜孔を通過するのに十分小さく，核内での消費を十分まかなえるだけのATPが核膜孔を通して細胞質から供給されているものと考えられた．一方，ミトコンドリアマトリックスでは細胞質や核と比べてYFP/CFP比が顕著に低く，すなわちATP濃度が低く保たれていることが明らかとなった．ATP合成酵素によって合成されたATPは，おそらくミトコンドリア内膜に存在するATP：ADP輸送体によってすみやかに細胞質側に排出されていると考えられる．また，ミトコンドリアマトリックスのATPはクエン酸サイクルのいくつかの酵素を阻害することから，ミトコンドリアマトリックスのATP濃度が高くならないようにクエン酸サイクルがフィードバック制御されている可能性も考えられる．ミトコンドリアマトリックスのATP濃度が低い意義というのは何だろうか？　ATP合成酵素はプロトン駆動力を利用してATPを合成することができるが，その逆反応，すなわちATPを加水分解してプロトンポンプとして働くこともできる．しかし，せっかく合成したATPを再び加水分解していては効率が悪い．ATP濃度が低くADP濃度が高ければ，ATP合成酵素の反応の平衡は合成反応に傾いて効率よくATP合成反応を進めることができるはずである．

好気的な条件下では，ATPは動物細胞の中では主として解糖系（細胞質）と酸化的リン酸化（ミトコンドリア）によって作られる．しかし，虚血時などの嫌気的な条件では，酸化的リン酸化は働けずに解糖系がATP合成を担う．解糖系のみのATPの合成効率は非常に低く，酸化的リン酸化が働いてグルコースを完全酸化できる場合の20分の1程度である．ところが，一部のがん細胞などでは好気条件であっても，酸化的リン酸化ではなく解糖系にATP合成を頼っていることが知られている[9,10]．このような細胞では，酸化的リン酸化の分を補うために解糖系の活性が著しく上昇している．筆者らはがん細胞株であるHeLa細胞の細胞質ATP濃度が，解糖系および酸化的リン酸化の阻害剤に対してどのような応答を示すかを，ATeamを用いたリアルタイムイメージングによって調べた．グルコースを含む通常の培地で培養した細胞に酸化的リン酸化の阻害剤であるオリゴマイシンを加えた場合，ATP濃度の変化はほとんど観察されなかった．このことから，HeLa細胞におけるATP合成の酸化的リン酸化への依存度は非常に低く，解糖系だけでも十分細胞内ATP濃度を維持できることがわかった（**図3A**）．一方で，解糖系の阻害剤を加えた場合は顕著なATP濃度の低下が観察された．ところが，培地に含まれるグルコースをガラクトースに代えて同様の実験を行ったところ，酸化的リン酸化の阻害剤によってHeLa細胞のATP濃度は速やかに減少し，10分程度でほぼ枯渇した（図3B）．この結果は，解糖系を主としたHeLa細胞のエネルギー代謝が一つの培地成分の違いによって酸化的リン酸化を主としたものに変換したことを示しており，エネルギー代謝の制御を考える上で興味深い．

このように，通常は抑制されているHeLa細胞の酸化的リン酸化であるが，細胞内Ca^{2+}濃度の上昇によって活性化され，細胞質およびミトコンドリアのATP濃度が上昇することが細胞集団を用いた実験から示されている．ただ，単一細胞のレベルではATP濃度がCa^{2+}に対してどのように応答するかは不明であった．そこで，ヒスタミン刺激を細胞に与えた時のCa^{2+}濃度とATPを同時イメージングしたところ，Ca^{2+}濃度の上昇に続いてミトコンドリアATP濃度が上昇する様子が観察された（中野ら，未発表）．しかし，Ca^{2+}濃度とATP濃度のダイナミクスは必ずしも一致しておらず，Ca^{2+}濃度が低下した後も10分以上ATP濃度は高く保たれている細胞も多く観察された．細胞内ATPのターンオーバーが比較的速い（約1分）ことを考えると，この結果はCa^{2+}が間接的に酸化的リン酸化を活性化していることを示唆している．例えば，ピルビン酸デ

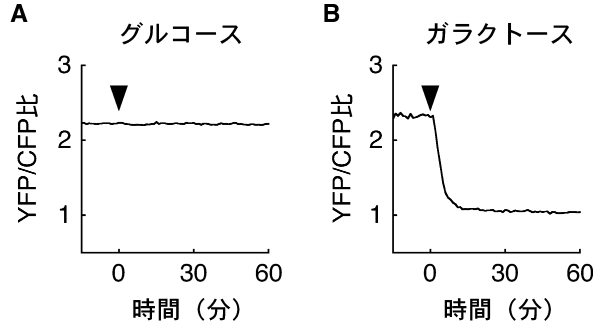

図3　酸化的リン酸化阻害剤による単一生細胞内のATP濃度の変化

(A)グルコース含有DMEM培地での変化．(B)ガラクトース含有（グルコース不含）DMEM培地での変化．矢尻で示す時点でオリゴマイシンを加えた．

ヒドロゲナーゼ（PDH：ミトコンドリアにおいてピルビン酸からアセチル CoA を合成する）は，それ自身は直接 Ca^{2+} によって影響を受けないが，PDH を脱リン酸化して活性化するホスファターゼ（PDP）は Ca^{2+} によって活性化されることが生化学的な実験から知られている．上で観察された Ca^{2+} に応答した酸化的リン酸化の活性化において，PDP 自身がどの程度の役割を果たしているのかは今後の分子生物学的な検討が必要だろう．

3. 細胞内 ATP/ADP 比イメージング

ATP を消費する生体内反応の多くは，ATP を ADP とリン酸に加水分解する．一方で，解糖系や酸化的リン酸化では ADP から ATP が合成される．そのため，細胞のエネルギー状態，すなわち ATP の消費と合成のバランスを評価する際には，ATP 濃度よりもむしろ ATP/ADP 比の方が適しているという考え方がある．また，通常の条件では細胞内の ATP は ADP の 5～10 倍量存在しているため，ATP/ADP 比の方が ATP 濃度そのものよりもはるかに ATP の消費・合成バランスの変化に敏感である．Berg らは，メタン菌由来のアンモニア代謝制御タンパク質である GlnK1 を用いて，ATP：ADP 比プローブである Perceval を開発した[11]．Perceval は GlnK1 の T ループと呼ばれるヌクレオチド結合領域に円順列変異 YFP を挿入して作られている．T ループ領域にヌクレオチドが結合して引き起こされる構造変化が YFP の蛍光団の周囲に伝わり，YFP の励起スペクトルの変化として現れる．T ループの構造は ATP が結合した場合と ADP が結合した場合で異なるため，ATP：ADP 比によって励起スペクトルが変化する．Perceval を細胞内に発現させてイメージングすることで，単一細胞レベルで ATP：ADP 比の変化を計測することが可能である．ただ，Perceval は pH に対する感受性が非常に高く，結果を解釈するためには蛍光シグナルへの pH 変化の寄与を考慮に入れる必要がある．また，GTP も Perceval のシグナルに影響を与える．こうした他の因子からの影響が少なくなるように改良されれば，ATP/ADP 比のイメージングは細胞のエネルギー状態を解析するためのより強力な手段となると考えられる．

4. 細胞外 ATP 濃度の蛍光イメージング

細胞外の ATP（あるいは ADP や UTP，UDP）の重要性は，特にそれらを認識する P2X 受容体と P2Y 受容体の研究から強く認識されつつある[12]．ごく最近では，貪食細胞がアポトーシスした細胞を見つける際に，アポトーシス細胞が放出する ATP（と UTP）を手がかりにしているという興味深い知見も報告されている[13]．しかし，細胞外 ATP を認識するメカニズムの研究が進んだ一方で，ATP が放出されるメカニズムやタイミングはあまり研究が進んでいなかった．特に，細胞外 ATP を高い時間分解能と空間分解能で検出するための適当な方法はなかったが，2006 年になって Chen らが，細胞が放出する ATP を NADPH の蛍光としてイメージングする系を報告した[14]．この方法では，培地中にヘキソキナーゼ，グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ，および $NADP^+$ を加えておき，放出された ATP を NADPH に変換する．Chen らはこの系を用いて，好中球の細胞膜に走化性因子が結合すると，そこから ATP が放出されることを突き止めた．放出された ATP は自身の持つ P2Y2 受容体で認識されて走化性因子のシグナルを増強する．それによって好中球は走化性因子の濃度勾配に沿って正確に進むことができるようだ．Chen らの手法は，放出された ATP を分解してしまうためにシグナルを乱してしまう可能性はあるものの，高い時間分解能・空間分解能で放出される ATP を細胞レベルで検出する系として威力を発揮しそうである．一方で，対象が組織レベル以上になると細胞外 NADPH の蛍光シグナルは細胞内の NADPH や NADH による自家蛍光に埋もれてしまい，もはやこの方法で細胞外 ATP をイメージングすることは困難だと考えられる．この点を克服し組織や生体内における細胞外 ATP の動態を知るためには，より長波長側の蛍光を用いた新しいプローブを開発する必要があるだろう．

5. おわりに

この 10 数年で，ライブイメージング技術の発展とともに多くの蛍光プローブが開発され，生きた細胞内で様々なイオンの濃度やタンパク質の相互作用・構造変化，シグナル伝達といったものが可視化できるようになってきた．イメージングを用いた方法は，一般的な生化学的手法では抜け落ちてしまう空間情報・時間情報を補完することができる強力な手段である．こうした技術は ATP を含めて代謝物の研究にはほとんど適用されてこなかったが，今後は生命現象のカギとなるような代謝物を可視化するためのプローブが開発されるようになるに違いない．ATP のイメージングもようやく始まったばかりである．近い将来，予想しなかったような ATP の役割が明らかになる日が来ることを期待したい．

1) Imamura, H., Nhat, K.P.H., Togawa, H., Saito, K., Iino, R.,

Kato-Yamada, Y., Nagai, T., & Noji, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15651–15656.
2) 今村博臣，横山 謙 (2007) 生化学，**79**，425–437.
3) Kato-Yamada, Y. & Yoshida, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 36013–36016.
4) Kato-Yamada, Y. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 6875–6878.
5) Iino, R., Murakami, T., Iizuka, S., Kato-Yamada, Y., Suzuki, T., & Yoshida, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40130–40134.
6) Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11233–11238.
7) Kotera, I., Iwasaki, T., Imamura, H., Noji, H., & Nagai, T. (2010) *ACS Chem. Biol.*, **5**, 215–222.
8) 今村博臣 (2010) 実験医学，**28**，1303–1308.
9) Warburg, O. (1956) *Science*, **124**, 269–270.
10) Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., & Thompson, C.B. (2009) *Science*, **324**, 1029–1033.
11) Berg, J., Hung, Y.P., & Yellen, G. (2009) *Nat. Methods*, **6**, 161–166.
12) Khakh, B.S. & North, R.A. (2006) *Nature*, **442**, 527–532.
13) Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N., & Ravichandran, K.S. (2009) *Nature*, **461**, 282–286.
14) Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., & Junger, W.G. (2006) *Science*, **314**, 1792–1795.

今村 博臣
(大阪大学 産業科学研究所・
科学技術振興機構 さきがけ)

Fluorescence imaging of intra- and extra-cellular ATP
Hiromi Imamura (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, and PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 8–1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567–0047, Japan)

腸内細菌による Th17 細胞分化

1. はじめに

消化管は日常的に様々な微生物が侵入する危険にさらされている．そのため消化管粘膜免疫系は，侵入してくる病原微生物を迅速に排除するために，常に活性化状態に保って備えている．粘膜免疫細胞は，病原体排除のために炎症を起こすだけでなく，消化管上皮細胞に常時働きかけて抗菌ペプチドの産生を促進したり，あるいは上皮組織の修復を促進したり，粘膜のバリアの維持・補強にも重要な働きをしている．消化管管腔内には約1,000菌種に及ぶ腸内細菌が存在している．腸内細菌が存在しないと，粘膜バリアは脆弱となり病原体の侵入を受けやすくなることが知られている．つまり腸内細菌によって，宿主は免疫系を活性化状態に保つことができているのである．腸内細菌は我々にとって無くてはならないものであり，“共生体 (symbiont)”であると言える．

消化管には多数のT細胞が存在する．T細胞は骨髄で産生され，その大半が胸腺で分化・成熟する．成熟したT細胞は血液中に放出され，リンパ節や腸管などにおいて抗原刺激を受けて活性化する．T細胞は，細胞表面にCD4を発現するものとCD8を発現するものとがある．CD8陽性T細胞はその役割から細胞障害性T細胞と呼ばれ，一方CD4陽性T細胞はヘルパーT細胞（Th細胞）と呼ばれている．従来，活性化したTh細胞は，インターフェロン-γ（IFN-γ）を主に産生するタイプ（“Th1細胞”と呼ばれる）と，インターロイキン(IL)-4を産生するタイプ（“Th2細胞”と呼ばれる）の二つに分けて考えられてきた．Th1細胞は細胞性免疫を亢進し，Th2細胞は液性免疫（抗体応答）を亢進する．しかしながら，このTh1・Th2パラダイムだけでは説明できない現象が数多く存在していた．これに対して最近になって，Th細胞には，少なくともさらにもう1種類の細胞群が存在することが明らかになった．それがTh17細胞である[1]．Th17細胞はIL-17とIL-22を高産生することを特徴とする．IL-17は細胞遊走や炎症を引き起こすことで知られるサイトカインである．Th17細胞は，抗菌ペプチド誘導因子として知られるIL-22なども産生し，緑膿菌，肺炎菌，病原性大腸菌，カンジダ菌などの細菌・真菌感染防御に重要な働きをすることが知られている．その一方で，Th17細胞の過剰活性化が多発性硬化症や関節リウマチ，慢性炎症性腸疾患の発症や増悪に密接に関わっているという報告が数多くなされており，自己免疫疾患という文脈でも非常に注目されている．即ち，Th17細胞の数を人為的に増加させることができれば，感染症の治療に役立つと考えられるし，逆にその数を人為的に減少させることができれば，自己免疫疾患の治療になると考えられる．Th17細胞は消化管粘膜固有層において，常時，多数存在する．本稿では，腸内細菌による消化管粘膜固有層のTh17細胞の分化誘導メカニズムについて最近の知見を紹介する．