

令和 2 年 2 月 28 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 802

氏 名 伊藤秀城

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：シンガポール（国名：シンガポール共和国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
蛍光寿命計測を用いた細胞内エネルギー代謝の定量的時空間イメージング
3. 派遣期間：平成 30 年 2 月 1 日 ～ 令和 2 年 1 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
Agency for Science, Technology and Research, Skin Research Institute of Singapore
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究の背景、問題点】

生体が獲得したエネルギーの一部は、代謝によって主として ATP の形で貯蔵され、必要に応じて、さまざまな生命活動に利用される。しかしながら、生体内におけるエネルギーの産生及び消費の詳細は、十分に理解されていない部分が多い。その解明には、生体を構成する基本単位である細胞において、その時空間的に精度の高い計測手法で定量することが必須となる。

一般的な ATP 濃度計測には、ホタルルシフェラーゼが ATP 濃度依存的に化学発光することを応用し、その発光強度をマイクロプレートリーダー等で測定することで、試料中の ATP 濃度を求める手法が使われている。しかし、この手法で細胞を計測する際は、細胞抽出液を用いるため、エネルギー代謝の時空間的な情報は失われてしまう。

そこで、蛍光顕微鏡を用いた一細胞解析に使用可能で、ATP 濃度依存的に蛍光の性質が変化するタンパク質センサーが開発されてきた。その代表的なセンサーとして、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型(1, 2)、Ratiometric 型(3)、ATP:ADP 型(4)等が挙げられる。これらは、生細胞における ATP 濃度計測の手法として有用であるが、本研究では、より高精度で計測可能な手法の開発に成功した。

【解決策、研究目的、研究方法】

本研究では、生細胞において新たに開発された単色型蛍光 ATP センサーを、蛍光寿命顕微鏡法 (FLIM) によって計測した。蛍光顕微鏡において、広く用いられる蛍光強度の測定は、機器の揺らぎや褪色の影響を強く受けるが、蛍光寿命はそうした要因とは独立した機構で決定するため、より正確な測定が可

能となる(5)。本研究で用いたのは、時間領域蛍光寿命顕微鏡法（time-domain FLIM）で、時間相関単一光子計数技術（TCSPC）を応用した手法である（図 1）。まず、パルスレーザーによって、蛍光物質を繰り返し励起する。励起から光子が放出されるまでの時間を測定し、その統計を取ることで光子数の時間分布が得られる。そこに減衰曲線を当てはめていき、蛍光寿命が得られる。

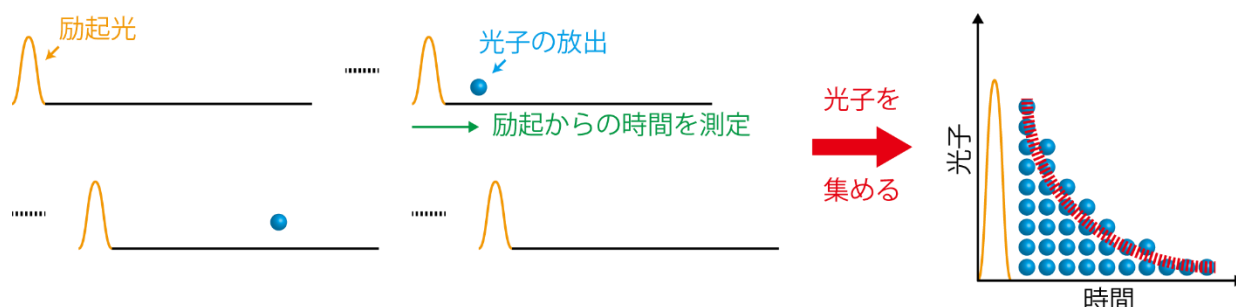


図 1. 時間領域蛍光寿命顕微鏡法の原理

本研究の目的は、時間領域蛍光寿命顕微鏡法を用いて、ATP 濃度を高時空間分解能で解析することで、個々の生細胞におけるエネルギー代謝の動態を明らかにすることである。さらに、各細胞小器官における計測や ATP 合成阻害後の計測を通して、より多くの知見を得ることを試みた。また、エネルギー代謝にとって、重要である pH の定量イメージング手法の導入にも取り組んだ。

【特色と独創的な点】

蛍光強度を測定する先行研究と比較し、本研究で用いた時間領域蛍光寿命顕微鏡法では、より信頼性の高い結果が得られる。測定値は ATP 濃度に対応した数値であるため、蛍光寿命から ATP 濃度を求める際に、複雑な計算を介すことが不要となる。また、ATP 濃度の「変化」を知るための計測に留まらず、「ありのまま」の濃度を知ることができる。

単色型の蛍光センサーであるため、細胞へのダメージが少ない長波長の励起光を用いたり、他の標的を同時計測したりしながら、ATP 濃度の絶対定量が可能となる。さらに、構造が比較的単純であるため、タンパク質形成の過程での不具合が生じる可能性が低くなる。

従来、生体から得た細胞の識別手法は、固定が必要な組織切片の顕微鏡による観察や、細胞集団から集めた細胞抽出液の解析が主であった。一方、本研究が提案する ATP 濃度計測を応用した細胞識別法が実現すれば、生きたまま 1 つ 1 つの細胞を直接評価することが可能となる。本研究の成果を社会へ還元することで、エネルギー代謝に関する研究に基礎的な知見を与えることができる。また、細胞状態を判別することが可能となれば、現在マーカーの無い細胞に対しても、状態を調べる有効なツールとなり得るため、診断や治療に役立つことが期待される。

【研究経過及び得られた結果】

まず、単一細胞におけるエネルギー代謝を定量するため、蛍光 ATP センサーの選定を行った。予備実験で、ATP 濃度に応じて蛍光寿命が変化する蛍光 ATP センサーを見出していたが、本研究では共同研究者らから既に発表されているものを含め(6)、複数の蛍光 ATP センサーにおける蛍光寿命の ATP 濃度依存性をスクリーニングした。その結果、図 2 A で示したような構造を持つ蛍光 ATP センサーが、大きな蛍光寿命変化を示した。精製タンパク質を用いた測定では、ATP 非存在下では 2.60 ナノ秒、10mM ATP 存在下では 1.64 ナノ秒と、図 2 B で示した生理的な ATP 濃度の範囲において、ATP 濃度依存的に最大で約 1 ナノ秒の変化を示す結果を得た。他の単色型の蛍光センサーと比較すると、蛍光 pH センサーの pHRed も環

境内の pH に応じて、その蛍光寿命を変化させるが、その変化は約 1.8 ナノ秒から 2.2 ナノ秒であり(7)、本研究で用いた蛍光 ATP センサーは 2 倍程度の変化幅を示した。

続いて、予備実験と同様に、この蛍光 ATP センサーを、ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 内で発現させた。通常の細胞質での発現に加え、特定の amino 酸配列を追加することで、ミトコンドリアと核における局所的な発現に成功した (図 3 A)。さらに、生細胞における ATP 合成過程の 1 つである解糖系を、フッ化ナトリウムによって阻害したところ、阻害後の蛍光寿命が長くなった (図 3 B)。図 2 B で示した結果に照らし合わせると、解糖系の阻害によって、細胞質の ATP 濃度が減少したことがわかった。

現在、申請時の計画に沿って、さまざまな細胞間の ATP 濃度を比較した結果等を取りまとめている。さらに、既存の蛍光 pH センサーを使った細胞内 pH 評価系によって、より精度の高い ATP 濃度計測手法を構築することにも成功している。

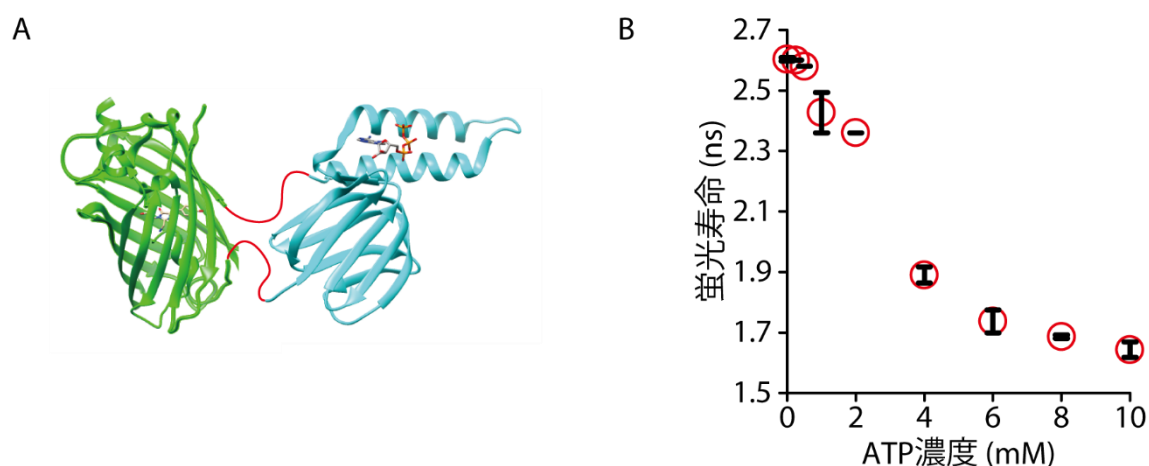


図 2. 本研究で用いた蛍光 ATP センサー

(A) 本研究で用いた蛍光 ATP センサーの 3 次元構造の模式図 (PDB ID: 3DPW and 2E5Y)。蛍光タンパク質 (緑)、アミノ酸リンカー (赤)、ATP 結合部位 (青) から構成される。(B) 精製タンパク質を用いた蛍光 ATP センサーの ATP 濃度と蛍光寿命の関係。各点において 3 回測定し、その平均 (赤丸) と標準偏差 (エラーバー) を示す。

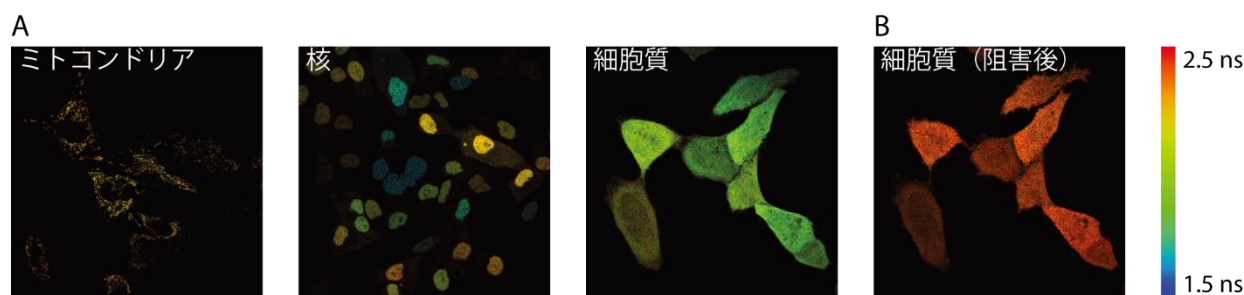


図 3. HeLa における蛍光 ATP センサーの蛍光寿命像

(A) 各細胞小器官に局所的に発現した蛍光 ATP センサーの蛍光寿命像。(B) フッ化ナトリウムを加え、解糖系を阻害した後の蛍光 ATP センサー (細胞質) の蛍光寿命像。蛍光寿命の表示範囲 (1.5 ~ 2.5 ナノ秒) は、全ての図で共通である。

【参考文献】

1. H. Imamura, K. P. Huynh Nhat, H. Togawa, K. Saito, R. Iino, Y. Kato-Yamada, T. Nagai, H. Noji, 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).
2. T. Yoshida, A. Kakizuka, H. Imamura, BTeam, a Novel BRET-based Biosensor for the Accurate Quantification of ATP Concentration within Living Cells. *Sci. Rep.* **6**, 39618 (2016).
3. H. Yaginuma, S. Kawai, K. V. Tabata, K. Tomiyama, A. Kakizuka, T. Komatsuzaki, H. Noji, H. Imamura, Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci. Rep.* **4**, 6522 (2014).
4. J. Berg, Y. P. Hung, G. Yellen, A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nat. Methods.* **6**, 161–166 (2009).
5. X. D. Wang, O. S. Wolfbeis, R. J. Meier, Luminescent probes and sensors for temperature. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7834–7869 (2013).
6. S. Arai, R. Kriszt, K. Harada, L. S. Looi, S. Matsuda, D. Wongso, S. Suo, S. Ishiura, Y. H. Tseng, M. Raghunath, T. Ito, T. Tsuboi, T. Kitaguchi, RGB-Color Intensiometric Indicators to Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP in Single Cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 10873–10878 (2018).
7. M. Tantama, Y. P. Hung, G. Yellen, Imaging Intracellular pH in Live Cells with a Genetically Encoded Red Fluorescent Protein Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10034–10037 (2011).

【成果の発表・関係学会への参加】

1. *Hideki Itoh, “Single cell analysis on energy metabolism by fluorescence lifetime imaging Microscopy”, 2018 Core-to-core symposium: Biotechnology towards Next Generation Single Cell Analysis, Singapore, October 2018.

(Session chair & Invited talk)

2. *Hideki Itoh, “Biological Application of Visualized Energy by Microscopy”, GE Healthcare Lunch & Learn: Choosing the right microscope for your research, Singapore, April 2018.

(Invited talk)