OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	バクテリア細胞内ATP濃度の一細胞計測
Author(s)	柳沼, 秀幸
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26278
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕 バクテリア細胞内ATP濃度の一細胞計測

学位申請者　　柳沼 秀幸

バクテリアの集団は、同一の試験管内であっても均質な細胞の集まりではないことが、近年明らかにになってきている。アデノシン三リン酸（ATP）の加水分解は細胞内の多くの反応と共役している非常に重要な代謝物質である。ATP濃度が一細胞で定量できれば、個々の細胞の違いを代謝状態という観点から可視化することが可能になるほか、細胞内ATPの制御の仕組みを理解するのにも役立つ。過去に細胞内で使えるATPセンサーが開発された例はあるものの、細胞内ATP濃度の絶対値の定量が行われたことはない。そこで本研究では、大腸菌の細胞内ATP濃度を一細胞で定量する方法を開発し、これを用いて大腸菌集団内のATP濃度分布を調べた。

第二章では、過去に今村らによって開発されたATPセンサー蛍光タンパク質「ATeam」を用いて大腸菌内のATP濃度を定量しようと試みた。しかしATeamのシグナル（YFPとCFPの蛍光のレシオ）はルシフェラーゼアッセイのATP定量結果とはうまく適合しないばかりか、低ATP条件では理論上出るはずのない低いレシオを出した。ATeamのシグナルが信用できない原因は、ATeamがCFPとYFPの2種の成熟速度が異なる蛍光タンパク質から成っているためであることが示唆された。そこで、第三章では単一のGFPから成るATPセンサーの開発を行った。開発した単一蛍光色素型ATPセンサー「BQueen」は25℃において生理的なATP濃度によく応答した。また、大腸菌でBQueenを発現させて連続培養条件で培養したところ成熟速度の影響はほとんどないことがわかった。さらに、BQueenのシグナルはルシフェラーゼアッセイのATP定量結果とも近い値を示し、定量計測が可能であることが示された。

第四章では開発されたBQueenを用いて大腸菌集団のATP濃度分布を測定した。連続培養、及びバッチ培養条件の対数増殖期、定常期のいずれにおいても、BQueenのシグナルの分布が見られた。これは測定系の誤差や細胞ごとのpHの違いでは説明できず、ATP濃度そのものに分布があることを示している。また意外なことに、連続培養条件の細胞を顕微鏡下で培養したところ、ATP濃度が高い細胞は必ずしも分裂が速いとはいえなかった。ATP濃度の特に高い細胞では、ATPの消費が少なく分裂もしないのではないかと考えられる。

一方、培養中に新鮮培地を追加しないバッチ培養条件の細胞では、細胞外の環境が増殖に不適となるにつれて、集団全体の平均ATP濃度が低下した。さらに、定常期では意外なことに分布の広がりの尺度である%RSD（標準偏差÷平均×100）は対数増殖期よりも小さくなり、より集中した分布になった。この現象を説明するために、ATP濃度に関して以下のようなモデルを立てた。まず前提として、各細胞の酵素の量は一定ではなく、ある範囲で分布をもつ。そして細胞内のATP濃度は合成速度と消費速度のバランスによって決定される。このとき、合成速度のほうが細胞ごとのばらつきが大きいと考えられる。なぜなら細胞内の反応の非常に多くがATPを消費するので、各反応の消費速度が細胞によって異なっていたとしても、それらの総和である総消費速度はほとんどばらつかないと予想されるからである。一方、ATPを合成する反応の数は限られている。従って、ATP合成経路中の酵素の量の分布は、ATP濃度の分布に強く影響を与える。また、実質的に細胞内ATP濃度に寄与しているATP合成経路の数も重要で、多いほどATP濃度の分布は狭くなる。このようなモデルに基づいて考えると、対数増殖期から定常期にかけて%RSDが小さくなったのは、対数増殖期では豊富に存在するグルコースのみを炭素源として利用していたのに対し、定常期ではカタボライト抑制が解除されて複数の炭素源（培地中の代謝産物や細胞内に蓄積した糖など）を利用しているためだと考えることができる。加えて、対数増殖期におけるATP濃度の%RSDは、既に報告されているタンパク質濃度の%RSD（およそ30～300%、タンパク質によって異なる）の下限と同程度であった。ここから、%RSDの大きな酵素がATP合成に重要であるならばATP濃度のばらつきはもっと広いと思われるので、少なくともATP合成に重要な酵素の濃度分布は広くないと推察することができた。また、対数増殖期のATP濃度の分布は最小でただ一つの酵素の濃度分布に由来する可能性も示された。このような知見は細胞のATP濃度維持の仕組みを理解するのに役立つと考えられる。

今回開発されたBQueenにより、バクテリア単一細胞の精度で代謝状態を調べることが可能となった。この手法は、バクテリア集団の中に異なる状態の細胞が存在する場合の解析に特に力を発揮すると考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　柳沼　秀幸　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者		
	主 査　招へい教授	野地　博行
	副 査　教授	永井　健治
	副 査　教授	難波　啓一
	副 査　招へい	岡田　康志

論文審査の結果の要旨

当該研究においては、一細胞で使うことのできる蛍光性のATPセンサータンパク質（BQueen）が開発された。このセンサーは特にバクテリア一細胞のATP濃度を定量的に求めることを目的に作成されたもので、従来のATPセンサーに存在したシグナルが変動してしまう問題が解決されていた。このセンサーを用いて、均一な遺伝的背景をもつ大腸菌集団のATP濃度のばらつきが測定された。その結果、例えば対数増殖期の大腸菌のATP濃度は2ー8 mMの範囲で分布しているなど、過去に例のないATP濃度分布のデータが得られた。また、測定した結果に対して理論的な解釈を加え、どのようにしてそのような分布が生じるのかが議論されていた。これらの成果は生命現象をこれまで不可能であった精度で観測することが可能であることを十分に示すものであり、将来的に細胞内ATP濃度の調節機構やバクテリアの代謝経路の理解につながると考えられる。さらに、遺伝子的には他の細胞と同一でありながら高い抗生物質耐性をもつPersister細胞のATP濃度がBQueenで測定され、通常の細胞のATP濃度と比較された。これまでPersister細胞のATP濃度は他の細胞よりも低いのではないかとする学説が提唱されていたが、BQueenによる測定ではむしろ通常の細胞よりも高い傾向があり、既存の学説とは逆の興味深い結果であった。従って、当該研究は学位論文として十分な完成度と新奇性を共に有していると言え、学位の授与に値すると認められる。