

細胞内目的部位に ATP を局部添加したい

使用製品

Caged ATP [CC01]

解析装置



I はじめに

Caged 化合物は生理活性物質や蛍光物質などの、その本来の性質をブロックした化合物であり、近紫外光照射により、瞬時に元の活性な物質に転換することができる化合物の総称である。ある物質の生体における作用機序を調べるには、その物質を系中で測定することも必要であるが、同時に、系中にその物質を入れて追従する変化を観察することも重要である。ところが、生体反応の多くは速度が速く、また複雑に関連した反応カスケードであることが多いため、外からその物質を加えた場合、系中を拡散する過程が律速となってその後の反応が明確に捉えられなくなってしまう恐れがある。そのため、いかに素早く目的物質を添加するかについて様々な方法が開発されてきたが、必ずしも満足できるものではなかった。そこで光をトリガーに用いる手法が報告されてきている。

光は考えられる限り最も速い媒体であり、また細く絞り込むこともできる。そこで、もし光で物質を制御できれば、それは時間分解能、空間分解能共に優れた手法であるといえる。Caged 化合物はそのために開発された試薬で、多くの研究分野に新しい手法を展開できるものと期待される。これまで Caged 化合物は、その使用法や装置についての情報が少なく、一部の研究者だけが使える特殊な方法という印象があった。しかし Caged 化合物を用いた研究は特殊なものではなく、装置さえあればだれでも再現良く使用できる手法である。

II Caged ATP の特性

Caged ATP(Code: CC01) は ATP の γ 位リン酸をニトロベンジル型化合物で保護した化合物で、ATP 活性を持たない。このニトロベンジル基は 310 ~ 360 nm の近紫外光で瞬時に解除でき、ATP を系内に素早く放出できる。アクトミオシン ATPase をはじめ各種 ATPase は反応が速いため、外から ATP を加えた場合には ATP 分子の系内への拡散が律速となってしまう、解析が困難になる場合が多い。これに対し Caged ATP は活性がないため、系中にあらかじめ均一に投与しておくことができる。この状態で光照射すれば、瞬時にかつ同時に ATP が出現することになり、拡散を除外できるため ATPase の作用メカニズムの研究に大きな力を発揮する。また、時間分解 X 線回折法などを用いた分野の研究にも使用できると予想される。

光分解速度は、22°C で約 100 s⁻¹ である。表 1 に各種 Caged ATP の ATP 放出速度及び量子収率を示す。

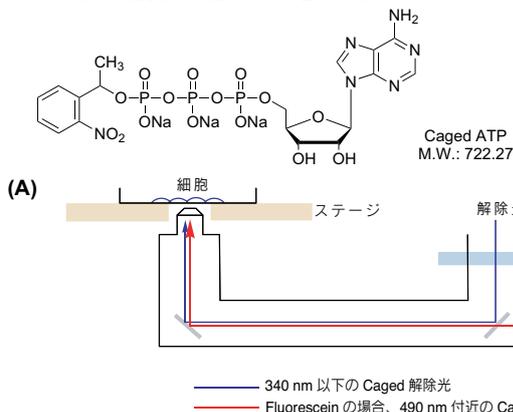


図 1 落射蛍光装置への解除光の導入

表 1 ATP の放出速度定数 k 及び量子収率 Qp(20°C)

	k s ⁻¹			Qp
	pH7	pH8	pH10	
Caged ATP	84	9	1.5	0.63
Caged ATP dimethoxy	18	1.3	0.14	0.07

III 試薬の細胞内への導入

Caged ATP は水溶性が高く、細胞膜透過性が低い。骨格筋では、グリセロール、サポニンなどで処理したスキンドファイバーを用いることにより、インキュベートで筋繊維内に均一に分布させることができる。その他、パッチピペットの内液に入れたり、マイクロインジェクション、浸透ショック法などが用いられる。

IV 顕微鏡の構造とアクティベート法(照射光の種類)

Caged ATP は通常生細胞において用いられ、顕微鏡観察下アクティベートされる。そのためには特異的部位に解除光を照射しなければならない。以前は通常の蛍光顕微鏡を用い、レンズ系や光ファイバーなどを自作し実験に用いていたが、最近になって、顕微鏡各社から Caged 化合物実験用のオプションが市販されている。これらの装置の概略を図 1 に示す。

通常の蛍光顕微鏡における蛍光観察用励起光の側面からダイクロイックミラーを通して解除光を導入し、対物レンズを通して目的箇所へ照射する。(340 nm の解除光を光学系に通すため、紫外光の透過率の良いレンズを用いてある。)

市販されているものはほとんど落射型の蛍光顕微鏡を改良したもので (A) の様に通常の蛍光観察用励起光の光路にダイクロイックミラーを通して、横から解除光を照射する形式をとっている。この方法では、解除光の絞り込みも対物レンズを併用して利用するため、目的の照射部位を限定しやすい利点がある。

その他、(B) の様に外部から、光ファイバー、レンズを用いて解除光を照射する方法は、自作し易くダイクロイックミラーによるエネルギーの減衰の心配も無いが、照射部位を限定しにくく、また光ファイバーを用いた場合は、かなりのエネルギーの減衰がある。

落射蛍光装置を用いる場合、底面から解除光を照射するため、ディッシュの底面も紫外光透過の良いものを用いる必要がある。そのため図 2 の様なディッシュが用いられる。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

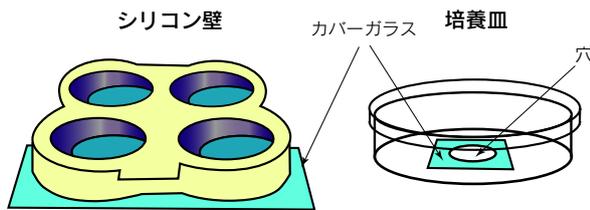


図2 倒立型蛍光顕微鏡に用いる培養皿の例

Caged 化合物のアクティベートには紫外光の照射が必要となるが、Caged nucleotide、Caged calcium、Caged neurotransmitter については、短時間でアクティベートする必要があるため、エネルギーの高い光源を用いる必要がある。通常用いられている光源を以下に示す。

(1) キセノンフラッシュランプ

得られるエネルギーが高く、300 ~ 400 nm を通すバンドパスフィルターを用い、1 msec 照射で 10 mm² に集光して、100 ~ 200 mJ のエネルギーが得られる。これは 2 mmol/l Caged ATP から 1 mmol/l ATP を放出させるのに相当するエネルギーである。キセノンフラッシュランプは安価で、既存の装置にも組み込みやすい。

(2) 水銀アークランプ

366 nm に最も強い輝線を持ち、シャッターおよびバンドパスフィルターを用いて数百 msec の照射で Caged 基解除に十分なエネルギーを与えることができるが、非常に速い過程の解析には向かない。

(3) レーザー

第二高調波ルビーレーザーが一般的である。波長は 347 nm で 300 mJ までのエネルギーを得ることができる。Nd-YAG レーザー (355 nm) も使用できる。色素レーザーは得られるエネルギーが 100 mJ までとルビーレーザーに比べて弱い、波長が 320 nm と短く、347 nm 域のモル吸光係数に比べ Caged 基の吸収が 2 倍あるため、集光をすれば使用できる。

V 使用方法

(1) 使用組織

Rabbit psoas muscle fiber

(2) 試薬及びバッファー

・ Caged ATP^{*1} (Code: CC01)

・ シリコンオイル

・ Skinning solution

ATP	2.5 mmol/l
塩化マグネシウム	2.5 mmol/l
GEDTA(EGTA) (Code: G002)	5 mmol/l
Imidazole	10 mmol/l
プロピオン酸カリウム	170 mmol/l
Phenylmethylsulfonyl fluoride	0.1 mmol/l
KOH または塩酸で pH7.1 にする	

・ Storage solution

ATP	2.5 mmol/l
塩化マグネシウム	2.5 mmol/l
GEDTA(EGTA)	5 mmol/l
Imidazole	10 mmol/l
プロピオン酸カリウム	170 mmol/l
アジ化ナトリウム	5 mmol/l
グリセロール	50 %
KOH または塩酸で pH7.0 にする	

・ Relaxing solution

Mg ATP	5.0 mmol/l
塩化マグネシウム	7.4 mmol/l
GEDTA(EGTA)	30 mmol/l
K ⁺ + Na ⁺	141 mmol/l
TES(Code.GB18)	100 mmol/l
Creatine phosphate	11 mmol/l
グルタチオン還元型	10 mmol/l

・ Rigoring solution

塩化マグネシウム	3.2 mmol/l
GEDTA(EGTA)	53 mmol/l
K ⁺ + Na ⁺	140 mmol/l
TES	100 mmol/l
グルタチオン還元型	10 mmol/l

※ Caged ATP は水溶性であり、バッファーにそのまま溶解して用いる事ができる。貯蔵には冷凍遮光保存が必要である。そのように保存したものであっても、1年以上経ったものは使用しない方がよい。

(3) 方法

スキンドファイバーの製法^{*2}

- ウサギの psoas muscle fiber の束を 5 ~ 10°C においてシリコンオイル中で取り出す。
- 筋繊維の束を Skinning solution に浸け、0°C で 2 時間緩やかに攪拌する。
- さらに新しい Skinning solution と置換し、密封ビンに入れ 4°C で 24 時間攪拌する。
- ファイバーを取りだし、Storage solution に浸し、ゆっくり -22°C まで冷却し、3 カ月間保存する。

※ 数種類の方法があるが、どの方法も同じ様な結果をあたえる。サポニンあるいはジキトニン等も膜透過性細胞の調製に用いられるが、各々インキュベーション時間の違いにより、形質膜に形成される孔のサイズも変わってくるため、使用細胞に適した方法を用いる。

負荷法

(導入用バッファーの作製をはじめ導入操作は Caged 化合物に光を当てないように暗室、またはイエローランプ中で行う。)

- 顕微鏡下、Relaxing solution 中に筋繊維を浸し、繊維を弛緩させる。
- 筋繊維に両端に微小クリップをつけ、その張力をモニターする。又は繊維を予め蛍光標識しておいて、その動きを観察できるようにする。
- バッファーを Relaxing solution から Rigoring solution に置換し繊維を緊張させる。
- 繊維の緊張が安定したら、10 mmol/l Caged ATP、過剰の Mg を含んだ Rigoring solution に置換して 2 分間、繊維中に Caged ATP を拡散させる。
- 目的の場所に解除光を照射し、張力をモニターする。

(4) Caged ATP 使用時の注意事項

- カルシウム濃度等を蛍光測定したい場合は、同時に Fluo 3 等を導入しておく。この際、観察用励起光が Caged ATP を解除してしまわないよう注意する。450 nm 以上で励起できるカルシウムプローブが望ましい。
- Caged ATP は Caged 化合物の中でも歴史が古く多くの報告がある。しかしながら、使用細胞、使用機器にあったプロトコルを確立するまで試薬の濃度、インキュベーション時間あるいは解除光照射の時間等、検討する必要がある。一度プロトコルを確立してしまうとその後は、再現性良く実験できる。

参考文献

- 1) W. H. Thirl, J. A. Sleep, M. A. Ferenczi, "Inhibition of unloaded shortening velocity in permeabilized muscle fibers by caged ATP compounds", *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **1995**, *16*, 131.
- 2) I. Morano, A. Oesterman, A. Arner, "Rate of active tension development from rigor in skinned atrial and ventricular cardiac fibers from swine following photolytic release of ATP from caged ATP", *Acta Physiol. Scand.*, **1995**, *154*, 343.
- 3) J. E. T. Corrie, G. P. Reid, "Site-specific labeling of caged ATP with deuterium or 18oxygen", *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1995**, *36*, 289.
- 4) K. Horiuti, N. Yagi, S. Takemori, M. Watanabe, K. Wakabayashi, K. Yamada, "Structural changes of crossbridges on contraction and relaxation induced by photolysis of caged ATP: An x-ray diffraction study at the Photon Factory", *Synchrotron Radiat. Biosci.*, **1994**, *486*.
- 5) R. S. Chittock, D. G. Lidzey, N. Berovic, C. W. Wharton, J. B. Jackson, T. D. Beynon, "Two-wavelength switching of luciferase activity using caged compounds", *Adv. Mater. Opt. Electron.*, **1994**, *4*, 349.
- 6) Y. Emoto, K. Horiuti, K. Tawada, K. Yamada, "Tension relaxation induced by pulse photolysis of caged ATP in partially crosslinked fibers from rabbit psoas muscle", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1995**, *92*, 1461.
- 7) H. Thirlwell, J. E. T. Corrie, G. P. Reid, D. R. Trentham, M. A. Ferenczi, "Kinetics of relaxation from rigor of permeabilized fasttwitch skeletal fibers from the rabbit using a novel caged ATP and apyrase", *Biophys. J.*, **1994**, *67*, 2436.
- 8) H. Martin, R. J. Barsotti, "Activation of skinned trabeculae of the guinea pig induced by laser photolysis of caged ATP", *Biophys. J.*, **1994**, *67*, 1933.
- 9) J. Sleep, C. Herrmann, T. Barman, F. Travers, "Inhibition of ATP Binding to Myofibrils and Acto-Myosin Subfragment 1 by Caged ATP", *Biochemistry*, **1994**, *33*, 6038
- 10) H. Martin, R. J. Barsotti, "Relaxation from rigor of skinned trabeculae of the guinea pig induced by laser photolysis of caged ATP", *Biophys. J.*, **1994**, *66*, 1115.
- 11) K. Hirose, T. D. Lenart, J. M. Murray, Franzini-Armstrong, Clara; Goldman, Yale E., "Flash and smash: rapid freezing of muscle fibers activated by photolysis of caged ATP", *Biophys. J.*, **1993**, *65*, 397.
- 12) K. Horiuti, T. Sakoda, K. Yamada, "Time course of rise of muscle stiffness at onset of contraction induced by photorelease of ATP", *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **1992**, *13*, 685.
- 13) J. E. T. Corrie, Y. Katayama, G. P. Reid, M. Anson, D. R. Trentham, "The development and application of photosensitive caged compounds to aid time-resolved structure determination of macromolecules", *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A*, **1992**, *340*, 233.
- 14) J. E. T. Corrie, G. P. Reid, D. R. Trentham, M. B. Hursthouse, M. A. Mazid, "Synthesis and absolute stereochemistry of the two diastereoisomers of P3-1-(2-nitrophenyl)ethyl adenosine triphosphate ('Caged' ATP)", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, *8*, 1015.
- 15) K. Horiuti, T. Sakoda, M. Takei, K. Yamada, "Effects of ethylene glycol on the kinetics of contraction on flash photolysis of caged ATP in rat psoas muscle fibers", *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **1992**, *13*, 199.
- 16) G. J. M. Stienen, M. A. Ferenczi, "Relaxation from rigor by photolysis of caged-ATP in different types of muscle fibers from *Xenopus laevis*" *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **1991**, *12*, 507.
- 17) R. Buchet, I. Jona, A. Martonosi, "The effect of dicyclohexylcarbodiimide and cyclopiazonic acid on the difference FTIR spectra of sarcoplasmic reticulum induced by photolysis of caged-ATP and caged-calcium", *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1104*, 207.
- 18) J. W. Tanner, D. D. Thomas, Y. E. Goldman, "Transients in orientation of a fluorescent cross-bridge probe following photolysis of caged nucleotides in skeletal muscle fibers", *J. Mol. Biol.*, **1992**, *223*, 185.
- 19) M. Yamakawa, Y. E. Goldman, "Mechanical transients initiated by photolysis of caged ATP within fibers of insect fibrillar flight muscle", *J. Gen. Physiol.*, **1991**, *98*, 657.
- 20) E. M. Ostap, D. D. Thomas, "Rotational dynamics of spin-labeled F-actin during activation of myosin S1 ATPase using caged ATP", *Biophys. J.*, **1991**, *59*, 1235.
- 21) J. A. Dantzig, M. G. Hibberd, D. R. Trentham, Y. E. Goldman, "Cross-bridge kinetics in the presence of magnesium-ADP investigated by photolysis of caged ATP in rabbit psoas muscle fibers", *J. Physiol. (London)*, **1991**, *432*, 639.

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料