

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手 A

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22687011

研究課題名（和文） ATP イメージングによるアポトーシスにおける細胞内 ATP の意義の解明

研究課題名（英文） Analysis of the roles of intracellular ATP during apoptosis by using the ATP imaging technique.

研究代表者 今村 博臣 (IMAMURA HIROMI)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：20422545

研究成果の概要（和文）：カスパーゼに耐性の蛍光 ATP バイオセンサーを開発し、アポトーシス細胞内の ATP レベルを経時的に追跡する手法を開発した。この手法を用い、カスパーゼ 3 の活性化後に細胞内 ATP レベルが減少する事を明らかにし、ATP の減少に関与する分子を同定した。さらに、細胞内 ATP がアポトーシス細胞の細胞膜動態を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we monitored intracellular ATP dynamics during apoptosis by using a newly developed caspase-resistant fluorescent ATP biosensor. We found that intracellular ATP level starts to decrease after the activation of caspase 3, and identified a molecule that is involved in declination of ATP. Moreover, we elucidated that intracellular ATP level regulates plasma membrane blebbing of apoptotic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2011 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2012 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：細胞生物学、細胞死、FRET

1. 研究開始当初の背景

ATP は細胞のエネルギー通貨として、筋収縮などはもとより、細胞運動、細胞内輸送、膜を介した物質輸送、生体高分子の合成、代謝反応等々、多種多様な場面で用いられている。その一方で、ATP は細胞内外でシグナルとして働いている事が知られており、眼の発生や味覚の伝達、細胞の走化性、インスリンの分泌などに重要な役割を果たしている事が明らかにされつつある。細胞死においても ATP がシグナルとして働いている事が示唆

されている。しかし、その役割については必ずしも一致した見解があるわけではない。例えば、細胞にアポトーシスを誘導する前に細胞内 ATP 濃度を下げる処理をすると、アポトーシスではなくネクロシスによる細胞死が誘導される事が知られている。一方で、アポトーシスが実行される上で重要な因子であるアポトゾーム複合体は、高濃度の ATP で形成が阻害されるという報告もある。すなわち、ATP がアポトーシス促進的に働くモデルと、抗アポトーシスの働くモデルの対立

した2つのモデルが混在している。また、アポトーシス後期の重要なステップであるフォスファチジルセリンの細胞表面への露出が起こるメカニズムに関しても、細胞内 ATP 濃度によって制御されているとするモデルを含め様々なモデルが提案されている。このような混乱が生じている原因のひとつに、これまでアポトーシス過程における細胞内 ATP 濃度の経時的な変化が不明であったという点が挙げられる。アポトーシスでは、ミトコンドリア膜電位の消失、カスパーゼの活性化、核の凝縮と断片化、細胞表面へのホスファチジルセリンの露出といった、いくつものイベントが順番に進行していくが、その進行速度は細胞ごとに大きく異なるため、ある細胞集団にアポトーシスを誘導したとしても、全ての細胞でこれらが同時に進行するわけではない。そのため、従来のように多数の細胞の抽出液中の ATP を検出する手法では、細胞死のどのタイミングで ATP 濃度が変化しているのかを知る事は非常に困難であった。

申請者のグループはフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を利用した蛍光 ATP バイオセンサーである「ATeam」を開発した。ATeam を細胞に発現させ、蛍光顕微鏡を用いてライブイメージングをおこなうことで、単一の細胞の細胞内 ATP 濃度変化を計測することが可能である。この技術を用いることでアポトーシスの際の細胞内 ATP 濃度の詳細な挙動を明らかにする事が出来ると期待された。しかし、予備的な実験により ATeam にはアポトーシス時に活性化するプロテアーゼ群であるカスパーゼによって切断される配列が存在すること、そしてアポトーシス細胞の中で ATeam が実際に切断されることが明らかとなった。ATeam は切断されると本来の機能を発揮できないため、アポトーシスの際の細胞内 ATP 濃度の変化を測定することは不可能であった。

2. 研究の目的

ATeam をカスパーゼに対して耐性となるように改変し、個々の生細胞がアポトーシスに至る過程の細胞内 ATP のダイナミクスを分オーダーの時間分解能でイメージング計測する手法を確立する。そして、個々の細胞について細胞内 ATP 濃度とアポトーシスのイベントを並行してイメージングすることで、ATP 濃度変化のタイミングと振る舞いを明らかにすることを目的とした。そして、アポトーシスにおいて細胞内 ATP 濃度の変化が生じる機構、それがアポトーシスの進行に与える影響を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) カスパーゼ耐性 ATeam の開発

ATeam のカスパーゼ切断部位は、一次配列の *in silico* 解析およびリコンビナントカスパーゼによって生じる断片のアミノ酸配列解析より推定した。

(2) イメージング

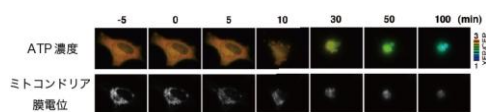
カスパーゼ耐性 ATeam は HeLa 細胞に一過的に発現させた。細胞をアクチノマイシン D や抗 FAS 抗体などで処理することによってアポトーシスを誘導し、蛍光ライブイメージングをおこない、アポトーシス細胞内の ATP 濃度変化の計測をおこなった。ミトコンドリア膜電位はトリメチルローダミンによって、ホスファチジルセリンは Alexa647-AnnexinV によって、核は Haechst33342 によって可視化した。

4. 研究成果

(1) カスパーゼ耐性蛍光 ATP プロブの開発

ATeam の一次配列の *in silico* 解析より、配列内に 1 ヶ所のカスパーゼ切断部位が予想された。その切断予想部位のアスパラギン酸をグリシンに置換したが、アポトーシス時の切断は完全には抑制されなかった。そこで、精製した ATeam をカスパーゼによって処理した際に切断されて生じる断片の N 末端アミノ酸配列を解析することにより、上記とは別の切断部位を決定した。上記の変異に加え、この切断部位のアスパラギン酸をアスパラギンに置換し、ATeamDNDG を得た。精製した ATeamDNDG はカスパーゼによる切断を受けなかった。また、ATeamDNDG を発現する哺乳類細胞にアポトーシスを誘導しても、切断は観察されなかった。以上の結果から、ATeamDNDG はカスパーゼに耐性であると結論した。

(2) 細胞質 ATP 濃度はカスパーゼの活性化後に減少する



アポトーシス細胞の ATP 濃度変化

ATeamDNDG を HeLa 細胞に発現させ、単一のアポトーシス細胞の細胞質 ATP 濃度を経時的に計測した。アポトーシス刺激直後は顕著な ATP 濃度の変化は観察されなかったが、ミトコンドリア膜電位が減少を始めると、それに続いて細胞質 ATP 濃度は減少を開始し、およそ 1~2 時間以内にほぼ枯渇した。ミトコンドリア膜電位はカスパーゼ 3 の活性化とほぼ同時に減少を開始しており、細

胞質 ATP 濃度の減少はカスパーゼ 3 の活性化直後に始まるということが明らかとなった。

(3) アポトーシスにおける細胞質 ATP 濃度減少の機構

では、どのような機構でアポトーシス細胞では細胞質 ATP 濃度が減少しているのだろうか？可能性として、(i)ミトコンドリア膜電位の低下に伴う ATP を合成能の消失と、ATP 合成酵素の逆反応による ATP の加水分解の亢進、(ii)ミオシンの過剰活性化による ATP 消費の亢進、(iii)PANX1 チャンネルを介した細胞外への ATP の漏出、の 3 つの可能性が考えられた。(i)の可能性を確かめるため、アポトーシスを誘導していない細胞を脱共役剤である CCCP で処理して人為的にミトコンドリア膜電位を消失させた。その結果、顕著な細胞質 ATP 濃度の減少は観察されなかった。この結果は、HeLa 細胞を始めとするがん細胞が ATP 合成を解糖系に強く依存していることと一致している。すなわち、少なくとも解糖系に ATP 合成を強く依存しているような細胞では、ミトコンドリア膜電位低下はアポトーシス細胞の細胞質 ATP 濃度の低下に大きくは寄与していないと考えられた。次に(ii)の可能性を調べるため、Rock 阻害剤である Y27632 存在下で、アポトーシス細胞の細胞質 ATP 濃度を計測した。アポトーシス細胞では、Rock がカスパーゼによって切断されて活性化型となり、ATPase であるミオシンが過剰に活性化してブレッキングと呼ばれる非常にダイナミックな細胞膜の動きが生じる。しかし、Y27632 処理をおこなっても ATP の減少はほとんど抑制されなかった。したがって、ミオシンの過剰活性化による ATP 消費の亢進は、アポトーシス細胞の ATP 濃度を低下させるほどの効果はないと考えられた。続いて(iii)の可能性を検討した。アポトーシス細胞は細胞膜に存在する PANX1 へミチャンネルを介して ATP を放出し、それによって貪食細胞を誘引するという報告がある。PANX1 が C 末端部分をカスパーゼ 3 によって切断されて活性化すると、ATP は細胞内から細胞外へと漏出する。そこで、PANX1 チャンネルの阻害剤プロベネシド存在下でアポトーシス細胞の細胞質 ATP 濃度の経時変化を計測した結果、アポトーシス細胞の ATP 濃度低下は顕著に抑制された。一方、PANX1 を過剰発現させた場合は細胞質 ATP 濃度の現象が著しく促進された。以上の結果は、カスパーゼによって活性化された PANX1 からの ATP の漏出が、アポトーシス細胞の ATP 低下の主たる原因であることを強く示唆している。

(4) アポトーシス細胞のブレッキングは細

胞質 ATP 濃度によって制御されている

アポトーシス細胞のブレッキングは一般的にカスパーゼ活性化後に最も激しく起こり、徐々に弱まっていく。ブレッキングはミオシンの過剰活性化によって引き起こされるため、細胞質 ATP がブレッキングに関与している可能性が考えられた。そこで、PANX1 を過剰発現させ、カスパーゼ活性化後速やかに細胞質 ATP を低下させたところ、ブレッキングはほとんど観察されなかった。一方、プロベネシドによって ATP の低下を抑えたところ、ブレッキングは弱まることなく継続した。細胞膜のブレッキングは核の断片化に必要とされるという報告があったことから、核の断片化についても調べた。その結果、PANX1 を過剰発現した際には核の断片化はほとんど観察されなかった。これらの結果は、PANX1 がアポトーシス細胞の ATP 濃度を通じてブレッキングと核の断片化を制御している事を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 今村博臣、安東友美、藤川誠. 細胞内 ATP の分布とダイナミクス、その制御 (2013) 生物物理, 53, 20-23. DOI: 10.2142/biophys.53.020 査読有
2. Waldeck-Weiermair M, Alam MR, Khan MJ, Deak AT, Vishnu N, Karsten F, Imamura H, Graier WF, Malli R. Spatiotemporal correlations between cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ signals using a novel red-shifted mitochondrial targeted cameleon. (2012) PLoS ONE, 7, e45917. DOI:10.1371/journal.pone.0045917 査読有
3. Hatsugai N, Koldenkova VP, Imamura H, Noji H, Nagai T. Changes in cytosolic ATP levels and intracellular morphology during bacteria-induced hypersensitive cell death as revealed by real-time fluorescence microscopy imaging. (2012) Plant Cell Physiol, 53, 1768-1775. DOI:10.1093/pcp/pcs119 査読有
4. Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. Assessing the actual contribution of IF1, an inhibitor of mitochondrial F₀F₁, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology and cell viability. (2012) J Biol Chem, 287, 18781-18787. DOI: 10.1074/jbc.M112.345793 査読有

5. Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. (2012) PLoS Pathogens, 8, e1002561. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002561 査読有
 6. Nakano M, Imamura H, Nagai T, Noji H. Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at single cell level. (2011) ACS Chem Biol, 6, 709-7015. DOI: 10.1021/cb100313n 査読有
- [学会発表] (計 14 件)
1. Sakamoto S, Kakizuka A, Imamura H, Imaging of intracellular ATP dynamics in single apoptotic cells, 11th International Student Seminar, 2013.3.10, Kyoto University, Japan
 2. 坂本修一朗、野地博行、垣塚彰、今村博臣、アポトーシスにおける細胞内 ATP の挙動の解析、日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会、2012.12.24、岡山大学 (岡山)
 3. Imamura H, Tsuyama T, Uemura T, Kakizuka A, Fluorescent ATP biosensor optimized for imaging of cells from non-vertebrate model organisms, International Symposia “New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences”, 2012.9.28, University of Tokyo, Japan.
 4. Imamura H, Tsuyama T, Kishikawa J, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, Genetically-encoded ATP biosensor for low temperatures, 17th European Bioenergetic Conference, 2012.9.19, University of Freiburg, Germany.
 5. 坂本修一朗、野地博行、垣塚彰、今村博臣、Pannexin1 は細胞内 ATP レベルを制御することでアポトーシスの進行に重要な役割を果たす、日本生体エネルギー研究会 第 37 回討論会、2012.12.21、京都産業大学 (京都)
 6. 小池雅昭、今村博臣、垣塚彰、飢餓条件下における VCP タンパク質の機能解析、日本生体エネルギー研究会 第 37 回討論会、2012.12.21、京都産業大学 (京都)
 7. Imamura H, Distribution and dynamics of ATP level inside living cells, 1st NIBB-Princeton Symposium, 2011.11.1, Okazaki Conference Center, Japan
 8. 今村博臣、野地博行、垣塚彰、ミトコンドリア ATP 濃度は細胞質 ATP 濃度とは半独立に制御されている、第 84 回日本生化学会大会、2011.9.22、京都国際会館 (京都)
 9. 今村博臣、ATP 結合タンパク質を利用した細胞内 ATP の可視化、酵素工学研究会 第 65 回講演会、2011.4.22、京都テルサ (京都)
 10. 中野雅裕、今村博臣、野地博行、細胞内 ATP とカルシウムの同時イメージング、第 2 回光塾、2010.12.11、大阪大学 (大阪)
 11. 中野雅裕、今村博臣、野地博行、Red-shifted genetically-encoded fluorescent ATP indicators enabled simultaneous imaging of ATP and Ca²⁺ inside single living cells、第 48 回日本生物物理学会年会、2010.9.20、東北大学 (宮城)
 12. Imamura H, Nakano M, Noji H, Simultaneous ratiometric imaging of ATP and Ca²⁺ concentrations inside single living cells, 16th European Bioenergetics Conference, 2010.7.21, University of Warsaw, Poland.
 13. Kishikawa J, Fujikawa H, Imamura H, Yasuda K, Ishii N, Mitani S, Noji H, Yokoyama K, ATP concentration change in Caenorhabditis elegans, 16th European Bioenergetics Conference, 2010.7.19, University of Warsaw, Poland.
 14. Imamura H, Imaging of intracellular ATP: Looking into cells through ATP, NIG Symposium 2010 “New Frontiers in Genetics”, 2010.4.9, National Institute of Genetics, Japan
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
今村 博臣 (IMAMURA HIROMI)
研究者番号 : 20422545
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし