

細胞死の過程で、なぜ ATP 濃度が下がるのか

死にゆく細胞の ATP 濃度変化を詳細に可視化することに成功

積極的に ATP 濃度を下げる因子を明らかに

ポイント

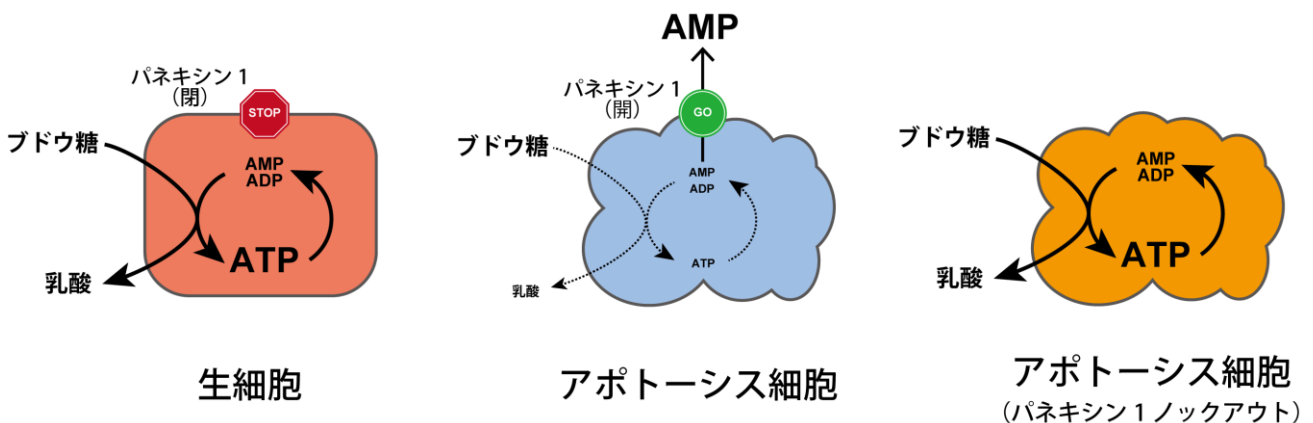
- ・細胞死の過程で分解されずに ATP 濃度を可視化できる改良型蛍光 ATP バイオセンサーの開発
- ・細胞死の際にパネキシン 1^{注1)} の働きにより、細胞内の ATP 濃度が急速に低下することを観察
- ・パネキシン 1 の働きを阻害すると、細胞内の ATP 濃度が下がりにくくなり、無駄にグルコースを消費し続けることが明らかに

概要

京都大学大学院 生命科学研究科 今村博臣准教授らの研究グループは、独自に開発した蛍光バイオセンサーを用いることで、アポトーシスと呼ばれる細胞死が起こる際の ATP 濃度の変化の様子を詳細に捉えることに成功しました。

ATP は、生体高分子の生合成や分解などの代謝反応を進めたり、神経細胞の膜電位を保ったり、筋肉細胞を収縮させるのに必要なエネルギーの運搬体として働く物質です。私たちヒトを含む全ての生物において、ATP はエネルギー運搬体として細胞が生きる上で欠かすことのできない極めて重要な物質です。これまで、死んだ細胞では細胞内に ATP がほとんど残っていないことが知られていましたが、細胞内 ATP 濃度が細胞死のどのタイミングで低下するのか、そしてどのような仕組みで低下するのかについては、これまで詳しくは分かっていませんでした。研究グループでは、単一細胞内の ATP 濃度を詳細に計測するための改良型蛍光 ATP バイオセンサーを開発し、細胞死が進行する中で、ATP の原料となる AMP が細胞から積極的に排出されることにより、細胞内の ATP の急速な低下が起こっていることを見出しました。この AMP を排出する因子が働かないようロックアウトした細胞では、細胞死が始まっても、ATP の低下が抑制されるために死んでも死にきれず、長時間にわたって収縮運動を続ける様子が観察されたほか、細胞の栄養分であるブドウ糖を消費し続けることも明らかになりました。

本成果は、2020 年 10 月 15 日に国際学術誌「eLife」にオンライン掲載されました。



1. 背景

生きた細胞では、ブドウ糖などに含まれる化学的なエネルギーを使うことによって、代謝反応などで消費される ATP をその分解物である ADP から再合成し、細胞内の ATP 濃度が保たれています。一方で、死んだ細胞では、ほとんど ATP が残っていません。細胞死の過程は、同一条件で培養した場合でも、それぞれの細胞において挙動にばらつきが見られるため、ATP の減少が細胞死のどのタイミングで起こるか判断が難しく、また、ATP が減少する仕組みもほとんど分かっていませんでした。

2. 研究手法・成果

研究グループでは、これまでに細胞内 ATP 濃度を単一細胞レベルで可視化・計測するための FRET バイオセンサー^{注2)} (蛍光バイオセンサー) を開発しており、ATeam と名付けています。今回、細胞死の過程において、安定して細胞内の ATP 濃度を計測できるように蛍光バイオセンサーに改良を加えました。また、細胞死の進行を計測するため、カスパーゼ^{注2)} 3 を検知する蛍光バイオセンサーも同時に開発しました。この二つのバイオセンサーを同一細胞の中に送り込み、ATP 濃度とカスパーゼ 3 の活性の両方を同時に計測することによって、カスパーゼ 3 活性化後の ATP 濃度の挙動を異なる細胞間で正確に比較することが可能になりました。HeLa 細胞において解析したところ、カスパーゼ 3 の活性が高まるタイミングの直後から ATP 濃度の低下が始まるのが明らかになりました。(図 1)

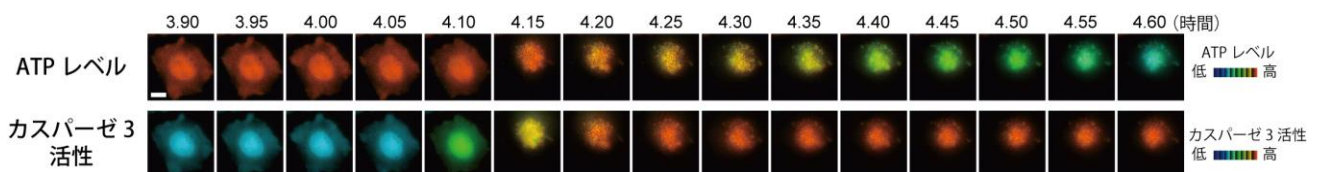


図 1 細胞死が生じる際の ATP 濃度とカスパーゼ 3 活性

単一細胞内のカスパーゼ 3 活性が高まるタイミングの直後から ATP 濃度が下がることが見て取れる。(赤：ATP 濃度やカスパーゼ 3 活性の高い状態 青：ATP 濃度やカスパーゼ 3 活性の低い状態)

次に ATP 濃度低下の要因を探るために、ATP の原料となる AMP を細胞外に排出する働きをもつパネキシン 1 遺伝子を CRISPR-Cas9 を用いてノックアウト (働かなくさせた) させた細胞を用いて、単一細胞内の ATP 濃度とカスパーゼ活性を測定しました。すると、カスパーゼ 3 の活性が上がり、細胞死の指標の一つであるホスファチジルセリンが細胞表面に出るとい現象が見られたにもかかわらず、ATP の低下は著しく遅くなりました (図 2)。

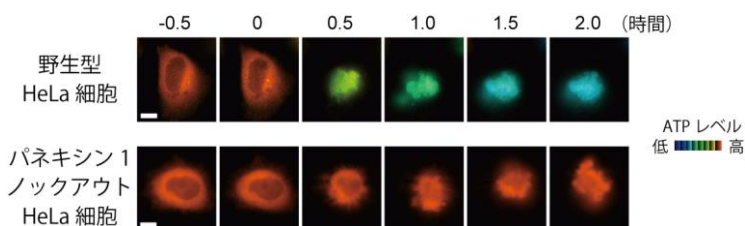


図 2 パネキシン 1 をノックアウトした HeLa 細胞での細胞死と ATP 濃度の関係

パネキシン 1 をノックアウトした HeLa 細胞では、カスパーゼ 3 の活性化後 2 時間経過しても細胞内の ATP 濃度がほ

とんど低下することなく保たれている。(赤：ATP 濃度の高い状態 青：ATP 濃度の低い状態)

さらに、パネキシン 1 ノックアウト細胞の様子を観察したところ、長時間にわたって細胞のグルコース消費は止まらず、ブレッピングと呼ばれる細胞の収縮運動も持続することがわかりました (動画 1)。

動画 1 長時間にわたり収縮運動を続けるパネキシン 1 ノックアウト細胞

通常はカスパーゼの活性化後短時間で収束する収縮運動が長時間持続する様子が見られる。

<https://elifesciences.org/articles/61960#video2>

3. 波及効果、今後の予定

今回、研究グループが開発した ATeam (蛍光バイオセンサー) は、細胞死の過酷な細胞環境でも機能することから、今後、細胞死のメカニズムについてより詳細に解析することが可能になり、細胞の生と死についての境界についてより詳細な知見が得られることが期待できます。また、ATP 濃度を指標とした薬剤スクリーニングにも威力を発揮することが期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費補助金 若手研究 A (22687011)、挑戦的萌芽研究 (24657101)、挑戦的萌芽研究 (16K14709) の援助でおこなわれました。大阪大学、東北大学、ウエスタンオンタリオ大学 (カナダ) との共同研究成果です。

<用語解説>

注 1 パネキシン 1

ATP の原料となる AMP 等を透過する膜タンパク質。

注 2 FRET バイオセンサー

共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer : FRET) の原理を利用した蛍光バイオセンサーのこと。イオン濃度や、情報伝達物質の濃度、酵素の活性など様々な生命現象について、リアルタイムで観察可能なバイオセンサーが数多く開発されている。

注 3 カスパーゼ

細胞死の際に、様々なタンパク質を分解する活性をもつ酵素で、細胞死の過程で中心的な役割を果たす。

<研究者のコメント>

細胞が生きていくために欠かせない ATP ですが、細胞がその濃度を制御する仕組みについては、不明な点がまだ多く残されています。私たちが開発してきた細胞内 ATP 濃度可視化技術を用いることによって、その疑問に迫ってきたいと考えています。

<論文タイトルと著者>

タイトル : Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated programmed ATP loss during apoptosis (アポト

ーシス時のパネキシン1によるプログラムされた ATP 減少の単一細胞におけるダイナミクスについて)

著 者 : Hiromi Imamura, Shuichiro Sakamoto, Tomoki Yoshida, Yusuke Matsui, Silvia Penuela, Dale W Laird, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Akira Kakizuka

掲 載 誌 : eLife DOI : 10.7554/eLife.61960