

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07782

研究課題名(和文) 光刺激反応系を用いたCa²⁺依存性の膵外分泌機構の解明研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of the Ca²⁺ dependent exocrine pancreatic secretion by optogenetic control

研究代表者

中村 京子 (Nakamura, Kyoko)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90578858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内のCa²⁺動態は、多様な生命現象のトリガーとして重要な役割を担っている。本研究では膵腺房細胞からの消化酵素の分泌に関与するCa²⁺動態の解析を目的とした。我々はこの細胞における細胞内Ca²⁺上昇パターンがムスカリン作動性アセチルコリン受容体(mAChR)サブタイプ特異的な様式で引き起こされることを明らかにしているが、その特異的な変動パターンと消化酵素分泌様式の関係については未解決である。本研究ではこのmAChRのサブタイプ特異的なCa²⁺応答パターンをオプトジェネティクスで制御し、消化酵素分泌におけるその関与を解明するための足掛かりとした。

研究成果の概要(英文)：Intracellular Ca²⁺ plays important roles as triggers for multiple biological phenomena. The aim of the present study was to clarify the role of intracellular Ca²⁺ for the release of digestive enzymes from pancreatic acinar cells. We found mAChR subtypes-dependent characteristic patterns of Ca²⁺ dynamics in the cell induced by an agonist (ACh). However, the relationship between the Ca²⁺ dynamics and the enzyme-release remain unknown. In the present study, we tried to get some clues to rule out the relationship between the enzyme release and the intracellular Ca²⁺ dynamics by an optogenetic method.

研究分野：細胞生理学

キーワード：カルシウムシグナリング ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 光刺激

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} はあらゆる生命現象の根幹をなしており、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇することによって、分泌、受精、収縮など、生命の維持に不可欠な生理的現象が誘導される。しかしながら、細胞内の Ca^{2+} の重要性、およびそれにより引き起こされる現象、それぞれは詳細に研究されてきているが、両者を直結させた報告は未だないのが現状である。細胞内の Ca^{2+} 濃度の、様々な上昇パターンがどのように生理現象に関与しているか、その直接的な根拠を解明することは、将来的に Ca^{2+} ハンドリングの側面からの創薬へのアプローチに重要な手掛かりとなる。

我々はこれまでに膵臓の外分泌機能を担う腺房細胞を用いて、アセチルコリン(ACh)誘発性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇パターンに、ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(mAChR)サブタイプ間で顕著な違いがあることを明らかにした。外分泌は副交感神経によって調節され、副交感神経の神経伝達物質であるAChが、mAChRを介して引き起こした細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化がトリガーとして機能している。その分泌に関わる Ca^{2+} 濃度の上昇には特有な時空間的パターンがあり、それによって腺房細胞からの消化酵素と電解質の分泌がコントロールされていると推察される。膵臓外分泌は、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇することにより、分泌顆粒が膜に融合して開口放出が起こる。膵臓の機能は生命維持に必須であり、このメカニズムの崩壊は急性膵炎などの重篤な病態を引き起こす。しかし現在即効性のある有効な治療法はなく、食事制限や、酵素活性抑制剤、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制する薬などが考えられているくらいである。

膵臓の腺房細胞は、ACh誘発性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に振動(oscillation)を伴う特徴的なパターンを呈するため、まずはこの系に焦点を絞り、開口放出による消化酵素の分泌と、それを引き起こす Ca^{2+} 濃度の上昇パターンとの関連性を詳細に解明することで、最終的には Ca^{2+} ハンドリングの側面からの創薬へのアプローチの第一歩になればと考えた。我々はmAChRサブタイプであるタイプ1(M1)とタイプ3(M3)のノックアウト(KO)マウスから単離した膵腺房細胞を用いて、それぞれを介するACh誘発性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇パターンにおいて、M3KOは振動を伴わないがM1KOは多数の細胞で振動を伴うことを見出した。またそれぞれのサブタイプを単独に発現させた株化細胞での Ca^{2+} 動態観察で、M1のみでは振動を伴わず、M3のみでは振動を伴うことが多いことが確認できている。これまでmAChRのどのサブタイプが、どのようにACh誘発性の Ca^{2+} 濃度上昇パターンに関与しているかは不明であった。ここで分泌に関与しているサブタイプ間での Ca^{2+} シグナルが異なる結果が示されたことで、そこに膵外分泌機能調節の鍵があると考えた。また我々

は、それぞれのサブタイプによって、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇パターンの違いを生み出す分子メカニズムを、数種類のM1とM3のキメラ受容体を作製して株化細胞に導入し、アゴニスト誘発性の Ca^{2+} 動態を観察することにより調べ、細胞内第三ループ(i3 loop)とC末端領域が重要であることを見出した。

これまで細胞内の Ca^{2+} 動態を観察するには薬物刺激、電気刺激などが主であった。これは Ca^{2+} の動態のみを観察するには適しているが、生理現象との相関関係を調べるには厳しい点が多い。そこでここ10数年程の間に急速に発展してきたオプトジェネティクス的手法を用いることで、その関係を明らかにする足掛かりにならないかと考えた。オプトジェネティクスは光で細胞内イベントを操作する手法で、従来のように細胞に対して薬物刺激ではないため、ダメージの少ない無侵襲な状態を保て、時間分解能も格段に上げられる利点がある。今や脳神経分野では欠かせなくなっており、毎年多くの画期的な報告がされてきている。2009年にはGタンパク質共役型受容体と光感受性タンパク質とのキメラ受容体である光駆動型Gタンパク質共役型受容体、opto-XR(opto- α_1 AR)が作製され、光刺激による細胞内の Ca^{2+} 動態の観察が報告された(文献)。その後2013年に μ -opioid受容体とのキメラ受容体(opto-MOR)でも細胞内 Ca^{2+} 上昇の報告がされている(文献)。Gタンパク質共役型受容体は言わずと知れた細胞内情報伝達の立役者であり、生命維持を司る様々な生理現象の上流の因子である。また多くの疾患にも関与しているため、薬剤市場における重要な創薬ターゲットでもある。このように生理現象に大きく関与しているGタンパク質共役型受容体と、光感受性タンパク質とを組み合わせることで、 Ca^{2+} 動態と生理機能を結び付け、その関連性を調べることの意義は大きい。

もはやオプトジェネティクス的手法は、脳神経分野のみならず非興奮性細胞でも新しい知見が得られることが可能になっている。そこで膵腺房細胞の消化酵素分泌に関与しているGタンパク質共役型受容体であるmAChRにこのツールを応用して細胞内 Ca^{2+} 動態を光でコントロールし、 Ca^{2+} 動態と生理機能を結び付けることを試みた。

2. 研究の目的

上述のように、細胞内の Ca^{2+} の動きが、生理機能が遂行される上で多くの重要な役割を担っていることは明らかであるが、 Ca^{2+} 動態-生理現象を結びつけることは手法的に厳しい側面もあり、これまでに報告はほとんどされていない。膵臓の外分泌機能を担う腺房細胞では、ACh誘発性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇パターンにmAChRのサブタイプ間で顕著な違いがあることがわかっている。細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は、膵臓の機能遂行に重要な発動因子であり、また細胞内 Ca^{2+} 濃度の過度な

上昇は機能不全の原因でもある。Ca²⁺シグナルが酵素分泌などの生理現象をどのように制御しているのかを知ることは、膵臓の機能異常や病態に関わる要因解明への足掛かりとなると考えられる。以上のことから本研究では mAChR に着目し、Ca²⁺シグナルが酵素分泌をどのようにコントロールしているのかを探っていく。そのために、optogenetics の手法を用い、

(1) mACh のサブタイプ M1 と M3 と、光感受性タンパクとのキメラ受容体を作製して株化細胞に発現させ、光で細胞内 Ca²⁺濃度の上昇パターンを制御するツールをスクリーニングし、開発する。

(2) 上記ツールを膵臓細胞由来の株化細胞 (AR42J: 消化酵素産生、分泌可能細胞) に導入して、異なる Ca²⁺濃度の上昇パターンを誘導する光照射の条件を検討し、それぞれの条件下における消化酵素の分泌を促し、ツールの有効性を明らかにする。

(3) マウスの膵臓から単離した腺房細胞に上記キメラ受容体を発現させ、光照射で細胞内 Ca²⁺濃度上昇のパターンを誘導して消化酵素を分泌させ、その収量を測定する。これにより、実際の膵臓細胞での Ca²⁺動態と消化酵素の分泌パターンとの関連性を明らかにする。これらの結果を元に、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇パターンと酵素分泌の解析を行い、相互関係を明らかにしていく。このデータで、どのような Ca²⁺濃度上昇パターンのときに、どの消化酵素がどのくらい分泌されるのかを示すことができ、細胞内 Ca²⁺動態と生理現象を直接結び付けた知見を検証する。

3. 研究の方法

(1) mAChR サブタイプ M1 および M3 と光感受性タンパクとのキメラ受容体(opto-XR)の作製:

光感受性タンパク質であるロドプシンの細胞内ドメインである loop1, loop2, loop3 領域を、mAChR サブタイプ M1 および M3 の相当部分と置換して融合する。C 末端には、発現細胞を同定するために赤色蛍光タンパクである tdTomato をタグとして付加する。

(2) キメラ受容体発現細胞でのカルシウムイメージング (測定系の確立):

作製したキメラ受容体を HEK293 細胞に発現させて細胞内の Ca²⁺動態を測定する。タグとして付加した赤色蛍光タンパク、および光刺激の波長から、細胞には Ca²⁺蛍光指示薬として fura-2 を負荷し、光刺激は LED 光源より青色光を照射する。ポジティブコントロールとして、opto-α₁AR (文献) に同じ tdTomato をタグとして付加した受容体を細胞に発現させ、光刺激による細胞内 Ca²⁺イメージングを行い、測定条件をその結果を元に検討する。

(3) 膵臓由来細胞および単離膵腺房細胞での細胞内 Ca²⁺濃度上昇パターン誘導:

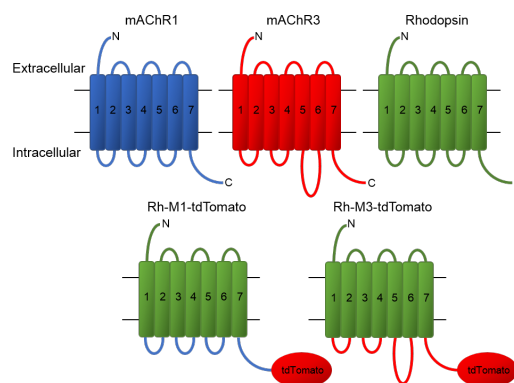
アミラーゼなどの消化酵素を産生、分泌できるラット膵腫瘍由来の株化細胞である AR42J にリポフェクションで、またマウスの膵臓から単離した腺房細胞には組み換えアデノウイルスベクターにより作製したキメラ受容体を発現させ、光刺激で細胞内 Ca²⁺濃度上昇を振動の有無を焦点に観察する。

(4) 膵臓細胞での光刺激による分泌酵素の測定:

上記で決定した Ca²⁺濃度上昇の時間パターンを誘導する光刺激条件を細胞に課し、測定メディアムを採取して分泌された消化酵素 (アミラーゼ、リパーゼ、トリプシン) 活性を測定し、細胞内 Ca²⁺濃度上昇パターンと消化酵素分泌との関連性を総合的に評価し、その関係を明らかにする。

4. 研究成果

mAChR サブタイプ M1 および M3 と光感受性タンパクとのキメラ受容体(opto-XR)の作製; mAChR サブタイプ M1 および M3 と、光感受性タンパク質ロドプシンのキメラ受容体を作製した。ロドプシンの細胞内領域を、M1 および M3 の相当部分(i1, i2, i3 loop および C 末端)と置換し、C 末端に発現細胞同定用として赤色蛍光タンパク質である tdTomato を付加した。(図 1)



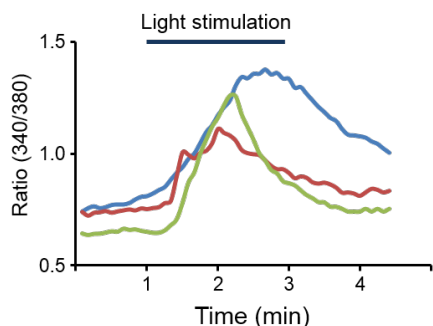
(図1)キメラ受容体の構造

キメラ受容体は、置換領域が mAChR の i3 loop と C 末端、i2, i3 loop と C 末端、i1, i2, i3 loop と C 末端を作製し、それぞれを HEK293 細胞に発現させて、蛍光 Ca²⁺指示薬である fura-2 を負荷して光刺激による細胞内 Ca²⁺動態を観察した。その際の光刺激は LED 光源から 490 nm の波長を抽出して照射した。ポジティブコントロールの opto-α₁AR-tdTomato を HEK293 細胞に発現させて、Ca²⁺蛍光指示薬 fura-2 を負荷し、光刺激で細胞内 Ca²⁺動態を観察したところ、発現細胞において大きな Ca²⁺上昇が見られたのでこの測定系を用いて測定した。

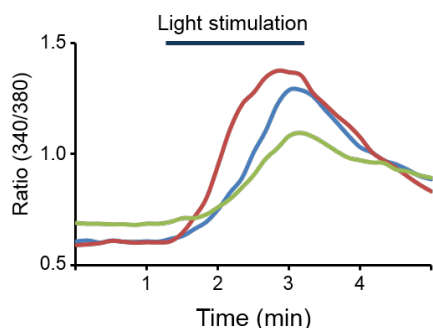
キメラ受容体発現細胞において、細胞内領域をすべて mAChR に置換した Rh-M1-tdTomato

および Rh-M3-tdTomato 発現細胞でいくつかの細胞で Ca^{2+} 上昇が観察された。(図2) 図はそれぞれの受容体発現細胞での Ca^{2+} 上昇典型的なトレースを示す。光刺激が始まると細胞内の Ca^{2+} が上昇し始め、刺激が終わると元のレベルに戻る方向に動いていた。

Rh-M1-tdTomato



Rh-M3-tdTomato



(図2) 光刺激時の Ca^{2+} 上昇の典型例

しかし振動の有無を確認できるまでは至らず、またアゴニスト(ACh)誘発性の Ca^{2+} 上昇に比べ反応速度が遅かったことも改良すべき課題となった。 Ca^{2+} 上昇のパターン制御を目指すために今後はさらに精度の高いツールの開発に取り組んでいく。

<まとめ>

膵腺房細胞における Ca^{2+} 依存的な外分泌機構は、振動の有無と言う Ca^{2+} 上昇パターンが大きく関与している可能性が高い。それは mAChR のサブタイプである M1 と M3 が、 Ca^{2+} 上昇をコントロールして分泌を制御していると考えられるからである。M1 および M3 の KO マウスから単離した膵腺房細胞で、カルバコール刺激によるアミラーゼの分泌量を測定した結果各サブタイプで分泌量に違いがあることが報告されている(文献)。その報告と、各サブタイプを介するアゴニスト誘発性の Ca^{2+} 上昇のパターンに違いがあると言う我々の報告を考え合わせると、 Ca^{2+} 動態のパターン、つまり Ca^{2+} 振動の有無が消化酵素の分泌量を制御していることが推察される。

このことを証明するためにも、今回の手法およびツールの活用は大きな利点となる。測定

系確立のためのポジティブコントロールとして用いた、opto- α_1 AR-tdTomato(文献)発現細胞での光刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇は、報告されている様相よりもかなり大きく、また反応速度も早いレベルで検出できた。この系を用いて、mAChR ベースのキメラ受容体で振動を伴った Ca^{2+} 上昇パターンが確認できるツールを開発し、光でパターン制御できれば膵臓の外分泌機構と細胞内 Ca^{2+} 動態との関連性の解明が期待できる。今後も引き続き精度の高いツールの開発と、測定系のさらなるグレードアップを目指す。

今回は膵腺房細胞において、キメラ受容体を介した細胞内 Ca^{2+} 上昇による酵素分泌誘導までは確認できなかったが、 Ca^{2+} 動態と生理現象との関連を調べる上で Ca^{2+} 上昇パターンを制御できるさらなるツールの開発を目指すための足掛かりとなった。

<引用文献>

Temporally precise in vivo control of intracellular signaling. Airan RD, et al. Nature, 458(7241):1025-9, 2009

Design and functional evaluation of an optically active μ -opioid receptor. Barish PA, et al. European Journal of Pharmacology, 705: 42-48, 2013

Cholinergic stimulation of amylase secretion from pancreatic acinar cells studied with muscarinic acetylcholine receptor mutant mice. Gautam D, et al. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 313: 995-1002, 2005

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 京子 (NAKAMURA, Kyoko)
順天堂大学・医学部・非常勤助教
研究者番号: 90578858

(2) 研究分担者

濱田 耕造 (HAMADA, Kozo)
理化学研究所・脳科学総合研究センター・
研究員
研究者番号: 00311358