

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 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590977

研究課題名（和文） ATP プローブを用いた膵島、骨格筋、心筋細胞内 ATP 濃度リアルタイムモニタリング

研究課題名（英文）Real-time measurement of intracellular ATP concentration using novel fluorescent ATP probe.

研究代表者

長嶋 一昭 (NAGASHIMA KAZUAKI)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40324628

研究成果の概要（和文）：蛍光エネルギー移動(FRET)を利用した新規蛍光 ATP プローブを用いて各種刺激下での膵β細胞内 ATP 濃度変化を測定し、Fura2-AM を併用した細胞内 Ca²⁺濃度同時測定のを構築し生理学的条件下での膵β細胞内イオン濃度変化を測定した。さらに、ATeam 遺伝子を導入した蛍光 ATP プローブ遺伝子導入(Tg)マウスを作成し、その単離膵β細胞で ATeam が機能し、細胞内 ATP 濃度に応じて FRET 反応を示すことを確認し、同マウス単離膵島を用いた解析を推進中である。

研究成果の概要（英文）：To visualize intracellular ATP levels in physiological conditions, we generated a series of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based indicators for ATP. Using the fluorescent ATP probe and the fluorescent Ca²⁺ probe Fura2-AM, we carried out dual measurements of intracellular ATP and Ca²⁺ concentrations of living pancreatic beta-cell lines in the physiological conditions. And we also generated the transgenic (Tg) mouse expressing ATP probe protein in pancreatic beta-cells. We are now carrying out several functional experiments using the Tg mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常・ATP・K_{ATP} チャンネル・糖尿病

1. 研究開始当初の背景

生体のエネルギー通貨と称される ATP は、細胞内代謝および機能調節に深く関わっている。細胞内 ATP 濃度変化の測定は、細胞機能調節の理解に極めて重要であるが、従来までの細胞内 ATP 濃度測定は、定点測定で

あり、生細胞のまま経時的測定ができず、繊細な動態を示す細胞内代謝変化を理解する上で全く不十分であった。本申請者は、これまで糖尿病研究、特にインスリン分泌メカニズムに関して継続して研究してきた。K_{ATP} チャンネル欠損マウスを用いて、同チャンネルが生

体内でグルコースおよび経口血糖降下薬刺激による膵β細胞インスリン分泌調節に必須であることを直接的に証明し (Proc Natl Acad Sci USA, 1998)、同チャネルの様々な活性調節因子を検証し (EMBO J, 1999)、経口血糖降下薬の作用機序・薬剤特性の違いに関して検討を行い (Diabetes Res Clin Pract, 2004)、本邦初の Kir6.2 遺伝子異常新生児糖尿病症例を同定し、その遺伝子変異によるチャネル特性変化を電気生理学的手法を用いて直接的に検討してきた (J Clin Endocrinol Metab, 2005)。これら研究過程で、従来の細胞内 ATP 濃度測定は、細胞をつぶしたある時点での定点測定であり、繊細な動態を示す細胞内代謝変化を理解する上で全く不十分であり、ATP 濃度変化とそれにより活性調節され機能発現する K_{ATP} チャネルの生理的条件下での役割の詳細は未だ検証不十分であることを強く実感していた。

2. 研究の目的

本申請研究は、生細胞のまま細胞内 ATP 濃度を実測可能な新たな ATP プローブを作成し、血糖値の恒常性維持の観点から膵β細胞 (インスリン分泌調節に関与) 等における様々な生理的条件下における細胞内 ATP 濃度を実測し、それにより活性調節される K_{ATP} チャネルの生理的役割の実際を検証することを主たる目的とする。

3. 研究の方法

(1) ATP プローブの作成、生細胞での細胞内 ATP 濃度測定

分担研究者今村らは、ATP 合成酵素のサブユニットの一つである ϵ タンパク質の両端に cyan fluorescent protein (CFP) の変異体である mseCFP と yellow fluorescent protein (YFP) の変異体である monomeric (A206K) Venus (改変 mVenus) を遺伝子工学的に連結させ、蛍光エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer; FRET) を利用した蛍光 ATP プローブ (ATeam3.10 および ATeam 1.03) を開発した (Proc Nat Acad Sci USA, 2009)。ATP 結合に伴う ϵ タンパク質の構造変化は2つの蛍光タンパク質の距離と向きに変化をもたらし、結果として mseCFP から改変 mVenus への FRET 効率が変化する。ATeam は ATP に対して非常に特異的で、ADP、GTP、dATP といった類似のヌクレオチドには反応しない。ATeam3.10 および ATeam 1.03 の解離定数 (Kd) は、各々 7.4 μ M および 1.2mM であり、Hella 細胞を用いた検討で、本 ATP プローブは容易に生細胞に遺伝子導入可能であり、細胞内 ATP 濃度によって YFP/CFP ratio が変化することが確認できた。しかしながら、本プローブを膵β細胞株 MIN6 細胞およびラット単離膵島細胞 (膵β細胞) に遺伝子導入し、

低グルコース (2.8mM) から高グルコース (25mM)、または高グルコースから低グルコース変換にて YFP/CFP ratio 変化 (細胞内 ATP 濃度変化) を検討したが、予想以上に膵β細胞内 ATP 濃度は高く、十分な ratio 変化が捕らえられなかった。これらの基礎実験を踏まえて、より Kd 値の大きい ATP プローブを改良する。現存の2種類のプローブに加え、現在作成中のより Kd 値の大きい改良型を含めた、広い ATP 濃度レンジをカバー可能な異なる Kd 値を有する3種類のプローブ

(ATeams) を用いて、膵β細胞株 MIN6 細胞、齧歯類 (ラットおよびマウス) 膵β細胞、骨格筋細胞および心筋細胞における非刺激時および各種刺激 (高濃度グルコース等) 時における細胞内 ATP 濃度を測定する。ATP プローブの細胞への導入には、リポフェクタミン 2000, Opti MEM を用いたリポフェクション法により行い、一波長励起二波長測光および既知濃度 ATP で作成した ATP 濃度-ratio 曲線を用いて、細胞内 ATP 濃度を算出する。さらに同様の試料を従来のルシフェラーゼ法による whole-cell 細胞内 ATP 濃度測定値と比較・検討する。

(2) 細胞質内 ATP 濃度分布の解析

培養細胞 (MIN6 細胞) または組織初代培養細胞に、ATeam をリポフェクション法 (細胞によってはエレクトロポレーション法) により transient に導入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、単一細胞質内の ATP 濃度分布を検討する。各組織での非刺激時の ATP 濃度分布に加え、各種刺激 (膵β細胞においては高濃度グルコースおよび SU 薬剤刺激等) 後の、細胞内 ATP 濃度分布変化を検討する。後述する ATeam の stable 発現 MIN6、さらには ATeam 遺伝子導入マウス作成後は同マウス単離膵島細胞を用いて、より生理的条件下での状態評価のために、同様の検討を行う。

(3) 単一細胞での複数の細胞内シグナル同時モニタリングシステムの構築

膵β細胞インスリン分泌調節で主要な経路である K_{ATP} チャネルを介する経路 (triggering pathway) において、細胞内 ATP 濃度変化と同様に重要な観察対象である、 K_{ATP} チャネル活性、β細胞膜電位、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行う。この同一細胞並列評価により、いくつか提唱されている上記 K_{ATP} チャネルを介する経路以外の経路 (K_{ATP} channel-independent amplifying pathway など) の生理的条件下でのグルコース応答性インスリン分泌で担う重要性および関与するタイミング (タイムコース) を検討する。 K_{ATP} チャネル活性およびβ細胞膜電位はパッチクランプ whole-cell mode にて、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は Fura2-AM を用いた励起波長 340nm/380nm、蛍光波長 510nm の二波長励起一波長測光 (AQUACOSMOS システム; 浜松ホト

ニクス；機材は設置済)にて、膜容量測定はパッチクランプ whole-cell mode (機材は設置済)にて行う。必要に応じて他の細胞内イオン濃度変化；Na⁺, Cl⁻および細胞内 pH を、各種蛍光プローブ；SBFI-AM, MQAE-AM, BCECF-AM にて、対応する励起および蛍光波長フィルターを用いた AQUACOSMOS システムにて測定する。

(4) MIN6-ATeam 細胞の作成

MIN6 細胞にエレクトロポレーション法を用いて ATeam を導入した stable 発現細胞を作成し、コロニー法またはカップ法にて単一細胞回収 (細胞クローニング) を行う。

AQUACOSMOS システムを用いて、一波長励起二波長測光にて測定し、グルコース反応性良好に保っている細胞を選別し、ATeam 導入 stable 細胞株 (MIN6-ATeam) を確立する。同細胞株を用いて transient な系よりもより生理的条件に近い状態で、細胞内 ATP 濃度および高グルコースおよび SU 薬刺激時の ATP 濃度変化を in vitro 解析する。

(5) ATeam 遺伝子導入マウスの作成

ATeam 遺伝子導入した Tg マウスを作成し、生理的条件下での細胞内 ATP 濃度を測定する。また糖尿病モデルマウス等との交配にて、ATeam 発現糖尿病モデルマウスを作成し、膵β細胞等における細胞内 ATP 濃度変化を介した K_{ATP} チャネル機能調節を介するインスリン分泌およびインスリン抵抗性への影響およびメカニズムを生理的条件下で検討する。

4. 研究成果

蛍光エネルギー移動(FRET)を利用した蛍光 ATP プローブ (Proc Nat Acad Sci USA, 2009) 2 種を用いて各種刺激下での膵β細胞内 ATP 濃度変化を解析。従来想定以上に膵β細胞内 ATP 濃度は高く、左記プローブ測定レンジ内で十分な ratio 変化が捕らえられなかった。そのため、上記プローブを改良し、より Kd 値の大きい蛍光 ATP プローブ (GO-ATeam) を新規作成し、膵β細胞株、齧歯類膵β細胞における各種刺激 (高濃度グルコース、スルホニル尿素薬等) 前後の細胞内 ATP 濃度を測定し、Fura2-AM を併用した細胞内 Ca²⁺濃度変化の同時測定の系を構築し生理的条件下での膵β細胞内イオン濃度変化を測定した (論文投稿中)。さらに、ATeam 遺伝子を導入した蛍光 ATP プローブ遺伝子導入(Tg)マウスを作成し、その 5 系統の中で細胞内 ATP 濃度測定に最も適した 1 系統を選別し、その単離膵β細胞で ATeam が機能し、細胞内 ATP 濃度に応じて FRET 反応を示すことを確認した。さらに ob/ob マウスと交配し、Ateam を発現する肥満糖尿病モデルマウスを作製した。現在、同マウス単離膵島を用いた解析を推進中である。

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 13 件)

- (1) Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Kondo Y, Yasuda K, Koizumi A, Inagaki N. Exome sequencing identifies a new candidate mutation for susceptibility to diabetes in a family with highly aggregated type 2 diabetes. **Mol. Genet. Metab.**109: 112-117, 2013 (doi: 10.1016/j.ymgme.2013.02.010) (査読有)
- (2) Sasaki M, Fujimoto S, Sato Y, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Nagashima K, Inagaki N. Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. **Diabetes** 62:1996-2003, 2013 (doi: 10.2337/db12-0903) (査読有)
- (3) Suzuki K, Harada N, Yamane S, Nakamura Y, Sasaki K, Nasteska D, Joo E, Shibue K, Harada T, Hamasaki A, Toyoda K, Nagashima K, Inagaki N. Transcriptional factor regulatory factor X 6 (Rfx6) increases gastric inhibitory polypeptide (GIP) expression in enteroendocrine K-cells and is involved in GIP hypersecretion in high-fat diet-induced obesity. **J. Biol. Chem.** 288: 1929-1938, 2013 (doi:10.1074/jbc.M112.423137) (査読有)
- (4) 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. **PLoS ONE**, 7:e45917, 2012 (doi: 10.1371/journal.pone.0045917) (査読有)
- (5) 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. **Plant. Cell Physiol.**, 53: 1768-1775, 2012 (doi: 10.1093/pcp/pcs119) (査読有)
- (6) Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. Assessing the actual contribution of IF1, an inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology and cell viability. **J. Biol. Chem.**, 287: 18781-18787, 2012 (doi: 10.1074/jbc.M112.345793) (査読有)
- (7) Komoriya Y, Ariga T, Iino R, Imamura H,

- Okuno D, Noji H. Principal role of the arginine finger in rotary catalysis of F1-ATPase. **J. Biol. Chem.**, 287: 15134-15142, 2012 (doi: 10.1074/jbc.M111.328153) (査読有)
- (8) 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. **PLoS Pathog.**, 8: e1002561, 2012 (doi: 10.1371/journal.ppat.1002561) (査読有)
- (9) Kishikawa J, Fujikawa M, Imamura H, Yasuda K, Noji H, Ishii N, Mitani S, Yokoyama K. Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*. **Microsc. Res. Tech.**, 75: 15-19, 2012. (doi: 10.1002/jemt.21103) (査読有)
- (10) Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Yamada C, Funakoshi S, Akitomo K, Takenaka K, Harada K, Koizumi A, M, Inagaki N. GCKR mutations in Japanese families with clustered type 2 diabetes. **Mol. Genet. Metab.**, 102:453-460, 2011 (doi: 10.1016/j.ymgme.2010.12.009) (査読有)
- (11) Liemburg-Apers DC, Imamura H, Forkink M, Nootboom M, Swarts HG, Brock R, Smeitink JA, Willems PH, Koopman WJ. Quantitative Glucose and ATP Sensing in Mammalian Cells. **Pharm. Res.**, 8: 2745-2757, 2011 (doi: 10.1007/s11095-011-0492-8) (査読有)
- (12) Waldeck-Weiermair M, Jean-Quartier C, Rost R, Khan MJ, Vishnu N, Bondarenko AI, Imamura H, Malli R, Graier WF. The leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (LETM1) and uncoupling proteins-2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca^{2+} uptake pathways. **J Biol Chem**, 286: 28444-28455, 2011 (doi: 10.1074/jbc.M111.244517) (査読有)
- (13) Nakano M, Imamura H, Nagai T, Noji H. Ca^{2+} regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at single cell level. **ACS Chem. Biol.**, 6: 709-715, 2011 (doi: 10.1021/cb100313n) (査読有)
- [学会発表] (計 8 件)
- (1) Nagashima K, Yorifuji T, Tanaka D, Inagaki N. Genetic and functional analyses of KATP channel gene mutations in patients with neonatal diabetes in Japan. 第 90 回日本生化学会大会, Symposium, Oral presentation, 2013.3.27-29、東京 (船堀)
- (2) Nagashima K, Yorifuji T, Sasaki M, Tanaka D, Ogura K, Sato H, Tahara Y, Yamano G, Sato Y, Sugizaki K, Ogura M, Inagaki N. Molecular analyses of Japanese patients with neonatal diabetes. **9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress/ 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes**. Oral presentation, 2012.11.24-27, Kyoto
- (3) 長嶋一昭, 佐々木真弓, 田中大祐, 稲垣暢也. 日本人新生児糖尿病の発症頻度、発症原因遺伝子および遺伝子変異部位による薬効変化に関する検討. 第 55 回日本糖尿病学会総会. (シンポジウム, 口演, 2012.5.17-19, 横浜)
- (4) 長嶋一昭, 今村博臣, 田中 喬, 田中大祐, 稲垣暢也. 蛍光プローブを用いた膵β細胞内 ATP および Ca^{2+} 濃度同時測定を試み. 第 55 回日本糖尿病学会総会. ポスター, 2012.5.17-19, 横浜
- (5) Nagashima K, Tohru Yorifuji T, Sasaki M, Tanaka D, Inagaki N. Functional analysis of KCNJ11 mutation in neonatal diabetes. **3th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD)**. Oral presentation, 2011.7.22-24, 北京 (中国)
- (6) Imamura H. Distribution and dynamics of ATP level inside living cells. **1st NIBB-Princeton Symposium**. 口演, 2011 年 11 月 1 日, 岡崎
- (7) 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. 酵素工学会 第 65 回講演会, 口演, 2011 年 4 月 22 日, 京都
- (8) Imamura H. Imaging of intracellular ATP: Looking into cells through ATP. **NIG Symposium 2010 "New Frontiers in Genetics"**, 口演, 2010 年 4 月 9 日, 静岡
- [図書] (計 12 件)
- (1) 長嶋一昭, 稲垣暢也. 食後高血糖の病態から各経口薬の特徴と併用療法の実際をみる. **Life Style Medicine**. 2013 in press
- (2) 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. **生物物理**, 53: 20-23, 2013
- (3) 長嶋一昭, 稲垣暢也. SU 薬とインクレチン関連薬併用による低血糖. **経口糖尿病治療薬の新展開—病態プロファイルと最適薬剤選択の決め手**, フジメディカル出版, 154-158, 2012
- (4) 長嶋一昭, 稲垣暢也. スルホニル尿素薬. **糖尿病の分子標的と治療薬辞典**, 羊土社, 246-249, 2013
- (5) 長嶋一昭, 稲垣暢也. 新生児糖尿病の病態・診断・治療. **最新臨床糖尿病学 (下)**, 日本臨床社, 「日本臨床」2012 年 7 月増刊号 38-42, 2012
- (6) 長嶋一昭, 稲垣暢也. SU 薬と速効型イ

研究者番号：20422545

(3)連携研究者
なし

- ンスリン分泌促進薬（グリニド）一薬剤構造から薬理特性および薬効を考える一。**糖尿病治療薬のサイエンス**，南山堂，28-37，2012
- (7) 長嶋一昭、稲垣暢也． 新生児糖尿病． **International Review of Diabetes**，メディカルレビュー社，3,35-39，2012
- (8) 長嶋一昭、稲垣暢也． SU 薬と速効型インスリン分泌促進薬． **糖尿病学イラストレイテッド**，羊土社，244-249，2012
- (9) 長嶋一昭、稲垣暢也． 糖尿病とイオンチャンネル． **細胞**，ニューサイエンス社，43，420-423，2011
- (10) 長嶋一昭、稲垣暢也． 新生児糖尿病． 月刊 **糖尿病**，医学出版，3: 58-64，2011
- (11) 長嶋一昭、稲垣暢也． インスリン分泌における K_{ATP} チャンネルの役割． **糖尿病ナビゲーター（第2版）**，メディカルレビュー社，46-47，2010
- (12) 今村博臣． 蛍光イメージングによる細胞内および細胞外 ATP の可視化． **生化学**． 日本生化学会． 82：425-437，2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長嶋 一昭 (NAGASHIMA KAZUAKI)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40324628

(2)研究分担者

今村 博臣 (IMAMURA HIROMI)
京都大学・生命科学研究所・特定准教授