

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07066

研究課題名(和文) 生体内AMPK可視化による、恒常性維持機構におけるAMPK機能の解明

研究課題名(英文) Optical Imaging of AMPK activity in vivo

研究代表者

寺井 健太 (Terai, Kenta)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20616073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：AMP-activated protein kinase (以下AMPK) は代謝系のマスターレギュレーターのひとつである。細胞内ATPが欠乏するとAMPKが活性化され、エネルギー産生が亢進する。一方、AMPKの生体内における主要な機能として、肝臓での糖新生と、筋肉での糖代謝亢進が報告されているが、どのようにして臓器間で異なる機能を調節しているかは未知である。本研究では光遺伝学を用いて、AMPK活性を組織ごと、1細胞レベルの解像度で活性化する技術を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生きたマウスの中で、単一細胞レベルの非常に高い空間解像度でAMPKを操作することが可能になりました。今後、一つの細胞が生体全体に与える影響を調べることが可能になります。複雑な生体において、臓器間、細胞間で、お互いの情報を共有するためのメカニズムを調べる手法になると期待されます。

研究成果の概要(英文)：AMP-activated protein kinase (AMPK) is the master regulator of metabolic pathways and energy homeostasis. A number of activators of AMPK have been developed to treat diabetic patients or to improve the performance of athletes. These reagents are powerful tool to delineate the role of AMPK. However, such small molecule activators are prone to cause off-target effects and not applicable for the targeted stimulation of specific cell types. Here, we developed an optogenetic tool that rapidly and reversibly controls the AMPK activity by light inducible protein clustering in mammalian cells.

研究分野：生体イメージング

キーワード：AMPK 光遺伝学 生体イメージング 二光子顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

AMP-activated protein kinase (以下 AMPK) は代謝状態を制御する酵素である。ATP が欠乏すると AMPK が活性化され、エネルギー生産を亢進する (図 1)。AMPK を欠損したマウスでは、筋肉での糖代謝や肝臓での糖新生が低下する。AMPK の生理学的な機能は、耐糖能、老化、概日リズム、癌化、筋持久力の向上といった恒常性機構に関与している。これらの知見は、糖尿病治療薬であり AMPK 活性化薬でもあるメトホルミンや、AMPK 欠損マウスにより明らかにされた。しかし、これらの恒常性機構における責任臓器や細胞内分子機構などの詳細は不明である。

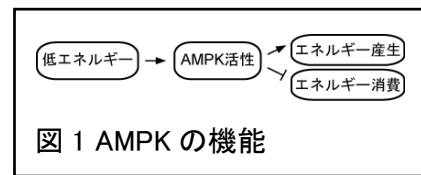


図 1 AMPK の機能

### 2. 研究の目的

*in vivo* における AMPK 活性を光遺伝学によって制御し、生体マウスにおける一細胞レベル、個別臓器ごとの AMPK 活性化が個体全体の恒常性に与える影響を検討する。

### 3. 研究の方法

AMPK の活性化を、赤色光刺激により誘導できる系を用いた。植物由来の PhyB-PIF は赤色光により複合体を形成することが知られている (図 2)。この系においてはヘム誘導体であるフィアコシアノビルリン(PCB)が発色団として必要であり、PCB を産生する培養細胞とマウスを作出した。

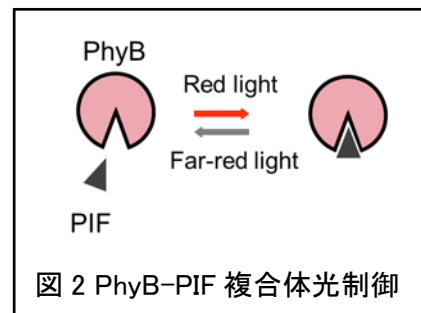


図 2 PhyB-PIF 複合体光制御

また、光依存的な AMPK 活性化には、光依存的に多量体を形成する系を用いた (図 3)。A) 多量体誘導の感度特異度、B) 多量体に含まれる AMPK のサブユニットを検討した。

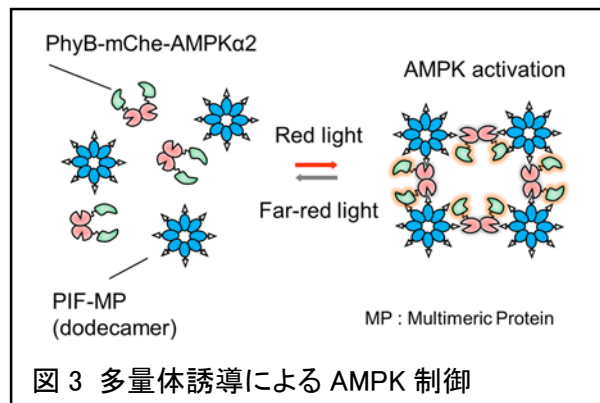


図 3 多量体誘導による AMPK 制御

更に、多量体形成時に、なぜ AMPK が活性化するのかを、生化学や細胞生物学的に解析した。

### 4. 研究成果

培養細胞を用いた実験系において、赤色光依存で AMPK 活性を制御することに成功している (図 4)。650 nm の光刺激により、mCherry で蛍光ラベルした AMPK が多量体を形成している (図 4、左上段)。同時に、AMPK の活性化が FRET プローブで検出される (図 4、左下段)。これらの変化

は、750 nm の光刺激により元の状態に戻る。現在は、これらの実験系をマウスに移行している。

上記の実験系獲得のためには、マウス生体内で光遺伝学を行う必要がある。そのための準備も付随して進めている。

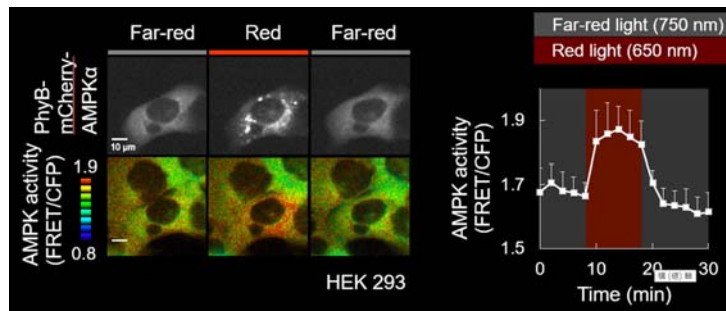


図 4 赤色光による AMPK 制御

CRY2 など光遺伝学で光スイッチとして機能する分子は、生きたマウスを観察するのに用いる 2 光子励起顕微鏡の光では活性化できないことが明らかとなった。そこで、2 光子励起で効率よく活性化できる蛍光タンパク質からの蛍光共鳴エネルギー移動を利用して、CRY2 を 2 光子励起で活性化する技術を開発しました (図 5)。また、本研究では 2 光子励起の性質を利用して、生体内での多種多様な細胞の中から、狙った単一の細胞のみで、細胞の増殖や分化に重要な分子である ERK 活性の制御に成功した。

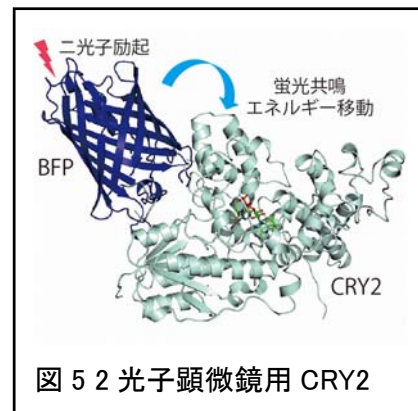


図 5 2 光子顕微鏡用 CRY2

PCB 産生マウスの作出過程で、ビリベルジンレダクターゼ  $\alpha$  (*Blvra*) のノックアウトマウスを作出した (図 6)。近赤外光を用いた生体イメージングは①高い生体透過性②可視光領域の蛍光タンパク質との併用による多色イメージングという利点から、生体内への応用が望まれていた。しかしながら、既存の近赤外蛍光タンパク質は蛍光強度が低く、生体への応用は限定されていた。この理由として、近赤外蛍光タンパク質はビリベルジンというヘム代謝産物を発色団として要求すること、生体内ではビリベルジン濃度が低く保たれていることが原因だと

考えられた。そこでヘム代謝に関与するビリベルジンレダクターゼ (*Blvra*) という酵素をノックアウトしたマウス (*Blvra*<sup>-/-</sup>マウス) を作出することで、マウス生体内での近赤外蛍光タンパク質の高輝度化に成功した。また同様の手法が、近赤外光に応答するカルシウムセンサーや光遺伝学ツールに応用可能であることを示した。

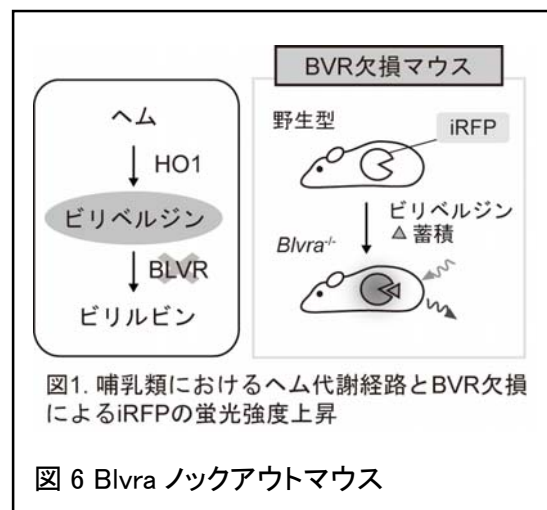


図 1. 哺乳類におけるヘム代謝経路と BVR 欠損による iRFP の蛍光強度上昇

図 6 *Blvra* ノックアウトマウス

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Konagaya Yumi, Takakura Kanako, Sogabe Maina, Bisaria Anjali, Liu Chad, Meyer Tobias, Sehara-Fujisawa Atsuko, Matsuda Michiyuki, Terai Kenta	4. 巻 19
2. 論文標題 Intravital imaging reveals cell cycle-dependent myogenic cell migration during muscle regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 3167 ~ 3181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384101.2020.1838779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu Chad, Konagaya Yumi, Chung Mingyu, Daigh Leighton H., Fan Yilin, Yang Hee Won, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki, Meyer Tobias	4. 巻 11
2. 論文標題 Altered G1 signaling order and commitment point in cells proliferating without CDK4/6 activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 18966-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18966-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kinjo Tomoaki, Watabe Tetsuya, Kobachi Kenju, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Single-Cell Activation of the cAMP-Signaling Pathway in 3D Tissues with FRET-Assisted Two-Photon Activation of bPAC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2848 ~ 2853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imanishi Ayako, Ichise Hiroshi, Fan Chuyun, Nakagawa Yasuaki, Kuwahara Koichiro, Sumiyama Kenta, Matsuda Michiyuki, Terai Kenta	4. 巻 191
2. 論文標題 Visualization of Spatially-Controlled Vasospasm by Sympathetic Nerve-Mediated ROCK Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 194 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.09.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobachi Kenju, Kuno Sota, Sato Shinya, Sumiyama Kenta, Matsuda Michiyuki, Terai Kenta	4. 巻 45
2. 論文標題 Biliverdin Reductase-A Deficiency Brighten and Sensitize Biliverdin-binding Chromoproteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 131 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.20010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Michiyuki, Terai Kenta	4. 巻
2. 論文標題 Experimental pathology by intravital microscopy and genetically encoded fluorescent biosensors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12925	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watabe Tetsuya, Terai Kenta, Sumiyama Kenta, Matsuda Michiyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Booster, a Red-Shifted Genetically Encoded FRET Biosensor Compatible with Cyan Fluorescent Protein/Yellow Fluorescent Protein-Based FRET Biosensors and Blue Light-Responsive Optogenetic Tools	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 719 ~ 730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b01941	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinjo Tomoaki, Terai Kenta, Horita Shoichiro, Nomura Norimichi, Sumiyama Kenta, Togashi Kaori, Iwata So, Matsuda Michiyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-019-0541-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terai Kenta, Imanishi Ayako, Li Chunjie, Matsuda Michiyuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Two Decades of Genetically Encoded Biosensors Based on Förster Resonance Energy Transfer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 153 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.18035	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kenta Terai, Yoshinobu Konishi, Hiroshi Ichise, Tetsuya Watabe, Yukari Sando, Takefumi Kondo, Choji Oki, Shinya Tsukiji, Yoko Hamazaki, Yasuhiro Murakawa, Akifumi Takaori-Kondo and Michiyuki Matsuda
2. 発表標題 Gq-protein-coupled receptor signaling in tumor cells promotes cancer immune evasion
3. 学会等名 AACR Virtual Special Conference on Tumor Heterogeneity: From Single Cells to Clinical Impact
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺井健太、小西義延、松田道行
2. 発表標題 癌細胞中のGq蛋白共役型受容体による免疫回避機構
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺井健太、小西義延、松田道行
2. 発表標題 第109回日本病理学会総会
3. 学会等名 生体イメージングによる腫瘍細胞由来プロスタノイドによる腫瘍微小環境の形成機構
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenju Kobachi, Kenta Terai, Michiyuki Matsuda
2. 発表標題 Control of AMP-Activated Protein Kinase by Optogenetic Protein Clustering
3. 学会等名 The 66th NIBB Conference ABiS International Symposium
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関