

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590260

研究課題名（和文）ミトコンドリア機能可視化による脂肪酸受容体の機能解析

研究課題名（英文）Long chain fatty acid receptor function using visualization of mitochondrial function

研究代表者

淡路 健雄（AWAJI TAKEO）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60297546

研究成果の概要（和文）：本研究において、Green Fluorescent Protein を利用した pH センサーをよりミトコンドリア測定に適した性能に改良した。このミトコンドリア pH センサーはインスリノーマ細胞においてミトコンドリアマトリックスに局在していることを電子顕微鏡にて確認した。また、各種インスリン分泌刺激に応じミトコンドリア pH が変化することを確認し、不飽和脂肪酸受容体刺激によるミトコンドリア pH の変化がブドウ糖負荷とは異なることを見いだした。さらに、不飽和脂肪酸受容体を内因性に発現している細胞を用い、細胞内カルシウム変化を指標として各種化合物・不飽和脂肪酸を用い、GPR40・GPR120 受容体の薬理学的特性を検討した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluate the long chain fatty acid receptor function using visualization of mitochondrial function and intracellular Ca^{2+} concentration. Mitochondrial pH is known to reflect its functional viability. However, there has been no useful system to measure the quantitative and serial mitochondrial pH. Recently, a pH of organum has been successfully calculated by using GFP, but still it is not a direct quantitative calculation. Here, we developed the new system to evaluate mitochondrial pH of living cell with fluorescence ratio between two GFP. This pH probe system could evaluate the wide and preferable pH range. We applied insulin-stimulating substance, such as glucose, tolbutamide, arginine and potassium, and measure mitochondrial pH. In the cultured β -cells, the mitochondrial pH decreased immediately by glucose and potassium, and leisurely decreased by arginine and tolbutamide. A basal level of the mitochondrial pH of β -cells has increased by aeration in a cultured medium. However, GPR40 agonist quickly decreases the mitochondrial pH. This result suggested that the signal transduction of GPR40 is differ from the others. Additionally, we evaluate the agonist of GPR120 using Ca^{2+} visualization in STC-1 cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学一般

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：不飽和脂肪酸受容体、Green Fluorescent Protein、生命現象可視化、細胞内カル

シウムイオン濃度測定、水素イオン濃度、ミトコンドリア機能、細胞内シグナル伝達機構、三量体共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

七回膜貫通型受容体は、古典的なホルモン・神経伝達物質・アミノ酸をリガンドとする化学受容体を含む大きなファミリーを形成している。この受容体は創薬の格好のターゲットとなり、タンパク・遺伝子配列・細胞内シグナル伝達機序・細胞レベルでの機能の検討並びに、生体レベルでの正常・病態における役割が数多く報告されてきている。現在、全ヒトゲノム配列が明らかになり、その解析によりリガンド並びに機能の不明な三量体Gタンパク質共役型受容体をcodeすると考えられる遺伝子が数多く見いだされ、またいくつかの遺伝子は実際に生体で発現していることが確認されている。これら新しい受容体はオーファンレセプターと総称されている。オーファンレセプターは、多くの生理機能に関連していると考えられ、これまで知られていなかった病態生理に対する役割・新たな治療薬開発に、オーファンレセプターの機能の理解は重要と考えられている。近年、此までに知られていなかった長鎖不飽和脂肪酸をリガンドとする新規三量体Gタンパク質共役型受容体(GPR40)が同定された。この受容体は膵島細胞に比較的特異的に発現している。刺激により受容体が活性化されるとインスリンの分泌が亢進することが確かめられ、創薬ターゲットとして糖代謝疾患の発症・治療への応用に興味を持たれている。また我々のグループは、膵島細胞のインスリン分泌のコントロールに関与することが知られているホルモンであるGLP-1の分泌する腸管分泌細胞においてもGPR40が多く発現しており、同じ細胞に於いて異なる長鎖不飽和脂肪酸に特異性を示す新規七回膜貫通型受容体を見いだした。この受容体と共役して腸管分泌細胞においてGLP-1の分泌がコントロールされており、マウスに於いて密接に糖代謝と共役していることを見だし、*Nature Medicine*にて報告を行っている。これまで長鎖不飽和脂肪酸は生理作用を持ち、糖代謝やインスリン分泌に影響を与えることが知られており、栄養学的観点から研究が行われてきた。しかし、生理活性物質としての作用点・受容体が不明であり生体総体としての現象論の記述が行われてきたただけであった。本研究者らにより新規長鎖不飽和脂肪酸受容体がクローニングされ、より詳細な検討が可

能となってきており、これら長鎖不飽和脂肪酸受容体の細胞内シグナル伝達機構の解明を細胞レベルで可能となった。

一方、インスリン分泌におけるシグナル伝達機序の解析において、これまでは生化学的方法や電気生理学的手法等が一般的に用いられてきたが、正常分泌における反応の重要な調節器官であるミトコンドリア機能を連続的・経時的に記録する方法は今まで無く、間欠的に生化学的方法より推定するしかなかった。本研究者らはこれまで受容体を介するシグナル伝達機構の可視化研究を行ってきており、これを発展させミトコンドリア機能の良い指標であるミトコンドリア水素イオン濃度(pH)変化の定量的細胞内小器官選択的プローブを開発してきた。これを用いることにより、脂質代謝・糖代謝に関わるシグナル伝達機序をより詳細に検討できる可能性が考えられる。生体レベルでの糖代謝に密接に関連している事が示唆される受容体の機能を解明することは、現在の糖尿病患者人口の増加している現状では、糖代謝疾患の治療薬の開発ならび病態の理解に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、インスリン分泌に関わる細胞内シグナル伝達機構を中心に、長鎖脂肪酸をリガンドとする三量体Gタンパク質共役型受容体、具体的にはインスリン分泌調節に直接関わると考えられるGPR40受容体およびインスリン分泌を調節するGLP-1分泌を誘発するGPR120受容体の細胞内シグナル伝達機序・細胞生理機能・生体での生理的意義を明らかにすることを目的とする。古典的な細胞内カルシウムシグナル可視化技術のみならず、インスリン分泌に重要なことは知られていたが、これまで解析が困難であったミトコンドリア機能解析を、本研究で開発・改良をおこなうGreen Fluorescent Proteinを利用したpHセンサーで、生細胞でリアルタイムに行う。対象として長鎖脂肪酸受容体を内因性に発現しておりグルコース感受性が保たれているインスリノーマ細胞ならびGLP-1産生細胞である腸管細胞をモデルに実験を行う。シグナル伝達系ならびに薬物感受性をより詳しく調べるため、長鎖脂肪酸受容体を発現させた培養細胞で同様の実験をおこなう。また、その成果をもとに生体レベルでの実験を

おこなう。

3. 研究の方法

(1) 細胞内カルシウム濃度変化を指標とした不飽和脂肪酸受容体内因性発現細胞の機能解析

GPR40 (インスリノーマ・腸管由来細胞) 並びにGPR120 (腸管由来細胞) の内因性発現株化細胞を利用し、これまでに報告されているリガンド刺激による細胞内カルシウム濃度変化における薬理学的特性並びにシグナル伝達機構の薬理学的解析を、当教室に保有する顕微カルシウム測定装置を利用して行う。これら細胞のリガンドによる反応性は、培養条件・外液のグルコース濃度・温度に大きく影響されることが示唆されている。これら一般的条件の検討と各種細胞内シグナル伝達遮断薬を利用した検討により長鎖不飽和受容体の細胞内シグナル伝達関連分子の絞り込みを行う。

(2) GPR40 ならびにGPR120 安定細胞の作出

内因性に受容体を発現している細胞は、増殖速度が遅く、遺伝子導入の効率が極めて悪く、また長期の培養により性質が変化する可能性が高いため受容体下流へのシグナル伝達機構解析ならび結合実験をおこなう上で不利である。このため、増殖速度が速く使用経験が豊かな CHO・HEK293 細胞にクローニング済みの受容体遺伝子の導入をおこない、安定発現細胞の作出をおこなう。導入遺伝子のコピー数・部位の影響を取り除き、効率のよい安定発現細胞作出の可能である Flip-In system を利用する予定である。基本的な培養設備はすでに保有しており、この実験を遂行する上で必要な最低限の分子生物学的実験機材は当教室で保有している。また、ここで作成した安定発現細胞は内因性発現細胞で見出されたシグナル伝達機構の再構築系に利用する。

(3) GFP 融合GPR40 ならびにGPR120 安定細胞の作出

受容体機能調節機構として細胞内局在の変化が指摘されている。GPR40 とGPR120 受容体のGFP 融合受容体遺伝子を作成し野生型受容体と同様な方法にて安定発現細胞の作出をおこなう。新しい受容体であり現在まで利用可能な受容体そのものの機能を抑制する化合物は見いだされおらず、上記のスクリーニング的検討では、不飽和脂肪酸の代謝を介する作用か受容体を介

する作用かの区別が困難である。この検討を可能とするため、ここで作成した安定発現細胞の蛍光強度の変化を指標に、受容体発現抑制RNAi の検討を行う。次年度以降ここで開発した 受容体特異的抑制RNAi を利用してより特異的な細胞内シグナル伝達機構の解析を行う。これまで本研究者は GFP 融合受容体の局在の変化の検討を行ってきており、最低限度の顕微蛍光測定システムを所属研究室で所有している。

(4) G16 融合GPR40 ならびにGPR120 安定細胞の作出

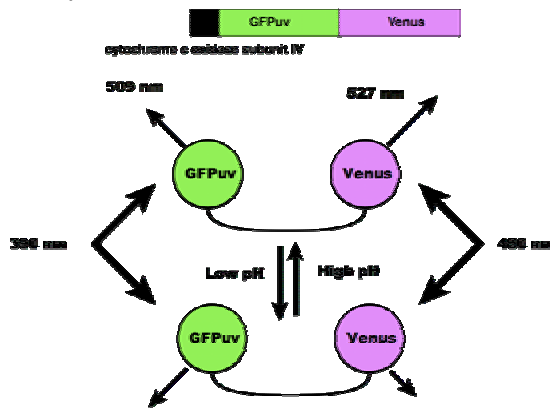
三量体GTP 結合タンパクは多くのファミリーを持つが、G16 と呼ばれるものは受容体と融合タンパクを作ることにより強制的に共役させることが可能であり、オフオン受容体のリガンド探索に利用されている。本研究で用いる受容体は多くのリガンドが報告されているが、その特異性については報告者により差違が認められている。今後の薬理学的検討を行うための基盤を確保するため、各種不飽和脂肪酸の受容体への特異性検討のため、G16 融合GPR40 ならびにGPR120 安定細胞の作出を試みる。不飽和脂肪酸は極めて種類が多く、またカルシウム指示薬を多く必要とするので試薬代が多く掛かることが予想している。

(5) GPR40 内因性発現細胞におけるミトコンドリア機能測定系の開発

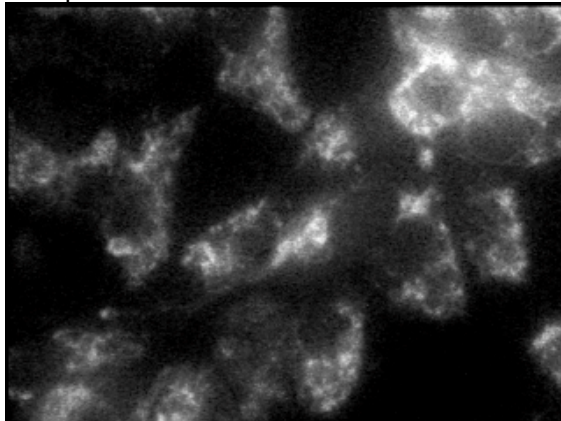
正常の糖代謝における膵細胞でのインスリン分泌とミトコンドリア機能は密接に関連している。遺伝性のミトコンドリア異常症において生じる、ミトコンドリア機能の低下は糖代謝異常を引きおこし、糖尿病の発症につながるがよく知られている。また、ダイナミックにミトコンドリア機能は変化しており、間欠的な機能評価ではミトコンドリア機能の評価は十分でない。しかしながら、細胞内小器官であり経時的な生細胞レベルでの定量的なミトコンドリア機能の評価は極めて困難であった。

今回標的とする受容体は、不飽和脂肪酸をリガンドとしインスリン分泌・糖代謝に密接に共役する。このため受容体のシグナルや機能を解析するために、生細胞でのミトコンドリア機能の経時的な評価は必須である。代表研究者は、これまで、細胞内水素イオン濃度 (pH) の測定系の開発を行ってきた。これまでに開発してきた pH センサーは GFP をタンデムに融合させてあり ratio にて細胞内 pH を定量可能である。下記に原理と構造の模式図を示す。

GFPuvの蛍光強度は近傍の水素イオン濃度変化に対して極めて安定である。変異を導入し水素イオン濃度変化に関連して蛍光強度が変化するGFP変異体をGFPuvに融合してある。GFPuvの蛍光を基準に水素イオン濃度感受性GFP変異体の蛍光強度の比を取るにより定量的に分子近傍のpHが測定できる。



GFPを単純に2個以上つないだ分子はミトコンドリア移行配列を融合してもミトコンドリアに移行しないと報告されているが、移行配列の改良により多くの細胞でプローブのミトコンドリアへの局在に成功している。INS1細胞に導入したミトコンドリアpHプローブの局在をコンフォーカル顕微鏡で撮影した結果を示す。ミトコンドリアの分布と一致して蛍光が検出されており、ここでは示さないが電子共役系の阻害薬であるCCC P (カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン)の投与により速やかに蛍光の減少・pHの低下が認められた。



蛍光光度が微弱であり検出が困難であるが、カルシウムに比べ変化の時間経過は長いと考えられる。これまで利用してきた蛍光記録用カメラは時間分解能に重点を置いてきたが、より微弱な蛍光を長時間で記録できる冷却型CCDカメラが必要となると考えられ、画像記録システム構築を同時に行う。このプローブを不飽和脂肪酸受容体内因性発現細胞に遺伝子導入し、次年度以降ミトコンドリア機能の検討を行う。

(6)ミトコンドリア機能からみた 不飽和脂肪酸受容体のインスリン分泌に関する作用の検討

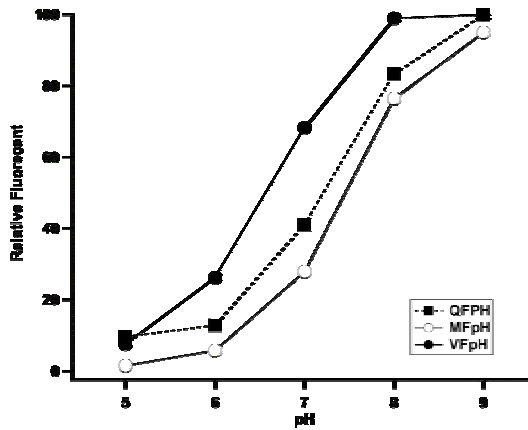
インスリン分泌はミトコンドリアの機能に密接に関連している事が知られている。前年度に作成した、インスリン分泌細胞でのミトコンドリアプローブ導入細胞を利用して、インスリンの分泌量・カルシウム反応とミトコンドリア機能の相関について検討をおこなう。また、一部の糖尿病関連遺伝子が脂質代謝関連分子の発現調節を行っている事が示唆されており、疾患関連遺伝子のミトコンドリア機能とインスリン分泌に対する関連について検討をおこなう。

4. 研究成果

ミトコンドリアpH可視化によるミトコンドリア機能の評価

(1) pHセンサーの改良

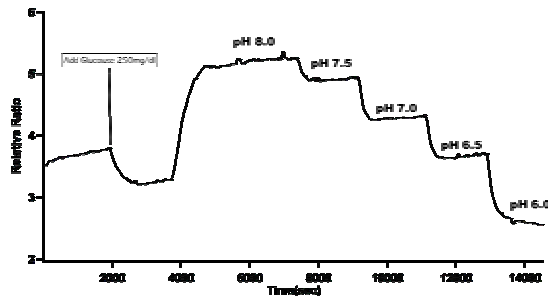
Green Fluorescent Protein (以下GFP)は、環境の変化によりその蛍光強度が変化することが知られている。また、多くのグループの成果として、異なる蛍光スペクトルを持つ、GFP変異体が開発されている。この変異体GFPの中から異なるスペクトルを持ち、水素イオン濃度感受性の異なるものを選択し、蛍光強度の比でpHを測定するのが今回用いた水素イオン濃度センサーの原理である。市販されているGFPuvの蛍光は水素イオン濃度の変化に安定で、励起波長(約390nm)と蛍光波長(約510nm)の間が離れている。これとEYFPを組み合わせたpHセンサーを我々は報告していた。しかし、pH以外の細胞内環境の変化に対してEYFPが感受性が高く、精度に問題があった。一方宮脇らにより報告された、EYFPと同様な蛍光スペクトルをもつvenusと呼ばれる変異体は蛍光強度が強くpHを含む細胞内環境に対して安定である。今回このvenusに変異を導入し水素イオン濃度のみ反比例して蛍光強度が変化する変異体を作成しGFPuvと融合を行い、pHプローブの作成をおこなった。アミノ酸変異の導入により蛍光強度が強く異なるpH感受性を持つpHセンサーが作成できた。以下にその結果を示す。縦軸は相対的蛍光強度、横軸は水素イオン濃度を示す。変異を導入することにより水素イオン依存的に蛍光強度は減少し、変異により異なるレンジを持つプローブが作成できた。



(2)細胞での評価

一般の細胞ではミトコンドリアのpHは細胞内より高いことが想定されているため、乖離定数の小さいpHセンサーにミトコンドリア移行配列を導入しインスリノーマ細胞であるINS1とmin6に遺伝子導入し、安定発現細胞の樹立を行った。ブドウ糖負荷後に行った、pHキャリブレーションの結果を以下に示す。

グルコース非存在下の細胞ではブドウ糖負荷により速やかにミトコンドリアpHは低下を示した。また、細胞にイオノフォア投与と共に外液のpHを変えることにより速やかに蛍光強度比は変化しその安定性は良好であった。



Kd値は6.8でありin vitroキャリブレーションと同様な結果が得られミトコンドリアpHのプロープとして有効であると考えられた。また本プロープの元となったEYFPにみられる強いクロライド感受性はほとんど検出されなかった。想定より測定されるpHが低いこと並びに局在シグナルが有効に働いているか確認するため、免疫電顕を施行した。抗GFAP抗体のシグナルはミトコンドリアのクリスタ膜間腔に多く認められ、このプロープは膜間腔のpHを示していると想定されている。

(3)不飽和脂肪酸受容体刺激による内因性受容体発現細胞におけるpH変化

既知のインスリン刺激によるミトコンドリア機能の評価

生理的なインスリン刺激であるブドウ糖負荷をコントロールにアスパラギン酸・グリベンクラマイドなどによる刺激をpHプロープ安定発現インスリノーマ細胞にて行った。

グルコース非存在下にすべての薬物の投与を行った。時間経過に差は認められるがpHの低下を示し、負荷終了後はベースのpHレベルに復帰した。また、同時に細胞内カルシウム反応も測定しており、これら刺激ではすべて細胞内カルシウム濃度の上昇を認めた。

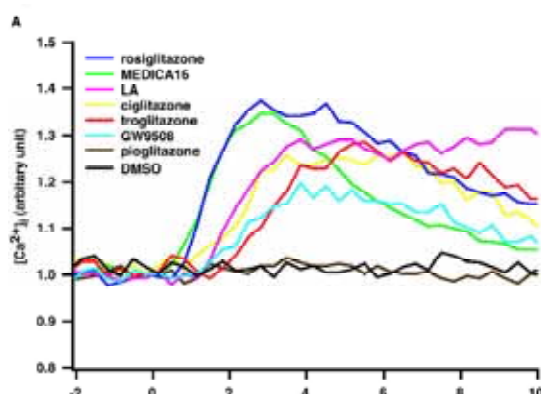
受容体アゴニストによるミトコンドリアpHの変化

インスリノーマ細胞には本研究のターゲットの一つであるGPR40が主に発現しており、その主たるアゴニストは中鎖不飽和脂肪酸である。比較的GPR40に選択性を示すリノレイン酸を用いミトコンドリア機能の評価を行った。GPCRファミリーに含まれるGPR40はGq/11と共役しておりフォスホリパーゼを介して細胞内イノシトール-1,4,5-三リン酸を上昇させ最終的に細胞内カルシウム濃度を上昇させる。今回利用した細胞でも同様にリノレイン酸1μM投与により速やかな細胞内カルシウムの上昇を認めた。一方ミトコンドリアpHはグルコースやアルギニンなどのインスリン分泌を誘発する細胞内カルシウム上昇させる刺激とは異なり、速やかな上昇を示した。これは、ミトコンドリアへGPR40から既知のインスリン分泌に関わる細胞内シグナル系とは異なるシグナルが関与していることを示唆している。現在このミトコンドリアpHを上昇させるシグナル伝達メカニズムに関して各種細胞内シグナル伝達阻害薬やシグナル伝達物質関連RNAiを用いて探索を行っている。

(4)カルシウム反応を指標とした不飽和脂肪酸受容体内因性発現細胞におけるGPR40並びにGPR120の薬理的解析。

本研究対象である不飽和脂肪酸受容体はメタボリックシンドロームや糖尿病治療との関連に興味を持たれ各種薬理的ツールが本課題開始後に新規開発されるようになってきている。これら新規不飽和脂肪酸受容体刺激薬を用い、内因性受容体発現細胞であるmin6細胞やSTC-1細胞並びに受容体安定発現細胞を用い、カルシウム反応性を指標に受容体機能の薬理的検討を行った。Min6を使った実験としては、京都大学のグループと共同で、GPR40を活性化することが知られているMEDICA16、GW

9508、ロシグリタゾンやトログリタゾン等の化学合成リガンドの結合特性を調べた。これらの化合物およびチアゾリジン系薬物であるシグリタゾンは濃度依存的に結合を示し。一方でチアゾリジン系薬物であるピオグリタゾンは結合を示さなかった。さらにこれらの化合物の結合特性が内在的にGPR40を発現している細胞においてGPR40を介した細胞内カルシウム上昇活性と一致するかを調べた。図に示すように、MEDICA16やGW9508など結合を示した全てのチアゾリジン系薬物はMIN6細胞では細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した。しかし一方で、結合を示さなかったピオグリタゾンは、GPR40を介したCa²⁺濃度上昇を示さなかった。



これら合成化合物のGPR40に対する結合特性はGPR40の活性特性とよく一致していると考えられた。現在GPR40と特性の似ているGPR120に関して新規合成刺激薬ならびに各種不飽和脂肪酸を中心に、内因性発現細胞である腸管由来STC-1細胞で検討中である。

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1件)

Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1). Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Koshimizu TA, Itsubo C, Sadakane K, Awaji T, Tsujimoto G. 査読有, Molecular Pharmacology, 75 (1) 巻, 2009, 85-91

[学会発表](計3件)

培養臍 生細胞を用いたミトコンドリア機能の経時的定量評価の検討
尾形真規子、淡路健雄、岩崎直子、藤巻理沙、滝沢美保、丸山 敬、岩本安彦

第51回日本糖尿病学会総会 2008年5月23日 東京

A new system to determine the Mitochondrial pH in cultured living cell

Makiko Ogata, Naoko Iwasaki, Takeo Awaji, Risa Fujimaki, Miho Takizawa, Kei Maruyama, Yasuhiko Iwamoto

第8回日本ミトコンドリア学会年会 2008年12月18日 東京

A new system to determine the Mitochondrial pH in cultured living cell

Makiko Ogata, Takeo Awaji, Naoko Iwasaki, Risa Fujimaki, Miho Takizawa, Yasuhiko Iwamoto, Kei Maruyama

第82回日本薬理学会総会 2009年3月17日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

淡路 健雄 (AWAJI TAKEO)

埼玉医科大学医学部・講師

研究者番号: 60297546

(2) 研究分担者

平澤 明 (HIRASAWA AKIRA)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 70242633

(H19 H20: 連携研究者)

尾形 真規子 (OGATA MAKIKO)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10233404

(H19 H20: 連携研究者)

(3) 連携研究者 なし