

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461346

研究課題名(和文) 蛍光ATPプローブ遺伝子導入マウスを用いた糖代謝異常病態解析

研究課題名(英文) Functional analysis of pancreatic beta-cells in metabolic disorders using the fluorescent ATP probe gene transgenic mouse

研究代表者

長嶋 一昭 (NAGASHIMA, KAZUAKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40324628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵 細胞内代謝動態を解析するため、蛍光エネルギー移動(FRET)を利用した蛍光ATPプローブおよび同プローブ遺伝子導入マウスを作製し、Fura2-AMを併用することにより、膵 細胞内ATP濃度およびCa²⁺濃度変化同時測定系を構築し、生理学的条件における各種刺激下での膵 細胞内代謝・イオン濃度動態変化を解析した。

研究成果の概要(英文)：To visualize and analyze intracellular ATP dynamics in physiological condition, we generated a series of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based indicators for ATP. Using the fluorescent ATP probe, the fluorescent Ca²⁺ probe, and the transgenic mouse expressing ATP probe protein in pancreatic beta-cells, we carried out several functional analyses of intracellular ATP and Ca²⁺ concentrations in living pancreatic beta-cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ATP KATPチャネル 糖代謝異常

1. 研究開始当初の背景

糖尿病発症にはインスリン分泌障害およびインスリン抵抗性の両者が関与する。血糖値恒常性維持のためには、膵細胞インスリン分泌が、分泌の量およびタイミングともに適切に調節されることが必須である。グルコース刺激による主要なインスリン分泌調節機序として K_{ATP} チャンネルを介した経路の重要性が広く認められており、これまで *in vitro*、*in vivo* ともに多くの解析がなされてきた。当教室の稲垣らが世界に先駆けその分子的基盤を解明し (Science 1995)、本申請者らが同チャンネル変異遺伝子導入マウスおよび遺伝子欠損マウスを用いてインスリン分泌における重要性を直接証明し (PNAS.1997、PNAS.1998)、電気生理学的解析で同チャンネルに対する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ってきた (Diabetes Res Clin Pract.2004)。さらに、本邦初となる K_{ATP} チャンネル構成サブユニットの Kir6.2 遺伝子異常新生児糖尿病症例を同定・解析し、Kir6.2 遺伝子異常による成人発症糖尿病症例を報告し、その遺伝子変異によるチャンネル特性変化を直接評価した (J Clin Endocrinol Metab.2005)。また Kir6.2 と対をなすもう一方の K_{ATP} チャンネル構成サブユニット SUR1 遺伝子異常による本邦初の新生児糖尿病症例の解析を分担するなど (J Diabetes Invest. 2013) 申請者らは基礎的解析と臨床的展開を常に意識した研究推進を継続してきた。一方、糖代謝状態を反映する細胞内 ATP 濃度変化の解析に関しては、従来の測定法では細胞をつぶしたある一時点での定点測定であり、生細胞のままの経時的測定ができず、温度、培養条件、細胞内環境等のわずかな違いで繊細に変化する細胞内代謝変化を解析する上で全く不十分であったこともあり、ATP 濃度変化とそれにより活性調節され機能発現する組織特異的 K_{ATP} チャンネルの生理的条件下での役割の詳細は未だに検証不十分であることを、これまでの研究経験から申請者らは強く実感してきた。我々は、平成 22~24 年度科研費基盤研究 (C) により、研究分担者今村らが開発した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 (Proc Nat Acad Sci USA, 2009) を改良した膵細胞でも使用可能な ATP に対する高 Kd 値を有する新規蛍光 ATP プローブ (GO-ATeam) を用いて、齧歯類単離膵細胞 (MIN6 等) でグルコースおよびインスリン分泌促進薬での生細胞での経時的細胞内 ATP 濃度リアルタイム計測を行ない、さらに蛍光 Ca^{2+} プローブ Fura-2AM を併用した細胞内 ATP および Ca^{2+} 濃度同時モニタリングを行いグルコース刺激による膵細胞内代謝動態を検討した。また、本申請者はこれまでに、膵細胞シミュレーションに関して、文部科学省科研費若手研究 (B)

「*in silico* 膵細胞および細胞の機能的統合モデルの構築」(H16~H18 年度; 研究代表者) で膵島細胞間 (細胞細胞、細胞細胞間) の相互イオン流通性、細胞間電気伝導性および各ホルモンのパラクリン調節による膵島細胞機能調節に関して解析を行い、文部科学省リーディングプロジェクト「細胞生体機能シミュレーション」(H15~H19 年度) および地域産学官連携科学技術振興事業費補助金「エネルギー代謝シミュレーションを活用した安心な高度医療技術の研究開発」(H19~H23 年度) に参画し膵細胞シミュレーションモデル構築に係ってきた。本申請研究は、これらの研究経過・研究基盤を踏まえ、細胞内糖代謝異常と耐糖能異常の病態形成機序における関りの実際を、上記ツールおよびこれまで確立してきた手法を用いて解析・評価する目的で立案した。

2. 研究の目的

アデノシン三リン酸 (ATP) は細胞内代謝および細胞機能調節に深く関わる。膵細胞グルコース刺激によるインスリン分泌調節の主たる機序として代謝説が通説とされ、糖代謝・細胞内 ATP 濃度変化を介した膵細胞 K_{ATP} チャンネル活性調節がその調節基盤とされている。生理的条件下における膵細胞代謝調節メカニズムの理解には、生細胞における刺激前後の細胞内シグナルの動態観察が必要であるが、従来、細胞内 ATP 濃度動態を生細胞のまま簡便に、経時的かつリアルタイムで測定できる手法はなかった。本研究は、申請者および研究分担者が平成 22~24 年度科研費基盤研究 (C) で用いた膵島細胞で使用可能な高い解離定数 (Kd) を有する新規蛍光 ATP プローブを基に作製された同蛍光 ATP プローブ遺伝子導入 (Tg) マウスを用いて、生細胞のまま、生理的条件下で、直接的、経時的かつリアルタイムに細胞内代謝動態を解析し、細胞内糖代謝と糖代謝異常の病態形成機序との関わりを実際を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高 Kd 蛍光 ATP プローブ遺伝子導入マウスを用いた膵島代謝解析
研究分担者今村らが開発した、ATP 合成酵素サブユニットタンパク質両端に cyan fluorescent protein (CFP) 変異体の mseCFP と yellow fluorescent protein (YFP) 変異体 monomeric(A206K)Venus (改変 mVenus) を遺伝子工学的に連結させた蛍光 ATP プローブ (ATeam3.10 および ATeam 1.03) (Proc Nat Acad Sci USA, 2009) は、Hella 細胞では容易に遺伝子導入可能であり、細胞内 ATP 濃度変化に伴う YFP/CFP ratio 変化が確認出来たが、本プローブを膵細胞株 MIN6 細胞およびラット単離膵島細胞 (膵細胞) に Lipofection 等により遺伝子導入し、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に変換してYFP/CFP ratio変化(細胞内ATP濃度変化)を検討したところ、予想以上に膵細胞内ATP濃度が高く、十分なratio変化が捕らえられなかった。これらの実験経過を踏まえて、よりATPに対するKd値の大きいATPプローブ(GO-ATeam)を研究分担者今村が開発し、膵細胞株での予備実験で十分なratio変動を確認した上で、申請者らが同プローブ遺伝子導入(Tg)マウスを作製し、樹立した複数の系統間で蛍光ATPプローブ発現量およびグルコースに対するFRET蛍光強度に差があるため、膵島・膵細胞解析に適した系統を評価・選別し、その中の最適系統を用いて、グルコース、経口血糖降下薬刺激による細胞内ATP濃度変化を測定する。各蛍光イオンプローブ(Fura2-AM、SBFI-AM、MQAE-AM、BCECF-AM等)併用しての細胞内ATP濃度との同時測定のために、各蛍光イオンプローブに対応する励起および蛍光波長フィルターをAQUACOSMOSシステムに組み込みセットアップする(細胞内Ca²⁺濃度測定の場合は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、Na⁺濃度測定ではSBFI-AM使用、励起波長340/380nm、蛍光波長510nm測光、Cl⁻濃度測定ではMQAE-AM使用、励起波長355nm、蛍光波長460nm測光、H⁺濃度測定ではBCECF-AM使用、励起波長450/500nm、蛍光535nm測光)。また、膵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、細胞膜電位測定を行う。K_{ATP}チャネル活性および細胞膜電位はパッチクランプ whole-cell modeにて、単一細胞からの分泌量評価のための膜容量測定はパッチクランプ whole-cell mode (Pulsefit software; HEKA社: 機材は設置済)にて行う。

(2)高Kd蛍光ATPプローブ遺伝子導入肥満耐糖能異常マウスの作成および解析
解析用の蛍光ATPプローブ遺伝子導入マウス優良系統とob/obマウス、db/dbマウス等の肥満・耐糖能異常マウスを交配し、蛍光ATPプローブ遺伝子導入肥満耐糖能異常マウスを作成。通常食、低炭水化物食、高炭水化物食、高脂肪食負荷、さらには長期果糖負荷による細胞内代謝状態変化、各種イオン動態変化およびインスリン分泌能変化を継続的に観察し、摂取栄養素による膵細胞内代謝変化およびインスリン分泌能の変化を検討する。

4. 研究成果

蛍光ATPプローブ(GO-ATeam)遺伝子導入(Tg)マウスを作製し、樹立した複数の系統間で蛍光ATPプローブ発現量およびグル

コースに対するFRET蛍光強度、ratio変化程度等を比較し、膵島・膵細胞解析に適した最適系統を選別した。摂餌・飲水量、体重変化、インスリン分泌能(in vivo評価: OGTT、IPGTT、in vitro評価: batch incubation)により野生型(対照)マウスと比較し、有意差ないことを確認した。各蛍光イオンプローブ(Fura2-AM、SBFI-AM、MQAE-AM、BCECF-AM等)併用しての細胞内ATP濃度との同時測定のために、各蛍光イオンプローブに対応する励起および蛍光波長フィルターをAQUACOSMOSシステムに組み込みセットアップし、実際に細胞内ATP濃度と細胞内Ca²⁺濃度(Fura2-AM使用)の同時測定を行った。Tgマウスでの解析と並行して、野生型マウス単離膵島にアデノウイルスベクターを用いてGO-ATeamを導入し、その後、蛍光イオンプローブを実験前に導入することでマウス膵島細胞(細胞)および膵細胞株MIN6細胞内ATP濃度変化と細胞内Ca²⁺濃度変化の同時測定を行った。その結果、高グルコース刺激により、細胞内でATP Ca²⁺の順で細胞内濃度上昇し、このATP濃度の上昇が初期のCa²⁺濃度上昇に必須であること、細胞内Ca²⁺濃度のオシレーション変動の際にも、ATP濃度のオシレーション変動は生じていないこと(高濃度グルコースによる細胞内Ca²⁺濃度オシレーションは、細胞内ATPオシレーションに起因するものでない)を明らかにした。また、Ca²⁺オシレーション維持には細胞内ATP濃度が高い濃度でtonicに保たれていることが必要であることを明らかにした。GO-ATeam遺伝子導入(Tg)マウスでも、上記、外部から蛍光プローブ導入した状態での検討と同様の細胞内ATPおよびCa²⁺濃度動態を認めた。しかしながらTgマウス継代とともに細胞内GO-ATeam発現量は低下し(gene silencing)観測に十分な蛍光が得難くなった。そのため遺伝子導入マウスを用いたより生理的条件下での検討は同遺伝子ノックイン(KI)マウスを用いての検討とし、Tgマウス同様、KIマウスでも摂餌・発育状況、体重変化、インスリン分泌能を評価し、野生型との相違無いことを確認し、細胞内ATP、Ca²⁺濃度等測定、順次、解析継続中である。

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12件)

Sato H, Nagashima K, Ogura M, Sato Y, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Sugizaki K, Fujita N, Tatsuoka H, Usui R, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N. Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic β -cells. **J Diabetes Invest.** 査読有, 7:171-8, 2016
doi: 10.1111/jdi.12407

James AD, Patel W, Butt Z, Adiamah M, Dakhel R, Latif A, Ugenti C, Swanton E, Imamura H, Siriwardena AK, Bruce JI. The plasma membrane calcium pump in pancreatic cancer cells exhibiting the Warburg effect relies on glycolytic ATP. **J Biol Chem**. 査読有, 290: 24760-71, 2015
doi: 10.1074/jbc.M115.668707

Distelmaier F, Valsecchi F, Liemburg-Apers DC, Lebedzinska M, Rodenburg RJ, Heil S, Keijer J, Fransen J, Imamura H, Danhauser K, Seibt A, Viollet B, Gellerich FN, Smeitink JA, Wieckowski MR, Willems PH, Koopman WJ. Mitochondrial dysfunction in primary human fibroblasts triggers an adaptive cell survival program that requires AMPK- α . **Biochim Biophys Acta**. 査読有, 1852: 529-40, 2015
doi: 10.1016/j.bbdis.2014.12.012

長嶋一昭, 稲垣暢也. インスリン分泌機構とその破綻. **医学の歩み**. 査読無, 252, 377-382, 2015

Béguin P, Nagashima K, Mahalakshmi RN, Vigot R, Matsunaga A, Miki T, Ng MY, Ng YJA, Lim CH, Tay HS, Hwang LA, Firsov D, Tang BL, Inagaki N, Mori Y, Seino S, Launey T, Hunziker W. BARP suppresses voltage-gated calcium channel activity and Ca^{2+} -evoked exocytosis. **J Cell Biol**. 査読有, 205:233-49, 2014
doi: 10.1083/jcb.201304101

Shintani Y, Drexler HCA, Kioka H, Terracciano CMN, Coppen SR, Imamura H, Akao M, Nakai J, Wheeler AP, Higo S, Nakayama H, Takashima S, Suzuki K. Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. **EMBO Rep**. 査読有, 15: 438-45, 2014
doi: 10.1002/embr.201337945

Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca^{2+} influx and subsequent Ca^{2+} oscillations. **J Biol Chem**. 査読有, 289: 2205-2216, 2014
doi: 10.1074/jbc.M113.499111

Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N. Palmitate induces reactive oxygen species production and β -cell dysfunction by activating NADPH oxidase via cSrc signaling. submission. **J Diabetes Invest**. 査読有, 5: 19-26, 2014

doi: 10.1111/jdi.12124

今村博臣. 細胞内 ATP がみたい - ライブイメージングで明らかになってきた細胞内 ATP 濃度の時空間動態. **実験医学**. 査読無, 32, 2515-17, 2014

今村博臣. 生細胞内 ATP 濃度イメージング. **生体の科学**. 査読無, 65, 294-198, 2014

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**. 査読有, 62:1996-2003, 2013
doi: 10.2337/db12-0903

Liu L, Nagashima K, Yasuda T, Liu Y, Hu HR, He G, Feng B, Zhao M, Zhuang L, Zheng T, Friedman TC, Xiang K. Mutations in KCNJ11 are associated with the development of autosomal dominant, early-onset type 2 diabetes. **Diabetologia**. 査読有, 56: 2609-18, 2013
doi: 10.1007/s00125-013-3031-9

〔学会発表〕(計 4 件)

今村博臣. 細胞エネルギーを可視化する. 第 23 回日本バイオイメージング学会学術集会. 2014.9.4-6, 大阪

Imamura H. Fluorescent imaging of ATP levels in live cells. 京都大学 - 台湾大学シンポジウム 2014, 2014.9.1-2, 京都

田中 喬, 長嶋一昭, 稲垣暢也, 野地 博行, 垣塚 彰, 今村博臣. 蛍光 ATP バイオセンサーを用いたインスリン分泌細胞内 ATP のダイナミクスの計測. 第 86 回日本生化学会大会. 2013.9.11-13, 神奈川

今村博臣. 蛍光 ATP バイオセンサーを用いた ATP 代謝の解析. 第 50 回日本臨床分子医学会学術集会. 2013.4.12-13, 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長嶋一昭 (NAGASHIMA KAZUAKI)
京都大学・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・准教授
研究者番号 : 20422545