

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670100

研究課題名(和文)心臓丸ごとの拍動時のエネルギー変動を1細胞レベルで解析するシステム開発

研究課題名(英文)Development of the measuring technique of ATP dynamics in beating whole heart

研究代表者

山本 正道(yamamoto, masamichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：70423150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：2009年にATP濃度を可視化するFRET蛋白質としてATeamが開発され、細胞株内部のATP分布と変動が報告された。そこで本研究ではこのATeamを応用して高解像度・高速反応性かつ定量的にATPを測定できる新規ATeamを利用して、マウス生体内でATP変動を測定できるシステムを構築することに世界で初めて成功した。このマウスを用いて正常な心臓が拍動する時に取るATPの動態を蛍光顕微鏡を用いて計測した。その結果、心臓の拍動と共にATP量が変動している事が明らかとなってきた。

研究成果の概要(英文)：In 2009, it was reported that the distribution of ATP dynamics in culture cell by ATeam, which was developed for FRET probe detecting ATP levels in vivo. In this study, I tried to develop novel ATeam which measure the correct ATP levels for high resolution and high speed, then was successful in developing the powerful mouse measuring the ATP dynamics in mouse. I tried to examine the ATP dynamics in beating heart under the fluorescent microscope. At the result, it was clear that ATP levels are dependent on beating in heart.

研究分野：代謝イメージング

キーワード：アデノシン三リン酸

1. 研究開始当初の背景

心臓は全ての動物の生命活動の中核となっている臓器である。ヒトにおいて、特に先進国では心疾患は主要な死亡原因の一つである。

心疾患の診断や解析は臨床では心電図・超音波検査・CT検査・MRI検査・心臓カテーテル検査など、基礎では生化学的方法・電気化学的方法などいずれも心臓全体を組織・部位として捉えた低解像度の空間を時間軸に沿って解析するに留まっている。そのため、左室駆出率の低下などにおける原因細胞の特定は不可能であった(Koitabashi, N. et al *Nature Rev Cardiol.* 2011)。これは心臓を構成する各細胞レベルの機能としてエネルギー増減・カルシウム(Ca²⁺)濃度・電位変化などを高解像度かつ高速反応で検出する方法が開発されてこなかったためである。

近年、細胞内カルシウムを測定する事に使われてきた Fluo-02 などの化学指示薬から GCaMP などを初めとする遺伝子組換え型蛍光 Ca²⁺プローブの開発により Ca²⁺濃度の側面から心臓全体を1細胞毎に高解像度で解析する方法が試されている。しかし、マウスの心臓は1秒間に約6回拍動するため、既存の Ca²⁺プローブが高速に反応する事で Ca²⁺濃度変化を正確に捉えられるかは不明である。

2009年に開発されたアデノシン3リン酸(ATP)濃度を可視化するプローブ(ATeam)は細菌のATP合成酵素を構成する蛋白質の一つ

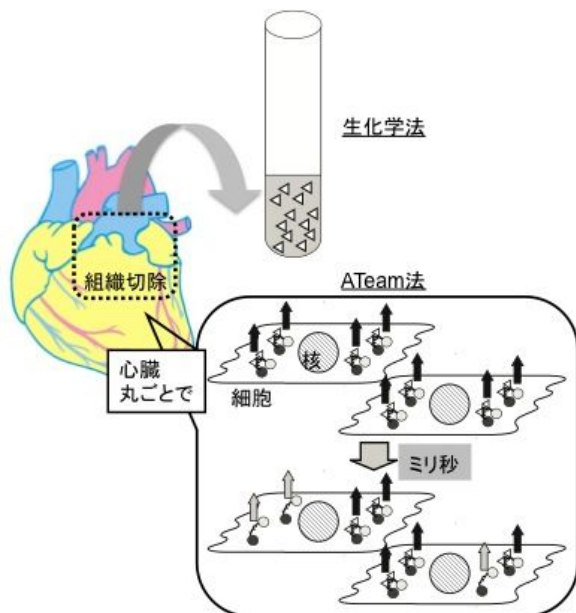


図1: エネルギー検出方法の比較

従来の生化学法は組織から切除した後にすり潰して解析する。今回の ATeam 法は拍動する心臓をそのまま非侵襲的に観察する事で解析する。

である サブユニット(ATP結合タンパク質)

を介して CFP と YFP を結合させて作成されている。これは ATP 濃度が上昇すると サブユニット部分が構造変化して CFP を励起する 440nm の光を当てても CFP から YFP への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こり、GFP 由来の蛍光が減少して YFP 由来の蛍光が主に発せられるようになる。この各蛍光輝度値を利用して、FRET(YFP)/GFP の輝度値の Ratio を用いる事で高解像度にエネルギー増減を計測できる(図1)。

2. 研究の目的

心臓は常に収縮し血液を送り出すポンプとしてエネルギー(ATP)を消費・供給している臓器である。ポンプ機能に直結する生理学的な心機能の知見は培養細胞レベルと個体臓器レベルで乖離がある。2009年にATP濃度を可視化する FRET 蛋白質として ATeam が開発され、細胞株内部の ATP 分布と変動が報告された。そこで本研究ではこの ATeam を利用して高解像度・高速反応性かつ定量的に ATP を測定できる ATeam を開発して、マウス生体内での ATP 変動を1細胞毎に測定できるシステムを構築する。更に、このマウスで正常や心疾患時(Yamamoto, M. et al. *Development.* 2003, Koitabashi, N. et al *JCI.* 2011)における心臓まるごとの生理的機能を1細胞レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1)ATP 可視化マウスの作出

ATeamはマウス ROSA26領域へノックインする構築にして、エレクトロポレーション法を用いた定法にて ES 細胞を経てキメラマウスを作出した。生殖系列移行が確認されたキメラマウスと野生型のマウスを交配する事により F1 マウスを得た。ここから全身で ATeam が発現するマウス(ATP 可視化マウス)を得た。

(2)ATP 可視化マウス繊維芽細胞の樹立

ATP 可視化マウスと野生型マウスを交配した後、受精後 14 日目の胚を子宮から回収してきて DMEM/10% FCS を用いて定法によりマウス繊維芽細胞を樹立した。

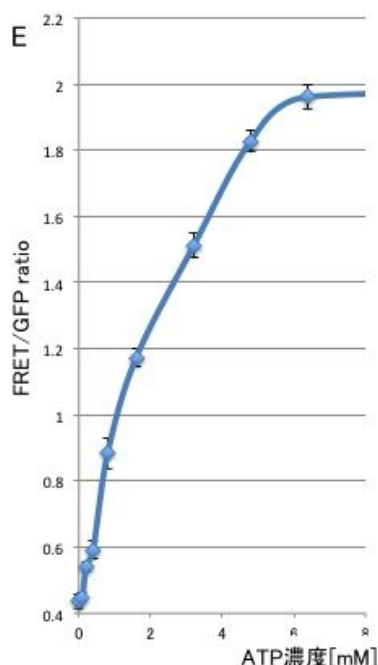
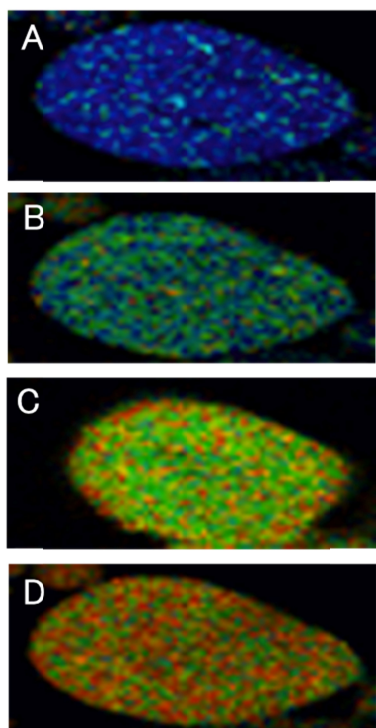
(3)蛍光 Ratio 値から ATP 量の定量法

マウス繊維芽細胞を黄色ブドウ球菌由来の -toxin (-Hemolysin) を加えた permilization buffer (140mM KCl, 6mM NaCl, 0.1mM EGTA, 10mM HEPES (pH7.4))にて処理する事で脂質二重膜である細胞膜に穴を開けた後に Calibration buffer (140mM KCl, 6mM NaCl, 0.5mM MgCl2, 10mM HEPES (pH7.4))に置換する。置換した培養液に各濃度にあわせた Mg-ATP を Calibration buffer へ溶解してマウス繊維芽細胞の蛍光

を測定した。測定は蛍光顕微鏡を用いて、488nm で励起した後にバンドフィルター FF02-520/35 とダイクロイックミラーにて分光した 552nm 以上の蛍光を BLP01-532R のロングパスフィルターにて得た。得られた 2 色の蛍光画像を Metamorph にて解析して FRET ratio 画像を得た。

(4)心臓丸ごと ATP 増減の解析法

心臓丸ごとの観察は ATP 可視化マウスをイソフルラン麻酔、人工呼吸器管理下で、電気メ



スを用いて止血・開胸し、心臓を蛍光顕微鏡

下で観察した(Koitaishi, N. et al. *J Clin Invest.* 2011)。488nmで励起させた後に、吸収フィルタ 515/30nmと 575/40nmで2つの蛍光画像を CCD カメラで得る。画像取得速度は 100 フレーム/秒から 30 フレーム/秒で行う。得られた画像は Metamorph にて解析する。

(5)低酸素暴露法

心臓丸ごとの観察時に低酸素状態にする事で、心臓への酸素供給量を低下させて心臓の拍動を遅くさせる。このために ATP 可視化マウスをイソフルラン麻酔後に気管支挿管して人工呼吸器管理下で止血・開胸を進めていくが、心臓を蛍光顕微鏡で観察している際に人工呼吸器を陰圧で停止して、肺へ酸素が強制的に流入しないようにする。この状態にして約 1 分程度すると低酸素状態に陥る。

4. 研究成果

(1)蛍光 Ratio 値は ATP 量に正の相関をする。図 2: ATP 可視化マウスから樹立したマウス繊維芽細胞における蛍光 Ratio 値と ATP 量の関係。

A)ATP 量 0.8mM 時のマウス繊維芽細胞。B)ATP 量 1.6mM のマウス繊維芽細胞。C)ATP 量 3.2mM のマウス繊維芽細胞。D)ATP 量 4.8mM のマウス繊維芽細胞。A~D は全て Metamorph にて FRET/GFP の ratio 画像を IMD イメージで示している。Ratio は 0.4 から 2.0 で設定して解析を行っている E)蛍光 Ratio 値(Y 軸)と ATP 量(X 軸)の関係。

マウス繊維芽細胞を用いて、細胞膜に ATP が透過する程度の穴を開けた後に、培養液に様々な濃度の ATP を添加して、2 光子顕微鏡にて観察する事で、蛍光 Ratio 値と ATP 量の相関性を調べた。その結果、ATP 量が 0.1mM から 6mM まで変化する間に蛍光 Ratio 値は 0.4 から 2.0 まで直線状に変化しており、正の相関が示された(図 2)。これより、本マウスを用いる事で、ATP 量が 0.1mM から 6mM までを蛍光の Ratio 値として非侵襲的に調べる事ができると示唆された。

(2)心臓が拍動する時に ATP 量は変動する。心臓の拍動と共に ATP 量が変動するかどうかを調べるため、気管支挿管した ATP 可視化マウスをイソフルラン麻酔後に電気メスなどを用いて開胸して蛍光顕微鏡にて 2 色の蛍光の観察を行った。画像は 1 秒間に 33 フレームから 100 フレームで取得した。その画像を用いて metamorph にて解析を行う事で FRET/GFP の ratio 画像を作成して IMD イメージへと変換した。その結果、心臓の拍動と共に ATP 量が変動している事が明らかとなってきた。

更に、人工呼吸器を停止する事により低酸素

暴露を試みた。低酸素状態にすると徐々に心臓の拍動が遅くなるがATPの量と変動には正常時の心臓と比較して大きな変化は見られなかった。低酸素暴露後1分後には心室の拍動は落ち、心房は収縮運動を起こさなくなっていた。この時のATP量とその変動は、心室では遅い収縮-弛緩運動に同調するようにしてATP量の変動は正常時と変わりなかった。一方、収縮運動を停止した心房では正常な心房で観察されていたATP量の変動が完全に消失した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山本正道

マウス生体内におけるATP動態、第9回NIBBバイオイメージングフォーラム、2015年1月27日、岡崎(愛知県)

山本正道

生体内におけるエネルギー動態、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月3日、神戸(兵庫県)

山本正道

Visualization of ATP level in vivo、CREST International Symposium 2015、2015年12月26日、岡崎(愛知県)

山本正道

Visualization of ATP level in vivo、第93回日本生理学会大会、2016年3月22日、札幌(北海道)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ATP可視化動物およびその用途

発明者：山本正道

種類：特許

番号：PCT/JP2015/050932

出願年月日：平成27年1月15日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/yamamoto.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 正道 (YAMAMOTO MASAMICHI)

京都大学・大学院医学研究科腎臓内科学・

特任講師