

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

所 属	大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学
氏 名	木岡 秀隆
研究テーマ	ATP産生増強を介した虚血耐性獲得機構の解明と創薬標的探索

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

【背景・目的】

我々はATP感受性蛍光FRETプローブ(ATeam)を用いることにより、ミトコンドリアの最も重要な機能であるATP産生を司る電子伝達系複合体VであるF₀F₁-ATP合成酵素と結合することによりそのATP合成活性を増強させる遺伝子G0s2を新規に同定した(Kioka H, et al. *PNAS* 2014;111(1):273-8.)。

本研究ではMit-ATeamアッセイを*in vivo*に拡大し、G0s2の*in vivo*での虚血耐性獲得能及び機序解明について検討する。

【研究方法・結果】

心臓特異的 Mit-ATeam トランスジェニックゼブラフィッシュの作成と、拍動する心臓での *in vivo* ATP imaging

以前より我々が用いているGal4-UASシステムを用いて心臓特異的Mit-ATeamゼブラフィッシュを作成した。一般的に拍動する心臓のイメージングは、脳や骨などに比較して困難とされている。我々のシステムにおいては心周期(拡張期—収縮期)に伴うYFP/CFP比の変化はわずかであったことから、モーション・アーチファクトはほとんど無いことが判明し、正確な心機能 ATP 濃度同時イメージングに成功した。

G0s2 モザイク発現モデルを用いた G0s2 による臓器保護効果

ゼブラフィッシュ受精卵に心臓特異的プロモーターをつけたG0s2コンストラクトをインジェクションすることにより、Mit-ATeamゼブラフィッシュの心臓にモザイク状にG0s2発現させるモデルを作成した。G0s2モザイク発現モデルを用いて、G0s2発現領域(*g0s2(+)*)と非発現領域(*g0s2(-)*)でのATP濃度の変化を観察した。G0s2発現領域では非発現領域に比べATP濃度(YFP/CFP比にて表される)が保持されていることが示された。更にG0s2発現領域においては、心筋壁運動が低酸素化においても保たれていた。このことよりG0s2は生体内においても低酸素条件においてもATP産生を保持することにより臓器機能を保持する作用を持つ事が示された。

【考察・結論】

培養細胞と生体内ではエネルギー代謝は大きく異なることが知られており、生体を用いたエネルギー代謝研究はヒト疾患解明のために必須であると考えられる。しかし、特に拍動する心臓において生体内蛍光イメージングはモーション・アーチファクト、自家蛍光等の様々なアーチファクトが関与しうるため開発が困難であった。我々はコントロールFRETプローブを用いることによりアーチファクトの可能性を除外し、正確な生体内ATP濃度イメージング系の確立に成功した。今回確立した心機能、ATP濃度同時イメージング系を用いることにより、細胞実験により示されていた現象同様に、G0s2は生体内においても低酸素下にATP産生を保持することにより臓器保護的に作用し、虚血耐性獲得に寄与することが示された。

【今後の課題】

病態におけるG0s2機能解析を行うために、現在G0s2コンディショナルノックアウトマウスの作成を行っている。また、マウスでもエネルギー状態の可視化を試みる。マウス心筋梗塞モデル、及び虚血の関与も示唆されるマウス心不全モデルを用いて、G0s2の機能解析を進め、虚血性心疾患および慢性心不全治療の創薬ターゲットとして研究を継続する予定である。

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2015年9月7日～ 2015年9月11日	11th MiPconference on Mitochondrial Physiology (国外) T Hayashi, Y Asano, Y Shintani Y, <u>H Kioka</u> , T Tsukihara, S Yoshikawa, S Takashima. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase
2	2014年11月15日 ～2014年11月19日	American Heart Association Scientific Sessions 2014 (国外) <u>H Kioka</u> , H Kato, Y Asano, Y Sakata, M Kitakaze, S Takashima. In vivo Visualization of ATP Dynamics Under Hypoxia Reveals That G0/G1 Switch Gene 2 Provides Ischemic Tolerance Through the Increase of ATP production
3	2014年10月10日 ～2014年10月12日	第18回日本心不全学会学術集会 (国内) H Kato, <u>H Kioka</u> , Y Asano, S Takashima. Evaluation of Mitochondrial ATP Levels In Vivo Identifies G0/G1 Switch Gene 2 as a Therapeutic Target of Ischemic Heart Failure
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿準備中	Visualization of ATP dynamics under hypoxia in zebrafish heart revealed that G0s2 is a guardian of hypoxic tissue
2		
3		
4		