

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

## 研究成果報告書(最終) &lt;概要&gt;

所 属	京都大学 大学院医学研究科 腎臓内科学
氏 名	山本正道
研究テーマ	エネルギー代謝可視化による心疾患の解析

- ・ 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)

## &lt;研究目的&gt;

心疾患は主要な死亡原因の一つである。その理由の一つは、心疾患の診断や解析が心臓全体を組織・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事である。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( $Ca^{2+}$ )濃度や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。

2009年にATP濃度を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の機能を用いて可視化する蛍光プローブ(ATeam)が開発された。そこで、このATeamを応用して高解像度・高速反応かつ定量的にATPを測定できるATeamを開発した。本研究では、これを利用してマウス生体内で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、このマウスを用いて心臓の生理的機能をエネルギーの側面から高解像度・高速反応かつ定量的に解明する。

## &lt;研究成果&gt;

CFPとYFPにより作成されたATeamをEGFPとKusabira Orangeの長波長での組み合わせへ改変する事で、臓器深部までpH安定的に計測できるプローブを用いた。この改良型ATeamをマウスROSA26領域へノックインする形でマウスを作成することで、全身でATeamが発現するマウス(ATP可視化マウス)を作出する事に成功した。

このマウスの受精後14日目胚から繊維芽細胞を樹立して、EGFPとKusabira Orange(FRET)の蛍光比(FRET/EGFP)とATP量の相関性を調べた。具体的には黄色ブドウ球菌由来の毒素を用いて、繊維芽細胞の細胞膜に穴を開ける事で培養液中のATPが細胞内に取り込まれるようにして、培養液のATP濃度を変化させたときの蛍光比を計測した。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。更に、誤差値も0.08以下と非常に小さかった。これより、ATP量が0.1mMから6mMまでの間にあれば、細胞内部のATP量を蛍光Ratio値として非侵襲的に計測できる事が示された。

心臓が拍動する時に洞結節からヒス束を介して心臓全体に活動電位が上昇する事が電気生理学的手法及びオプティカルマッピングの手法を用いて報告されているが、臓器レベル及び細胞レベルでのATPを介したエネルギー利用に関しては全く不明であった。そこで、ATP可視化マウスを用いて臓器レベルで心臓拍動時におけるATP量の増減を調べた。ATP可視化マウスをイソフルラン麻酔下で気管支挿管する事で人工呼吸器の管理下にした後、電気メスを用いて開胸して拍動する心臓を蛍光顕微鏡下で観察した。蛍光は488nmの励起光を照射して、吸収光を515nmを中心とした30nmのバンド波と575nmを中心とした40nmのバンド波に分離する事でEGFPとFRETの蛍光を得た。得られた蛍光画像は蛍光画像解析ソフト(metamorph)を用いてFRET/EGFP ratio値として計算し、IMDイメージで表す事にした。

その結果、心臓が拍動した時にATP量の変動する像が得られた。更に、ATP可視化マウスに低酸素処理を行うと心臓の拍動速度が低下するが、それとともに心室でのATP量の変動は低下した。また、心房では収縮-弛緩運動が消失するとATP量の変動は観察されなくなった。



2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2016年9月9日	第88回 日本遺伝学会、山本正道、マウス生体内におけるATP動態の可視化
2	2016年3月22日	第93回 日本生理学会大会、山本正道、Visualization of ATP levels in vivo
3	2015年12月26日	CREST International Symposium 2015、山本正道、Visualization of ATP levels in vivo
4	2015年12月3日	第38回 日本分子生物学会年会、山本正道、生体内におけるエネルギー動態
5	2015年1月27日	第9回 NIBB バイオイメージングフォーラム、山本正道、マウス生体内におけるATP動態
6	2014年11月14日	International Symposium by ASRLD-Unit、山本正道、Visualization of ATP levels in vivo
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		