

博士論文

生細胞イメージング技術を用いた  
小腸内分泌 L 細胞の生理機能解析

原田 一貴

## 目次

略語.....	3
第1章 序論.....	5
1.1. ホルモンによる生体恒常性調節.....	5
1.2. ホルモン分泌器官としての消化管.....	5
1.3. 小腸内分泌L細胞とグルカゴン様ペプチド-1.....	6
1.4. 蛍光イメージング手法による細胞機能の解析.....	7
1.5. 本研究の目的.....	9
第2章 リゾホスファチジルイノシトールによる GLP-1 分泌制御機構.....	11
2.1. 緒言.....	11
2.2. 材料と方法.....	12
2.3. 結果.....	16
2.4. 考察.....	19
第3章 赤色蛍光タンパク質を用いた cAMP 可視化センサーの開発と応用.....	21
3.1. 緒言.....	21
3.2. 材料と方法.....	22
3.3. 結果.....	28
3.4. 考察.....	32
第4章 キニーネによる GLP-1 分泌制御機構.....	35
4.1. 緒言.....	35
4.2. 材料と方法.....	36
4.3. 結果.....	38
4.4. 考察.....	40
第5章 総合討論.....	43
5.1. 本研究から得られた知見とその意義.....	43
5.2. 現在の研究手法の限界とさらなる研究の進展に向けて.....	44
第6章 総括.....	47
参考文献.....	48
謝辞.....	64
図表.....	65

## 略語

A.U.: arbitrary unit

(任意単位)

AUC: area under curve

(曲線下面積値)

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

(環状アデノシンーリン酸)

cGMP: cyclic guanosine monophosphate

(環状グアノシンーリン酸)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

(酵素共役免疫吸光法)

Epac: exchange protein directly activated by cAMP

(cAMP 結合タンパク質)

FI: fluorescence intensity

(蛍光強度)

Fsk: forskolin

(フォルスコリン)

FRET: Förster resonance energy transfer

(フォルスター共鳴エネルギー移動)

GLP-1: glucagon-like peptide-1

(グルカゴン様ペプチド-1)

GPCR: G protein-coupled receptor

(G タンパク質共役型受容体)

IBMX: 3-isobutyl 1-methylxanthine

(3-イソブチル 1-メチルキサンチン)

IP<sub>3</sub>: inositol 1, 4, 5-trisphosphate

(イノシトール 1, 4, 5-トリスリン酸)

IP<sub>3</sub>R: inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor

(イノシトール 1, 4, 5-トリスリン酸受容体)

K<sub>ATP</sub> channel: ATP-sensitive potassium channel

(ATP 感受性カリウムチャンネル)

LPI: lysophosphatidylinositol

(リゾホスファチジルイノシトール)

PAC: photoactivated adenylyl cyclase

(光活性化アデニル酸シクラーゼ)

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

(ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ)

PLC: phospholipase C

(ホスホリパーゼ C)

ROCK: Rho-associated protein kinase

(Rho 関連タンパク質キナーゼ)

RR: ruthenium red

(ルテニウムレッド)

siRNA: small interfering RNA

(低分子干渉 RNA)

Tas2R: taste receptor type 2

(2 型味覚受容体、苦味受容体)

TIRFM: total internal reflection fluorescence microscopy

(全反射蛍光顕微鏡)

tPA: tissue-type plasminogen activator

(組織型プラスミノゲン活性化因子)

TRPV2: transient receptor potential cation channel subfamily V member 2

(transient receptor potential 陽イオンチャネルサブファミリーV メンバー2)

VDCC: voltage-dependent calcium channel

(電位依存性カルシウムチャネル)

## 第1章 序論

### 1.1. ホルモンによる生体恒常性調節

地球上の生物は、様々な外界の環境変化や刺激に応答し、最適な行動を選択していく。生命現象は細胞単位での分子ダイナミズムにより引き起こされるが、ヒトなどの多細胞生物においては、離れた位置にある細胞同士が適切にシグナルを授受し、個体全体の応答が制御される必要がある。

そのための仕組みとして発達したのが、神経系による調節機構と、体液中のホルモンなど液性因子を介した調節機構である。神経系は非連続なシナプス接合の集合体として機能しており、定まった投射先に向かって迅速なシグナルを伝達する。対して液性因子による調節は、始点と終点である分泌細胞と標的細胞は定まっているものの、全身にめぐらされた血管やリンパ管中での運搬により行われるため、シグナルの伝達速度は神経系よりも低速である。また、一つの因子が複数の標的細胞に作用し、それぞれで異なった作用をもたらすこともある。

両者は様々な局面で補完的にはたらき、個体の恒常性を維持している。例えば血糖値が低下すると、間脳の視床下部および膵臓のランゲルハンス島がグルコース濃度低下を感知する[1-4]。視床下部の神経内分泌細胞から成長ホルモン放出ホルモンや副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンが脳下垂体門脈中へ分泌されると、下垂体前葉から成長ホルモンや副腎皮質刺激ホルモンが分泌され、アドレナリンやグルココルチコイドの分泌促進により血糖値を上昇させる[5]。また視床下部が交感神経を活性化し、これもアドレナリン分泌の促進や肝臓でのグリコーゲン分解促進を通じて血糖値を上昇させる[6]。さらに、膵 $\alpha$ 細胞ではグルカゴンの分泌が促進され、血糖値上昇を引き起こす[3]。反対に血糖値が上昇すると、下垂体からのホルモン分泌が抑制され、副交感神経が活性化して血糖値を低下させる。また膵 $\beta$ 細胞から分泌されるインスリンも血糖値低下作用を示す[4]。これらの作用は、血糖値やホルモン濃度の変化を受けたフィードバック制御により、厳密に調節されている。

### 1.2. ホルモン分泌器官としての消化管

消化管は、口から取り込まれた食餌成分や腸内細菌叢の通過または定着部位であり、それら外界刺激に対して適切な応答を示すことで、体内環境を保護する界面としての役割を果たす。栄養素などの有益な成分に対しては、蠕動運動や消化液の分泌を行い、エネルギーとして摂取する。一方で毒素や病原体に対しては免疫反応や嘔吐反射を通じて除去作用を示す。

こうした消化管の機能には、消化管内分泌細胞由来のホルモンが深く関与している。消化管内分泌細胞は消化管上皮細胞中に散在しており、形態的には頂端部が消化管内腔（管腔）まで到達し微絨毛を有した「開放型」（open-type）細胞と、基底膜側のみに面し微絨毛を持たない「閉鎖型」（closed-type）細胞の2つに大別される[7]（図1）。開放型の細胞は、その形状から管腔内の化学物質を直接感知していると考えられる。両者の細胞とも、基底膜側から消化管ホルモンを分泌する。分泌された消化管ホルモンは、血液中に取り込まれて離れた標的細胞に作用し、また付近の外分泌細胞や神経細胞にパラクリン様式でも作用する。

消化管内分泌細胞は10種類以上存在し、多くの場合1種の細胞が1種類のみホルモンを分泌する[8]。このうちS細胞から分泌され、膵臓から重炭酸イオンの分泌を促進するセクレ

チンは、世界で初めて発見されたホルモンでもある[9]。消化管ホルモンのはたらきにより、消化管自身のみならず、消化管に接続した神経系も含めた「腸脳連関」(gut-brain axis)の機能制御が成立している。消化管ホルモンの一種であるモチリンやセロトニンが脊髄神経や迷走神経に作用することで、蠕動運動や嘔吐、下痢などの反射行動が制御されるほか[7]、胃から分泌されるグレリンは、血液脳関門を通過して間脳視床下部にも作用し、摂食行動を制御している[10, 11]。すなわち消化管は、管腔という対外環境をモニターする感覚器官であると同時に、その情報を消化管ホルモンの形で全身の神経系、内分泌系、免疫系に伝達する内分泌器官ともみなすことができる(図1)。これらのホルモンの分泌異常は、炎症性腸疾患、肥満、糖尿病など多くの疾患発症にも関与しており、消化管ホルモンによる腸脳連関の制御機構を理解することは、薬剤開発や臨床治療を目指すうえでも重要といえる。

### 1.3. 小腸内分泌 L 細胞とグルカゴン様ペプチド-1

小腸内分泌 L 細胞(以下 L 細胞)は主に小腸下部の空腸から回腸に分布しており[12, 13]、微絨毛を持つ頂端部が管腔側に、基部が血管や神経に面した開放型の細胞である[8]。L 細胞から分泌されるグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1)は、当初は膵  $\alpha$  細胞から分泌されるグルカゴンと類似したペプチド構造を持つことから「腸管グルカゴン」(enteroglucagon)と呼ばれていたペプチドホルモンであり[14-16]、実際に同一の前駆体タンパク質であるプログルカゴンからプロセッシングを受けて産生される[17, 18](図2A)。

分泌された GLP-1 は、血液中を通過して膵  $\beta$  細胞の GLP-1 受容体に結合し、膵  $\beta$  細胞内の cAMP 濃度を上昇させることで、グルコース濃度依存的に起こるインスリン分泌を増強する[19-21]。この GLP-1 によるインスリン分泌促進作用は、細胞外グルコース濃度に依存しており、低グルコース濃度下においてはインスリン分泌を促進しない[22]。加えて、GLP-1 は膵  $\beta$  細胞のアポトーシスを抑制し、膵  $\beta$  細胞の再生を促進する可能性も示唆されている[23]。さらに、GLP-1 は迷走神経や中枢神経にも作用し、食欲を抑制する[24](図2B)。そのため、GLP-1 分泌を促進することで、低血糖に陥るリスクを回避しながら血糖値の上昇を防ぐことが可能であり、糖尿病治療のための薬剤開発標的として注目されている。現在、GLP-1 の類似体である Exendin-4 や、GLP-1 を分解する dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) に対する阻害剤が糖尿病治療薬として実用化されている[25, 26]。

L 細胞が開放型の細胞であることから、GLP-1 分泌は管腔側と基底膜側、両方面からの制御を受けると考えられる。特に血中 GLP-1 濃度は食後に上昇するため、管腔側に流入する食餌由来成分が分泌制御因子として注目され、その作用機序の解明が行われてきた。食事由来成分のうち古くから詳細な研究がなされてきたのは、糖のなかでも生体にとって最も一般的なエネルギー源であるグルコースで、GLP-1 分泌促進作用を持つ[27]。様々な実験から、グルコースによる GLP-1 分泌にはグルコーストランスポーター SGLT (sodium-dependent glucose transporter)、ATP 感受性カリウムチャネル (ATP-sensitive potassium channel:  $K_{ATP}$  channel) の関与が示唆されている[28, 29]。また、種々の脂肪酸やアミノ酸にも GLP-1 分泌促進作用が認められており、脂質は GPR40、GPR41、GPR43 および GPR120[30-32]、アミノ酸はカルシウム感受性受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR) および GPRC6A (G protein-coupled receptor

family C group 6 subtype A) といった G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) によって分泌促進シグナルが伝達されると考えられている[33, 34]。さらに食餌成分以外にも、食事に伴い肝臓で合成され、胆のうから管腔内へ分泌される胆汁酸が GLP-1 分泌を促進することや[35]、腸内細菌によって合成される代謝産物のインドールや S-エクオールが GLP-1 分泌を抑制することが知られている[36, 37]。

基底膜側由来の分泌制御因子としては、消化管に投射する自律神経由来の神経伝達物質が早くから注目されてきた。副交感神経系の神経伝達物質であるアセチルコリンは、GLP-1 分泌促進作用を持ち、ムスカリン型アセチルコリン受容体の関与が見出されている[38]。交感神経系の神経伝達物質であるノルアドレナリンには、GLP-1 分泌への影響が認められなかったが、アドレナリン受容体のうち  $\beta$  アドレナリン受容体に対するアンタゴニストによる GLP-1 分泌増加が報告されている[39]。

また、GLP-1 以外の消化管ホルモンも GLP-1 分泌制御に関与している。小腸内分泌 S 細胞や膵  $\delta$  細胞から分泌されるソマトスタチンは、GLP-1 分泌を抑制する[40]。一方、セロトニンは中枢神経系では神経伝達物質として機能するが、消化管では消化管内分泌細胞の一種である腸クロム親和性細胞から分泌されるものが大半を占め、GLP-1 分泌促進作用が認められている[41]。さらに近年、ストレスや免疫と関連する物質が GLP-1 分泌に影響を及ぼすことも分かっている。グルココルチコイドは GLP-1 分泌を抑制するが[42]、インターロイキン 6 やアドレナリン、アルギニンバソプレシンは GLP-1 分泌を促進する[42-44]。

以上から、GLP-1 分泌は食餌成分に応じて起こるだけでなく、消化管全体、さらには全身の状態変化に応じて多彩に制御されるものであると考えられる (図 3)。この複雑な現象のメカニズムを解明するにあたっては、電気生理学やタンパク質生化学の手法を用いた定量的な解析や、動物個体を用いた実験に加え、細胞内で起こるシグナル伝達動態を経時的に捉えることが必要となる。そのためのツールとして、後述する蛍光イメージング手法が有効だといえる。

#### 1.4. 蛍光イメージング手法による細胞機能の解析

細胞内現象を解析するにあたっては、「どの分子が、いつ、どのように変動したか」を明らかにすることが求められる。そのための手法として、とりわけ神経細胞で威力を発揮したのがパッチクランプ法などの電気生理学的手法である。神経細胞や一部の内分泌細胞は「興奮性細胞」と呼ばれ、電位依存性のイオンチャネルが多数発現しており、活動電位の発生を利用して開口分泌などを行っている。そのため、細胞膜上での電位や電流の変化を測定することで、細胞の活動状態をリアルタイムで知ることができる。さらに現在では、光照射によって活性化されるチャンネルロドプシンなどのイオンチャネルを発現させ、特定の細胞を興奮または不活性化させた際の影響も解析可能である[45]。しかし、この手法には適用対象が興奮性細胞に限られるという欠点がある。例えば、神経系においてアストロサイトなどのグリア細胞は非興奮性細胞であり、従来は積極的な情報処理に関与しているとはみなされなかった[46]。

非興奮性細胞でも高い時空間分解能での解析を可能にしたのが生細胞イメージング、とりわけ蛍光イメージング手法である。蛍光イメージング手法で用いるツールには、大きく分け

て蛍光指示薬と蛍光タンパク質がある。両者とも、オワンクラゲから単離されたカルシウム感受性蛍光タンパク質イクオリン、および緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) の発見が端緒となって発展してきた。

イクオリンは、外液中の  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すると青色の発光を呈するタンパク質である。目的の細胞にインジェクションし青色発光の変化を観察することで、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を可視化できるようになった[47]。しかしイクオリンは発光強度が低いため、現在では、同様の性質を持ちながら明るく、低分子量で導入のしやすい  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光指示薬が多数開発、改良されている[48]。さらに、可視化対象とする分子も  $\text{Ca}^{2+}$  だけでなく、硫化水素、一酸化窒素など多様化している[49, 50]。具体的な成果として、緑色  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素 Fluo4 と二光子顕微鏡を使用することで、生きたマウスの脳内でアストロサイト細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が絶えず変動していることが発見され、グリア細胞が神経系の情報伝達に積極的に関与するという、新たなパラダイムの確立に発展した[51]。

GFP は、青色光の照射により緑色の蛍光を発するタンパク質である。分子生物学的手法を用いて幅広い細胞種において発現させることができるため、遺伝子発現マーカーやタンパク質輸送マーカーとして多用されている[52]。さらに GFP に遺伝子変異を導入することで、青色、黄色、オレンジ色、赤色など、様々な波長の蛍光を発する蛍光タンパク質が開発されている[53]。

この蛍光タンパク質を利用し、特定分子の濃度変化を可視化する蛍光タンパク質センサーが開発された。最初に開発されたのはフォルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer: FRET) の原理を利用した FRET 型センサーで、2 つの蛍光タンパク質と、目的分子に対する結合ドメインタンパク質を遺伝子工学的に融合して作製される。2 つの蛍光タンパク質は、CFP (シアン) と YFP (黄)、GFP (緑) と RFP (赤) など、片方の蛍光波長がもう片方の励起波長と重なる組み合わせとする (図 4A)。目的分子が結合ドメインに結合すると、その構造変化に伴って蛍光タンパク質間の距離が変化する。ここで短波長側の蛍光タンパク質に対する励起光を照射すると、そのエネルギーが長波長側の蛍光タンパク質に移動する FRET 現象が起こる、あるいは消失し、長波長側の蛍光タンパク質の蛍光強度が増減する。すなわち、目的分子の濃度変化が 2 つの蛍光タンパク質の蛍光強度比の変化として可視化される。

この原理で最初に開発されたのが、FRET 型  $\text{Ca}^{2+}$  センサー Cameleon である[54]。Cameleon は CFP と YFP、そして両者の間に融合されたカルモジュリンと M13 ペプチドからなる。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇してカルモジュリンに結合すると、その構造が M13 を包み込むように変化し、CFP と YFP が接近して FRET が起こる。この Cameleon を端緒として、現在では環状アデノシンリン酸 (cyclic adenosine monophosphate: cAMP)、環状グアノシンリン酸 (cyclic guanosine monophosphate: cGMP)、ATP、グルコース、乳酸など、様々な分子に対する FRET 型センサーが開発されている[55–58]。

続いて開発されたのは、蛍光タンパク質を 1 種類のみ用いる単色輝度変化型センサーである。単色輝度変化型センサーは、遺伝子変異を導入した 1 つの蛍光タンパク質と結合ドメインを融合して作製される。変異導入と融合の方法は、挿入型と円順列変異型に大別され、両



者とも蛍光タンパク質の蛍光放出に重要な発色団と呼ばれる部分の付近のアミノ酸に変異を加える。挿入型では、発色団付近の位置で蛍光タンパク質を分割し、その間に結合ドメインを挿入する (図 4B)。円順列変異では、発色団付近の位置で蛍光タンパク質の配列を入れ替え、その一端または両端に結合ドメインを付加する[59] (図 4C)。目的分子が結合すると、発色団のイオン環境が変化し、蛍光タンパク質の蛍光強度が上昇ないし低下する。すなわち、目的分子の濃度変化が蛍光強度の変化として可視化される。

単色輝度変化型センサーも  $\text{Ca}^{2+}$ センサーで最初に開発がなされ、挿入型では Camgaroo[59]、円順列変異型では GCaMP[60]および pericam[61]が初の開発例である。現在では対象分子が cAMP、cGMP、ATP など多様化し、蛍光タンパク質の多色化も実現しているが、FRET 型センサーに比べるとそのバリエーションは少ない[62–65]。

FRET 型センサーと単色輝度変化型センサーにはそれぞれ長所、短所が存在する。FRET 型センサーは蛍光強度比で評価を行うため、焦点深度のずれの影響を受けにくい点、蛍光タンパク質自体には大規模な変異を導入しないため設計が比較的容易な点が優れている。その反面、目的分子の結合に伴う蛍光強度比の変化率が小さく、微細な変化を検知にくい点、観察に 2 つの蛍光波長の測定が必要で複数分子の同時観察がしにくい点が短所である。単色輝度変化型センサーは蛍光強度の変化率を向上させやすく、観察波長が 1 波長でよいため複数分子の同時観察を行いやすい点が優れている。一方で焦点深度のずれや細胞内 pH 変化が蛍光強度に大きく影響し、アーティファクトを生じやすい欠点があるほか、センサー開発の先行例も少ないため設計自体が難しい。そのため、蛍光イメージング解析を行うにあたっては、両者の特徴を把握したうえで最適なセンサーを選択、ないし開発する必要がある。

蛍光イメージング手法の発展には、蛍光顕微鏡技術の進歩も大きく貢献している。中でも、ホルモン分泌に関わる細胞内現象の解明に大きく役立ったのが全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscopy: TIRFM) である (図 5)。TIRFM は、標本の置かれたガラスの裏側でレーザー光を全反射させ、反射面から標本側へ染み出すエヴァネッセント光を励起光として用いる。エヴァネッセント光の強度は、反射面からの距離に応じて指数関数的に低下するため、ガラス面付近の領域にある蛍光分子のみを励起できる[66]。この方法を用いることで、細胞膜直下にある単一のシナプス小胞やホルモン分泌小胞の挙動を可視化できるようになった[67, 68]。また、ガラス表面に細胞骨格タンパク質やモータータンパク質を低濃度で定着させ、一分子イメージングを行うことも可能である[69, 70]。

以上の蛍光タンパク質センサーや顕微鏡技術の活用により、内分泌細胞や神経細胞をはじめとする様々な細胞において、細胞内の分子動態や分泌制御メカニズムの解明が進んでいる[62, 71]。本論文では、これらのツールをさらに発展・融合させ、小腸内分泌 L 細胞の生理機能解明を目指すこととした。

## 1.5. 本研究の目的

本論文では、小腸内分泌 L 細胞の生理機能解明を目指し、生細胞イメージングを技術的な軸として、以下の 3 つのテーマで研究を行った。

第一に、脂質の一種リゾホスファチジルイノシトールによる GLP-1 分泌制御機構について、

Ca<sup>2+</sup>イメージングおよび TIRFM を活用し、Ca<sup>2+</sup>、細胞骨格、イオンチャネルの動態観察に基づく解析を行った。その結果、リゾホスファチジルイノシトールによりアクチン骨格の再構成とイオンチャネルの膜移行が起こり、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇と GLP-1 分泌増強に結びつくことを示した。

第二に、細胞内 cAMP 動態の可視化解析を進展させるため、赤色単色輝度変化型 cAMP センサー Pink Flamindo を開発した。これを用い、Ca<sup>2+</sup>と cAMP の二色同時イメージング、光活性化アデニル酸シクラーゼとの併用、マウス脳内アストロサイトにおける *in vivo* 二光子顕微鏡イメージングに成功した。

第三に、苦味物質の一種キニーネによる GLP-1 分泌制御機構について、Ca<sup>2+</sup>イメージング、Pink Flamindo を用いた cAMP イメージング、および TIRFM を用い、特に GLP-1 分泌小胞の挙動に注目した解析を行った。その結果、キニーネは細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こすが GLP-1 分泌は増強しないこと、キニーネ投与により GLP-1 分泌小胞は細胞膜に係留されたままとなり開口分泌には至っておらず、GLP-1 開口分泌には細胞内 Ca<sup>2+</sup>と cAMP 両者の濃度変化が重要であることを示した。

## 第2章 リゾホスファチジルイノシトールによる GLP-1 分泌制御機構

### 2.1. 緒言

リゾホスファチジルイノシトール (lysophosphatidylinositol: LPI) はリン脂質の一種で、炭化水素鎖を1本のみ持つリゾリン脂質という脂質に属する。主に炭素数16のパルミチン酸、または炭素数18のステアリン酸に、グリセロール骨格、リン酸、イノシトールが結合した構造をとる。リゾリン脂質は細胞膜の構成成分であるだけでなく、細胞外に放出されシグナル伝達物質としての機能を持った脂質メディエーター分子として注目されており、免疫、腫瘍形成、痛覚感知などへの関与が報告されている[72]。LPI はがん細胞の移動、血管内皮細胞の弛緩、開口分泌促進、膜電位の調節作用が知られており[73-76]、さらに古くから膵β細胞からのインスリン分泌を促進することも報告されている[77, 78]。しかし、ホルモン開口分泌にLPI がどのような影響を与えるのか、十分な解析はなされていない[73, 79]。

近年、LPI に対する受容体として GPCR の一種である GPR55 が同定された[80, 81]。GPR55 の性質について、GPR55 を強制発現させたヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293 細胞や[80, 82-84]、内在的に GPR55 を発現するヒト血管内皮細胞由来細胞株 EA.hy926 細胞を中心に解析が行われてきた[85, 86]。一般的に GPR55 は G<sub>q</sub> および G<sub>12/13</sub> タンパク質と共役すると考えられているが、HEK293 細胞を用いた実験からは cAMP 応答配列結合タンパク質 (cAMP response element-binding protein: CREB)、細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase: ERK)、核内因子 κB (nuclear factor-κB: NFκB) の活性化作用が、EA.hy926 細胞を用いた実験からはホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase: PI3K)、インテグリン、intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>チャネルの関与が報告されている[85, 86]。

膵β細胞においても GPR55 の発現が知られており、GPR55 のアゴニスト投与により細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が見られている[77, 78, 87, 88]。加えて、GPR55 遺伝子欠損マウスが肥満症状を示すこと[89]、肥満患者で血中 LPI 濃度が上昇すること[90]、絶食中に血中 LPI 濃度が低下することから[91]、LPI が血糖値制御に関与していると考えられる。しかし、インスリンと同様に血糖値制御に関与するホルモンである GLP-1 の分泌と LPI との関連性については未解明である。

そこで本研究では、マウス小腸内分泌 L 細胞由来細胞株 GLUTag 細胞を用い、LPI が GLP-1 分泌に与える影響と、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

## 2.2. 材料と方法

### 2.2.1. 試薬

Y-27632 (WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、ルテニウムレッド (ruthenium red: RR, WAKO Pure Chemical Industries) は水に溶解した。U-73122 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)、LPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、ワートマニン (Sigma-Aldrich)、LY294002 (Cayman Chemical)、ラトランキュリン A (WAKO Pure Chemical Industries)、フォルスコリン (forskolin: Fsk) (WAKO Pure Chemical Industries)、3-イソブチル 1-メチルキサンチン (3-isobutyl 1-methylxanthine: IBMX) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) はジメチルスルホキシドに溶解した。O-1918 (Cayman Chemical)、O-1602 (Cayman Chemical) は酢酸メチルに溶解した。

### 2.2.2. プラスミド設計

GFPを融合したラット組織型プラスミノゲン活性化因子 (GFP-tagged tissue-type plasminogen activator: tPA-GFP) およびアクチン可視化蛍光タンパク質 (EGFP-tagged Lifeact: Lifeact-EGFP、Münster大学Roland Wedlich-Söldner教授より供与) の発現プラスミドは先行研究で使用されたものを用いた[34, 92]。マウスtransient receptor potential陽イオンチャネルサブファミリーVメンバー2 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 2: TRPV2) のcDNAクローン (DNAFORM, ID 2210009M20) を*Xho*Iおよび*Eco*RI認識配列でpEGFP-N1プラスミドにサブクローニングすることで、TRPV2-EGFPプラスミドを得た。

### 2.2.3. 細胞培養と遺伝子導入

GLUtag 細胞 (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute の Daniel Drucker 教授より供与) は、1 g/L グルコース、グルタミン、ピルビン酸ナトリウムを含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM, Sigma-Aldrich) に非働化した 10 % v/v ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Sigma-Aldrich)、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を加えた培地中で、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 下で培養した。

イメージング実験に際しては、35 mm ガラスボトムディッシュを 15 分間 UV 照射したのち、1 mg/mL poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) をガラス上に 200 µL 滴下して 30 分室温静置しコーティングした。その後リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) 400 µL で 3 回洗浄したのち、トリプシン処理した GLUtag 細胞を  $1 \times 10^5$  細胞播種して培養した。遺伝子導入には、播種後 1 日培養した GLUtag 細胞 1 ディッシュあたり、1.5 µg のプラスミドと 3 µL の Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を合計 100 µL となるよう OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合し、抗生物質を含まない 1 mL の培地中で導入し、4 時間後に培地を交換したのち 1 日培養した。

### 2.2.4. RT-PCR

GLUtag 細胞およびマウス脳、心臓、小腸、肝臓の Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて抽出し、RNase-free DNase Set (QIAGEN) で処理したのち、1 µg

の Total RNA を High Capacity RNA to cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) で逆転写し、cDNA を合成した。10 倍希釈した cDNA を用い、EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa, Shiga, Japan) で PCR 反応を行った。PCR に用いた遺伝子、およびそれに対するプライマーの情報は表 1 に記した。

### 2. 2. 5. RNA 干渉

GPR55 に対する低分子干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA) (Silencer Select siRNA, Thermo Fisher Scientific)、TRPV2 に対する siRNA (Mission siRNA, Sigma-Aldrich)、およびヒト・マウス・ラットの mRNA に相同性を持たないネガティブコントロール siRNA は Lipofectamine 2000 Transfection Reagent を用いて、播種後 1 日培養した GLUTag 細胞に製品のプロトコル通りに 100 nM 濃度で導入した。導入後 1 日培養し、イメージング実験を行った。用いた siRNA の配列は表 2 に記した。

ノックダウン効率は RT-PCR を用いて解析した。35 mm ディッシュに GLUTag 細胞を  $2.5 \times 10^5$  細胞 (GPR55 ノックダウン時) または  $1 \times 10^6$  細胞 (TRPV2 ノックダウン時) 播種して 1 日培養したのち、100 nM の siRNA を導入し、1 日培養後に Total RNA を回収して RT-PCR を行った。PCR 産物量が指数関数的に増幅しているサイクル数で反応を停止させ、1 mg/L のエチジウムブロマイドを含んだ 2 % アガロースゲルで電気泳動した。各遺伝子に対するバンドの輝度は ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で定量した。

### 2. 2. 6. 細胞内 $Ca^{2+}$ 動態の可視化解析

GLUTag 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに  $1 \times 10^5$  細胞播種後 2 日培養した。RNA 干渉を行う際は、 $5 \times 10^4$  細胞 (GPR55 ノックダウン時) または  $1 \times 10^5$  細胞 (TRPV2 ノックダウン時) 播種して 1 日培養したのち、2. 2. 5. と同様の手順で 100 nM の siRNA を導入し、その後 1 日培養した。5 mM グルコース入りの modified Ringer's buffer (RB: 140 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.5 mM  $NaH_2PO_4$ , 0.5 mM  $MgSO_4$ , 1.5 mM  $CaCl_2$ , 10 mM HEPES, 2 mM  $NaHCO_3$ ) で 2 回洗浄したのち、RB 中に終濃度 250 nM の Fluo4-AM (Dojindo, Kumamoto, Japan) を加えて 37°C、5%  $CO_2$  下で 20 分間インキュベートした。その後細胞を 2 回洗浄し、0.1 mM グルコース入りの RB 中で観察した。

観察には倒立顕微鏡 (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan)、油浸対物レンズ (UApo/340, 40 $\times$ , NA = 1.35, Olympus)、EM-CCD カメラ (Evolve, Photometrics, Tucson, AZ, USA) を用い、37°C のヒーティングステージ上で観察を行った。励起光にはキセノンランプ (U-LH75XEAP0, Olympus) を用い、励起フィルター 460-495 nm、ダイクロイックミラー 505 nm、吸収フィルター 510-550 nm のフィルターセット (U-MWIBA2, Olympus) で蛍光を観察した。撮影は 5 秒ごと 20 分間行い、撮影開始から 3 分後に直接滴下により細胞刺激を行った。顕微鏡の制御は MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で行った。

### 2. 2. 7. TIRFM による観察

tPA-GFP、Lifeact-EGFP、TRPV2-EGFP を遺伝子導入した GLUTag 細胞を 2 回洗浄したのち、

0.1 mM グルコース入りの RB 中で観察した。観察には倒立顕微鏡 (ECLIPSE Ti-E, Nikon, Tokyo, Japan)、油浸対物レンズ (CFI Apochromat TIRF, 100×, NA = 1.49, Nikon)、EM-CCD カメラ (iXon, Andor, Belfast, UK) を使い、37°C のヒーティングステージ上で観察を行った。励起光には 488 nm 波長の光ポンピング半導体レーザー (Sapphire 488LP, 30 mW, Coherent, Santa Clara, CA, USA) を使い、510–560 nm の吸収フィルター (HQ535/30m, Chroma, Bellows Falls, VT, USA) で蛍光を観察した。撮影は 0.5 秒ごと 20 分間行い、撮影開始から 3 分後に直接滴下により細胞刺激を行った。顕微鏡の制御は MetaMorph で行った。

### 2. 2. 8. 酵素共役免疫吸光法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) による測定

GLUtag 細胞を 6 穴プレートに  $5 \times 10^5$  細胞播種後 2 日培養した。RNA 干渉を行う際は、 $2.5 \times 10^5$  細胞播種して 1 日培養したのち、2. 2. 5. と同様の手順で 100 nM の siRNA を導入し、その後 1 日培養した。培地を 0.1 mM グルコース入りの RB に置換し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 10 分間インキュベートする洗浄作業を 2 回行ったのち、0.1 mM グルコース入りの RB 中に刺激を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 30 分間インキュベートした。その後 RB を回収し、1,000 g、4°C で 10 分間遠心し、上清 100 μL を測定に用いた。測定には Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISA Kit (Merck Millipore) および蛍光プレートリーダー (Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbad, Germany) を用いた。

### 2. 2. 9. マウス急性単離小腸を用いた測定

東京大学大学院総合文化研究科動物実験委員会より受けた承認に基づき (承認番号: 26-31、29-4)、動物実験を行った。C57BL/6J 系統の 8 週齢雄マウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan) を購入し、自由飲水、摂食下で一晩飼育したのち、頸椎脱臼により安楽死させた。小腸組織を採取し、氷冷した PBS 中で細断したのち、100 g、4°C で 5 分間遠心し、上清を除去した。沈殿した組織を 10 mL の氷冷した PBS 中で 3 分間さらに細断し、再度 100 g、4°C で 5 分間遠心、上清を除去し、沈殿した組織を 18 mL の 0.1 mM グルコース入りの RB で懸濁した。懸濁液 500 μL を 24 穴プレートに播種し、刺激および 1% v/v の dipeptidyl peptidase-4 阻害剤 (DPP IV Inhibitor, Merck Millipore) を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間インキュベートした。全サンプルを 1.5 mL チューブへ回収、1,000 g、4°C で 10 分間遠心し、上清 100 μL を測定に用いた。測定は 2. 2. 8. と同様に行い、検出された GLP-1 濃度を各サンプルの組織重量で除算した値 (pM/mg) で比較した。

### 2. 2. 10. データ解析

イメージング画像の解析には ImageJ および MetaMorph を用いた。Ca<sup>2+</sup>イメージングでは、ImageJ の Stackreg プラグインでずれの補正を行ったのち、MetaMorph で個々の細胞の領域を手動で選択し、バックグラウンドを差し引いた蛍光強度 (fluorescence intensity: FI) の変化を算出した。刺激直前 30 秒間の蛍光強度の平均を 100% とし、%換算の経時変化曲線を作製した。曲線下面積値 (Area under curve: AUC) を算出するため、撮影開始から 245–1200 秒 (LPI と RR の同時投与時)、365–1200 秒 (O-1602 投与時)、または 185–1200 秒 (その他) の間で

single exponential 近似を行い、褪色曲線を作製した。撮影開始から 185 秒以降で褪色曲線より上にある部分の面積と下にある部分の面積を差し引きし、AUC とした (図 6)。計算単位は秒×%からなる任意単位 (arbitrary unit: A.U.) で示した。

tPA-GFP を用いた開口分泌の可視化観察では、tPA-GFP が分泌顆粒から開口分泌によって放出される際、GFP 由来の蛍光を持った輝点の蛍光強度が瞬間的に上昇し、その後輝点が拡散しながら徐々に減衰する様子が観察された。これを GLP-1 の開口分泌反応と定義し、20 分間における分泌反応回数を細胞の面積で除算して比較した。

Lifect-EGFP を用いたアクチン動態観察では、細胞表面に Lifect-EGFP 由来の蛍光を持つドット状の輝点が観察された。これを接着斑と定義し、撮影開始時、10 分後、20 分後の接着斑密度を算出した。接着斑数の計測には ImageJ を用いた。Subtract background と Threshold で画像を二値化したのち、Analyze particles で Size 4–32、Circularity 0.5–1.0 として検出された領域を接着斑とし、1 細胞当たりの接着斑数を細胞の面積で除算して比較した。

統計解析は GraphPad Prism 6 software (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) で行い、Welch's *t* test、One-way ANOVA と Dunnett's post hoc test または Tukey's post hoc test による検定を行った。データはそれぞれ、平均値 ± 標準偏差で示した。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. LPIによるGLUTag細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇とGLP-1分泌増強

GLUTag細胞においてRT-PCRを行い、GPR55の発現をmRNAレベルで見出した(図7A)。そこで、Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素Fluo4-AMをGLUTag細胞に負荷し、LPI投与時のGLUTag細胞における細胞内Ca<sup>2+</sup>動態を観察した。その結果、LPI(2 μM)の投与後にFluo4の蛍光強度が持続的に振動しながら上昇し、曲線化面積値が有意に増加した(図7B、C)。

またGLP-1の開口分泌動態を調べるため、GLP-1分泌小胞と共局在することが知られている蛍光タンパク質tPA-GFPをGLUTag細胞に発現させ[34]、TIRFMで観察した。TIRFMでは、tPA-GFP由来の蛍光が輝点として観察され、開口分泌が起こる際にはこの輝点の蛍光強度が一過的に上昇したのち、拡散しながら減衰する。この一連の反応を開口分泌反応と定義して頻度を比較したところ、LPI(2 μM)の投与により開口分泌頻度が有意に増加した(図8A、B)。

そして、分泌されたGLP-1量をELISA法により測定したところ、LPI(2 μM)によりGLUTag細胞からのGLP-1分泌量が有意に増加した(図8C)。さらにマウス急性単離小腸においても、LPI(10 μM)の投与によりGLP-1分泌量が有意に増加した(図8D)。以上から、小腸内分泌L細胞がLPIを感受することで、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)が上昇し、GLP-1分泌が促進されると示唆された。

### 2.3.2. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇におけるGPR55の関与とアクチン骨格再構成

GLUTag細胞における[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に対するGPR55の関与を検証するため、GPR55およびその下流のシグナル経路を阻害する実験を行った。GPR55のアンタゴニストであるO-1918(50 μM)をLPI(2 μM)と同時に投与したところ、LPIによって引き起こされるFluo4の蛍光強度上昇が有意に抑制された(図9A、B)。同様に、GPR55の発現をsiRNAによって抑制した場合も、LPI投与時のFluo4の蛍光強度上昇が有意に抑制された(図9C-E)。すなわち、LPI投与時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇はGPR55を介していると考えられた。

GPR55はG<sub>q</sub>およびG<sub>12/13</sub>タンパク質と共役しているとされる。G<sub>q</sub>タンパク質はホスホリパーゼCβ(phospholipase Cβ: PLCβ)を活性化して、イノシトール1,4,5-トリスリン酸(inositol trisphosphate: IP<sub>3</sub>)を産生させ、IP<sub>3</sub>受容体(inositol trisphosphate receptor: IP<sub>3</sub>R)を介し小胞体内のCa<sup>2+</sup>を細胞質へ放出させる。一方、G<sub>12/13</sub>タンパク質はRhoAとRho関連タンパク質キナーゼ(Rho-associated protein kinase: ROCK)の活性化を通じてホスホリパーゼCε(phospholipase Cε: PLCε)を活性化することで、G<sub>q</sub>タンパク質と同様に小胞体内のCa<sup>2+</sup>を細胞質へ放出させるほか、ROCKがアクチンとミオシンの束形成を促し、ストレスファイバーと接着斑を形成させる[93]。

そこで、それぞれのシグナルの下流に存在するPLCおよびROCKの阻害による影響を解析した。PLCの阻害剤U-73122(50 nM)、またはROCKの阻害剤Y-27632(50 μM)をLPI(2 μM)と同時に投与したところ、LPIによって引き起こされるFluo4の蛍光強度上昇が有意に抑制された(図10A-D)。一方、PI3Kの関与を調べるためにPI3Kの阻害剤LY294002(20 μM)をLPI(2 μM)と同時に投与したが、Fluo4の蛍光強度上昇は抑制されなかった(図10E、F)。



また、G<sub>12/13</sub> タンパク質とその下流の RhoA シグナルがアクチン重合を促進することから、LPI 投与時の GLUTag 細胞におけるアクチン骨格の動態を解析した。GLUTag 細胞にアクチン可視化蛍光タンパク質 Lifeact-EGFP を強制発現させ、TIRFM で細胞膜直下のアクチン骨格を観察したところ、LPI (2 μM) の投与により細胞膜周縁部で Lifeact-EGFP の形態変化と蛍光強度上昇が起こり、また細胞膜表面の輝点の密度が有意に増加した (図 11)。先行研究の観察画像から、この輝点はアクチン繊維からなるストレスファイバーの先端である接着斑と考えられる[94, 95]。このことから、LPI 投与によりアクチン繊維の重合が促進され、接着斑の形成が促進されたと示唆された。

### 2. 3. 3. Transient receptor potential vanilloid 2 チャネルの膜移行

LPI による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇および GLP-1 分泌に関与するさらなる因子として、transient receptor potential 陽イオンチャネルサブファミリーV メンバー2 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 2: TRPV2) に注目した。先行研究において、TRPV2 を強制発現させた HEK293 細胞で LPI 投与により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が見られていることから[74]、GLUTag 細胞においても TRPV2 が関与していると考えた。

そこで、GLUTag 細胞において RT-PCR を行い、TRPV2 の発現を mRNA レベルで見出した (図 12A, B)。TRPV2 のアンタゴニストであるルテニウムレッド (ruthenium red: RR) (40 μM) を LPI (2 μM) と同時に投与したところ、LPI によって引き起こされる Fluo4 の蛍光強度上昇および GLP-1 分泌が有意に抑制された (図 12C-E)。RR は TRPV2 以外の様々な TRP チャネルに対しても阻害効果を示すため[96]、TRPV2 の発現を siRNA によって抑制した GLUTag 細胞でも実験を行った。その結果、RR 使用時と同様に、LPI 投与時の Fluo4 の蛍光強度上昇および GLP-1 分泌が有意に抑制された (図 12F-H)。すなわち、LPI 投与時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇および GLP-1 分泌に TRPV2 が関与しているとし唆された。

次に、TRPV2 の活性化メカニズムを検証するため、細胞膜における TRPV2 の局在変化を解析した。GLUTag 細胞に TRPV2-EGFP を強制発現させ TIRFM で観察したところ、LPI (2 μM) の投与により細胞膜全体における TRPV2-EGFP の蛍光強度が上昇した (図 13A, B)。さらに、この蛍光強度上昇は GPR55 のアンタゴニストである O-1918 (50 μM) の同時投与により優位に抑制された (図 13C)。以上から、LPI によって TRPV2 が細胞膜へ移行し、持続的な[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を引き起こしているとし唆された。

アクチン骨格再構成と TRPV2 の膜移行の関連を検証するため、アクチン重合阻害剤であるラトランキュリン A を LPI (2 μM) と同時投与した際の Lifeact-EGFP および TRPV2-EGFP の動態を TIRFM で観察した。しかし、ラトランキュリン A を 10 nM 以上の濃度で投与すると、TRPV2-EGFP を含んだ細胞膜が剥離し観察不可能となった。ラトランキュリン A の濃度を 1 nM まで低下させると、急速な剥離は起こらなくなったが、細胞膜が収縮して蛍光強度の上昇を起こす細胞が見られ、定量的な解析を行うことはできなかった (図 14A)。一方、1 nM のラトランキュリン A では Lifeact-EGFP の動態に変化は生じず、TRPV2-EGFP 観察時に細胞膜が剥離した 10 nM まで濃度を上昇させても接着斑構造の変化は部分的であった (図 14B)。また、10 nM ラトランキュリン A を LPI (2 μM) と同時投与して Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った

が、Fluo4 の蛍光強度に抑制効果は見られなかった (図 14C、D)。

#### 2.3.4. GPR55 選択的活性化時の $\text{Ca}^{2+}$ 動態と GLP-1 分泌への影響

最後に、GPR55 のみを選択的に活性化させることで LPI 投与時の応答を再現できるか検証した。GPR55 のアゴニストである O-1602 (10  $\mu\text{M}$ ) を GLUTag 細胞に投与すると、Fluo4 の蛍光強度上昇、TRPV-EGFP の蛍光強度上昇、GLP-1 分泌量のいずれにも変化は生じなかった (図 15)。以上から、LPI 投与時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇、TRPV2 の膜移行、GLP-1 分泌は GPR55 の活性化だけでは生じない現象であると示唆された。

## 2.4. 考察

本研究では、GLUTag 細胞に GPR55 が発現し、LPI 感受により  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と GLP-1 開口分泌頻度の増加、GLP-1 分泌の増強が起ることを見出した。またその過程において、 $G_q$  および  $G_{12/13}$  経路の活性化、アクチン骨格の再構成、そして TRPV2 の細胞膜への移行が起ることを明らかにした (図 16)。

血中 LPI 濃度はヒト健常者で約 300 nM、肥満患者で約 700 nM、ラットで約 3  $\mu$ M であり、本研究で GLUTag 細胞に用いた LPI 濃度 (2  $\mu$ M) は生理環境下での小腸内分泌 L 細胞に対する濃度を反映するものとして適切だと考えられる。

先行研究において GPR55 は  $G_q$ 、 $G_{12/13}$ 、PI3K 経路と共役するとされているが、本研究では  $G_q$  および  $G_{12/13}$  経路の阻害により  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の抑制が見られたものの、PI3K 経路の阻害効果は見られなかった (図 10)。この理由として、先行研究で用いられた HEK293 細胞や EA.hy926 細胞と今回用いた GLUTag 細胞とでは、GPR55 の共役する経路が異なる可能性が考えられる。同じ生物種でも、病態発症や遺伝子変異によって各組織における G タンパク質の発現量は変動することが知られている [97, 98]。また、GPCR はリン酸化修飾を受けることで、共役する G タンパク質が切り替わることも知られている [99–101]。HEK293 細胞、EA.hy926 細胞、GLUTag 細胞は生物種や組織、株化過程がそれぞれ異なることから、GPR55 の下流シグナルに相違が生じたと考えられる。

GLUTag 細胞で見られた TRPV2 の膜移行現象が GPR55 の阻害によって抑制されたことから、GPR55 の下流ではたらく  $G_q$  および  $G_{12/13}$  経路が TRPV2 の膜移行を制御していると考えられる (図 13)。このうち  $G_{12/13}$  とその下流の RhoA および ROCK は、脂肪細胞や骨格筋細胞においてグルコーストランスポーターの膜移行に関与することが報告されている [102–104]。よって、GLUTag 細胞における TRPV2 の膜移行も ROCK を介していると推測される。マウスマクロファージ由来細胞株 TtT/M87 細胞では、接着斑に局在するインテグリン、パキシリン、接着斑キナーゼといったタンパク質と共局在する形で TRPV2 が細胞膜へ移行することが報告されており、本研究の仮説を支持する [105]。

しかし、TRPV2 の膜移行は ROCK 以外のシグナルによって引き起こされることも報告されている。マウス膵  $\beta$  細胞株 MIN6 細胞を用いた先行研究において、インスリン様成長因子刺激に応じて TRPV2 が輸送小胞から細胞膜へと移行し、細胞膜の局在が増加することで  $[Ca^{2+}]_i$  上昇やインスリン分泌が促進されるという報告があり [106, 107]、またヒト繊維肉腫細胞由来細胞株 HT1080 細胞、TtT/M87 細胞、ヒト網膜色素上皮由来細胞株 ARPE-19 細胞においても様々な刺激に応じた TRPV2 の細胞膜への移行が報告されている [108–110]。これらはいずれも PI3K およびその下流の Rac1 の活性化に依存しており、PI3K 阻害により抑制される。しかし、本研究に用いた GLUTag 細胞では、LPI によって PI3K 経路の活性化は起きていないと考えられるため、TRPV2 の膜移行は様々なシグナル経路に制御されていると示唆される。

また、実際に TRPV2 を含む輸送小胞がアクチン繊維とどのような相互作用を示しているかについても確認が必要である。本研究ではラトランキュリン A を LPI と同時投与して検証を試みたが、Lifeact-EGFP と TRPV2-EGFP とで影響の生じる濃度が異なり、定量的な解析が困難であった (図 14)。この理由として、Lifeact がアクチンタンパク質に結合する性質を持つ

ため、Lifeact-EGFP を発現させた細胞はラトランキュリン A に対する感受性が低下し、重合阻害が起きにくくなった可能性が考えられる。また、TRPV2-EGFP を含んだ細胞膜が剥離する濃度 (10  $\mu\text{M}$ ) のラトランキュリン A を用いても、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に対する抑制効果は見られなかった。より高濃度のラトランキュリン A によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇阻害が起こる可能性もあるが、その場合 TRPV2-EGFP の動態観察ができなくなるため、今回は検証を断念することとなった。これらの問題点を解決するには、TRPV2 を含む小胞を生化学的に単離精製し、小胞上にアクチン繊維と相互作用するタンパク質が存在するかを明らかにしたうえで、そのタンパク質が膜融合に果たす役割を阻害剤投与、siRNA による発現抑制などを通じて解析する必要がある。

GPR55 の阻害や発現抑制による $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇への影響が部分的であったのに対し、TRPV2 の阻害や発現抑制は $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇や GLP-1 分泌を大幅に抑制した (図 9、図 12)。また、GPR55 のみを選択的に活性化させても $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇、TRPV2 の膜移行、GLP-1 分泌は引き起こされなかった (図 15)。さらに、TRPV2 が細胞膜上に移行したとしても、その後活性化されなければ  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させることはできない。これらの結果は、LPI による TRPV2 活性化が GPR55 以外のシグナルによっても制御されている可能性を示唆する。TRPV2 を含む TRP チャネルファミリーの中には、各種のリゾリン脂質によって活性化するものが複数種類知られている。たとえば、TRPV1 はリゾホスファチジン酸が直接結合することで活性化するという報告があり [111]、TRPM8 は LPI、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルセリンによって、作用機序は未解明ながら活性化するとされている [112, 113]。さらに、TRPV2 を強制発現させた HEK293 細胞において、LPI およびリゾホスファチジルコリン投与により膜電位上昇と $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が見られている [74]。そのため、TRPV2 は LPI が直接結合することでも活性化している可能性がある。LPI と TRPV2 の相互作用について詳細な検討を行うためには、TRPV2 やその変異体を挿入した人工脂質二重膜系を用いた電気生理学的な解析が必要である。

本研究では GLUTag 細胞だけでなく、マウス急性単離小腸においても LPI による GLP-1 分泌増強を見出した。LPI と GPR55 を介したシグナルがインスリン分泌や血糖値制御に関与するという報告は近年増えているものの、LPI の主要産生部位、摂食後の血中 LPI 濃度変化など、*in vivo* レベルで解明すべき点は多数残されている。また生体中の小腸内分泌 L 細胞において、GPR55 の局在に管腔側と基底膜側とで差異があるか、応答性が異なるかなども検証が必要である。本研究を足がかりとして、組織個体レベルでの LPI、GLP-1、インスリンの相互作用機構の解明が進展すれば、糖尿病をはじめとする代謝疾患の治療に寄与することも期待される。

## 第3章 赤色蛍光タンパク質を用いた cAMP 可視化センサーの開発と応用

### 3.1. 緒言

cAMP は細胞内ではたらく重要なシグナル分子であり、ホルモン分泌、細胞移動、記憶形成など様々な生理機能をつかさどっている[114–116]。従来、FRET 型の cAMP 可視化センサーが開発され、細胞内 cAMP 濃度の範囲の解明などに役立てられてきた[55, 117–119]。しかし、FRET 型センサーは2つの波長での蛍光取得が必要となるため、複数分子の動態を同時に観察する多重色イメージングには不向きである。

先行研究において、緑色の単色輝度変化型 cAMP センサー *Flamindo* および *Flamindo2* が開発され、Ca<sup>2+</sup> と cAMP の同時イメージング、TRIFM での分泌小胞との同時イメージングに成功している[62, 120]。しかし、現在赤色の単色輝度変化型センサーは種類が少ないため、cAMP 動態の観察に緑色の蛍光を使用すると、同時観察する分子が限られるという問題点があった。また、光照射によって活性化され、イオン透過や二量体化などの機能を発揮する光遺伝学技術に用いられるタンパク質は、多くが青色光により活性化されるものであるため[45, 121]、励起に青色光を必要とする緑色センサーとの併用は困難である。そのため、赤色の単色輝度変化型 cAMP センサーの開発が求められていた。

そこで本研究では、独自の変異導入技術により、赤色単色輝度変化型 cAMP センサー *Pink Flamindo* (Pink Fluorescent cAMP indicator) を開発し、培養細胞およびマウス脳においてその有用性を検証することとした。

## 3.2. 材料と方法

### 3.2.1. 試薬

cAMP (Sigma-Aldrich)、cGMP (Merck Millipore) は水に溶解した。2', 5'-dideoxyadenosine (DDA) (Sigma-Aldrich)、Fsk (WAKO Pure Chemical Industries)、ニゲリシンナトリウム塩 (WAKO Pure Chemical Industries)、IBMX (Merck Millipore) はジメチルスルホキシドに溶解した。

### 3.2.2. プラスミド設計

赤色 Ca<sup>2+</sup>可視化センサーR-GECO[64]の DNA 配列に含まれる、赤色蛍光タンパク質 mApple に相当する DNA 配列を円順列変異導入前の配列順序で、Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) により合成した。150 番目のアラニンと 151 番目のバリンの間に *SacII* および *EcoRI* の認識配列を持つよう改変し、*BamHI* および *HindIII* 認識配列で pRSET-A プラスミドにサブクローニングした。その後 *SacII* および *EcoRI* の認識配列で切断し、そこへ先行研究で作製された緑色 cAMP 可視化センサーFlamindo2[120]の DNA 配列に含まれる、マウス exchange protein directly activated by cAMP 1 (Epacl, NM\_001171281) の cAMP 結合ドメイン (199-358 アミノ酸) の DNA 配列を挿入した。これをプロトタイプ配列とし、cAMP 結合ドメインの N 末端および C 末端部分のリンカーアミノ酸長を増減した変異体を PCR により作製して、輝度変化率の向上を図った。付加させる配列には、逆平行 NZ ロイシンジッパーの配列を用いた[122]。さらに、リンカー付近の特定のアミノ酸残基を対象としたランダム変異導入を、センス鎖およびアンチセンス鎖に NNK および MNN 塩基を有するプライマーを用いた PCR により導入した。形質転換して得られたコロニーから 46 個を選抜し、変異体スクリーニング候補とした。

各種変異体プラスミドを大腸菌 *Escherichia coli* JM109 (DE3) コンピテントセル (Promega, Madison, WI, USA) に形質転換し、50 µg/mL アンピシリン (Wako) 入り LB 培地に植菌して 20°C で 4 日振盪培養した。16,000 g、4°C で 5 分間遠心して上清を除去し、沈殿した菌体を PBS で懸濁したのち超音波破碎した。16,000 g、4°C で 10 分間遠心し、上清を測定サンプルとした。上清を PBS で希釈し、100 µM cAMP を加える前と加えた後の蛍光強度を蛍光分光光度計 (F-2500, Hitachi, Tokyo, Japan) で測定し、輝度変化率を算出した。最も高い輝度変化率を示した変異体を Pink Flamindo と命名し、*BamHI* および *HindIII* 認識配列で pcDNA3.1(-)プラスミドにサブクローニングした。

ヒトのコドンに最適化された光走性バクテリア *Beggiatoa sp.*の光活性化アデニル酸シクラーゼ (h\_bPAC) DNA 配列は、pGEM-HE プラスミドに挿入された形で Addgene (#28134) から購入し、*BglIII* および *EcoRI* 認識配列で pEGFP-C1 プラスミドにサブクローニングして EGFP-h\_bPAC とした。また、Pink Flamindo およびを細胞膜に局在させるため、細胞膜局在化シグナル配列である CCAX box (KMSKDGKKKKKSKTKCVIM) [123]の塩基配列 5'-AAGATGAGCAAAGATGGTAAAAAGAAGAAAAAGAAGTCAAAGACAAAGTGTGTAATTA TGTA-3'をプライマーアニーリング法により合成し、*XbaI* および *ApaI* 認識配列で pcDNA3.1(+)-プラスミドに挿入したのち、終止コドンを取り除いた Pink Flamindo または

EGFP-h\_bPACを *Bam*HIおよび *Eco*RI 認識配列でサブクローニングして、C末端側に CAAX box を付加した Pink Flamindo-CAAX および EGFP-h\_bPAC-CAAX を作製した。

赤色蛍光タンパク質 mCherry は、pmCherry-N1 プラスミドから *Bam*HI および *Hind*III 認識配列で pRSET-A および pcDNA3.1(-)プラスミドにサブクローニングしたものを用いた。pH 感受性緑色蛍光タンパク質 pHluorin は、先行研究で使用した Synapto-pHluorin プラスミド[124] から *Not*I および *Xho*I 認識配列で pcDNA 3.1(+)+プラスミドにサブクローニングしたものを用いた。緑色単色輝度変化型 Ca<sup>2+</sup>センサー-G-GECO プラスミドは Addgene (#32447) から購入した。赤色インスリン分泌小胞マーカー-NPY-mKate プラスミドは先行研究で使用されたものを用いた[62]。

### 3.2.3. タンパク質精製と蛍光・吸光測定

pRSET-A プラスミドにサブクローニングした Pink Flamindo または mCherry を大腸菌 *Escherichia coli* JM109 (DE3) コンピテントセルに形質転換し、50 µg/mL アンピシリン (Wako) 入り LB 培地に植菌して 20°C で 4 日振盪培養した。4,800 g、4°C で 10 分間遠心して上清を除去し、沈殿した菌体を PBS で懸濁した。液体窒素で 3 回凍結融解したのち、40 µg/mL のリゾチーム (WAKO Pure Chemical Industries) を加えて超音波破碎した。

4,800 g、4°C で 20 分間遠心して上清を除去したのち、Pink Flamindo タンパク質を含んだ沈殿を Ni-NTA アガロースカラム (QIAGEN) で精製した。まず、回収したタンパク質溶液に Ni-NTA ビーズを加え、4°C で一晩回転させながら吸着させたのち、Pink Flamindo タンパク質の吸着したビーズを 1,000 g、4°C で 1 分間遠心して回収、PBS に懸濁した。ビーズ懸濁液をフィルター付きカラムに添加し、10 mM イミダゾール (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) 溶液で洗浄した後、300 mM イミダゾール溶液でタンパク質を溶出した。PD-10 ゲル濾過カラム (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) で精製溶液のイミダゾールを除去し、HEPES バッファー (150 mM KCl, 50mM HEPES-KOH [pH 7.4]) に溶出した。精製したタンパク質の濃度は Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で測定した。

吸収スペクトルは紫外可視分光光度計 (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、30 µM の Pink Flamindo タンパク質で 240-600 nm で測定した。

蛍光測定は蛍光分光光度計 (F-2500, Hitachi) で行った。励起スペクトルは励起波長 450-580 nm、蛍光波長 595 nm で、蛍光スペクトルは励起波長 550 nm、蛍光波長 570-670 nm で測定した。濃度依存性の解析は、10 nM、30 nM、100 nM、300 nM、1 µM、3 µM、10 µM、30 µM、100 µM、300 µM、1 mM の cAMP または cGMP 存在下での蛍光強度を測定し、ヒルの式と最小二乗法近似によって解離定数 ( $K_d$ ) とヒル係数を算出した。pH 依存性の解析に際しては、精製 Pink Flamindo タンパク質を 100 mM HEPES-KOH [pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5] で希釈した。

cAMP に対する応答の可逆性解析は以下のように行った (図 17)。まず cAMP 非存在下での蛍光強度を 595 nm で測定し、その後 1 µM cAMP 存在下での蛍光強度、続いて 9 µM cAMP を添加した合計 10 µM cAMP 存在下での蛍光強度を測定した。その後、10 µM cAMP 混合後のサンプルを PBS または 10 µM cAMP を含んだ PBS で 10 倍に希釈し、それぞれの蛍光強度

を測定した。

$F_0$  : cAMP 非存在下での蛍光強度

$F_{1\ \mu\text{M cAMP}}$  : 1  $\mu\text{M}$  cAMP 存在下での蛍光強度

$F_{10\ \mu\text{M cAMP}}$  : 10  $\mu\text{M}$  cAMP 存在下での蛍光強度

$F_A$  : PBS で 10 倍希釈した際の蛍光強度

$F_B$  : 10  $\mu\text{M}$  cAMP を含んだ PBS で 10 倍に希釈した際の蛍光強度

とおくと、

1  $\mu\text{M}$  cAMP 添加による輝度変化率 =  $F_{1\ \mu\text{M cAMP}}/F_0$

10  $\mu\text{M}$  cAMP 添加による輝度変化率 =  $F_{10\ \mu\text{M cAMP}}/F_0$

で表される。さらに、 $F_A/F_B$  を求めることで、溶液中の Pink Flamindo タンパク質濃度が変わらない状況で cAMP 濃度が 1/10 に低下した時の相対的な輝度変化率を間接的に算出できる。以上より、cAMP 濃度を 10  $\mu\text{M}$  から 1  $\mu\text{M}$  に低下させた際、Pink Flamindo が cAMP 非存在下に対して示す輝度変化率  $F_{10\ \mu\text{M cAMP} \rightarrow 1\ \mu\text{M cAMP}} / F_0$  は、

$(F_{10\ \mu\text{M cAMP}}/F_0) \times (F_A/F_B) = (F_{10\ \mu\text{M cAMP}} \times F_A) / (F_0 \times F_B)$  から求められる。

cAMP への応答の経時変化解析に際しては、0.5 秒ごとに 595 nm の蛍光を測定し、cAMP を加える直前 10 秒間の蛍光強度の平均を 100% とした。

### 3.2.4. 細胞培養と遺伝子導入

HeLa 細胞および MIN6 m9 (神戸大学大学院医学研究科分子代謝医学部門生理学・細胞生物学講座清野進特命教授より供与) は、4.5 g/L グルコース、グルタミン、ピルビン酸ナトリウムを含むダルベッコ変法イーグル培地 DMEM (Sigma-Aldrich) に非働化した 10 % v/v FBS (Sigma-Aldrich)、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を加えた培地中で、37°C、5%  $\text{CO}_2$  下で培養した。MIN6 m9 の培地には 50  $\mu\text{M}$  の 2-メルカプトエタノール (WAKO Pure Chemical Industries) を加えた。

イメージング実験に際しては、35 mm ガラスボトムディッシュを 15 分間 UV 照射したのち、1 mg/mL poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) をガラス上に 200  $\mu\text{L}$  滴下して 30 分室温静置しコーティングした。その後 PBS 400  $\mu\text{L}$  で 3 回洗浄したのち、トリプシン処理した細胞を  $5 \times 10^4$  細胞 (HeLa 細胞) または  $1 \times 10^5$  細胞 (MIN6 m9 細胞) 播種して培養した。遺伝子導入には、播種後 2 日培養した GLUTag 細胞 1 ディッシュあたり、1.5  $\mu\text{g}$  のプラスミドと 3  $\mu\text{L}$  の Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を合計 100  $\mu\text{L}$  となるよう OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合、または 3  $\mu\text{g}$  のプラスミドと 9  $\mu\text{L}$  の Polyethyleneimine “MAX” (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , pH 7.0, Polysciences, Warrington, PA, USA) を 200  $\mu\text{L}$  の OptiMEM で混合した。抗生物質を含まない 1 mL の培地中で混合液を導入し、4 時間後に培地を交換したのち、32°C、5%  $\text{CO}_2$  下で 2 日培養した。MIN6 m9 細胞は、32°C 培養開始から 1 日後に 1 g/L グルコース入りの培地に交換し、続けて 32°C、5%  $\text{CO}_2$  下で 1 日培養した。

### 3.2.5. 細胞内 cAMP 動態の可視化解析

35 mm ガラスボトムディッシュで培養した HeLa 細胞および MIN6 m9 細胞を 3 mM (MIN6



m9 細胞) または 5 mM (HeLa 細胞) グルコース入りの RB で 2 回洗浄し観察した。MIN6 m9 細胞は 3 mM グルコース入りの RB 中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 30 分間インキュベートしたのち観察した。観察には倒立顕微鏡 (IX-71, Olympus)、油浸対物レンズ (UApo/340, 40×, NA = 1.35, Olympus)、中間変倍レンズ (1.6×)、EM-CCD カメラ (Evolve, Photometrics) を使い、37°C のヒーティングステージ上で観察を行った。励起光にはキセノンランプ (U-LH75XEAP0, Olympus) を使い、励起フィルター545–580 nm、ダイクロイックミラー585 nm、吸収フィルター610 nm のフィルターセットで蛍光を観察した。撮影は 5 秒ごとに行い、撮影開始から 2 分後に灌流または直接滴下により細胞刺激を行った。顕微鏡の制御は MetaMorph software (Molecular Devices) で行った。

### 3. 2. 6. 細胞内での Pink Flamindo の基底蛍光強度および褪色特性の解析

Pink Flamindo または mCherry を HeLa 細胞に遺伝子導入し、培地交換後 32°C または 37°C で 5% CO<sub>2</sub> 下で 2 日培養した。その後細胞を 3. 2. 5. と同様の手順で洗浄、観察した。倒立顕微鏡の対物レンズには空浸レンズ (UPlanApo, 20×, NA = 0.70, Olympus) を用いた。基底蛍光強度の解析に際しては、15 mW/cm<sup>2</sup> 出力のキセノンランプでカメラの露光時間と感度を一定にした状態で撮影した。褪色曲線の作製に際しては、2.6 W/cm<sup>2</sup> 出力のキセノンランプを照射し、0.5 秒ごと 10 分間撮影した。顕微鏡の制御は MetaMorph で行った。

### 3. 2. 7. 細胞内 pH 変化に対する応答の観察

HeLa 細胞に Pink Flamindo および pH 感受性緑色蛍光タンパク質 pHluorin を 3. 2. 4. と同様に Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入し、培地交換後 32°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 3 日培養した。3. 2. 6. と同様に洗浄、観察を開始した。観察は 5 秒ごと 50 分間行い、撮影開始から 2 分後に 100 μM Fsk を直接滴下し、開始から 20 分後以降 High K<sup>+</sup>/nigericin 溶液 (130 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MOPS, 5 μg/mL nigericin; pH 6.4, 6.8, 7.4, 7.6, 7.8) を pH 7.4、6.4、6.8、7.8、7.6、7.4 の順で 5 分間ずつ灌流投与した。顕微鏡の制御は MetaMorph で行った。

### 3. 2. 8. 光活性化アデニル酸シクラーゼとの併用および二色イメージング

HeLa 細胞および MIN6 m9 細胞を 3. 2. 5. と同様の手順で洗浄、観察した。観察には倒立顕微鏡 (ECLIPSE Ti-E, Nikon)、油浸対物レンズ (CFI Plan Fluor, 40×, NA = 1.30, Nikon)、中間変倍レンズ (1.5×)、EM-CCD カメラ (iXon, Andor) を使い、37°C のヒーティングステージ上で観察を行った。HeLa 細胞の観察には、励起光には 488 nm 波長の光ポンピング半導体レーザー (Sapphire 488LP, 30 mW, Coherent) および 561 nm 波長のダイオードポンピング固体レーザー (85-YCA-010, 10 mW, Melles Griot, Tokyo, Japan) を用いた。MIN6 m9 細胞の TIRFM イメージングでは、油浸対物レンズ (CFI Apochromat TIRF, 100×, NA = 1.49, Nikon) を用いた。MIN6 m9 細胞の二色イメージングには、水銀ランプ (Nikon) を用いた。二つのフィルターセット (励起フィルター465–495 nm、ダイクロイックミラー505 nm、吸収フィルター515–555 nm および励起フィルター540–580 nm、ダイクロイックミラー595 nm、吸収フィルター600–660 nm)

をフィルターターレット (Nikon) で自動制御し、蛍光を観察した。顕微鏡の制御は MetaMorph で行った。

### 3.2.9. ウイルス精製とマウス脳への導入

pAAV-hSyn-EGFP プラスミド (Addgene #50465、North Carolina 大学医学部 Bryan Roth 教授より供与) の human Synapsin プロモーター配列 (神経細胞特異的発現を誘導する) を human glial fibrillary acidic protein プロモーター配列 (アストロサイト特異的発現を誘導する) [125] に置換し、EGFP 配列を *AgeI* および *NotI* 認識配列で Pink Flamindo または Flamindo2 配列に置換することで、pAAV-hGFAP-Pink Flamindo および pAAV-hGFAP-Flamindo2 プラスミドを得た。これを pAAV2/9 プラスミド (Pennsylvania 大学医学部 James M. Wilson 教授より供与) および pHelper プラスミド (Agilent, Santa Clara, CA, USA) とともに HEK293T 細胞に遺伝子導入し、先行研究の手順に従ってウイルスを回収、精製した[126–128]。精製されたウイルスの濃度は AAV9-hGFAP-Pink Flamindo が  $6.6 \times 10^{13}$  vg/mL、AAV9-hGFAP-Flamindo2 が  $1.1 \times 10^{14}$  vg/mL であった。これらのウイルスを PBS で 10 倍に希釈し、マイクロインジェクションに用いた。

理化学研究所脳神経科学研究センター動物実験委員会より受けた承認に基づき (承認番号: H27-2-230)、動物実験を行った。C57BL/6J 系統の 8 週齢雄マウス (Japan SLC または KLEA Japan, Tokyo, Japan) に 70 mg/kg ケタミンと 10mg/kg キシラジンの混合麻酔を腹腔投与し、脳定位固定装置 (SR-9M-HT, Narishige, Tokyo, Japan) に固定した。その後は 1%イソフルランの吸入麻酔により麻酔状態を維持した。ブレグマ縫合から背側へ 1 mm、左側へ 2 mm のポイントにマイクロドリル (Volvere Vmax, Nakanishi, Tochigi, Japan) で小さな穴をあけ、ウイルス溶液の入ったガラス細管を 20°の角度で一次体性感覚野皮質に挿入した (図 18A)。マイクロインジェクター (FemtoJet, Eppendorf, Hamburg, Germany) を用い、皮質表面から 350  $\mu$ m ~ 500  $\mu$ m の深さに 500 nL のウイルス溶液を 5 分間かけて注入した。ウイルス導入 2 週間後に二光子顕微鏡イメージングを行い、また Pink Flamindo がアストロサイトに発現していることの確認として免疫組織染色を行った。アストロサイトのマーカーである S100B との共局在を確認するため、抗 DsRed 抗体 (1:1000, Clontech #632496, Shiga, Japan) および抗 S100B 抗体 (1:1000, #S2532, Sigma-Aldrich) で免疫組織染色を行った。

### 3.2.10. 頭蓋窓作製と *in vivo* 二光子顕微鏡イメージング

ウイルス導入したマウスに 1.5 g/kg ウレタンを腹腔投与して麻酔した。手術と観察の間、マウスの体温はヒーティングパッド (BWT-100A, Bio Research Centre, Nagoya, Japan または TR-200, Fine Science Tools, Foster City, CA, USA) で 37°C に維持した。頭皮を切開して頭蓋骨を露出させ、綿棒で骨膜を除去したのち、歯科用セメント (Fuji LUTE BC, GC Corporation, Tokyo, Japan および Super Bond C&B, Sun Medical, Shiga, Japan) を用いて金属チャンバープレートを接着した。ウイルス注入部位の上方にマイクロドリルで 3 mm 径の頭蓋窓をあけ、硬膜を除去した。頭蓋窓内部を人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid: aCSF) で満たしたのち、半分程度の領域を 3 mm 四方、0.12 mm 厚さのカバーガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) で覆い、歯科用セメントで固定した (図 18B)。

観察にはレゾナントスキャナー型二光子顕微鏡 (B-Scope, Thorlabs, Newton, NJ, USA)、対物レンズ (XLPlan N 25×, NA = 1.05, Olympus) を用いた。自動波長チューニング式フェムト秒レーザー (Chameleon Ultra 2, Coherent) を用い、Pink Flamindo は 1040 nm 波長、Flamindo2 は 960 nm 波長で励起し、対物レンズ下の出力を 30 mW とした。顕微鏡にはバンドパスダイクロイックミラー (ZT405/488/561/680-1100rpc, Chroma) を接続し、得られた放出光をロングパスダイクロイックミラー (FF562-Di03, Semrock, Rochester, NY, USA) およびバンドパス吸収フィルター (Flamindo2: FF03-525/50, Pink Flamindo: FF01-607/70) (Semrock) で検出した。Fsk と IBMX の混合溶液を直接滴下し、aCSF による洗浄を挟んで 2 回刺激を行った (図 18C)。毎秒 30 回光検出を行い、毎秒ごとに 30 フレームの平均値を取得画像として出力した。1 秒ごとに 20 枚の画像を撮影する操作を 2 分ごとに行い、20 枚の平均画像を 2 分ごとの出力画像とした。

### 3. 2. 11. データ解析

イメージング画像の解析には MetaMorph を用い、個々の細胞の領域を手動で選択し、バックグラウンドを差し引いた蛍光強度変化を算出した。3. 2. 5. および 3. 2. 8. では、刺激直前 30 秒間の蛍光強度の平均を 100 % とし、%換算の経時変化曲線を作製した。

3. 2. 6. での Pink Flamindo の褪色特性の解析では、各条件において同程度の明るさの細胞を解析対象とし、最大蛍光強度を 100% として %換算の経時変化曲線を作製した。

3. 2. 7. での細胞内 pH 変化に基づく Pink Flamindo の蛍光強度補正は、先行研究[129]を参考に以下のように行った (図 19)。まず、撮影開始から 30 分後、35 分後、40 分後、45 分後、50 分後の蛍光強度に基づき、pH 6.4–7.4、および pH 7.4–7.8 の 2 つの区間で、最小 2 乗法近似により細胞内での Pink Flamindo および pHluorin の蛍光強度の pH 依存曲線を作製した。pHluorin の蛍光強度は pH のみに影響されることから、作製した pH 依存曲線に基づき、High K<sup>+</sup>/nigericin 溶液投与前の pHluorin の蛍光強度から、Fsk 投与に伴う pH 変化推測値を算出した。そして Pink Flamindo の pH 依存曲線に基づき、pH の影響を除いた補正後蛍光強度を算出した。

3. 2. 10 での *in vivo* 二光子顕微鏡イメージングでは、取得画像のうち最も蛍光強度の低い 100 画素の蛍光強度平均値をバックグラウンドと定義して差し引き、ImageJ を用いてアストロサイトの細胞体領域を囲み、蛍光強度変化を算出した。撮影開始から 10 分間の蛍光強度平均値  $F_0$  を 100% とし、%換算の経時変化曲線を作製した。Pink Flamindo と Flamindo2 での輝度変化率比較は、cAMP 濃度上昇により Pink Flamindo は蛍光強度が上昇、Flamindo2 は蛍光強度が低下することから、Pink Flamindo では  $(F_{\max}-F_0)/F_0$ 、Flamindo2 では  $(F_0-F_{\min})/F_{\min}$  を算出して比較した。

統計解析は GraphPad Prism 6 software (GraphPad software) で行い、Welch's *t* test による検定を行った。データはそれぞれ、平均値 ± 標準偏差で示した。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 赤色 cAMP 可視化センサーPink Flamindo の開発

赤色単色輝度変化型 cAMP センサーの開発のため、先行研究で緑色単色輝度変化型 cGMP センサーGreen cGull (Green cGMP visualizing fluorescent protein) の開発にあたって確立した変異導入手法を用いた[130]。まず、赤色蛍光タンパク質 mApple の配列を発色団付近の 150 番目のアラニン部分で 2 つに分割し、その間に緑色 cAMP センサーFlamindo2 で用いたマウス Epacl の cAMP 結合ドメイン配列を挿入した (図 20A)。

蛍光タンパク質部分と結合ドメイン部分をつなぐリンカー配列は、蛍光強度変化率 (ダイナミックレンジ)、目的分子の結合に伴う蛍光強度の変化の方向 (増加または減少) など、センサーの様々な性質を決定づけることが知られている[60–62, 64, 120, 131]。そこで、このリンカー配列の最適化により、ダイナミックレンジの向上を図った。まず、逆平行 NZ ロイシンジッパー配列をもとに、C 末端側のリンカーアミノ酸長を-6 から+9 まで変化させた変異体を作製し、cAMP (100  $\mu$ M) 添加に伴うダイナミックレンジを比較した。その結果、アミノ酸長-5 の変異体 (C-5) が最も高いダイナミックレンジを示した。続いて C 末端のリンカーをアミノ酸長-5 に固定したうえで、N 末端側のリンカーアミノ酸長を同様に-9 から $\pm 0$  まで変化させた変異体を作製した。これらのダイナミックレンジを比較した結果、アミノ酸長-6 の変異体 (N-6) が最も高いダイナミックレンジを示した (図 20B)。

次に、得られた変異体 (N-6, C-5) を鋳型に、リンカー付近の特定のアミノ酸残基を対象にランダム変異を導入し、最も高いダイナミックレンジを示す変異体を選抜した。そして得られた変異体を鋳型とし、さらに別のアミノ酸残基を対象に変異を導入して選抜するスクリーニングを繰り返した。最終的に、cAMP (100  $\mu$ M) 添加により蛍光強度が 4.2 倍に上昇する変異体の取得に成功し、これを Pink Flamindo (Pink Fluorescent cAMP indicator) と名付けた (図 20C)。

#### 3.3.2. Pink Flamindo の分光学的特性

*In vitro* での Pink Flamindo の性質を調べるため、精製タンパク質を用いて分光学的測定を行った。励起蛍光スペクトルを測定したところ、励起スペクトルのピークは 567 nm、蛍光スペクトルのピークは 590 nm であった (図 21A)。cAMP (100  $\mu$ M) の添加により蛍光強度は 4.2 倍に上昇し、また cAMP への応答は可逆的であることも示された (図 21B)。また、cAMP 添加後 5 秒以内に蛍光強度の上昇が起きた (図 21C)。一方、Pink Flamindo の蛍光強度を通常の赤色蛍光タンパク質 mCherry と比較すると、cAMP 非存在下では約 1/20、cAMP (100  $\mu$ M) 存在下では約 1/5 の明るさであった (図 21D、E)。

次に精製 Pink Flamindo タンパク質 (30  $\mu$ M) の吸収スペクトルを測定したところ、cAMP (100  $\mu$ M) の添加に伴い 420 nm 付近の吸光度が低下し、565 nm 付近の吸光度が上昇した (図 22A)。

続いて cAMP、および構造の類似した cGMP に対する濃度依存性を解析したところ、ヒルの式に基づいた解離定数 ( $K_d$ ) は cAMP に対しては 7.2  $\mu$ M、cGMP に対しては 94  $\mu$ M であった。またヒル係数は cAMP に対しては 1.01、cGMP に対しては 1.07 であった (図 22B)。

最後に pH 依存性を解析すると、cAMP 非存在下、存在 (100  $\mu$ M) 下ともに pH の上昇に伴い蛍光強度が上昇する傾向を示した (図 22C)。以上から、Pink Flamindo は cAMP に特異的かつ可逆的に応答するが、pH 変化の影響を受けやすく、実験データの解釈に注意を要すると示唆された。

### 3.3.3. Pink Flamindo を用いた細胞内 cAMP 動態観察

Pink Flamindo の生細胞における機能性を検証するため、ヒト子宮頸がん細胞由来細胞株 HeLa 細胞に Pink Flamindo を強制発現させ、cAMP を合成するアデニル酸シクラーゼの活性化剤である Fsk (100  $\mu$ M)、cAMP を分解するホスホジエステラーゼの阻害剤である IBMX (200  $\mu$ M)、アデニル酸シクラーゼの阻害剤である 2', 5'-dideoxyadenosine (DDA、100  $\mu$ M) を順に投与した。その結果、Pink Flamindo の蛍光強度は Fsk により一過的に上昇した後、IBMX によってさらに長時間上昇し、その後 DDA により低下した (図 23A)。また、DDA (500  $\mu$ M) のみを投与した際には蛍光強度の一過的な低下が見られた (図 23B)。さらに、生理的な cAMP 濃度変化を観察できるか検証するため、膵  $\beta$  細胞のグルコースに対する応答を観察することとした[132, 133]。マウス膵  $\beta$  細胞由来細胞株 MIN6 m9 細胞に Pink Flamindo を強制発現させ、高グルコース (25mM) を投与したところ、Pink Flamindo の蛍光強度が持続的に上昇した (図 23C)。以上から、Pink Flamindo は生細胞においても正常に機能し、細胞内 cAMP 動態の観察に適していると示された。

### 3.3.4. 細胞内での Pink Flamindo の基底蛍光強度および褪色特性

Pink Flamindo をはじめとする単色輝度変化型センサーは、一般的な細胞培養温度 (37°C) よりも低い 30°C 付近の温度で培養し発現させることで、発色団の成熟が促進され、蛍光強度およびダイナミックレンジが向上する性質を持つ[60]。そこで、Pink Flamindo および mCherry を 32°C または 37°C で HeLa 細胞に強制発現させた際の基底状態の蛍光強度、および褪色特性を比較した。その結果、Pink Flamindo は 32°C、mCherry は 37°C で高い蛍光強度を示した (図 24A)。また、32°C で発現させた際に同程度の蛍光強度を示す細胞で褪色曲線を作製すると、Pink Flamindo と mCherry の間に褪色特性の違いは見られなかった (図 24B)。以上の結果から、培養細胞での Pink Flamindo 観察実験は 3.3.3. を含め、すべて 32°C で発現させた条件で行った。

### 3.3.5. 光活性化アデニル酸シクラーゼとの併用

赤色単色輝度変化型センサーの有用性として、光遺伝学ツールとの併用が容易である点があげられる。そこで、青色光の照射により活性化して cAMP を合成する、光走性バクテリア *Beggiatoa sp.* の光活性化アデニル酸シクラーゼ (bPAC) を用いた。EGFP-h\_bPAC を Pink Flamindo とともに HeLa 細胞に強制発現させ、青色光照射時の cAMP 動態を観察した。HeLa 細胞に 1.8  $\mu$ W 出力の青色レーザー光を照射すると、Pink Flamindo の蛍光強度が速やかに上昇し、その上昇率、および応答時間はレーザーの照射時間に依存して増加する傾向を示した (図 25A)。一方、Pink Flamindo のみを強制発現させた HeLa 細胞に同出力のレーザー光を照射し

た際も、小規模な蛍光強度の上昇が見られた (図 25B)。

また、MIN6 m9 細胞に Pink Flamindo-CAAX および EGFP-h\_bPAC-CAAX を強制発現させて TIRFM で観察し、青色光照射時の細胞膜直下での cAMP 動態を解析したところ、0.1  $\mu\text{W}$  出力の青色レーザー光照射によって Pink Flamindo-CAAX の蛍光強度上昇が確認された (図 25C)。しかし、赤色インスリン分泌小胞マーカー NPY-mKate と EGFP-h\_bPAC-CAAX を強制発現させて TIRFM で観察し、Pink Flamindo-CAAX の観察時と同じ条件で青色レーザー光を 1 秒以上照射しても、NPY-mKate の開口分泌現象は見られなかった (図 25D)。

以上から、Pink Flamindo は光遺伝学ツールとの併用に適したセンサーだが、光照射や pH 変化の影響など、cAMP 濃度変化によらない蛍光強度変化に注意が必要であると示唆された。

### 3.3.6. 細胞内 cAMP および $\text{Ca}^{2+}$ 動態の同時可視化

Pink Flamindo を用いた二色イメージングの対象として、膵  $\beta$  細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  および cAMP の動態の同時観察を行うこととした。膵  $\beta$  細胞がグルコースを感受すると、細胞内 ATP 濃度が上昇し、ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャンネル ( $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネル) が閉じて脱分極が起こり、細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入とインスリン分泌が引き起こされる [134]。そこで、MIN6 m9 細胞に Pink Flamindo および緑色単色輝度変化型  $\text{Ca}^{2+}$  センサー G-GECO を強制発現させ、 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルの閉口剤であるトルブタミド (200  $\mu\text{M}$ ) を投与した。その結果、Pink Flamindo の蛍光強度はなだらかに上昇したのに対し、G-GECO の蛍光強度は速やかに上昇してピークを示したのち、激しい振動を繰り返した (図 26A)。以上から、Pink Flamindo は二色同時イメージングにも適用可能であると示された。

### 3.3.7. 細胞内 pH 変化に対する Pink Flamindo の応答

3.3.2. で示したように、Pink Flamindo は pH の上昇に伴って蛍光強度が上昇する性質を持つため、細胞イメージングで観察された蛍光強度変化が細胞内の pH 変化の影響を受けていないか、検証が必要となる場合がある。そこで、HeLa 細胞に Fsk を投与した際の Pink Flamindo の蛍光強度変化と細胞内 pH 変化の関連を解析した。HeLa 細胞に Pink Flamindo および pH 感受性緑色蛍光タンパク質 pHluorin を強制発現させ、Fsk (100  $\mu\text{M}$ ) 投与ののち、細胞内外のイオン環境を平衡化させる High  $\text{K}^+$ /nigericin 溶液を様々な pH (pH 6.4、6.8、7.4、7.6、7.8) で投与し、各 pH における細胞内での Pink Flamindo および pHluorin の蛍光強度依存性を算出した。そのうえで、Fsk 投与中の pH 変化を pHluorin の蛍光強度から推測し、pH 変化を差し引いた Pink Flamindo の補正後蛍光強度を算出した結果、Fsk 投与中の Pink Flamindo の蛍光強度変化は pH 変化の影響をほぼ受けておらず、実際の cAMP 濃度変化を反映していた (図 26B)。

### 3.3.8. マウス脳での *in vivo* 二光子顕微鏡イメージング

Pink Flamindo の *in vivo* での有用性を検証するため、Pink Flamindo をアストロサイトで発現するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、マウス大脳皮質に注入した。免疫組織染色の結果、Pink Flamindo がアストロサイトマーカー S100B と共局在しており、アストロサイトに正しく発現していることが示された (図 27A)。ウイルス感染から 2 週間後、ウレタン麻酔した

マウスの脳に頭蓋窓を作製し、二光子顕微鏡でアストロサイトを観察した。頭蓋窓から Fsk (50  $\mu$ M) および IBMX (500  $\mu$ M) の混合溶液を投与したところ、Pink Flamindo の蛍光強度が上昇し、洗浄操作を挟んで 2 度目の投与にも可逆的に応答した (図 27B-D)。1 度目の Fsk/IBMX 投与から 10 分後のアストロサイト細胞領域における蛍光強度の上昇率は  $56.4 \pm 28.7\%$  であった。また、cAMP 濃度上昇に伴い蛍光強度が低下する緑色単色輝度変化型 cAMP センサー Flamindo2 を用いて同様の実験を行ったところ、Fsk/IBMX 投与によって蛍光強度が可逆的に低下した (図 27E)。その低下率は  $64.5 \pm 24.4\%$  で、Pink Flamindo と同程度の応答を示した (図 27F)。

### 3.4. 考察

本研究では、赤色単色輝度変化型 cAMP センサー Pink Flamindo の開発に成功し、光遺伝学ツールとの併用、二色同時イメージング、*in vivo* 二光子顕微鏡イメージングに適用できることを示した。

本研究で用いた変異導入手法は、Pink Flamindo 以外にも緑色単色輝度変化型 cGMP センサー Green cGull や、緑・赤・青色単色輝度変化型 ATP センサー MaLion にも適用され、高性能なセンサー開発に成功している[65, 130]。従来単色輝度変化型センサーは開発が難しく、特に多色化に成功した例は少なかったが、この手法を用いることで多様な分子に対する新規単色輝度変化型センサーの開発、および多色化が進展すると期待できる。

Pink Flamindo の cAMP に対する応答は、精製タンパク質においても生細胞においても可逆的であり、細胞内の cAMP 濃度変化を適切に反映できていると考えられる (図 21B, 図 23A)。また、精製タンパク質は cAMP の添加後 5 秒以内に蛍光強度が上昇する (図 21C)。これは先行研究で Epac 由来の結合ドメインを用いて開発された FRET 型 cAMP センサーと同程度であり[55]、cAMP への応答速度という点でも遜色ないと考えられるが、より正確な反応速度定数を解析するには、ストップフロー法を用いた測定が必要である。

吸収スペクトルの測定では、cAMP の添加に伴い 420 nm 付近の吸光度が低下し、565 nm 付近の吸光度が上昇した (図 22A)。蛍光タンパク質の発色団を構成するアミノ酸は、チロシン残基のカルボキシル基が脱プロトン状態 ( $O^-$ ) のときに蛍光を発し、プロトン状態 (OH) では蛍光を発しない。mApple においては 71 番目のチロシン残基が発色団の中心であり、脱プロトン状態では 550 nm 付近に、プロトン状態では 400 nm 付近に吸光ピークを持つことが知られている[135]。すなわち、Pink Flamindo は cAMP の添加により発色団のイオン環境が変化し、脱プロトン/プロトン状態の比率が増加することで蛍光強度の上昇に結びついていると考えられる。

Pink Flamindo の cAMP および cGMP に対する  $K_d$  はそれぞれ 7.2  $\mu$ M および 94  $\mu$ M、ヒル係数はそれぞれ 1.01 および 1.07 で、アロステリック効果は示さないと考えられる (図 22B)。先行研究において開発された FRET 型 cAMP センサーの cAMP に対する  $K_d$  は 50 nM から 10  $\mu$ M の範囲にあり、細胞内で適切に機能していることから[118, 136–139]、Pink Flamindo も細胞内 cAMP 動態の観察に十分な親和性を示すと考えられる。また、Pink Flamindo は cGMP にも応答するが、これまで開発された cGMP センサーの cGMP に対する  $K_d$  は 1  $\mu$ M 前後であるため[63, 140–142]、細胞内での cGMP 濃度の変化範囲は Pink Flamindo の  $K_d$  よりはるかに低く、cGMP への応答は無視できる範囲であると推測される。

一方、Flamindo2 の cAMP および cGMP に対する  $K_d$  はそれぞれ 3.2  $\mu$ M および 22  $\mu$ M で、Pink Flamindo の方が高い  $K_d$ 、すなわち低い親和性を持つといえる。同じ Epac1 由来の結合ドメインを用いているにもかかわらず  $K_d$  が異なった理由として、変異導入手法の違いが考えられる。Flamindo2 の開発過程では、蛍光タンパク質部分と結合ドメイン部分の間のリンカー長のみを調節していたのに対し、Pink Flamindo の開発過程ではリンカー長の調節に加え、リンカー、蛍光タンパク質、結合ドメインいずれの部分にも変異を導入している (図 20)。この操作によりダイナミックレンジの大幅な向上を達成できた一方、ダイナミックレンジの高い



変異体をスクリーニングする過程で cAMP への親和性や基底状態の蛍光強度が低下していた可能性がある。従来の FRET 型 cAMP センサーや、近年新たに開発された赤色単色輝度変化型 cAMP センサー[143]は、Epac1、Epac2、プロテインキナーゼ A (protein kinase A: PKA)、環状ヌクレオチド感受性チャネルなど、様々なタンパク質由来の cAMP 結合ドメインを用いており、その  $K_d$  も様々であることから、結合ドメインや変異導入箇所の最適化により、さらに適切な蛍光強度、ダイナミックレンジ、親和性を兼ね備えたセンサーの開発が可能になると考えられる。

Pink Flamindo を用いた生細胞イメージング実験では、様々な刺激によって蛍光強度の上昇が見られたものの、上昇率は 1.5 倍から 2.5 倍付近の場合がほとんどであり、精製タンパク質でのダイナミックレンジである 4.2 倍には達していない (図 23)。この理由として、基底状態で細胞内に一定濃度の cAMP が存在している可能性が考えられる。基底状態の HeLa 細胞に DDA を投与した際に蛍光強度の低下が見られたことは、この仮説を支持する (図 23B)。また、Fsk、IBMX、DDA を順に投与した際、DDA を投与しても蛍光強度が Fsk 投与前の値に戻らなかったのは、DDA によってアデニル酸シクラーゼ活性が抑制されても、IBMX によるホスホジエステラーゼ抑制効果が残存しており、cAMP 分解が進まなかったためと考えられる。

光活性化アデニル酸シクラーゼ bPAC との併用実験では、青色光の照射条件によって細胞内の cAMP 濃度を様々に変動させることが可能であることを Pink Flamindo により実証した (図 25A)。しかし、Pink Flamindo のみを発現させた場合でも青色光照射による蛍光強度上昇が見られたことから、その結果の解釈には注意を要する (図 25B)。また、MIN6 m9 細胞において EGFP-h\_bPAC-CAAX を青色光により活性化させたとき、最も短い 40 ミリ秒の照射時に比べて 200 ミリ秒の照射時の方が小さい応答を示す傾向にあった (図 25C)。この理由として、bPAC が細胞種あるいは細胞内の局在により一定の不応期を持つ可能性があげられる。その後行われた 1 秒以上の照射に対しては、不応期から回復した一部の bPAC が強く応答し、蛍光強度上昇率が大きくなったと考えられる。

MIN6 m9 細胞において、Pink Flamindo-CAAX の蛍光強度上昇が見られた条件で青色光を照射しても NPY-mKate の開口分泌現象は確認できなかった (図 25D)。膵  $\beta$  細胞からインスリンが分泌される際には、細胞内で  $Ca^{2+}$  と cAMP の両者が開口分泌促進に関与することが知られている[62, 133, 144, 145]。青色光で EGFP-h\_bPAC-CAAX を活性化させた場合、細胞膜直下で cAMP のみが選択的に増加していると考えられるが、cAMP 濃度のみの上昇ではインスリン開口分泌を引き起こすには不十分である可能性がある。

二色同時イメージングでは、トルブタミド投与により MIN6 m9 細胞内で  $Ca^{2+}$  と cAMP の濃度が上昇する様子の観察に成功した (図 26A)。蛍光強度の経時変化を比較すると、Pink Flamindo の蛍光強度はなだらかな上昇を示したのに対し、G-GECO の蛍光強度は速やかにピークに達したのち激しい振動を繰り返した。先行研究において、MIN6 m9 細胞内に細胞外から  $Ca^{2+}$  が流入すると、細胞膜上に局在し  $Ca^{2+}$  活性化されるアデニル酸シクラーゼが活性化され、インスリン開口分泌を増強するという報告がある[62]。今回得られた Pink Flamindo と G-GECO の経時変化の違いは、この分子動態の差異を反映するものと考えられる。しかし、

FRET 型 cAMP センサーEpac1-camps を用いた実験では、トルブタミド投与によって蛍光強度比の小刻みな振動が見られたという報告もある[145]。この振動の有無の原因としては、センサーの親和性、発現時の培養温度の違いが考えられる。

マウス脳における *in vivo* 二光子顕微鏡イメージングでは、Pink Flamindo および Flamindo2 が活きたマウスにおいても正常に機能し、応答の可逆性も保たれていることを示した(図 27)。前述したように Pink Flamindo は Flamindo2 に比べて cAMP 親和性が低いものの、Fsk/IBMX 投与時の蛍光強度変化率に違いがなかったことから、細胞内での cAMP 動態観察には大きく影響していないと考えられる (図 27F)。

本研究で開発した赤色単色輝度変化型 cAMP センサーPink Flamindo は、従来の FRET 型 cAMP センサーや緑色 cAMP センサーでは不可能であった二色イメージング、光遺伝学との併用に適用でき、さらに *in vivo* イメージング実験にも使用可能であることが示された。これにより、生きた生物個体中を含む様々な細胞において、異なる分子間の相互作用、また異なる細胞小器官における分子動態の差異など、複雑なシグナル分子ネットワークが細胞機能におよぼす生理学的意義の解明が期待される。

## 第4章 キニーネによる GLP-1 分泌制御機構

### 4.1. 緒言

小腸内分泌 L 細胞が感受する食餌由来成分を味覚の観点から見ると、甘味（糖）[27-29]、うま味（アミノ酸）[33, 34]、脂肪味（脂質）[30-32]、辛味（カプサイシン）[146]、塩味（NaCl）[147]と GLP-1 分泌の関連については知見が蓄積されている。しかし残る苦味については、苦味物質とその受容体である 2 型味覚受容体（taste receptor type 2: マウスでは Tas2R、ヒトでは TAS2R）の種類が非常に多く、受容体-リガンドの関係性や選択的アゴニスト・アンタゴニストの解明が不十分なため、十分な解析が進んでいないのが現状である[148-152]。

キニーネは苦味物質の一種で、マラリアの治療薬成分として使用されている。先行研究において、キニーネを経口投与したラットで体重増加抑制効果が報告され、その効果は苦味による食欲減退とは独立に起こる現象で、transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5) チャンネルを介するとされている[153, 154]。しかしこの過程で、GLP-1 分泌によるインスリン分泌促進に伴う血糖値低下が関与しているかは不明である。また、ヒト小腸内分泌 L 細胞由来細胞株 NCI-H716 細胞ではキニーネ投与により GLP-1 分泌の促進が報告されているが[149]、その詳細な分子機構も不明である。

そこで本研究では、マウス小腸内分泌 L 細胞由来細胞株 GLUTag 細胞を用い、キニーネが GLP-1 分泌に与える影響と、その分子メカニズムを解明することを目的とした。またそれにあたり、第3章で開発した Pink Flamingo を用いて細胞内 cAMP 動態が GLP-1 開口分泌に果たす役割を解析した。

## 4. 2. 材料と方法

### 4. 2. 1. 試薬

キニーネ (Wako Pure Chemical Industries) はエタノールに溶解した。ジアゾキシド、ニフェジピン、YM-254890 (Wako Pure Chemical Industries)、Fsk (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) および U-73122 (Cayman Chemical) はジメチルスルホキシドに溶解した。

### 4. 2. 2. 細胞培養と遺伝子導入

GLUTag 細胞は 2. 2. 3. と同様の手順で、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 下で培養した。イメージング実験に際しては、35 mm ガラスボトムディッシュを 15 分間 UV 照射したのち、1 mg/mL poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) をガラス上に 200 μL 滴下して 30 分室温静置しコーティングした。その後 PBS 400 μL で 3 回洗浄したのち、トリプシン処理した GLUTag 細胞を 1×10<sup>5</sup> 細胞播種して培養した。遺伝子導入には、播種後 2 日培養した GLUTag 細胞 1 ディッシュあたり、1.5 μg のプラスミドと 3 μL の Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を合計 100 μL となるよう OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合し、抗生物質を含まない 1 mL の培地中で導入し、4 時間後に培地を交換したのち、37°C (tPA-GFP) または 32°C (Pink Flamindo)、5 % CO<sub>2</sub> 下で 2 日培養した。

### 4. 2. 3. RT-PCR

2. 2. 4. と同様の手順で GLUTag 細胞およびマウス脳の Total RNA、cDNA を合成し、PCR 反応を行った。PCR に用いた遺伝子、およびそれに対するプライマーの情報は表 3 に記した。

### 4. 2. 4. 細胞内 Ca<sup>2+</sup>および cAMP 動態の可視化解析

Ca<sup>2+</sup>イメージングは 2. 2. 6. と同様の手順で行った。撮影は 5 秒ごと 20 分間行い、キニーネは撮影開始から 2 分後に灌流投与、Fsk は撮影開始から 10 分後に直接滴下により投与した。

### 4. 2. 5. TIRFM による観察

TIRFM イメージングは 2. 2. 7. と同様の手順で行った。撮影は 0.5 秒ごと 20 分間行い、4. 2. 4. と同様の手順で刺激を行った。

### 4. 2. 6. 酵素共役免疫吸光法による測定

GLUTag 細胞を 6 穴プレートに 5×10<sup>5</sup> 細胞播種後 2 日培養した。RB で 2 回洗浄したのち、0.1 mM グルコース入りの RB 中に刺激を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 2 時間インキュベートした。その後 RB を回収し、1,000 g、4°C で 10 分間遠心し、上清 100 μL を測定に用いた。測定には GLP-1 ELISA Kit *Wako*, High Sensitive (Wako Pure Chemical Industries) および蛍光プレートリーダー (MPR-A4i, TOSOH, Tokyo, Japan) を用いた。

### 4. 2. 7. 蛍光免疫染色

GLUTag 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに播種後 2 日培養し、0.1 mM グルコース

入り RB で 2 回洗浄後、刺激溶液 1 mL を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 2 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄したのち、2%パラホルムアルデヒドを加えて室温 20 分間インキュベートし細胞を固定した。次に PBS で 3 回洗浄し、0.3% Triton X-100 含有 PBS を加えて 2 分間インキュベートし、膜透過処理を行った。その後、PBS で 1000 倍希釈した蛍光標識ファロイジン (Alexa Fluor®488 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific) を加え、室温 30 分間インキュベートした。PBS で 5 回洗浄後、2 mL の PBS を加え、4. 2. 5. と同様に全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### 4. 2. 8. データ解析

イメージング画像の解析には ImageJ および MetaMorph を用いた。Ca<sup>2+</sup>および cAMP イメージングでは、ImageJ の Stackreg プラグインでずれの補正を行ったのち、MetaMorph で個々の細胞の領域を手動で選択し、バックグラウンドを差し引いた蛍光強度変化を算出した。刺激直前 30 秒間の蛍光強度の平均を 100%とし、%換算の経時変化曲線を作製して、刺激後の蛍光強度の最大値を比較した。

tPA-GFP を用いた開口分泌の可視化観察では、tPA-GFP が分泌顆粒から開口分泌によって放出される際、GFP 由来の蛍光を持った輝点の蛍光強度が瞬間的に上昇し、その後輝点が拡散しながら徐々に減衰する様子が観察された。これを GLP-1 の開口分泌反応と定義し、20 分間における分泌反応回数を細胞の面積で除算して比較した。単一の tPA-GFP 顆粒の蛍光強度変化解析に際しては、1.3 μm 四方の正方形で顆粒の中心を囲み、MetaMorph の Track objects アプリケーションでトラッキングした。測定開始時点から 30 秒間の明るさの平均を 100%とし、%換算の経時変化曲線を作製した。

蛍光標識ファロイジンを用いた免疫染色では、細胞膜全体でのファロイジンの蛍光強度を比較した。

統計解析は GraphPad Prism 6 software (GraphPad software) で行い、Welch's *t* test、または One-way ANOVA と Tukey's post hoc test による検定を行った。データはそれぞれ、平均値 ± 標準偏差で示した。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. キニーネによる GLUTag 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇

先行研究において、HEK293T 細胞にヒトの様々な苦味受容体 TAS2R を発現させて苦味物質を投与し、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った結果、TAS2R4、7、10、14、39、40、43、44、46 がキニーネ受容体候補として報告されている[155]。そこで、これらの受容体に対するマウスのホモログである Tas2R104、105、106、107、108、114、116、120、130、136、139、144[156] の GLUTag 細胞における発現を RT-PCR により解析した。その結果、これらすべての受容体が mRNA レベルで発現していることを見出した (図 28A)。

続いて、キニーネ投与時の GLUTag 細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  動態を Fluo4 により観察した。キニーネ (100  $\mu\text{M}$ 、300  $\mu\text{M}$ 、500  $\mu\text{M}$ ) の投与に伴い、Fluo4 の蛍光強度が濃度依存的に上昇した (図 28B、C)。以上から、GLUTag 細胞に発現している Tas2R がキニーネを感知し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が起こると示唆された。

#### 4.3.2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に関与するシグナル経路

Tas2R は GPCR で、ガストデュেশン ( $\text{G}_{\text{gust}}$ ) と呼ばれる  $\alpha$  サブユニット、および  $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットと共役している。Tas2R がリガンドの結合によって活性化すると、 $\text{G}_{\text{gust}}$  はホスホジエステラーゼを活性化して細胞内の cAMP 濃度を低下させ、 $\beta$  および  $\gamma$  サブユニットは PLC を活性化して、イノシトール三リン酸受容体を介し小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞質へ放出させる [151]。一方膵  $\beta$  細胞において、キニーネが  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルを阻害して細胞膜を脱分極させ、電位依存性カルシウムチャンネル (voltage-dependent calcium channel: VDCC) を介して細胞外から細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させインスリン分泌を促進することが知られている [157]。そこで、GLUTag 細胞で見られた  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇における、小胞体由来の  $\text{Ca}^{2+}$  と細胞外由来の  $\text{Ca}^{2+}$  の関与を検証した。 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルの開口剤であるジアゾキシド (250  $\mu\text{M}$ ) または L 型 VDCC の阻害剤であるニフェジピン (1  $\mu\text{M}$ ) をキニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) と同時投与すると、キニーネによる Fluo4 の蛍光強度上昇が有意に抑制された (図 29A、B)。また、PLC 阻害剤である U-73122 (1  $\mu\text{M}$ ) をキニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) と同時投与した場合も蛍光強度上昇が抑制された。さらに、 $\text{G}_q$  タンパク質の阻害剤である YM-254890 (250 nM) によっても蛍光強度上昇が抑制された。これらすべての阻害剤を同時にキニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) と同時投与すると、蛍光強度上昇がほぼ完全に抑制された (図 29C、D)。以上から、キニーネによる  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は Tas2R とその下流の PLC 活性化、および  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネル阻害を介していると示唆され、また PLC 活性化の制御には  $\text{G}_{\text{gust}}$  に加えて  $\text{G}_q$  タンパク質も関与する可能性が示された。

#### 4.3.3. キニーネが GLP-1 開口分泌動態に与える影響

続いて、キニーネが GLP-1 分泌に与える影響を検証した。分泌された GLP-1 量を ELISA 法により比較すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が起きているにもかかわらず、グルコース (25 mM) 投与で見られる分泌増強は起こらなかった (図 30A)。このメカニズムを解明するため、GLP-1 分泌小胞マーカー tPA-GFP[34] を GLUTag 細胞に強制発現させて TIRFM で観察した。グルコース (25 mM) 投与時には、tPA-GFP 由来の輝点の蛍光強度が一過的に上昇したのち徐々に低下

する開口分泌現象が見られた (図 30B、C)。しかしキニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) 投与時には、輝点は細胞膜にとどまり、その蛍光強度はなだらかに上昇し続けるものの開口分泌に至らなかった (図 30D、E)。以上から、キニーネは GLP-1 分泌小胞を細胞膜へと接近させるものの、完全な膜融合と内部の GLP-1 放出までは引き起こさないと示唆された。

#### 4.3.4. キニーネによるアクチン骨格再構成

キニーネ投与時に tPA-GFP 顆粒が細胞膜に接近するものの膜融合に至らず、GLP-1 開口分泌が促進されなかったことから、細胞膜直下のアクチン骨格の動態との関連を解析した。第 2 章と同様に Lifeact-EGFP を GLUTag 細胞に強制発現させて TIRFM で観察し、グルコース (25 mM) またはキニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) 投与時の接着斑密度の変化を比較したが、どちらにおいてもコントロール条件と比べ有意な差は見られなかった (図 31A)。しかし、蛍光標識ファロイジンを用いて免疫染色した GLUTag 細胞を TIRFM で観察すると、グルコース (25 mM) 投与によってはファロイジンの蛍光強度に変化が見られなかったのに対し、キニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) 投与後の細胞ではファロイジンの蛍光強度が有意に上昇した (図 31B、C)。以上から、キニーネ投与によって接着斑形成とは異なる形でアクチンの重合が促進され、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇による GLP-1 開口分泌を抑制している可能性が示された。

#### 4.3.5. 細胞内 cAMP 変動時の GLP-1 開口分泌動態の変化

開口分泌は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  および cAMP に制御されている。キニーネが  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こしたにもかかわらず GLP-1 開口分泌に至らなかったことから、GLP-1 開口分泌が起こるには  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇だけでなく、 $[\text{cAMP}]_i$  上昇も必要なのではないかと考えた。そこで、第 3 章で開発した Pink Flamindo を GLUTag 細胞に強制発現させ、最初にキニーネ、続いてアデニル酸シクラーゼの活性化剤 Fsk を投与した際の細胞内 cAMP 動態を観察した。その結果、Pink Flamindo の蛍光強度はキニーネでは変化せず、Fsk (1  $\mu\text{M}$ ) によってのみ上昇した。一方、同様の手順で  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行うと、Fluo4 の蛍光強度はキニーネによって上昇した後 Fsk の影響は受けなかった (図 32A、B)。すなわち、キニーネは  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、Fsk は  $[\text{cAMP}]_i$  のみをそれぞれ上昇させると考えられた。

この条件で tPA-GFP の観察を TIRFM により行ったところ、Fsk 投与に伴い tPA-GFP の開口分泌頻度が有意に増加した (図 32C)。以上から、キニーネ単体では GLP-1 開口分泌を引き起こすには不十分であり、GLUTag 細胞においては  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  と  $[\text{cAMP}]_i$  の両者が上昇した際、GLP-1 開口分泌が増強されると示唆された。

#### 4.4. 考察

本研究では、GLUTag 細胞に苦味受容体が発現し、キニーネを感知して PLC、 $K_{ATP}$  チャネルを介して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こることを見出した。また、キニーネ感知だけでは GLP-1 開口分泌に至らず、Fsk 投与による $[cAMP]_i$ 上昇が加わることで開口分泌が引き起こされることを明らかにした。

第2章では LPI により $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こり、GLP-1 分泌が促進されることを見出しているが、本研究では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られるにもかかわらず GLP-1 分泌が促進されなかった(図 28、図 30)。この違いの要因として、第一に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の規模の違い、第二にアクチン骨格再構成のパターンの違いが考えられる(図 33)。LPI 投与時には Fluo4 の蛍光強度は平均で 1.5 倍以上に上昇し、また蛍光強度の上昇が 10 分以上持続していたのに対し(図 7B)、キニーネ投与時には Fluo4 の蛍光強度は平均で 1.2 倍程度であり、10 分後にはキニーネ投与前の値に戻っている(図 28B)。そのため、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が大規模かつ持続的であった LPI 投与時には  $Ca^{2+}$ 単体で GLP-1 開口分泌に至ったが、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が小さく一過的であったキニーネ投与時には、 $Ca^{2+}$ 単体では GLP-1 開口分泌に至らなかったと推測される。

Tas2R は  $G_{gust}$  と共役するが、本研究では  $G_q$  タンパク質の阻害剤である YM-254890 によっても $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制効果が見られた(図 29C、D)。 $G_{gust}$  の  $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニット、および  $G_q$  の  $\alpha$  サブユニットはいずれも PLC を活性化するため、この結果は PLC 阻害の結果と矛盾しない。すなわち、キニーネに対する受容体と推測される Tas2R104、105、106、107、108、114、116、120、130、136、139、144 では、共役する G タンパク質の切り替えが起きている可能性がある。 $\beta_1$  アドレナリン受容体は本来  $G_s$  タンパク質と共役するが、 $G_i$  タンパク質と共役することも報告されており[99]、またカルシウム感受性受容体は  $G_s$ 、 $G_i$ 、 $G_q$ 、 $G_{12/13}$  いずれとも共役すると考えられている[158]。よって、GLUTag 細胞に発現している苦味受容体も  $G_{gust}$ 、 $G_q$  の両者と共役している可能性がある。

キニーネが関与する Tas2R 以外のシグナル経路として、本研究でも確認された  $K_{ATP}$  チャネルの阻害のほか、TRPM5 チャネルの阻害が先行研究で報告されている[157, 159]。しかし、小腸内分泌 L 細胞由来細胞株 STC-1 細胞や NCI-H716 細胞を用いた研究では、キニーネを含む苦味物質によって起こる GLP-1 分泌において、TRPM5 の関与は見出されていない[148, 159]。そのため、ラットでキニーネ経口投与により見られ、TRPM5 が関与するとされた体重増加抑制効果は、GLP-1 分泌の変化とは別の要因によって起きている可能性が高い。また、NCI-H716 細胞ではキニーネにより GLP-1 分泌が増強されるが[149]、本研究に用いた GLUTag 細胞では増強効果は見られなかった。この違いの理由としては、Tas2R の発現量、共役する G タンパク質などシグナル経路を構成する因子の発現量や共役パターン、GLP-1 分泌小胞の  $Ca^{2+}$ 感受性の差異が推測される。すなわち、同じ小腸内分泌 L 細胞由来細胞株であっても、その種類によって GLP-1 の分泌制御機構は異なる場合があるといえる。実際、GLUTag 細胞、NCI-H716 細胞、STC-1 細胞では細胞内に含まれる GLP-1 などのペプチド量や、刺激に対する応答性が異なることが報告されている[160]。そのため、研究対象とする物質によっては、生体における GLP-1 分泌を適切に再現する細胞株の選択が重要であると考えられる。

ファロイジン染色の結果、キニーネによりアクチン重合が促進し、GLP-分泌小胞の膜融合



を抑制する可能性が示された (図 31B、C)。開口分泌におけるアクチン骨格の関与には諸説あり、しばしば相反する報告も存在する[161]。アクチンが分泌小胞と細胞膜の間で物理的な障壁としてはたらき開口分泌を抑制するという報告がある一方[162]、分泌小胞の膜融合を補助する役割があるとする報告もある[163]。膵β細胞においては、グルコース依存的に起こるインスリン分泌はアクチン脱重合と共役しており、Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) がその役割を担っているとされる[164, 165]。また、ヒト TAS2R4 を強制発現させた HEK293T 細胞においては、キニーネ投与により Rac1 が不活性化されるという報告がある[166]。GLP-1 分泌において Rac1 やアクチン脱重合が与える影響は不明であるが、本研究の結果から、キニーネによって Rac1 が不活性化し、アクチン重合が促進され、GLP-1 開口分泌が抑制されるという仮説を立てることが可能である。

一方、第 2 章では LPI により RhoA が活性化され、アクチン重合に伴うストレスファイバーと接着斑の形成が促進されることで TRPV2 が膜移行する、という仮説を提唱している。第 2 章では Lifeact-EGFP を用い、LPI による接着斑構造の変化を見出したが、本研究のキニーネ投与時には変化を確認できなかった (図 31A)。一方、ファロイジン染色によってはアクチン構造の変化を認めている (図 31B、C)。すわなち、キニーネによるアクチン骨格の再構成は、LPI による細胞膜直下の接着斑形成と同一の現象ではない可能性が想定される。先行研究で報告されている開口分泌へのアクチン骨格の関与も、再構成の経路によって異なる影響に結びついていると考えられる。たとえばキニーネ投与時には細胞膜から離れた部分も含むアクチン骨格全体の網目構造が強化されたとすれば、分泌小胞の膜融合に対して物理的障壁となり、 $[cAMP]_i$  上昇に伴い脱重合することで、GLP-1 開口分泌に至った可能性がある。

ただし、第 2 章での LPI 投与実験においても、GLUTag 細胞で本研究と同様のファロイジン染色を行った際、キニーネ投与時と同様の蛍光強度の上昇が観察されるかは検証が必要である。細胞膜直下に加え、細胞膜から離れた細胞質内まで含めたアクチン動態の全容を解析するには、光シート顕微鏡などを用いた生細胞三次元タイムラプス解析が必要と考えられる。また、同じアクチン骨格が、構造変化を制御するエフェクタータンパク質の違いにより GLP-1 開口分泌に対して正反対の影響を与えうるのかについても、さらなる検証が必要である。

また、キニーネ投与後に Fsk によって $[cAMP]_i$ を上昇させることで、キニーネ単体では引き起こされなかった GLP-1 開口分泌に至った (図 32)。cAMP は PKA や Epac などのタンパク質を活性化させる[161]。腎細胞において、PKA が RhoA をリン酸化し、アクチン脱重合を引き起こすことでアクアポリン 2 の膜移行を促進することが報告されている[167]。そのため GLUTag 細胞においても、Fsk によって $[cAMP]_i$ が上昇したことで、キニーネにより重合したアクチンを再度脱重合させ、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇による膜融合を促進し、GLP-1 開口分泌に至った可能性がある。第 2 章でも LPI 投与により $[Ca^{2+}]_i$  上昇が起きているが、その上昇度合いがキニーネ投与時に比べてより大規模かつ持続的であったため、 $Ca^{2+}$ 単体でも GLP-1 開口分泌を引き起こすのに十分であったと考えられる。また前述したように、LPI 投与時とキニーネ投与時でアクチン骨格の動態に与える影響が異なることで、 $Ca^{2+}$ および cAMP の影響に差異が生じた可能性もある。

本研究では  $Ca^{2+}$ 、cAMP、GLP-1 分泌小胞の動態を可視化する生細胞イメージング技術によ

り、キニーネがGLP-1分泌に与える影響を分子レベルで解析することに成功した。また、GLP-1分泌小胞の動態に対してCa<sup>2+</sup>、cAMP、アクチンが果たす役割を、それぞれ部分的ではあるが解明した。本研究で用いた手法および得られた成果は、他の苦味物質や様々な化学物質とGLP-1分泌との関連を解析するにあたっても有効な知見であり、最終的にはGLP-1開口分泌を分子レベルで自在に制御することで、GLP-1分泌能の向上と代謝疾患治療に資する可能性を有すると考えられる。

## 第5章 総合討論

### 5.1. 本研究から得られた知見とその意義

本研究は、小腸内分泌 L 細胞の生理機能を生細胞イメージングにより解明することを目標に、3つのテーマについて研究を行った。第一に、LPI による GLP-1 分泌制御機構について、 $\text{Ca}^{2+}$ 、アクチン骨格、TRPV2 チャネルの関与を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングおよび TIRFM により明らかにした (第2章)。第二に、赤色単色輝度変化型 cAMP センサー Pink Flamindo を開発し、二色イメージング、光遺伝学との併用、*in vivo* イメージングへの有用性を示した (第3章)。第三に、キニーネによる GLP-1 分泌制御機構について、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング、cAMP イメージング、TIRFM による GLP-1 分泌小胞の動態観察を行い、GLP-1 開口分泌における  $\text{Ca}^{2+}$  および cAMP 両者の重要性を示した (第4章)。

以上の成果は、GLP-1 分泌に細胞内のシグナル分子やタンパク質が果たす役割をダイナミックに捉えた先駆的なものであり、また単色輝度変化型センサーの内分泌細胞における有用性を示し、将来性にも富んだものといえる。

LPI、キニーネはいずれも、GLUTag 細胞への作用機序において GPCR を介していた。GPCR は創薬研究においても重要な研究対象であるが、リガンドや下流のシグナル経路の同定が難しく、現在でも機能が未解明のオーファン GPCR が多数存在する。LPI に対する受容体 GPR55 も近年までオーファン受容体であり、リガンドとして LPI 以外にリゾホスファチジルグルコシドを感受するという報告もある[168]。また、選択的アゴニスト O-1602 だけでは GLUTag 細胞の応答を再現できなかった点、 $G_q \cdot G_{12/13}$  やその他のシグナルとの共役が先行研究でも本研究でも見られた点から、その詳細な機能についてはさらなる検証が必要と考えられる。キニーネに対する受容体も、先行研究に基づき複数の発現を見出したが、Tas2R は GPCR の中でも選択的アンタゴニストに乏しく機能解析が難しいため、それぞれの受容体が伝達する詳細なシグナル経路の判別には至らなかった。

GPCR の機能解析は、HEK293 細胞やチャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 CHO 細胞などのモデル細胞に GPCR を強制発現させ、 $\text{Ca}^{2+}$  や cAMP などのシグナル分子動態を測定する実験が主流であった。 $\text{Ca}^{2+}$  は Fluo4 などの  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素が、cAMP はルシフェラーゼ反応を利用したセンサータンパク質が用いられているが[169]、その大半は緑色の蛍光ないし発光を測定するものであるため、複数分子の同時測定が困難である。そこで、本研究で開発した Pink Flamindo のような単色輝度変化型センサーを用い、測定ツールの多色化、輝度や感度の最適化を行うことで、よりハイスループットな解析が達成される可能性がある。

すなわち、センサー開発による個々の GPCR やイオンチャネルなどの分子レベルでの機能解析と、実際の内分泌細胞における生理機能解明は相互補完的に進展させることが可能であり、機能未知のオーファン GPCR が持つ生理的意義を解明するにあたって非常に有効な手段であると考えられる。近年では、X 線結晶解析をもちいた構造生物学的な見地からも GPCR、イオンチャネル、酵素などの詳細な性質の解明が進んでいる。アミノ酸レベルでの構造データをもとにリガンド、アゴニスト、アンタゴニストなどの同定や開発が進み、本研究で用いたイメージング技術によるシグナル動態の解析と結びつけることで、消化管をはじめ様々な内分泌細胞におけるホルモン分泌制御機構の解明、そして創薬開発や治療手段の確立へと発

展していくことが期待される。

## 5.2. 現在の研究手法の限界とさらなる研究の進展に向けて

本研究では高精度の生細胞イメージングにより、GLP-1 分泌を対象とした細胞・分子レベルでの機能解析を行ってきた。しかし、消化管ホルモンによる恒常性調節の全容を明らかにするには、なお解決すべき課題が多く残されている。

第一に、株化細胞を用いた実験系では生体中の消化管環境を再現することができない。本研究では、株化された GLUTag 細胞を Poly-L-lysine コーティングしたガラスボトムディッシュに播種して観察した実験が主であるが、実際の L 細胞は周囲の上皮細胞や基底膜などに囲まれ、多様な接着タンパク質によって固定されており、また細胞極性も有している。加えて、消化管内では L 細胞が単一の生理活性物質のみに暴露されることはなく、管腔由来の食餌成分や腸内細菌代謝産物、さらに他臓器との連関を介した神経、血管由来の物質が混合された状態で到達し、またそのキネティクスも様々に変化しているはずである。さらに、株化に伴うホルモン分泌能の変化も考慮すべきである。

消化管をはじめとする生理学研究において、分子レベルの時空間解像度が得られる環境を求めるほど実際の動物体内における環境からはかけ離れ、反対に動物個体に近い生理環境を求めれば分子レベルでの解析が困難になるという課題は常に立ちはだかっている。創薬研究などの応用段階を見据えるのであれば、できるだけ動物個体の性質を維持したまま、観測された現象に関わる受容体やシグナル経路まで解明できる研究を行う必要がある。現在 GLP-1 研究においては、初代培養 L 細胞を用いた実験、および急性単離小腸を用いた実験が有効な手段となっている。前者は L 細胞で特異的に蛍光タンパク質を発現するような遺伝子組換えマウスを作製し、フローサイトメトリーを用いて小腸組織から L 細胞のみを単離回収したのち培養する技術である[29]。電気生理学的実験に加え、発現させる蛍光タンパク質を GCaMP などの分子センサーにすることで、Ca<sup>2+</sup>などシグナル分子動態のイメージングも可能である[170]。後者はラットやブタなどから小腸を切り出し、一時的にチャンバー内で灌流投与を行う技術である[27, 28]。測定手段は生化学や電気生理学的実験に限られるが、管腔内または小腸に通じる動脈内にカニューレを挿入して目的の生理活性物質を投与することで、管腔や血管由来の物質が L 細胞に到達する腸内環境を再現できる。

これらの技術に加えて、さらに研究を進展させる可能性を有するのが、生きた動物個体で直接細胞の蛍光観察を行う *in vivo* イメージングである。*in vivo* イメージングの技術は脳で最も進展しており、脳表層は共焦点顕微鏡で観察でき[171]、さらに脳深部は透過性の高い赤外線を励起光に用いる二光子顕微鏡や[51]、光ファイバーやスティックレンズを直接挿入して観察に用いる内視顕微鏡[172]で観察が可能である。小腸においても、二光子顕微鏡および内視顕微鏡での観察例が存在し、炎症発生部位での免疫応答の観察に成功している[173–175]。*in vivo* イメージングを L 細胞に対して行うにあたっては、L 細胞特異的な遺伝子導入手法、観察組織や観察用の顕微鏡レンズの固定法が課題となる。脳ではアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターとマイクロインジェクターを用いた遺伝子発現系が確立しており、遺伝子組換えマウスを作製せずとも比較的容易に蛍光タンパク質や分子センサーの発現が可能となっ

ている。小腸においては腸間膜動脈へのウイルスインジェクションを行った例はあるが[176]、難易度が高く十分には普及していない。また、脳は定位固定装置を用いることでマウスの手足が触れない状態で実験を行うことができ、覚醒下での実験も可能で、視覚刺激提示時の脳内視覚野での  $\text{Ca}^{2+}$  動態観察なども行われている[177]。それに対し、腸で *in vivo* イメージングを行うには麻酔下での実験、かつ固定装置を用いる必要があるため[178]、蠕動運動や神経活動が弱まり、特に摂食と関連した GLP-1 の動態研究には不適切となる可能性がある。究極的には、完全自由行動下で脳深部組織の観察も可能な、超小型内視顕微鏡 (miniature microendoscope) [179]やファイバーフォトメトリー[180]のような技術を腸組織においても適用することが理想的であるが、現状では開発・成功例は存在せず、新たな技術革新が待たれる。

第二に、内分泌細胞におけるホルモン分泌小胞の動態の解析が困難である。本研究では、キニーネ投与時には tPA-GFP 小胞が細胞膜に接近するのみで開口分泌には至らないが、Fsk 投与により開口分泌が起こることを示している (第 4 章)。しかし、このときの一つ一つの小胞の動きに注目すると、開口分泌される小胞は最初のキニーネ投与時に細胞膜に接近した小胞ではなく、Fsk 投与後に初めて細胞膜付近に現れる小胞であることが分かる (図 34)。つまり、キニーネによる  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に伴い動員される小胞と、Fsk による  $[\text{cAMP}]_i$  上昇に伴い動員される小胞とでは、それぞれのシグナル分子に対する感受性、そして分泌の起こりやすさが異なると推測される。また、開口分泌そのものにも、あらかじめ細胞膜にドッキングしていた小胞が分泌される resident 分泌、刺激を受けて初めて細胞膜に接近し即座に開口分泌される passenger 分泌などの多様性がある[181]。こうしたホルモン分泌小胞の開口分泌に至るまでの動態を定量的に解析できるツールはいくつか開発されているが[182, 183]、特に開口分泌様式の多様性まで含めた解析を定量化する手段は現時点では存在しない。

細胞膜付近での移動から開口分泌に至るまでを一括して網羅的、定量的に解析可能なツールが開発され、開口分泌の多様性メカニズムを解明できれば、薬剤投与などにより特定のパターンの分泌頻度を自在に操作可能となり、ホルモン分泌能の改善手段に寄与できる可能性がある。たとえば膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌は、まず一過的な強い分泌が起き、その後穏やかな分泌が持続的に起こる、二相性分泌と呼ばれる様式をとる。2 型糖尿病患者では、特に初期の一過的な分泌が阻害され、血糖値制御に異常を生じることが知られている[184]。一過的な分泌と持続的な分泌がどのように区別され、個々の小胞の振る舞いがどのように制御されているかを明らかにしたうえで、その制御機構を患者においても正常なものに近づける手段を構築できれば、新たな糖尿病治療法の確立につながると期待できる。

第三に、開発した単色輝度変化型センサーにも更なる改良の余地がある。本研究で確立した変異導入手法は、他の目的分子、また赤以外の色の蛍光タンパク質に対しても有効で汎用性を持った手法であるが、ダイナミックレンジや親和性の予想ができず、どこまで変異を加えることで完成形となるかの判断が難しいという問題がある。古くに開発され数々の改良が加えられてきた GCaMP では、X 線結晶解析もなされて構造が明らかになっており、構造情報に基づいた予測からも性質改変が可能であるが[185]、新規センサーを開発するにあたっては三次元構造が未知のため適用できない。また、GFP の特定残基に網羅的な変異を加えたラ

ライブラリーを作製し、その性質に基づいた機械学習を通じて色の改変を行った研究例もあるが[186]、この手法を適用するにはリンカー長調節、ランダム変異導入ですべての組み合わせのライブラリーを用意する必要があるため、GFP 単体に比べても必要試行数が膨大であり、現在の手法に比べて効率的とは言い難い。もう一つの手法として、ランダムに変異を導入したセンサータンパク質を発現する大腸菌に対してフローサイトメトリーを行い、明るかったものを分取したのち次世代シーケンサーによって網羅的に DNA 配列を解読し、最適な変異導入部位を見つけ出す技術も考案されている[187]。時間効率、コスト、得られるセンサーの性能を兼ね備えたスクリーニング方法は現在も確立に向けた試行錯誤が重ねられており、今後の技術革新が待たれる。

以上の課題を克服するには、生理学や分子生物学面でのアプローチだけでなく、新たな観察・測定系を開発するための工学的な技術や、効率的かつ定量的な解析を可能にするための情報学的な知識が必要である。学際的・分野横断的な知識と技術の統合により、分子レベルでのメカニズムに迫りつつも全身でのはたらきと意義まで俯瞰した、包括的な解析が達成できると考えられる。

## 第6章 総括

本研究では、生細胞イメージングを技術的な軸とし、小腸内分泌 L 細胞の生理機能解析、およびそのための新規分子センサー開発を行った。血液中の脂質メディエーター分子や食餌成分中の苦味物質が GLP-1 分泌に与える影響について、受容体、細胞内シグナル分子、細胞骨格、イオンチャネル、GLP-1 分泌小胞の動態可視化を足がかりに解明した本研究の成果は、体内外の様々な化学物質を受容し応答する L 細胞の性質解明に迫るうえで重要な意義を持つといえる。

今後、本研究で得られた知見および確立した技術を、分子細胞レベルから組織個体レベルの階層にまで拡張することで、さらなる生理的意義の解明に進展すると考えられる。最終的には、消化管ホルモンに加えて性ホルモンなど、神経系と内分泌系両者にまたがって作用し、行動まで含めた全身の恒常性を司る化学物質の役割の全容解明に結びつく、生命科学研究上のブレイクスルーが起きることを期待する。

## 参考文献

- [1] Karnani, M., Burdakov, D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **300** (1), R47–R55, 2011.
- [2] Oomura, Y., Ooyama, H., Sugimori, M., Nakamura, T., Yamada, Y. Glucose Inhibition of the Glucose-sensitive Neuron in the Rat Lateral Hypothalamus. *Nature* **247** (5439), 284–286, 1974.
- [3] Rorsman, P., Salehi, S.A., Abdulkader, F., Braun, M., MacDonald, P.E. K<sub>ATP</sub>-channels and glucose-regulated glucagon secretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **19** (8), 277–284, 2008.
- [4] Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H., Sato, Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation* **4** (6), 511–516, 2013.
- [5] Alexander, S.L., Irvine, C.H.G., Donald, R.A. Dynamics of the Regulation of the Hypothalamo–Pituitary–Adrenal (HPA) Axis Determined Using a Nonsurgical Method for Collecting Pituitary Venous Blood from Horses. *Frontiers in Neuroendocrinology* **17** (1), 1–50, 1996.
- [6] Püschel, G.P. Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **280** (1), 854–867, 2004.
- [7] Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., Greenwood-Van Meerveld, B. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterology & Motility* **28** (5), 620–630, 2016.
- [8] Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.-J., Bravo, D.M., Callaghan, B. The gut as a sensory organ. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **1010** (1212), 729–740, 2013.
- [9] Bayliss, W.M., Starling, E.H. The mechanism of pancreatic secretion. *Journal of Physiology* **28** (5), 325–353, 1902.
- [10] Al Massadi, O., López, M., Tschöp, M., Diéguez, C., Nogueiras, R. Current Understanding of the Hypothalamic Ghrelin Pathways Inducing Appetite and Adiposity. *Trends in Neurosciences* **40** (3), 167–180, 2017.
- [11] Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., Matsukura, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409** (6817), 194–198, 2001.
- [12] Bryant, M.G., Bloom, S.R., Polak, J.M., Hobbs, S., Domschke, W., Domschke, S., Mitznegg, P., Ruppin, H., Demling, L. Measurement of gut hormonal peptides in biopsies from human stomach and proximal small intestine. *Gut* **24** (2), 114–119, 1983.
- [13] Eissele, R., Goke, R., Willemer, S., Harthus, H.P., Vermeer, H., Arnold, R., Goke, B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation* **22** (4), 283–291, 1992.
- [14] Grimelius, L., Capella, C., Buffa, R., Polak, J.M., Pearse, A.G., Solcia, E. Cytochemical and



- ultrastructural differentiation of enteroglucagon and pancreatic-type glucagon cells of the gastrointestinal tract. *Virchows Archiv. B. Cell Pathology* **20** (3), 217–228, 1976.
- [15] Unger, R.H., Ketterer, H., Eisentraut, A.M. Distribution of immunoassayable glucagon in gastrointestinal tissues. *Metabolism: Clinical and Experimental* **15** (10), 865–867, 1966.
- [16] Unger, R.H., Ohneda, A., Valverde, I., Eisentraut, A.M., Exton, J. Characterization of the responses of circulating glucagon-like immunoreactivity to intraduodenal and intravenous administration of glucose. *Journal of Clinical Investigation* **47** (1), 48–65, 1968.
- [17] Bell, G.I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P.J., Najarian, R.C. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature* **304** (5924), 368–371, 1983.
- [18] Bell, G.I., Santerre, R.F., Mullenbach, G.T. Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* **302** (5910), 716–718, 1983.
- [19] Schmidt, W.E., Siegel, E.G., Creutzfeldt, W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* **28** (9), 704–707, 1985.
- [20] Kreymann, B., Williams, G., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* **2** (8571), 1300–1304, 1987.
- [21] Moens, K., Heimberg, H., Flamez, D., Huypens, P., Quartier, E., Ling, Z., Pipeleers, D., Gremlich, S., Thorens, B., Schuit, F. Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes* **45** (2), 257–261, 1996.
- [22] Fujimoto, W., Miki, T., Ogura, T., Zhang, M., Seino, Y., Satin, L.S., Nakaya, H., Seino, S. Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated insulin secretion by cyclic AMP in mice. *Diabetologia* **52** (5), 863–872, 2009.
- [23] Buteau, J., Spatz, M.L., Accili, D. Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes* **55** (5), 1190–1196, 2006.
- [24] Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Maestre, O., Gomez, R., Munoz, R.M., Eng, J., Blazquez, E. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism: Clinical and Experimental* **49** (6), 709–717, 2000.
- [25] Eng, J., Kleinman, W.A., Singh, L., Singh, G., Raufman, J.P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Journal of Biological Chemistry* **267** (11), 7402–7405, 1992.
- [26] Villhauer, E.B., Brinkman, J.A., Naderi, G.B., Burkey, B.F., Dunning, B.E., Prasad, K., Mangold, B.L., Russell, M.E., Hughes, T.E. 1-[[[(3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine]: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties.

- Journal of Medicinal Chemistry* **46** (13), 2774–2789, 2003.
- [27] Elliott, R.M., Morgan, L.M., Tredger, J.A., Deacon, S., Wright, J., Marks, V. Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *The Journal of Endocrinology* **138** (1), 159–66, 1993.
- [28] Herrmann, C., Göke, R., Richter, G., Fehmann, H.C., Arnold, R., Göke, B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* **56** (2), 117–26, 1995.
- [29] Reimann, F., Habib, A.M., Tolhurst, G., Parker, H.E., Rogers, G.J., Gribble, F.M. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metabolism* **8** (6), 532–539, 2008.
- [30] Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine* **11** (1), 90–94, 2005.
- [31] Edfalk, S., Steneberg, P., Edlund, H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* **57** (9), 2280–2287, 2008.
- [32] Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., Gribble, F.M. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **61** (2), 364–371, 2012.
- [33] Conigrave, A.D., Brown, E.M. Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract II. 1 -Amino acid sensing by calcium-sensing receptors: implications for GI physiology. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **291** (5), G753–G761, 2006.
- [34] Oya, M., Kitaguchi, T., Pais, R., Reimann, F., Gribble, F., Tsuboi, T. The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Journal of Biological Chemistry* **288** (7), 4513–4521, 2013.
- [35] Brighton, C.A., Rievaj, J., Kuhre, R.E., Glass, L.L., Schoonjans, K., Holst, J.J., Gribble, F.M., Reimann, F. Bile Acids Trigger GLP-1 Release Predominantly by Accessing Basolaterally Located G Protein–Coupled Bile Acid Receptors. *Endocrinology* **156** (11), 3961–3970, 2015.
- [36] Chimere, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., Reimann, F. Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Reports* **9** (4), 1202–8, 2014.
- [37] Harada, K., Sada, S., Sakaguchi, H., Takizawa, M., Ishida, R., Tsuboi, T. Bacterial metabolite S-equol modulates glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine L cell line GLUTag cells via actin polymerization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **501** (4), 1009–1015, 2018.
- [38] Anini, Y., Hansotia, T., Brubaker, P.L. Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* **143** (6), 2420–2426,

- 2002.
- [39] Dumoulin, V., Dakka, T., Plaisancie, P., Chayvialle, J.A., Cuber, J.C. Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* **136** (11), 5182–8, 1995.
- [40] Hansen, L., Hartmann, B., Mineo, H., Holst, J.J. Glucagon-like peptide-1 secretion is influenced by perfusate glucose concentration and by a feedback mechanism involving somatostatin in isolated perfused porcine ileum. *Regulatory Peptides* **118** (1–2), 11–8, 2004.
- [41] Ripken, D., van der Wielen, N., Wortelboer, H.M., Meijerink, J., Witkamp, R.F., Hendriks, H.F.J. Nutrient-induced glucagon like peptide-1 release is modulated by serotonin. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **32**, 142–50, 2016.
- [42] Sato, T., Hayashi, H., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. Glucocorticoids decrease the production of glucagon-like peptide-1 at the transcriptional level in intestinal L-cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **406**, 60–67, 2015.
- [43] Claustre, J., Brechet, S., Plaisancie, P., Chayvialle, J.A., Cuber, J.C. Stimulatory effect of beta-adrenergic agonists on ileal L cell secretion and modulation by a-adrenergic activation. *Journal of Endocrinology* **162** (2), 271–278, 1999.
- [44] Harada, K., Kitaguchi, T., Tsuboi, T. Integrative function of adrenaline receptors for glucagon-like peptide-1 exocytosis in enteroendocrine L cell line GLUTag. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460** (4), 1053–1058, 2015.
- [45] Shcherbakova, D.M., Shemetov, A.A., Kaberniuk, A.A., Verkhusha, V. V. Natural Photoreceptors as a Source of Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools. *Annual Review of Biochemistry* **84** (1), 519–550, 2015.
- [46] Cali, C., Marchaland, J., Spagnuolo, P., Gremion, J., Bezzi, P. Regulated exocytosis from astrocytes physiological and pathological related aspects. *International Review of Neurobiology* **85**, 261–293, 2009.
- [47] Shimomura, O., Musicki, B., Kishi, Y., Inouye, S. Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. *Cell Calcium* **14** (5), 373–8, 1993.
- [48] Burnier, M., Centeno, G., Burki, E., Brunner, H.R. Confocal microscopy to analyze cytosolic and nuclear calcium in cultured vascular cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **266** (4), C1118–C1127, 1994.
- [49] Sasakura, K., Hanaoka, K., Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., Nagano, T. Development of a Highly Selective Fluorescence Probe for Hydrogen Sulfide. *Journal of the American Chemical Society* **133** (45), 18003–18005, 2011.
- [50] Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* **70** (13), 2446–2453, 1998.

- [51] Hirase, H., Qian, L., Barthó, P., Buzsáki, G. Calcium Dynamics of Cortical Astrocytic Networks In Vivo. *PLoS Biology* **2** (4), e96, 2004.
- [52] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263** (5148), 802–805, 1994.
- [53] Day, R.N., Davidson, M.W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews* **38** (10), 2887, 2009.
- [54] Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., Tsien, R.Y. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388** (6645), 882–887, 1997.
- [55] Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., Lohse, M.J. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *Journal of Biological Chemistry* **279** (36), 37215–37218, 2004.
- [56] Honda, A., Adams, S.R., Sawyer, C.L., Lev-Ram, V., Tsien, R.Y., Dostmann, W.R. Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (5), 2437–2442, 2001.
- [57] Imamura, H., Huynh, K.P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-yamada, Y. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (37), 15651–15656, 2009.
- [58] Mächler, P., Wyss, M.T., Elsayed, M., Stobart, J., Gutierrez, R., von Faber-Castell, A., Kaelin, V., Zuend, M., San Martín, A., Romero-Gómez, I., Baeza-Lehnert, F., Lengacher, S., Schneider, B.L., Aebischer, P., Magistretti, P.J., Barros, L.F., Weber, B. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metabolism* **23** (1), 94–102, 2016.
- [59] Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (20), 11241–11246, 1999.
- [60] Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K. A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **19** (2), 137–141, 2001.
- [61] Nagai, T., Sawano, A., Park, E.S., Miyawaki, A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (6), 3197–202, 2001.
- [62] Kitaguchi, T., Oya, M., Wada, Y., Tsuboi, T., Miyawaki, A. Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells. *Biochemical Journal* **450** (2), 365–373, 2013.
- [63] Nausch, L.W.M., Ledoux, J., Boney, A.D., Nelson, M.T., Dostmann, W.R. Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (1),

- 365–70, 2008.
- [64] Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y.-F., Nakano, M., Abdelfattah, A.S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., Campbell, R.E. An expanded palette of genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators. *Science* **333** (6051), 1888–91, 2011.
- [65] Arai, S., Kriszt, R., Harada, K., Looi, L.-S., Matsuda, S., Wongso, D., Suo, S., Ishiura, S., Tseng, Y.-H., Raghunath, M., Ito, T., Tsuboi, T., Kitaguchi, T. RGB-Color Intensiometric Indicators to Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP in Single Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **57** (34), 10873–10878, 2018.
- [66] Ravier, M.A., Tsuboi, T., Rutter, G.A. Imaging a target of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling: Dense core granule exocytosis viewed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods* **46** (3), 233–238, 2008.
- [67] Steyer, J.A., Horstmann, H., Almers, W. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* **388** (6641), 474–478, 1997.
- [68] Tsuboi, T., Zhao, C., Terakawa, S., Rutter, G.A. Simultaneous evanescent wave imaging of insulin vesicle membrane and cargo during a single exocytotic event. *Current Biology* **10** (20), 1307–1310, 2000.
- [69] Vale, R.D., Funatsu, T., Pierce, D.W., Romberg, L., Harada, Y., Yanagida, T. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380** (6573), 451–453, 1996.
- [70] Ishijima, A., Kojima, H., Funatsu, T., Tokunaga, M., Higuchi, H., Tanaka, H., Yanagida, T. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell* **92** (2), 161–171, 1998.
- [71] Park, H., Li, Y., Tsien, R.W. Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode. *Science* **335** (6074), 1362–1366, 2012.
- [72] Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., Chun, J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual Review of Biochemistry* **73** 321–354, 2004.
- [73] Pan, C.Y., Wu, A.Z., Chen, Y.T. Lysophospholipids regulate excitability and exocytosis in cultured bovine chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry* **102** (3), 944–956, 2007.
- [74] Monet, M., Gkika, D., Lehen'kyi, V., Pourtier, A., Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Juvin, V., Rassendren, F., Humez, S., Prevarsakaya, N. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1793** (3), 528–539, 2009.
- [75] Bondarenko, A.I., Malli, R., Graier, W.F. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol directly activates intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology* **462** (2), 245–255, 2011.
- [76] AlSuleimani, Y.M., Hiley, C.R. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol relaxes rat mesenteric resistance artery and induces  $\text{Ca}^{2+}$  release in rat mesenteric artery endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* **172** (12), 3043–3057, 2015.

- [77] Metz, S.A. Lysophosphatidylinositol, but not lysophosphatidic acid, stimulates insulin release. A possible role for phospholipase A2 but not *de novo* synthesis of lysophospholipid in pancreatic islet function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **138** (2), 720–727, 1986.
- [78] Metz, S.A. Mobilization of Cellular Ca<sup>2+</sup> by Lysophospholipids in Rat Islets of Langerhans. *Biochimica et Biophysica Acta* **968** (2), 239–252, 1988.
- [79] Ma, M.T., Yeo, J.F., Farooqui, A.A., Zhang, J., Chen, P., Ong, W.Y. Differential effects of lysophospholipids on exocytosis in rat PC12 cells. *Journal of Neural Transmission* **117** (3), 301–308, 2010.
- [80] Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362** (4), 928–934, 2007.
- [81] Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Geasley, P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology* **152** (7), 1092–1101, 2007.
- [82] Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., Mackie, K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (7), 2699–704, 2008.
- [83] Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Ford, L.A., Ross, R.A., Waldhoer, M., Irving, A.J. The GPR55 ligand L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling and NFAT activation. *FASEB Journal* **23** (1), 183–193, 2009.
- [84] Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Schroder, R., Kargl, J.K., Platzer, W., Martini, L., Arthur, S., Penman, J., Whistler, J.L., Kostenis, E., Waldhoer, M., Irving, A.J. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *British Journal of Pharmacology* **160** (3), 604–614, 2010.
- [85] Waldeck-Weiermair, M., Zoratti, C., Osibow, K., Balenga, N., Goessnitzer, E., Waldhoer, M., Malli, R., Graier, W.F. Integrin clustering enables anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *Journal of Cell Science* **121** (10), 1704–1717, 2008.
- [86] Bondarenko, A., Waldeck-Weiermair, M., Naghdi, S., Poteser, M., Malli, R., Graier, W.F. GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* **161** (2), 308–320, 2010.
- [87] Romero-Zerbo, S.Y., Rafacho, A., Diaz-Arteaga, A., Suarez, J., Quesada, I., Imbernon, M., Ross, R.A., Dieguez, C., Rodriguez de Fonseca, F., Nogueiras, R., Nadal, A., Bermudez-Silva, F.J. A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology* **211** (2), 177–185, 2011.
- [88] McKillop, A.M., Moran, B.M., Abdel-Wahab, Y.H.A., Flatt, P.R. Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells,

- isolated pancreatic islets and mice. *British Journal of Pharmacology* **170** (5), 978–90, 2013.
- [89] Meadows, A., Lee, J.H., Wu, C.S., Wei, Q., Pradhan, G., Yafi, M., Lu, H.C., Sun, Y. Deletion of G-protein-coupled receptor 55 promotes obesity by reducing physical activity. *International Journal of Obesity* **40** (3), 417–424, 2015.
- [90] Moreno-Navarrete, J.M., Catalan, V., Whyte, L., Diaz-Arteaga, A., Vazquez-Martinez, R., Rotellar, F., Guzman, R., Gomez-Ambrosi, J., Pulido, M.R., Russell, W.R., Imbernon, M., Ross, R.A., Malagon, M.M., Dieguez, C., Fernandez-Real, J.M., Fruhbeck, G., Nogueiras, R. The L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* **61** (2), 281–291, 2012.
- [91] Imbernon, M., Whyte, L., Diaz-Arteaga, A., Russell, W.R., Moreno, N.R., Vazquez, M.J., Gonzalez, C.R., Diaz-Ruiz, A., Lopez, M., Malagon, M.M., Ross, R.A., Dieguez, C., Nogueiras, R. Regulation of GPR55 in rat white adipose tissue and serum LPI by nutritional status, gestation, gender and pituitary factors. *Molecular and Cellular Endocrinology* **383** (1–2), 159–169, 2014.
- [92] Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods* **5** (7), 605–607, 2008.
- [93] Suzuki, N., Hajicek, N., Kozasa, T. Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals* **17** (1), 55–70, 2009.
- [94] Kiuchi, T., Higuchi, M., Takamura, A., Maruoka, M., Watanabe, N. Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes. *Nature Methods* **12** (8), 743–746, 2015.
- [95] Kuipers, D., Mehonic, A., Kajita, M., Peter, L., Fujita, Y., Duke, T., Charras, G., Gale, J.E. Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *Journal of Cell Science* **127** (6), 1229–1241, 2014.
- [96] Vriens, J., Appendino, G., Nilius, B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Molecular Pharmacology* **75** (6), 1262–1279, 2009.
- [97] Gettys, T.W., Ramkumar, V., Surwit, R.S., Taylor, I.L. Tissue-specific alterations in G protein expression in genetic versus diet-induced models of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the mouse. *Metabolism: Clinical and Experimental* **44** (6), 771–778, 1995.
- [98] Matsuda, N., Hattori, Y., Gando, S., Watanuki, S., Kemmotsu, O., Kanno, M. Differential gene transcriptional regulation of G<sub>i</sub> isoforms and G<sub>s</sub> protein expression in diabetic rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **361** (1), 53–60, 2000.
- [99] Martin, N.P., Whalen, E.J., Zamah, M.A., Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J. PKA-mediated phosphorylation of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor promotes G<sub>s</sub>/G<sub>i</sub> switching. *Cellular Signalling* **16** (12), 1397–1403, 2004.
- [100] Cruciani, R.A., Dvorkin, B., Morris, S.A., Crain, S.M., Makman, M.H. Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11

- neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90** (7), 3019–3023, 1993.
- [101] Lawler, O.A., Miggin, S.M., Kinsella, B.T. Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G<sub>s</sub>-, to G<sub>i</sub>-, and to G<sub>q</sub>-coupled effector signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **276** (36), 33596–33607, 2001.
- [102] Hou, J.C., Shigematsu, S., Crawford, H.C., Anastasiadis, P.Z., Pessin, J.E. Dual regulation of Rho and Rac by p120 catenin controls adipocyte plasma membrane trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **281** (33), 23307–23312, 2006.
- [103] Chun, K.-H., Araki, K., Jee, Y., Lee, D.-H., Oh, B.-C., Huang, H., Park, K.S., Lee, S.W., Zabolotny, J.M., Kim, Y.-B. Regulation of glucose transport by ROCK1 differs from that of ROCK2 and is controlled by actin polymerization. *Endocrinology* **153** (4), 1649–1662, 2012.
- [104] Tsuchiya, A., Kanno, T., Shimizu, T., Tanaka, A., Nishizaki, T. Rac1 and ROCK are implicated in the cell surface delivery of GLUT4 under the control of the insulin signal mimetic diDCP-LA-PE. *Journal of Pharmacological Sciences* **128** (4), 179–184, 2015.
- [105] Nagasawa, M., Kojima, I. Translocation of calcium-permeable TRPV2 channel to the podosome: Its role in the regulation of podosome assembly. *Cell Calcium* **51** (2), 186–193, 2012.
- [106] Aoyagi, K., Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Nakamichi, Y., Nagamatsu, S. Insulin/phosphoinositide 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first-phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochemical Journal* **432** (2), 375–386, 2010.
- [107] Hisanaga, E., Nagasawa, M., Ueki, K., Kulkarni, R.N., Mori, M., Kojima, I. Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* **58** (1), 174–184, 2009.
- [108] Nagasawa, M., Kojima, I. Translocation of TRPV2 channel induced by focal administration of mechanical stress. *Physiological Reports* **3** (2), e12296, 2015.
- [109] Nagasawa, M., Nakagawa, Y., Tanaka, S., Kojima, I. Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *Journal of Cellular Physiology* **210** (3), 692–702, 2007.
- [110] Reichhart, N., Keckeis, S., Fried, F., Fels, G., Strauss, O. Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **253** (6), 865–874, 2015.
- [111] Nieto-Posadas, A., Picazo-Juarez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lazaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D., Rosenbaum, T. Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature Chemical Biology* **8** (1), 78–85, 2012.
- [112] Andersson, D.A., Nash, M., Bevan, S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Neuroscience* **27** (12), 3347–



- 3355, 2007.
- [113] Vanden Abeele, F., Zholos, A., Bidaux, G., Shuba, Y., Thebault, S., Beck, B., Flourakis, M., Panchin, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N.  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase A2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids. *Journal of Biological Chemistry* **281** (52), 40174–40182, 2006.
- [114] Nakajima, A., Ishihara, S., Imoto, D., Sawai, S. Rectified directional sensing in long-range cell migration. *Nature Communications* **5** (1), 5367, 2014.
- [115] Tolhurst, G., Zheng, Y., Parker, H.E., Habib, A.M., Reimann, F., Gribble, F.M. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and cAMP. *Endocrinology* **152** (2), 405–413, 2011.
- [116] Kandel, E.R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EB. *Molecular Brain* **5** (14), 1–12, 2012.
- [117] Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L., Jalink, K. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Reports* **5** (12), 1176–1180, 2004.
- [118] DiPilato, L.M., Cheng, X., Zhang, J. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (47), 16513–16518, 2004.
- [119] Iancu, R. V, Ramamurthy, G., Warriar, S., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Jones, S.W., Harvey, R.D. Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **295** (2), C414–C422, 2008.
- [120] Odaka, H., Arai, S., Inoue, T., Kitaguchi, T. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS One* **9** (6), e100252, 2014.
- [121] Stierl, M., Stumpf, P., Udvari, D., Gueta, R., Hagedorn, R., Losi, A., Gärtner, W., Petereit, L., Efetova, M., Schwarzel, M., Oertner, T.G., Nagel, G., Hegemann, P. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *The Journal of Biological Chemistry* **286** (2), 1181–1188, 2011.
- [122] Ghosh, I., Hamilton, A.D., Regan, L. Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society* **122** (23), 5658–5659, 2000.
- [123] Gao, J., Liao, J., Yang, G.-Y. CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis. *American Journal of Translational Research* **1** (3), 312–325, 2009.
- [124] Tsuboi, T., Rutter, G.A. Multiple forms of “kiss-and-run” exocytosis revealed by evanescent wave microscopy. *Current Biology* **13** (7), 563–567, 2003.
- [125] Brenner, M., Kisseberth, W., Su, Y., Besnard, F., Messing, A. GFAP promoter directs

- astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci.* **14** (3), 1030–1037, 1994.
- [126] Konno, A., Shuvaev, A.N., Miyake, N., Miyake, K., Iizuka, A., Matsuura, S., Huda, F., Nakamura, K., Yanagi, S., Shimada, T., Hirai, H. Mutant ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar Purkinje cells. *Cerebellum* **13** (1), 29–41, 2014.
- [127] Huda, F., Konno, A., Matsuzaki, Y., Goenawan, H., Miyake, K., Shimada, T., Hirai, H. Distinct transduction profiles in the CNS via three injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* **1**, 14032, 2014.
- [128] Miyake, K., Miyake, N., Yamazaki, Y., Shimada, T., Hirai, Y. Serotype-independent Method of Recombinant Adeno-associated Virus (AAV) Vector Production and Purification. *Journal of Nippon Medical School* **79** (6), 394–402, 2012.
- [129] Berg, J., Hung, Y.P., Yellen, G. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nature Methods* **6** (2), 161–166, 2009.
- [130] Matsuda, S., Harada, K., Ito, M., Takizawa, M., Wongso, D., Tsuboi, T., Kitaguchi, T. Generation of a cGMP Indicator with an Expanded Dynamic Range by Optimization of Amino Acid Linkers between a Fluorescent Protein and PDE5a. *ACS Sensors* **2** (1), 46–51, 2017.
- [131] Marvin, J.S., Borghuis, B.G., Tian, L., Cichon, J., Harnett, M.T., Akerboom, J., Gordus, A., Renninger, S.L., Chen, T.W., Bargmann, C.I., Orger, M.B., Schreiter, E.R., Demb, J.B., Gan, W.B., Hires, S.A., Looger, L.L. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nature Methods* **10** (2), 162–170, 2013.
- [132] Minami, K., Yano, H., Miki, T., Nagashima, K., Wang, C.Z., Tanaka, H., Miyazaki, J.I., Seino, S. Insulin secretion and differential gene expression in glucose-responsive and -unresponsive MIN6 sublines. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **279** (4), E773–E781, 2000.
- [133] Dyachok, O., Isakov, Y., Sagetorp, J., Tengholm, A. Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin-secreting beta-cells. *Nature* **439** (7074), 349–352, 2006.
- [134] McTaggart, J.S., Clark, R.H., Ashcroft, F.M. The role of the  $K_{ATP}$  channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *The Journal of Physiology* **588** (Pt 17), 3201–3209, 2010.
- [135] Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., Tsien, R.Y. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods* **5** (6), 545–551, 2008.
- [136] Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S., Tsien, R.Y. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349** (6311), 694–697, 1991.
- [137] Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M.J., Engelhardt, S. Cyclic AMP Imaging in Adult Cardiac Myocytes Reveals Far-Reaching  $\beta_1$ -Adrenergic but Locally Confined  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor-Mediated Signaling. *Circulation Research* **99** (10), 1084–1091, 2006.

- [138] Violin, J.D., DiPilato, L.M., Yildirim, N., Elston, T.C., Zhang, J., Lefkowitz, R.J.  $\beta_2$ -adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *The Journal of Biological Chemistry* **283** (5), 2949–2961, 2008.
- [139] Mukherjee, S., Jansen, V., Jikeli, J.F., Hamzeh, H., Alvarez, L., Dombrowski, M., Balbach, M., Strünker, T., Seifert, R., Kaupp, U.B., Wachten, D., Darszon, A., Visconti, P., Moss, S. A novel biosensor to study cAMP dynamics in cilia and flagella. *ELife* **5**, 5071–5075, 2016.
- [140] Nikolaev, V.O., Gambaryan, S., Lohse, M.J. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nature Methods* **3** (1), 23–25, 2006.
- [141] Bhargava, Y., Hampden-Smith, K., Chachlaki, K., Wood, K.C., Vernon, J., Allerston, C.K., Batchelor, A.M., Garthwaite, J. Improved genetically-encoded, FlincG-type fluorescent biosensors for neural cGMP imaging. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **6** 26, 2013.
- [142] Niino, Y., Hotta, K., Oka, K. Simultaneous live cell imaging using dual FRET sensors with a single excitation light. *PloS One* **4** (6), e6036, 2009.
- [143] Ohta, Y., Furuta, T., Nagai, T., Horikawa, K. Red fluorescent cAMP indicator with increased affinity and expanded dynamic range. *Scientific Reports* **8** (1), 1866, 2018.
- [144] Pinton, P., Tsuboi, T., Ainscow, E.K., Pozzan, T., Rizzuto, R., Rutter, G.A. Dynamics of glucose-induced membrane recruitment of protein kinase C  $\beta$  II in living pancreatic islet  $\beta$ -cells. *The Journal of Biological Chemistry* **277** (40), 37702–37710, 2002.
- [145] Landa, L.R., Harbeck, M., Kaihara, K., Chepurny, O., Kitiphongspattana, K., Graf, O., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Holz, G.G., Roe, M.W. Interplay of  $\text{Ca}^{2+}$  and cAMP Signaling in the Insulin-secreting MIN6  $\beta$ -Cell Line. *Journal of Biological Chemistry* **280** (35), 31294–31302, 2005.
- [146] Wang, P., Yan, Z., Zhong, J., Chen, J., Ni, Y., Li, L., Ma, L., Zhao, Z., Liu, D., Zhu, Z. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Activation Enhances Gut Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Improves Glucose Homeostasis. *Diabetes* **61** (8), 2155–2165, 2012.
- [147] Natochin, Y. V., Kutina, A. V., Marina, A.S., Shakhmatova, E.I. Stimulus for Glucagon-Like Peptide 1 Secretion in Rats. *Doklady Biological Sciences* **479** (1), 57–59, 2018.
- [148] Yue, X., Liang, J., Gu, F., Du, D., Chen, F. Berberine activates bitter taste responses of enteroendocrine STC-1 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **447** (1–2), 21–32, 2018.
- [149] Kim, K.-S., Egan, J.M., Jang, H.-J. Denatonium induces secretion of glucagon-like peptide-1 through activation of bitter taste receptor pathways. *Diabetologia* **57** (10), 2117–2125, 2014.
- [150] Masuho, I., Tateyama, M., Saitoh, O. Characterization of Bitter Taste Responses of Intestinal STC-1 Cells. *Chemical Senses* **30** (4), 281–290, 2005.
- [151] Rozengurt, E. Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and  $\alpha$ -gustducin in the mammalian gut. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **291** (2), G171–G177, 2006.
- [152] Pham, H., Hui, H., Morvaridi, S., Cai, J., Zhang, S., Tan, J., Wu, V., Levin, N., Knudsen, B., Goddard, W.A., Pandol, S.J., Abrol, R. A bitter pill for type 2 diabetes? The activation of bitter

- taste receptor TAS2R38 can stimulate GLP-1 release from enteroendocrine L-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **475** (3), 295–300, 2016.
- [153] Heybach, J.P., Boyle, P.C. Dietary quinine reduces body weight and food intake independent of aversive taste. *Physiology and Behavior* **29** (6), 1171–1173, 1982.
- [154] Cettour-Rose, P., Bezençon, C., Darimont, C., Le Coutre, J., Damak, S. Quinine controls body weight gain without affecting food intake in male C57BL6 mice. *BMC Physiology* **13** (1), 5, 2013.
- [155] Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G., Behrens, M. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical Senses* **35** (2), 157–170, 2009.
- [156] Go, Y., Satta, Y., Takenaka, O., Takahata, N. Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* **170** (1), 313–326, 2005.
- [157] Gribble, F.M., Davis, T.M.E., Higham, C.E., Clark, A., Ashcroft, F.M. The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels. *British Journal of Pharmacology* **131** (4), 756–760, 2000.
- [158] Colella, M., Gerbino, A., Hofer, A.M., Curci, S. Recent advances in understanding the extracellular calcium-sensing receptor. *F1000Research* **5**, 2535, 2016.
- [159] Talavera, K., Yasumatsu, K., Yoshida, R., Margolskee, R.F., Voets, T., Ninomiya, Y., Nilius, B. The taste transduction channel TRPM5 is a locus for bitter-sweet taste interactions. *FASEB Journal* **22** (5), 1343–1355, 2008.
- [160] Kuhre, R.E., Wewer Albrechtsen, N.J., Deacon, C.F., Balk-Møller, E., Rehfeld, J.F., Reimann, F., Gribble, F.M., Holst, J.J. Peptide production and secretion in GLUTag, NCI-H716, and STC-1 cells: a comparison to native L-cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **56** (3), 201–211, 2016.
- [161] Porat-Shliom, N., Milberg, O., Masedunskas, A., Weigert, R. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70** (12), 2099–2121, 2013.
- [162] Gutiérrez, L.M. New Insights into the Role of the Cortical Cytoskeleton in Exocytosis from Neuroendocrine Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology* **295**, 109–137, 2012.
- [163] Sabbatini, M.E., Bi, Y., Ji, B., Ernst, S.A., Williams, J.A. CCK activates RhoA and Rac1 differentially through Ga13 and Gaq in mouse pancreatic acini. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **298** (3), C592–C601, 2010.
- [164] Shibutani, Y., Asahara, S.I., Teruyama, K., Inoue, H., Matsuda, T., Seino, S., Kido, Y. Constitutive activation of rac1 in pancreatic  $\beta$  cells facilitates f-actin depolymerization but exerts no influence on the increase of pancreatic  $\beta$  cell mass and facilitation of insulin secretion. *Kobe Journal of Medical Sciences* **59** (3), 72–80, 2013.
- [165] Asahara, S., Shibutani, Y., Teruyama, K., Inoue, H.Y., Kawada, Y., Etoh, H., Matsuda, T.,

- Kimura-Koyanagi, M., Hashimoto, N., Sakahara, M., Fujimoto, W., Takahashi, H., Ueda, S., Hosooka, T., Satoh, T., Inoue, H., Matsumoto, M., Aiba, A., Kasuga, M., Kido, Y. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin. *Diabetologia* **56** (5), 1088–1097, 2013.
- [166] Sidhu, C., Jaggupilli, A., Chelikani, P., Bhullar, R.P. Regulation of Rac1 GTPase activity by quinine through G-protein and bitter taste receptor T2R4. *Molecular and Cellular Biochemistry* **426** (1–2), 129–136, 2017.
- [167] Bouley, R., Pastor-Soler, N., Cohen, O., McLaughlin, M., Breton, S., Brown, D. Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **288** (6), F1103–F1112, 2005.
- [168] Guy, A.T., Nagatsuka, Y., Ooashi, N., Inoue, M., Nakata, A., Greimel, P., Inoue, A., Nabetani, T., Murayama, A., Ohta, K., Ito, Y., Aoki, J., Hirabayashi, Y., Kamiguchi, H. Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science* **349** (6251), 974–977, 2015.
- [169] Kumar, M., Hsiao, K., Vidugiriene, J., Goueli, S.A. A Bioluminescent-Based, HTS-Compatible Assay to Monitor G-Protein-Coupled Receptor Modulation of Cellular Cyclic AMP. *ASSAY and Drug Development Technologies* **5** (2), 237–246, 2007.
- [170] Chimere, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., Reimann, F. Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells. *Cell Reports* **9** (4), 1202–1208, 2014.
- [171] Wang, Y., Yamamoto, S., Miyakawa, A., Sakurai, T., Ibaraki, K., Terakawa, S. Intravital oxygen radical imaging in normal and ischemic rat cortex. *Neurosurgery* **67** (1), 118–127, 2010.
- [172] Sato, M., Motegi, Y., Yagi, S., Gengyo-ando, K., Ohkura, M., Nakai, J. Fast varifocal two-photon microendoscope for imaging neuronal activity in the deep brain. *Biomedical Optics Express* **8** (9), 4049, 2017.
- [173] McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., Miller, M.J. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103<sup>+</sup> dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483** (7389), 345–349, 2012.
- [174] Mizuno, R., Kamioka, Y., Kabashima, K., Imajo, M., Sumiyama, K., Nakasho, E., Ito, T., Hamazaki, Y., Okuchi, Y., Sakai, Y., Kiyokawa, E., Matsuda, M. In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines. *The Journal of Experimental Medicine* **211** (6), 1123–1136, 2014.
- [175] Kim, P., Chung, E., Yamashita, H., Hung, K.E., Mizoguchi, A., Kucherlapati, R., Fukumura, D., Jain, R.K., Yun, S.H. In vivo wide-area cellular imaging by side-view endomicroscopy. *Nature Methods* **7** (4), 303–305, 2010.
- [176] Polyak, S., Mach, A., Porvasnik, S., Dixon, L., Conlon, T., Erger, K.E., Acosta, A., Wright,

- A.J., Campbell-Thompson, M., Zolotukhin, I., Wasserfall, C., Mah, C. Identification of adeno-associated viral vectors suitable for intestinal gene delivery and modulation of experimental colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **302** (3), G296–G308, 2012.
- [177] Fosque, B.F., Sun, Y., Dana, H., Yang, C.T., Ohyama, T., Tadross, M.R., Patel, R., Zlatic, M., Kim, D.S., Ahrens, M.B., Jayaraman, V., Looger, L.L., Schreiter, E.R. Labeling of active neural circuits in vivo with designed calcium integrators. *Science* **347** (6223), 755–760, 2015.
- [178] Toiyama, Y., Mizoguchi, A., Okugawa, Y., Koike, Y., Morimoto, Y., Araki, T., Uchida, K., Tanaka, K., Nakashima, H., Hibi, M., Kimura, K., Inoue, Y., Miki, C., Kusunoki, M. Intravital imaging of DSS-induced cecal mucosal damage in GFP-transgenic mice using two-photon microscopy. *Journal of Gastroenterology* **45** (5), 544–553, 2010.
- [179] Ghosh, K.K., Burns, L.D., Cocker, E.D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., Gamal, A. El, Schnitzer, M.J. Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nature Methods* **8** (10), 871–878, 2011.
- [180] Inutsuka, A., Yamashita, A., Chowdhury, S., Nakai, J., Ohkura, M., Taguchi, T., Yamanaka, A. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. *Scientific Reports* **6** (1), 29480, 2016.
- [181] Kasai, K., Fujita, T., Gomi, H., Izumi, T. Docking is not a Prerequisite but a Temporal Constraint for Fusion of Secretory Granules. *Traffic* **9** (7), 1191–1203, 2008.
- [182] Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S.L., Danuser, G. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature Methods* **5** (8), 695–702, 2008.
- [183] Forte, L.A., Gramlich, M.W., Klyachko, V.A. Activity-Dependence of Synaptic Vesicle Dynamics. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **37** (44), 10597–10610, 2017.
- [184] Seino, S., Shibasaki, T., Minami, K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* **121** (6), 2118–25, 2011.
- [185] Akerboom, J., Rivera, J.D.V., Guilbe, M.M.R., Malavé, E.C.A., Hernandez, H.H., Tian, L., Hires, S.A., Marvin, J.S., Looger, L.L., Schreiter, E.R. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *The Journal of Biological Chemistry* **284** (10), 6455–64, 2009.
- [186] Saito, Y., Oikawa, M., Nakazawa, H., Niide, T., Kameda, T., Tsuda, K., Umetsu, M. Machine-Learning-Guided Mutagenesis for Directed Evolution of Fluorescent Proteins. *ACS Synthetic Biology* **7** (9), 2014–2022, 2018.
- [187] Nadler, D.C., Morgan, S.-A., Flamholz, A., Kortright, K.E., Savage, D.F. Rapid construction of metabolite biosensors using domain-insertion profiling. *Nature Communications* **7** (1), 12266, 2016.
- [188] 原田一貴, 坪井貴司. インクレチン分泌制御の分子メカニズム. *実験医学増刊* **35** (2),

- 245–250, 2017.
- [189] Harada, K., Kitaguchi, T., Kamiya, T., Aung, K.H., Nakamura, K., Ohta, K., Tsuboi, T. Lysophosphatidylinositol-induced activation of the cation channel TRPV2 triggers glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine L cells. *Journal of Biological Chemistry* **292** (26), 10855–10864, 2017.
- [190] Harada, K., Ito, M., Wang, X., Tanaka, M., Wongso, D., Konno, A., Hirai, H., Hirase, H., Tsuboi, T., Kitaguchi, T. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Scientific Reports* **7** (1), 7351, 2017.
- [191] Harada, K., Sakaguchi, H., Sada, S., Ishida, R., Hayasaka, Y., Tsuboi, T. Bitter tastant quinine modulates glucagon-like peptide-1 exocytosis from clonal GLUTag enteroendocrine L cells via actin reorganization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **500** (3), 723–730, 2018.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、実験計画から論文執筆に至るまで多大なご指導ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系坪井貴司教授に深く感謝申し上げます。

プラスミド設計をはじめとする実験や論文執筆にあたり、終始ご協力いただいた、東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所北口哲也准教授に、この場を借りて感謝申し上げます。

分光蛍光光度計の使用を快く承諾してくださり、実験室の中でも外でも親しく接してくださった、東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系吉本敬太郎准教授、また吉本研究室の皆様にご感謝申し上げます。

マウス急性単離小腸を用いた測定をはじめ、多くの動物実験でご指導を賜りました、国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部中村和昭室長および Kyaw Htet Aung 博士に、この場を借りて感謝申し上げます。

cAMP 可視化センサー Pink Flamindo のアデノ随伴ウイルス作製は、群馬大学大学院医学系研究科脳神経再生医学分野 平井宏和教授および今野歩講師にご協力いただきました。また Pink Flamindo を用いた *in vivo* 二光子顕微鏡イメージングは、理化学研究所脳神経科学研究センター神経グリア回路研究チーム平瀬肇チームリーダー、Wang Xiaowen 氏、田中三佳博士にご協力いただきました。ここに感謝申し上げます。

本研究で使用した GLUTag 細胞は、Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute の Daniel Drucker 教授よりご供与いただきました。また MIN6 m9 細胞は、神戸大学大学院医学研究科分子代謝医学部門生理学・細胞生物学講座清野進特命教授よりご供与いただきました。ここに感謝申し上げます。

Lifact-EGFP プラスミドは、Münster 大学 Roland Wedlich-Söldner 教授よりご供与いただきました。ここに感謝申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員奨励費（16J06838）の助成のもと行われました。

最後に、博士課程修了に至るまで経済的な後ろ盾であった家族と、研究を続けていくにあたり精神的な支柱であり続けた坪井研究室の皆様、そして実験に使用した多くの生物たちに感謝申し上げます。



図表

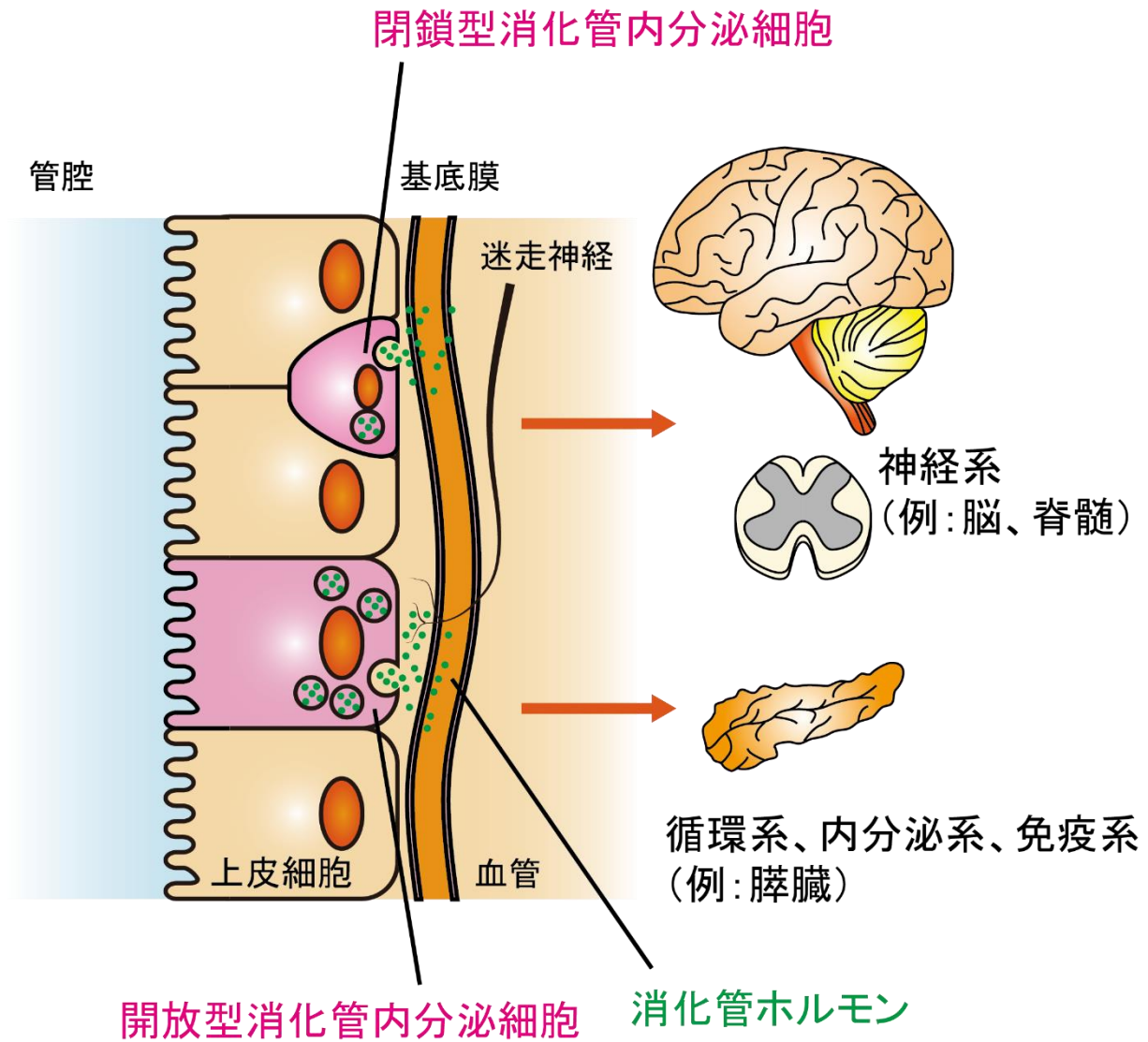


図1 消化管ホルモンによる全身の恒常性制御

消化管内分泌細胞は消化管内壁の上皮細胞中に少数分布し、開放型細胞と閉鎖型細胞が存在する。分泌された消化管ホルモンは血中に取り込まれるほか、近位の細胞や迷走神経にパラクリン様式でも作用する。これにより、蠕動運動や嘔吐反射をはじめとする神経応答に加え、膵臓など循環系、内分泌系、免疫系の器官における生理機能も制御されている。

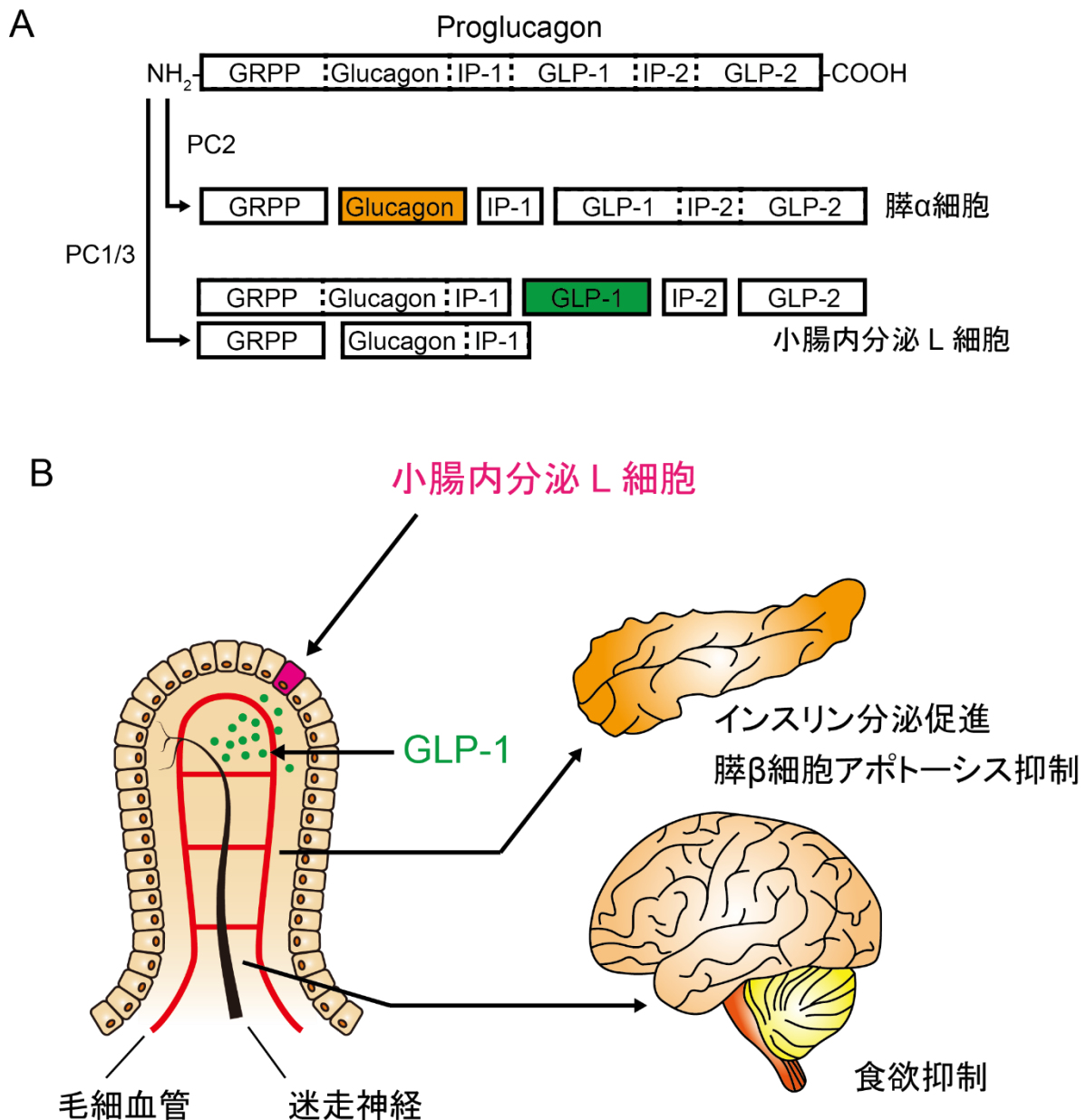


図2 小腸内分泌L細胞とGLP-1の生理機能

- (A) グルカゴン遺伝子から転写・翻訳されたプログルカゴンタンパク質が、プロセッシングを受ける過程の模式図。膵α細胞と小腸内分泌L細胞では異なるプロホルモンコンバーターゼ (prohormone convertase: PC) が発現しており、膵α細胞ではPC2によりグルカゴンが、小腸内分泌L細胞ではPC1/3によりGLP-1が産生される。GRPP: glicentin-related pancreatic polypeptide, IP: intervening peptide, GLP-2: glucagon-like peptide-2。
- (B) 小腸内分泌L細胞の生理機能。小腸内分泌L細胞は主として小腸下部に局在し、血管や迷走神経に面した基底部からGLP-1を分泌する。分泌されたGLP-1は、血中をめぐって膵β細胞に作用し、グルコース依存的に起こるインスリン分泌を増強するほか、アポトーシスを抑制する。また、迷走神経への作用を通じて食欲を抑制する。

原田一貴, 坪井貴司. インクレチン分泌制御の分子メカニズム. 実験医学増刊 35(2), 245–250, 2017. [188]より改変。

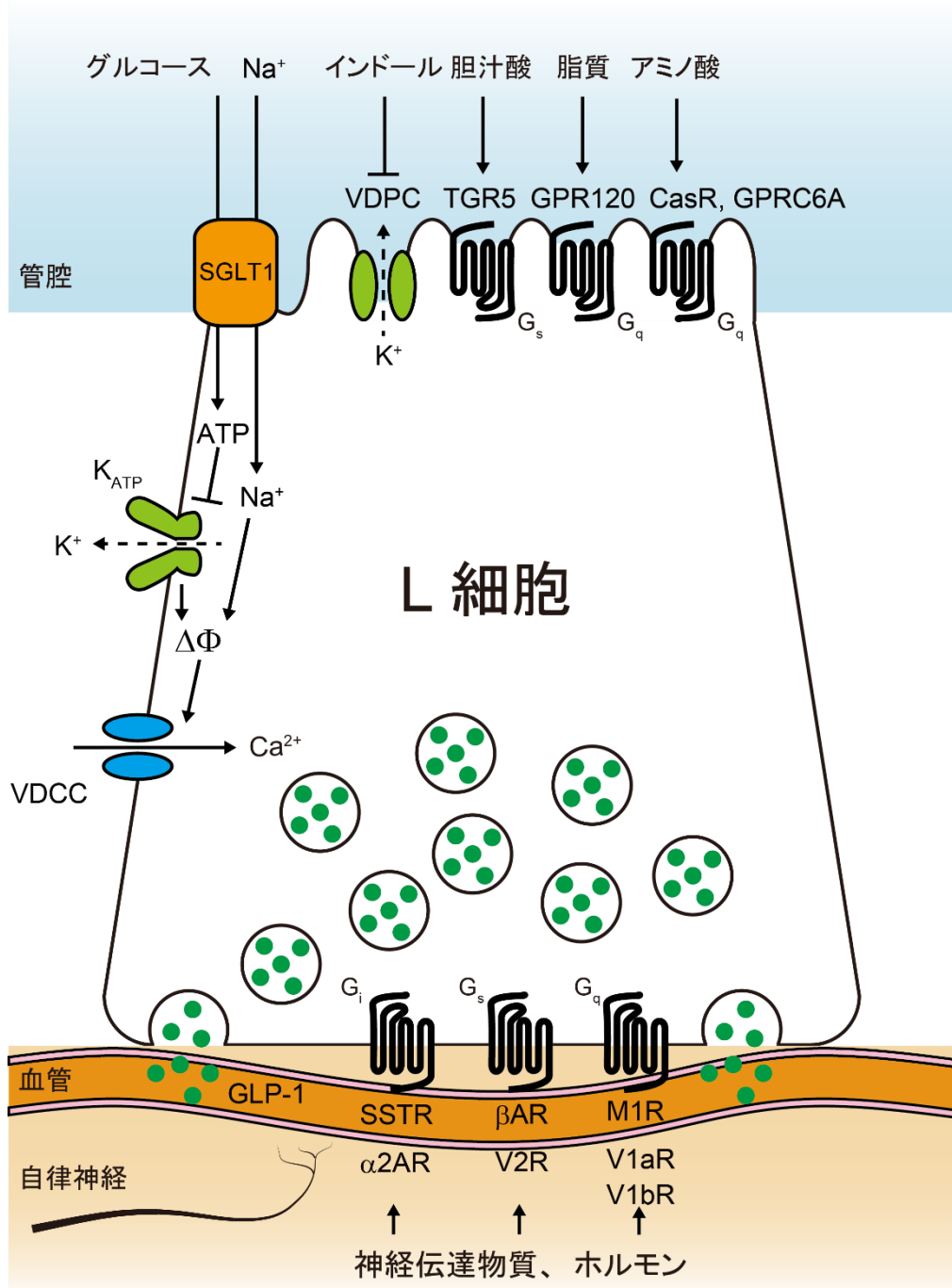


図3 小腸内分泌L細胞からのGLP-1分泌制御機構

小腸内分泌L細胞には様々な受容体、トランスポーター、チャネルが発現しており、管腔内に存在する食餌由来成分や腸内細菌代謝産物、血中や神経由来の生理活性物質を感知し、GLP-1分泌を制御している。VDCC: voltage-dependent calcium channel (電位依存性カルシウムチャネル), VDPC: voltage-dependent potassium channel (電位依存性カリウムチャネル), α<sub>2</sub>/βAR: α<sub>2</sub>/β adrenergic receptor (α<sub>2</sub>/β アドレナリン受容体), M1R: muscarinic receptor 1 (1型ムスカリン型アセチルコリン受容体), SSTR: somatostatin receptor (ソマトスタチン受容体), V1a/V1b/V2R: vasopressin receptor 1a/1b/2 (バソプレシン V1a/b/2型受容体), ΔΦ: 脱分極。

文献[188]より改変。

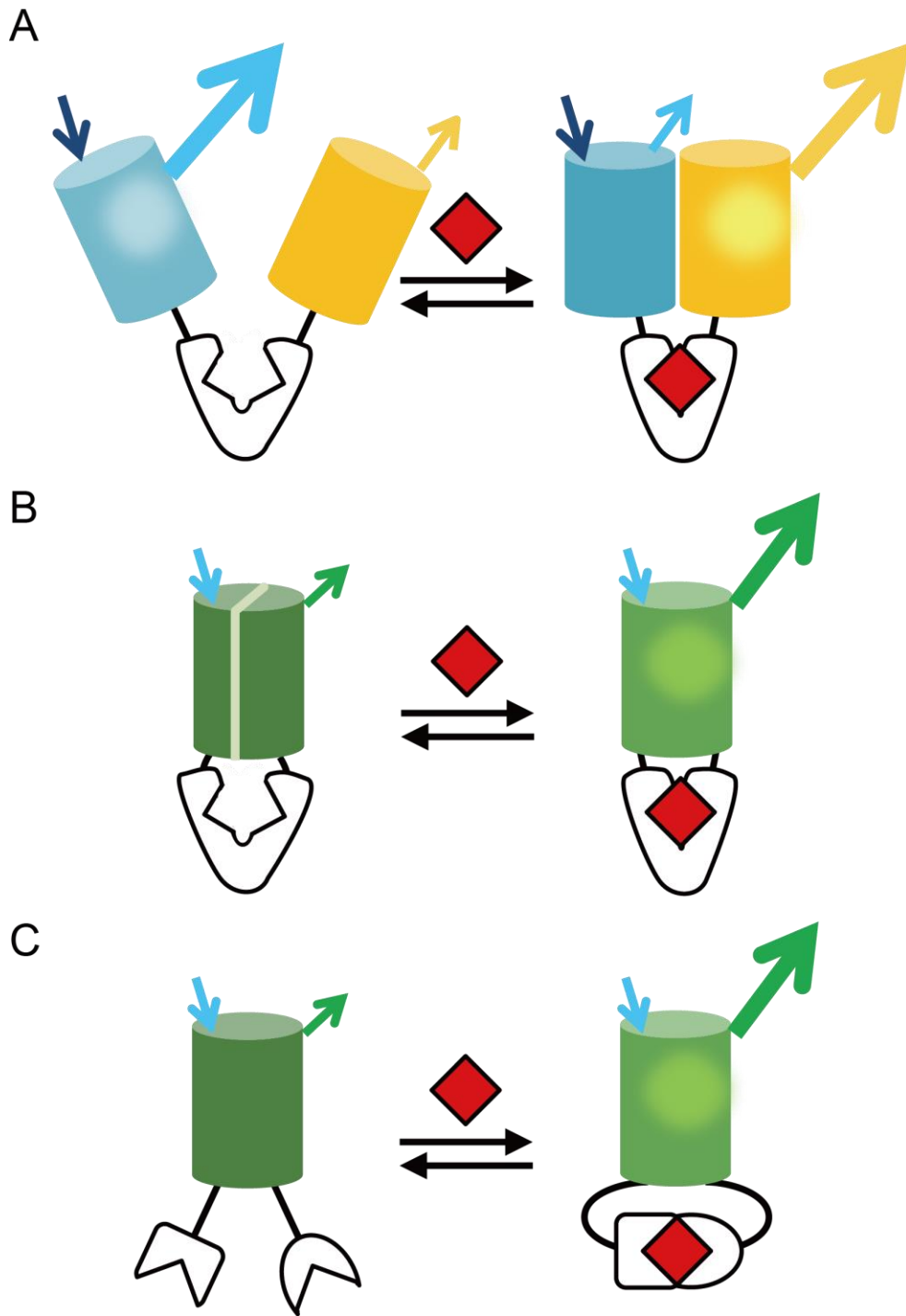


図4 蛍光タンパク質を用いた分子センサーの模式図

- (A) FRET 型センサー。標的分子が 2 つの蛍光タンパク質の間の結合ドメインに結合すると、FRET 現象が起こるまたは解消されて 2 つの蛍光強度の比が変化する。
- (B) 単色輝度変化型センサーのうち挿入型センサー。発色団付近で分割した 1 つの蛍光タンパク質の間に結合ドメインが融合され、標的分子が結合すると蛍光強度が変化する。
- (C) 単色輝度変化型センサーのうち円順列変異型センサー。発色団付近で円順列変異を加えた 1 つのタンパク質の末端に結合ドメインが融合され、標的分子が結合すると蛍光強度が変化する。

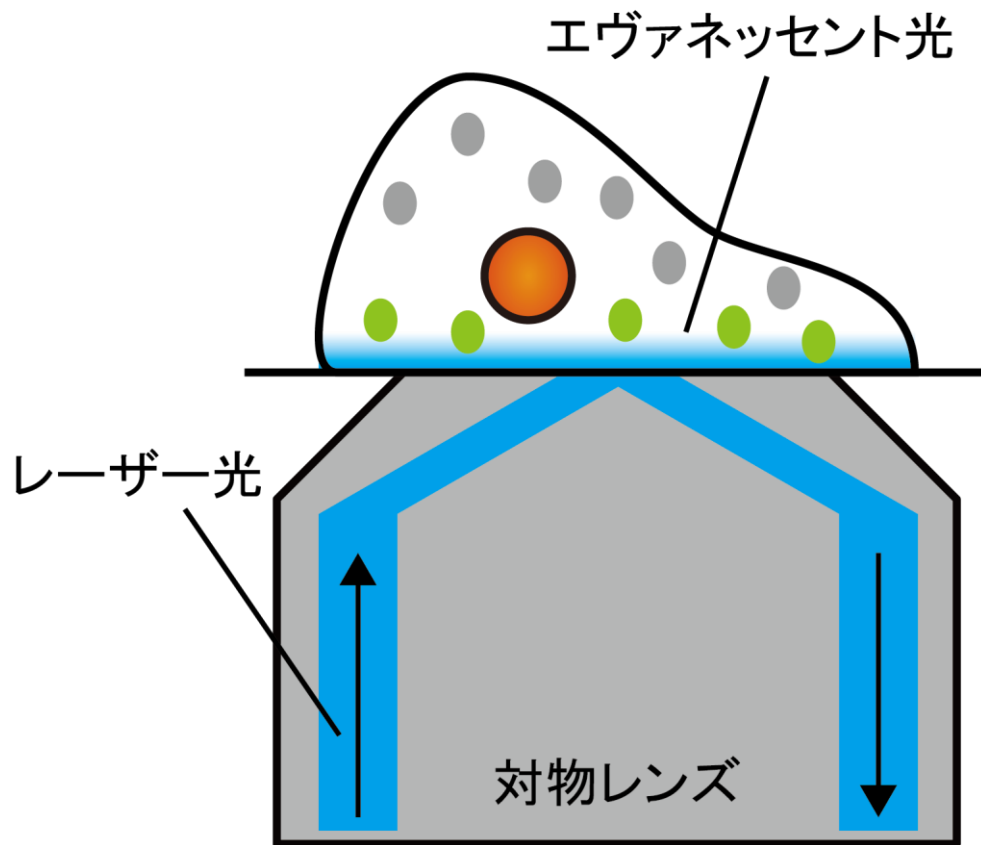


図5 全反射蛍光顕微鏡の原理

対物レンズを通し、細胞の播種されたガラス表面で全反射する角度でレーザー光を照射する。ガラス面から染み出すエヴァネッセント光を励起光として用いることで、細胞膜直下の蛍光分子のみを励起し観察することができる。

表1 第2章で RT-PCR に用いたプライマー一覧

遺伝子名 (Accession No.)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, NM_001289726.1)	CCGGTGCTGAGTATGTCGT GGAGTCTAC	CTTTCCAGAGGGGCCATCC ACAGTCTTC
G protein coupled receptor 55 (GPR55, NM_001033290)	TTGGCCTGGTTCTCAACCT AC	AGGACCATCTTGAATGGGA GG
Transient receptor potential cation channel vanilloid 2 (TRPV2, NM_011706.2)	TGTACGACCTGTCCTCTGT G	CAACAGCAGCATGGAGTC C

表2 第2章で RNA 干渉に用いた siRNA 一覧

siRNA 名	センス鎖配列 (5'-3')	アンチセンス鎖配列 (5'-3')
GPR55 siRNA (s105617, Thermo Fisher Scientific)	GGACCAUUGCUACCAA UCUTT	AGAUUGGUAGCAAUGG UCCAG
Negative Control No. 1 siRNA (Thermo Fisher Scientific)	Not provided	Not provided
TRPV2 siRNA (Mm_Trpv2_6139, Sigma-Aldrich)	CCUGUUACUUGGUCUA CAUTT	AUGUAGACCAAGUAAC AGGTT
Control siRNA (SIC_001, Sigma-Aldrich)	Not provided	Not provided

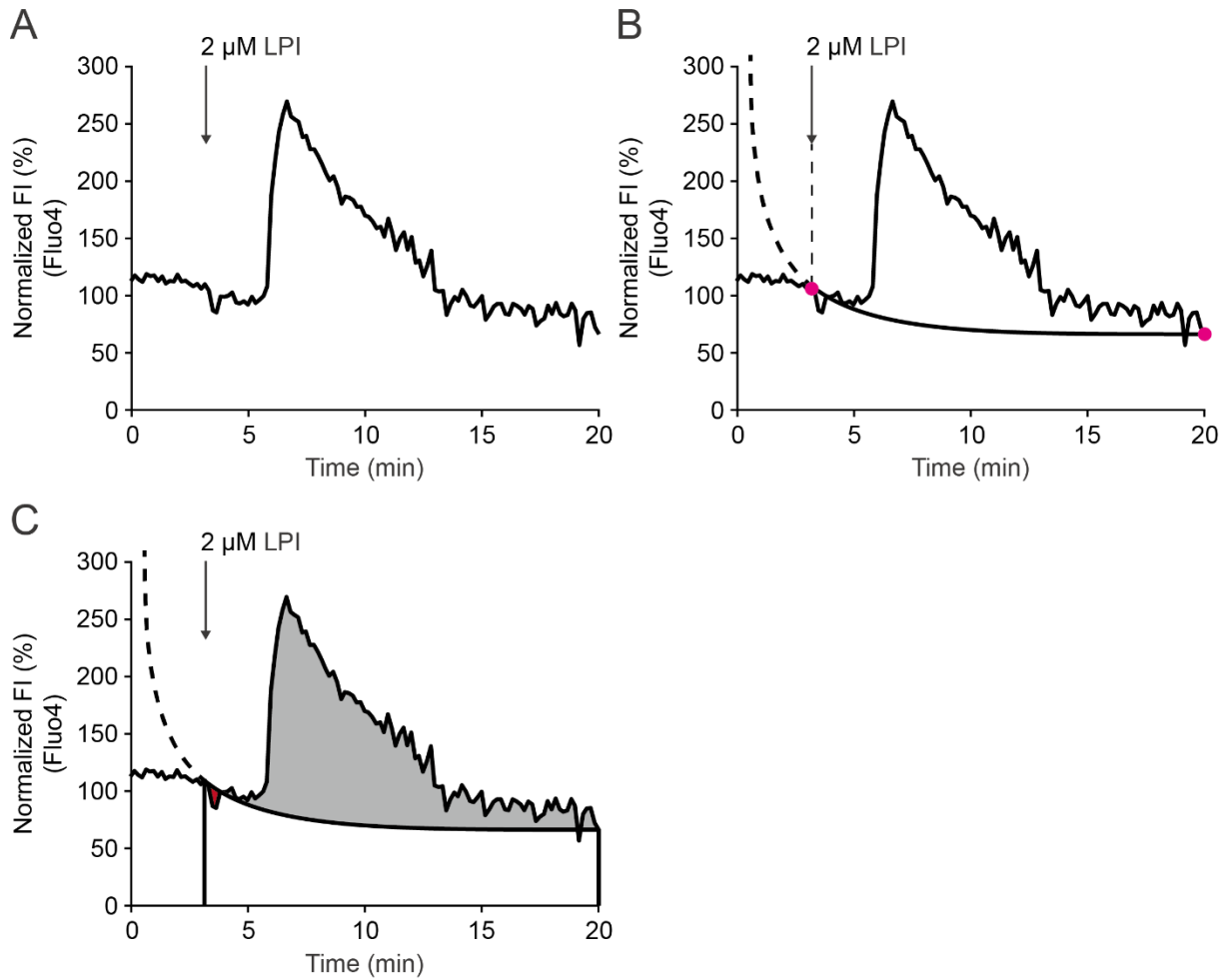


図6  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングにおける曲線下面積値の計算方法

- (A) LPI投与時刻（開始180秒後）の直前30秒間の蛍光強度平均値を100%としたタイムコースを作製する。
- (B) LPI投与直後（開始185秒後）と撮影終了時刻（開始1200秒後）の2点を通る指数関数曲線を作製し、褪色曲線とする。
- (C) LPI投与直後から撮影終了までにおけるタイムコースのうち、褪色曲線より上の部分（灰色）と下の部分（赤色）を差し引きし、曲線下面積値（AUC）とする。

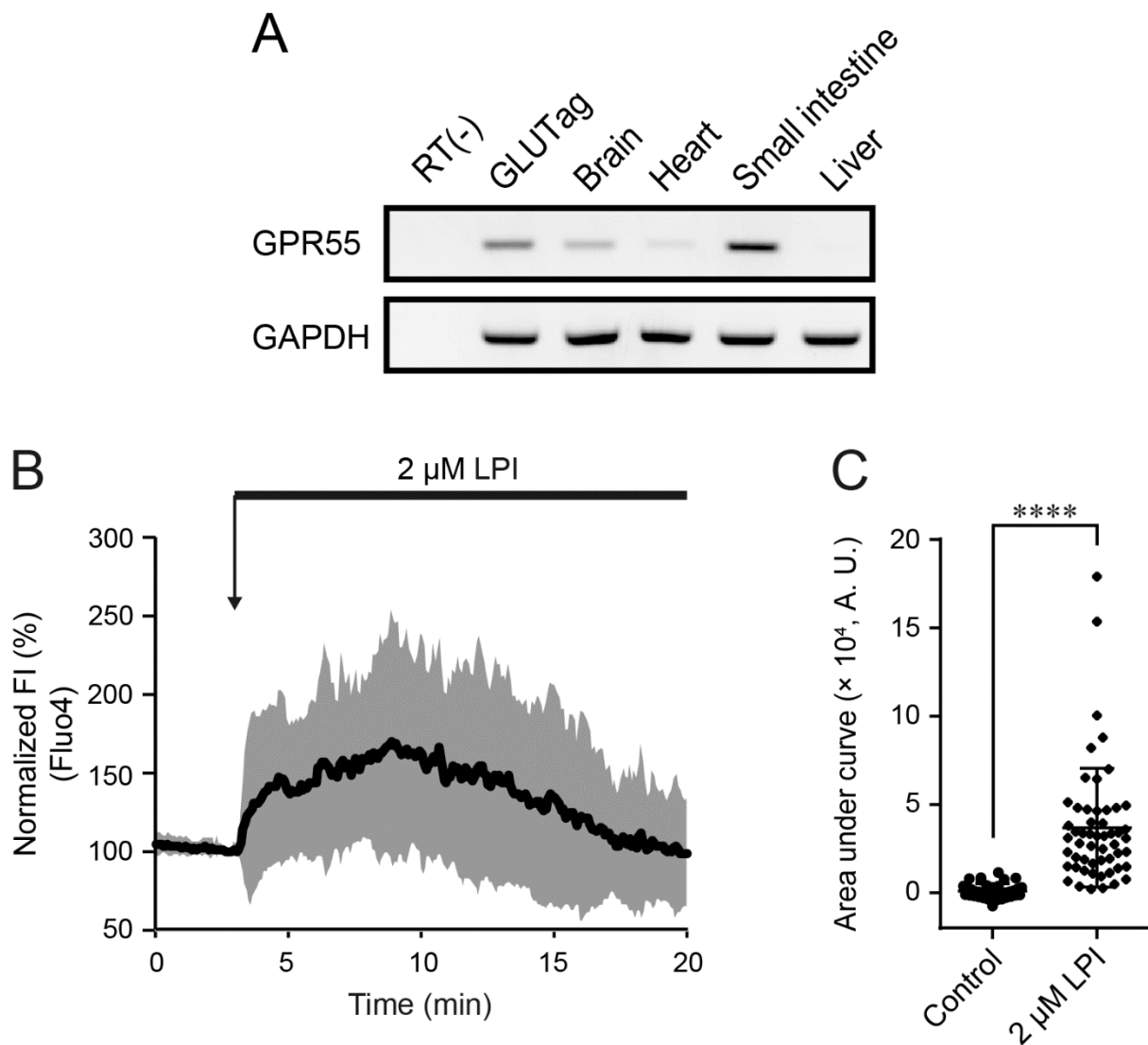


図7 GLUTag 細胞における GPR55 の発現、および LPI による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態変化

(A) RT-PCR による GPR55 の発現解析。試行回数 3 回。

(B) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の蛍光強度経時変化。細胞数 72。

(C) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 37 以上。Welch's *t* test。

データは平均  $\pm$  標準偏差。\*\*\*\*は  $P < 0.0001$  を示す。

Harada K., Kitaguchi T., Kamiya T., Aung KH., Nakamura K., Ohta K., Tsuboi T. Lysophosphatidylinositol-induced activation of the cation channel TRPV2 triggers glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine L cells. *Journal of Biological Chemistry* **292**(26), 10855-10864, 2017. [189]より改変。



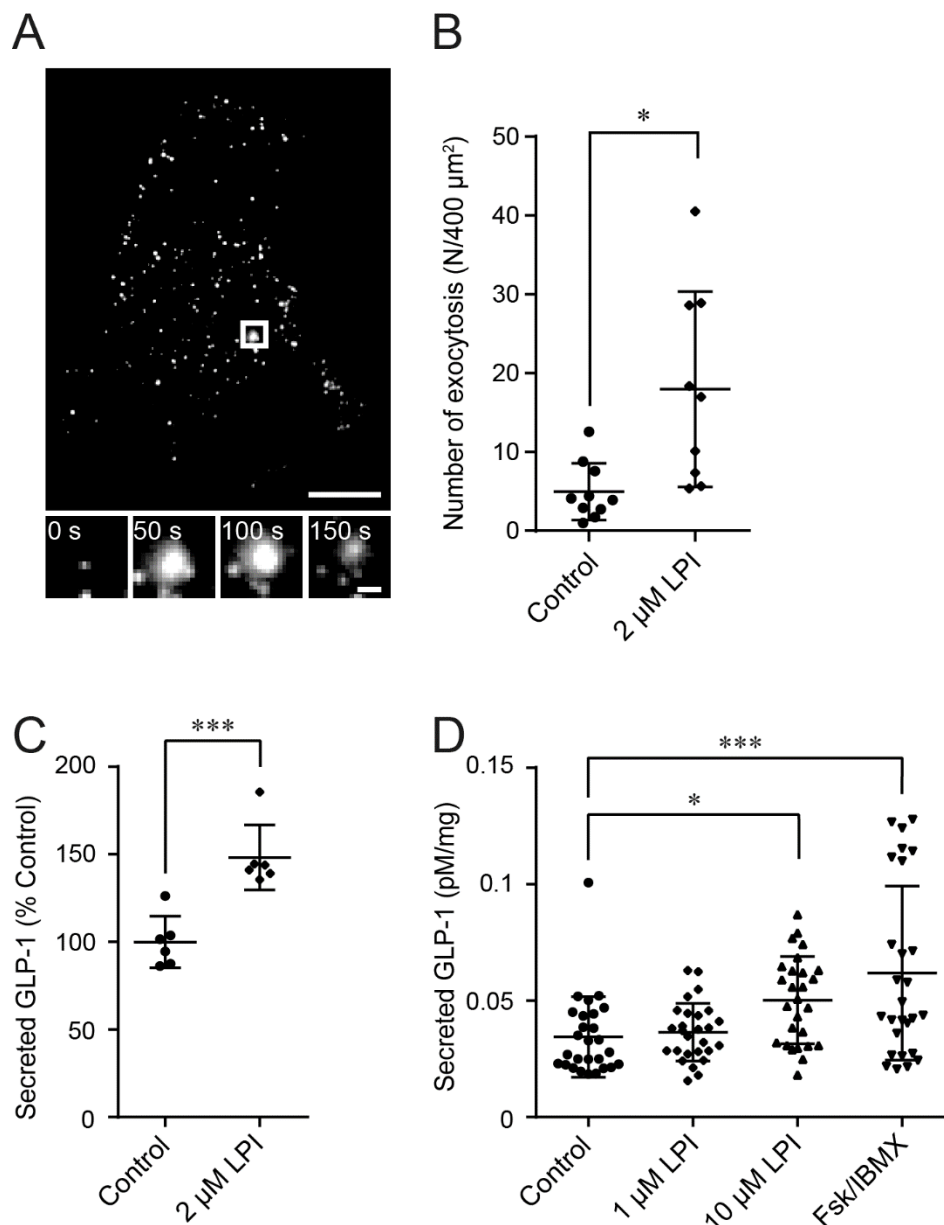


図8 LPIによるGLUTag細胞からのGLP-1分泌

- (A) 上:tPA-GFPを強制発現させたGLUTag細胞の全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は10  $\mu\text{m}$ 。下:上の正方形で囲まれた部分でのtPA-GFP顆粒の経時変化。蛍光強度が一過的に上昇したのち拡散しながら減衰する様子が確認された。校正棒は1  $\mu\text{m}$ 。
- (B) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与によるGLUTag細胞からのtPA-GFP顆粒の開口放出頻度。細胞数9以上。Welch's *t* test。
- (C) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与によるGLUTag細胞からのGLP-1分泌量。試行回数6回。図12EとのOne-way ANOVAおよびTukey's post hoc test。
- (D) LPI (1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ ) およびFsk (10  $\mu\text{M}$ )・IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) 混合溶液投与によるマウス急性単離小腸からのGLP-1分泌量。動物数9匹、試行回数27回。One-way ANOVAおよびTukey's post hoc test。

データは平均  $\pm$  標準偏差。\*は $P < 0.05$ 、\*\*\*は $P < 0.001$ を示す。

文献[189]より改変。

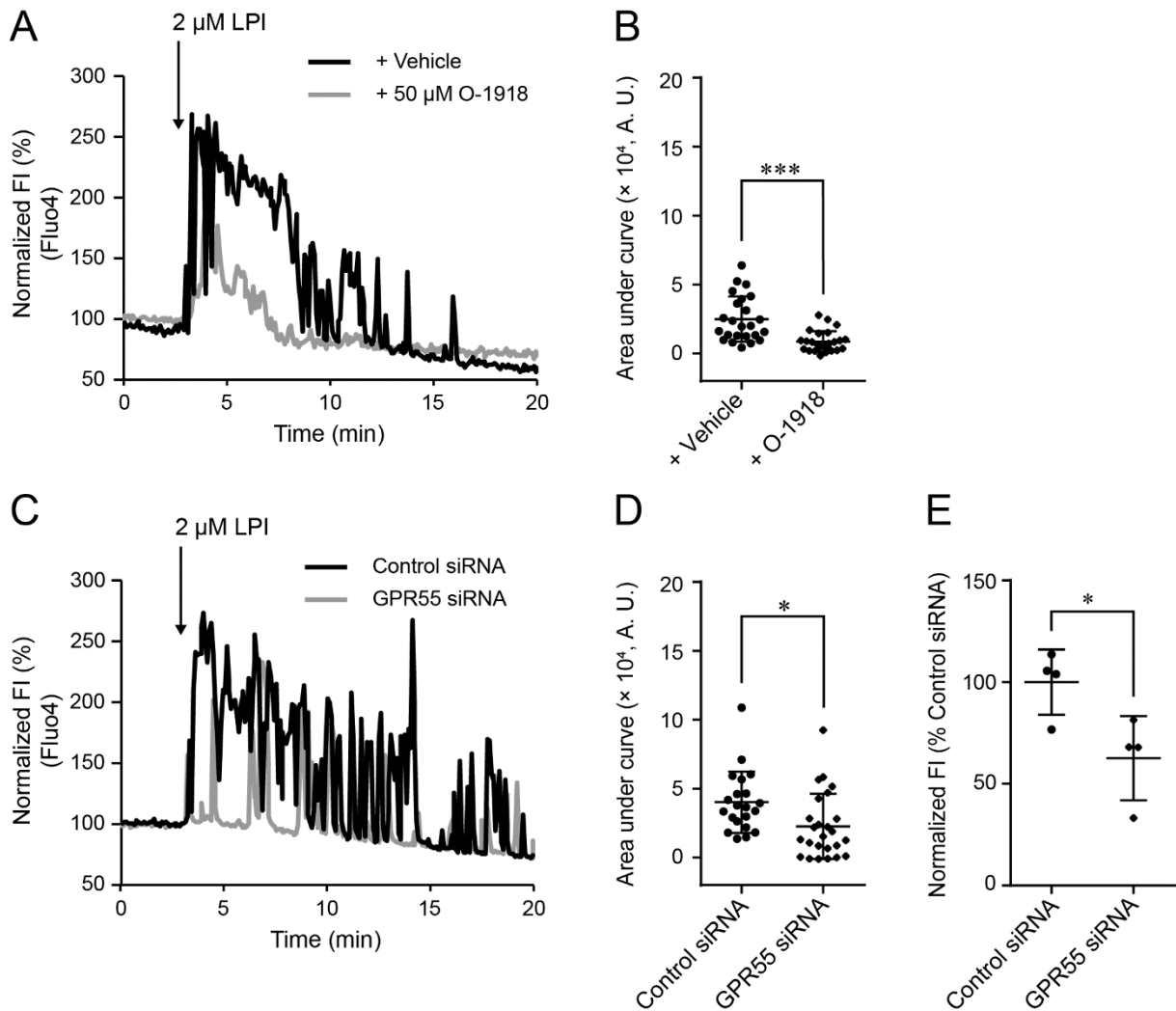


図9 LPIによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇における GPR55 の関与

- (A) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および O-1918 (50  $\mu\text{M}$ ) 同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (B) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および O-1918 (50  $\mu\text{M}$ ) 同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 24 以上。Welch's *t* test。
- (C) GPR55 をノックダウンした GLUTag 細胞における LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 与時の Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (D) GPR55 をノックダウンした GLUTag 細胞における LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 29 以上。Welch's *t* test。
- (E) RT-PCR による GPR55 のノックダウン効率の検証。GAPDH のバンドの輝度に対する GPR55 のバンドの輝度の相対値の比較。試行回数 4 回。Welch's *t* test。

データは平均  $\pm$  標準偏差。\*は  $P < 0.05$ 、\*\*\*は  $P < 0.001$  を示す。

文献[189]より改変。

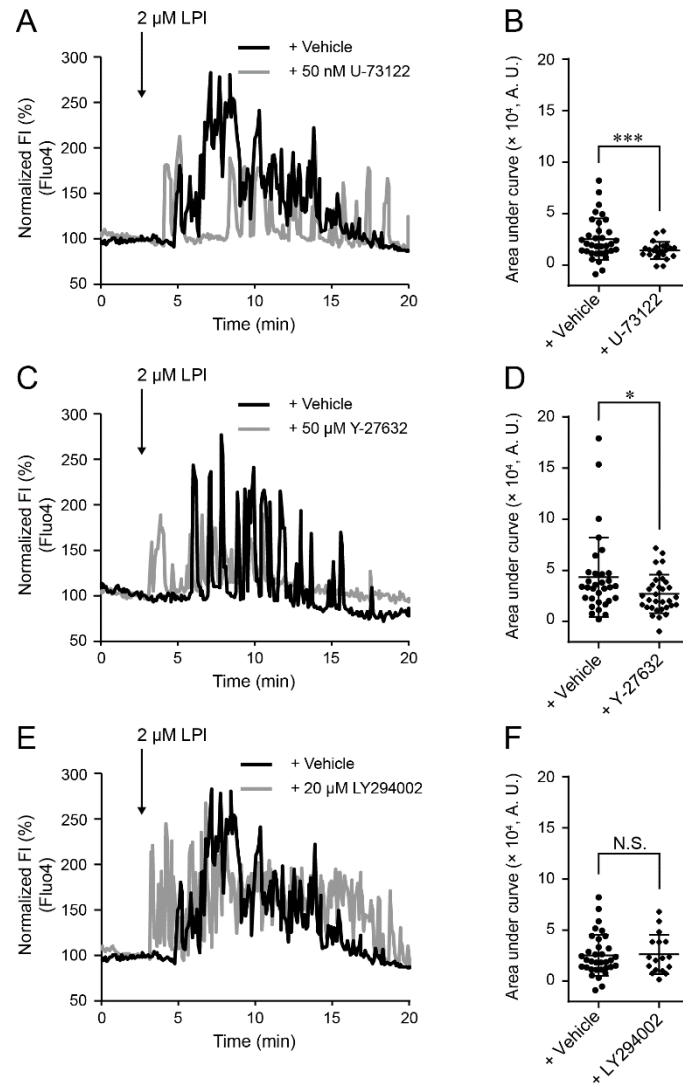


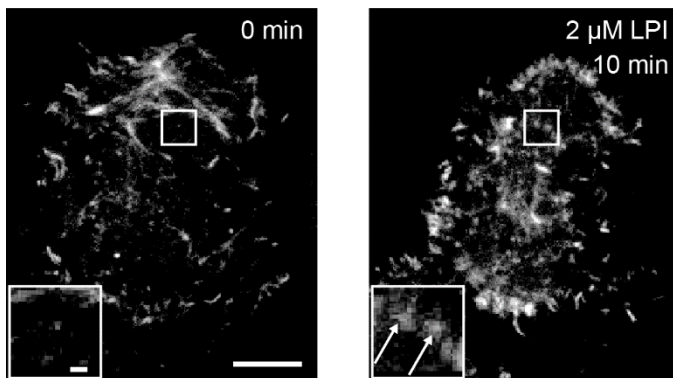
図 10 LPI による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇における PLC、ROCK、PI3K の関与

- (A) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および U-73122 (50 nM) 同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (B) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および U-73122 (50 nM) 同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 22 以上。図 10F との One-way ANOVA および Tukey's post hoc test。
- (C) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および Y-27632 (50  $\mu\text{M}$ ) 同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (D) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および Y-27632 (50  $\mu\text{M}$ ) 同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 32 以上。Welch's *t* test。
- (E) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および LY294002 (20  $\mu\text{M}$ ) 同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (F) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および LY294002 (20  $\mu\text{M}$ ) 同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 17 以上。図 10B との One-way ANOVA および Tukey's post hoc test。

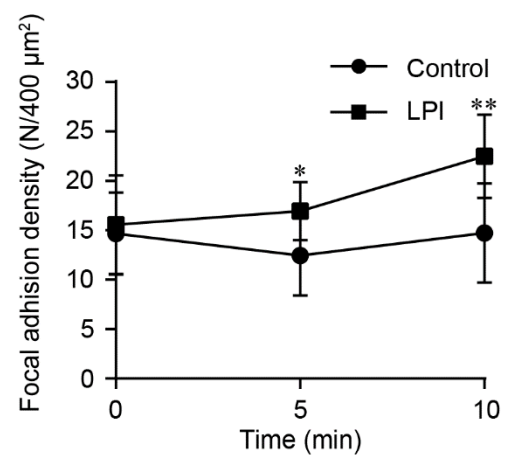
データは平均  $\pm$  標準偏差。N.S.は有意差なし、\*は  $P < 0.05$ 、\*\*\*は  $P < 0.001$  を示す。

文献[189]より改変。

A



B



### 図 11 LPI によるアクチン骨格再構成

(A) Lifeact-EGFP を強制発現させた GLUTag 細胞の LPI (2 μM) 投与前 (左) および投与 10 分後 (右) の全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10 μm。挿入図は正方形で囲まれた部分の拡大画像。接着斑 (矢印) が輝点として観察された。校正棒は 1 μm。

(B) LPI (2 μM) 投与による接着斑密度の変化。細胞数 9 以上。Welch's *t* test。データは平均 ± 標準偏差。\*は  $P < 0.05$ 、\*\*は  $P < 0.01$  を示す。

文献[189]より改変。

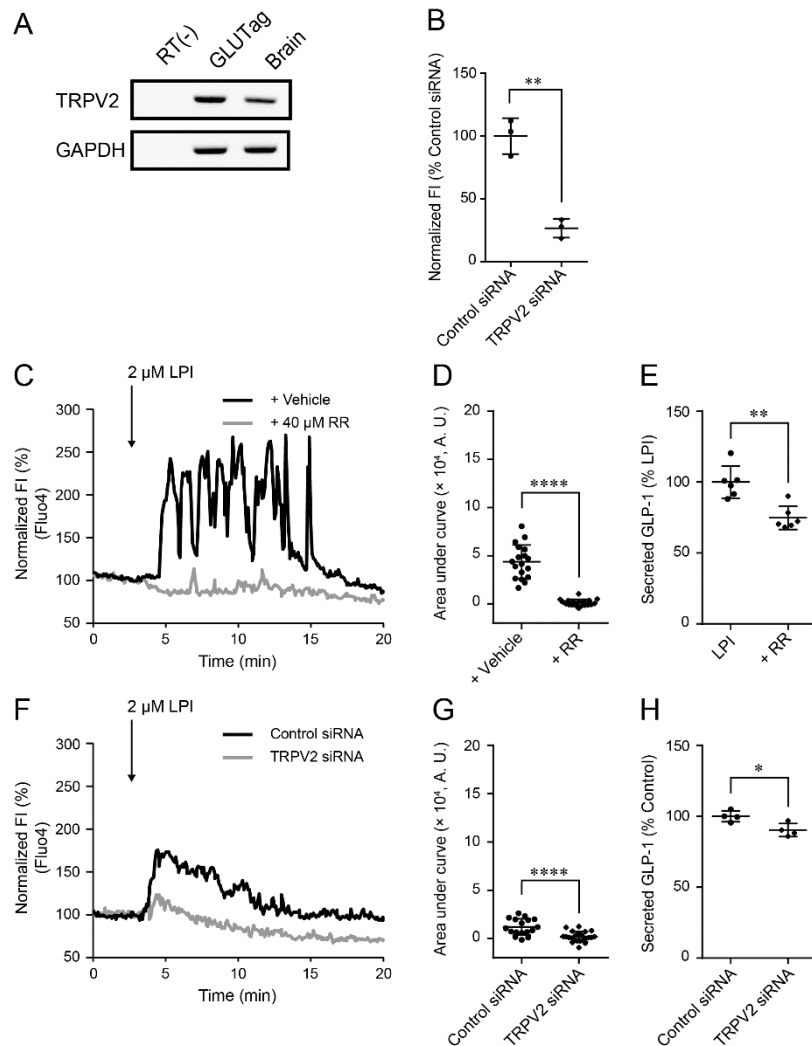


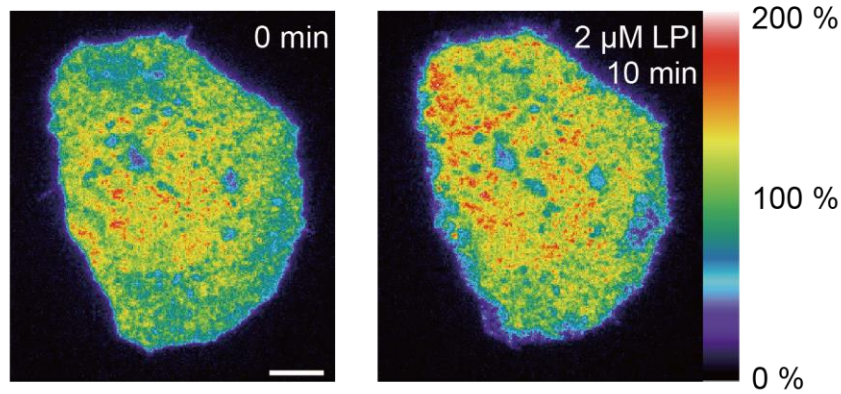
図 12 LPI による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇および GLP-1 分泌における TRPV2 の関与

- (A) RT-PCR による TRPV2 の発現解析。試行回数 4 回。
- (B) RT-PCR による TRPV2 のノックダウン効率の検証。GAPDH のバンドの輝度に対する TRPV2 のバンドの輝度の相対値の比較。試行回数 3 回。Welch's *t* test。
- (C) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および RR (40  $\mu\text{M}$ ) 同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (D) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) および RR (40  $\mu\text{M}$ ) 同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 18 以上。Welch's *t* test。
- (E) LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与による GLUTag 細胞からの GLP-1 分泌量。試行回数 4 回。図 8C との One-way ANOVA および Tukey's post hoc test。
- (F) TRPV2 をノックダウンした GLUTag 細胞における LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 与時の Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (G) TRPV2 をノックダウンした GLUTag 細胞における LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 17 以上。Welch's *t* test。
- (H) TRPV2 をノックダウンした GLUTag 細胞における LPI (2  $\mu\text{M}$ ) 投与による GLUTag 細胞からの GLP-1 分泌量。試行回数 4 回。Welch's *t* test。

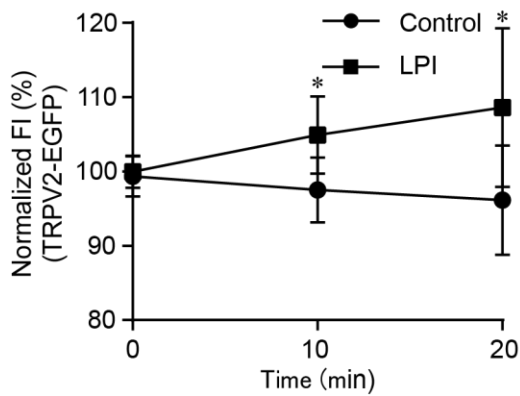
データは平均  $\pm$  標準偏差。\*は  $P < 0.05$ 、\*\*は  $P < 0.01$ 、\*\*\*\*は  $P < 0.0001$  を示す。

文献[189]より改変。

A



B



C

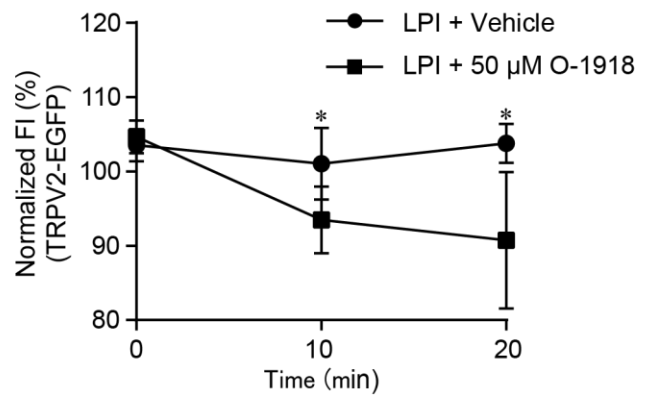


図 13 LPI による TRPV2 の膜移行

(A) TRPV2-EGFP を強制発現させた GLUTag 細胞の LPI (2 μM) 投与前 (左) および投与 10 分後 (右) の疑似カラー全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10 μm。

(B) LPI (2 μM) 投与による TRPV2-EGFP の蛍光強度変化。細胞数 6 以上。Welch's *t* test。

(C) LPI (2 μM) および O-1918 (50 μM) 同時投与による TRPV2-EGFP の蛍光強度変化。細胞数 5 以上。Welch's *t* test。

データは平均 ± 標準偏差。\*は  $P < 0.05$  を示す。

文献[189]より改変。

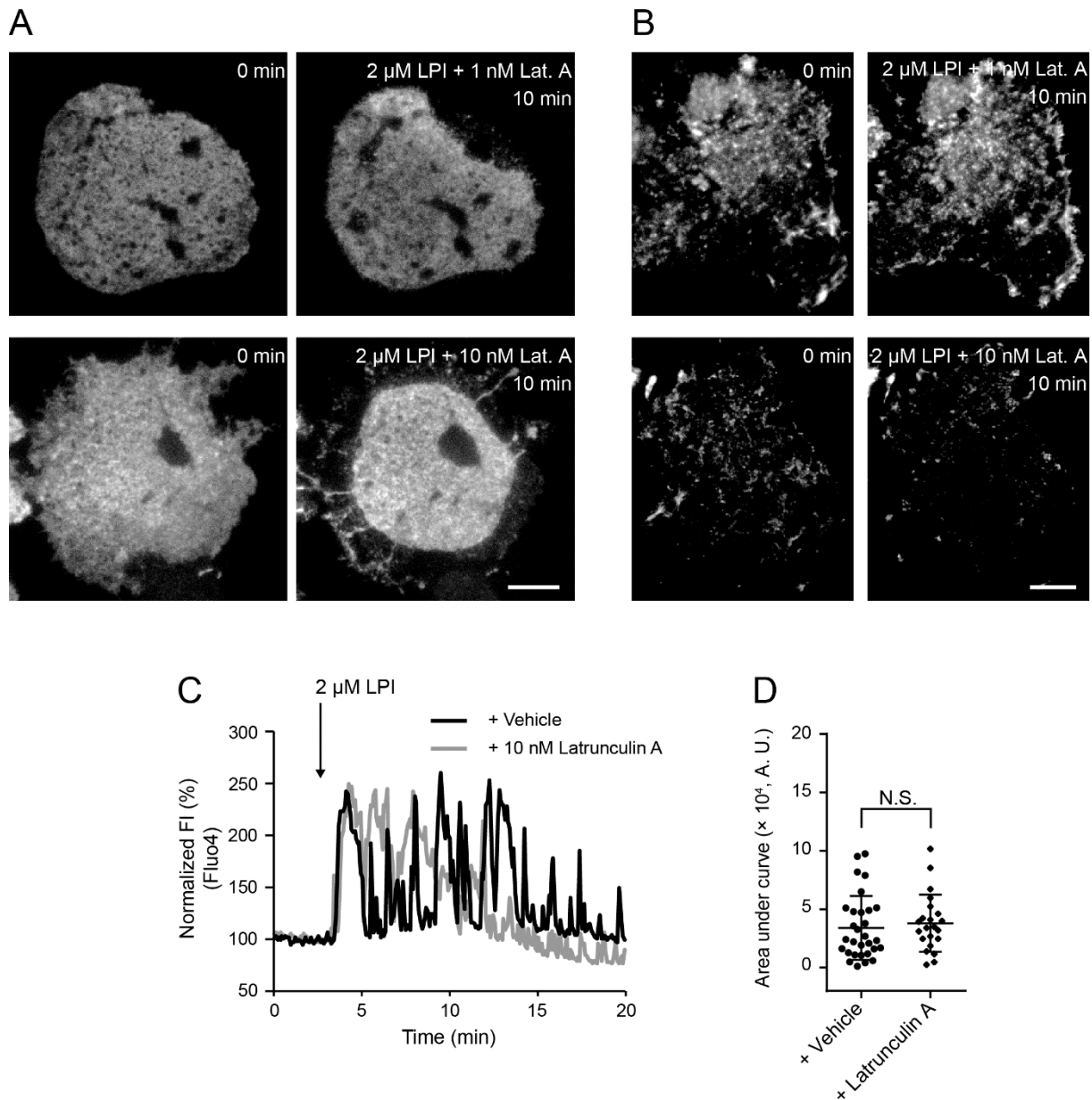


図 14 アクチン重合阻害時の GLUTag 細胞における LPI への応答

- (A) TRPV2-EGFP を強制発現させた GLUTag 細胞の LPI (2  $\mu$ M) およびラトランキュリン A (上: 1 nM、下: 10 nM) 同時投与前 (左) および投与 10 分後 (右) の全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10  $\mu$ m。
- (B) Lifeact-EGFP を強制発現させた GLUTag 細胞の LPI (2  $\mu$ M) およびラトランキュリン A (上: 1 nM、下: 10 nM) 同時投与前 (左) および投与 10 分後 (右) の全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10  $\mu$ m。
- (C) LPI (2  $\mu$ M) およびラトランキュリン A (10 nM) 同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (D) LPI (2  $\mu$ M) およびラトランキュリン A (10 nM) 同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 22 以上。Welch's *t* test。データは平均  $\pm$  標準偏差。N.S.は有意差なしを示す。

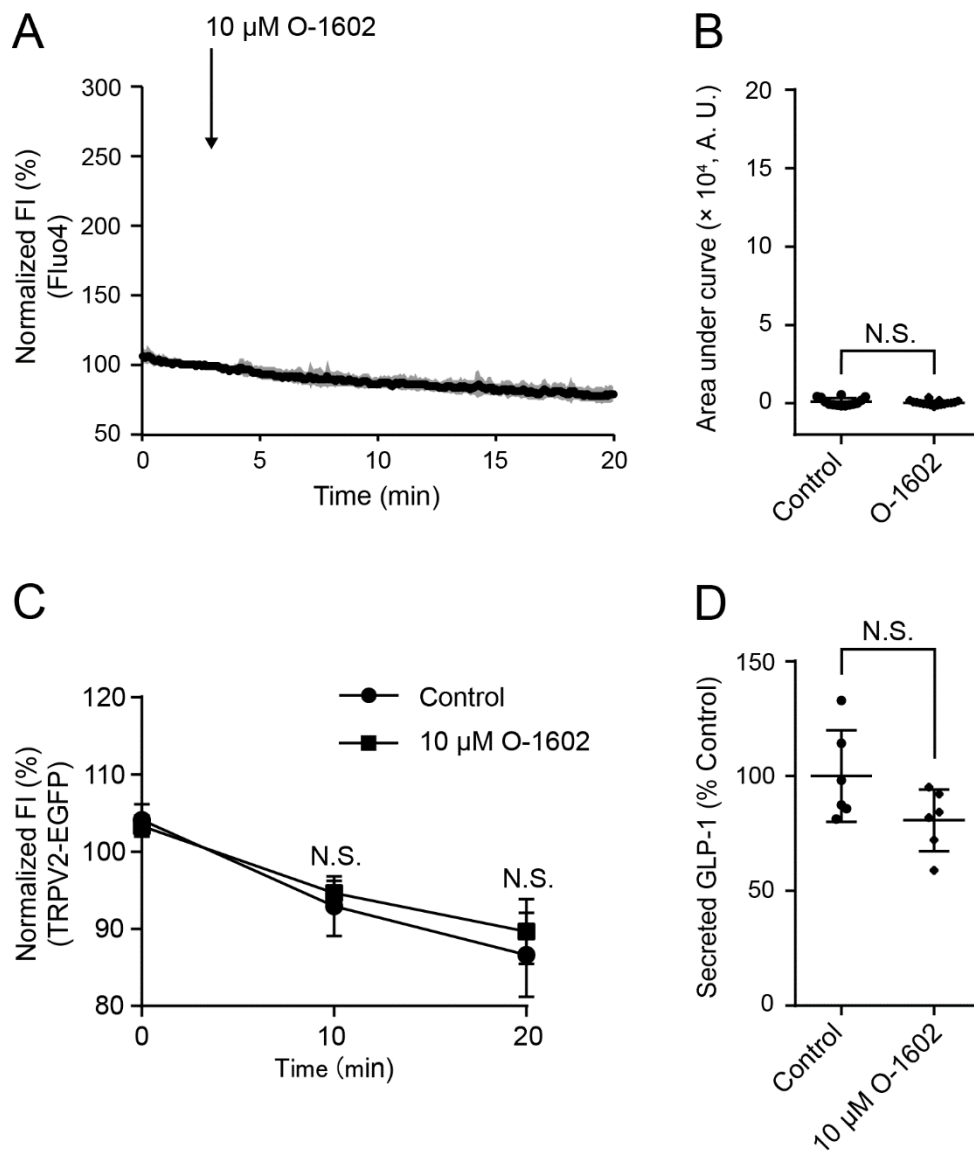


図 15 GPR55 選択的活性化時の GLUTag 細胞における LPI への応答

- (A) O-1602 (10  $\mu$ M) 投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の蛍光強度経時変化。細胞数 17。
- (B) O-1602 (10  $\mu$ M) 投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された曲線下面積値。細胞数 14 以上。Welch's *t* test。
- (C) O-1602 (10  $\mu$ M) 投与による TRPV2-EGFP の蛍光強度変化。細胞数 8。Welch's *t* test。
- (D) O-1602 (10  $\mu$ M) 投与による GLUTag 細胞からの GLP-1 分泌量。試行回数 6 回。Welch's *t* test。

データは平均  $\pm$  標準偏差。N.S.は有意差なしを示す。

文献[189]より改変。



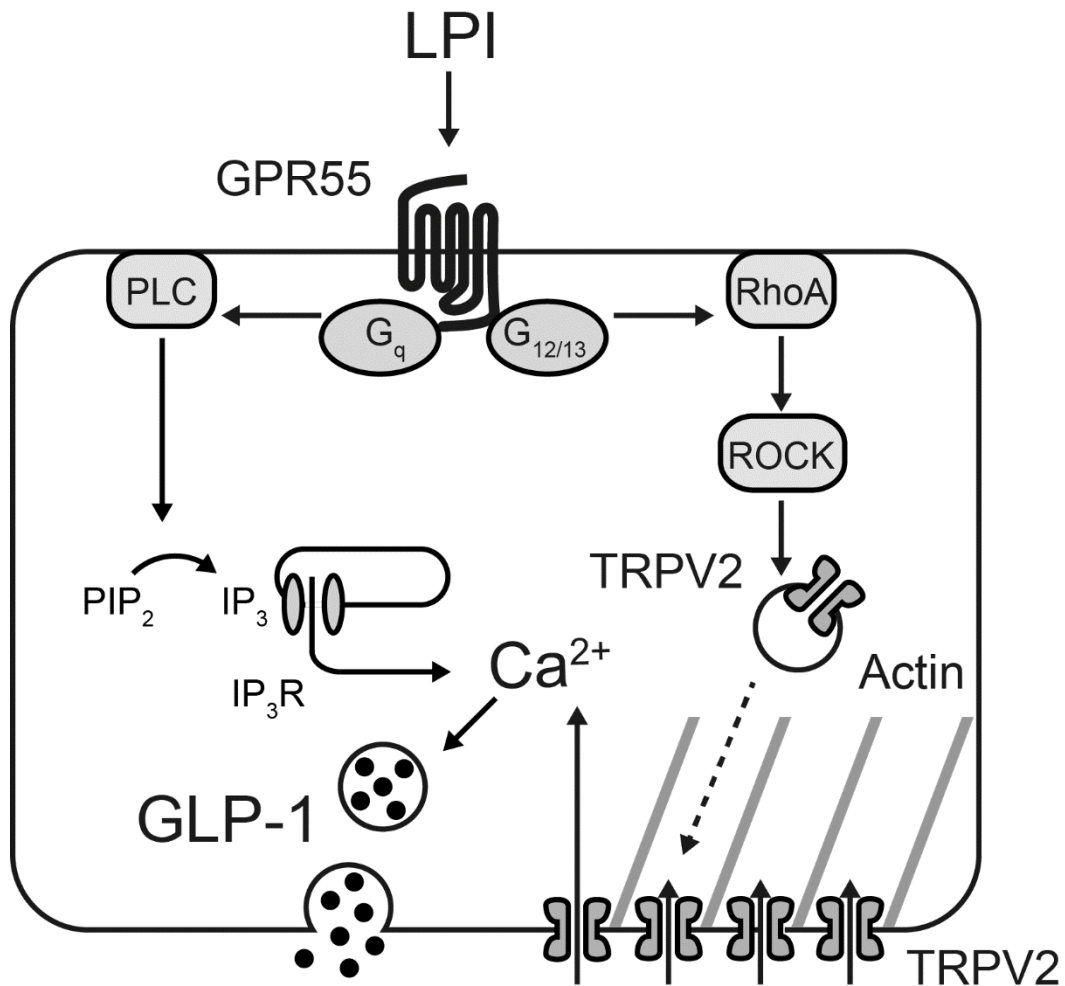


図 16 LPI による GLP-1 分泌制御機構モデル

GPR55 が LPI を感受する。GPR55 は  $G_q$  および  $G_{12/13}$  タンパク質と共役すると考えられる。 $G_q$  タンパク質の下流では、PLC の活性化により小胞体上の  $IP_3R$  からの  $Ca^{2+}$  放出が起こる一方、 $G_{12/13}$  タンパク質の下流で RhoA と ROCK の活性化に伴い、アクチン重合が促進されることで接着斑の形成が起こる。アクチン重合に伴い、TRPV2 を含む輸送小胞の細胞膜への融合が促進されることで、細胞膜上の TRPV2 が増加し、細胞外から多量の  $Ca^{2+}$  が流入する。これによって持続的な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が起こり、GLP-1 分泌が促進されると考えられる。また、LPI が TRPV2 に直接アゴニストとして作用する可能性もある。PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (ホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸)。

文献[189]より改変。

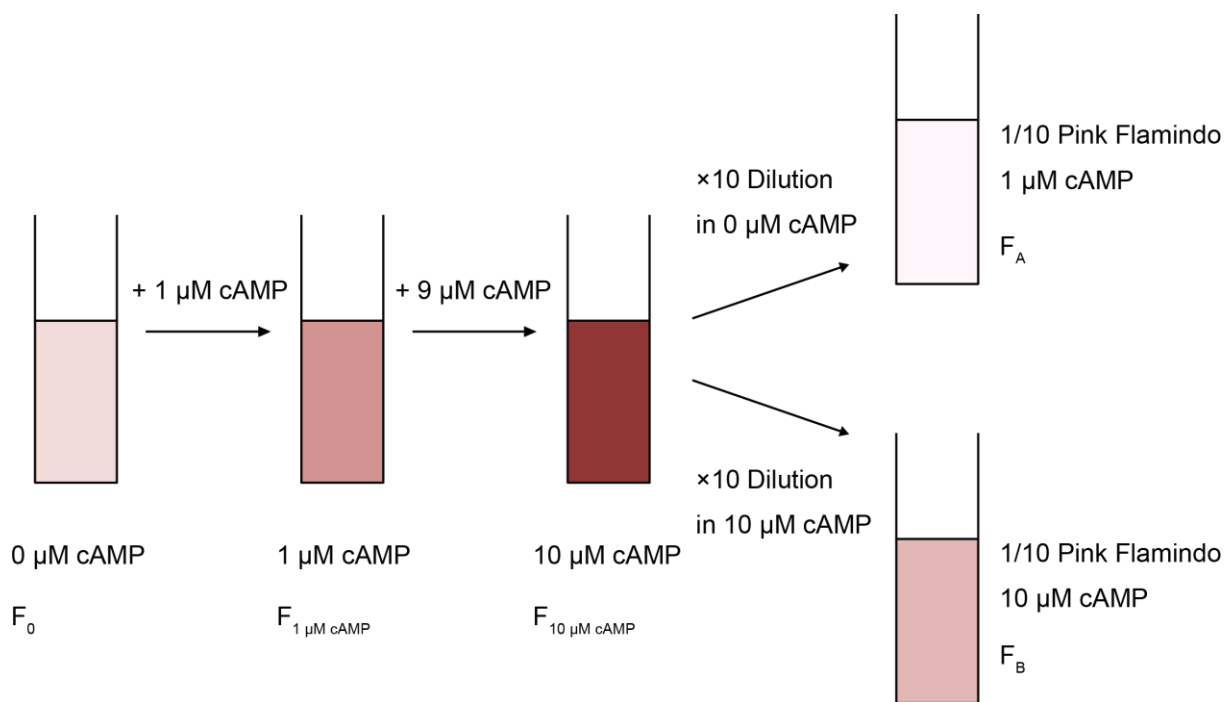


図 17 Pink Flamindo の cAMP に対する応答の可逆性解析

Pink Flamindo のみを含む溶液の蛍光強度 ( $F_0$ ) を測定したのち、まず 1  $\mu\text{M}$ 、続いて 9  $\mu\text{M}$  の cAMP を加え、終濃度 1  $\mu\text{M}$  および 10  $\mu\text{M}$  の cAMP 存在下での蛍光強度 ( $F_{1 \mu\text{M cAMP}}$  および  $F_{10 \mu\text{M cAMP}}$ ) を測定した。その後、cAMP を含まない PBS で 10 倍希釈した、Pink Flamindo 濃度 1/10 かつ 1  $\mu\text{M}$  cAMP 存在下での蛍光強度 ( $F_A$ )、および 10  $\mu\text{M}$  cAMP を含んだ PBS で 10 倍希釈した、Pink Flamindo 濃度 1/10 かつ 10  $\mu\text{M}$  cAMP 存在下での蛍光強度 ( $F_B$ ) を測定した。cAMP 濃度を 10  $\mu\text{M}$  から 1  $\mu\text{M}$  に低下させた際、Pink Flamindo が cAMP 非存在下に対して示す輝度変化率  $F_{10 \mu\text{M cAMP} \rightarrow 1 \mu\text{M cAMP}} / F_0$  は、

$$(F_{10 \mu\text{M cAMP}}/F_0) \times (F_A/F_B) = (F_{10 \mu\text{M cAMP}} \times F_A) / (F_0 \times F_B) \text{ から求められる。}$$

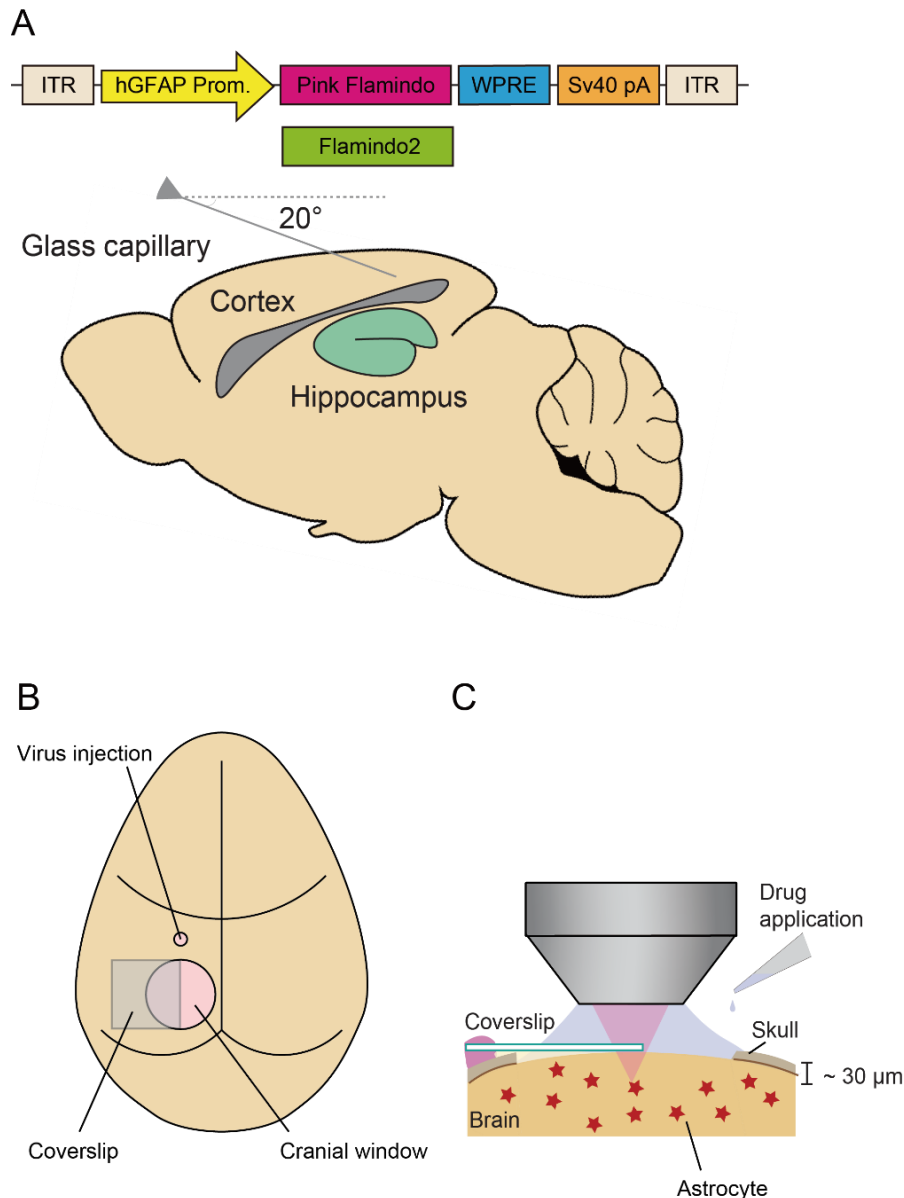


図 18 **Pink Flamindo** 発現ウイルスベクターの導入および二光子顕微鏡イメージング手順

- (A) 上: pAAV-GFAP-Pink Flamindo および pAAV-GFAP-Flamindo2 を発現するアデノ随伴ウイルスベクターの配列模式図。下: マウス脳へのウイルスベクター注入位置の模式図。頭蓋窓に水平角  $20^\circ$  でガラス針を挿入し、皮質表面から  $350\ \mu\text{m} \sim 500\ \mu\text{m}$  の深さにウイルス溶液を注入した。ITR: inverted terminal repeats, hGFAP Prom.: human glial fibrillary acidic protein promoter, WPRE: woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, Sv40 pA: Simian Virus 40 polyA。
- (B) マウス脳におけるウイルスベクター注入用頭蓋窓、および二光子顕微鏡観察用頭蓋窓の模式図。ウイルス溶液注入部位に相当する位置の頭蓋骨を観察用に除去した。
- (C) 頭蓋窓での二光子顕微鏡イメージング手順の模式図。頭蓋窓の左半分カバーガラスを設置し、カバーガラスと頭蓋窓の隙間から薬剤滴下および洗浄を行った。

Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H., Tsuboi T., Kitaguchi T. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. *Scientific Reports* 7(1), 7351, 2017. [190]より改変。

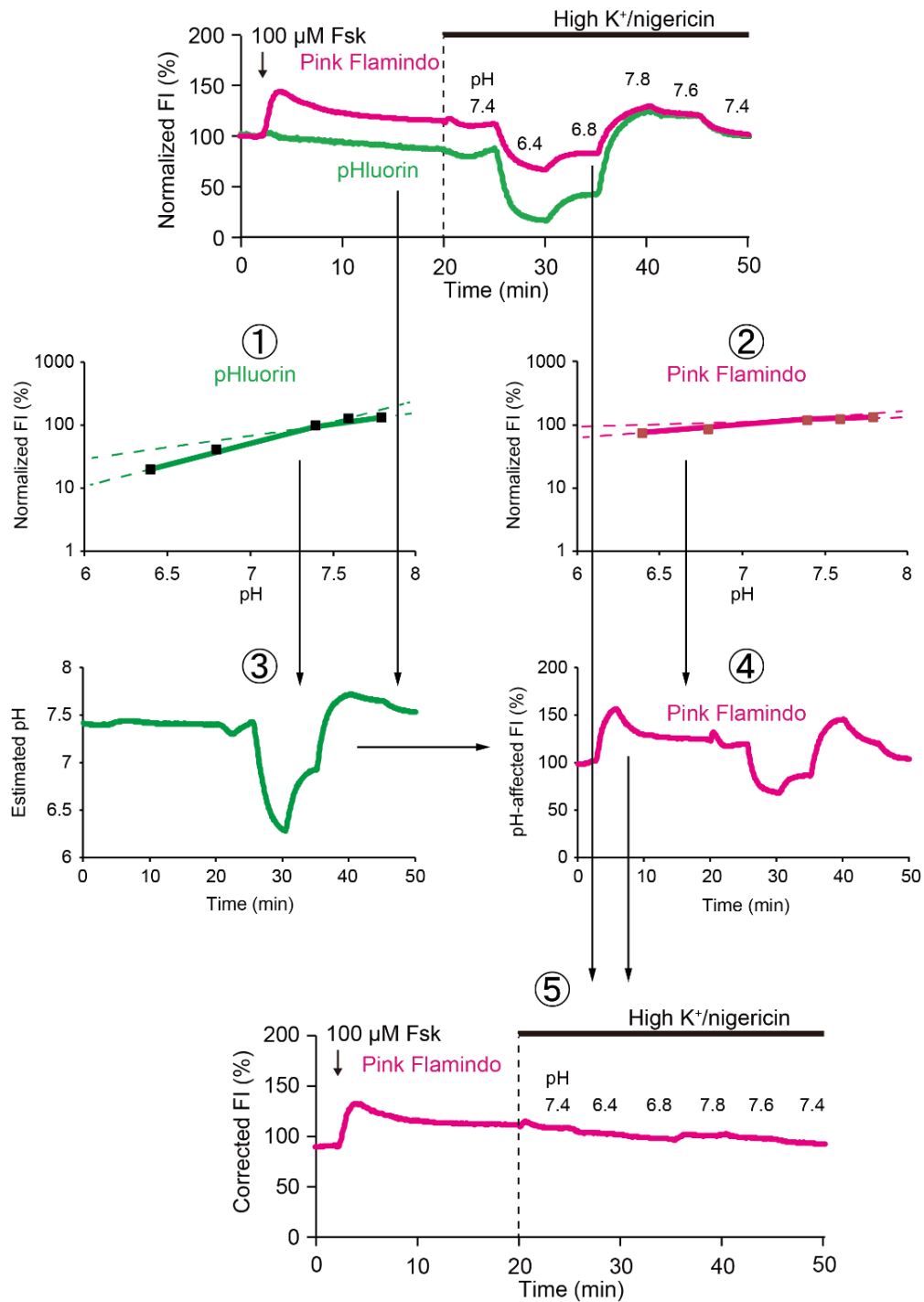
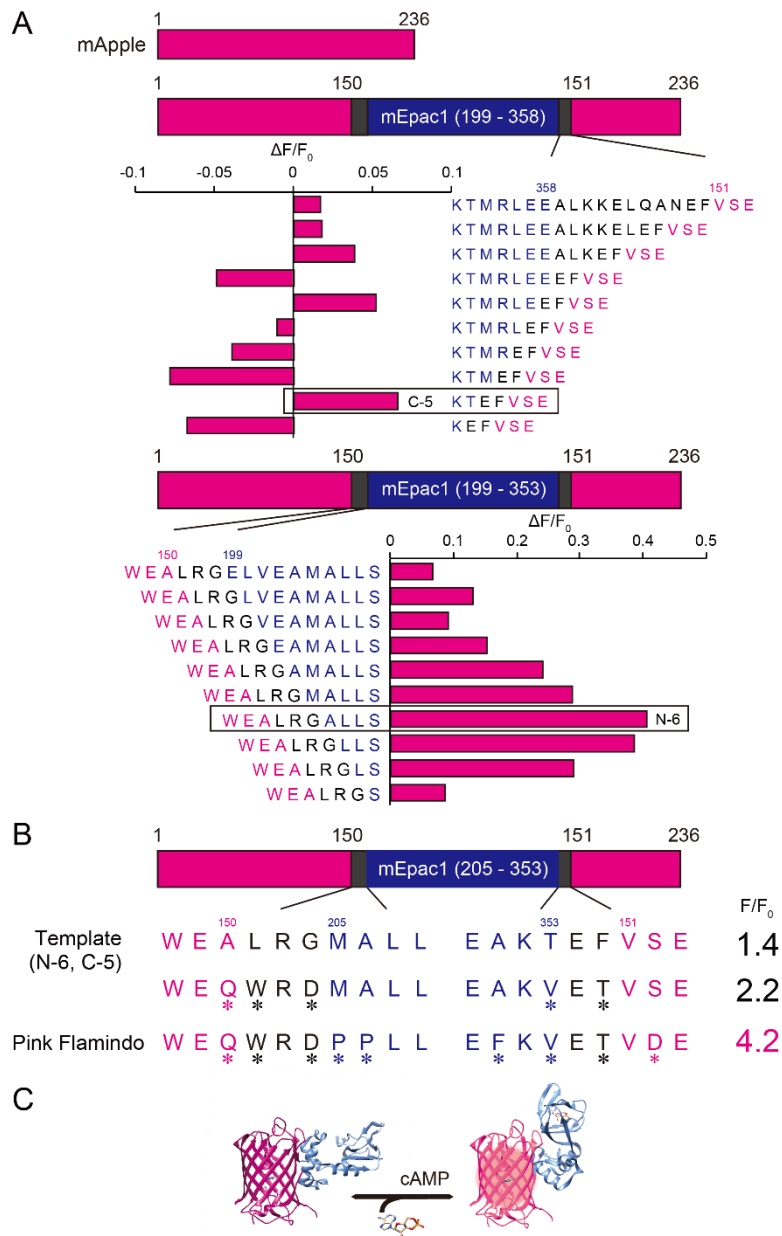


図 19 Pink Flamindo の細胞内 pH 変化に対する応答の解析手順

Pink Flamindo および pHluorin を強制発現させた HeLa 細胞に、Fsk (100 μM) を滴下したのち High K<sup>+</sup>/nigericin 溶液を pH7.4、6.4、6.8、7.8、7.6、7.4 の順で灌流投与した。High K<sup>+</sup>/nigericin 溶液投与中の蛍光強度から、細胞内における pHluorin および Pink Flamindo の蛍光強度の pH 依存曲線 (①および②) を作製した。続いて①および pHluorin の蛍光強度変化に基づき、実験中の pH 推測値 (③) を算出した。②および③から、実験中の pH 変化による Pink Flamindo の蛍光強度変化推測値 (④) を算出した。そして実験データの蛍光強度変化を④で除算することで、pH 変化の影響を差し引いた補正後蛍光強度 (⑤) を算出した。



**図 20 Pink Flamindo の開発手順および配列図**

- (A) Pink Flamindo のリンカー長調節手順。分割した mApple に mEpac1 の cAMP 結合ドメイン配列を挿入し、まず C 末端側のリンカー長を変化させ、蛍光強度変化率 ( $\Delta F/F_0$ ) の最も高い C-5 を得た。続いて C 末端のリンカー長を C-5 に固定したのち、N 末端側のリンカー長を変化させ、同様に蛍光強度変化率  $\Delta F/F_0$  の最も高い N-6 を得た。
- (B) ランダム変異導入手順。リンカー長 N-6、C-5 の変異体を鋳型とし、リンカーおよびその周辺のアミノ酸に点変異を導入し、 $\Delta F/F_0$  の最も高い変異体を選抜する作業を繰り返した。\*は、変異導入箇所を示す。
- (C) Pink Flamindo の cAMP 解離 (左) および結合時 (右) の 3 次元構造モデル。Protein Data Bank から mCherry (PDB\_4ZIO) および Epac1 (cAMP 解離時 : PDB\_2BYV、cAMP 結合時 : PDB\_4MGK) の 3 次元画像を得て作製した。

文献[190]より改変。

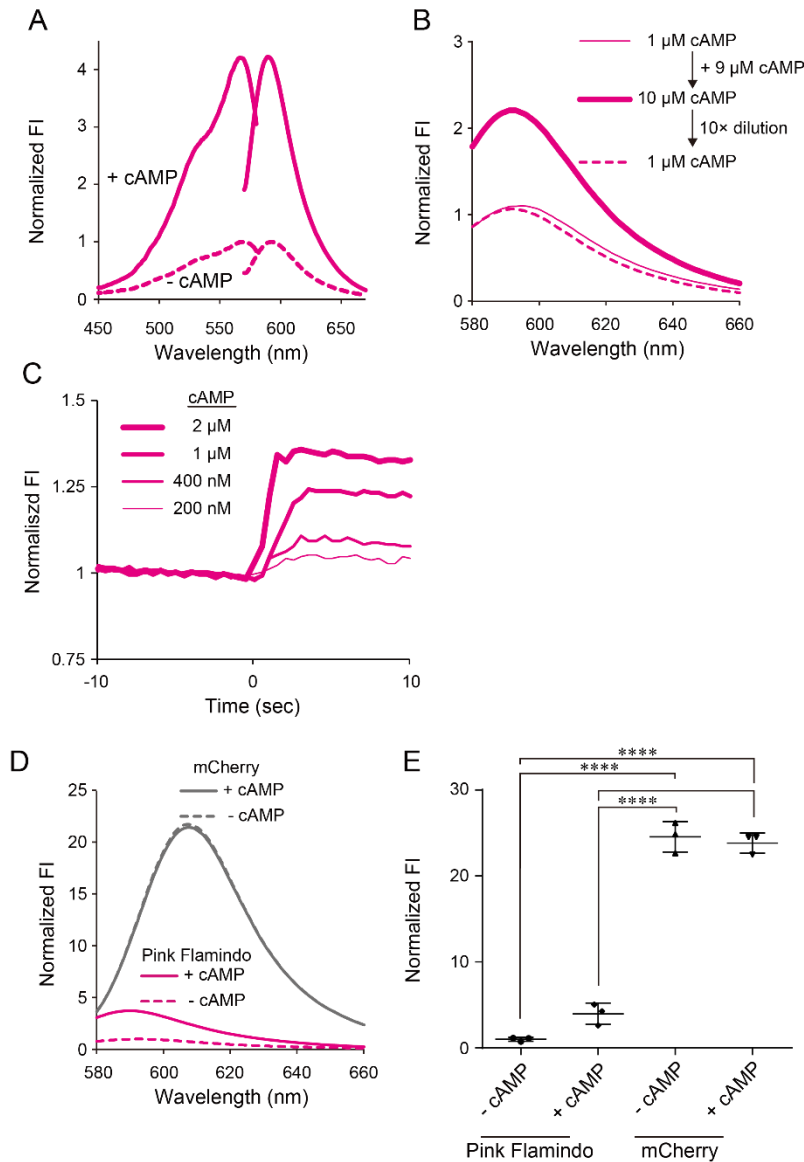


図 21 Pink Flamindo の励起蛍光スペクトル、応答可逆性、応答速度、蛍光強度

- (A) cAMP (100 μM) 存在下 (実線) および非存在下 (破線) での Pink Flamindo の励起蛍光スペクトル。cAMP 非存在下での蛍光強度のピークを 1 として標準化した。
- (B) 1 μM cAMP (細い実線)、10 μM cAMP (太い実線) 存在下、および cAMP を理論上 10 μM から 1 μM に希釈した場合 (破線) の Pink Flamindo の蛍光スペクトル。cAMP 非存在下での蛍光強度のピークを 1 として標準化した。
- (C) cAMP (200 nM、400 nM、1 μM、2 μM) 投与中の Pink Flamindo の蛍光強度の経時変化。cAMP 投与直前 10 秒間の蛍光強度の平均を 1 として標準化した。
- (D) cAMP (100 μM) 存在下 (実線) および非存在下 (破線) での Pink Flamindo (マゼンタ線) および mCherry (灰色線) の蛍光スペクトル。cAMP 非存在下での Pink Flamindo の蛍光強度のピークを 1 として標準化した。
- (E) D における蛍光強度のピーク値の比較。試行回数 3 回。One-way ANOVA および Tukey's post hoc test。

データは平均 ± 標準偏差。\*\*\*\*は  $P < 0.0001$  を示す。

文献[190]より改変。

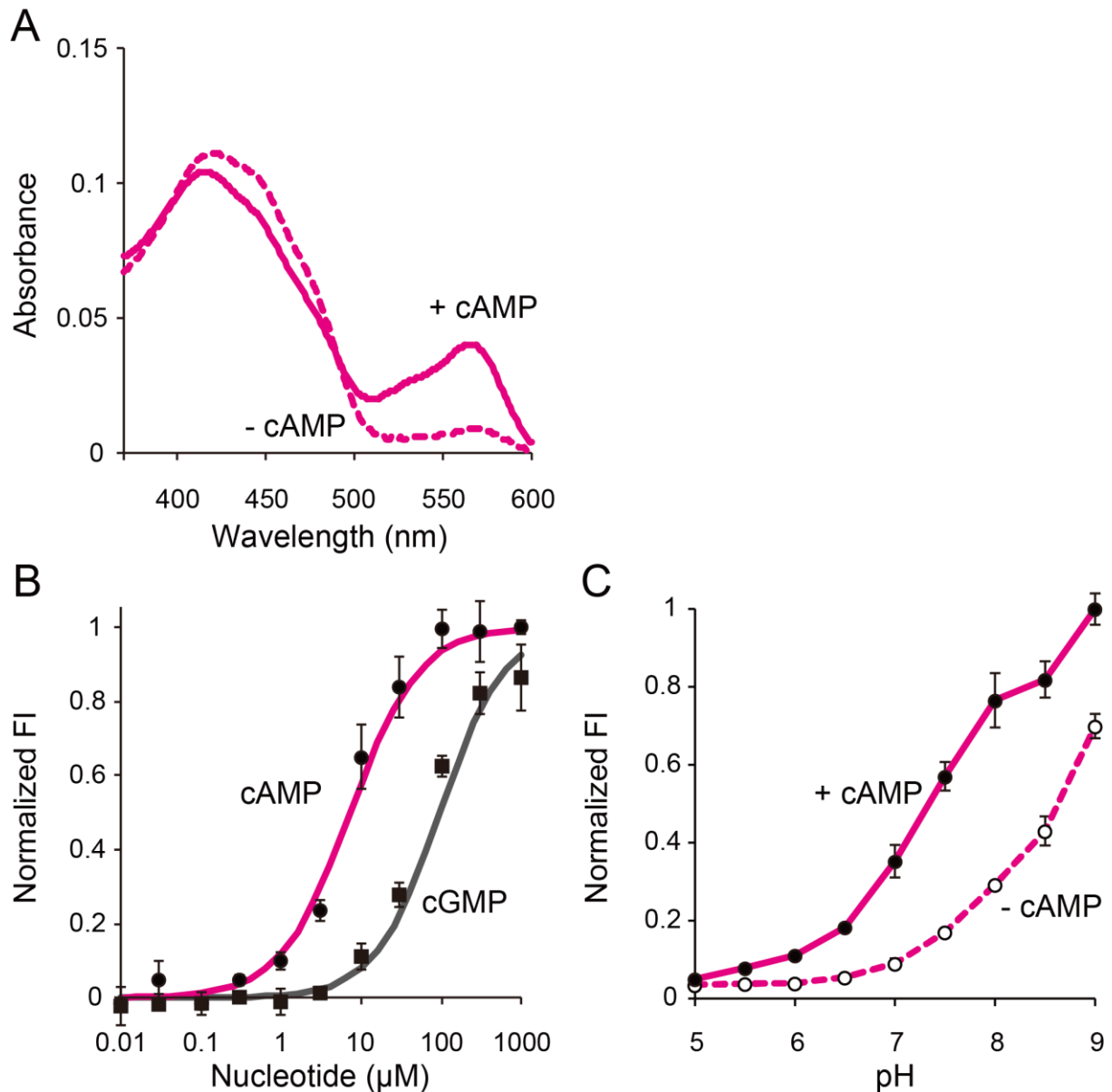
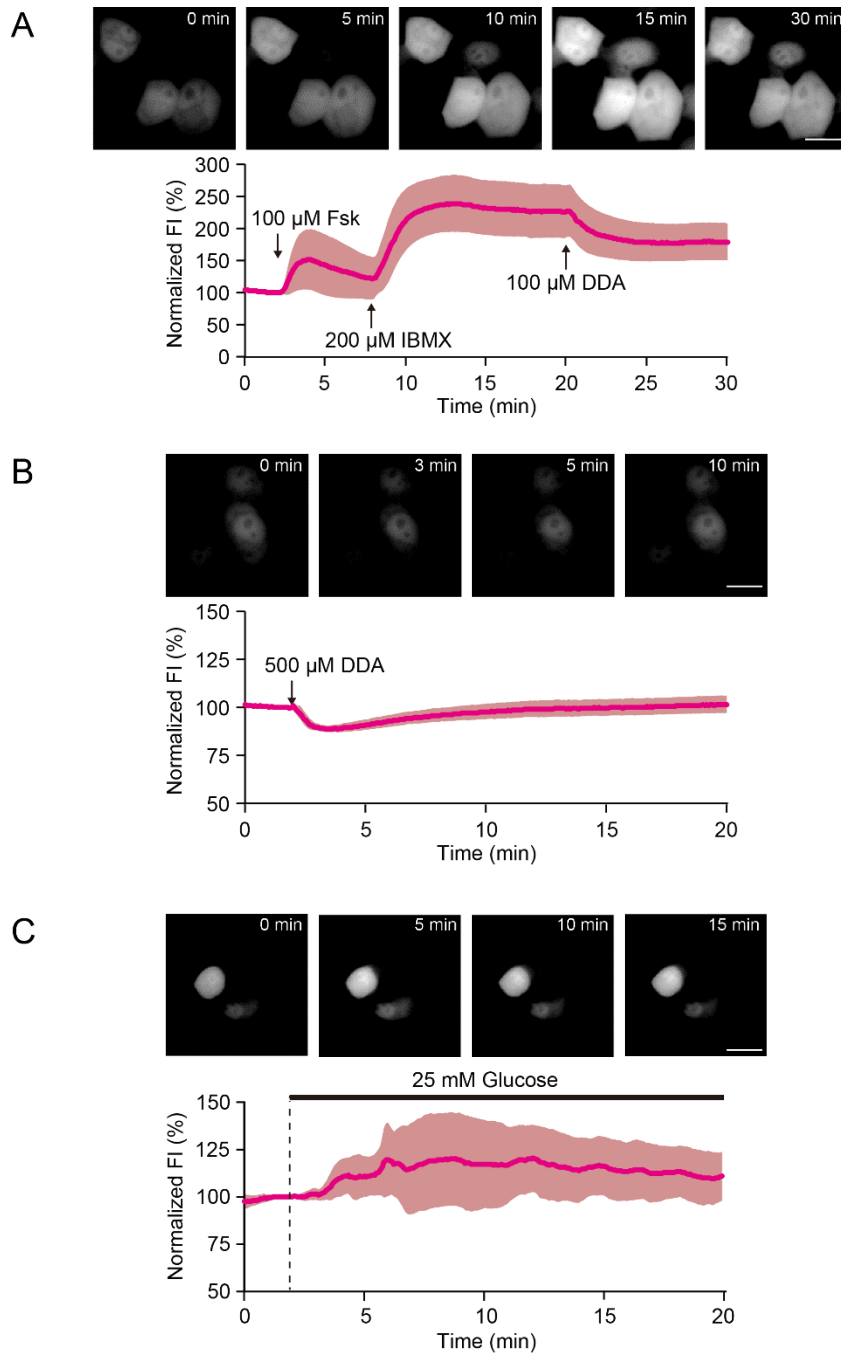


図 22 Pink Flamindo の吸収スペクトル、濃度依存性、pH 依存性

- (A) cAMP (100  $\mu\text{M}$ ) 存在下 (実線) および非存在下 (破線) での Pink Flamindo (30  $\mu\text{M}$ ) の吸収スペクトル。
- (B) cAMP (●、赤線) および cGMP (■、灰色線) に対する Pink Flamindo の濃度依存性曲線。cAMP および cGMP 非存在下での蛍光強度を 0、1 mM cAMP および cGMP 存在下での蛍光強度を 1 として標準化した。ヒルの式に基づく解離定数 ( $K_d$ ) は cAMP に対しては 7.2  $\mu\text{M}$ 、cGMP に対しては 94  $\mu\text{M}$ 。試行回数 3 回。
- (C) AMP (100  $\mu\text{M}$ ) 存在下 (実線) および非存在下 (破線) での Pink Flamindo の pH 依存性曲線。cAMP 存在下、pH 9.0 での蛍光強度を 1 として標準化した。試行回数 3 回。データは平均  $\pm$  標準偏差。

文献[190]より改変。



**図 23 Pink Flamindo を用いた生細胞イメージング**

- (A) Pink Flamindo を強制発現させた HeLa 細胞に Fsk (100  $\mu$ M)、IBMX (200  $\mu$ M)、DDA (100  $\mu$ M) を順に投与した際の顕微鏡画像および蛍光強度の経時変化。校正棒は 20  $\mu$ m。細胞数 30。
- (B) Pink Flamindo を強制発現させた HeLa 細胞に DDA (500  $\mu$ M) を投与した際の顕微鏡画像および蛍光強度の経時変化。校正棒は 20  $\mu$ m。細胞数 17。
- (C) Pink Flamindo を強制発現させた MIN6 m9 細胞にグルコース (25 mM) を投与した際の顕微鏡画像および蛍光強度の経時変化。校正棒は 20  $\mu$ m。細胞数 15。

データは平均  $\pm$  標準偏差。

文献[190]より改変。



A

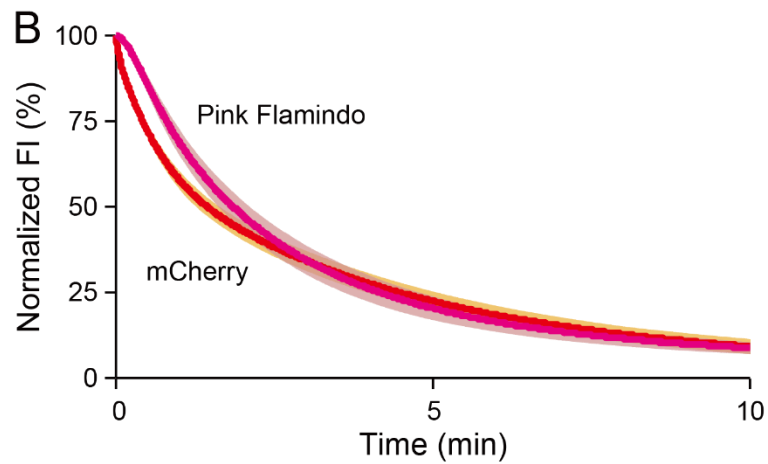
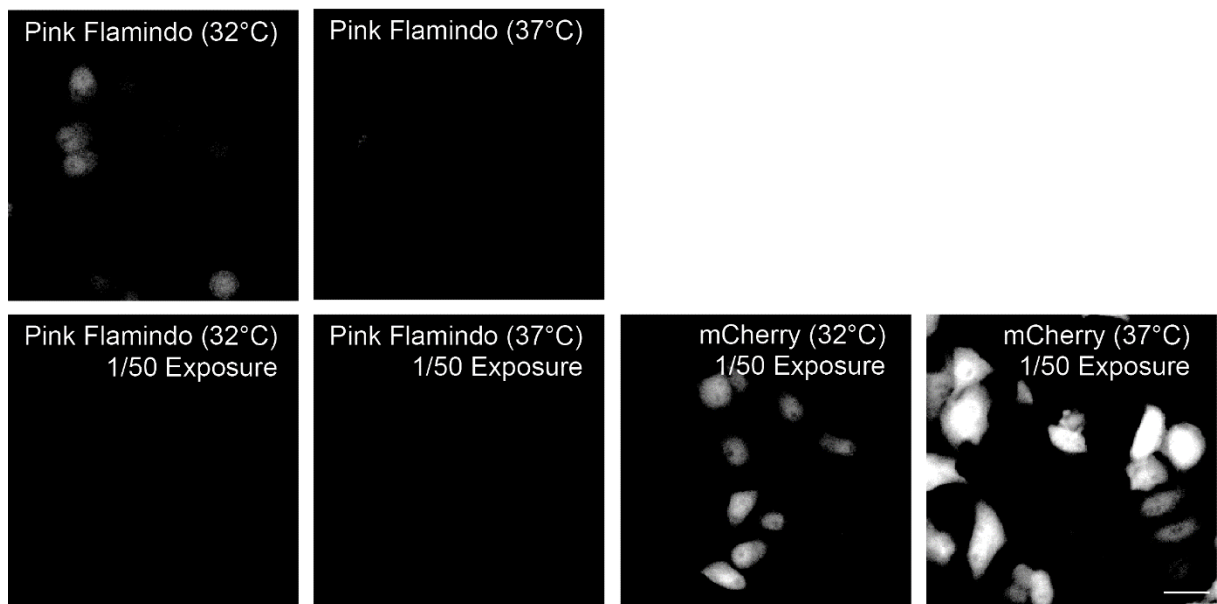


図 24 生細胞における Pink Flamindo の蛍光強度および褪色特性

(A) Pink Flamindo または mCherry を 32°C または 37°C で強制発現させた HeLa 細胞の基底状態における蛍光強度の比較。露光時間 500 ミリ秒 (上) および 10 ミリ秒 (下) で撮影した。校正棒は 30  $\mu\text{m}$ 。

(B) Pink Flamindo または mCherry を 32°C で強制発現させた HeLa 細胞に 2.6 W/cm<sup>2</sup> の緑色光を照射した際の褪色曲線。細胞数 7 以上。

データは平均  $\pm$  標準偏差。

文献[190]より改変。

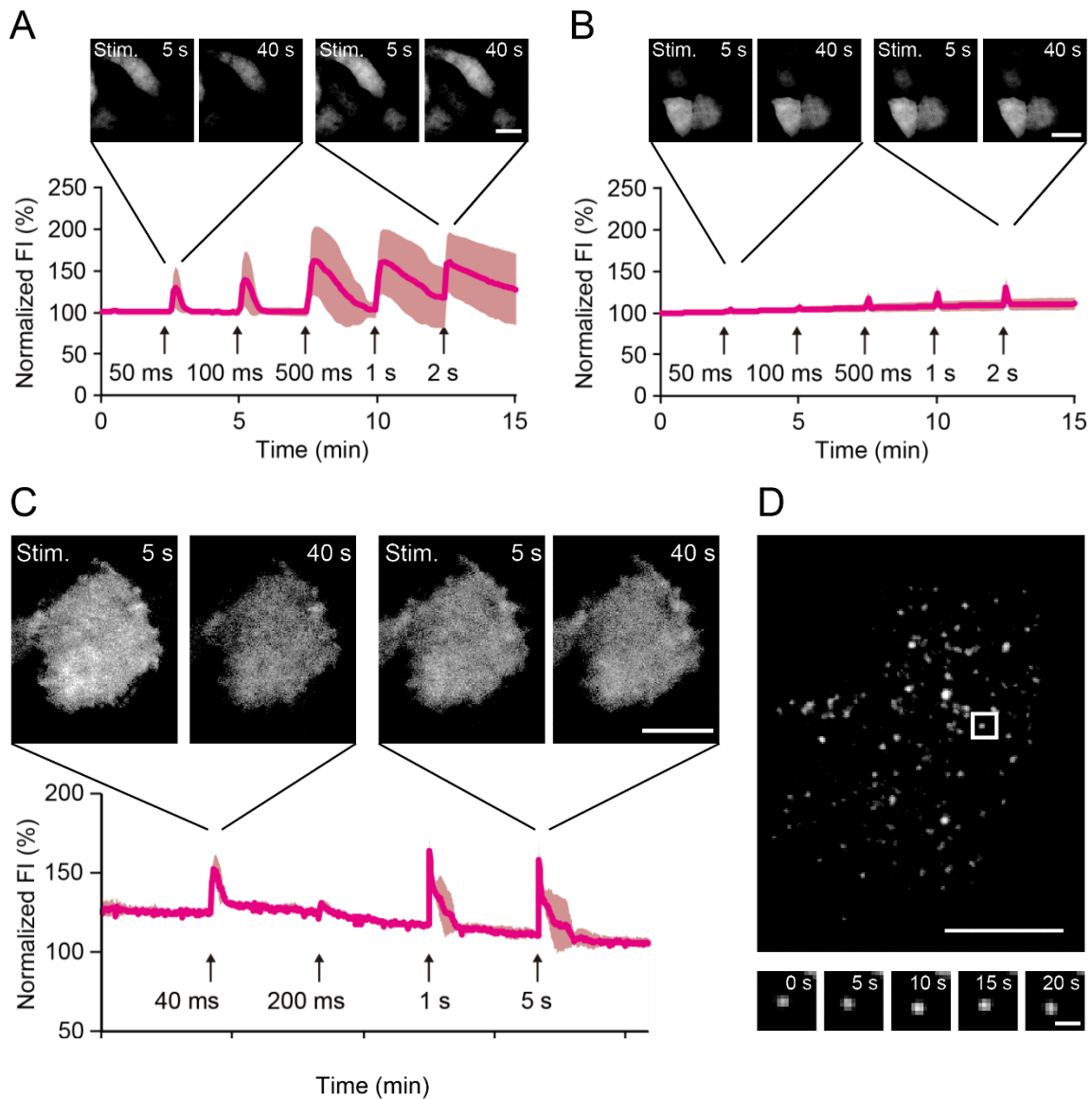


図 25 光活性化アデニル酸シクラーゼと Pink Flamindo を併用した生細胞イメージング  
 (A) Pink Flamindo および EGFP-h\_bPAC を強制発現させた HeLa 細胞に 1.8  $\mu$ W 出力の青色レーザー光を照射した際の顕微鏡画像および蛍光強度の経時変化。校正棒は 20  $\mu$ m。細胞数 23。  
 (B) Pink Flamindo のみを強制発現させた HeLa 細胞に 1.8  $\mu$ W 出力の青色レーザー光を照射した際の顕微鏡画像および蛍光強度の経時変化。校正棒は 20  $\mu$ m。細胞数 14。  
 (C) Pink Flamindo-CAAX および EGFP-h\_bPAC-CAAX を強制発現させた MIN6 m9 細胞に 0.1  $\mu$ W 出力の青色レーザー光を照射した際の顕微鏡画像および蛍光強度の経時変化。校正棒は 10  $\mu$ m。細胞数 3。  
 (D) 上: NPY-mKate および EGFP-h\_bPAC-CAAX を強制発現させた MIN6 m9 細胞に 0.1  $\mu$ W 出力の青色レーザー光を 5 秒間照射した際の全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10  $\mu$ m。下: 上の正方形で囲まれた部分の NPY-mKate 顆粒の経時変化。図 8A の tPA-GFP 顆粒で見られたような蛍光強度の上昇と減衰は見られなかった。校正棒は 1  $\mu$ m。データは平均  $\pm$  標準偏差。

文献[190]より改変。

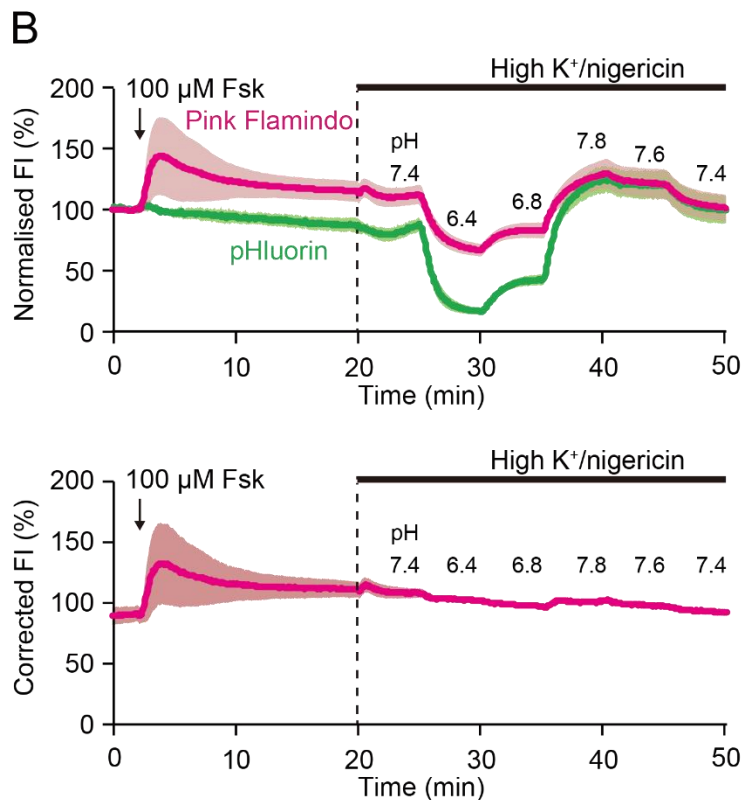
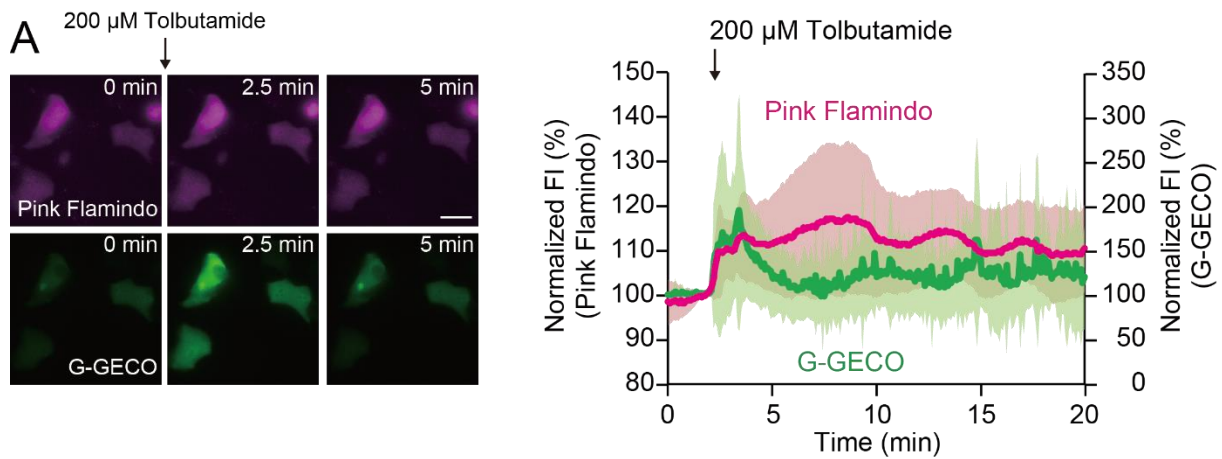


図 26 **Pink Flamindo** を用いた二色イメージングおよび細胞内 pH 変化の影響の解析

(A) Pink Flamindo および G-GECO を強制発現させた MIN6 m9 細胞にトルブタミド (200  $\mu$ M) を投与した際の顕微鏡画像および蛍光強度の経時変化。校正棒は 20  $\mu$ m。細胞数 18。

(B) Pink Flamindo および pHluorin を強制発現させた HeLa 細胞に Fsk (100  $\mu$ M)、続いて HighK<sup>+</sup>/nigericin 溶液を pH7.4、6.4、6.8、7.8、7.6、7.4 の順で投与した際の蛍光強度の経時変化。細胞数 16。

データは平均  $\pm$  標準偏差。

文献[190]より改変。

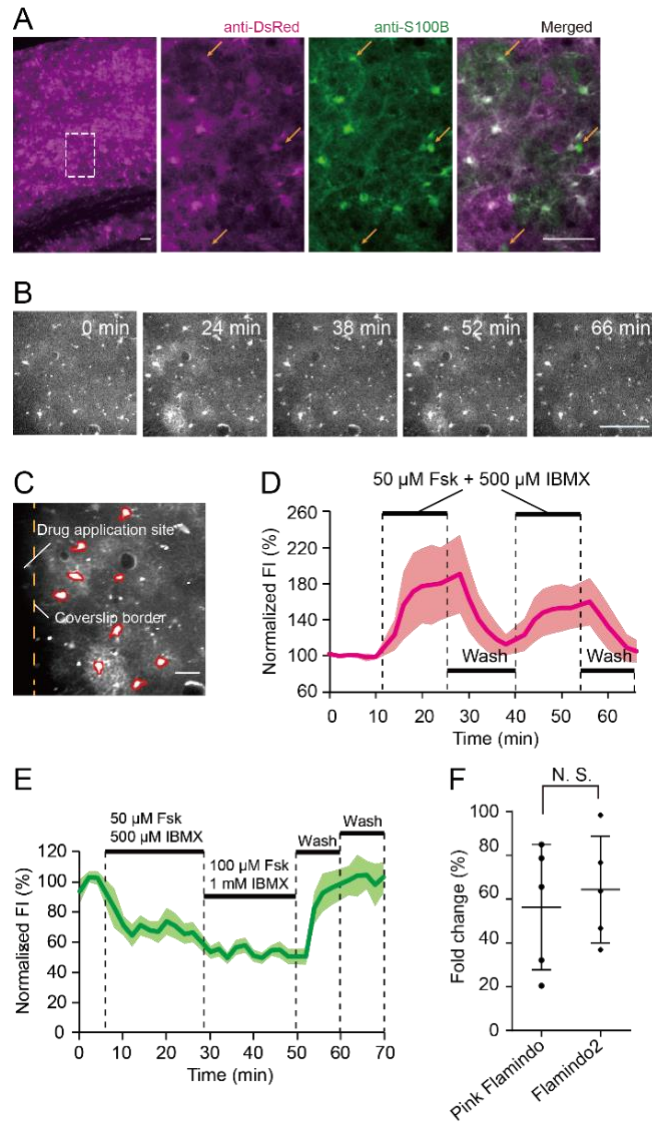


図 27 Pink Flamindo を用いた *in vivo* 二光子顕微鏡イメージング

- (A) Pink Flamindo を発現するアデノ随伴ウイルスベクター導入から 1 か月後の体性感覚野皮質における免疫染色画像。右の 3 つは左の画像の破線で囲まれた部分の拡大画像。Pink Flamindo を発現する細胞 (マゼンタ) の大半は S100B (緑色) 陽性であった。一部の細胞は S100B 陽性であったが Pink Flamindo 陰性であった (矢印)。校正棒は 100  $\mu\text{m}$ 。
- (B) Pink Flamindo を発現するアストロサイトに Fsk (50  $\mu\text{M}$ ) および IBMX (500  $\mu\text{M}$ ) 混合溶液を投与した際の二光子顕微鏡画像。校正棒は 100  $\mu\text{m}$ 。
- (C) B の 24 分時点における解析領域の表示図。赤線で囲まれた部分が解析したアストロサイトを示す。黄色破線はカバーガラスの境界を示す。校正棒は 50  $\mu\text{m}$ 。
- (D) B で示した細胞の蛍光強度の経時変化。細胞数 9。
- (E) Pink Flamindo を発現するアストロサイトに Fsk および IBMX 混合溶液を投与した際の蛍光強度の経時変化。細胞数 9。
- (F) D および E で Fsk (50  $\mu\text{M}$ ) および IBMX (500  $\mu\text{M}$ ) 投与による Pink Flamindo または Flamindo2 の蛍光強度変化から算出した蛍光強度変化率の比較。Welch's *t* test。データは平均  $\pm$  標準偏差。N.S.は有意差なしを示す。

文献[190]より改変。

表3 第4章でRT-PCRに用いたプライマー一覧

遺伝子名 (Accession No.)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, NM_001289726.1)	CCATCACCATCTTCCAGGA G	TTCAGCTCTGGGATGACCT T
Taste receptor type 2 member 104 (Tas2r104, NM_207011)	TGAGTGCAGCTGGAAAGCA TC	AGACTGCTCGGCATAAGCA T
Taste receptor type 2 member 105 (Tas2r105, NM_020501)	TTCCTTCTCATCGGCTTAG CA	ACAGTCAGGTGATTCACAG TCAT
Taste receptor type 2 member 106 (Tas2r106, NM_207016)	CCACATATGGTTGCCTCTG A	AGCCTGTTCAGCTGACTGT
Taste receptor type 2 member 107 (Tas2r107, NM_199154)	TGCTCGGAGTTTATAGGGG ACA	CCAGAGGTAAGCATGTGTG GAA
Taste receptor type 2 member 108 (Tas2r108, NM_020502)	GTCGCAGAATTGCCTCTC C	CCAGAGACTGTTTGCATCC AGA
Taste receptor type 2 member 114 (Tas2r114, NM_207019)	GCAGGCAGATGGAATCAA AT	ACTGCTTCAGCCGACTGTT T
Taste receptor type 2 member 116 (Tas2r116, NM_053212)	CTTTTGCTGTGTCAGTGGT CA	TCTGATGTGGGCCTTAGTG CT
Taste receptor type 2 member 120 (Tas2r120, NM_207023)	TGCATATCTTGGGATGGTG A	GGACCATGGTGCTCTGATC T
Taste receptor type 2 member 130 (Tas2r130, NM_199156)	TCCAGACACCTACAACAG AGG	CAGGGAGATAATCACACAT GCC
Taste receptor type 2 member 136 (Tas2r136, NM_181276)	AGCTATGACTTTCAGTCTA GGCA	AGCCTCATTGTCCTAAGGT GTT
Taste receptor type 2 member 139 (Tas2r139, NM_181275)	AACCCAGCAACTACTGGA AAC	ACCCATGAGACTGCATTCA CA
Taste receptor type 2 member 144 (Tas2r144, NM_001001453)	GTCATAATCCCTTTCGTGG TCTC	TTTGCTCCTGACCCATTCA GT

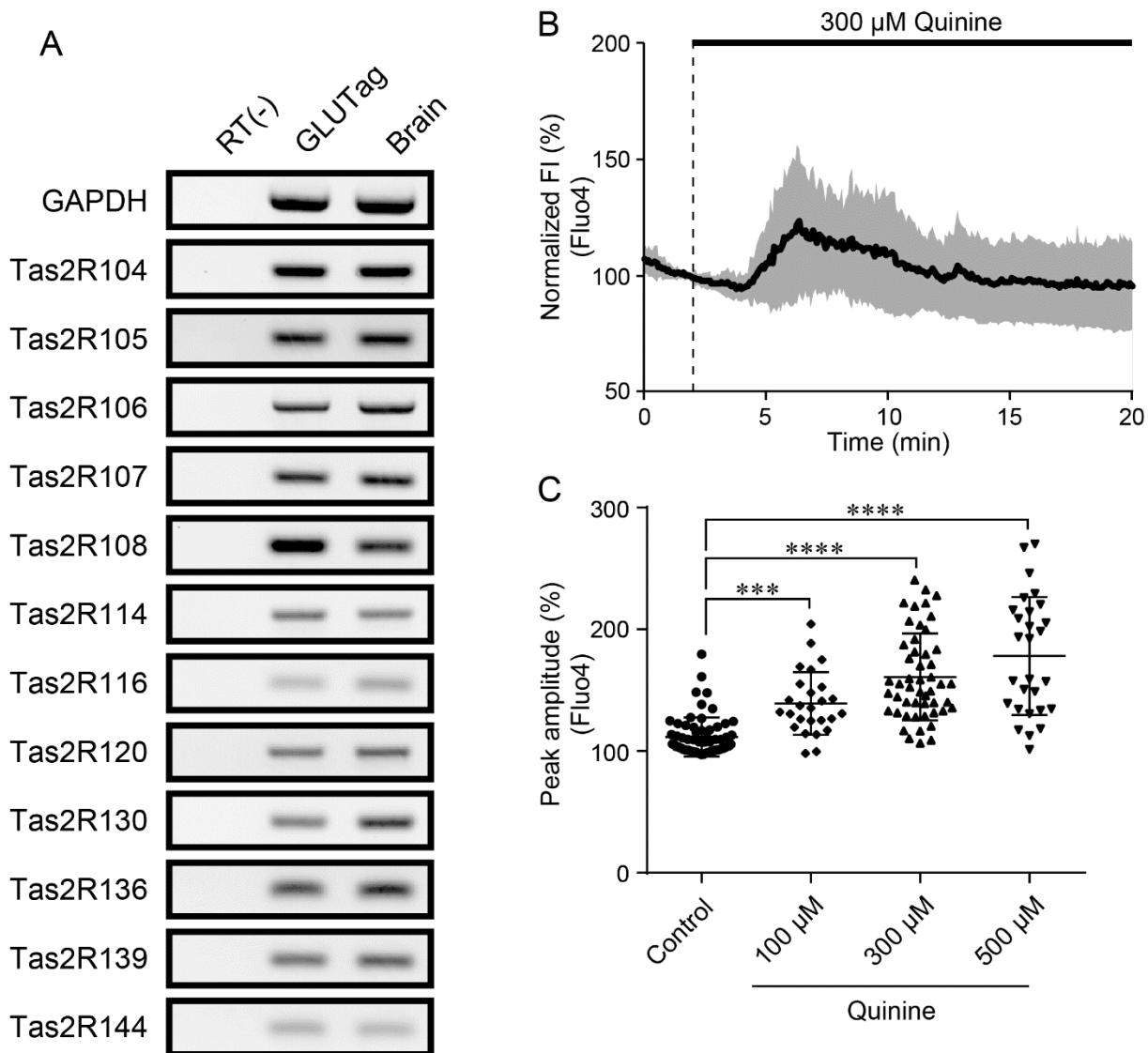


図 28 GLUTag 細胞におけるキニーネ受容体候補の発現、およびキニーネ投与による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態変化

- (A) RT-PCR による Tas2R104、105、106、107、108、114、116、120、130、136、139、144 の発現解析。試行回数 3 回。
- (B) キニーネ (300  $\mu$ M) 投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の蛍光強度経時変化。細胞数 50。
- (C) キニーネ (100  $\mu$ M、300  $\mu$ M、500  $\mu$ M) 投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された蛍光強度ピーク値。細胞数 26 以上。One-way ANOVA および Dunnett's post hoc test。データは平均  $\pm$  標準偏差。\*\*\*は  $P < 0.001$ 、\*\*\*\*は  $P < 0.0001$  を示す。

Harada K., Sakaguchi H., Sada S., Ishida R., Hayasaka Y., Tsuboi T. Bitter tastant quinine modulates glucagon-like peptide-1 exocytosis from clonal GLUTag enteroendocrine L cells via actin reorganization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **500**(3), 723-730, 2018. [191] より改変。

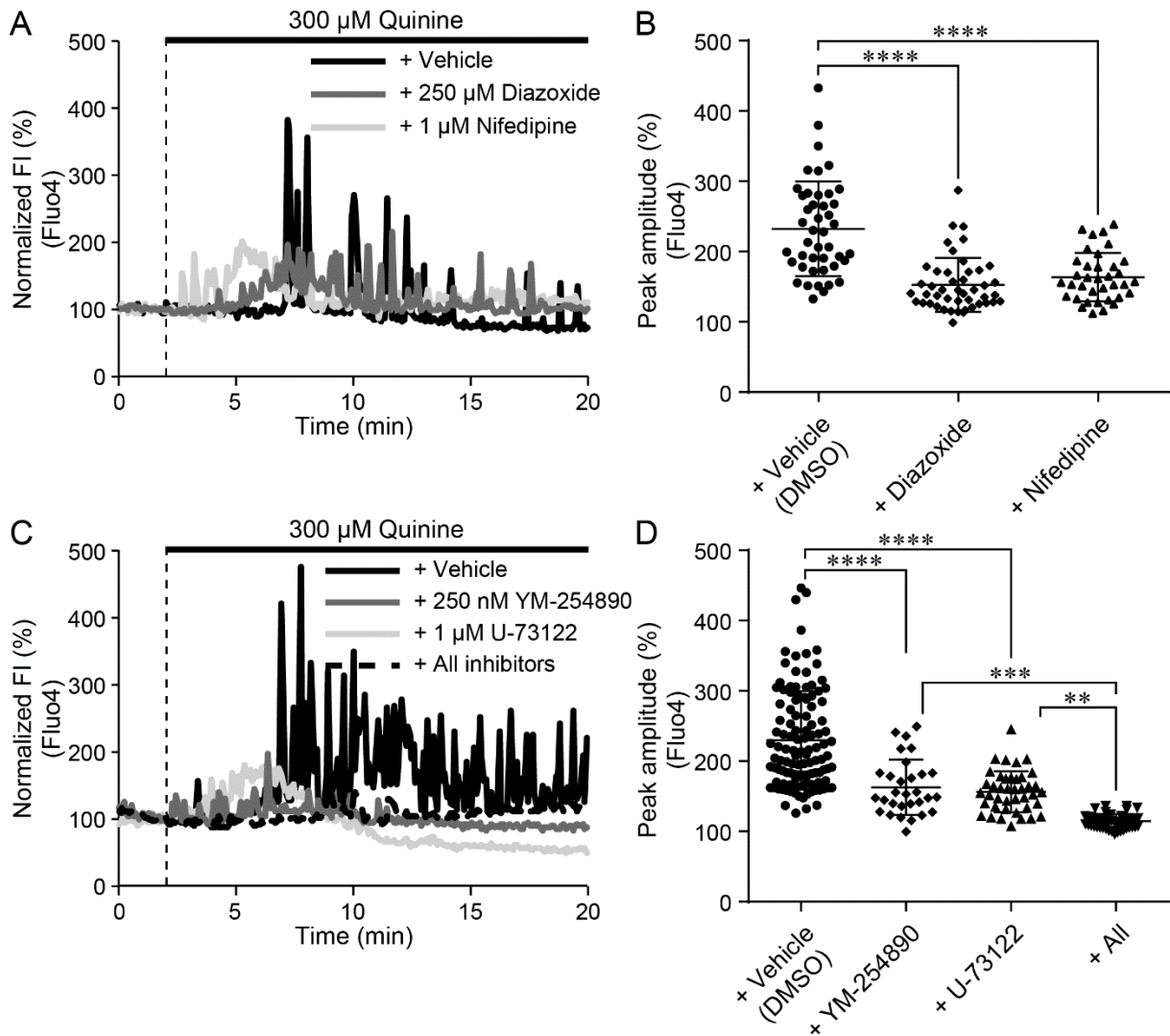
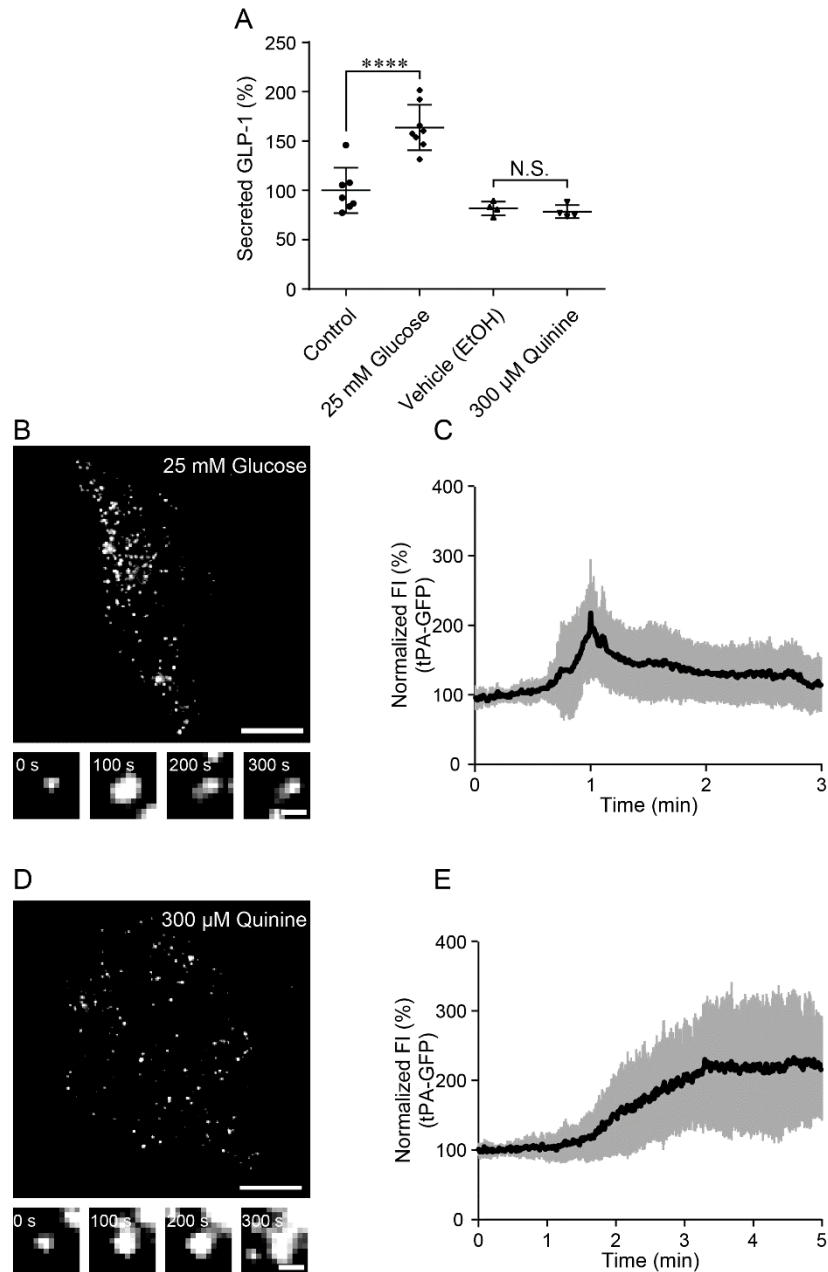


図 29 キニーネによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇における  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネル、PLC の関与

- (A) キニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) およびジアゾキシド (250  $\mu\text{M}$ ) またはニフェジピン (1  $\mu\text{M}$ ) 同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (B) キニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) およびジアゾキシド (250  $\mu\text{M}$ ) またはニフェジピン (1  $\mu\text{M}$ ) 同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された蛍光強度ピーク値。細胞数 36 以上。One-way ANOVA および Dunnett's post hoc test。
- (C) キニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) および YM-254890 (250 nM)、U-73122 (1  $\mu\text{M}$ )、または全阻害剤同時投与時の GLUTag 細胞における Fluo4 の代表的な蛍光強度経時変化。
- (D) キニーネ (300  $\mu\text{M}$ ) および YM-254890 (250 nM)、U-73122 (1  $\mu\text{M}$ )、または全阻害剤同時投与による Fluo4 の蛍光強度から計算された蛍光強度ピーク値。細胞数 30 以上。One-way ANOVA および Tukey's post hoc test。

データは平均  $\pm$  標準偏差。\*\*は  $P < 0.01$ 、\*\*\*は  $P < 0.001$ 、\*\*\*\*は  $P < 0.0001$  を示す。

文献[191]より改変。



**図 30 キニーネによる GLP-1 分泌動態への影響**

- (A) グルコース (25 mM) またはキニーネ (300 μM) 投与による GLUTag 細胞からの GLP-1 分泌量。試行回数 4 回以上。One-way ANOVA および Tukey's post hoc test。
- (B、D) 上：tPA-GFP を強制発現させた GLUTag 細胞にグルコース (B、25 mM) またはキニーネ (D、300 μM) を投与した際の全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10 μm。下：上の正方形で囲まれた部分の tPA-GFP 顆粒の経時変化。校正棒は 1 μm。B では蛍光強度が一過的に上昇したのち拡散しながら減衰する様子が確認されたが、D では確認できなかった。
- (C、E) グルコース (C、25 mM) またはキニーネ (E、300 μM) を投与した際の単一の tPA-GFP 顆粒の蛍光強度の経時変化。顆粒数 19 (C) および 22 (E)。データは平均 ± 標準偏差。N.S.は有意差なし、\*\*\*\*は  $P < 0.0001$  を示す。

文献[191]より改変。



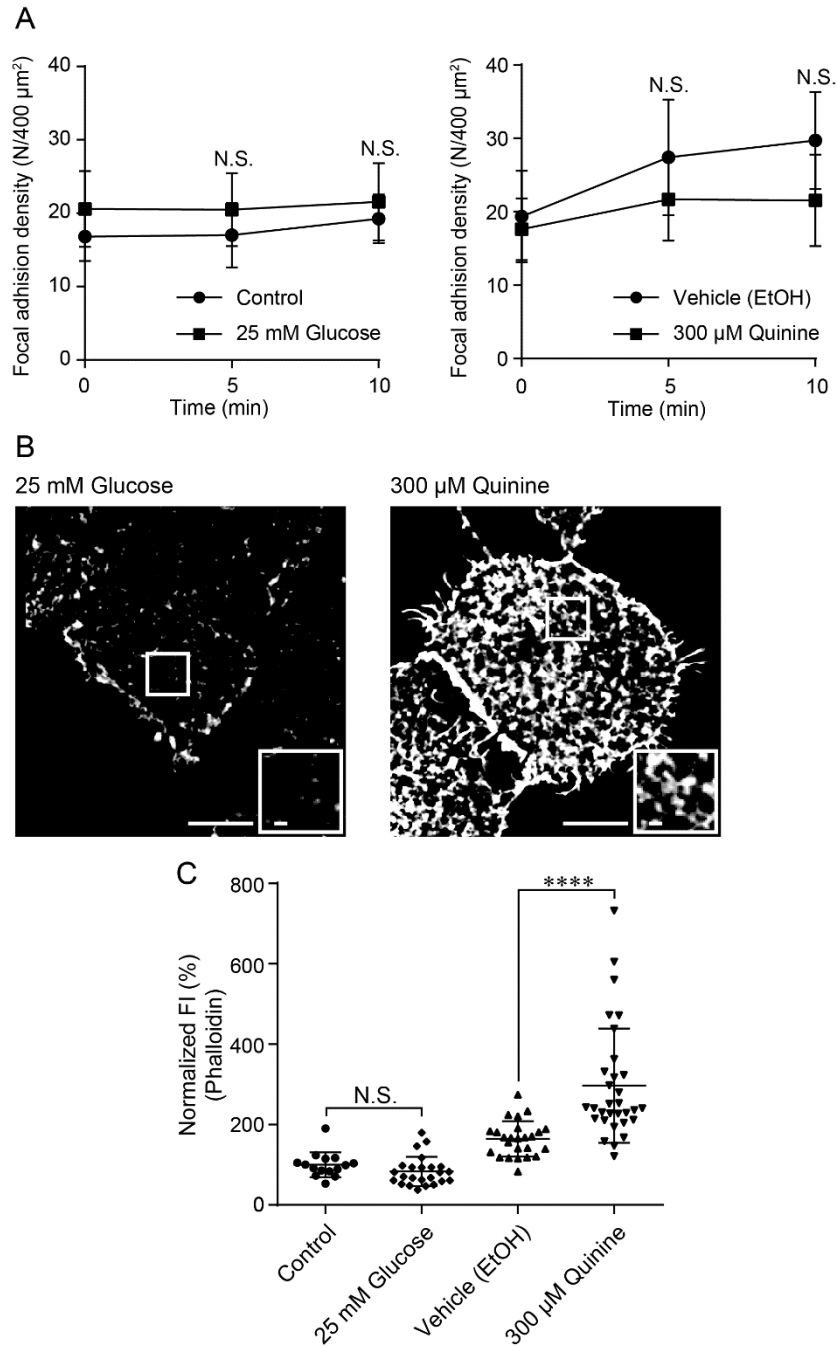


図 31 キニーネによるアクチン骨格再構成

- (A) Lifeact-EGFP を強制発現させた GLUTag 細胞における、グルコース (左、25 mM) またはキニーネ (右、300  $\mu\text{M}$ ) 投与による接着斑密度の変化。細胞数 4 以上。Welch's *t* test。
- (B) GLUTag 細胞にグルコース (左、25 mM) またはキニーネ (右、300  $\mu\text{M}$ ) を投与したのち、Alexa488-ファロイジンで染色したアクチンの全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10  $\mu\text{m}$ 。挿入図は正方形で囲まれた部分の拡大画像。校正棒は 1  $\mu\text{m}$ 。
- (C) Alexa488-ファロイジンで染色した GLUTag 細胞のファロイジンの蛍光強度の比較。細胞数 15 以上。One-way ANOVA および Dunnett's post hoc test。データは平均  $\pm$  標準偏差。N.S.は有意差なし、\*\*\*\*は  $P < 0.0001$  を示す。

文献[191]より改変。

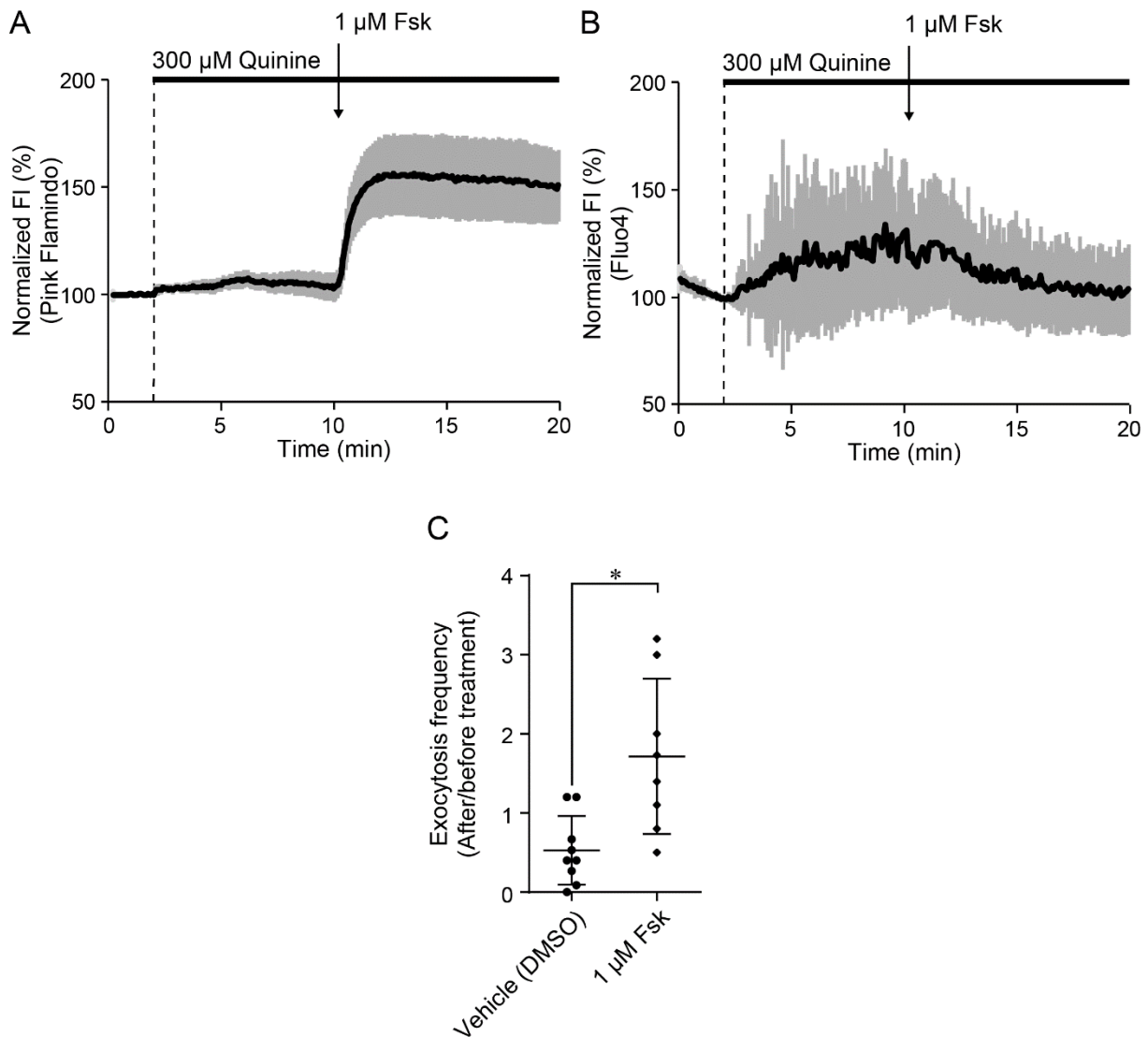


図 32 細胞内 cAMP 濃度上昇時のキニーネに対する応答の変化

- (A) Pink Flamindo を強制発現させた GLUTag 細胞にキニーネ (300  $\mu$ M)、続けて Fsk (1  $\mu$ M) を投与した際の蛍光強度の経時変化。細胞数 34。
- (B) GLUTag 細胞にキニーネ (300  $\mu$ M)、続けて Fsk (1  $\mu$ M) を投与した際の Fluo4 の蛍光強度の経時変化。細胞数 60。
- (C) tPA-GFP を強制発現させた GLUTag 細胞にキニーネ (300  $\mu$ M)、続けて Fsk (1  $\mu$ M) を投与した際の tPA-GFP 開口分泌頻度。Fsk 投与前と投与後での開口分泌頻度比を算出して比較した。細胞数 8 以上。Welch's *t* test。

データは平均  $\pm$  標準偏差。\*は  $P < 0.05$  を示す。

文献[191]より改変。

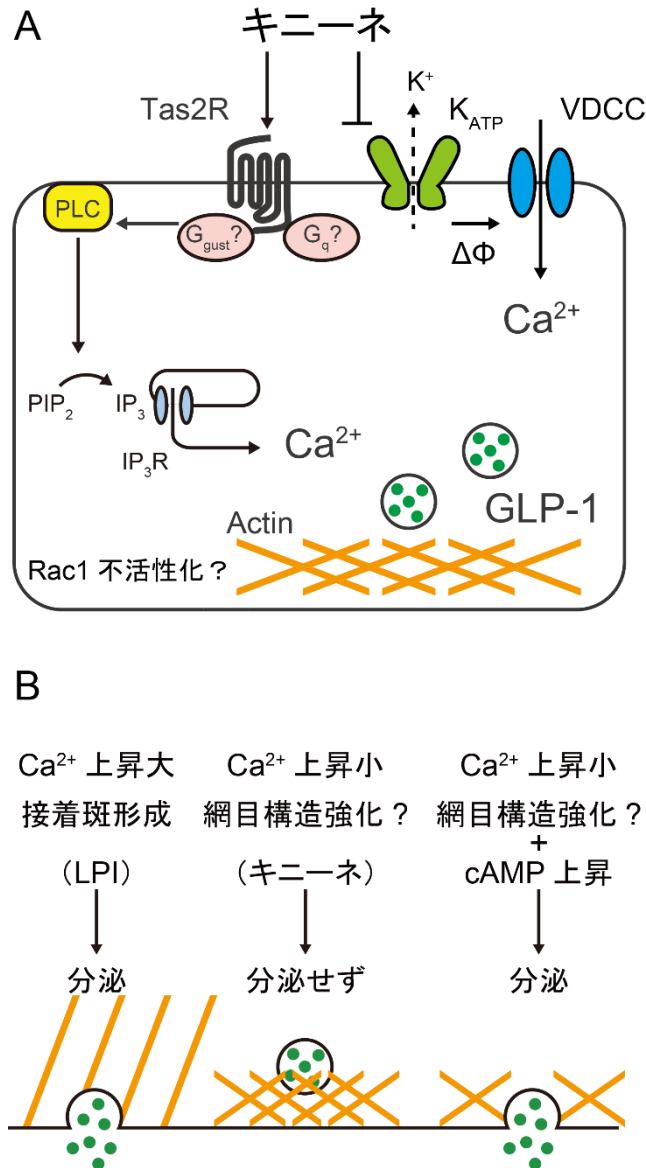
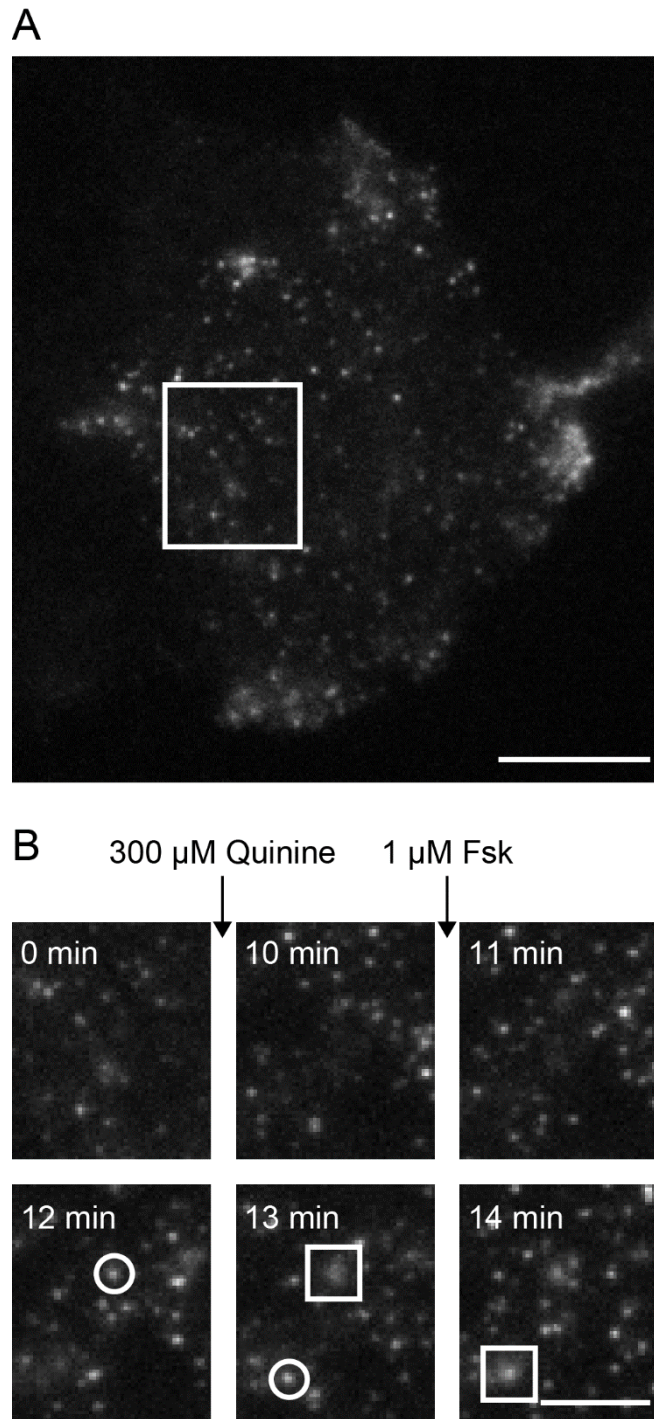


図 33 キニーネによる GLP-1 分泌制御機構モデル

- (A) Tas2R がキニーネを感知して活性化すると、PLC の活性化と  $IP_3$  産生を通じて小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出が起こる。PLC 活性化の制御には  $G_{gust}$  に加えて  $G_q$  タンパク質も関与する可能性がある。また、Tas2R の下流で  $G_q$  タンパク質が活性化している可能性もある。さらに、 $K_{ATP}$  チャネルがキニーネによって阻害され、細胞質内からの  $K^+$  の流出が抑制されることで脱分極が起き、VDCC を介して細胞外から  $Ca^{2+}$  が流入する。しかし、アクチン重合が促進されて GLP-1 分泌小胞の開口分泌が抑制されるため、GLP-1 分泌の促進には至らないと考えられる。アクチンの重合には Rac1 の不活性化が関与している可能性がある。 $\Delta\Phi$ : 脱分極。
- (B) GLP-1 開口分泌に対する  $Ca^{2+}$  および cAMP の関与モデル。第 2 章での LPI 投与時のように、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が大規模かつ持続的に上昇し、アクチン骨格が接着斑形成に向かう形で再構成される場合は、それ単体で GLP-1 開口分泌が促進されるが、第 4 章でのキニーネ投与時のように、 $Ca^{2+}$  濃度上昇が一過的であり、アクチン骨格が網目構造全体の強化に向かう場合は開口分泌に至らないと考えられる。一方その状況下でも、cAMP 濃度上昇が加わると開口分泌を引き起こすことができると考えられる。



**図 34** キニーネに続けて Fsk を投与した際の tPA-GFP 小胞の詳細な動態

(A) tPA-GFP を強制発現させた GLUTag 細胞にキニーネ (300  $\mu$ M)、続けて Fsk (1  $\mu$ M) を投与した際の全反射蛍光顕微鏡画像。校正棒は 10  $\mu$ m。

(B) A の長方形で囲まれた部分の tPA-GFP 顆粒の経時変化。キニーネ投与により tPA-GFP 顆粒が細胞膜に接近するが分泌には至らず、Fsk 投与後初めて細胞膜に接近した顆粒 (○) が速やかに開口分泌 (□) を示した。校正棒は 5  $\mu$ m。