

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

# 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

氏名 原田 一貴

#### 【背景・研究目的】

哺乳類の消化管は、栄養素の吸収や消化液の分泌によって体内のエネルギーバランスを保つだけでなく、体内外の環境変化に応じて様々な消化管ホルモンを分泌しており、全身の神経系、免疫系、内分泌系の機能を調節し、恒常性維持に関与している。消化管上の内分泌細胞のうち、主に小腸下部に分布する小腸内分泌 L 細胞（以下 L 細胞）は、グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) と呼ばれるホルモンを分泌する。L 細胞からの GLP-1 分泌は、消化管内の栄養素や腸内細菌代謝産物、小腸に分布する粘膜下神経叢由来の神経伝達物質や血中のホルモンなど、様々な生理活性物質によって調節されている。分泌された GLP-1 は、膵  $\beta$  細胞に作用してグルコース濃度依存的なインスリン分泌を促進するほか、迷走神経を介して中枢神経系にも作用し、摂食行動を抑制する。そのため、GLP-1 受容体作動薬や GLP-1 を分解するジペプチジルペプチダーゼ 4 (dipeptidyl peptidase-4: DPP-4) の阻害剤が 2 型糖尿病の治療薬として臨床使用されている。

しかし、L 細胞は小腸上皮に数%しか存在せず、動物個体から L 細胞を単離精製し、培養することが非常に困難なため、GLP-1 分泌の素過程にかかわる膜（小胞）輸送タンパク質の機能および細胞内シグナル分子の動態については、その多くが未解明である。そこで、L 細胞由来の株化された培養細胞を用い、細胞機能を高時空間分解能で解析できる生細胞イメージング手法を適用して、L 細胞からの GLP-1 分泌制御機構を明らかにすることを目的とした。

本研究では第一に、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、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングおよび細胞膜近傍のみの蛍光を検出できる全反射蛍光顕微鏡

(total internal reflection fluorescence microscopy: TIRFM) を活用し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、細胞骨格、イオンチャネルの動態観察にもとづく解析を行った。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 cAMP センサー Pink Flamindo を開発し、多重色イメージング、光遺伝学との併用、*in vivo* イメージングへの適用を試みた。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、 $\text{Ca}^{2+}$  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、GLP-1 分泌小胞の挙動に注目した解析を行った。

### 【研究 1 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】

リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルイノシトール (lysophosphatidylinositol: LPI) は、細胞移動や開口分泌に関与しており、肥満症や糖尿病患者において血中濃度上昇が認められている。さらに、LPI を感受する G タンパク質共役型受容体 GPR55 は、膵  $\beta$  細胞においてインスリン分泌に関与する。しかし、L 細胞における GPR55 の発現や、インスリン分泌を制御するホルモンである GLP-1 と LPI の関係は未解明であるため、その解明を試みた。

$\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素 Fluo4 を用い、LPI 投与によりマウス L 細胞由来細胞株 GLUTag 細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) が上昇することを見出した。また ELISA 法を用い、GLUTag 細胞およびマウス急性単離初代培養小腸において、LPI 投与による GLP-1 分泌量の増加を見出した。さらに、GFP を融合させた組織型プラスミノゲン活性化因子 (green fluorescent protein-tagged tissue plasminogen activator: tPA-GFP) が GLP-1 分泌小胞と共局在する性質を利用し、tPA-GFP を GLUTag 細胞に遺伝子導入し、TIRFM で観察したところ、LPI 投与により tPA-GFP の開口分泌頻度が増加した。

次に RT-PCR 法により、GLUTag 細胞において GPR55 の発現を mRNA レベルで見出した。GPR55 の選択的アンタゴニスト投与や、RNA 干渉法を用いた GPR55 の発現抑制により、LPI による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が抑制された。また、アクチン動態を可視化できる蛍光タンパク質 Lifeact-EGFP を GLUTag 細胞に遺伝子導入し、TIRFM で観察したところ、重合したアクチン骨格の先端に見られる接着斑の密度が増加した。さらに、イオンチャネルの一種である transient receptor potential cation channel subfamily V member 2 (TRPV2) を阻害、または発現抑制すると、LPI による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇および GLP-1 分泌が抑制された。GFP を融合させた TRPV2 (TRPV2-GFP) を GLUTag 細胞に遺伝子導入し、TIRFM を用いて観察を行ったところ、LPI の投与に伴う細胞膜の蛍光強度上昇が観察され、TRPV2 の細胞膜への移行が示唆された。またこの反応は、GPR55 の阻害によって抑制された。

以上から、L 細胞において、LPI により GPR55 が活性化され、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇とアクチン骨格の再構成が誘発されることに加え、TRPV2 が細胞膜へ移行することで持続的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こし、GLP-1 分泌を促進すると示唆された。

### 【研究 2 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】

環状アデノシンリン酸 (cyclic adenosine monophosphate: cAMP) は、細胞分化や移動、開口分泌の制御に関与する細胞内セカンドメッセンジャーである。従来、フォルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer : FRET) を利用した 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。しかし、FRET 型センサーは 2 つの波長の光を用いて励起および蛍光取得が必要であり、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。そこで、1 波長のみによる励起および蛍光取得で cAMP 動態を可視化でき、多重色イメージングや、青色光で活性化する光受容体タンパク質を用いた光遺伝学との併用にも適用可能な、赤色蛍光タンパク質を基盤とした単色輝度変化型 cAMP センサーの開発を行った。

発色団付近で分割した赤色蛍光タンパク質 mApple に、マウス exchange protein directly activated by cAMP 1 (Epac1) の cAMP 結合ドメインを挿入し、配列の最適化により、赤色 cAMP 可視化センサー Pink Flamindo (Pink fluorescent cAMP indicator) を開発した。Pink Flamindo は、試験管内で cAMP との結合により蛍光輝度が約 4.2 倍に上昇した。

開発した Pink Flamindo を生細胞に遺伝子導入した結果、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞や、マウス膵  $\beta$  細胞株 MIN6 m9 細胞において薬理刺激や生理的刺激への応答が確認された。また、緑色  $\text{Ca}^{2+}$  センサー G-GECO との同時観察や、青色光照射で活性化し cAMP を合成する光活性化アデニル酸シクラーゼとの併用にも成功した。さらに、生きたマウス脳内のグリア細胞の一種アストロサイトで Pink Flamindo による cAMP 動態の *in vivo* 二光子顕微鏡イメージングにも成功した。

以上から、Pink Flamindo は、従来の 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るだけでなく、*in vivo* イメージング実験にも使用可能であり、生きた生体中を含む様々な細胞において有効なツールであることが示された。

### 【研究 3 キニーネによる GLP-1 分泌制御機構】

キニーネは苦味物質の一種である。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とされている。そこで、消化管に取り込まれたキニーネが GLP-1 分泌の促進を介して体重増加を抑制する可能性を考え、キニーネが GLP-1 分泌に与える影響の解明を試みた。

GLUTag 細胞において Fluo4 を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行ったところ、キニーネ投与により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が見られたにもかかわらず、GLP-1 の分泌量は増加しなかった。TIRFM を用いて tPA-GFP 顆粒の動態に着目すると、キニーネ投与によって顆粒が細胞膜に接近するものの、細胞膜に係留されたまま膜融合に至らなかった。

蛍光標識ファロイジンを用いた GLUTag 細胞のアクチン染色の結果、キニーネによりアクチン重合が促進していることが示唆された。アクチン重合により GLP-1 分泌小胞の膜融合が抑制され、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇だけでは GLP-1 開口分泌に至らなくなっていると推測し、GLP-1 開口分泌には細胞内 cAMP 濃度 ( $[\text{cAMP}]_i$ ) の上昇も必要なのではないかと考えた。研究 2 で開発した Pink Flamindo を GLUTag 細胞に導入し、アデニル酸シクラーゼの活性化剤フォルスコリンをキニーネに続けて投与すると、キニーネ単体では観察されなかった  $[\text{cAMP}]_i$  上昇が誘発され、tPA-GFP の開口放出頻度も増加した。

以上から、キニーネは  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こすが、同時にアクチン重合を促進し、GLP-1 分泌の促進には至らず、キニーネによる体重増加抑制効果は GLP-1 分泌以外の作用を介する

こと、また GLP-1 の分泌には  $\text{Ca}^{2+}$  と cAMP の両者が協同的に関与することが示唆された。

### 【考察・結論】

以上の研究から、小腸内分泌 L 細胞からの GLP-1 分泌が  $\text{Ca}^{2+}$  や cAMP などの細胞内シグナル分子、細胞骨格、イオンチャネルによって厳密に制御されていることが示唆された。また、本研究で開発した Pink Flamindo をはじめとする単色輝度変化型分子センサーは、生細胞において多重色蛍光イメージング、光遺伝学に有効であることが示された。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様々な細胞機能解析に対する有用性を示し、将来性にも富んだものといえる。

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残されている。本研究で GLP-1 分泌動態の解析に用いた GLUTag 細胞は株化された細胞であり、生体中の消化管環境を必ずしも再現していない。動物個体に近い生理環境での解析を行うにあたって、生きた動物個体内での蛍光観察を可能にする *in vivo* イメージングを消化管内分泌細胞にも適用することが選択肢の一つである。本研究で開発した Pink Flamindo が *in vivo* イメージングに有効であったことから、細胞機能を制御する他の分子に対しても同様の単色輝度変化型分子センサーの開発と、体内深部の消化管や内分泌器官での *in vivo* イメージングの観察系の構築により、これまで解明できなかった生理現象の解明が期待できる。また、GLP-1 分泌小胞の開口分泌動態を網羅的かつ定量的に解析できるツールが開発されれば、本研究で取得した TIRFM のデータをもとに、細胞内の各種シグナル分子や開口分泌に関与するタンパク質の関与をより詳細に明らかにでき、代謝疾患に対する新たな治療方策の確立に結びつく可能性がある。

今後、上記の課題を克服する知識と技術の統合により、消化管ホルモンや性ホルモンなど、全身の恒常性から行動までを制御するホルモンの分泌調節について、分子レベルでのメカニズムに迫りつつも全身でののはたらきと意義まで俯瞰した、包括的な解析が達成されることを期待する。