

消化管内分泌細胞のうち、主に小腸下部に存在する小腸内分泌 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。GLP-1 分泌は、消化管内の栄養素や腸内細菌代謝産物、神経伝達物質や血中のホルモンなどによって調節されている。しかし、L 細胞は単離精製が困難なため、GLP-1 分泌の素過程にかかわるタンパク質の機能および細胞内シグナル分子の動態の多くが未解明である。本論文は、L 細胞由来の株化細胞である GLUTag 細胞を用い、生細胞イメージング手法により GLP-1 の分泌制御機構を明らかにしたものである。

第一に、脂質の一種リゾホスファチジルイノシトール（lysophosphatidylinositol: LPI）による GLP-1 分泌制御機構を解析した。LPI により GLUTag 細胞内で  $Ca^{2+}_i$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) が上昇することを見出し、ELISA 法を用い、GLUTag 細胞およびマウス急性単離小腸において、LPI による GLP-1 分泌量の増加を見出した。また全反射蛍光顕微鏡を用いた観察から、LPI によりアクチン骨格が再構成され、接着斑の密度が増加すること、イオンチャネルの一種 transient receptor potential cation channel subfamily V member 2 (TRPV2) が細胞膜へ移行して  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と GLP-1 分泌を引き起こすことが示唆された。

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、生細胞においても薬理刺激や生理的刺激への応答が確認された。さらに、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も可能であり、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。

第三に、苦味物質の一種キニーネによる GLP-1 分泌制御機構を解析した。キニーネ投与により GLUTag 細胞内で  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が起こったが、GLP-1 分泌顆粒の膜融合に至らず、GLP-1 分泌量も増加しなかった。蛍光標識ファロイジンを用いた染色の結果、キニーネによりアクチン重合が促進され、GLP-1 分泌顆粒の膜融合が抑制されていると示唆された。GLP-1 開口分泌には細胞内 cAMP 濃度 ( $[cAMP]_i$ ) の上昇も必要と考え、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  $[cAMP]_i$  上昇が誘発され、開口放出頻度も増加した。以上から、キニーネは  $[Ca^{2+}]_i$  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、GLP-1 の分泌には  $Ca^{2+}$  と cAMP の両者が協同的に関与することが示唆された。

本論文は、全反射蛍光顕微鏡やシグナル分子センサーなどの生細胞イメージング技術により、様々な生理活性物質による GLP-1 分泌制御機構を、シグナル分子、分泌顆粒、細胞骨格の協同作用という観点から高時空間分解能で可視化解析することに成功した。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。