

## 論文の内容の要旨

# 緑色蛍光型グルコースセンサーによる 生体内グルコース動態の可視化解析

三田真理恵

### 【背景と目的】

グルコースは、動物にとって最も重要なエネルギー源である。血液を介して全身に運ばれたグルコースは、全身の細胞内でそれぞれ利用される。例えば、脳の神経細胞や筋細胞、そして肝細胞では、他の臓器の細胞よりも多くのグルコースを必要とする。これらの細胞がグルコースを細胞内に取り込むためには、膵臓のランゲルハンス島に存在する  $\beta$  細胞から分泌される、インスリンの作用が必要である。このインスリンは、膵  $\beta$  細胞が血中グルコース濃度を感受することで分泌される。以上のような、各種細胞ごとのグルコースへの応答性を解明するためには、単一細胞レベルでの細胞内グルコース濃度変化のライブセルイメージング解析が必要不可欠である。

蛍光タンパク質を利用したライブセルイメージング用の分子センサーには、Förster 共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer; FRET) 型と単色蛍光型の2種類が存在する。これまでに FRET 型グルコースセンサー (FLIPglu-170nDelta13) により細胞内のグルコース動態の可視化が達成されていた。しかしこの FRET 型センサーは、2種類の蛍光を検出する必要があるため、細胞内での微細なグルコース濃度変化や、他の細胞内分子とグルコースとの相互作用の解析には不向きである。

そこで本研究では、高時空間分解能で細胞内のグルコース動態を可視化解析でき、多重色蛍光イメージングに適している、単色蛍光型の緑色蛍光型グルコースセンサーの開発を行った。そして、このグルコースセンサーを各種細胞やモデル生物に導入し、グルコース動態をリアルタイムに可視化解析した。

## 【第1章：緑色蛍光型グルコースセンサーの開発手法】

緑色蛍光型グルコースセンサーは、緑色蛍光タンパク質 Citrine と、大腸菌の MglB 由来のグルコース結合ドメイン配列を融合して構築した。各ドメインの間には、ロイシンジッパー由来のリンカーアミノ酸配列を融合した。リンカーアミノ酸配列の長さを調節することで、グルコースの添加によって蛍光輝度が1.6倍に増加する変異体を取得した。続いて、リンカーアミノ酸配列の種類を最適化することで、蛍光輝度が3.3倍に増加する変異体を取得した。さらに、センサーの汎用性を高めるため、MglB内のグルコース認識に関与するアミノ酸に変異を導入した。一連の配列最適化により、グルコース添加による輝度変化が約7倍と大きく、生細胞内のさまざまな濃度範囲に対応できる3種類の緑色蛍光型グルコースセンサー（Green Glucose indicating fluorescent protein; Green Glifon）の獲得に成功した（図1）。開発の過程で、リンカーアミノ酸配列の長さや種類が Green Glifon の蛍光輝度変化に密接に関与することと、結合ドメインへの変異導入によって Green Glifon のグルコースへの結合能を調節できることが分かった。

開発した3種類の Green Glifon について、グルコースへの親和性の指標となる EC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 44 μM (Green Glifon 50)、590 μM (Green Glifon 600)、3800 μM (Green Glifon 4000) だった。グルコース検出における信頼区間の指標となるワーキングレンジは、8.1~240 μM (Green Glifon 50)、120~2.8 mM (Green Glifon 600)、0.92~15 mM (Green Glifon 4000) だった。3種の Green Glifon を併せると、8.1 μM~15 mM の濃度範囲のグルコースを定量的に検出できることが分かった。

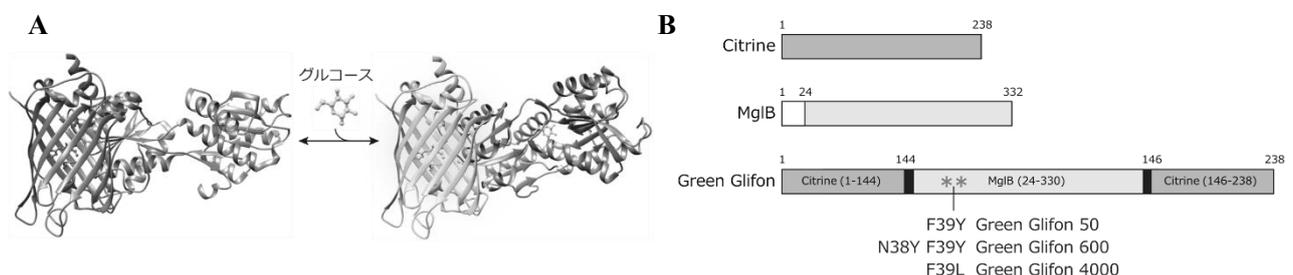


図1 緑色蛍光型グルコースセンサー-Green Glifon

(A) 構造予想図。グルコースの結合により、蛍光輝度が上昇する。

(B) 配列模式図。結合ドメインへの変異導入により、3種類のセンサーを獲得した。

## 【第2章：生細胞でのグルコースイメージング】

生細胞に Green Glifon を導入し、その性能を評価した。各種 Green Glifon を発現する HeLa 細胞では、細胞外液のグルコース濃度を変えることで、蛍光輝度の増減を通して、細胞内のグルコース濃度変化を可視化できた。この蛍光輝度変化は、グルコーストランスポーター阻害剤の投与によって抑制されることから、細胞外のグルコース濃度変化により、細胞内グルコース濃度が速やかに変化することが示唆された。Green Glifon 遺伝子に、細胞膜（細胞質側）、核内、ミトコンドリア内腔への局在化シグナル配列をそれぞれ融合すると、細胞小器官特異的に発現させることができ、細胞小器官に特異的なグルコース動態を可視化できた（図2A）。マウス膵β細胞由来細胞株である MIN6 m9 細胞内では、単一細胞内での2分子同時解析を実現し、単一細胞内でグルコースと Ca<sup>2+</sup>の同時可視化が可能であることを示した（図2B）。

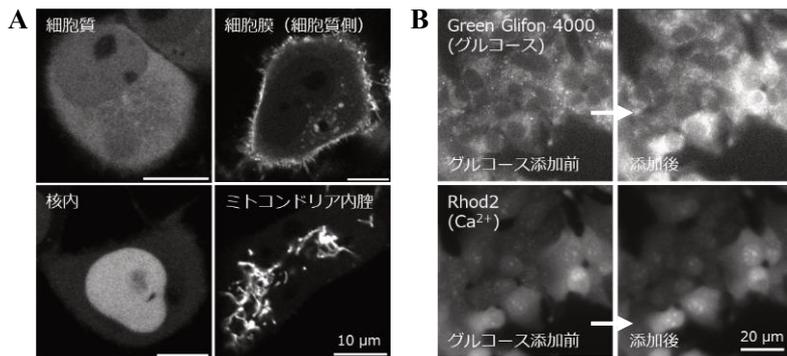


図2 生細胞イメージングへの適用

- (A) HeLa 細胞での局在型 Green Glifon 600 の局在の様子。  
 (B) MIN6 m9 細胞での 2 色イメージングの様子。左はグルコース添加前、右は添加後の細胞。

### 【第3章：各組織におけるグルコース動態解析】

Green Glifon を用いて、さまざまな組織や細胞種、あるいは血液中のグルコース濃度変化を解析した。

#### 線虫での *in vivo* イメージング

線虫に、プラスミドをマイクロインジェクションし、咽頭筋に Green Glifon 4000 を発現する F2 個体を得た。咽頭筋の蛍光輝度は、フルクトース刺激では変化せず、グルコース刺激によってのみ上昇することが分かった (図 3)。このことから、Green Glifon を用いることで、線虫体内におけるグルコース特異的な輝度変化を検出できることが分かった。

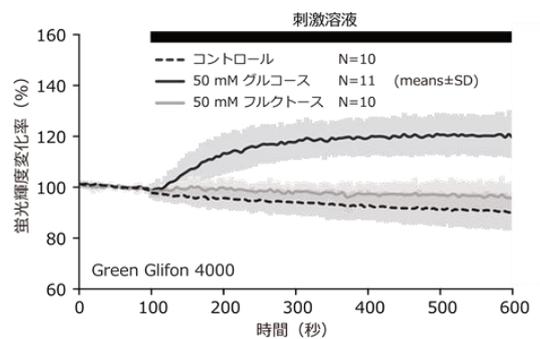


図3 線虫咽頭筋でのグルコース動態

#### マウス血糖値の測定

マウス 6 匹からマウス血漿を回収し、それを 1/1000 希釈したサンプルを 96 ウェルプレート上で Green Glifon 50 と混合して蛍光を測定した。既知のグルコース濃度での Green Glifon 50 の蛍光輝度変化率から作成した検量線に、マウス血漿由来の蛍光値を導入することで、血糖値を測定できることが分かった。血糖値計で測定した血糖値との相対誤差は 20% 以内であり、Green Glifon は、微量の血漿から血糖値を測定できることが分かった。

#### 人工甘味料の膵 $\beta$ 細胞への作用

人工甘味料 (スクラロース、アスパルテーム、アセスルファム K) は、膵  $\beta$  細胞内の  $Ca^{2+}$  や ATP 濃度を上昇させ、インスリン分泌を促進する。しかし、細胞内グルコース動態との関連は不明である。マウス膵  $\beta$  細胞株である MIN6 m9 細胞にグルコース存在下で人工甘味料を投与すると、 $Ca^{2+}$  上昇に加えて細胞内グルコース濃度が上昇し、細胞外からのグルコース取り込みが亢進されることを見出した (図 4)。一方、グルコース非存在下での人工甘味料投与は、細胞内  $Ca^{2+}$  上昇のみを引き起こした。

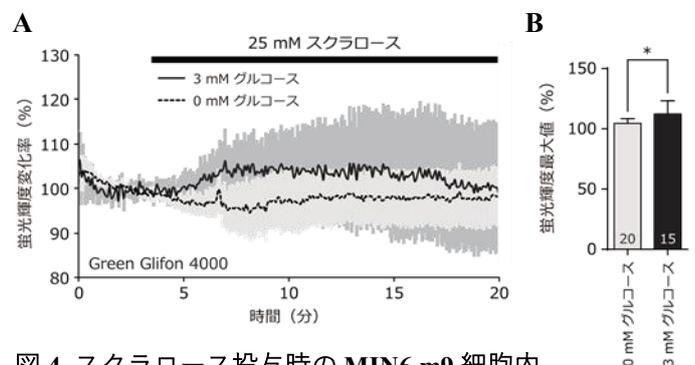


図4 スクラロース投与時の MIN6 m9 細胞内グルコース動態

- (A) Green Glifon 4000 の輝度変化。  
 (B) 蛍光輝度最大値の検定結果。\*は  $p < 0.05$ 、means  $\pm$  SD。

### 小腸内分泌 L 細胞への人工甘味料による作用

人工甘味料スクラロースは、腸管からの GLP-1 (glucagon-like peptide-1) 分泌を促進するが、細胞内グルコース動態に与える影響や、スクラロースがどの受容体に感知され、どのようなシグナル経路を辿るかは不明である。マウス小腸内分泌 L 細胞株である GLUTag 細胞にて、スクラロース投与時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、cAMP、グルコース動態をそれぞれ観察したところ、 $\text{Ca}^{2+}$ だけでなく、cAMP とグルコース濃度も上昇することを見出した。膵  $\beta$  細胞での結果と同様に、スクラロース投与によってグルコース取り込みが速やかに促進される可能性を見出した。また、7 回膜貫通型受容体の一種であるカルシウムセンシングレセプター (CaSR)、 $G_q$  タンパク質、アデニル酸シクラーゼをそれぞれ阻害すると、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に cAMP 濃度が上昇すること、 $G$  タンパク質型受容体の一種である CaSR を介して cAMP 濃度が上昇すること、CaSR 以外の  $G$  タンパク質型受容体を介して  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇することがわかった。これらのシグナルによって、グルコーストランスポーターの膜移行が促進され、グルコース取り込みが促進することが示唆された。

### 神経・グリア細胞でのイメージング条件検討

脳内のエネルギー恒常性と神経活動の関係については、いまだに不明な点が多い。その理由として、神経細胞とグリア細胞という性質の異なる細胞が、お互いのはたらきを調節していることが挙げられ、2 細胞間でのエネルギー源のやりとりを、リアルタイムで可視化解析した例はない。そこで、Green Glifon をレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターにクローニングし、初代培養した神経細胞とグリア細胞に発現させることを試みた。その結果 Green Glifon は、プロモーター配列に応じて、それぞれの細胞特異的に発現できることが分かった。

### **【総括】**

本研究では、緑色蛍光型グルコースセンサー Green Glifon の開発に成功した。Green Glifon を用いたライブセルイメージングによって、さまざまな細胞において、細胞内のグルコース濃度が速やかに変化することが分かった。また、膵  $\beta$  細胞や小腸内分泌 L 細胞では、人工甘味料の刺激により、細胞内へのグルコース取り込みが促進することを見出した。さらに Green Glifon は、線虫の咽頭筋という、生きている個体内でのグルコース濃度の測定や、血漿を用いた血糖値測定にも利用できることが分かった。今回開発した Green Glifon を用いた生細胞や生体内でのグルコース動態の可視化技術は、さまざまな組織に適用可能であると考えられる。Green Glifon は、ガンや免疫疾患などの病態解明や、生体恒常性の維持機構の解析など、さまざまな分野で貢献できると考えている。