

博士論文（要約）

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

目次

第1章 緑色蛍光型グルコースセンサーの開発手法	5
1.1 序論.....	5
1.1.1 生体とグルコース	5
1.1.2 蛍光タンパク質型分子センサーによる可視化技術	5
1.1.3 単色蛍光型分子センサーの開発手法	6
1.2 方法.....	10
1.2.1 グルコースセンサーのプロトタイプ構築	10
1.2.2 リンカーアミノ酸配列の長さの最適化	10
1.2.3 リンカーアミノ酸配列の種類の最適化	10
1.2.4 グルコースへの結合能調整	11
1.2.5 リコンビナントタンパク質の精製	11
1.2.6 グルコースへの濃度依存性の測定	11
1.2.7 励起・蛍光スペクトルの取得	12
1.2.8 pH 依存性の測定	12
1.2.9 グルコース以外の分子への応答性測定	12
1.2.10 吸収スペクトルの測定	12
1.2.11 データ解析	12
1.3 結果.....	17
1.3.1 緑色蛍光型グルコースセンサーの開発	17
1.3.2 緑色型グルコースセンサーの各種性質測定	18
1.4 考察.....	27
1.4.1 緑色蛍光型グルコースセンサーの開発手法	27
1.4.2 緑色蛍光型グルコースセンサーの濃度依存性	28
1.4.3 緑色蛍光型グルコースセンサーの励起・蛍光スペクトル	29
1.4.4 緑色蛍光型グルコースセンサーの pH 依存性	30
1.4.5 緑色蛍光型グルコースセンサーの分子選択性	30
1.4.6 緑色蛍光型グルコースセンサーの吸収スペクトル	30
第2章 生細胞でのグルコースイメージング	34
2.1 序論.....	34
2.1.1 生細胞へのセンサー適用とその意義	34

2.2	方法	35
2.2.1	細胞発現用プラスミドの構築	35
2.2.2	株化細胞の培養	35
2.2.3	細胞への遺伝子導入	36
2.2.4	細胞内でのグルコースイメージング	36
2.2.5	グルコース取り込みの阻害	36
2.2.6	局在型グルコースセンサーの細胞内局在	37
2.2.7	グルコースと Ca^{2+} の同時イメージング	37
2.2.8	イメージングデータの解析	37
2.3	結果	39
2.3.1	HeLa 細胞でのグルコースイメージング	39
2.3.2	局在型グルコースセンサーによるイメージング	39
2.3.3	MIN6 m9 でのグルコース・ Ca^{2+} 同時イメージング	39
2.4	考察	48
2.4.1	HeLa 細胞でのグルコースイメージング	48
2.4.2	局在型グルコースセンサーによるイメージング	48
2.4.3	MIN6 m9 でのグルコース・ Ca^{2+} 同時イメージング	49
2.4.4	3 種のグルコースセンサーの使い分け	50
第 3 章	各組織におけるグルコース動態解析	52
3.1	序論	52
3.1.1	モデル生物である線虫	52
3.1.2	スクリーニングにおける蛍光センサーの利用	52
3.1.3	ペプチドホルモンと内分泌細胞	52
3.1.4	内分泌細胞からのペプチドホルモン分泌機序	53
3.1.5	人工甘味料の内分泌細胞への作用	53
3.1.6	神経・グリア間のエネルギー恒常性	54
3.1.7	ウイルスベクターによる遺伝子導入技術	54
3.2	方法	57
3.2.1	線虫発現用プラスミドの構築	57
3.2.2	線虫の培養	57
3.2.3	線虫への遺伝子導入	57
3.2.4	線虫咽頭筋でのグルコースイメージング	58

3.2.5	線虫咽頭筋でのグルコースイメージングの解析	58
3.2.6	マウス血糖値の測定	58
3.2.7	株化細胞の培養	59
3.2.8	株化細胞への遺伝子導入	59
3.2.9	株化細胞でのカルシウムイメージング	59
3.2.10	人工甘味料と内分泌細胞	60
3.2.11	初代培養神経・グリア細胞の取得	60
3.2.12	初代培養神経・グリア細胞への遺伝子導入	61
3.2.13	初代培養神経・グリア細胞でのカルシウムイメージング	61
3.2.14	レンチウイルスベクター作製用プラスミドの構築	61
3.2.15	レンチウイルスベクターの作製	62
3.2.16	AAV ベクター作製用プラスミドの構築	62
3.2.17	AAV ベクターの作製	63
3.2.18	初代培養神経・グリア細胞へのウイルス感染	63
3.2.19	細胞イメージングデータの解析	64
3.3	結果	65
3.3.1	線虫での <i>in vivo</i> イメージング	65
3.3.2	マウス血糖値の測定	65
3.3.3	膵β細胞への人工甘味料の作用	65
3.3.4	(論文投稿中のため削除)	65
3.3.5	初代培養神経・グリア細胞でのイメージング条件の検討	66
3.4	考察	78
3.4.1	線虫での <i>in vivo</i> イメージング	78
3.4.2	マウス血糖値の測定	78
3.4.3	膵β細胞への人工甘味料の作用	79
3.4.4	(論文投稿中のため削除)	80
3.4.5	神経・グリア細胞でのイメージングへの適用	81
	総括	84
	参考文献	85
	謝辞	96

第1章 緑色蛍光型グルコースセンサーの開発手法

1.1 序論

1.1.1 生体とグルコース

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。特にヒトでは、脳が利用できるエネルギー源はグルコースだけであるともいわれ、成人男性が1日に消費するグルコースのうち約20~25%を脳が消費する[1]。グルコースは他にも、細胞分裂や細胞分化など、さまざまな生体反応において重要な役割を担う[2, 3]。血液を介して全身に輸送されるグルコースの濃度は、膵臓のランゲルハンス島に存在する β 細胞から分泌される、インスリンによって調節される。インスリンは、 β 細胞が血中グルコース濃度を感受することで分泌され、その作用は、筋細胞や肝細胞がグルコースを細胞内に取り込み、代謝して利用するために必要不可欠である[4-6]。

細胞内で起こるグルコースの代謝反応は、細胞内での酵素の状態や細胞外からの刺激によってダイナミックに変化する。活動時には解糖系や電子伝達系の酵素群によってATPやピルビン酸、乳酸などの物質が産生され、エネルギー貯蔵時にはグリコーゲンが合成されて細胞内に蓄積される。これらの経路の破綻は、糖尿病を代表としたホルモン分泌異常による代謝疾患や、細胞形態の変化による神経障害など、個体レベルの病態にも深く関与する[7]。

これまで、生体におけるグルコース濃度変化の解析は、放射性標識したグルコースを用いた陽電子放射断層撮影装置による可視化や、質量分析による定量によって成し遂げられてきた[8, 9]。しかし、これらの方法は時空間的な制約が大きく、生体や生細胞内のリアルタイムなグルコース動態の解析に用いるのは難しい。各種細胞ごとに異なる、グルコースへの応答を理解するためには、より高い時間分解能を持つツールの開発が求められていた。

1.1.2 蛍光タンパク質型分子センサーによる可視化技術

単一細胞レベルで、細胞内分子の挙動を解析するためには、蛍光タンパク質型分子センサーによるライブセルイメージング解析が有効である。1997年の蛍光タンパク質型 Ca^{2+} 可視化センサーCameleonの登場をきっかけとし[10]、多くの研究者によってcAMP、cGMP、ATPなど、さまざまな細胞内分子を可視化する分子センサーが開発されはじめた[11-13]。

蛍光タンパク質を基盤として開発されたこれらのセンサーは、Förster 共鳴エネルギー移動型 (FRET 型) と単色蛍光型という2つの主要なカテゴリに分類される (図1)。FRET 型分子センサーは、2つの蛍光タンパク質の間で起こる FRET による蛍光輝度比の変化から、標的分子の濃度や活性の変化を検出できる。作製が容易だが、観察時には2種類の蛍光画像の取得が必要であるため、複数分子を同時可視化する多重色蛍光イメージングへの適用が技術的に難しい。一方、単色蛍光型分子センサーは、標的分子の結合または解離による、1つの蛍光タンパク質の蛍光輝度変化を利用する。配列の最適化が必要で作製は困難だが、取

得する蛍光波長が1種類でよい。そのため、多重色蛍光イメージングに向いており、複数の細胞内分子がどのように相互作用しているかを、より高い時空間分解能で理解できる。また、分子の結合に伴う蛍光輝度変化率も大きくしやすく、細胞内の微弱な濃度変化を検出することにも長けている[14-16]。蛍光タンパク質型分子センサーを用いた細胞内分子の可視化技術は、細胞から個体レベルまでの細胞内分子の挙動を明らかにしており、これからの生命科学的研究にもより欠かせないツールになると考えられる。

グルコースでは、2003年に初めての FRET 型グルコースセンサー FLIPglu-170nDelta13 が報告された[17]。これに続いていくつかの FRET 型グルコースセンサーが開発され、細胞内におけるグルコースの時空間的観察が可能となった[17, 18]。しかしこの FRET 型センサーは、前述の通り、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。2018年当時、単色蛍光型のグルコースセンサーは存在せず、その開発と、それを用いたより高い時空間分解能でのグルコース動態の解析が期待されていた。

1.1.3 単色蛍光型分子センサーの開発手法

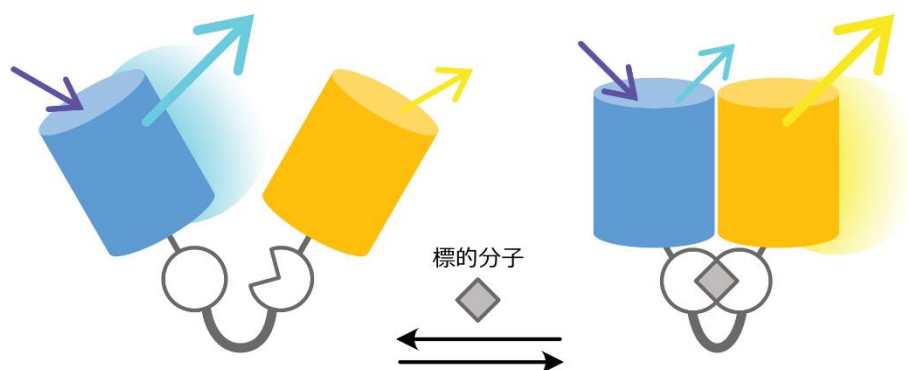
単色蛍光型分子センサーとして一般的なのは、単色蛍光型 Ca^{2+} センサー GCaMP に代表される、円順列変異型である[14] (図2)。円順列変異とは、タンパク質の配列を N 末端側と C 末端側で分割し、その順番を入れ替える変異である。緑色蛍光タンパク質 GFP は、円順列変異を導入しても、蛍光タンパク質としての機能を維持できることが知られており、円順列変異を加えた GFP は、circularly permuted GFP (cpGFP) と呼称される。円順列変異型分子センサーは、cpGFP の両端に、2つのドメイン (リガンド結合ドメイン[LBD]と、リガンド付き LBD 結合ドメイン) を融合した構造を持つ。しかし、この2つのドメインが特定されている標的分子は少なく、2つのドメインを必要とする円順列変異型の単色蛍光型分子センサー開発が困難だった。そこで新たに考案されたのが、挿入型分子センサーである (図2C)。

挿入型分子センサーは、単色蛍光型 Ca^{2+} センサー Camgaroo にみられるように、蛍光タンパク質を発色団付近で分割し、その間に1つの LBD を挿入した構造をもつ[20]。1つの LBD で作製できるため、結合配列が特定されている様々な分子に適用でき、分子センサーの汎用性を広げる可能性がある。しかし、1つの LBD しか持たない挿入型は、標的分子の結合または解離による構造変化を起こしにくく、開発技術が確立されていない。

そこで、Camgaroo の構造を参考にし、分割した蛍光タンパク質の間にある、結合ドメイン部分を他の標的分子への結合ドメインに変更することで、他分子への単色蛍光型センサーの開発が試みられた。単色蛍光型 cAMP センサー Flamindo (Fluorescent cAMP indicator) では、標的分子の結合による蛍光輝度変化を引き起こすため、蛍光タンパク質と結合ドメインの間にリンカーアミノ酸配列を挿入することで、センサーの開発に成功した[15]。続く単色蛍光型 cGMP センサー Green cGull (Green cGMP visualizing fluorescent protein) では、リンカーアミノ酸配列の長さや種類を最適化することで、より大きな蛍光輝度変化を引き起こ

すセンサーの開発に成功している[16]。そして本研究では、リンカーアミノ酸配列の最適化に加え、結合ドメインの配列を最適化することで、より汎用性の高い、単色蛍光型グルコースセンサーGreen Glifon (Green Glucose indicating fluorescent protein) [21]を開発した。この開発を通し、挿入型の単色蛍光型分子センサーの開発手法を確立した。

A Förster共鳴エネルギー移動型（FRET型）分子センサー



B 単色蛍光型分子センサー

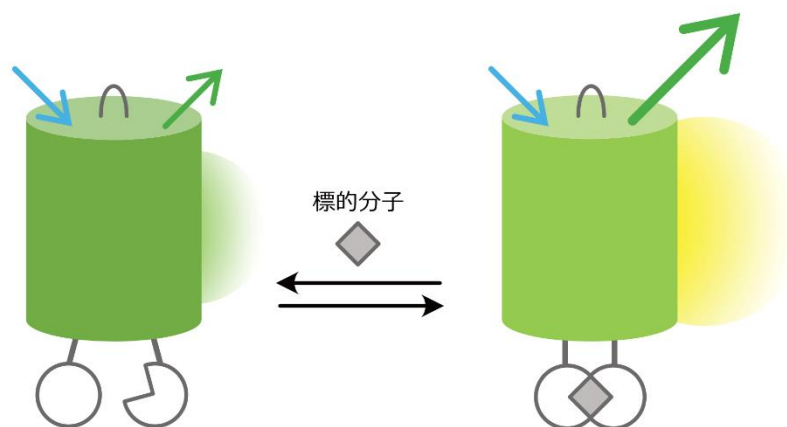


図1 2つの蛍光タンパク質型分子センサー

- (A) Förster 共鳴エネルギー移動型（FRET 型）分子センサーの配列模式図と構造予測図。FRET を起こす、2 つの蛍光タンパク質を組み合わせ、標的分子の結合または解離による蛍光輝度比の変化を利用する。
- (B) 単色蛍光型分子センサーの配列模式図と構造予測図。標的分子の結合または解離による、1 つの蛍光タンパク質の蛍光輝度変化を利用する。

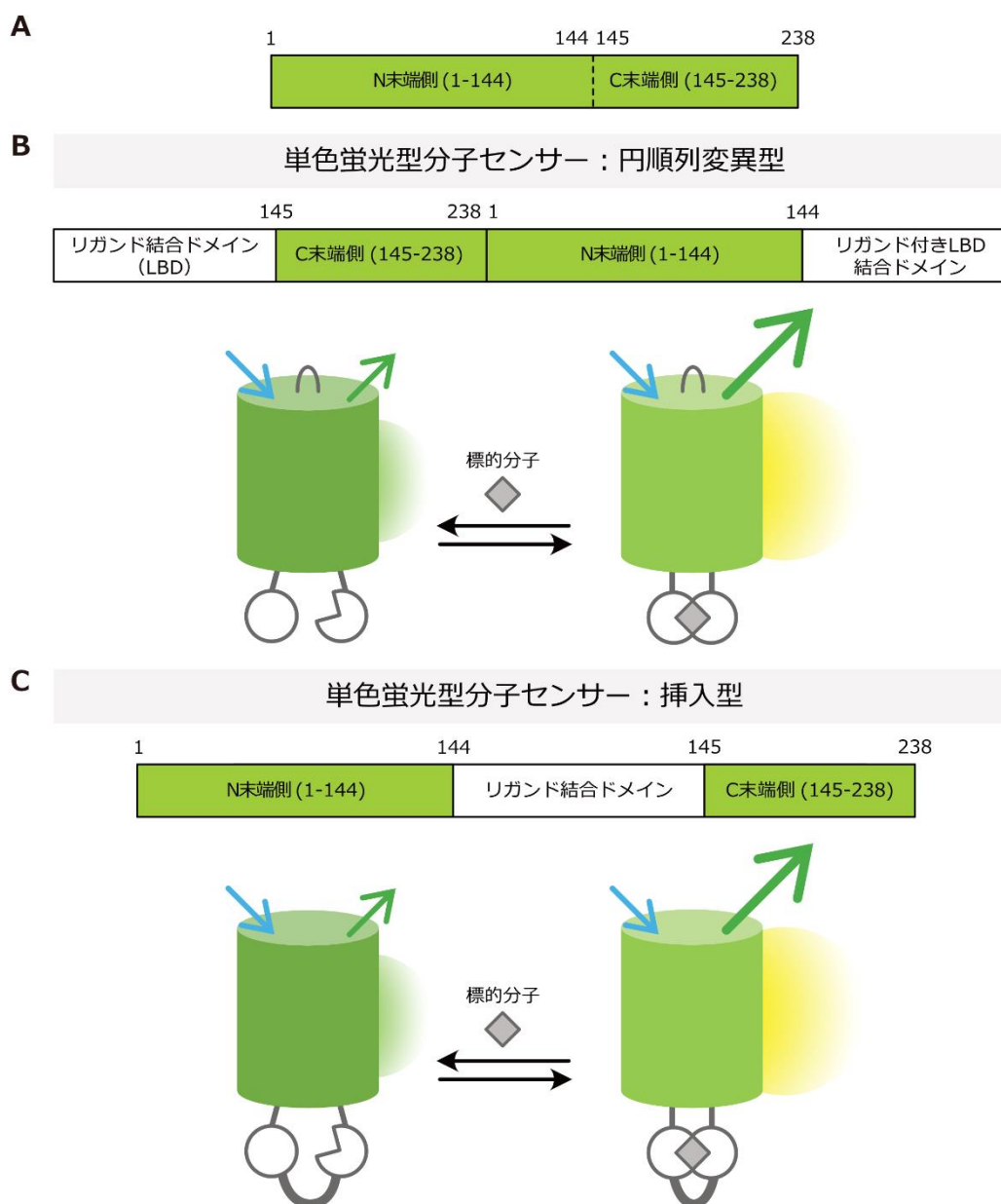


図2 2つの単色蛍光型分子センサー

- (A) 緑色蛍光タンパク質の配列模式図。先行研究から、144番目と145番目のアミノ酸の間で、配列を分割できることが示されてきた。
- (B) 円順列変異型の単色蛍光型分子センサーの配列模式図と構造予測図。円順列変異を加えた蛍光タンパク質の両端に、2つのドメインが融合されている。LBDへの標的分子の結合または解離による、蛍光輝度変化を利用する。
- (C) 挿入型の単色蛍光型分子センサーの配列模式図と構造予測図。分割した蛍光タンパク質の間に、標的分子への結合ドメインが挿入されている。結合ドメインは、円順列変異型と同じように2つの場合もあれば、1つのみの場合もある。ドメインへの標的分子の結合または解離による、蛍光輝度変化を利用する。

1.2 方法

1.2.1 グルコースセンサーのプロトタイプ構築

本緑色グルコースセンサーは、緑色蛍光タンパク質 GFP の変異体である Citrine を基盤として構築した[22]。タンパク質発現用の pRSET-A ベクター (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に、Citrine を *XhoI/HindIII* サイトで挿入した後、蛍光タンパク質の発色団の配列付近に、PCR 法によって *SacII/EcoRI* サイトを付加した。大腸菌発現下でのタンパク質の可溶性を高めるため、蛍光タンパク質の N 末端側に、マウス由来のアミロイド β 前駆体タンパク質の超酸性領域 (Amyloid beta precursor protein: APP, NM_001198823.1) を融合した[23] (図 3)。

グルコース結合ドメインとして、大腸菌の *Methyl-galactoside B* 遺伝子 (MglB, NC_000913) 由来の D-ガラクトース/D-グルコース結合ドメインを選出した[24]。MglB の N 末端側に *SacII* 認識配列、C 末端側に *EcoRI* 認識配列をそれぞれ付加し、蛍光タンパク質の配列中に挿入することで、プロトタイプのグルコースセンサーを取得した。

1.2.2 リンカーアミノ酸配列の長さの最適化

蛍光タンパク質とグルコース結合ドメインの間には、リンカーアミノ酸配列を設けた。リンカーアミノ酸として挿入する配列には、逆並行ロイシンジッパーを選出した[25] (図 4)。図に示したプライマーセットを用い、MglB の両側にリンカーアミノ酸配列を付加、または、MglB の両側のアミノ酸を欠失させることで、さまざまなリンカーアミノ酸長をもつ変異体を作製した (図 5)。作製した変異体は、大腸菌 *Escherichia coli* JM109 (DE3) 株に形質転換し、終濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ アンピシリン (FUJI FILM Wako pure chemical industries, Osaka, Japan) 入りの LB 培地 2 mL に植菌し、20°C で 4 日間、振盪培養した。菌液を 16,000 g、4°C で 5 分間遠心して上清を除去し、沈殿した菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS(-) [pH 7.4]) 700 μL に懸濁した。ホモジナイザーにて菌体を破碎して再度遠心し、目的タンパク質を含む上清を回収した。この上清を、蛍光スクリーニングに使用し、グルコースの添加によって最大の蛍光輝度変化を示すリンカーアミノ酸長をもつ変異体を選出した。

1.2.3 リンカーアミノ酸配列の種類の最適化

リンカーアミノ酸とその周辺のアミノ酸には、ランダムに変異を導入した (図 6)。変異導入のターゲットとなるアミノ酸をコードする 3 塩基を、それぞれ NNK・MNN としたセンス鎖・アンチセンス鎖のプライマーを作製した。プライマーに使用している混合塩基は、N では 4 塩基のどれかが、M では A (アデニン) または C (シトシン)、K では T (チミン) または G (グアニン) をコードする。NNK は、すべてのコドンに対応できる塩基配列となる。このプライマーを用い、PCR を 2 回行うことで、ターゲットとなるアミノ酸がランダムに変わった 48 種の変異体を取得した。作製した変異体は、リンカーアミノ酸長の最適化

と同様の方法で、蛍光スクリーニングを行った。グルコースの添加によって最大の蛍光輝度変化を示した変異体は、次のランダム変異の鋳型とした。アミノ酸にランダムに変異を加える操作を繰り返すことで、リンカーアミノ酸配列の種類を最適化した。

1.2.4 グルコースへの結合能調整

リンカーアミノ酸配列を最適化したグルコースセンサーについて、グルコースに対する結合能の調整を行った。グルコース結合ドメインに用いた MglB は、グルコース結合能に関与するアミノ酸が特定されている[26]。結合能に関するアミノ酸やその周辺のアミノ酸に、リンカーアミノ酸の配列最適化と同様の方法で変異を導入し、シーケンス解析することで、それぞれ 20 種の変異体を取得した。取得した変異体のうち、グルコースの結合による蛍光輝度変化率が大きく、細胞内で想定されるグルコース濃度に適用可能な結合能をもつ 3 種の変異体を、グルコースセンサーとして選出した。

1.2.5 リコンビナントタンパク質の精製

選出したグルコースセンサーを大腸菌 *Escherichia coli* JM109 (DE3) 株に形質転換し、終濃度 50 µg/mL アンピシリン入りの LB 培地 200 mL に植菌し、20°C で 4 日間、振盪培養した。菌液を 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(-) [pH 7.4] 10 mL に懸濁した。終濃度 40 µg/mL のリゾチーム (FUJI FILM Wako pure chemical industries) を加え、液体窒素による凍結融解と超音波ホモジナイザーによって菌体を破碎した。菌体破碎液は 4,800 g、4°C で 30 分間遠心して、目的タンパク質を含む上清を回収した。回収した上清に、PBS(-) で洗浄した Ni-NTA ビーズ (QIAGEN, KJ Venlo, Netherlands) を加え、4°C で一晩回転させることで目的のタンパク質を吸着させた。翌日、遠心して回収したビーズをフィルター付きカラムに添加し、PBS(-) と、PBS(-) に溶解した 10 mM イミダゾール溶液 (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan [pH 7.4]) でそれぞれ洗浄した。その後、PBS(-) に溶解した 300 mM イミダゾール溶液で目的タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質溶液は、HEPES 緩衝液 (150 mM KCl, 50 mM HEPES-KOH [pH 7.4]) で平衡化した PD-10 ゲルカラム (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に添加し、HEPES 緩衝液に置換することで、イミダゾールを取り除いた精製タンパク質溶液を得た。精製タンパク質は、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) の Protein A₂₈₀ モードで吸光度を測定し、濃度を算出した[27]。精製タンパク質は、液体窒素で凍結し、-80°C で保管した。

1.2.6 グルコースへの濃度依存性の測定

測定には、分光蛍光光度計 (F-2500, Hitachi, Tokyo, Japan) を用いた。1 µM の精製タンパク質に対して、最終濃度がそれぞれ 0 µM、0.1 µM、1 µM、10 µM、100 µM、1 mM、10 mM、100 mM となるようにグルコースを添加し、計 8 点の濃度条件で蛍光スペクトルを測定した。各濃度において、グルコース添加による蛍光輝度変化率を算出した。

1.2.7 励起・蛍光スペクトルの取得

励起スペクトルの測定時は、蛍光波長を 530 nm に設定した。蛍光スペクトルの測定時は、励起波長を 480 nm に設定した。プラスチック製 VIS キュベット (Eppendorf, Hamburg, Germany) に、HEPES 緩衝液で終濃度 5 μ M に希釈したタンパク質と、HEPES 緩衝液または終濃度 10 mM の HEPES 緩衝液に溶解したグルコース (FUJI FILM Wako pure chemical industries) を添加した。

1.2.8 pH 依存性の測定

1 μ M の精製タンパク質に対して、pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 に調整した HEPES 緩衝液を用い、HEPES 緩衝液または終濃度 10 mM のグルコースを添加し、計 9 点の pH 条件で蛍光スペクトルを測定した。

1.2.9 グルコース以外の分子への応答性測定

グルコースの他に、単糖であるガラクトース (FUJI FILM Wako pure chemical industries)、フルクトース (Kanto chemical co., inc., Tokyo, Japan)、グルコースの代謝産物であるグルコース 1-リン酸 (FUJI FILM Wako pure chemical industries)、グルコース 6-リン酸 (Oriental Yeast Co., ltd., Tokyo, Japan)、ピルビン酸 (FUJI FILM Wako pure chemical industries)、人工甘味料であるスクラロース (Tokyo Chemical Industry) について測定した。各分子は、1 μ M の精製タンパク質に対して最終濃度が各グルコースセンサーの EC₅₀ 値の 10 倍の濃度となるように添加した。

1.2.10 吸収スペクトルの測定

測定には、紫外可視分光光度計 (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いた。終濃度 25 μ M の精製タンパク質を石英キュベットに加え、HEPES 緩衝液または終濃度 10 mM のグルコースを添加した。

1.2.11 データ解析

センサーのグルコースへの 50%効果濃度 (EC₅₀) の算出には、ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) の Curve fitter 機能を使用した。グルコースへの濃度依存性の測定結果を、Rodbard モードによる 4 パラメータロジスティック曲線へに近似することで算出した。センサーのワーキングレンジは、4 パラメータロジスティック曲線の直線範囲とし、Bend point から推測した[28]。センサーの検出限界 (Limit of detection: LOD) は、ブランクの平均と標準偏差の 3 倍の値とした。

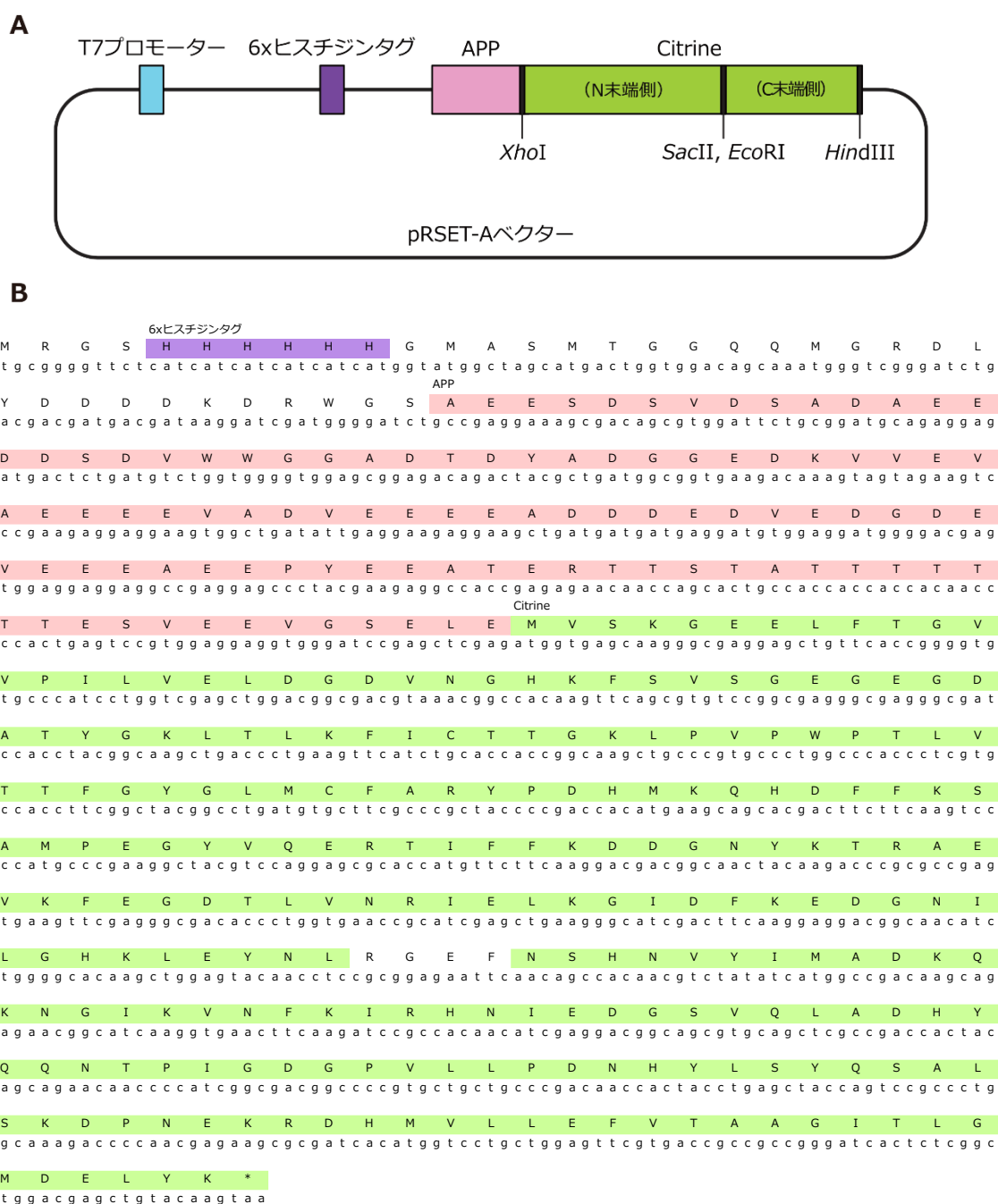


図3 センサーの基盤となるベクターの配列

- (A) グルコース結合ドメイン挿入前のベクター配列模式図。pRSET-A ベクターに、蛍光タンパク質 Citrine と APP 配列を挿入した。Citrine 周辺の、変異体作製に用いた制限酵素サイトを示した。
- (B) pRSET-A ベクターの塩基配列とコードされるアミノ酸配列。T7 プロモーター下流のメチオニンからタンパク質がコードされる。N 末端側にタンパク質精製用のヒスチジンタグを付けた、APP 融合型の Citrine が作られる。

A

N末端側用フォワードプライマーセット

gcc c cgc gga tta gcc caa gct gat act cgc att ggt gt	: 3アミノ酸挿入 (N+3)
gcc c cgc gga gcc caa gct gat act cgc att ggt gt	: 2アミノ酸挿入 (N+2)
gcc c cgc gga caa gct gat act cgc att ggt gt	: 1アミノ酸挿入 (N+1)
gcc c cgc gga gct gat act cgc att ggt gt	: 挿入なし (N±0)
gcc c cgc gga gat act cgc att ggt gta ac	: 1アミノ酸欠失 (N-1)
gcc c cgc gga act cgc att ggt gta aca at	: 1アミノ酸欠失 (N-2)
gcc c cgc gga cgc att ggt gta aca atc ta	: 1アミノ酸欠失 (N-3)

B

C末端側用リバースプライマーセット

g gaa ttc ctt taa agc ttt ctt gct gaa ctc agc ca	: 3アミノ酸挿入 (C+3)
g gaa ttc taa agc ttt ctt gct gaa ctc agc ca	: 2アミノ酸挿入 (C+2)
g gaa ttc agc ttt ctt gct gaa ctc agc ca	: 1アミノ酸挿入 (C+1)
g gaa ttc ttt ctt gct gaa ctc agc ca	: 挿入なし (C±0)
g gaa ttc ctt gct gaa ctc agc cag gt	: 1アミノ酸欠失 (C-1)
g gaa ttc gct gaa ctc agc cag gtt gt	: 1アミノ酸欠失 (C-2)
g gaa ttc gaa ctc agc cag gtt gtc tt	: 1アミノ酸欠失 (C-3)

C

g c c c t c a a a a a g a a c t a c a a g c c a a c a a g
A L K K E L Q A N K
c g a a a t t t c t t c c t c a a c g t c c g t t t a t t t

C末端側へのリンカーアミノ酸配列の付加プライマー用

a a g g a a c t c g c a c a a c t a a a a t g g g a a t t a
K E L A Q L K W E L
t t t c t c a a t c g c g t c a a c t t c a c c c t c g a a

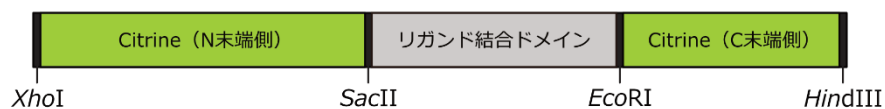
N末端側へのリンカーアミノ酸配列の付加プライマー用

c a a g c a t t a a a g a a a g a a t t a g c c c a a
Q A L K K E L A Q
g t c c g c g a g t t t t t c c t c g a c c g t g t c

図4 ロイシンジッパーの配列とプライマーの配列

- (A, B) N末端側 (A) および C末端側 (B) のリンカーアミノ酸配列の長さが異なる変異体を作製する際に使用するプライマーの例。アニーリング鎖は、18~25 塩基で、GC が 8~12 塩基になるように設計している。制限酵素サイトの 5'末端側に、数塩基を余剰に付加すると、制限酵素が配列を認識しやすくなる。余剰な塩基配列は、制限酵素によって異なる。また、リンカーアミノ酸を 3 アミノ酸以上付加するときは、3 アミノ酸付加した変異体がテンプレートになるよう、プライマーを設計し直している。
- (C) リンカーアミノ酸配列に用いた、ロイシンジッパーの塩基配列とアミノ酸配列。PCR の成功率を上げるため、フォワードプライマーとリバースプライマーに使用する塩基配列を少しずつ変更している。

A



B

N末端側の配列				C末端側の配列			
SacII リンカーアミノ酸				リンカーアミノ酸 EcoRI			
Y N L R G L A Q	X ₁	X ₂	X ₃ X ₄	3アミノ酸挿入	X _{n-3} X _{n-2} X _{n-1} X _n	A L K	E F N S
Y N L R G A Q	X ₁	X ₂	X ₃ X ₄	2アミノ酸挿入	X _{n-3} X _{n-2} X _{n-1} X _n	A L	E F N S
Y N L R G Q	X ₁	X ₂	X ₃ X ₄	1アミノ酸挿入	X _{n-3} X _{n-2} X _{n-1} X _n	A	E F N S
Y N L R G	X ₁	X ₂	X ₃ X ₄	挿入なし	X _{n-3} X _{n-2} X _{n-1} X _n	E	F N S
Y N L R G	X ₂	X ₃	X ₄	1アミノ酸欠失	X _{n-3} X _{n-2} X _{n-1}	E	F N S
Y N L R G	X ₃	X ₄		2アミノ酸欠失	X _{n-3} X _{n-2}	E	F N S
Y N L R G	X ₄			3アミノ酸欠失	X _{n-3}	E	F N S

図5 リンカーアミノ酸配列の長さが異なる変異体の配列例

- (A) リンカーアミノ酸配列の挿入前の配列模式図。図3のベクターの *SacII*/*EcoRI* サイトに、リガンド結合ドメインを挿入している。
- (B) リンカーアミノ酸の配列を変化させた変異体のアミノ酸配列例。図4(A, B)のプライマーセットを用い、図4(C)の配列を挿入している。Xは、リガンド結合ドメインのアミノ酸を示す。アミノ酸を欠失した変異体では、リガンド結合ドメインの配列を欠失させている。

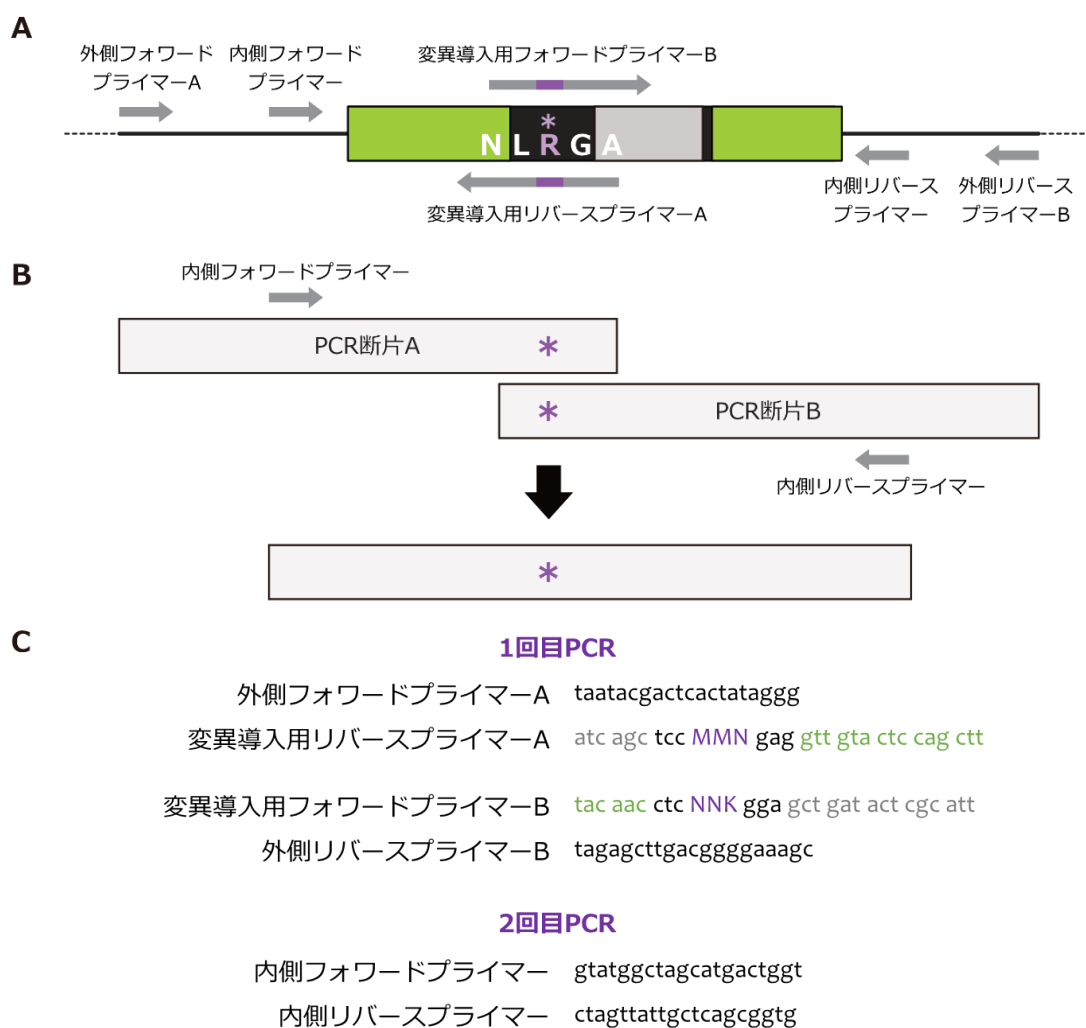


図6 特定のアミノ酸へのランダム変異導入方法

- (A) 1 回目 PCR の方法を示した模式図。例として、N 末端側リンカーアミノ酸の R への変異方法を示した。一連のランダム変異で使用する、全てのプライマーセットが認識する配列の位置も示した。1 回目の PCR では、プライマー A のセットとプライマー B のセットを用いた 2 パターンの PCR を行い、それぞれから PCR 断片を得ている。
- (B) 2 回目 PCR の方法を示した模式図。1 回目 PCR で得られた 2 つの PCR 断片を鋳型として、2 回目の PCR を行う。この一連の操作により、*で示した位置のアミノ酸が変異した断片を得ることができる。
- (C) 各 PCR 操作で用いるプライマーセットの例。プライマー中の、目的アミノ酸をコードする配列を、フォワードプライマーでは NNK に、リバースプライマーでは MMN にすることで、アミノ酸をランダムに変更した。変異導入用のプライマー 2 本は、それぞれの目的アミノ酸の位置に合わせて設計し直した。それ以外の、ベクター部分にかかる 4 本のプライマーは、共通して用いている。2 本の PCR 断片が重なる部分は、18 ～25 塩基とし (NNK 部分を含む)、GC が 8～9 塩基になるように設計している。

1.3 結果

1.3.1 緑色蛍光型グルコースセンサーの開発

分割した Citrine の間に、MglB 由来のグルコース結合ドメインを挿入することで、緑色蛍光型グルコースセンサーのプロトタイプを構築した。プロトタイプへの、逆並行ロイシンジッパー由来のリンカーアミノ酸配列の挿入、または MglB 配列の欠失により、さまざまなリンカーアミノ酸長をもつ変異体を取得した。MglB の N 末端側を-6 から+6 アミノ酸まで変化させた変異体と、MglB の C 末端側を-6 から+6 アミノ酸まで変化させた変異体で蛍光輝度変化率を算出した結果、C 末端側-2 アミノ酸の変異体が最も大きな変化率を示した (図 7A)。この変異体を鋳型に、MglB の N 末端側のリンカーアミノ酸長について再び検討した。C 末端側は-2 アミノ酸に固定し、N 末端側を-3 から+6 アミノ酸まで変化させた変異体にて蛍光輝度変化率を算出した結果、 ± 0 アミノ酸の変異体が最も大きな変化率を示した (図 7B)。これらのリンカーアミノ酸の長さの最適化操作により、グルコース存在下で蛍光輝度が 1.6 倍に増加する変異体を取得した。

続いて、リンカーアミノ酸の種類を最適化するため、PCR 法によって標的のアミノ酸にランダムに変異を導入した。本グルコースセンサーの場合、リンカーアミノ酸配列長が-2 または ± 0 であるため、リンカーアミノ酸の周辺の蛍光タンパク質および MglB のアミノ酸にも変異を導入した。最終的に、蛍光輝度変化率が 3.3 倍に増加する変異体を取得した (図 8)。一連のリンカーアミノ酸の最適化によって得られたグルコースセンサーを、Green Glifon (Green Glucose indicating fluorescent protein) と命名した。

本研究では、生細胞内のグルコース動態観察に適用可能なグルコースセンサーを目指し、細胞内のさまざまな濃度範囲に対応すべく、センサーのグルコースへの応答能を調整する変異の導入を試みた。MglB の結晶構造解析結果から判明しているグルコースの認識に関与するアミノ酸に[26]、ランダムに変異を導入した変異体を取得し、グルコースへの濃度依存性を測定した。全アミノ酸のうち、7 種のアミノ酸のみで、グルコース添加による輝度変化が生じた (図 9A)。特に、F39Y 変異体や F39L 変異体は、グルコースに応答することに加え、野生型の F39F に比べてより大きな蛍光輝度変化率を示すことが分かった。また、野生型 F39F のグルコースへの EC_{50} 値を概算すると、およそ $5 \mu M$ であることが分かった。生細胞内には高濃度のグルコースが存在すると考えられており、 EC_{50} 値が小さすぎると、グルコース濃度の変化を検出できない可能性があるため、より大きい EC_{50} 値を持つ可能性がある、F39Y 変異体や F39L 変異体をグルコースセンサーの候補として選出した。さらに、隣のアミノ酸にもランダムに変異を導入してみたところ、F39F 変異体と F39L 変異体の中間程度の EC_{50} 値を持つ可能性がある、F39Y N40Y 変異体を取得することができた (図 9B)。最終的には、F39Y 変異体・F39L 変異体・F39Y N40Y 変異体の 3 種を、グルコースセンサーとして選出し、性質測定を行った。

1.3.2 緑色型グルコースセンサーの各種性質測定

選出した 3 種の変異体についてタンパク質精製を行い、分光蛍光光度計によって性質データを取得した。濃度依存性の測定ではそれぞれ、計 8 点の濃度条件での蛍光輝度変化率を算出し、4 パラメータロジスティック曲線に近似することで EC_{50} 値を算出した。3 種の変異体の EC_{50} 値はそれぞれ、44 μM (F39Y 変異体)・590 μM (F39Y N40Y 変異体)・3800 μM (F39L 変異体)であることが分かった (図 10)。この結果から、3 種の変異体をそれぞれ Green Glifon 50・Green Glifon 600・Green Glifon 4000 と命名した。

3 種のグルコースセンサーの励起スペクトルと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 503 nm、蛍光スペクトルのピークは 523 nm を示した。また、10 mM グルコースによる蛍光輝度変化率は、Green Glifon 50 と Green Glifon 600 では約 7 倍、Green Glifon 4000 では約 6.5 倍を示した (図 11)。

pH 依存性の測定では、3 種のグルコースセンサーの蛍光測定を、さまざまな pH 条件の溶液中で行った。結果としてこのグルコースセンサーは、グルコースの有無に関わらず、pH 依存的に蛍光輝度が上昇することが分かった (図 12)。

紫外可視分光光度計を用い、3 種のグルコースセンサーの吸収スペクトルを測定した。結果として、10 mM グルコースの添加により、420 nm 付近の吸収ピークが減少し、500 nm 付近の吸光ピークが増加することが分かった (図 13)。

グルコース以外の分子への応答性の測定では、3 種のグルコースセンサーの蛍光輝度は、グルコースとガラクトースによって変化した (図 14)。他の候補分子では、蛍光輝度変化は見られなかった。また、ガラクトースによる蛍光輝度変化率は、グルコースに比べて小さいことが分かった。

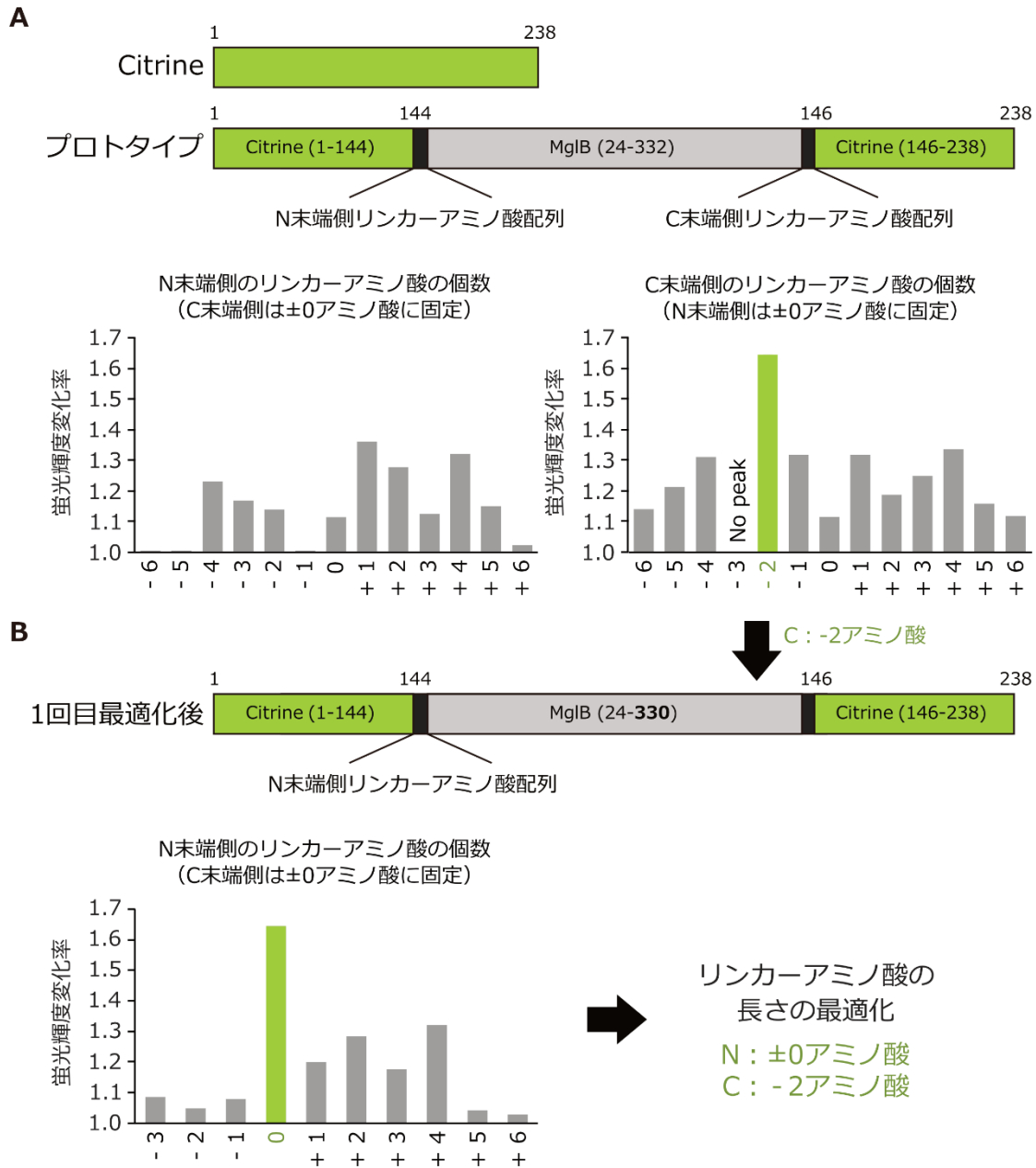


図7 リンカーアミノ酸配列の長さの最適化 (文献[21]より改変)

- (A) 1回目のリンカーアミノ酸配列の長さの最適化結果。N末端側およびC末端側のリンカーアミノ酸配列を、それぞれ-6から+6まで変化させた変異体を作製し、蛍光を測定した。本スクリーニングでは、グルコースの添加による蛍光輝度の変化が最も大きかった、C-2変異体を選出した。
- (B) 2回目のリンカーアミノ酸配列の長さの最適化結果。C-2変異体の、N末端側のリンカーアミノ酸配列を、-3から+6まで変化させた変異体を作製し、蛍光を測定した。グルコースの添加による蛍光輝度の変化が最も大きかった、N±0変異体を選出した。一連のリンカーアミノ酸の長さの最適化により、N±0, C-2変異体を選出した。



図8 リンカーアミノ酸配列の種類の最適化 (文献[21]より改変)

リンカーアミノ酸配列の長さが最適化された C±0, N-2 変異体への変異導入箇所と蛍光輝度変化。変異は、リンカーアミノ酸配列およびその周辺にランダムに加えている。操作は1アミノ酸ずつであるが、図では数アミノ酸に変異を加えた時点での配列および蛍光輝度を示している。変異を加えたアミノ酸を*で示しており、アミノ酸表記では種類が変わっていないものも、塩基レベルでの変異が加わっている。リンカーアミノ酸配列の最適化により、約 1.6 倍だった輝度変化は、約 3.3 倍まで上昇した。

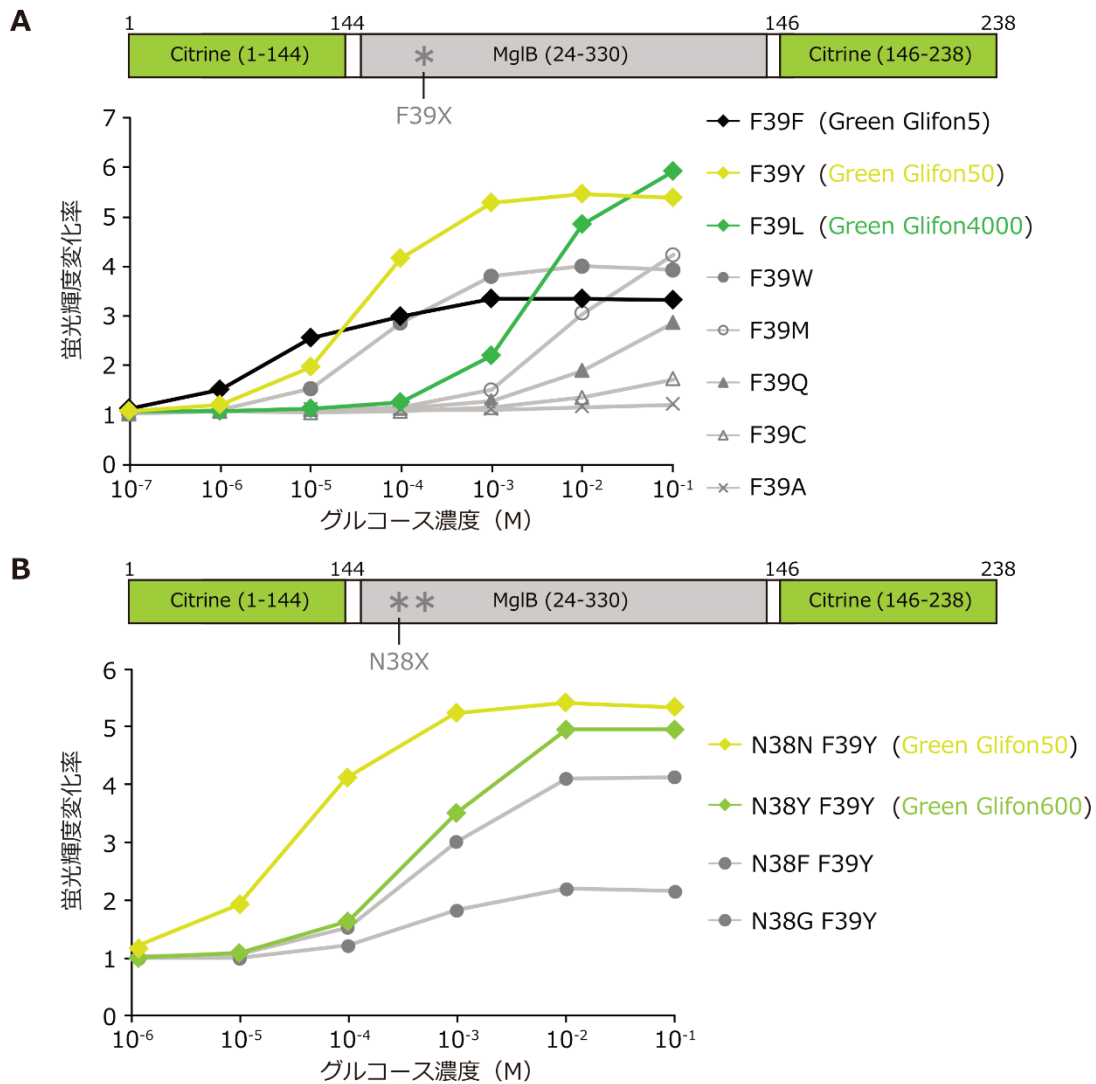


図9 グルコースへのEC₅₀値の調節 (文献[21]より改変)

- (A) グルコースセンサー配列内 MglB への、1 回目の変異導入箇所と蛍光測定結果。リンカーアミノ酸配列を最適化した変異体の、MglB の F39 にランダムに変異を導入した。シーケンス解析して全種類のアミノ酸に変化した変異体を取得し、蛍光測定を行った。全種類のアミノ酸のうち 7 種のアミノ酸で、グルコース添加による蛍光輝度変化が生じた (F39A は輝度変化しなかった変異体)。そのうち、変化率が大きい F39Y 変異体と F39L 変異体を選出した。
- (B) グルコースセンサー配列内 MglB への、2 回目の変異導入箇所と蛍光測定結果。(A) の F39Y 変異体の、N38 にランダムに変異を導入した。シーケンス解析して全種類のアミノ酸に変化した変異体を取得し、蛍光測定を行った。全種類のアミノ酸のうち 4 種のアミノ酸で、グルコース添加による蛍光輝度変化が生じた。そのうち、変化率が大きく、F39Y 変異体と F39L 変異体の中間付近の EC₅₀ 値を持つ可能性がある、N38Y F39Y 変異体を選出した。

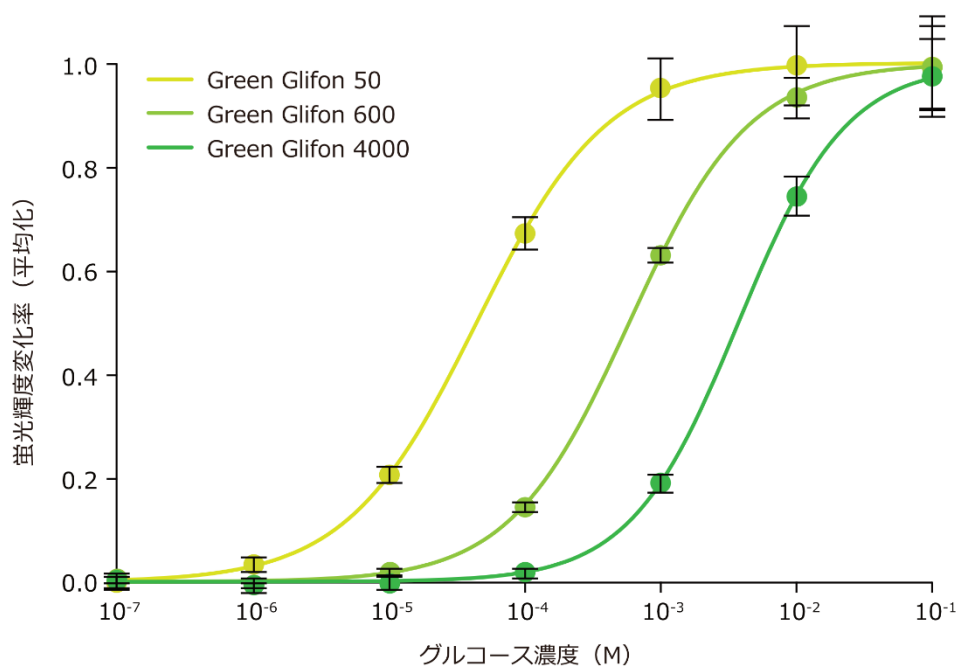


図 10 3 種のグルコースセンサーのグルコースへの濃度依存性と EC_{50} 値
(文献[21]より改変)

3 種のグルコースセンサーと、各濃度のグルコースへの応答を、精製タンパク質で測定した結果。各濃度での蛍光輝度変化率をそれぞれ算出し、4 パラメータロジスティック曲線に近似した。グルコースへの EC_{50} 値はそれぞれ、Green Glifon 50 は 44 μ M、Green Glifon 600 は 590 μ M、Green Glifon 4000 は 3900 μ M だった。データは means \pm SD、N = 3。

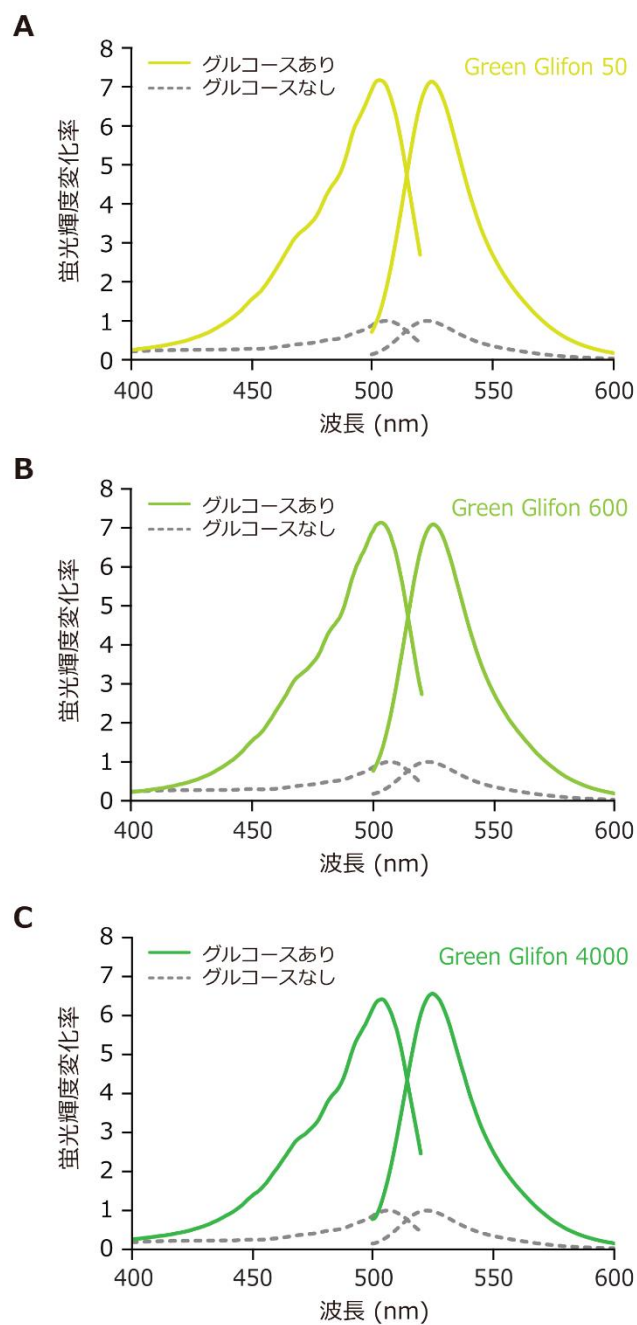


図 11 3種のグルコースセンサーの励起・蛍光スペクトルと蛍光輝度変化率
(文献[21]より改変)

(A-C) Green Glifon 50 (A)、Green Glifon 600 (B)、Green Glifon 4000 (C) の励起スペクトル (左側) と蛍光スペクトル (右側)。破線はグルコースなし、実線は 10 mM グルコース添加時のスペクトルを示す。3 種のグルコースセンサーの励起スペクトルのピークは 503 nm、蛍光スペクトルのピークは 523 nm を示した。蛍光輝度変化率は、Green Glifon 50 と Green Glifon 600 は約 7 倍、Green Glifon 4000 は約 6.5 倍だった。

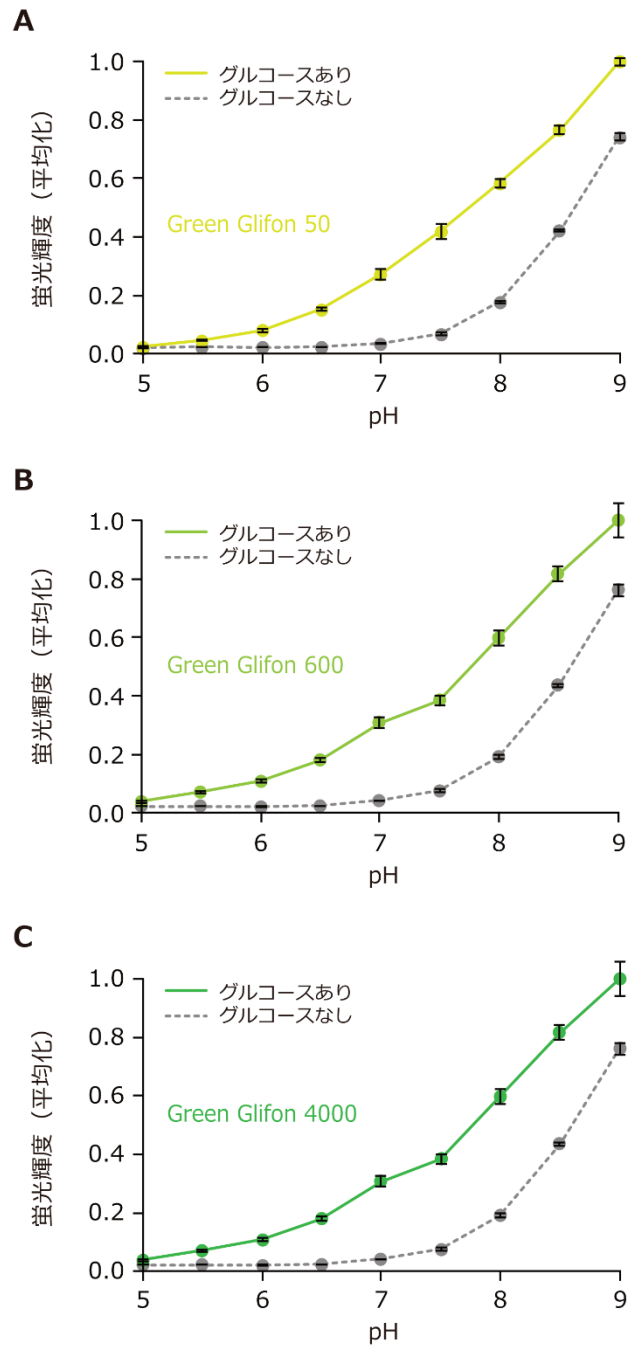


図 12 3種のグルコースセンサーの pH 依存性 (文献[21]より改変)

(A-C) Green Glifon 50 (A)、Green Glifon 600 (B)、Green Glifon 4000 (C) の pH 依存性。破線はグルコースなし、実線は 10 mM グルコース添加時の蛍光輝度を示す。3 種とも、pH が大きくなるに従って蛍光輝度が上昇した。データは means \pm SD、N = 3。

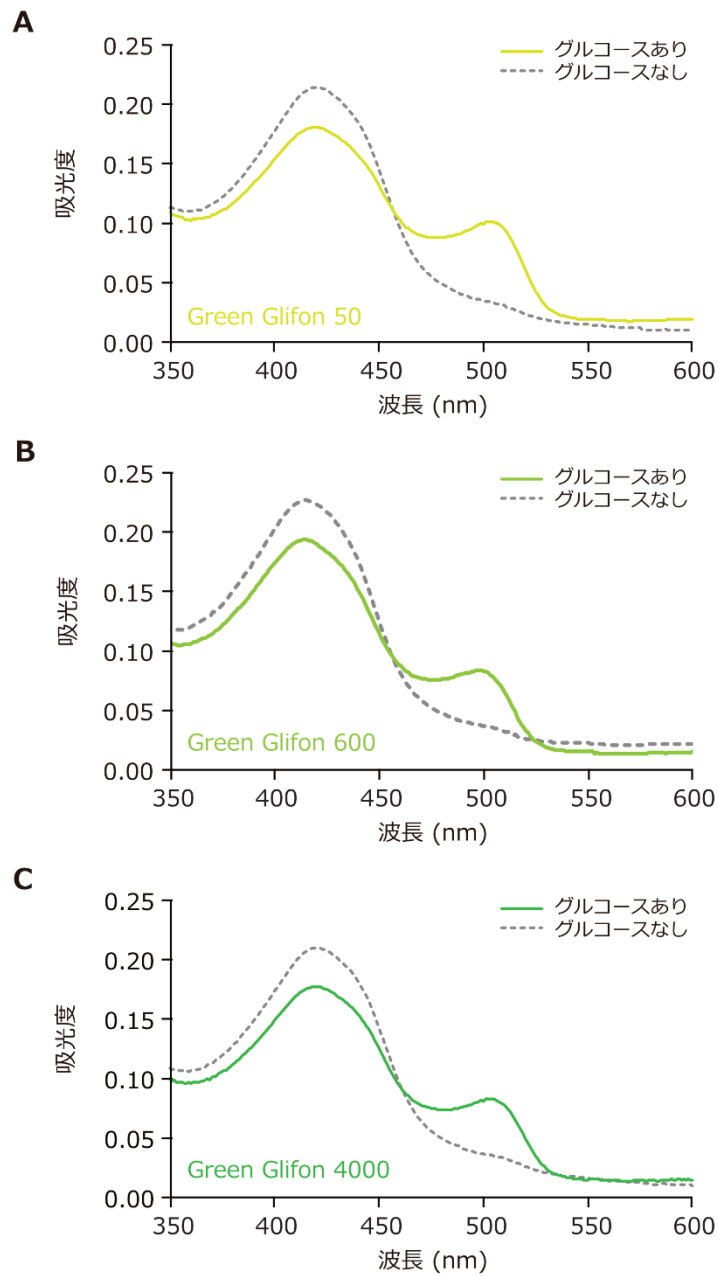


図 13 3種のグルコースセンサーの吸収スペクトル (文献[21]より改変)

(A-C) Green Glifon 50 (A)、Green Glifon 600 (B)、Green Glifon 4000 (C) の吸収スペクトル。破線はグルコースなし、実線は 10 mM グルコース添加時の蛍光輝度を示す。3 種とも、グルコースを添加することで、420 nm 付近の吸収ピークが減少し、500 nm 付近の吸収ピークが上昇した。

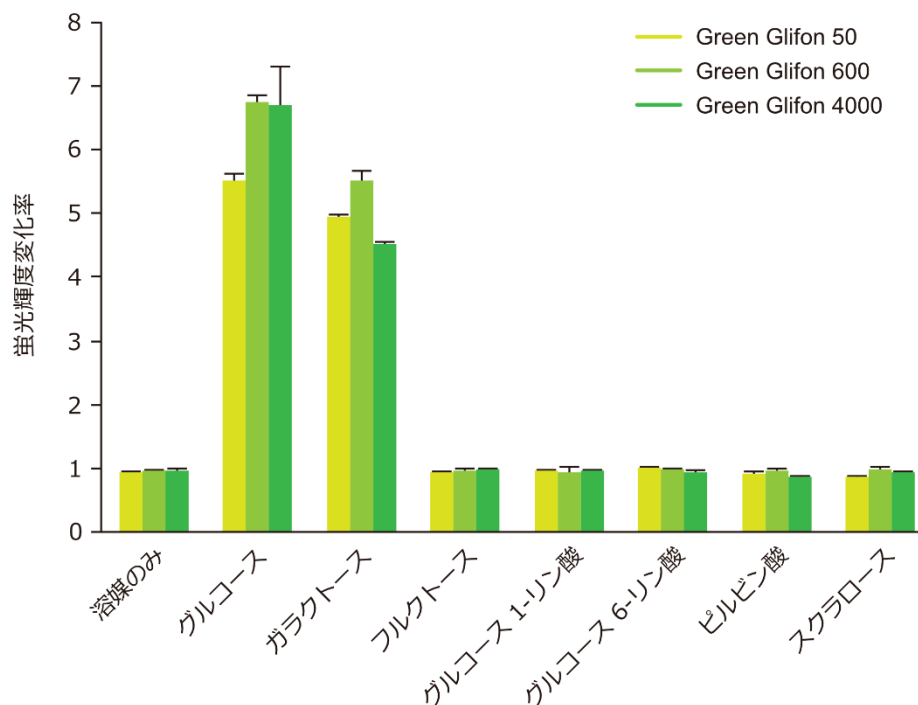


図 14 3 種のグルコースセンサーのグルコース以外の分子への応答性
(文献[21]より改変)

3 種のグルコースセンサーの、グルコースとそれ以外の分子への応答性。単糖であるグルコース、ガラクトース、フルクトースと、グルコースの代謝産物であるグルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、ピルビン酸と、人工甘味料スクラロースへの応答を確認した。3 種のグルコースセンサーはすべて、グルコースとガラクトースに応答した蛍光輝度変化を示した。ガラクトースでの輝度変化率は、グルコースよりも小さかった。データは means \pm SD、N = 3。

1.4 考察

1.4.1 緑色蛍光型グルコースセンサーの開発手法

挿入型の単色型分子センサーは、分割した蛍光タンパク質の間に標的分子への結合ドメインを挿入した構造をもつ。過去に開発された挿入型の緑色型分子センサーから、Citrine の分割部位が特定されてきた。蛍光タンパク質は、 β バレル構造の中心に、3 残基からなる発色団と呼ばれる構造をもつ[29]。Citrine の場合、発色団はセリン、チロシン、グリシンの残基である[22]。発色団は、 β バレルの構造が安定すると、自身で環状化し、脱水、酸化することで成熟する。蛍光タンパク質は、成熟した発色団が励起光を吸収して励起状態になり、その後、基底状態に戻ることで蛍光を発することができる。配列の分割が可能な部位は、この発色団の付近であり、 β バレルの構造を 2 分する形になっている。 β バレルを分割しているため、発色団付近の環境が不安定になっており、蛍光輝度変化が起きやすくなっている。挿入型の単色型分子センサーは、この変化も利用し、構築されている。

分子センサーの結合ドメインに用いる構造としては、標的分子を特異的に認識することと、前述の理由から、標的分子の結合または解離によって、構造が変化するものが望ましいと考えられる。本研究ではグルコース結合ドメインとして、MglB 由来の大腸菌由来の D-ガラクトース/D-グルコース結合ドメインを選出した。MglB は、FRET 型のグルコースセンサー FLIPglu-170nDelta13 にも利用されている[17, 18]。MglB を利用した分子センサーは、細胞内でもグルコースを認識し、グルコースの結合によって構造が変化するすることで、2 つの蛍光タンパク質の距離を変化させることが示唆されている。

本グルコースセンサーは、これまでの分子センサーと同様に、蛍光タンパク質部分と結合ドメイン部分の間にリンカーアミノ酸配列を設けている。このリンカーアミノ酸配列は、安定した構造をもつ逆並行ロイシンジッパー配列が元となっている (図 4)。このリンカーアミノ酸配列は、その長さやアミノ酸の種類を最適化することで、目的分子の結合による蛍光輝度変化率を高めることが推測されてきた。本グルコースセンサーも、リンカーアミノ酸の長さ、リンカーアミノ酸とその周辺のアミノ酸の種類を最適化することにより、蛍光輝度変化率が上昇した。特に、リンカーアミノ酸の種類の最適化は、センサーの蛍光輝度変化に大きく影響することが推測される。しかし、リンカーアミノ酸の長さや種類は、これまでの経験上、結合ドメインごとに最適な配列が異なっている。そのため、新しいセンサーを作製する際には、リンカーの最適化から行う必要があると考えられる。

また、本グルコースセンサーでは新たに、標的分子への結合能の調節を試みた。MglB 内の、グルコースの認識に関与するアミノ酸と周辺のアミノ酸にランダムに変異を導入した結果、センサーの EC_{50} 値を変更することに成功した (図 15)。この結果は、分子センサーとしての完成後でも、標的分子への EC_{50} 値を変更する操作が可能であることを示した。 EC_{50} 値は、センサーの標的分子への親和性を示す数値の一つである。 EC_{50} 値が低いということは、低濃度の標的分子にも応答でき、親和性が高いことを示す。結合能の調節過程で、変異

導入によってアミノ酸が変化した変異体のほとんどは、グルコース添加による蛍光輝度を示さなくなった。変異導入により、センサーがグルコースを認識できなくなった、または、グルコースへの親和性が著しく低くなったことが推測できる。この結果は、変異を導入した部位のアミノ酸がグルコース認識に重要であることを裏付けた。さらに、輝度変化を示した変異体は、野生型 F39 よりも大きい EC_{50} 値を持つことが推測された。この結果は、結合ドメインへの変異導入による EC_{50} 値の変更は、下げる方向よりも上げる方向の方が容易であることを示した。センサー設計時に、親和性の高い結合ドメインを選出することで、さまざまな EC_{50} 値を持つセンサーの開発が可能になり、目的の EC_{50} 値を持つセンサーが取得できると考えられる。今回用いた MglB は、グルコースへの K_d 値が ~ 150 nM で、グルコースへの親和性が高いことが報告されていた[24]。以上のようなセンサー結合能の最適化手法の確立は、他の分子センサーにも適用できる可能性がある。さまざまな濃度範囲に適用可能な分子センサーの開発は、分子センサーの汎用性を広げ、より詳細な分子動態の解明につながると考える。

なお、結合ドメインに用いている MglB は、1 つあたり 1 分子のグルコースを認識する。本グルコースセンサーも、後述の 4 パラメータロジスティック曲線への近似結果から、1 分子のグルコースを認識することが推測された。つまり、高濃度のグルコースに対するアロステリックな効果がないことが示唆された。このことから、センサーのグルコースへの親和性を示す指標として、 EC_{50} 値を採用している。

本研究の緑色蛍光型グルコースセンサーの開発は、先行研究の単色蛍光型 Ca^{2+} センサー Camgaroo [20]、緑色蛍光型 cAMP センサー Flamingo [15] および緑色蛍光型 cGMP センサー Green cGull [16] の開発手法を応用したものである。本グルコースセンサーで確立した開発手法により、緑色蛍光型乳酸センサー Green Lindoblum (Green Lactate indicator suitable for fluorescence imaging) および緑色蛍光型ピルビン酸センサー Green Pegassos (Green Pyruvate sensing a single fluorescent protein-based probe) が開発されている[30]。

1.4.2 緑色蛍光型グルコースセンサーの濃度依存性

精製タンパク質を用いた性質測定により、本グルコースセンサーの機能評価を行った結果について考察する。精製タンパク質の濃度は、モル吸光係数と吸光度から推定している[27]。タンパク質配列から算出した 280 nm のモル吸光係数はそれぞれ、 $78330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Green Glifon 50)、 $79610 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Green Glifon 600)、 $77050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Green Glifon 4000) であった。

まず、計 8 点のグルコース濃度条件で蛍光輝度変化率を算出することで、グルコース濃度に依存した蛍光輝度変化を測定した。この結果を、4 パラメータロジスティック曲線に近似することで、 EC_{50} 値・ワーキングレンジ・検出限界を算出した。 EC_{50} 値は前述の通り、グルコースに対する親和性を示す指標である。ワーキングレンジは信頼区間を示し、蛍光輝度変化率とグルコース濃度変化が線形に近似できる区間とした。

それぞれの EC₅₀ 値は、結果に示した通り、44 μ M (Green Glifon 50)、590 μ M (Green Glifon 600)、3800 μ M (Green Glifon 4000) だった (図 10)。それぞれのワーキングレンジは、4 パラメータロジスティック曲線の直線近似エリアより推測しており[28]、8.1~240 μ M (Green Glifon 50)、0.12~2.8 mM (Green Glifon 600)、0.92~15 mM (Green Glifon 4000) だった (図 16)。3 種のグルコースセンサーを併せると、8.1 μ M~15 mM の濃度範囲のグルコースを検出できることになり、広い濃度範囲をカバーすることができる。グルコースは、生体内ではさまざまな濃度範囲で存在するといわれており、細胞内グルコース濃度に明確な指標はない。しかし、哺乳類の生体内のグルコース濃度は、血中では 3~9 mM、肝臓では 1~10 mM、小腸では 0.4~24 mM といわれており、細胞内のグルコースは、血中と同程度またはそれ以下の濃度で存在すると考察されている[31-33]。このことから、生細胞での利用において、本グルコースセンサーが十分なワーキングレンジを持つことが推測できる。なお、それぞれの検出限界は、1.4 μ M (Green Glifon 50)、12 μ M (Green Glifon 600)、290 μ M (Green Glifon 4000) だった。

1.4.3 緑色蛍光型グルコースセンサーの励起・蛍光スペクトル

励起・蛍光スペクトルからは、グルコースセンサーがどの波長で最も強く励起され、どの波長の蛍光を放出しているかを推測することができる。3 種のグルコースセンサーはすべて、503 nm に励起スペクトルのピークをもち、523 nm に蛍光スペクトルのピークを持っていた (図 11)。蛍光顕微鏡での緑色蛍光観察では、一般的に、500 nm 付近に閾値をもつダイクロイックミラーが用いられる。フィルターセットは、450~500 nm の範囲の励起光を通すフィルターと、500~560 nm の範囲の蛍光を通すフィルターからなる。そのため、本グルコースセンサーは、一般的なフィルターセットで蛍光観察できることが示された。グルコースセンサーの基盤である Citrine は、516 nm の励起スペクトルのピークと、529 nm の蛍光スペクトルのピークをもつことが報告されている[22]。比較すると、グルコースセンサーは、Citrine よりも短波長側にシフトしたスペクトルのピークを持つことが分かる。過去の挿入型センサーでも短波長側へのシフトが見られていることから、蛍光タンパク質を分割したことによる、発色団周辺の環境の変化によると推測できるが、前述の理由もあって、蛍光観察には問題ない範囲であると考えられる。

また、蛍光スペクトルのピーク値をグルコースの有無で割算すると、グルコースセンサーのグルコース添加による最大輝度変化率を推測することができる。10 mM グルコース添加時の蛍光輝度変化率は、Green Glifon 50 と Green Glifon 600 は約 7 倍、Green Glifon 4000 は約 6.5 倍を示した (図 11)。Green Glifon 4000 の蛍光輝度変化率は、他の 2 種より低く算出された。これは、Green Glifon 4000 のワーキングレンジが 0.92~15 mM であり、10 mM グルコース刺激では蛍光輝度変化率が最大に達していないためだと推測される (図 16)。より高濃度のグルコース刺激により、Green Glifon 4000 も、最大で約 7 倍程度の蛍光輝度変化率を見込める可能性がある。

1.4.4 緑色蛍光型グルコースセンサーの pH 依存性

蛍光タンパク質は、pH に依存して蛍光輝度が変化することが知られている[22]。同様に、蛍光タンパク質を利用した分子センサーの多くも、pH に依存して蛍光輝度が変化する[14, 34]。これは、蛍光タンパク質の輝度変化が、成熟した発色団のプロトン付加状態と脱プロトン状態の比率に依存しているためである。特に単色型分子センサーは、円順列変異型と挿入型の双方とも、 β バレルの構造を分割しているため、発色団が外液の pH 変化による影響を受けやすい。一般的に、pH が高くなると蛍光輝度は上昇する。3 種のグルコースセンサーも、グルコースの有無に関わらず、pH 依存的に蛍光輝度が上昇することが分かった (図 12)。pH による蛍光輝度変化は、各 pH 環境で、グルコース添加によるグルコースセンサーの蛍光輝度変化に影響してしまうが、本グルコースセンサーは pH 7 付近の蛍光輝度変化率が特に大きいことが分かった。つまり、pH が中性付近に保たれている、哺乳類細胞内での観察では、十分な輝度変化をもたらすことが示された。しかし、本グルコースセンサーに限らず、蛍光タンパク質を利用した分子センサーを利用する際には、観察条件の pH やその経時的な変化に注意する必要がある。

1.4.5 緑色蛍光型グルコースセンサーの分子選択性

本グルコースセンサーに用いた MglB は、大腸菌内でグルコースとガラクトースの輸送に関わるタンパク質由来の結合ドメインであり、グルコースとガラクトースに結合することが知られている[24, 26]。グルコースセンサーがどの分子を特異的に認識するのかを知るため、グルコースと、グルコース以外の細胞内分子への応答性を測定した。候補分子として、グルコースの他に、グルコースと同じく単糖であるガラクトースとフルクトース、グルコースの代謝産物であるグルコース 1-リン酸とグルコース 6-リン酸とピルビン酸、また、人工甘味料であるスクラロースを用意した。結果として、グルコースセンサーはグルコースとガラクトースの添加によって蛍光輝度が変化した。フルクトース、グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、ピルビン酸、スクラロースの添加では蛍光輝度の変化は見られなかった (図 14)。以上の結果は、MglB の性質を反映していると推測されるが、グルコースイメージングの際には、ガラクトースによる輝度変化を考慮する必要がある。しかし哺乳類では、血中のグルコース濃度が 3~9 mM であるのに対し、ガラクトース濃度は $0.12 \pm 0.03 \mu\text{M}$ と非常に低く保たれている[35]。従ってガラクトースは、細胞内に存在したとしても、グルコースより低い濃度であると考えられる。そのため、哺乳類細胞内で発現したグルコースセンサーは、ほぼグルコースのみを認識できることが推測される。

1.4.6 緑色蛍光型グルコースセンサーの吸収スペクトル

吸収スペクトルでは、発色団の構造変化を推測することで、グルコースセンサーの蛍光輝度変化が起こる理由を考察する。蛍光タンパク質の発色団は、プロトン付加状態では蛍光を

発せず、脱プロトン状態のときに蛍光を発する。緑色蛍光タンパク質 Citrine の場合、発色団がプロトン付加状態のときは 400 nm 付近に、脱プロトン状態のときには 500 nm 付近に吸光ピークが観測されることが知られている[36]。これを基にしてグルコースセンサーの波形を見ると、10 mM グルコースの添加によりそれぞれ、420 nm 付近の吸光ピークが減少し、500 nm 付近の吸光ピークが増加している（図 13）。つまり、グルコースの結合による蛍光輝度の変化は、発色団の構造変化に起因すると考えられる。この結果から、グルコースセンサー内の結合ドメインにグルコースが結合すると、蛍光タンパク質の発色団付近の環境が変化し、発色団の脱プロトン状態の割合が増加することで、蛍光輝度が増加していると推測できる。

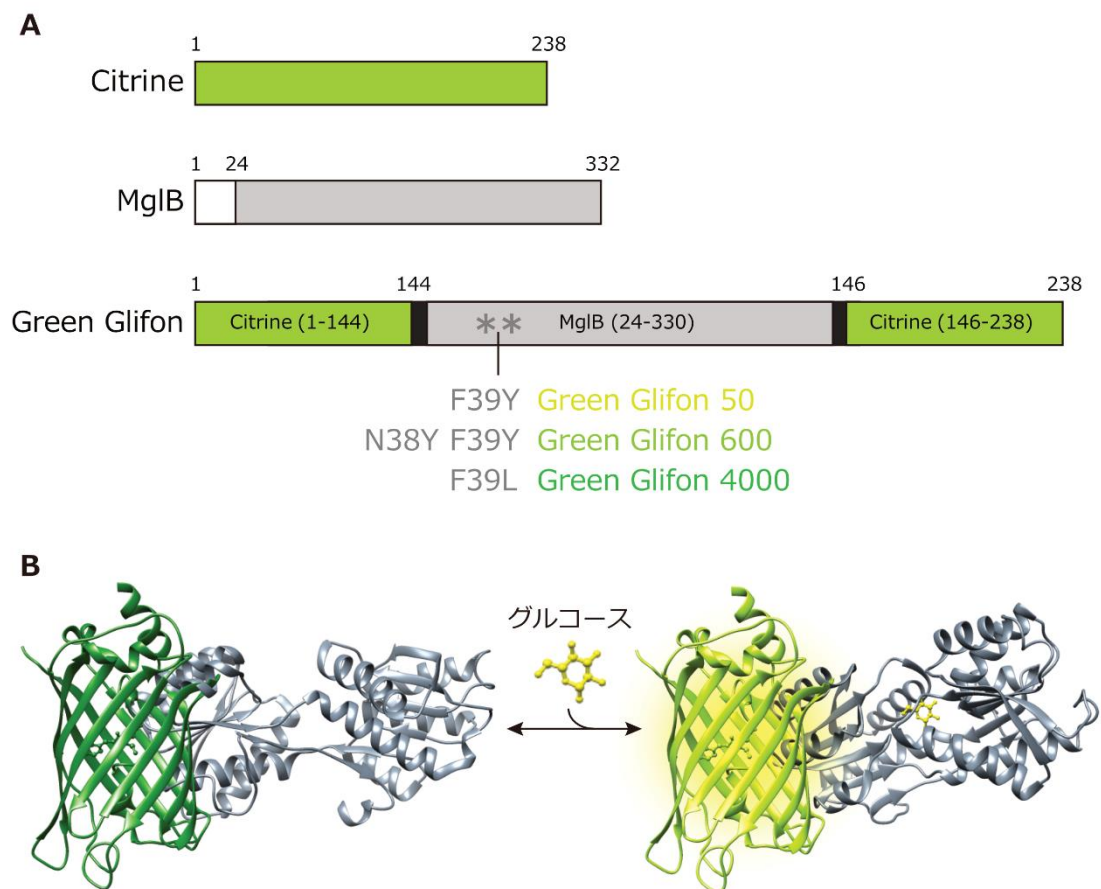
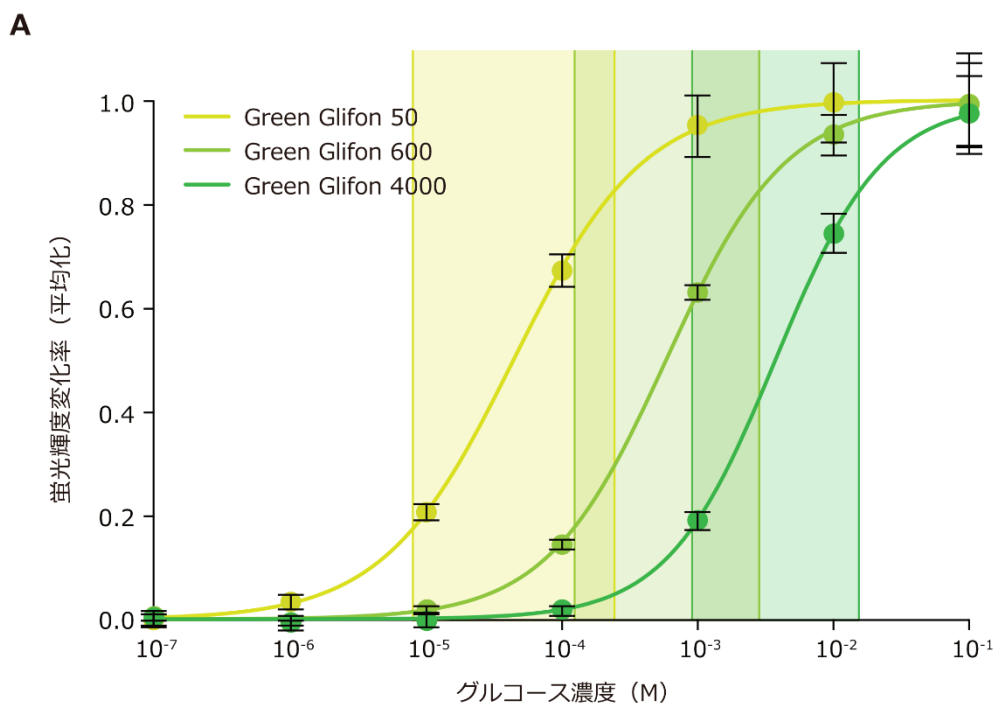


図 15 緑色グルコースセンサーGreen Glifon の配列模式図と構造予想図

(文献[21]より改変)

- (A) 本研究で作製したグルコースセンサーの配列模式図。緑色蛍光タンパク質 Citrine の配列を分割し、グルコース結合ドメインである MglB の配列を挿入している。MglB の N38 および F39 のアミノ酸に変異を加えることで、グルコースへの EC_{50} 値が異なる 3 種のグルコースセンサーを得た。
- (B) 本研究で作製したグルコースセンサーの構造予想図。センサーに、標的分子であるグルコースが結合することで蛍光輝度が上昇する、輝度上昇型の分子センサー。結合ドメインにグルコース分子が結合することによる構造変化が、リンカーアミノ酸配列を通して蛍光タンパク質部分に伝わり、蛍光輝度変化が起こると考えられる。



B

	EC ₅₀ 値	ワーキングレンジ		検出限界
		下限値	上限値	
Green Glifon 50	44 μ M	8.1 μ M	240 μ M	1.4 μ M
Green Glifon 600	590 μ M	0.12 mM	2.8 mM	12 μ M
Green Glifon 4000	3800 μ M	0.92 mM	15 mM	290 μ M

図 16 3種のグルコースセンサーのワーキングレンジと検出限界 (文献[21]より改変)

(A) 3種のグルコースセンサーのワーキングレンジ。グルコースへの濃度依存性曲線に重ねて示している。各色が各センサーのワーキングレンジを示す。

(B) 3種のグルコースセンサーの性質データ値のまとめ。EC₅₀値とワーキングレンジの下限値・上限値、検出限界のグルコース濃度を示す。

第2章 生細胞でのグルコースイメージング

2.1 序論

2.1.1 生細胞へのセンサー適用とその意義

第1章で述べたように、蛍光タンパク質型分子センサーは、生細胞内でのライブイメージングにより、細胞内分子の挙動を明らかにし、生命科学研究に貢献してきた。本グルコースセンサーは、精製タンパク質での *in vitro* の結果から、十分な蛍光輝度変化率をもち、生理的なグルコース濃度範囲に適用可能であることが分かった。しかしこれらの性質が、生細胞内でも維持されるかは不明である。過剰発現させたセンサーが、どのように発現して機能するかを知るには、実際に生細胞に導入し、評価試験を行う必要がある。

本章では、生細胞内でのグルコースイメージングの達成を目標とし、そのための条件検討とグルコースセンサーの細胞内での挙動評価を行った。生細胞として、一般的な株化細胞である HeLa 細胞と、グルコース動態の解析に多く用いられる膵β細胞株である MIN6 m9 細胞を選出した。これらの株化細胞に本グルコースセンサーを導入して、生細胞内で既知のグルコース変動を捉えることができるかを検証し、ライブセルイメージングに適しているかを評価した。また、単色蛍光型分子センサーのメリットである、別の色のセンサーと組み合わせたマルチカラーイメージングにも適用可能であるかを検証した。

2.2 方法

2.2.1 細胞発現用プラスミドの構築

哺乳類細胞での遺伝子発現のため、各グルコースセンサーを pcDNA3.1(-)ベクター (Thermo Fisher Scientific) にサブクローニングした。細胞小器官への局在化実験では、以下のシグナル配列を含むベクターに、Green Glifon 600 をサブクローニングした。ミトコンドリア局在型のみ、3種の Green Glifon をそれぞれサブクローニングした。作製したプラスミドの名称と局在箇所、シグナル配列は以下に示した。

表1 細胞発現用プラスミドの一覧

プラスミドの名称	局在箇所	シグナル配列	発現するセンサー
Green Glifon 50	細胞質基質	なし	Green Glifon 50
Green Glifon 600			Green Glifon 600
Green Glifon 4000			Green Glifon 4000
PM-Green Glifon 600	細胞膜 (細胞質基質向き)	MLCCMRRTKQ VEKNDEDQKI	Green Glifon 600
NLS-Green Glifon 600	核内	MPKKKRKV	Green Glifon 600
mito-Green Glifon 50	ミトコンドリア内腔	MSVLTPLLLR	Green Glifon 50
mito-Green Glifon 600		GLTGSARRLP	Green Glifon 600
mito-Green Glifon 4000		VPRAKIHSLPP EGKL	Green Glifon 4000

2.2.2 株化細胞の培養

細胞は、ヒト子宮頸がん細胞株の HeLa 細胞とマウス膵β細胞株の MIN6 m9 細胞を用いた。MIN6 m9 細胞は、清野進博士（神戸大学大学院医学研究科）より譲り受けた。HeLa 細胞用の培養液には、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（Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, U.S.A.）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・0.1 mg/mL ストレプトマイシン（SIGMA-ALDRICH）を添加したものをを用いた。MIN6 m9 細胞の培養液には、HeLa 細胞の培養液に 50 μM の β-メルカプトエタノールを添加したものをを用いた。それぞれの細胞は、37 °C、5 % CO₂ 下で継代培養した。

観察時、35 mm ガラスボトムディッシュは、15 分間 UV 照射して滅菌し、1 mg/mL poly-L-lysine (PLL, SIGMA-ALDRICH) をガラス上に 200 μL 滴下して 30 分静置した。400 μL の PBS で 3 回洗浄し、イメージング用ディッシュとした。このディッシュに、トリプシン処理した細胞を播種し、2 mL の培養液を加えて 37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。1 ディッシュあたりに播種する細胞数は、HeLa 細胞は 1.0×10⁵ 個、MIN6 m9 細胞は 2.0×10⁵ 個とした。

2.2.3 細胞への遺伝子導入

細胞への遺伝子導入には、Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (LF2K, Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞を播種してから 2 日後に、遺伝子導入の操作を行った。イメージング用ディッシュ 1 枚あたり、1.5 μ g のプラスミドと 3 μ L の LF2K を 1 mL の培養液中に添加した。HeLa 細胞は 32 °C で 4 時間、MIN6 m9 細胞は 37 °C で 1 日、5 % CO₂ 下で培養した。その後、新しい 2 mL 培養液に交換し、観察日まで培養を続けた。HeLa 細胞は遺伝子導入から 2 日後に観察、MIN6 m9 細胞は遺伝子導入操作の 3 日後に観察した。MIN6 m9 細胞は、観察する前日に、培地を 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 DMEM に交換した。

2.2.4 細胞内でのグルコースイメージング

グルコースセンサーを導入した HeLa 細胞の観察日には、イメージング記録用溶液 (modified Ringer's buffer: RB, 140 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgSO₄, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 2 mM NaHCO₃ [pH 7.4]) 1 mL で細胞を 2 回洗浄し、2 mL の RB 中で、37 °C、5 % CO₂ 下で 30 分間培養した。その後、新しい RB 1 mL に交換し、顕微鏡での観察を開始した。

観察には、倒立顕微鏡 (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan) に油浸 40 倍対物レンズ (UApo/340, $\times 40$, NA = 1.35, Olympus)、EM-CCD カメラ (Evolve, Photometrics, Tucson, AZ, USA) を取り付けたシステムを利用した。励起光にはキセノンランプ (U-LH75XEAP0, Olympus) を使い、460-495 nm の励起光フィルターと 510-550 nm の吸収フィルター、505 nm のダイクロイックミラーのフィルターセット (U-MWIBA2, Olympus) で蛍光を観察した。観察中、イメージング用ディッシュ内の溶液が常に入れ替わるよう、灌流装置につないだチューブを設置した。レンズとステージと灌流チューブにはヒーターを設け、それぞれ 37 °C に設定した。撮影は Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて 20 分間行い、5 秒ごとに画像を取得した。

2.2.5 グルコース取り込みの阻害

細胞外からのグルコース取り込みを阻害する物質として、アピゲニン (WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) とフロレチン (SIGMA-ALDRICH) を用いた。アピゲニンはジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) に、フロレチンはエタノールに溶解した。3 mM および 25 mM グルコースを含む RB で、アピゲニンは最終濃度 25 μ M、フロレチンは最終濃度 1 mM となるように希釈した。この溶液を用い、2.2.4 に示した操作でグルコースセンサーの蛍光輝度の変化を測定した。アピゲニン投与のコントロール条件として、3 mM および 25 mM グルコースを含む RB に最終濃度 0.0025% の DMSO を溶解したものを

いた。フロレチン投与のコントロール条件として、3 mM および 25 mM グルコースを含む RB に最終濃度 1%のエタノールを溶解したものを用いた。

2.2.6 局在型グルコースセンサーの細胞内局在

局在型グルコースセンサーを導入した HeLa 細胞は、グルコースイメージングの前に、細胞内での局在解析を行った。観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) に油浸対物レンズ (UPlan SApo, $\times 60$, NA=1.35, Olympus) を取り付けしたシステムを利用した。励起光には 488 nm (Showa Optonics Co., Ltd., Tokyo, Japan) のアルゴンレーザーを用いた。その後、2.2.4 と同様の操作でグルコースイメージングを行った。

2.2.7 グルコースと Ca^{2+} の同時イメージング

カルシウムとの同時イメージングのため、グルコースセンサーを導入した MIN6 m9 細胞には、赤色カルシウム感受性色素 Rhod2 (Abcam, Cambridge, UK) を負荷した。イメージング日に、3 mM グルコースを含む RB 1 mL で細胞を 2 回洗浄し、3 mM グルコースを含む RB 2 mL 中で、37 °C、5 % CO_2 下で 30 分間培養した。3 mM グルコースを含む RB 1 mL で 2 回洗浄し、RB 750 μL の中に最終濃度が 3 μM となるように Rhod2 を添加し、37 °C、5 % CO_2 下でさらに 30 分間培養した。合計 60 分の培養後、3 mM グルコースを含む RB 1 mL で 2 回洗浄し、RB 1 mL 中で観察を開始した。

観察には、倒立顕微鏡 (Axio Observer D1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) に油浸 40 倍レンズ (UPlanApo, $\times 40$, NA=1.00, Olympus) または 100 倍対物レンズ (UPlanApo, $\times 100$, NA=1.35, Olympus)、デジタル CMOS カメラ (ORCA-Flash4.0V2, C11440, Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka, Japan) を取り付けしたシステムを利用した。励起光には水銀ランプ (HBO100, Carl Zeiss) を用い、青励起には BP470/40 の励起フィルターと FT495 のダイクロイックミラーのセット (B38-HE, Carl Zeiss) を、緑励起には BP530-585 の励起フィルターと FT600 のダイクロイックミラーのセット (G00, Carl Zeiss) で蛍光を観察した。観察中、イメージング用ディッシュ内の溶液が常に入れ替わるよう、灌流装置につないだチューブを設置した。レンズとステージと灌流チューブにはヒーターを設け、それぞれ 37 °C に設定した。撮影は Metamorph software を用いて 20 分間行い、5 秒ごとに画像を取得した。

2.2.8 イメージングデータの解析

取得したイメージングデータは、ImageJ の Stackreg プラグインの Translation モードを用いて、細胞の位置を補正した。その後、Metamorph software に取り込み、個々の細胞の蛍光輝度を測定した。HeLa 細胞や MIN6 m9 細胞でのイメージングでは、撮影開始から最初の刺激投与までの蛍光輝度の平均値を 100 % とし、撮影中の各細胞の蛍光輝度変化を標準化した。経時的な蛍光輝度変化の平均値と、標準偏差を示したグラフを作成した。

統計解析には、GraphPad Prism6 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。Welch's t test の結果と、標準偏差のエラーバーを示した。

2.3 結果

2.3.1 HeLa 細胞でのグルコースイメージング

3 種のグルコースセンサーをそれぞれ導入した HeLa 細胞は、0 mM グルコースの RB 中で観察を開始した。観察途中で、3 mM または 25 mM グルコースの RB をそれぞれ 2 分間ずつ灌流し、グルコース刺激を与えた。それぞれのグルコースセンサーは、外液中のグルコース濃度の上昇に伴って、蛍光輝度が上昇した (図 17, 18)。外液中のグルコースを取り除くと、蛍光輝度が減少し、センサーの応答には可逆性が見られた。

3 mM または 25 mM グルコースの RB に、最終濃度 25 μ M のアピゲニンまたは最終濃度 1 mM のフロレチンを添加すると、グルコース刺激による各グルコースセンサーの輝度変化は見られなくなった (図 19A-C, 20A-C)。

2.3.2 局在型グルコースセンサーによるイメージング

シグナル配列のないグルコースセンサーまたはシグナル配列を融合した局在型グルコースセンサーを HeLa 細胞に発現させ、共焦点顕微鏡によって細胞内局在を観察した。シグナル配列のないグルコースセンサーは、細胞質基質に均一に発現していた (Green Glifon 600; 図 21A)。細胞膜局在型は、細胞の輪郭にそった蛍光がみられた (PM-Green Glifon 600; 図 21B)。核内局在型は、細胞中心部のみに蛍光がみられた (NLS-Green Glifon 600; 図 21C)。ミトコンドリア局在型は、ネットワーク状の蛍光がみられた (mito-Green Glifon 600; 図 21D)。

シグナル配列のないグルコースセンサーと同様の操作で、局在化グルコースセンサーによるグルコースイメージングを行った。細胞膜局在型と核内局在型は、3 mM または 25 mM グルコースの RB の灌流による、グルコース刺激によって蛍光輝度が変化した (図 22A, B)。一方で、ミトコンドリア局在型は、輝度変化を示さなかった (図 22C)。

グルコースへの EC_{50} 値が異なる、残り 2 種のグルコースセンサーでも、mito タグを融合したプラスミドを構築した。それぞれ HeLa 細胞に導入し、グルコースイメージングを行ったが、グルコース刺激による輝度変化はみられなかった (図 23)。

2.3.3 MIN6 m9 でのグルコース・ Ca^{2+} 同時イメージング

Green Glifon 4000 を導入した MIN6 m9 細胞に Rhod2 を負荷し、3 mM グルコースを含む RB 中で観察を開始した。撮影開始から 5 分後、25 mM グルコースを含む RB を灌流し、細胞にグルコース刺激を与えた。解析には、Green Glifon 4000 と Rhod2 の両方が導入されている細胞を選出した。Green Glifon 4000 と Rhod2 の蛍光輝度は、グルコース刺激後に上昇した (図 24)。

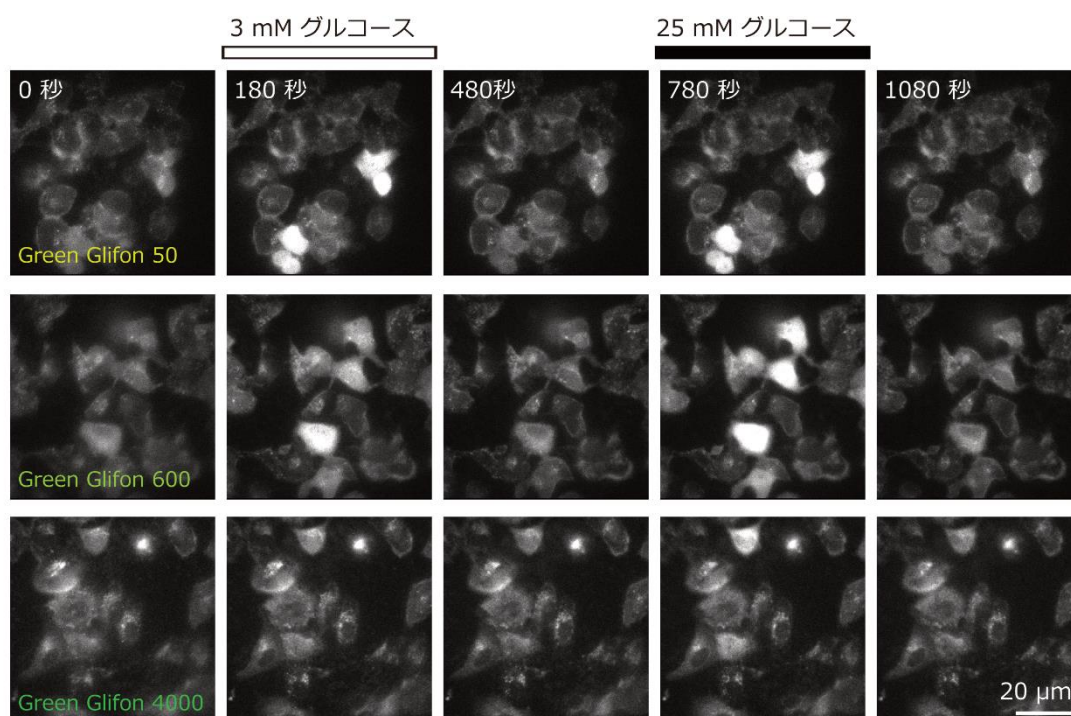


図 17 HeLa 細胞でのグルコースイメージング (文献[21]より改変)

各グルコースセンサーを発現した HeLa 細胞の蛍光観察像。バーで示した画像は、3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流したときのものである。バーで示していない画像は、グルコースを含まない RB を灌流している。グルコース刺激によって蛍光輝度は上昇し、その変化に可逆性があることが分かる。スケールバーは 20 μm 。

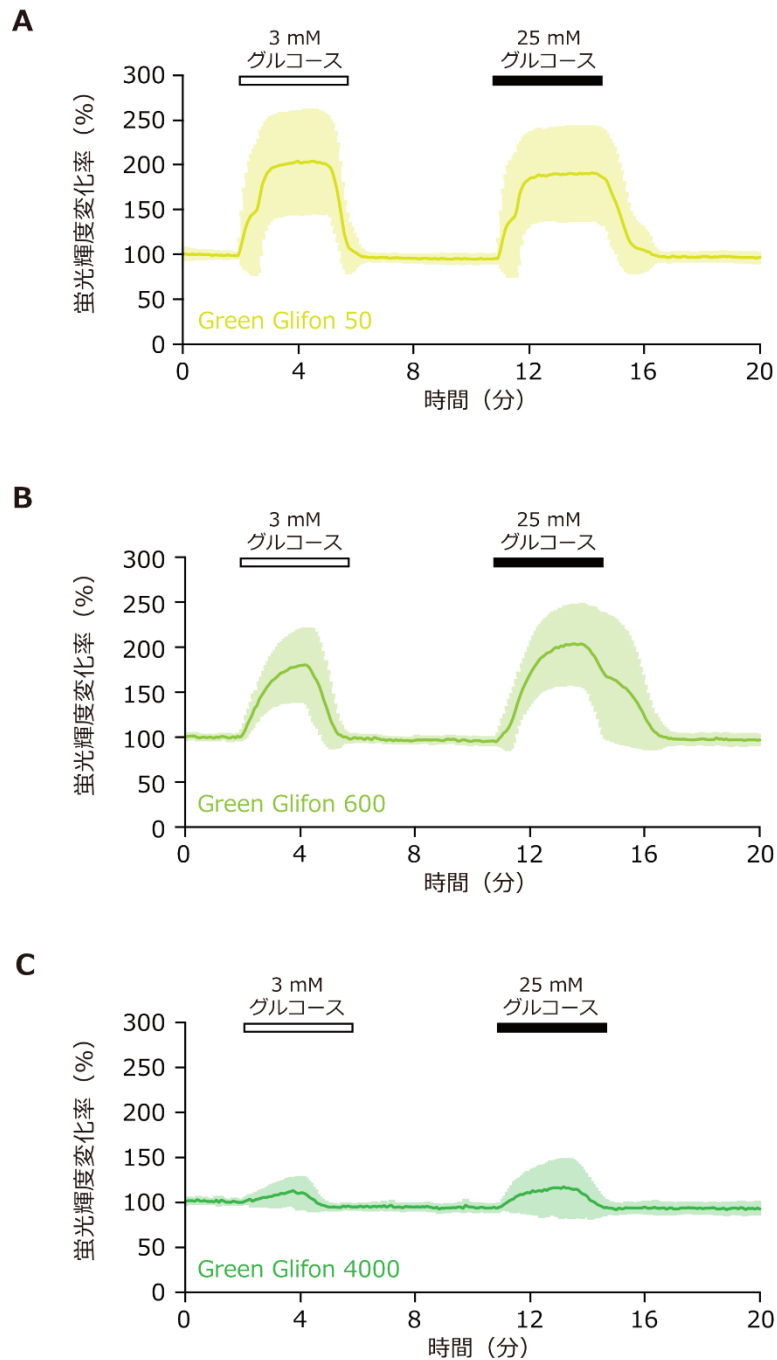


図 18 HeLa 細胞でのグルコースイメージングと蛍光輝度変化 (文献[21]より改変)

(A-C) 図 16 に示した細胞内の、Green Glifon 50 (A)、Green Glifon 600 (B) および Green Glifon 4000 (C) の蛍光輝度の経時変化。バーで示した時間には、3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流している。バーで示していない時間には、グルコースを含まない RB を灌流している。3 mM または 25 mM グルコース刺激時のみ、グルコースセンサーの輝度が上昇した。データは means \pm SD、Green Glifon 50; N = 14、Green Glifon 600; N = 15、Green Glifon 4000; N = 16。

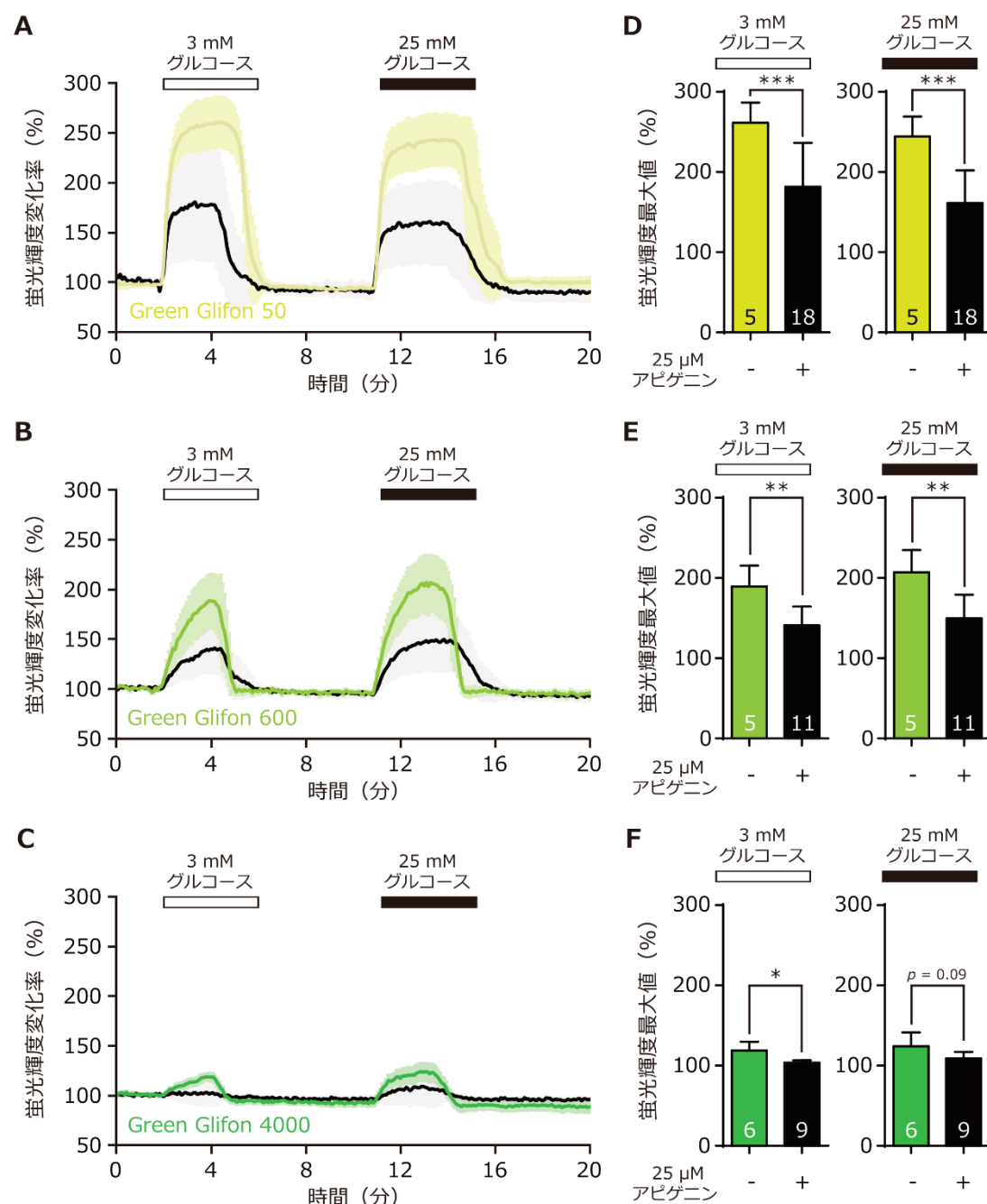


図 19 アピゲニンによるグルコース取り込み阻害

(A-C) グルコースとアピゲニンを同時投与したときの、各グルコースセンサーの蛍光輝度の経時変化。緑線はグルコースと溶媒のみ、黒線はグルコースとアピゲニンを投与した結果を示す。バーで示した時間に 3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流した。バーで示していない時間にはグルコースを含まない RB を灌流している。

(D-F) (A-C) の波形における、各グルコースセンサーの蛍光輝度変化率の最大値検定の結果。データは means \pm SD、N 数はグラフ内に示した。*は $p < 0.05$ を、**は $p < 0.01$ を、***は $p < 0.001$ を示す。

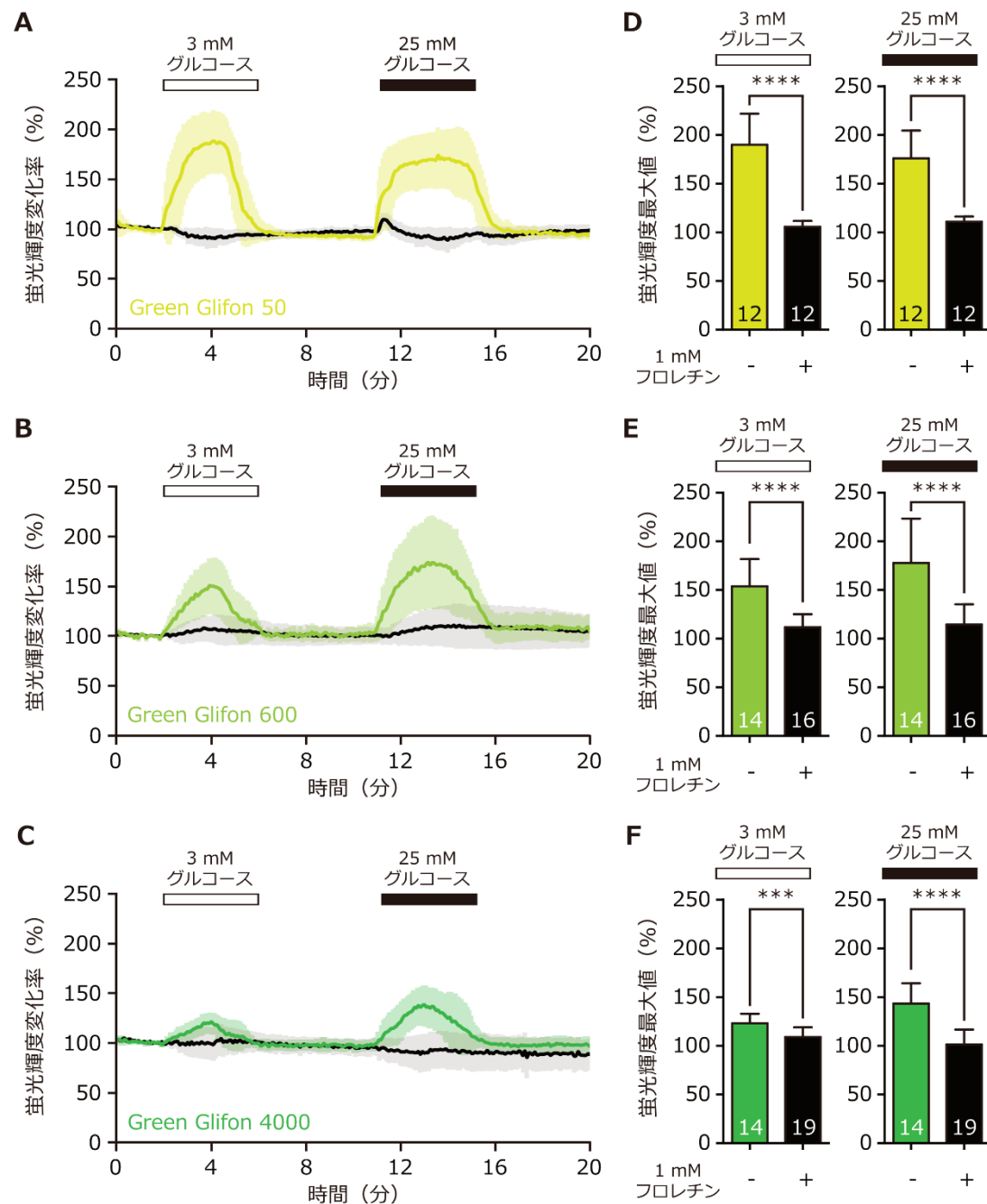


図 20 フロレチンによるグルコース取り込み阻害 (文献[21]より改変)

(A-C) グルコースとフロレチンを同時投与したときの、各グルコースセンサーの蛍光輝度の経時変化。緑線はグルコースと溶媒のみ、黒線はグルコースとフロレチンを投与した結果を示す。バーで示した時間に 3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流した。バーで示していない時間にはグルコースを含まない RB を灌流している。

(D-F) (A-C) の波形における、各グルコースセンサーの蛍光輝度変化率の最大値検定の結果。データは means \pm SD、N 数はグラフ内に示した。***は $p < 0.001$ を、****は $p < 0.0001$ を示す。

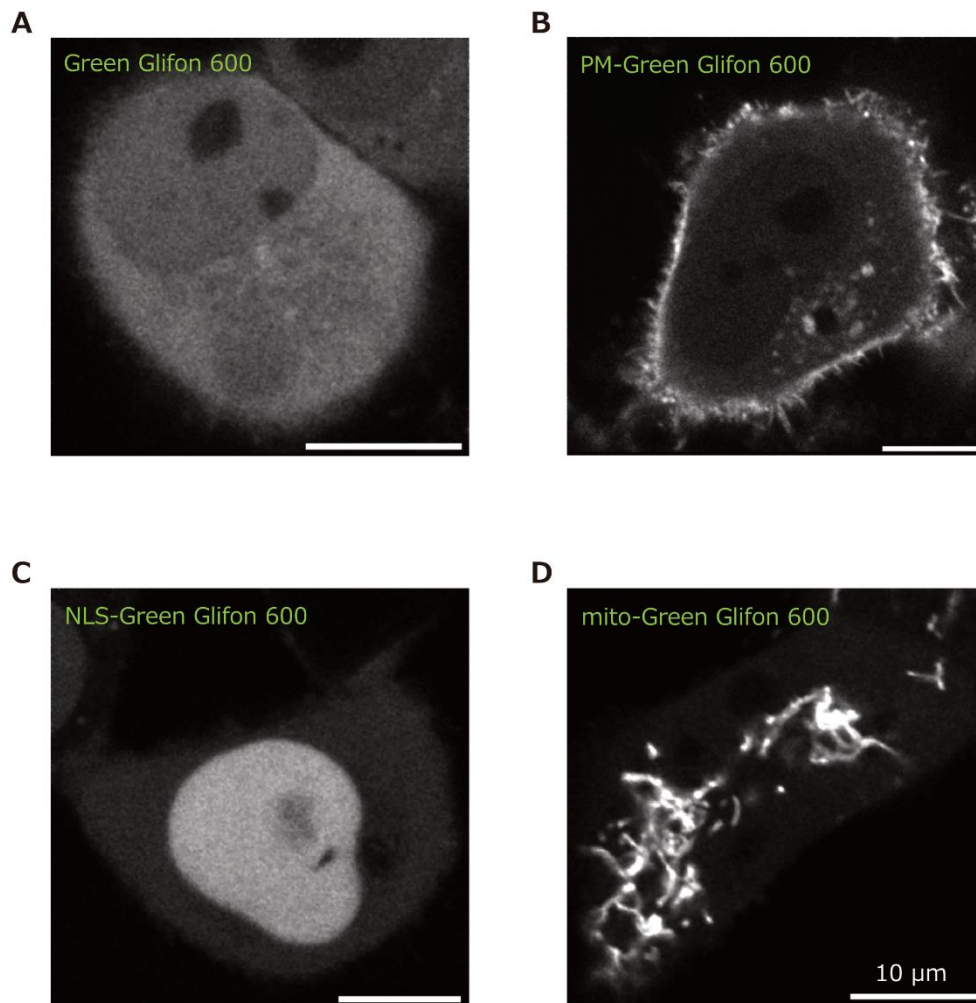


図 21 局在型グルコースセンサーの細胞内局在 (文献[21]より改変)

(A-D) 局在型グルコースセンサーの共焦点観察像。シグナル配列なしの Green Glifon 600 (A)、細胞膜膜局在型の PM-Green Glifon 600 (B)、核内局在型の NLS-Green Glifon 600 (C)、ミトコンドリア局在型の mito-Green Glifon 600 (D) を示す。スケールバーは 10 μm。

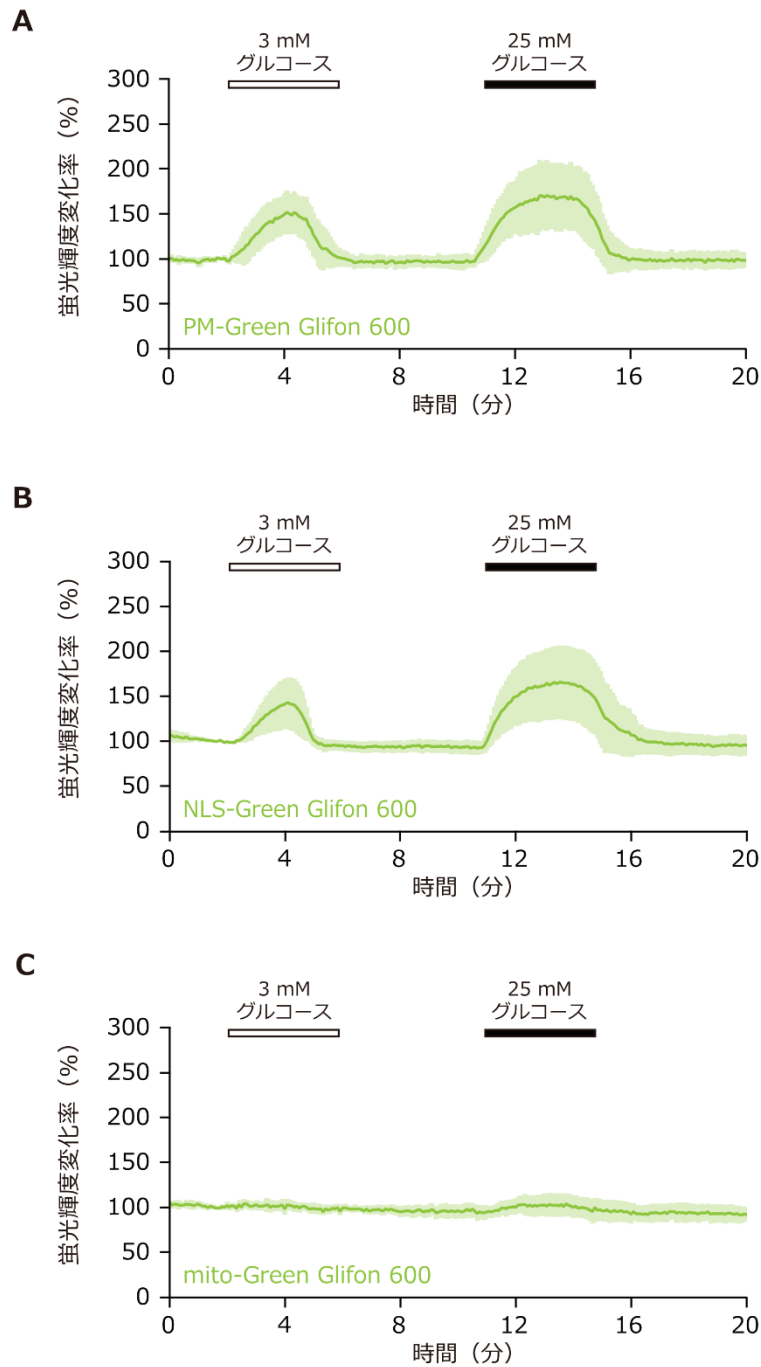


図 22 局在型グルコースセンサーの蛍光輝度変化 (文献[21]より改変)

(A-C) 局在型グルコースセンサーの蛍光輝度の経時変化。それぞれ、細胞膜局在型の PM-Green Glifon 600 (A)、核内局在型の NLS-Green Glifon 600 (B)、ミトコンドリア局在型の mito-Green Glifon 600 (C) の結果を示す。バーで示した時間に 3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流した。バーで示していない時間にはグルコースを含まない RB を灌流している。データは means \pm SD、PM-Green Glifon 600; N = 16、NLS-Green Glifon 600; N = 11、mito-Green Glifon 600; N = 17。

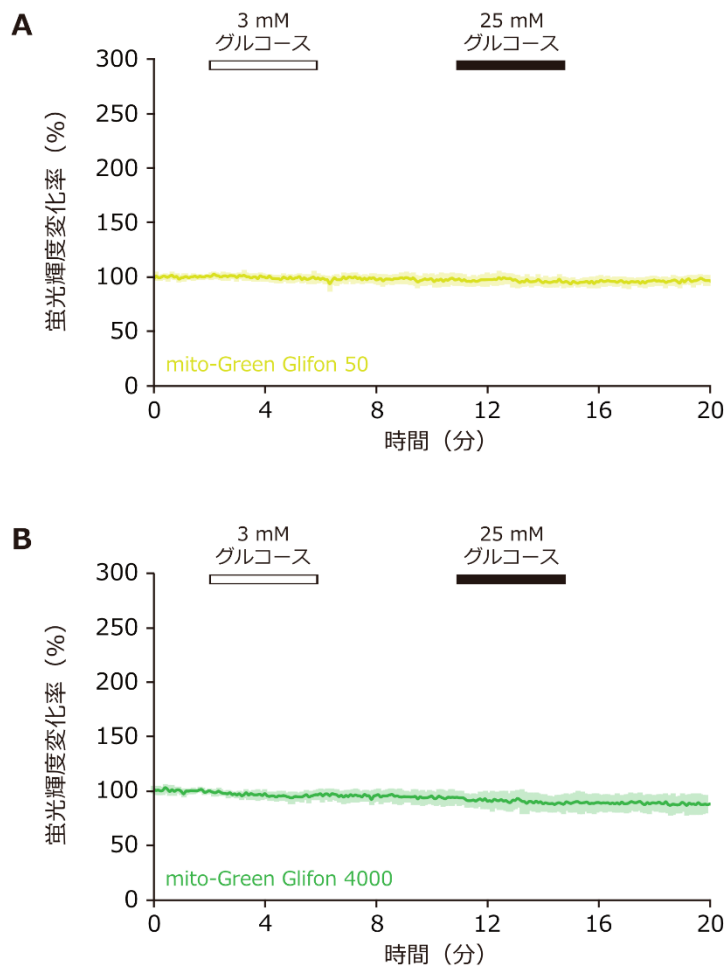


図 23 ミトコンドリア局在型グルコースセンサーの蛍光輝度変化（文献[21]より改変）

(A,B) ミトコンドリア局在型グルコースセンサーの蛍光輝度の経時変化。それぞれ、ミトコンドリア局在型の mito-Green Glifon 50 (A) と mito-Green Glifon 4000 (B) の結果を示す。バーで示した時間に 3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流した。バーで示していない時間にはグルコースを含まない RB を灌流している。データは means \pm SD、mito-Green Glifon 50; N = 17、mito-Green Glifon 4000; N = 17。

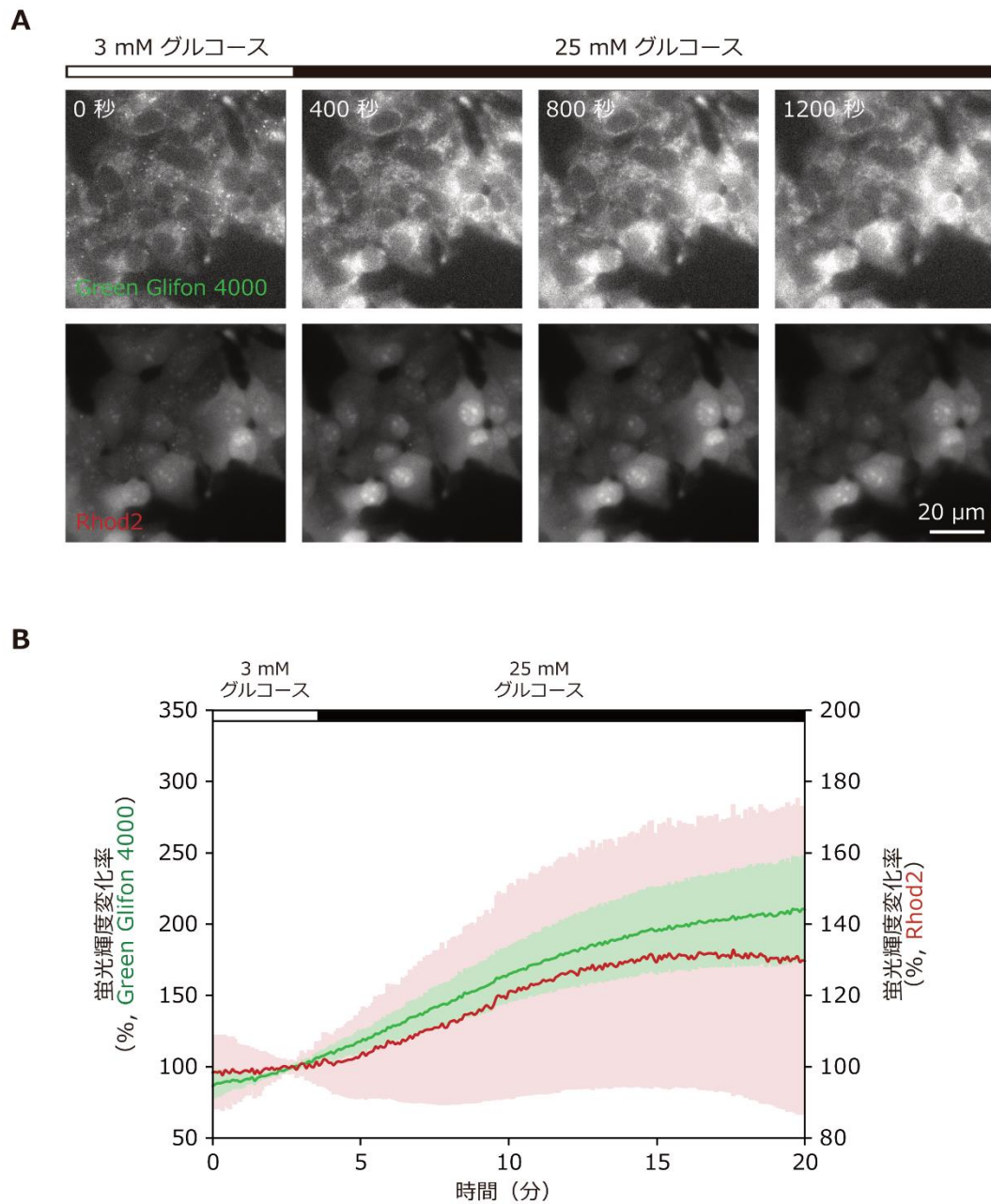


図 24 MIN6 m9 細胞でのグルコース・ Ca^{2+} イメージング (文献[21]より改変)

- (A) Green Glifon 4000 を発現し、Rhod2 を負荷した MIN6 m9 細胞の蛍光観察像。バーで示した画像は、3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流したときのものである。スケールバーは 20 μ m。
- (B) (A) に示した細胞の蛍光輝度の経時変化。バーで示した時間には、3 mM または 25 mM グルコースの RB を灌流している。25 mM グルコースの RB に切り替えると、Green Glifon 4000 および Rhod2 の輝度が上昇した。データは means \pm SD、N = 14。

2.4 考察

2.4.1 HeLa 細胞でのグルコースイメージング

3 種のグルコースセンサーはそれぞれ、細胞外液のグルコース濃度を变化させることで、蛍光輝度が変化することが分かった。HeLa 細胞の膜上には、グルコーストランスポーターが発現しており、濃度勾配に従ってグルコースを取り込むと考えられる。つまり、グルコースセンサーが細胞内でも機能し、グルコースに応答していることを示す結果となった。また、細胞外液のグルコースを取り除くと、蛍光輝度が減少したことから、センサーは可逆的にグルコースを認識できると考えられる。細胞内のグルコースは、グルコース濃度に依存して、センサーに結合または解離を繰り返していると推測される。

3 種のグルコースセンサーの蛍光輝度変化率は、それぞれ少しずつ異なることが分かった。Green Glifon 50 は、3 mM または 25 mM グルコースの刺激に対し、同程度まで蛍光輝度が上昇しているのに対し、Green Glifon 600 および Green Glifon 4000 は、蛍光輝度のピーク値に違いがあった。これは、各センサーのグルコースへの EC_{50} 値の違いを反映していると考えられる。Green Glifon 50 は、グルコースへの EC_{50} 値が 50 μ M であるため、3 mM または 25 mM どちらの刺激でも、ほぼ最大の蛍光輝度変化を示していることが予測される。一方、それよりも高い EC_{50} 値をもつ Green Glifon 600 と Green Glifon 4000 は、細胞内のグルコース濃度の違いを、蛍光輝度のピーク値の違いとして反映できたと考えられる。

また、細胞内でのグルコースセンサーの最大輝度変化率は 200%~250%程度であることが分かった。*In vitro* での最大輝度変化率は 7 倍程度だったが、それよりも小さい変化率を示した。これは、細胞外液のグルコースを除去しても、細胞内にグルコースが残存しているためだと考察した。細胞内のグルコースが完全に枯渇すると、細胞の生存が難しくなる。そのため、細胞外液にグルコースがない飢餓状態でも、細胞内に一定量のグルコースが残存していると考えられる。

以上のように、細胞内のグルコース濃度は、細胞外液のグルコース濃度変化に応じて変化することが推測された。これを裏付けるため、グルコースを細胞内に取り込んでいると考えられる、グルコーストランスポーターを阻害した対照実験を行った。グルコーストランスポーターの阻害剤としては、過去に報告されている、フラボノイドの一種であるアピゲニンと[37]、ポリフェノールの一種であるフロレチンを用いた[38]。それぞれ、グルコースとの同時投与で、グルコースセンサーの蛍光輝度上昇を有意に抑制することが分かった(図 19D-F, 20D-F)。また HeLa 細胞では、アピゲニンよりも、フロレチンの方が、グルコーストランスポーター阻害効果が大きいことが分かった。

2.4.2 局在型グルコースセンサーによるイメージング

シグナル配列のないグルコースセンサーは、細胞質基質に分布していることが分かった。グルコースセンサーをコードする塩基長は 1653 bp であり、550 アミノ酸となる。アミノ酸残基の平均分子量を 110 とすると、約 60 kDa に相当する。一般的に核膜孔は、40 kD 以下

の小分子やイオンを拡散によって通すといわれているので、グルコースセンサーは核内に入らず、細胞質基質に拡散していることが推測できる。

シグナル配列を融合したグルコースセンサーはそれぞれ、目的と思われる細胞小器官への局在が認められた。細胞膜局在型に用いたシグナル配列は、GAP43 (growth associated protein 43) 由来の配列であり、脂質ラフトにてパルミトイル化されることで、膜上にアンカーされることが知られている。核内局在型には、核内への輸送を誘導する NLS (nuclear localization signal/sequence) を用いた。ミトコンドリア局在型には、ミトコンドリアの膜上で複合体を形成する、COX8 (cytochrome c oxidase subunit 8A) 由来の配列を用いており、ミトコンドリアの内腔 (マトリクス) に輸送されることが分かっている。

さらに、細胞膜局在型と核内局在型は、細胞外からのグルコース刺激に応答し、輝度変化することが確認できた。一方で、ミトコンドリア局在型は、細胞外からのグルコース刺激による輝度変化を示さなかった。グルコースセンサーの EC_{50} 値が適していない可能性も考慮し、Green Glifon 50 および Green Glifon 4000 のミトコンドリア局在型プラスミドも作製し、Green Glifon 600 と同様にイメージングを行ったが、こちらも輝度変化を示さなかった。ミトコンドリアには、グルコースの代謝産物であるピルビン酸が輸送され、呼吸によって ATP が産生されることが知られている [39]。そのため、グルコースの状態ではミトコンドリアに輸送されていないことが推測され、グルコースセンサーの蛍光輝度が変化しないことが生理的な結果であると考えられた。以上より、局在型グルコースセンサーが局在先でも機能し、生理的なグルコース動態を可視化できることが示された。

また、本実験により、細胞外から取り込まれたグルコースは、拡散によって核内にまで到達する可能性が示された。近年、核内へのグルコース蓄積は、エビジェネティクスの分野で注目されており、DNA 修飾への関与や、ガン化による核へのグリコーゲン蓄積などが報告されている [40]。今後、核内でのリアルタイムなグルコースイメージングが、重要な発見をもたらす可能性が期待できる。

2.4.3 MIN6 m9 でのグルコース・ Ca^{2+} 同時イメージング

MIN6 m9 細胞の外液を低グルコース状態から高グルコース状態に切り替えることで、細胞内の Ca^{2+} およびグルコース濃度が上昇することが示唆された。膵 β 細胞には、グルコース代謝依存的なインスリン分泌経路が存在する。これは、細胞外から取り込まれたグルコースが、細胞内で代謝を受けて ATP となり、ATP 感受性 K^+ チャネル (K_{ATP} チャネル) と電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介して、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすことで生じる (図 25)。しかし、グルコースおよび Ca^{2+} がどのようなタイムスケールで上昇するのか、これまで観察されてこなかった。今回の結果は、細胞内のグルコース濃度上昇と Ca^{2+} 濃度上昇が、単一の細胞内でほぼ同時に起こることを新たに示した。

このように、緑色グルコースセンサーは、他色のセンサーと組み合わせることで、複数の分子動態の一細胞レベルでの解析を可能にした。グルコースと他分子の細胞内での相互作用

用や、経時的な変化を観察できるため、グルコース代謝のリアルタイム解析などにも応用できると考える。例えば、グルコースの代謝産物である ATP については、赤色 ATP センサー MaLionR (Monitoring aTP Level intensity based turn on indicators) が開発されている[41]。グルコースセンサーと MaLionR の併用により、グルコースから ATP への代謝がどのくらいのタイムスケールで行われるのか、どのような刺激によって促進されるかなどを検討できるようになった。また、ペプチドホルモンの分泌には、細胞内の Ca^{2+} 動態だけでなく、cAMP 動態も重要であることが知られている[42–44]。赤色 cAMP センサー Pink Flamindo との併用は、ペプチドホルモン分泌における、シグナル分子とグルコース代謝の関連を明らかにできる可能性がある[45]。

2.4.4 3種のグルコースセンサーの使い分け

これまでの生細胞イメージングの結果から、ヒト子宮頸がん細胞株の HeLa 細胞には Green Glifon 600 が、マウス膵 β 細胞株の MIN6 m9 細胞には Green Glifon 4000 によるグルコースイメージングが適していることが示唆された。この結果は、組織ごとに細胞内グルコース濃度が異なり、膵 β 細胞が上皮細胞よりも高い細胞内グルコース濃度で維持されている可能性を示した。HeLa 細胞を含む、多くの細胞で発現する GLUT1 (glucose transporter member 1) は、グルコースに対して $\sim 3 \text{ mM}$ の K_m 値をもつ[46]。一方、膵 β 細胞で高度に発現する GLUT2 (glucose transporter member 2) は、グルコースに対して $\sim 17 \text{ mM}$ の K_m 値をもつ[47]。グルコースへの K_m 値が高い GLUT2 は、GLUT1 に比べて、より高い濃度のグルコースに応答していることが推測できることから、細胞ごとに発現している GLUT サブタイプの違いが、細胞内グルコース濃度の違いを生み出していると考えた。グルコースイメージングの際には、推測される細胞内グルコースの基底濃度に合わせて、適切なワーキングレンジのグルコースセンサーを選ぶことで、より大きな蛍光輝度変化を引き出し、微細な変化を検出できると考える。

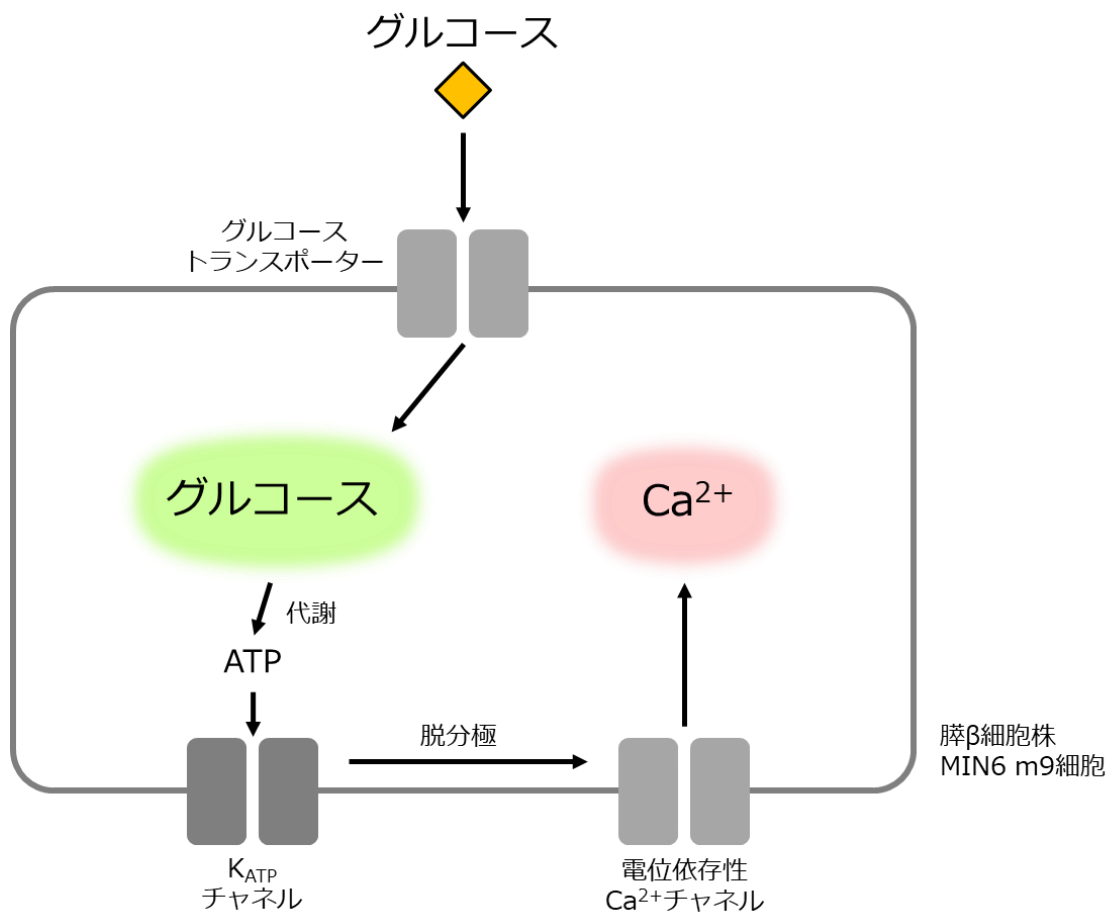


図 25 MIN6 m9 細胞内の分子挙動の模式図

MIN6 m9 細胞において、グルコース刺激による細胞内グルコースおよび Ca²⁺濃度上昇経路の予想図。細胞外から取り込まれたグルコースは、グルコーストランスポーターを介して取り込まれると予想される。そのグルコースは、代謝によって ATP になり、脱分極を介して Ca²⁺濃度上昇を引き起こすことが推測される。

第3章 各組織におけるグルコース動態解析

3.1 序論

3.1.1 モデル生物である線虫

線虫 (*Caenorhabditis elegans*; *C. elegans*) は、多細胞生物としては初めて、全ゲノムが解読された生物である。非寄生性の土壌線虫であり、体長は1 mm程度である[48]。雌雄同体と雄が存在し、雌雄同体株は自家受精することによって子孫を残すことができる。世代時間も短く、飼育も容易である。体は透明で、すべての細胞系譜が明らかにされている。マイクロインジェクションによる形質転換も可能で、蛍光顕微鏡下で生きたまま観察できるという利点がある[49]。雌雄同体の959個の体細胞のうち、302個が神経細胞であり、電子顕微鏡での切片観察から、神経細胞のシナプス結合のすべてが解明されている[50]。さらに線虫は、温度や光、化学物質など、さまざまな外部環境を認識し、誘引行動や忌避行動を示すことが知られている[51–56]。そのため、行動を指標にし、刺激の受容から行動としての出力まで、一連の流れを観察することができる。このような多くの点から、遺伝学や発生学、神経科学など、さまざまな分野でモデル生物として用いられている。近年では、線虫にも、インスリン/IGF様のシグナル伝達経路が存在することが報告され、代謝疾患研究における貢献が期待されている[57]。しかし、線虫に適用可能なグルコースセンサーが報告されておらず、線虫におけるグルコース動態解析は行われていない。

3.1.2 スクリーニングにおける蛍光センサーの利用

血液や尿中に含まれるグルコースは、多くの代謝障害のマーカーとしても利用できる。そのため、疾患研究や薬剤探索などの生化学的なスクリーニングアッセイでは、蛍光を指標として、グルコース濃度を推定する手法がとられる[6, 58, 59]。酵素免疫定量法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) は、定量に用いられる手法の一つであるが、多くのサンプル量を必要とし、測定までに時間を要してしまう。また、測定サンプルとして用いられる体液中には、グルコース以外の分子も多量に含まれるため、目的分子への特異性が求められる。そこで、グルコース特異的に蛍光輝度が変化する本グルコースセンサーを用い、微量のサンプル中のグルコース濃度を推定する、測定系の確立を目指した。

3.1.3 ペプチドホルモンと内分泌細胞

ペプチドホルモンは、アミノ酸由来のホルモンであり、インスリンやグルカゴン、成長ホルモンなどが挙げられる。中でもインスリンは、血糖値を減少させる唯一のホルモンであり、血中・臓器内グルコース濃度の調節や、タンパク質や脂質を含む栄養素の代謝調節に寄与する[60]。インスリンは、生体内のグルコース恒常性において最も重要なホルモンであり、糖尿病治療に用いられる[61]。また、GLP-1 (グルカゴン様ペプチド-1, glucagon-like peptide-1) は、膵β細胞にはたらきかけることで、インスリン分泌を調節するホルモンである[62, 63]。

GLP-1 は、血中グルコース濃度が高いときにはインスリン分泌を促進するが、血中グルコース濃度が低いときにはインスリン分泌を促進しない。低血糖の発生リスクが低いという利点から、糖尿病治療の標的として注目され始めている。

内分泌細胞は、前述のようなペプチドホルモンの分泌を司る細胞であり、膵臓や腸、胃など、さまざまな臓器に存在する。内分泌細胞は、体内の環境変化を感知してペプチドホルモンを分泌し、主に血液を介して他の臓器や細胞にシグナルを伝えることで、生体の恒常性維持に貢献する[64]。本研究では、インスリンを分泌する膵β細胞と、GLP-1を分泌する小腸内分泌L細胞に着目し、これらを総称して「内分泌細胞」と表記する。

3.1.4 内分泌細胞からのペプチドホルモン分泌機序

内分泌細胞は、細胞外のグルコース濃度の変化に応じ、ペプチドホルモンを分泌する[65]。この応答は、グルコーストランスポーターを介して取り込まれたグルコースが、ATP への代謝と脱分極を介し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を引き上げることで生じるとされ[36]、グルコース代謝に依存的な経路として知られている[66]（図 25 左側）。一方で、グルコース以外のアミノ酸や脂肪酸によっても、ペプチドホルモン分泌が促進されることが分かってきた[67–72]。内分泌細胞の細胞膜表面には、多種の G タンパク質共役型受容体（G protein-coupled receptor, GPCR）が発現しており、GPCR を介したペプチドホルモンの分泌経路（グルコース代謝に依存しない経路）が特定されてきた（図 25 右側）。しかし、内分泌細胞に発現する GPCR は、前述のようにリガンドが特定されているものもあれば、リガンドや機能が未解明なオーファン受容体も多数存在する。また、GPCR の下流のシグナル経路も複雑で、完全に特定されているものは少ない。さらに興味深いことに、膵β細胞での研究によって、グルコースが GPCR によっても認識される可能性が示されたが、そのシグナル経路は不明である[73]。このように、内分泌細胞からのペプチドホルモン分泌機序にはいまだ不明な点が多い。肥満症や糖尿病の治療法探索のためにも、その解明が待たれている。

3.1.5 人工甘味料の内分泌細胞への作用

人工甘味料は、ヒトの食品に添加される人工化合物であり、味蕾の甘味受容体に作用することで、甘味のシグナルを引き起こす[74]。糖であるグルコースやスクロースも同様に、味蕾の甘味受容体に受容され、その後、細胞内に取り込まれ、代謝されて生体のエネルギー源として利用されている。一方で人工甘味料は、細胞内に取り込まれず、代謝も受けないとされ、生体がエネルギーとして利用することができない。そのため、ゼロカロリー食品への添加物として一般的に利用され、糖尿病患者の食生活の助けとなっている。しかし、いくつかの人工甘味料の摂取は、血糖値が上昇しないのにも関わらず、膵β細胞に作用することでインスリンの分泌を、小腸内分泌L細胞に作用することで GLP-1 の分泌を促進する可能性が報告された[73, 75–78]。

味蕾で人工甘味料を受容する甘味受容体は、クラス C の GPCR の一種であり、Taste receptor type 1 member 2 (Tas1r2) と Taste receptor type 1 member 3 (Tas1r3) のヘテロ二量体で構成されている[79]。甘味受容体は、膵 β 細胞や小腸内分泌 L 細胞にも発現しており、その活性化によってペプチドホルモン分泌が促進されることが知られている[73, 75, 80]。このことから、人工甘味料は、甘味受容体を介して内分泌細胞に作用すると考えられてきた[81] (図 25 右側)。しかし近年、膵 β 細胞の研究で、クラス C の別の GPCR である、カルシウム感知受容体 (calcium-sensing receptor: CaSR) の活性化も、細胞内での ATP 産生を促進し、インスリン分泌に関与することが示唆された[82]。人工甘味料によるペプチドホルモンの分泌機序については、いまだに統一的な見解がない。

3.1.6 神経・グリア間のエネルギー恒常性

脳において、グルコースは最も重要なエネルギー源である。脳は、神経活動を司る神経細胞と、その周りを埋めるグリア細胞によって構成される。グリア細胞には、脳の構造を保つだけでなく、神経活動時に放出される神経伝達物質や不要物の回収、脳内への物質輸送を制御する血液脳関門の形成など、さまざまな作用がある[83, 84]。なかでも重要とされるのは、神経細胞へのエネルギー源供給による、脳内のエネルギー恒常性の維持である。この作用は、個体の行動や記憶学習、睡眠にも密接に関与すると報告されている[85–87]。しかし、脳内のエネルギー恒常性と神経活動の関係は、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る。これまでの解析は、ELISA 法による濃度推定や、グルコースや ATP など、1 分子に着目した動態観察が主流であり[88, 89]、2 細胞間でのエネルギー源のやりとりを、リアルタイムで捉えた例はない。

3.1.7 ウイルスベクターによる遺伝子導入技術

グリア細胞の一種であるアストロサイトでは、グルタミン酸を介した細胞内 Ca^{2+} 上昇や、ノルアドレナリンなどの神経伝達物質の受容による細胞内 cAMP 上昇が、アストロサイトの活性を制御すると報告されている[90, 91]。このような分子挙動の解明には、脳細胞への蛍光型分子センサー遺伝子の導入が欠かせない。脳細胞への遺伝子導入手法として、トランスフェクション試薬を用いたリポフェクション法やエレクトロポレーション法の他に、ウイルスベクターを用いた方法がある。

脳で一般的に用いられるウイルスベクターは、レトロウイルスを利用したレンチウイルスベクターや、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) ベクターである。レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus: HIV) の構造を基に開発された[92, 93]。非分裂細胞である神経細胞を含めた、さまざまな種類の哺乳類細胞に遺伝子導入できる。導入した目的遺伝子は、宿主のゲノムに組み込まれるため、安定して遺伝子発現できるというメリットがある。AAV ベクターは、アデノウイルスベクター

の作製途中に発見された、AAV を元に開発された[94,95]。P1 実験室で扱うことができ、アデノウイルスベクターに比べて安全性が高い。免疫系への作用が小さく、動物個体への遺伝子導入にも広く利用される。

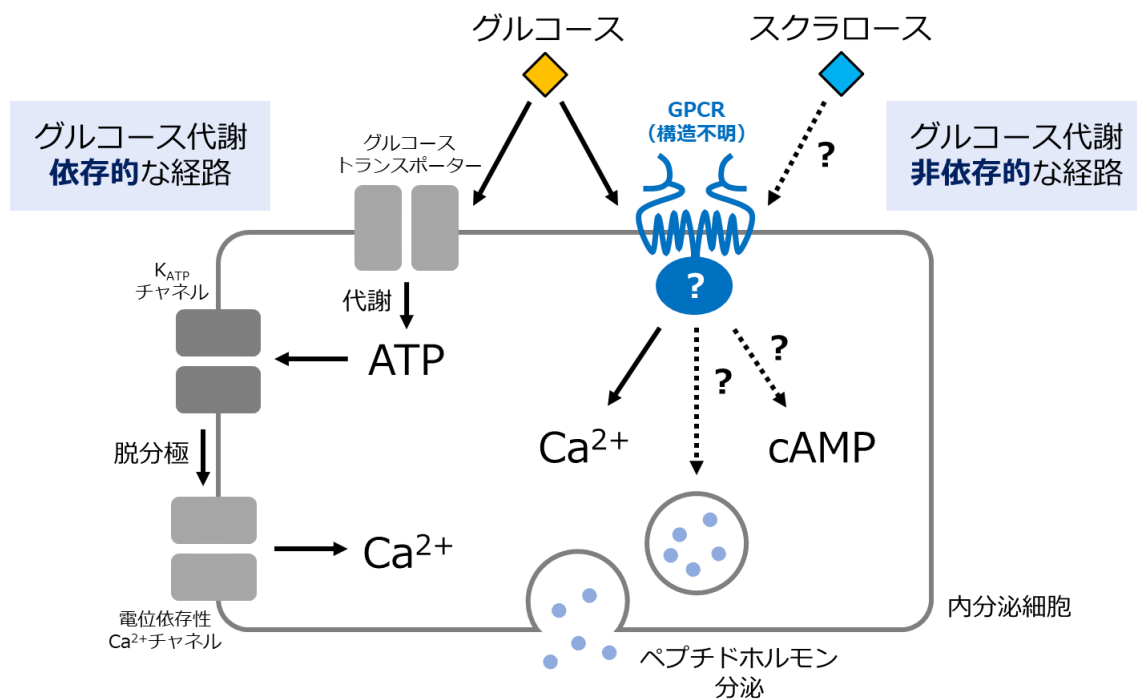


図 26 内分泌細胞で推測されるペプチドホルモン分泌機序

内分泌細胞（膵 β 細胞および小腸内分泌 L 細胞）で推測されているペプチドホルモンの分泌機序。グルコース代謝に依存した経路（左側）と、何らかの GPCR を介する、グルコース代謝に依存しない経路（右側）が存在すると推測されている。グルコースは両方の経路を、スクラロースは右側の経路を活性化させることで、ペプチドホルモン分泌を引き起こすと推測されている。

3.2 方法

3.2.1 線虫発現用プラスミドの構築

線虫の咽頭筋での遺伝子発現のため、*myo-2* プロモーターと *unc-54* 遺伝子の 3'非翻訳領域を持つ、pPD136.61 ベクターへのサブクローニングを行った。pPD136.61 ベクターは、Andrew Fire 博士（Stanford University School of Medicine）より譲り受けた。PCR 法により、各グルコースセンサーの N 末端に *Xho*I 認識配列を、C 末端に *Sac*I 認識配列を付加し、pPD136.61 ベクターに挿入した。作製したプラスミドの名称と発現部位を、以下の表に示した。

表 2 線虫発現用プラスミドの一覧

プラスミドの名称	発現部位	発現するグルコースセンサー
<i>myo2p::Green Glifon 50</i>	線虫咽頭筋	Green Glifon 50
<i>myo2p::Green Glifon 600</i>	線虫咽頭筋	Green Glifon 600
<i>myo2p::Green Glifon 4000</i>	線虫咽頭筋	Green Glifon 4000

3.2.2 線虫の培養

線虫（*Caenorhabditis elegans*）は、Bristol N2 株を野生株として用い[49]、20°Cのインキュベーター（CN-40A, Mitsubishi Electric Engineering, Tokyo, Japan）内で飼育した。線虫培養には、NGM プレートを使用した。NGM プレートは、3 g/L NaCl、2.5 g/L Bacto peptone、17 g/L Bacto Agar を逆浸透水に加え、オートクレーブ滅菌した。60°C程度まで冷ましてから、5 mg/mL コレステロール溶液（in EtOH 1 mL/L）、25 mM K-PO₄（pH6.0）、1 mM CaCl₂、1 mM MgSO₄を加えた。NGM プレートには、LB 培地で液体培養した大腸菌 OP50 株を塗布した。

3.2.3 線虫への遺伝子導入

各グルコースセンサー発現用のプラスミドと、インジェクションのマーカープラスミド *lin-44p::gfp* を 1:1 で混合し、全体のプラスミド濃度を 100 ng/μL とした DNA 溶液を調製した。*lin-44p::gfp* は、周防論博士（埼玉医科大学）より譲り受けた。DNA 溶液は、フィルター（Ultrafree-MC-GV, Merck Millipore, Burlington, MA, U.S.A.）に通した。線虫 Bristol N2 株の、雌雄同体成虫の生殖腺に、DNA 溶液をマイクロインジェクションすることで、遺伝子を導入した[49]。

マイクロインジェクションは、マニピュレーター（MN-4, Narishige, Tokyo, Japan）とマイクロマニピュレーター（MMO-203, Narishige）を取り付けた倒立顕微鏡（IX50, Olympus）と、マイクロインジェクター（FemtoJet 4i, Eppendorf, Hamburg, Germany）を用いて行った。インジェクション用のガラス針は、ニードルプラー（PC-10, Narishige）を用いて作製した。

DNA 溶液をインジェクションした個体（F0）から、インジェクションマーカーが発現した次世代の個体（F1）を取得した。F1 の次世代以降の個体（F2 以降）でインジェクション

マーカーが安定的に発現している線虫を、咽頭筋にグルコースセンサーを発現する線虫株として維持した。

3.2.4 線虫咽頭筋でのグルコースイメージング

35mm のガラスボトムディッシュのガラス面に、1.7%アガロースゲルを塗布し、厚さ 1 mm のアガーパッドを作製した。アガーパッドの上に、咽頭筋にグルコースセンサーを発現する線虫個体を置き、医療用接着剤（aron alpha A “Sankyo”, Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan）で固定した。固定後、M9 緩衝液（6 g/L Na₂HPO₄, 5 g/L NaCl, 3 g/L KH₂PO₄, 120 mg/L MgSO₄）を 3 mL 加えた。

観察には、倒立顕微鏡 (IX-71) に 20 倍対物レンズ (LWD CA20 PL, 20×, NA=0.40, Olympus)、EM-CCD カメラ (Evolve) を取り付けたシステムを利用した。励起光にはキセノンランプ (U-LH75XEAP0) を用い、460-495 nm の励起光フィルターと 510-550 nm の吸収フィルター、505 nm のダイクロイックミラーのフィルターセット (U-MWIBA2) で蛍光を観察した。撮影開始から 100 秒後に、ディッシュ内の最終濃度がそれぞれ 50 mM となるように、M9 緩衝液に溶解した 200 mM グルコースまたは 200 mM フルクトースを 1 mL 滴下した。撮影は Metamorph software を用いて 10 分間行い、5 秒ごとに画像を取得した。

3.2.5 線虫咽頭筋でのグルコースイメージングの解析

取得したイメージングデータは、ImageJ の Stackreg プラグインの Translation モードを用いて、線虫の位置を補正した。その後、Metamorph software に取り込み、咽頭筋の一部の領域 (Terminal bulb) の蛍光輝度を測定した。刺激投与直前の 1 分間の蛍光輝度の平均値を 100 % とし、線虫咽頭筋の蛍光輝度変化を標準化した。経時的な蛍光輝度変化の平均値と、標準偏差を示したグラフを作成した。

統計解析には、GraphPad Prism6 ソフトウェアを用いた。One-way ANOVA と Dunnett's post hoc test の結果と標準偏差のエラーバーを示した。

3.2.6 マウス血糖値の測定

マウス血液は、20~35 週齢の C57BL/10J マウスの下大静脈から、21 ゲージの針で採血した。1.5%イソフルランで入眠させ、腹部を開腹して下大静脈を露出させた。抗凝固剤として、採血シリンジ内に 1 mg/mL の EDTA を添加した。採取した血液を 1,000 g、4°C で遠心し、血漿を回収した。採血時、血糖値測定計 (ACCU-CHEK ST Meter, Roche, Basel, Switzerland) にて、基準となる血糖値を測定した。

蛍光測定には、蛍光プレートリーダー (Varioxscan LUX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) を使用した。励起光を 485 nm に設定し、538 nm の蛍光を測定した。最終濃度 1 μM になるように HEPES 緩衝液で希釈した Green Glifon 50 の精製タンパク質を、96 ウェルプレート (OptiPlate-96 F, PerkinElmer, Waltham, MA, U.S.A.) に加え、1/1000 量のマウス血

漿を添加した。検量線として、0 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M、100 μ M、300 μ M、1 mM となるようにグルコースを添加し、計 8 点の濃度条件で蛍光スペクトルを測定した。ImageJ の Curve fitter 機能にて、Rodbard モードによる 4 パラメータロジスティック曲線に近似した。すべての動物実験は、東京大学の規則に従って行った（研究承認番号：26-31、29-4）。

3.2.7 株化細胞の培養

細胞は、前述の MIN6 m9 細胞に加え、マウス小腸内分泌 L 細胞株の GLUTag 細胞を用いた。GLUTag 細胞は、Daniel Drucker 博士（Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute）から譲り受けた。GLUTag 細胞用の培養液には、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 DMEM（SIGMA-ALDRICH）に、非働化した 10 % v/v ウシ胎児血清（Qualified FBS, Thermo Fisher Scientific）、100 U/mL ペニシリン・0.1 mg/mL ストレプトマイシン（NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan）を添加したものをを用いた。各細胞は、37 °C、5 % CO₂ 下で継代培養した。

観察時には、前述のイメージング用ディッシュを用いた（2.2.2 細胞培養 参照）。このディッシュに、トリプシン処理した細胞を播種し、2 mL の培養液を加えて 37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。1 ディッシュあたりに播種する細胞数は、MIN6 m9 細胞は 2.0×10^5 個、GLUTag 細胞は 1.0×10^5 個とした。

3.2.8 株化細胞への遺伝子導入

GLUTag 細胞への遺伝子導入には、LF2K を用いた。細胞を播種してから 2 日後に、遺伝子導入の操作を行った。イメージング用ディッシュ 1 枚あたり、1.5 μ g のプラスミドと 3 μ L の LF2K を 1 mL の培養液中に添加し、37 °C で 4 時間、5 % CO₂ 下で培養した。その後、新しい 2 mL 培養液に交換し、観察日まで培養を続けた。細胞は、遺伝子導入から 2 日後に観察した。MIN6 m9 細胞へは、前述の方法で遺伝子導入し、観察した（2.2.3 細胞への遺伝子導入 参照）。

3.2.9 株化細胞でのカルシウムイメージング

MIN6 m9 細胞では、赤色カルシウム蛍光色素 Rhod2 を、GLUTag 細胞では、緑色カルシウム蛍光色素 Fluo4 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用い、カルシウムイメージングを行った。MIN6 m9 細胞への Rhod2 の負荷操作は、前述の通りである（2.2.7 グルコースと Ca²⁺ の同時イメージング 参照）。GLUTag 細胞への Fluo4 の負荷は、イメージング日に、5 mM グルコースを含む RB 1 mL で 2 回洗浄し、RB 750 μ L の中に最終濃度が 250 nM となるように Fluo4 を添加し、37 °C、5 % CO₂ 下で 30 分間静置した。その後、5 mM グルコースを含む RB 1 mL で 2 回洗浄し、RB 1 mL 中で観察を開始した。

3.2.10 人工甘味料と内分泌細胞

人工甘味料として、一般的な食品に用いられている、スクラロース、アスパルテーム (Tokyo Chemical Industry)、アセスルファム K (Tokyo Chemical Industry) を選出した。MIN6 m9 細胞では3種すべて、GLUTag 細胞ではスクラロースの効果について解析した。

MIN6 m9 細胞では、Green Glifon 4000 によるグルコースイメージングと、Rhod2 によるカルシウムイメージングを行った。GLUTag 細胞では、Green Glifon 600 によるグルコースイメージングと、Fluo4 によるカルシウムイメージングと、赤色蛍光タンパク質型の cAMP センサー Pink Flamindo[45] による cAMP イメージングを行った。

観察に用いた顕微鏡セットは、前述の通りである (2.2.7 グルコースと Ca^{2+} の同時イメージング 参照)。観察中、イメージング用ディッシュ内の溶液が常に入れ替わるよう、灌流装置につないだチューブを設置した。レンズとステージと灌流チューブにはヒーターを設け、それぞれ 37°C に設定した。撮影は Metamorph software を用いて 20 分間行い、5 秒ごとに画像を取得した。

3.2.11 初代培養神経・グリア細胞の取得

マウスの初代培養神経・グリア細胞の取得方法は、先行文献を参考にした[96]。

マウスの初代培養神経・グリア細胞は、P1 または P2 の Slc:ICR マウスから採取した。マウスを 3% イソフルランで麻酔し、Washing Medium (DMEM, HBSS(-), 7.6 g/L glucose, 2.5 g/L NaHCO_3 , 7.5 g/L HEPES [pH 7.2]) 中で解剖した。取り出したマウス的大脑皮質を、Washing Medium 中でほぐし、780 g、 4°C で遠心した。新しい Washing Medium 2 mL 中で細胞をほぐし、酵素液 (PBS(-), HBSS(-), 45 U papain, 33 mg/L L-cysteine, 33 mg/L BSA, 833 mg/L glucose, 0.5 g/L DNase, 6 μM MgSO_4) を 5 mL 加え、 37°C で 30 分間攪拌した。Culture Medium A (Neurobasal A, 非働化した 10% v/v House Serum, 2 mM L-glutamine, 10 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin, 1 \times B27 supplement) を 1 mL 添加して酵素反応を止め、780 g で 5 分間遠心した。上澄みを取り除き、Culture Medium A を 2 mL 加え、ピペッティングして、細胞懸濁液を得た。

培養経過の観察には、T25 フラスコを用いた。0.15 mg/mL の PLL でコートした後、 1.0×10^6 個の細胞と、5 mL の Culture Medium を添加した。 37°C 、5% CO_2 下で2週間培養し、形態観察した。播種した日を培養 0 日目として数え、培養 4 日ごとに、培地を新しいものに交換した。

観察には、PLL またはコラーゲンでコートしたガラスボトムディッシュを用いた。PLL コートは、ガラスボトムディッシュを 15 分間 UV 照射した後、50 $\mu\text{g/mL}$ または 500 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した PLL をガラス上に 200 μL 滴下して 30 分静置した。その後、400 μL の PBS で3回洗浄した。コラーゲンコートは、ガラスボトムディッシュを 15 分間 UV 照射した後、1/20 希釈した Cell Matrix 溶液 (Type-IV, Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan) 200 μL をガラスの上に置き、15 分間静置した。その後、Cell Matrix 溶液を吸い取り、DMEM 500 μL を置いて 30 分間静置した。

細胞密度は、10 種の条件で検討した。それぞれ、 0.5×10^5 cell/dish、 0.8×10^5 cell/dish、 1.0×10^5 cell/dish、 2.0×10^5 cell/dish、 4.0×10^5 cell/dish、 5.0×10^5 cell/dish、 1.0×10^6 cell/dish、 2.0×10^6 cell/dish、 8.0×10^6 cell/dish、 1.0×10^7 cell/dish となるように播種した。細胞懸濁液をガラス面にのせ、30 分間静置してから、Culture Medium A を 2 mL 添加した。播種した翌日（培養 1 日後）、500 μ L の培養液を取り除き、Culture Medium B（Neurobasal A, 非働化した 2% v/v Horse serum, 2 mM L-glutamine, 10 μ g/mL gentamycin, 0.5 \times B27 supplement）を 500 μ L 添加した。さらに翌日（培養 2 日後）、500 μ L の培養液を取り除き、Culture Medium C（Culture Medium B, 10 μ M Cytarabine）を 500 μ L 添加した。培養 6 日後にも、同様の操作で Culture Medium C を 500 μ L 添加した。培養 10~12 日後に、イメージングを行った。すべての動物実験は、東京大学の規則に従って行った（研究承認番号：26-31、29-4）。

3.2.12 初代培養神経・グリア細胞への遺伝子導入

初代培養神経・グリア細胞への遺伝子導入には、LF2K を用いた。遺伝子導入の操作は、初代培養細胞をガラスボトムディッシュに播種してから 10 日後から 12 日後までに行った。イメージング用ディッシュ 1 枚あたり、1.5 μ g のプラスミドと 3 μ L の LF2K または、3 μ g のプラスミドと 6 μ L の LF2K を 2 mL の培養液中に添加し、観察日まで 37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 下で培養した。細胞は、遺伝子導入から 2 日後または 3 日後に観察した。

3.2.13 初代培養神経・グリア細胞でのカルシウムイメージング

初代培養神経・グリア細胞では、Fluo4 を使い、カルシウムイメージングを行った。Fluo4 の負荷は、イメージング日に、人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid: α CSF, 126 mM NaCl, 2.6 mM NaHCO_3 , 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgSO_4 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 10 mM glucose）1 mL で 2 回洗浄し、 α CSF 1 mL 中に 0.01% Pluronic F-127（SIGMA-ALDRICH）と、最終濃度 5 μ M の Fluo4 を添加し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 下で 30 分間静置した[96, 97]。その後、 α CSF 1 mL で 2 回洗浄し、 α CSF 1.9 mL 中で観察を開始した。

3.2.14 レンチウイルスベクター作製用プラスミドの構築

神経またはグリア特異的な遺伝子導入のため、レンチウイルス発現ベクターの CSII-CMV-MCS ベクターのプロモーター領域を差し替えた。神経特異的なプロモーター配列として、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ上流の CaMKIIa を、グリア特異的なプロモーター配列として、アストロサイト特異的な遺伝子である、グリア線維性産生タンパク質上流の GFAP(ABC1D)を用いた[98, 99]。プロモーター領域は、pAAV-CaMKIIa-EYFP または pAAV-mGFAP(ABC1D)-RFlincA からクローニングした。pAAV-CaMKIIa-EYFP プラスミドは、Karl Deisseroth 博士（Stanford University）より、pAAV-mGFAP(ABC1D)-RFlincA プラスミドは、平瀬肇博士（University of Copenhagen）より譲り受けた。その後、各プロモーター

の下流にある MCS に、各グルコースセンサーをサブクローニングした。作製したプラスミドの名称とプロモーター名称、発現細胞種を以下に示した。

表3 レンチウイルスベクター作製用プラスミドの一覧

プラスミド名称	プロモーター	発現細胞種	発現するセンサー
CSII-CaMKIIa-Green Glifon 50	CaMKIIa	神経細胞	Green Glifon 50
CSII-GFAP(ABC1D)-Green Glifon 50	GFAP(ABC1D)	グリア細胞	Green Glifon 50
CSII-CaMKIIa-Green Glifon 600	CaMKIIa	神経細胞	Green Glifon 600
CSII-GFAP(ABC1D)-Green Glifon 600	GFAP(ABC1D)	グリア細胞	Green Glifon 600
CSII-CaMKIIa-Green Glifon 4000	CaMKIIa	神経細胞	Green Glifon 4000
CSII-GFAP(ABC1D)-Green Glifon 4000	GFAP(ABC1D)	グリア細胞	Green Glifon 4000

3.2.15 レンチウイルスベクターの作製

レンチウイルスベクターの作製および回収方法は、先行文献を参考にした[100]。

プロデューサー細胞には、HEK293T 細胞 (AAVpro[®] 293T Cell Line, TAKARA BIO INC., Shiga, Japan) を用いた。HEK293T 細胞用の培養液には、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 DMEM (SIGMA-ALDRICH) に、非働化した 10 % v/v ウシ胎児血清 (Qualified FBS, Thermo Fisher Scientific)、100 U/mL ペニシリン・0.1 mg/mL ストレプトマイシン (NACALAI TESQUE, INC.) を添加したものを用いた。

プロデューサー細胞へのトランスフェクションでは、トリプシン処理した 5.0×10^6 個の細胞と、10 μ g のレンチウイルスパッケージングプラスミドである pCAG-HIVgp (RIKEN BRC DNA BANK, #RDB04394) と pCMV-VSV-G-RSV-Rev (RIKEN BRC DNA BANK, #RDB04393)、17 μ g の表 3 に示したレンチウイルス作製用のプラスミド、36 μ L の LF2K を混合して 10 mL の培養液中に添加し、37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。トランスフェクション操作を行った翌日、10 mL の新しい培地に交換し、37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。培地交換から 48 時間後、培地全量を遠沈管に回収し、等量の新しい培地に交換した。回収した培地は、780 g、4 °C、10 分間遠心した後、上清を 0.45 μ m のフィルター (Merck Millipore) に通し、4 °C で一晩保存した。新しい培地の添加から 48 時間後に、再び培地全量を遠沈管に回収した。回収した培地は同様にフィルター処理し、4 °C で保存していたものと混合した。1.5 mL エッペンチューブに 1 mL ずつ分注し、液体窒素で凍結した後、-80 °C で保存した。

3.2.16 AAV ベクター作製用プラスミドの構築

神経またはグリア特異的な遺伝子導入のため、pAAV-CaMKIIa-EYFP または pAAV-mGFAP(ABC1D)-RFlucA の遺伝子部分に、各グルコースセンサーをサブクローニングした。作製したプラスミドの名称とプロモーター名称、発現細胞種を以下に示した。

表4 AAV ベクター作製用プラスミドの一覧

プラスミド名称	プロモーター	発現細胞種	発現するセンサー
pAAV-CaMKIIa-Green Glifon 50	CaMKIIa	神経細胞	Green Glifon 50
pAAV-GFAP(ABC1D)-Green Glifon 50	GFAP(ABC1D)	グリア細胞	Green Glifon 50
pAAV-CaMKIIa-Green Glifon 600	CaMKIIa	神経細胞	Green Glifon 600
pAAV-GFAP(ABC1D)-Green Glifon 600	GFAP(ABC1D)	グリア細胞	Green Glifon 600
pAAV-CaMKIIa-Green Glifon 4000	CaMKIIa	神経細胞	Green Glifon 4000
pAAV-GFAP(ABC1D)-Green Glifon 4000	GFAP(ABC1D)	グリア細胞	Green Glifon 4000

3.2.17 AAV ベクターの作製

AAV ベクターの作製および回収方法は、先行文献を参考にした[101]。

プロデューサー細胞には、HEK293T 細胞を用いた。継代し、10 cm ディッシュに 3.0×10^6 細胞の HEK293T 細胞を播種したものを 18 枚用意した。

プロデューサー細胞へのトランスフェクションでは、10 cm ディッシュ 1 枚あたり、6 μ g の AAV パッケージングプラスミドである pHelper、pAAV-DJ (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) と、表 4 に示した AAV 作製用のプラスミド、54 μ L の 1 mg/mL Polyethylenimine を混合して培養液中に添加し、37°C、5% CO₂ 下で培養した。トランスフェクション操作を行った翌日、6 mL の新しい培地に交換し、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培地交換から 48 時間後、セルスクレーパーで細胞ごとかきとり、遠沈管に回収した。400 g、室温で 5 分間遠心した後、細胞ペレットを 10 mL の PBS(-) で懸濁した。再度遠心して新しい 10 mL の PBS(-) で懸濁した後、液体窒素による凍結融解によって細胞を破碎した。細胞破碎液に、75 μ L の 1 mM MgCl₂ と、130 U のベンゾナーゼ (Merck Millipore) を添加し、37°C で 30 分間攪拌した。2000 g、4°C で 30 分間遠心して回収した上清を、6000 g、4°C で 20 時間遠心し、ウイルスを沈殿させた。ウイルスのペレットを 100 μ L の Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) で懸濁して AAV 溶液とした。分注して液体窒素で凍結した後、-80°C で保存した。

3.2.18 初代培養神経・グリア細胞へのウイルス感染

レンチウイルスベクターの感染は、初代培養細胞をガラスボトムディッシュに播種してから 10 日後から 12 日後までに行った。培地 2 mL に対し、ウイルス上清を 1 mL 添加し、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

AAV ベクターの感染は、初代培養細胞をガラスボトムディッシュに播種してから 10 日後から 12 日後に行った。1.0 \times 10⁵ 細胞に対し、1.0 \times 10⁹ particles 分 (multiplicity of infection: MOI;

1.0×10^4) または、 1.0×10^{10} particles 分 (MOI; 1.0×10^5) のウイルスを添加し、 37°C 、5 % CO_2 下で培養した。

3.2.19 細胞イメージングデータの解析

取得したイメージングデータは、ImageJ の Stackreg プラグインの Translation モードを用いて、細胞の位置を補正した。その後、Metamorph software に取り込み、個々の細胞の蛍光輝度を測定した。MIN6 m9 細胞や GLUTag 細胞でのイメージングでは、撮影開始から最初の刺激投与までの蛍光輝度の平均値を 100 % とし、撮影中の各細胞の蛍光輝度変化を標準化した。経時的な蛍光輝度変化の平均値と、標準偏差を示したグラフを作成した。

統計解析には、GraphPad Prism6 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。Welch's *t* test または One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test、One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test の結果と、標準偏差のエラーバーを示した。

3.3 結果

3.3.1 線虫での *in vivo* イメージング

各グルコースセンサーのプラスミドをマイクロインジェクションした個体から、マーカー遺伝子を発現する F1 個体が得られた。F2 以降でも、マーカーを発現する個体が得られた。Green Glifon 4000 を導入した個体について、マーカーを発現している F2 個体を *in vivo* イメージングに用いた。アガーパッド上に固定した線虫を M9 緩衝液に浸した状態で咽頭筋の蛍光撮影を開始し、100 秒後に刺激溶液を滴下した。最終濃度 50 mM グルコースの刺激により、咽頭筋の蛍光輝度が上昇することが分かった (図 27A)。一方、M9 緩衝液のみまたは最終濃度 50 mM フルクトースの刺激では、蛍光輝度は変化しなかった (図 27B)。

3.3.2 マウス血糖値の測定

既知の濃度のグルコースに対する Green Glifon 50 の蛍光輝度変化率から、血糖値予測用の検量線を作成した (図 28A)。その後、マウス 6 匹から得られたマウス血漿サンプルを、96 ウェルプレート上で Green Glifon 50 と混合し、蛍光測定を行った。検量線にマウス血漿の値を導入することで、Green Glifon 50 による血糖値を推測した。ACCU-CHEK ST Meter で測定した血糖値との相対誤差は、20%以内であることが分かった (図 28B)。

3.3.3 膵 β 細胞への人工甘味料の作用

MIN6 m9 細胞は、0 mM グルコースの RB 中で撮影を開始し、3 分後に 25 mM 人工甘味料を含む RB を灌流することで刺激した。Rhod2 の蛍光輝度は上昇したが、Green Glifon 4000 の蛍光輝度は変化しなかった (図 29A, 30A; 0 mM グルコース)。そこで、5 mM グルコースの RB 中で撮影を開始し、3 分後に 3 mM グルコースと 25 mM 人工甘味料を含む RB を灌流することで刺激した。すると、Rhod2 の蛍光輝度だけでなく、Green Glifon 4000 の蛍光輝度も上昇した (図 29A, 30A; 3 mM グルコース)。

3.3.4 (論文投稿中のため削除)

3.3.5 初代培養神経・グリア細胞でのイメージング条件の検討

初代培養神経・グリア細胞は、T25 フラスコ内で2週間、形態観察を行った。培養日数が増えると、細長い形態の細胞が増えていった（図 34）。

ガラスボトムディッシュに播種した初代培養神経・グリア細胞は、PLL コートでは張り付かず、コラーゲンコートが適していることが分かった。細胞は、1 ディッシュあたり 2.0×10^5 細胞以下の密度が観察に適していることが分かった（図 35）。

Fluo4 を用いた初代培養神経・グリア細胞でのカルシウムイメージングでは、 $10 \mu\text{M}$ グルタミン酸および $10 \mu\text{M}$ グルタミン酸と $10 \mu\text{M}$ グリシンの滴下により、Fluo4 の蛍光輝度が上昇した（図 36）。

初代培養神経・グリア細胞への遺伝子導入では、LF2K によるリポフェクション法と、レンチウイルスベクターまたは AAV ベクターによる方法を比較した。リポフェクション法では、 $1.5 \mu\text{g}$ または $3 \mu\text{g}$ のプラスミドを導入した。CaMKIIa プロモーターでは蛍光をほとんど観察できなかったが、GFAP(ABC1D)プロモーターでは微弱な発現が見られた（図 37A）。レンチウイルスベクターでは、リポフェクション法に比べると明るい蛍光を観察できた（図 37B）。AAV ベクターでは、MOI が 1.0×10^4 または 1.0×10^5 となるようにウイルスを添加した。 1.0×10^4 の MOI では蛍光は観察できなかった。 1.0×10^5 の MOI で、CaMKIIa プロモーターでは明瞭な蛍光像を得ることができた（図 37C）。GFAP(ABC1D)プロモーターでも、蛍光を観察することができた。

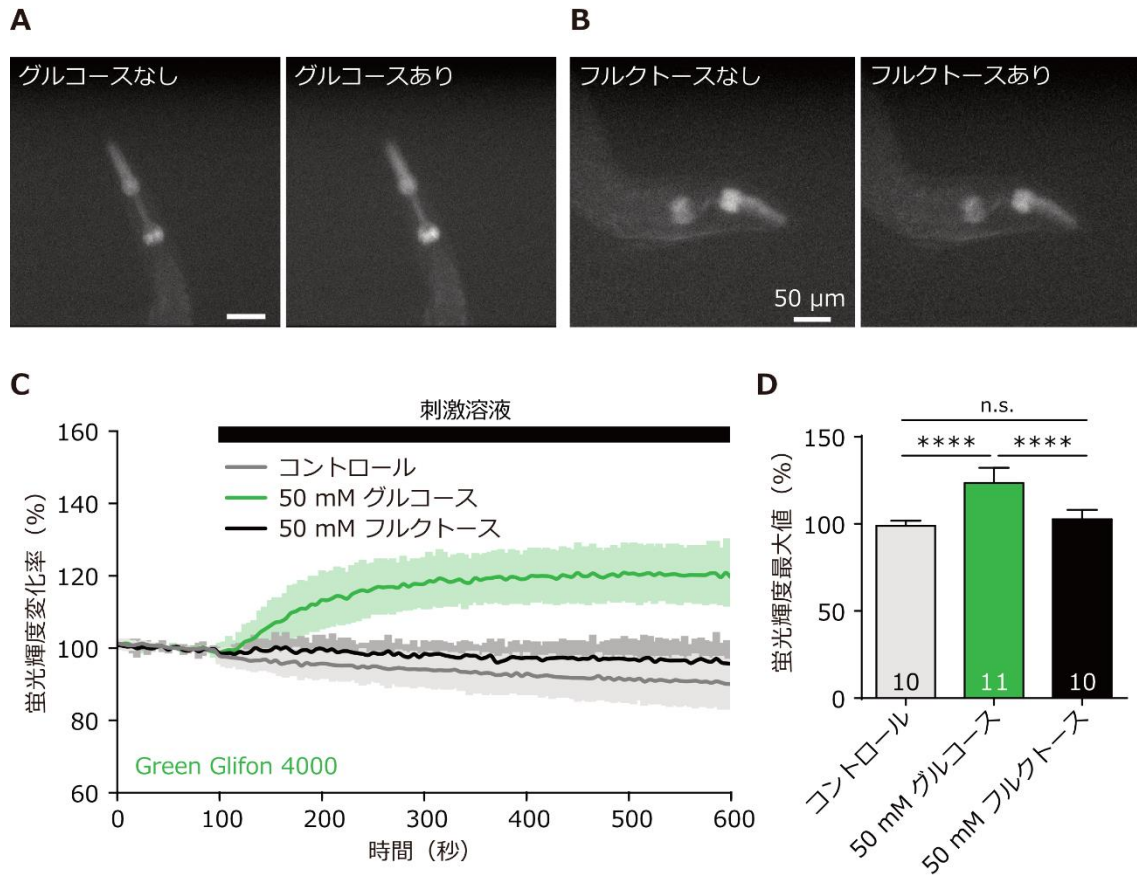
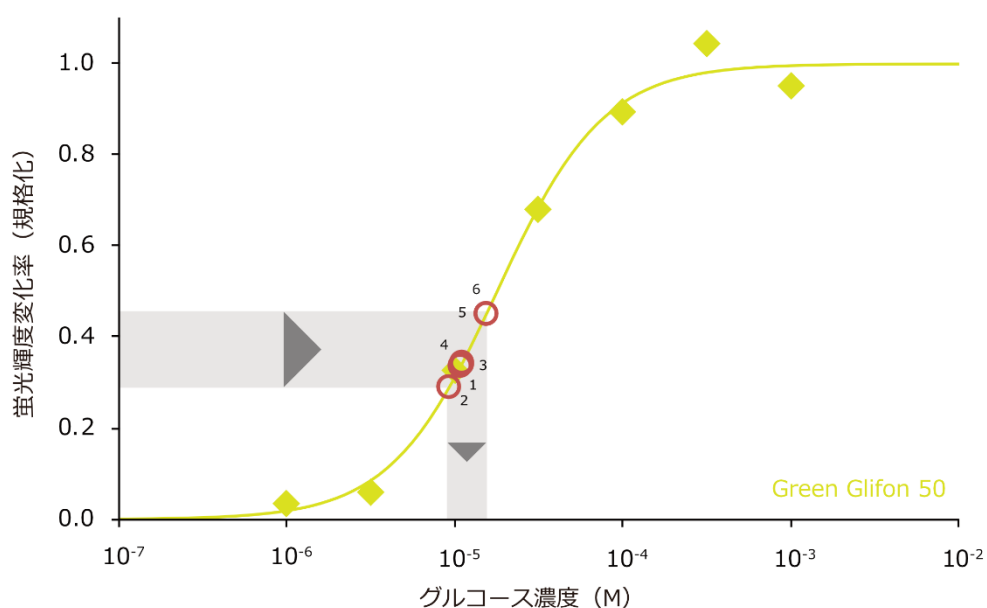


図 27 線虫咽頭筋でのグルコースイメージング (文献[21]より改変)

- (A, B) Green Glifon 4000 を咽頭筋に発現する線虫の、グルコースイメージング時の咽頭筋の蛍光観察像。グルコース投与 (A) により、咽頭筋の蛍光輝度が上昇したが、フルクトース投与 (B) では変化がなかった。スケールバーは 50 μm 。
- (C) (A, B) に示した線虫咽頭筋の蛍光輝度の経時変化。撮影開始から 100 秒後に刺激溶液を滴下しており、バーで示した時間には 50 mM 刺激溶液が存在する。グルコースの滴下によって、咽頭筋での蛍光輝度が上昇した。コントロールである M9 緩衝液の滴下や、フルクトースの滴下では蛍光輝度上昇は見られなかった。データは means \pm SD、コントロール; N = 10、50 mM グルコース; N = 11、50 mM フルクトース; N = 10。
- (D) (C) の波形における、Green Glifon 4000 の蛍光輝度変化率の最大値検定の結果。データは means \pm SD、N 数はグラフ内に示した。n.s. は not significant、****は $p < 0.0001$ を示す。

A



B

サンプル番号	1	2	3	4	5	6
Glifonの蛍光輝度から推測した血糖値 (GI, mM)	15.56	15.55	11.08	11.17	9.35	10.93
ACCU-CHEK ST Meter で測定した血糖値 (AM, mM)	11.83	14.06	10.61	13.56	10.83	12.00
相対誤差 (%)	11.98	4.79	2.12	-10.67	-7.92	-4.88

$$\text{相対誤差 (\%)} = (GI - AM) / \{(GI + AM) / 2\} * 100$$

図 28 グルコースセンサーによる血糖値測定（文献[21]より改変）

- (A) Green Glifon 50 の蛍光輝度変化率から作製した検量線と、推測される血糖値。検量線は、既知の濃度のグルコース刺激での、蛍光輝度変化率から作製した。N=3。マウス血漿サンプルの測定結果を、検量線上に赤丸でプロットした。数字はサンプル番号を示す。灰色の矢印のエリアは、蛍光輝度から血漿中のグルコース濃度を算出した流れを示している。
- (B) Green Glifon 50 による血糖値推測の確からしさ。蛍光輝度から推測した血糖値と、ACCU-CHEK ST Meter で測定した血糖値から、相対誤差を算出した。相対誤差は、すべてのサンプルで 20%以内だった。

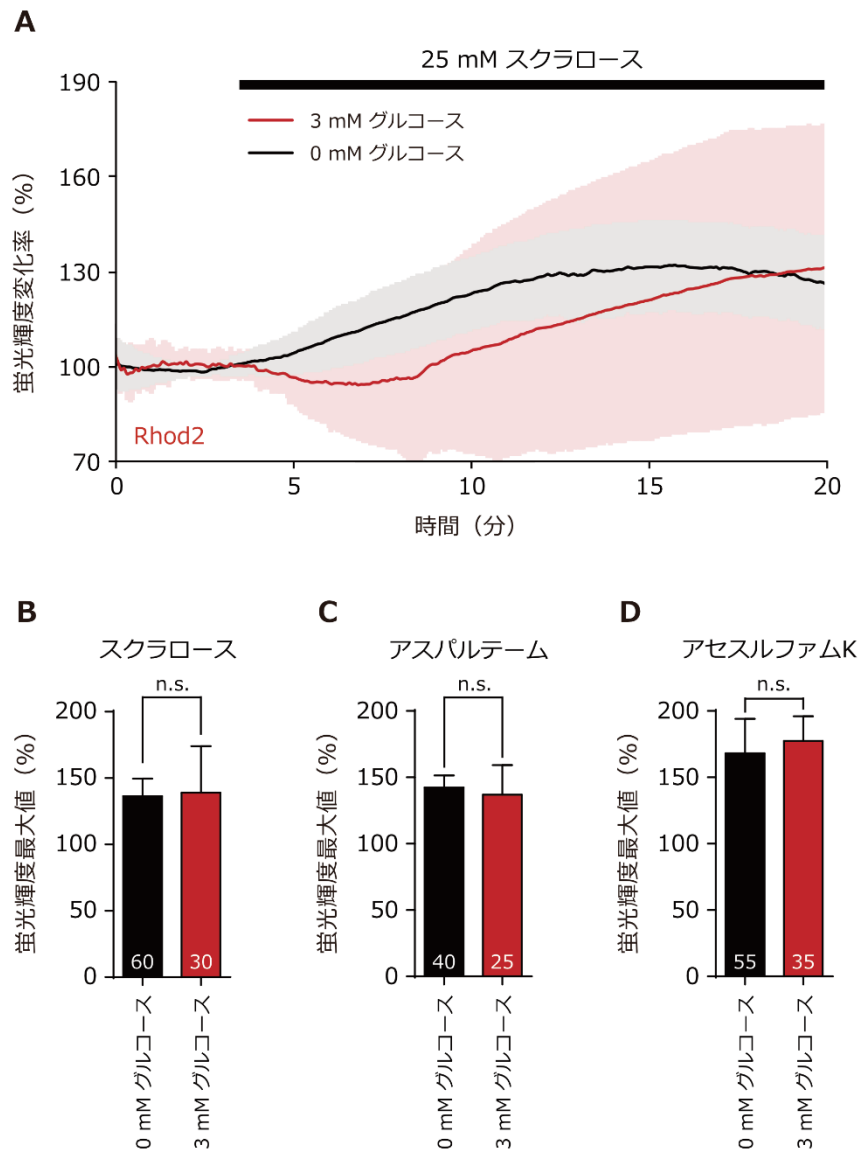


図 29 人工甘味料投与による MIN6 m9 細胞内の Ca^{2+} 動態 (文献[21]より改変)

- (A) スクラロース投与時の、MIN6 m9 細胞における Rhod2 の蛍光輝度の経時変化。黒線は 0 mM グルコース条件、赤線は 3 mM グルコース条件を示す。バーで示した時間に、25 mM スクラロースまたは 3 mM グルコースと 25 mM スクラロースを含む RB を灌流した。バーで示していない時間には、0 mM グルコースまたは 3 mM グルコースの RB を灌流している。どちらの条件でも、Rhod2 の蛍光輝度は上昇した。データは means \pm SD、0 mM グルコース; N = 60、3 mM グルコース; N = 30。
- (B-D) スクラロース (A)、アスパルテーム (B)、アセスルファム K (C) 投与後の、Rhod2 の蛍光輝度変化率の最大値検定の結果。データは means \pm SD、N 数はグラフ内に示した。n.s.は no significant を示す。

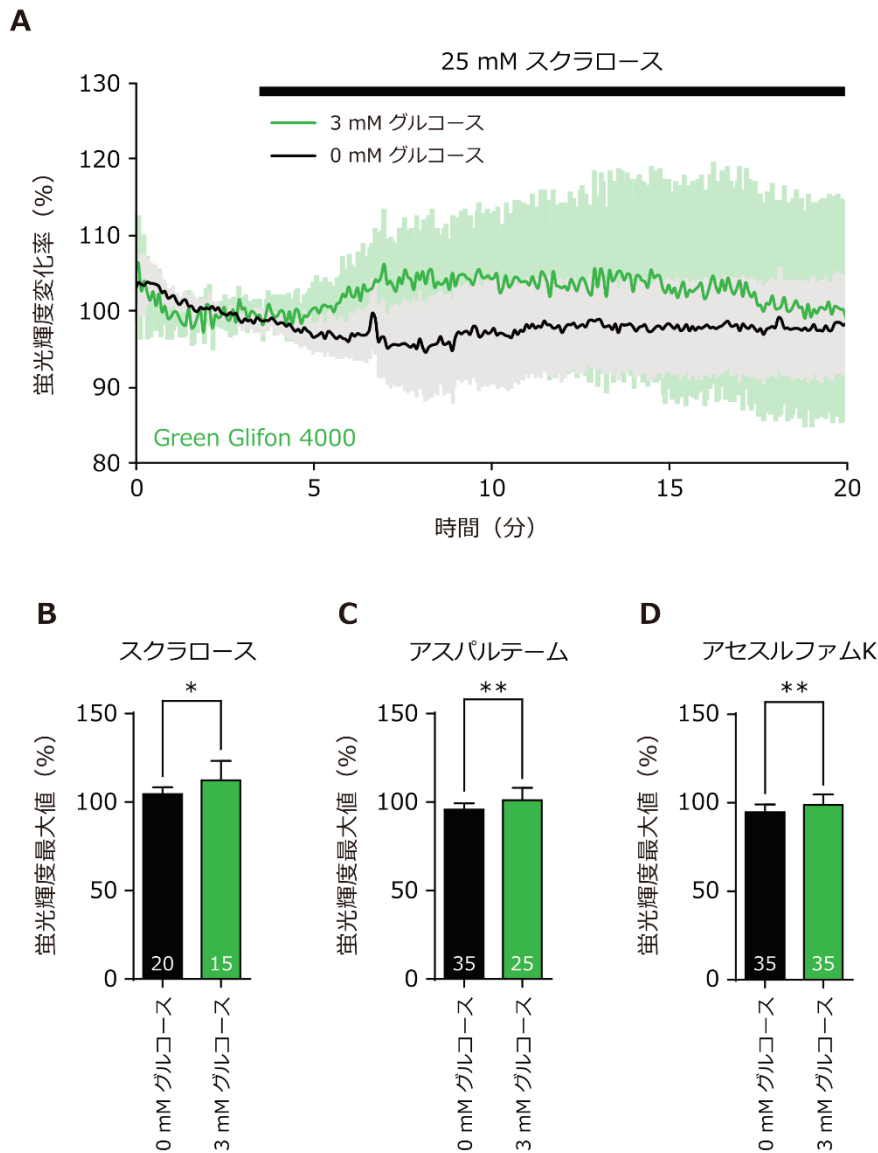


図 30 人工甘味料投与による MIN6 m9 細胞内のグルコース動態 (文献[21]より改変)

- (A) スクラロース投与時の、MIN6 m9 細胞における Green Glifon 4000 の蛍光輝度の経時変化。黒線は 0 mM グルコース条件、赤線は 3 mM グルコース条件を示す。バーで示した時間に、25 mM スクラロースまたは 3 mM グルコースと 25 mM スクラロースを含む RB を灌流した。バーで示していない時間には、0 mM グルコースまたは 3 mM グルコースの RB を灌流している。Green Glifon 4000 の蛍光輝度は、3 mM グルコース存在下で上昇した。データは means \pm SD、0 mM グルコース; N = 20、3 mM グルコース; N = 15。
- (B-D) スクラロース (A)、アスパルテーム (B)、アセスルファム K (C) 投与後の、Green Glifon 4000 の蛍光輝度変化率の最大値検定の結果。データは means \pm SD、N 数はグラフ内に示した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。

図 31 （論文投稿中のため削除）

図 32 （論文投稿中のため削除）

図 33 （論文投稿中のため削除）

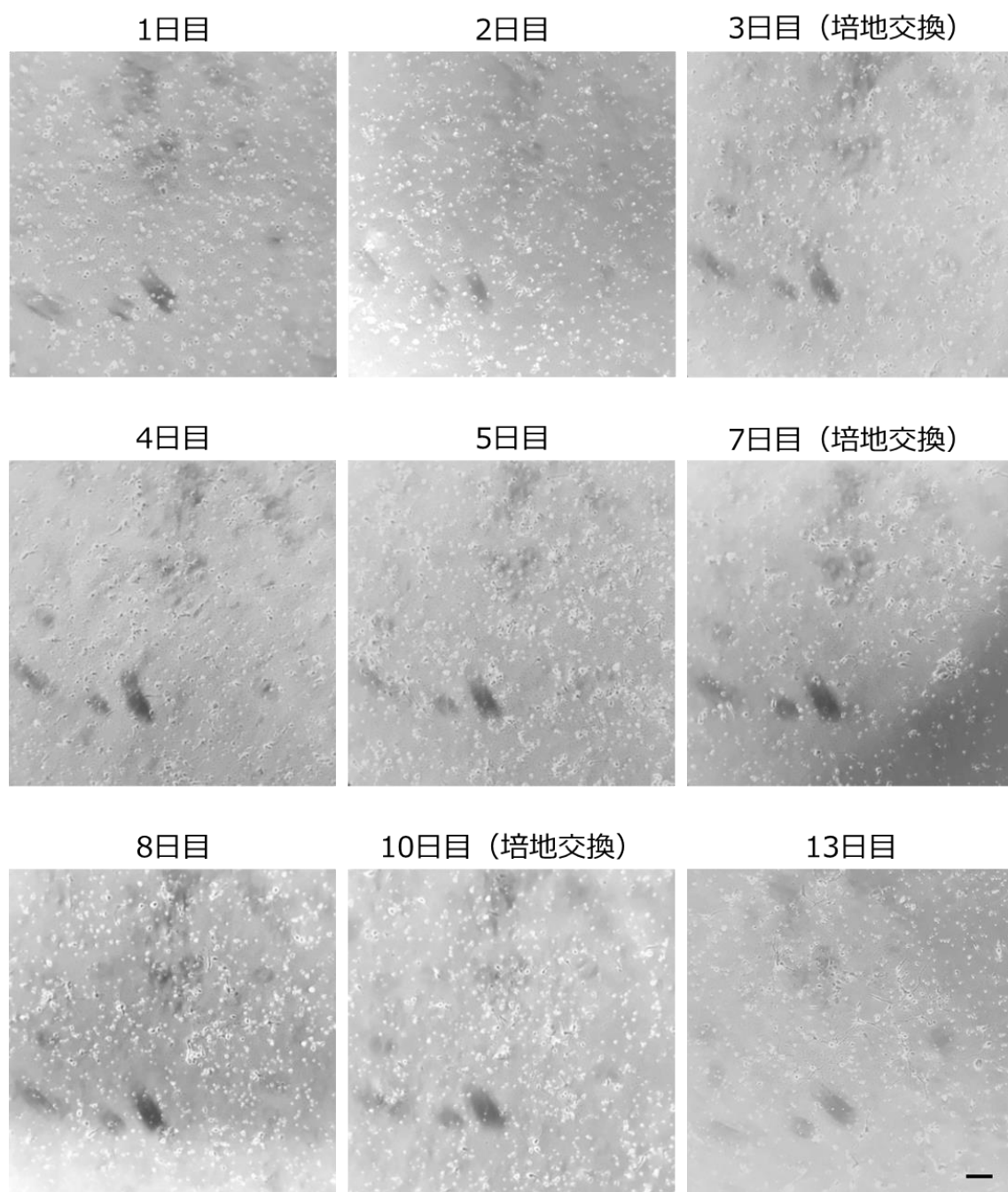


図 34 初代培養神経・グリア細胞の培養

T25 フラスコで培養した、初代培養神経・グリア細胞の培養過程。播種した日を培養 0 日目として数え、2 週間、経過観察した。培養 4 日ごとに培地を交換している。培養から 2 週間経過すると、細長い形態の細胞が増えていった。実態顕微鏡下での撮影。スケールバーは 100 μm 。

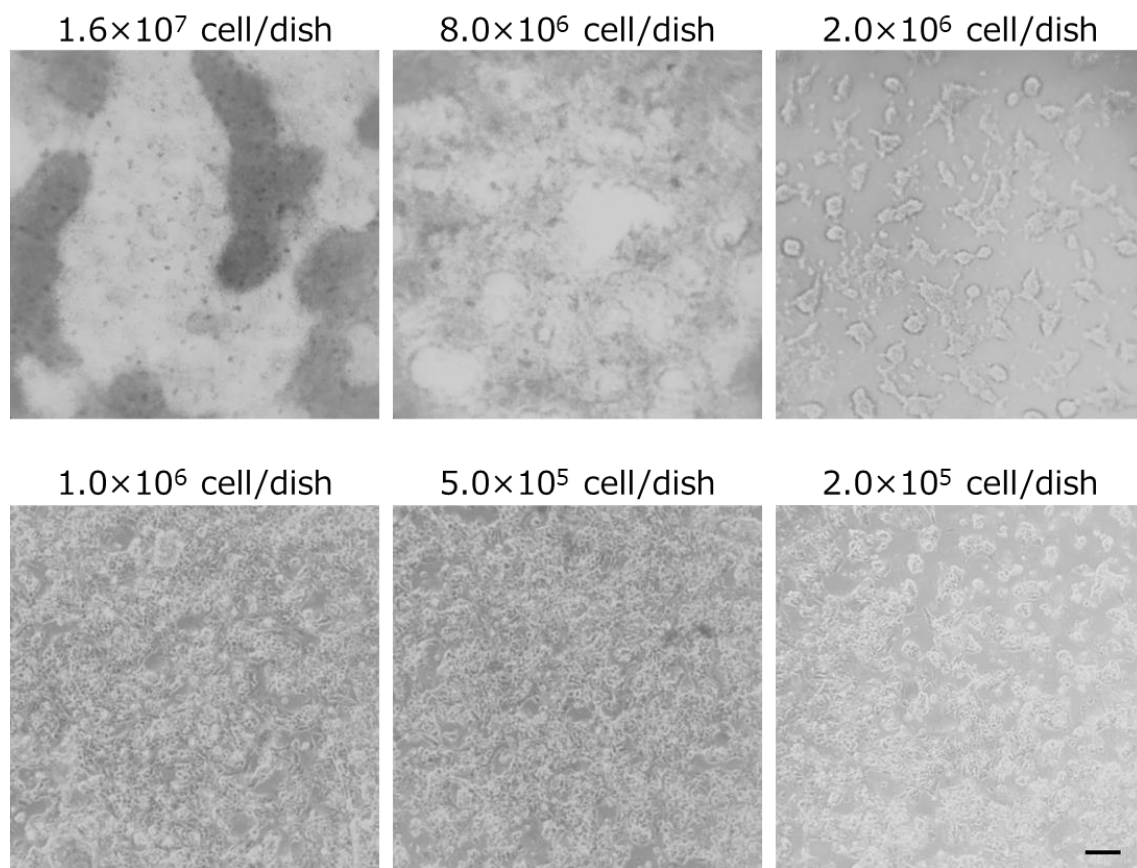


図 35 初代培養神経・グリア細胞の細胞密度の検討

コラーゲンコートしたガラスボトムディッシュで、観察に適した細胞密度を検討した結果。播種した翌日の様子を示す。細胞数が少ない方が、ガラス面に均一に広がっていることが分かる。実態顕微鏡下での撮影。スケールバーは 100 μm 。

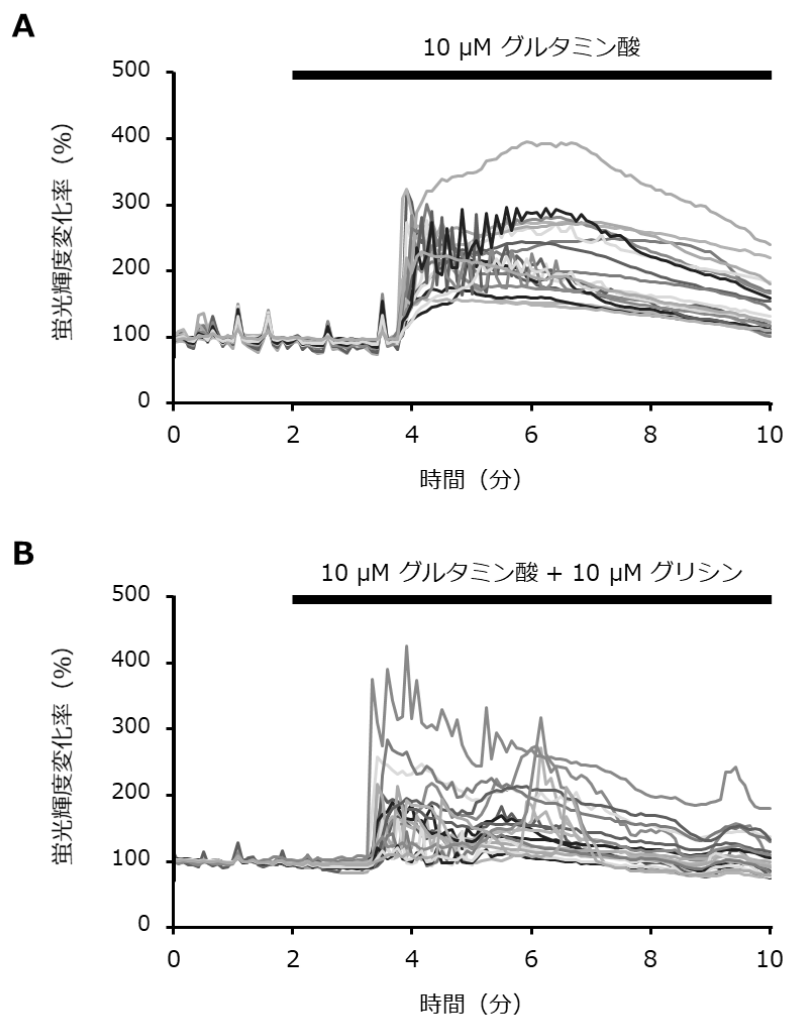


図 36 初代培養神経・グリア細胞での Fluo4 によるカルシウムイメージング

- (A) 10 μM グルタミン酸を滴下したときの Fluo4 の蛍光輝度変化。刺激溶液は、撮影開始から 2 分後に滴下した。蛍光輝度は少し遅れて上昇した。N=20。
- (B) 10 μM グルタミン酸と 10 μM グリシンを滴下したときの Fluo4 の蛍光輝度変化。刺激溶液は、撮影開始から 2 分後に滴下した。蛍光輝度は少し遅れて上昇した。N=20。

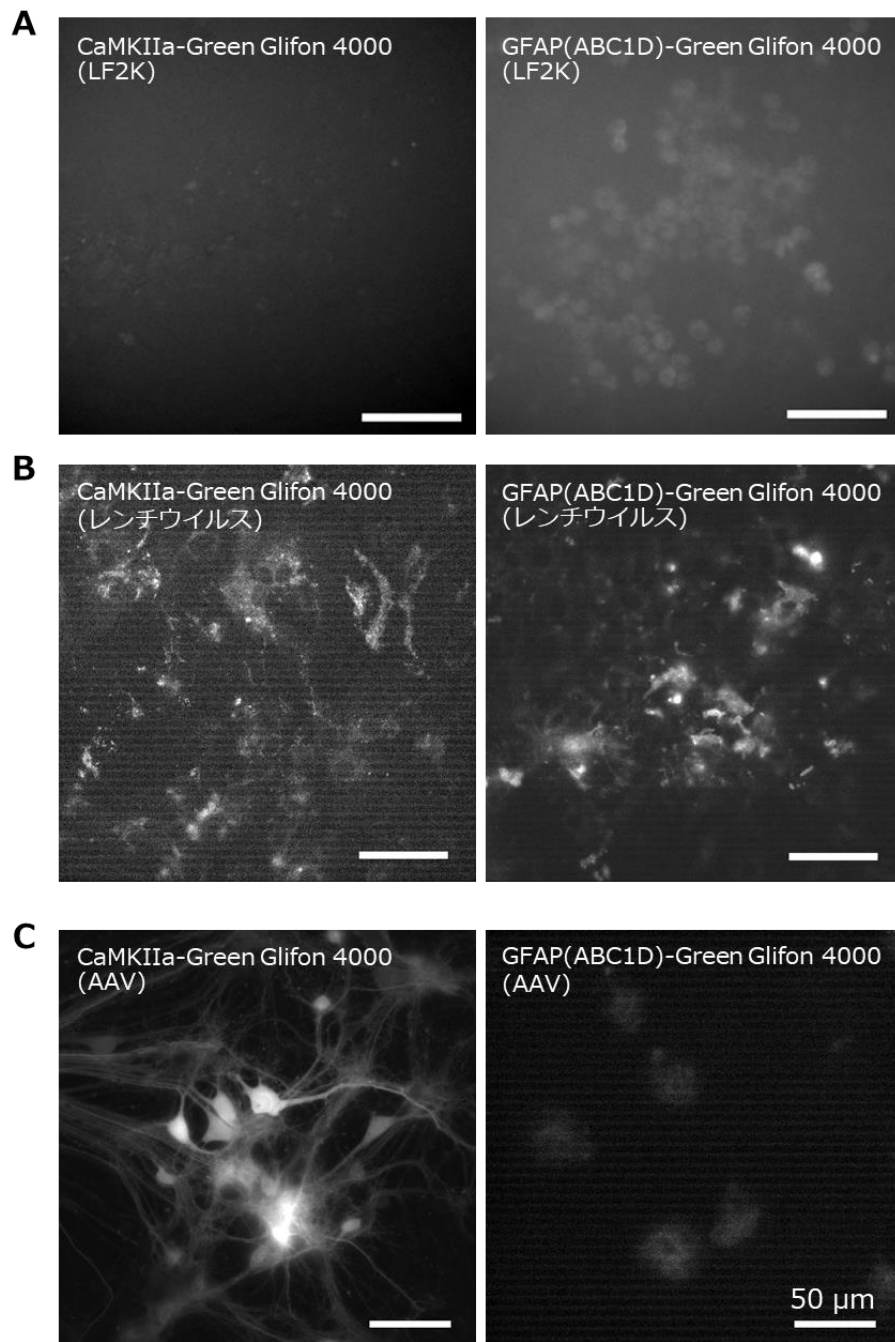


図 37 初代培養神経・グリア細胞への遺伝子導入

- (A) LF2K によるトランスフェクションで遺伝子導入した際の蛍光画像。細胞数は 1.0×10^6 、 $1.5 \mu\text{g}$ のプラスミドと $3 \mu\text{L}$ の LF2K を添加した。
- (B) レンチウイルスベクターで遺伝子導入した際の蛍光画像。細胞数は 1.0×10^5 、ウイルス上清を 1 mL 添加した。
- (C) AAV ベクターで遺伝子導入した際の蛍光画像。細胞数は 1.0×10^5 、MOI が 1.0×10^5 となるように AAV を添加した。スケールバーはすべて $50 \mu\text{m}$ 。

3.4 考察

3.4.1 線虫での *in vivo* イメージング

グルコースセンサーが、*in vivo* イメージングに適用可能であることを調べるため、線虫個体でのイメージングを試みた。雌雄同体株へのマイクロインジェクションを経て、咽頭筋にグルコースセンサーを発現する F2 個体を得ることができた。Green Glifon 4000 を咽頭筋に発現する F2 個体をアガーパッド上に固定して蛍光観察すると、グルコース刺激によってのみ、咽頭筋の蛍光輝度が上昇することが分かった。この輝度上昇は、M9 緩衝液では起こらないことから、刺激投与によるアーティファクトではないことが推測された。また、フルクトース刺激に応答しなかったことから、溶液の粘性などの機械刺激でないこと、および、咽頭筋に発現したグルコースセンサーもグルコースへの特異性を維持していることが分かった。さらにこの結果は、線虫が培養液中からグルコースを取り込んでいることを示した。線虫では、GLUT 遺伝子のホモログとして、*fgt-1*、*09B5.11*、*C35A11.4*、*F53H8.3*、*F48E3.2*、*F13B12.2*、*Y61A9LA.1*、*K08F9.1*、*Y37A1A.3* 遺伝子などが特定されている[102]。これらの活性は、GLUT 阻害剤であるフロレチンによって阻害されることも報告されており、GLUT を介したグルコース取り込み活性について、線虫を用いた実験系が利用できる可能性がある。今後、薬剤や土壌成分の投与によるグルコース恒常性への影響など、より生理的な条件でのグルコースイメージングが求められる。

また本結果は、本グルコースセンサーが哺乳類以外の種のイメージングにも利用できることと、生きている個体内でのグルコース濃度変化を可視化できる可能性を示した。例えば、酵母内では 1.5 mM、植物内では 2~5 mM の濃度範囲でグルコースが存在すると報告されている[18, 103]。本グルコースセンサーのワーキングレンジはこの範囲に適応しているため、酵母や植物体内でのグルコースイメージングへの応用が期待できる。

3.4.2 マウス血糖値の測定

Green Glifon 50 による血糖値測定の確からしさは、市販の血糖値計である、ACCU-CHEK ST Meter との相対誤差をもって判断した。相対誤差による評価法は、心拍出量の測定手法間における誤差の算出にも利用されており、既存の手法と比較することで新規手法の精度を推定するものである[104]。ACCU-CHEK ST Meter で測定した血糖値との相対誤差は、基準の 20%以内であり、Green Glifon 50 による血糖値測定が利用可能な精度であることを示した。標的分子への特異性も高いため、血液以外のサンプルにも適用が期待できる。例えば、血糖値測定以外では、尿糖測定が糖尿病の経過観察に用いられる。糖尿病において、尿糖異常は、血糖値異常よりも先に現れるという報告もある[105]。モデルラットでは、正常時の尿中のグルコース濃度は~10 mM であると示されており、本グルコースセンサーが適用できる可能性がある。また、市販の血糖値計が最低 0.6 μ L の血液を必要とするのに対し、Green Glifon 50 による測定は 1/1000 希釈した血漿中のグルコースを検出することができた。ヒト以外の動物の研究では、採取できるサンプル量が少ないこともあるため、高感度かつ少量の

サンプルでの標的分子の蛍光測定手法の検討が求められる。

また、緑色ピルビン酸センサーでは、ピルビン酸濃度測定を介し、ピルビン酸とは別の分子である D-セリンの濃度を推定している[30]。D-セリンは、脳内で神経伝達物質として放出され、NMDA 型グルタミン酸受容体のアゴニストとなる分子である[106, 107]。D-セリンは、D-セリンデヒドラターゼによって分解され、ピルビン酸に変換される[108, 109]。これを利用し、D-セリンデヒドラターゼの添加によって増加したピルビン酸濃度を測定することで、もともと含まれていた D-セリン濃度を推定した。この結果は、単色型分子センサーが顕微鏡下での蛍光観察だけでなく、高感度の生化学アッセイに応用できる可能性を示唆する。例えば、グルコースセンサーでグリコーゲン濃度を推定するなど、分子センサーと酵素を組み合わせることで、間接的に他の分子濃度を推測できる可能性が考えられる。

3.4.3 膵 β 細胞への人工甘味料の作用

膵 β 細胞への人工甘味料（スクラロース、アスパルテーム、アセスルファム K）の投与は、細胞内の Ca^{2+} 濃度と ATP 濃度を上昇させ、インスリン分泌を促進することが報告されている[75, 110, 111]。本実験系でも、人工甘味料投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が見られた（図 28）。そして新たに、人工甘味料の投与により、細胞内グルコース濃度が上昇する可能性が示された（図 29）。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞外のグルコース濃度に関わらず生じていた一方、細胞内グルコース濃度上昇は、細胞外にグルコースが存在する条件のみで起こっていた。この結果は、細胞内グルコース濃度上昇が、細胞外グルコースに由来することを示唆する（図 37）。

膵 β 細胞での人工甘味料の感知は、GPCR によって起こると推測されている[73]。そのため、GPCR の下流にある酵素の活性により、シグナル分子の動態が変化し、インスリン分泌が増強されると考えられてきた。本結果は、人工甘味料により、シグナル分子動態が変化することに加えて、グルコース濃度が変化することで、グルコース代謝依存的にもインスリン分泌を増強している可能性を示した。さらに先行研究において、人工甘味料の長期摂取により、GLUT2 などのグルコーストランスポーターの発現量が増加し、細胞内グルコース濃度が上昇することが報告されていた[76]。本結果と合わせると、人工甘味料の摂取は、短期的にも長期的にも、細胞内グルコース濃度を上昇させ、インスリン分泌を促進する可能性がある。短期的な人工甘味料の暴露によるグルコース取り込みの促進機序は不明であることから、シグナル分子およびグルコース動態の関連について、更なる解析が必要である。

また前述の通り、人工甘味料の投与により、細胞内 ATP 濃度が上昇することが知られている[27, 28]。しかしこの作用は、細胞外にグルコースがない条件でも起こり、GPCR 活性化に伴い、ミトコンドリアのエネルギー源であるコハク酸メチルが代謝されて起こると報告されている[112]。本研究でも、細胞外にグルコースがない条件では細胞内グルコース濃度上昇が見られなかったことから、細胞内 ATP 濃度の上昇は、グルコースの代謝ではなく、ミトコンドリアの活性化によって引き起こされると推測でき、以前の報告を裏付ける結果

となった。しかし生体では、細胞外にグルコースがない環境は考えにくい。そのため、ミトコンドリアの活性化による ATP 産生と、細胞内グルコース上昇に伴う ATP 産生の両方が同時に生じることで、インスリン分泌が増強されていると考察する。

3.4.4 （論文投稿中のため削除）

3.4.5 神経・グリア細胞でのイメージングへの適用

ICR マウスから回収した初代培養細胞は、培養から 2 週間以内に、樹状突起様の構造をとることが分かった。共培養系の作製方法には、フィーダー細胞としてのグリア細胞を播種した上に、神経細胞を播種するものと[119]、グリア細胞と神経細胞の混合液を作製し、同時に培養開始するものが存在する[120, 121]。本研究では後者のプロトコルを採用した。培養初期から神経細胞とグリア細胞がともに存在することで、2 種類の細胞が入り組んだ構造を作り、より生体に近い環境を再現することを期待している。

神経細胞において、 Ca^{2+} は活性に不可欠なシグナル分子である。安静時の細胞内 Ca^{2+} 濃度は 50~100 nM であり、神経細胞が電氣的に活性化することで、その濃度は 10 倍から 100 倍に上昇する[122]。この Ca^{2+} 濃度上昇は、電位依存性カルシウムチャネルやイオンチャネル型グルタミン酸受容体、Transient receptor potential (TRP) C チャネル、代謝型グルタミン酸受容体などの活性化によって生じる[123–126]。神経伝達物質の一つであるグルタミン酸は、これらのうち複数の経路を介し、 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすと報告されている[127]。本研究で取得した初代培養細胞も、Fluo4 でのカルシウムイメージングにて、グルタミン酸への応答が見られた。この結果は、共培養系の細胞が、生理的なグルタミン酸への応答能を維持していることを示唆する。細胞が取得できているかの指標として、グルタミン酸刺激が有効であると考ええる。しかし、Fluo4 などの蛍光色素は、神経細胞とグリア細胞の両方に負荷されてしまうため、カルシウムイメージングの際、神経細胞とグリア細胞を見分けることができない。神経・グリア細胞に特異的なカルシウムイメージングを行う際は、グリア細胞を特異的に染める Sulforhodamine 101 (SR101) を併用するか、神経細胞またはグリア細胞に特異的なプロモーター配列を用い、単色蛍光型カルシウムセンサーを遺伝子導入する必要がある[128, 129]。

遺伝子導入手法の検討では、LF2K によるリポフェクション法と、レンチウイルスベクターまたは AAV ベクターによる方法を比較した。結果として、神経細胞には AAV ベクターが、グリア細胞には AAV ベクターまたはレンチウイルスベクターが適していると推測された。しかし本研究では、レンチウイルスベクターのタイター測定を行っていない。より多くのウイルス上清の添加や、ウイルス添加までの日数を検討することで、導入効率の改善が見込める。なお、AAV ベクターを使用する際には、 1.0×10^5 以上の MOI が必要であった。今後は AAV ベクターを用い、神経・グリア細胞に特異的なグルコースイメージングを行う予定である。グルコースと細胞内シグナル分子である Ca^{2+} や cAMP との関連や、グルコースの代謝産物である乳酸との関連を明らかにしたい。

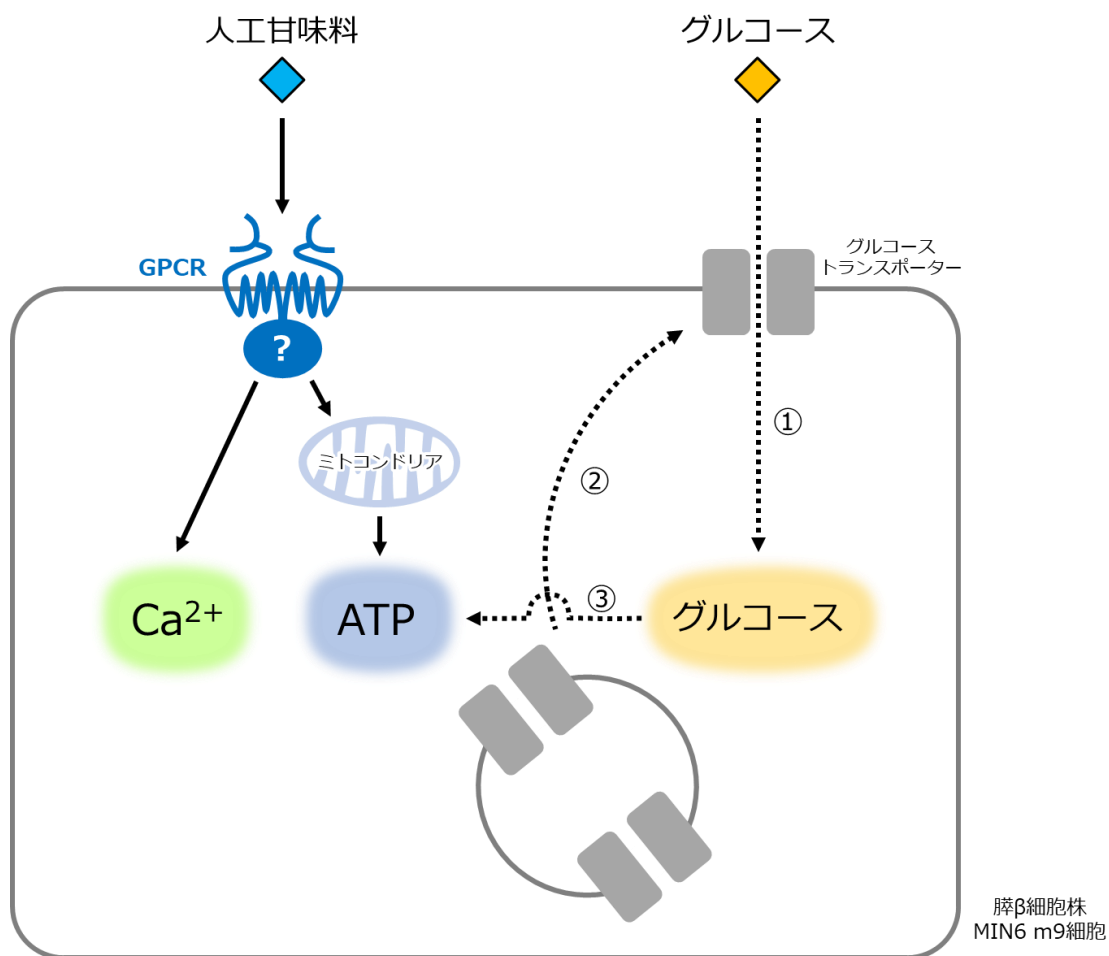


図 38 人工甘味料が MIN6 m9 細胞に与える影響

人工甘味料が MIN6 m9 細胞に与える影響の模式図。実線の経路は、過去に報告されていた経路を示す。細胞内 Ca^{2+} 濃度は、GPCR を介して上昇する。また、GPCR を介して、ミトコンドリアが活性化され、ATP が産生される。点線の経路は、本研究で推測された経路を示す。人工甘味料の刺激により、①細胞外からのグルコース取り込みが促進される。②グルコーストランスポーターを速やかに細胞膜に移行させ、グルコース取り込みをさらに促進させる。③取り込まれたグルコースは、代謝され、細胞内 ATP 濃度上昇を増強する。

図 39 （論文投稿中のため削除）

総括

本研究では、新規の緑色蛍光型グルコースセンサーGreen Glifon の開発に成功した[21]。またその開発を通し、単色蛍光型分子センサーの中でも、挿入型の開発手法を確立することができた。本グルコースセンサーには、グルコースへの EC_{50} 値が異なる 3 種類が存在し、3 種類のグルコースセンサーを併せると、 $8.1\ \mu\text{M}$ ~ $15\ \text{mM}$ の濃度範囲のグルコースを定量性高く検出できた。本グルコースセンサーは、大腸菌にリコンビナントタンパク質として作製させ、回収することで、血糖値測定などの生化学的なスクリーニングにも利用できた。大腸菌内だけでなく、哺乳類の生細胞や、線虫生体内に発現させても機能することが確認できた。培養細胞内では、シグナル配列を融合することで細胞小器官特異的に、生体内では、プロモーター配列を変えることで細胞種特異的に発現でき、グルコース動態を観察できることが分かった。初代培養細胞でも、細胞種特異的なグルコース動態を観察できる可能性がある。また、他色のセンサーと組み合わせたマルチカラーイメージングにも適用可能だった。

本グルコースセンサーを利用したライブセルイメージングによって、さまざまな細胞で共通して、細胞内のグルコース濃度変化が速やかに起こることが明らかになった。多くの株化細胞は、外液中のグルコース濃度変化に応答し、細胞内グルコース濃度が変化した。その変化は、細胞質基質だけでなく、核内にも及んでいた。また、内分泌細胞では、細胞外のグルコース濃度が一定の条件でも、人工甘味料の刺激を受けることで、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。内分泌細胞のグルコース取り込みについて、これまでは時間的な解析が行われておらず、本グルコースセンサーによる細胞内グルコースの時空間的観察が有効であると考えられる。神経・グリア細胞でのグルコースイメージングでは、今後、2 種類の細胞間の物質のやり取りをリアルタイムに解析し、分子の階層性や相互関係を理解したいと考えている。脳でのグルコース代謝と神経活動の相関を明らかにすることで、神経病態解析への応用を期待している。

また、本グルコースセンサーは、発生中の胚における解糖系の活性測定に利用され、解糖系とグルコース取り込みが強化されることで、神経堤細胞が移動し、胚発生が進行するという仮説を補強した[130]。多角的な実験技術を組み合わせた、生細胞・生体内でのグルコース代謝の可視化技術は、さまざまな組織に適用可能であると考えられる。本グルコースセンサーは、発生過程における解析や、ガンや免疫疾患などの病態解明、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。

参考文献

- [1] Goyal, M. S. & Raichle, M. E. Glucose requirements of the developing human brain. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **66** (Suppl 3), S46–S49, 2018.
- [2] DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism* **7** (1), 11–20, 2008.
- [3] Ghesquière, B., Wong, B. W., Kuchnio, A. & Carmeliet, P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* **511** (7508), 167–176, 2014.
- [4] Klip, A. & Marette, A. Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. *Journal of Cellular Biochemistry* **48** (1), 51–60, 1992.
- [5] Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414** (6865), 799–806, 2001.
- [6] Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. & Want, L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum* **17** (3), 183–190, 2004.
- [7] Kobayashi, M., Yamato, E., Tanabe, K., Tashiro, F., Miyazaki, S. & Miyazaki, J. Functional analysis of novel candidate regulators of insulin secretion in the MIN6 mouse pancreatic β cell line. *PLoS ONE* **11** (3), e0151927, 2016.
- [8] Yamada, K., Saito, M., Matsuoka, H. & Inagaki, N. A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nature Protocols* **2** (3), 753–762, 2007.
- [9] Satake, O., Kajinami, K., Ishikawa, Y., Ueda, T., Tsugawa, H., Kanemitsu, S., Okubo, S. & Takekoshi, N. Myocardial glucose metabolism assessed by positron emission tomography and the histopathologic findings of microvessels in syndrome X. *Circulation Journal* **68** (3), 220–226, 2004.
- [10] Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., Michael McCaffery, J., Adams, J. A., Ikura, M. & Tsien, R. Y. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388** (6645), 882–887, 1997.
- [11] Nikolaev, V. O., Bünnemann, 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.
- [12] Sato, M., Hida, N., Ozawa, T. & Umezawa, Y. Fluorescent indicators for cyclic GMP based on cyclic GMP-dependent protein kinase I α and green fluorescent proteins. *Analytical Chemistry* **72** (24), 5918–5924, 2000.

- [13] Yoshida, T., Alfaqaan, S., Sasaoka, N. & Imamura, H. Application of FRET-based biosensor “ATeam” for visualization of ATP levels in the mitochondrial matrix of living mammalian cells. *Methods in Molecular Biology* **1567**, 231–243, 2017.
- [14] Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **19** (2), 137–141, 2001.
- [15] 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.
- [16] 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 PDE5 α . *ACS Sensors* **2** (1), 46–51, 2017.
- [17] Fehr, M., Lalonde, S., Lager, I., Wolff, M. W. & Frommer, W. B. *In vivo* imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *Journal of Biological Chemistry* **278** (21), 19127–19133, 2003.
- [18] Deuschle, K., Chaudhuri, B., Okumoto, S., Lager, I., Lalonde, S. & Frommer, W. B. Rapid metabolism of glucose detected with FRET glucose nanosensors in epidermal cells and intact roots of arabidopsis RNA-silencing mutants. *Plant Cell* **18** (9), 2314–2325, 2006.
- [19] Fehr, M., Lalonde, S., Ehrhardt, D. W. & Frommer, W. B. Live imaging of glucose homeostasis in nuclei of COS-7 cells. *Journal of Fluorescence* **14** (5), 603–609, 2004.
- [20] 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.
- [21] Mita, M., Ito, M., Harada, K., Sugawara, I., Ueda, H., Tsuboi, T. & Kitaguchi, T. Green fluorescent protein-based glucose indicators report glucose dynamics in living cells. *Analytical Chemistry* **91** (7), 4821–4830, 2019.
- [22] Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *Journal of Biological Chemistry* **276** (31), 29188–29194, 2001.
- [23] Sangawa, T., Tabata, S., Suzuki, K., Saheki, Y., Tanaka, K. & Takagi, J. A multipurpose fusion tag derived from an unstructured and hyperacidic region of the amyloid precursor protein. *Protein Science* **22** (6), 840–850, 2013.
- [24] Deka, R. K., Goldberg, M. S., Hagman, K. E. & Norgard, M. V. The Tp38 (TpMg1B-2) lipoprotein binds glucose in a manner consistent with receptor function in *treponema pallidum*.

- Journal of Bacteriology* **186** (8), 2303–2308, 2004.
- [25] 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.
 - [26] Sakaguchi-Mikami, A., Taneoka, A., Yamoto, R., Ferri, S. & Sode, K. Engineering of ligand specificity of periplasmic binding protein for glucose sensing. *Biotechnology Letters* **30** (8), 1453–1460, 2008.
 - [27] Gill, S. C. & von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182** (2), 319–326, 1989.
 - [28] Sebaugh, J. L. & McCray, P. D. Defining the linear portion of a sigmoid-shaped curve: bend points. *Pharmaceutical Statistics* **2** (3), 167–174, 2003.
 - [29] Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273** (5280), 1392–1395, 1996.
 - [30] Harada, K., Chihara, T., Hayasaka, Y., Mita, M., Takizawa, M., Ishida, K., Arai, M., Tsuno, S., Matsumoto, M., Ishihara, T., Ueda, H., Kitaguchi, T. & Tsuboi, T. Green fluorescent protein-based lactate and pyruvate indicators suitable for biochemical assays and live cell imaging. *Scientific Reports* **10** (1), 1–11, 2020.
 - [31] Renard, E. Monitoring glycemic control: the importance of self-monitoring of blood glucose. *The American journal of medicine* **118** (Suppl 9A), 12S–19S, 2005.
 - [32] König, M., Bulik, S. & Holzhütter, H. G. Quantifying the contribution of the liver to glucose homeostasis: A detailed kinetic model of human hepatic glucose metabolism. *PLoS Computational Biology* **8** (6), e1002577, 2012.
 - [33] Ferraris, R. P., Yasharpour, S., Lloyd, K. C. K., Mirzayan, R. & Diamond, J. M. Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **259** (5 Pt 1), G822–G837, 1990.
 - [34] Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S. & Miyawaki, A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98** (6), 3197–3202, 2001.
 - [35] Schadeewaldt, P., Hammen, H. W., Loganathan, K., Bodner-Leidecker, A. & Wendel, U. Analysis of concentration and ^{13}C enrichment of D-galactose in human plasma. *Clinical Chemistry* **46** (5), 612–619, 2000.
 - [36] Heikal, A. A., Hess, S. T., Baird, G. S., Tsien, R. Y. & Webb, W. W. Molecular spectroscopy

- and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: Coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (22), 11996–12001, 2000.
- [37] Park, J. B. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **260** (2), 568–574, 1999.
- [38] Oldendorf, W. H., Crane, P. D., Lawner, P. M. & Braun, L. D. Rapid, transient drop in brain glucose after intravenous phloretin or 3-O-methyl-D-glucose. *Stroke* **14** (3), 388–393, 1983.
- [39] Liemburg-Apers, D. C., Willems, P. H. G. M., Koopman, W. J. H. & Grefte, S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Archives of Toxicology* 1209–1226, 2015, doi:10.1007/s00204-015-1520-y.
- [40] Sun, R. C., Dukhande, V. V., Zhou, Z., Young, L. E. A., Emanuelle, S., Brainson, C. F. & Gentry, M. S. Nuclear glycogenolysis modulates histone acetylation in human non-small cell lung cancers. *Cell Metabolism* **30** (5), 903-916.e7, 2019.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M. & Thorens, B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Letters* **524** (1-3), 199-203, 2002.

- [47] T, J. H. J., Milburn, J. L., Thorens, B., Lodish, H. F., Johnson, J. H., Newgard, C. B., Milburn, J. L., Lodish, H. F. & Thorens, B. The high Km glucose transporter of islets of langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *Journal of Biological Chemistry* **265** (12), 6548–6551, 1990.
- [48] Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77** (1), 71–94, 1974.
- [49] Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D., & Ambros, V. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *The EMBO journal* **10** (12), 3959–3970, 1991.
- [50] White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **314** (1165), 1–340, 1986.
- [51] Bargmann, C. I. & Horvitz, H. R. Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* **7** (5), 729–742, 1991.
- [52] Bargmann, C. I., Hartwig, E. & Horvitz, H. R. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* **74** (3), 515–527, 1993.
- [53] Hedgecock, E. M. & Russell, R. L. Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72** (10), 4061–4065, 1975.
- [54] Edwards, S. L., Charlie, N. K., Milfort, M. C., Brown, B. S., Gravlin, C. N., Knecht, J. E. & Miller, K. G. A novel molecular solution for ultraviolet light detection in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology* **5** (8), e198, 2008.
- [55] Ward, A., Liu, J., Feng, Z. & Xu, X. Z. S. Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in *C. elegans*. *Nature Neuroscience* **11** (8), 916–922, 2008.
- [56] Sassa, T., Murayama, T. & Maruyama, I. N. Strongly alkaline pH avoidance mediated by ASH sensory neurons in *C. elegans*. *Neuroscience Letters* **555**, 248–252, 2013.
- [57] Kaletsky, R. & Murphy, C. T. The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. *DMM Disease Models and Mechanisms* **3** (7–8), 415–419, 2010.
- [58] Alonso, M. D., Lomako, J., Lomako, W. M. & Whelan, W. J. A new look at the biogenesis of glycogen. *The FASEB Journal* **9** (12), 1126–1137, 1995.
- [59] Shao, J., Wang, Z., Yang, T., Ying, H., Zhang, Y. & Liu, S. Bone regulates glucose metabolism as an endocrine organ through osteocalcin. *International Journal of Endocrinology* **2015** 967673, 2015.
- [60] Wrenshall, G. A. & Marcus, A. The story of insulin: Forty years of success against diabetes.

- JAMA: The Journal of the American Medical Association* **12** (5), 461–461, 1963.
- [61] Mering, J. v. & Minkowski, O. Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **26**, 371–387, 1890.
 - [62] Gautier, J. F., Fetita, S., Sobngwi, E. & Salaün-Martin, C. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism* **31** (3 Pt 1), 233–42, 2005.
 - [63] Moore, B., Edie, E. S. & Abram, J. H. On the treatment of *Diabetes mellitus* by acid extract of duodenal mucous membrane. *Biochemical Journal* **1** (1), 28–38, 1906.
 - [64] Rasmussen, H., Zawalich, K. C., Ganesan, S., Calle, R. & Zawalich, W. S. Physiology and pathophysiology of insulin secretion. *Diabetes Care* **13** (6), 655–666, 1990.
 - [65] Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg, H. & Pipeleers, D. G. Glucose sensing in pancreatic β -cells: A model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* **50** (1), 1–11, 2001.
 - [66] Henquin, J. C. Regulation of insulin secretion: A matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* **52** (5), 739–751, 2009.
 - [67] Floyd, J. C., Fajans, S. S., Conn, J. W., Knopf, R. F. & Rull, J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *The Journal of clinical investigation* **45** (9), 1487–1502, 1966.
 - [68] Van Loon, L. J. C., Kruijschoop, M., Menheere, P. P. C. A., Wagenmakers, A. J. M., Saris, W. H. M. & Keizer, H. A. Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26** (3), 625–630, 2003.
 - [69] Itoh, Y. *et al.* Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature* **422** (6928), 173–176, 2003.
 - [70] Shapiro, H., Shachar, S., Sekler, I., Hershfinkel, M. & Walker, M. D. Role of GPR40 in fatty acid action on the β -cell line INS-1E. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **335** (1), 97–104, 2005.
 - [71] Conigrave, A. D., Mun, H.-C. & Brennan, S. C. Physiological significance of L-amino acid sensing by extracellular Ca^{2+} -sensing receptors. *Biochemical Society transactions* **35** (Pt 5), 1195–8, 2007.
 - [72] Oh, D. Y., Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W. Q., Li, P., Lu, W. J., Watkins, S. M. & Olefsky, J. M. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142** (5), 687–698, 2010.
 - [73] Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Shigemura, N., Ninomiya, Y. & Kojima, I. Sweet taste receptor expressed in pancreatic β -

- cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS ONE* **4** (4), e5106, 2009.
- [74] Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P. & Zuker, C. S. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444** (7117), 288–294, 2006.
 - [75] Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Mogami, H., Lohse, M., Ninomiya, Y. & Kojima, I. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocrine Journal* **60** (10), 1191–1206, 2013.
 - [76] Mace, O. J., Affleck, J., Patel, N. & Kellett, G. L. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *Journal of Physiology* **582** (1), 379–392, 2007.
 - [77] Mace, O. J., Lister, N., Morgan, E., Shepherd, E., Affleck, J., Helliwell, P., Bronk, J. R., Kellett, G. L., Meredith, D., Boyd, R., Pieri, M., Bailey, P. D., Pettcrew, R. & Foley, D. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *Journal of Physiology* **587** (1), 195–210, 2009.
 - [78] Li, L., Ohtsu, Y., Nakagawa, Y., Masuda, K. & Kojima, I. Sucralose, an activator of the glucose-sensing receptor, increases ATP by calcium-dependent and -independent mechanisms. *Endocrine Journal* **63** (8), 715–725, 2016.
 - [79] Roper, S. D. Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **24** (1), 71–79, 2013.
 - [80] Jang, H. J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M. J., Carlson, O. D., Kim, B. J., Zhou, J., Kim, H. H., Xu, X., Chan, S. L., Juhaszova, M., Bernier, M., Mosinger, B., Margolskee, R. F. & Egan, J. M. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** (38), 15069–15074, 2007.
 - [81] Temussi, P. The sweet taste receptor: A single receptor with multiple sites and modes of interaction. *Advances in Food and Nutrition Research* **53** (07), 199–239, 2007.
 - [82] Medina, J., Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Fernandez, A., Sakaguchi, K., Kitaguchi, T. & Kojima, I. Positive allosteric modulation of the calcium-sensing receptor by physiological concentrations of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **291** (44), 23126–23135, 2016.
 - [83] Magistretti, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Journal of Experimental Biology* **96** (4), 407–410, 2006.
 - [84] Verkhratsky, A., Matteoli, M., Parpura, V., Mothet, J. & Zorec, R. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *The EMBO Journal*

- 35** (3), 239–257, 2016.
- [85] Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** (22), 10625–10629, 1994.
 - [86] Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J. & Alberini, C. M. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* **144** (5), 810–823, 2011.
 - [87] Natsubori, A., Tsunematsu, T., Karashima, A., Imamura, H., Kabe, N., Trevisiol, A., Hirrlinger, J., Kodama, T., Sanagi, T., Masamoto, K., Takata, N., Nave, K. A., Matsui, K., Tanaka, K. F. & Honda, M. Intracellular ATP levels in mouse cortical excitatory neurons varies with sleep–wake states. *Communications Biology* **3** (1), 491, 2020.
 - [88] Petit, J. M., Gyger, J., Burlet-Godinot, S., Fiumelli, H., Martin, J. L., & Magistretti, P. J. Genes involved in the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) are specifically regulated in cortical astrocytes following sleep deprivation in mice. *Sleep* **36** (10), 1445–1458, 2013.
 - [89] 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.
 - [90] Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (22), 10625–10629, 1994.
 - [91] Oe, Y., Wang, X., Patriarchi, T., Konno, A., Ozawa, K., Yahagi, K., Hirai, H., Tian, L., McHugh, T. J. & Hirase, H. Distinct temporal integration of noradrenaline signaling by astrocytic second messengers during vigilance. *Nature Communications* **11** (1), 471, 2020.
 - [92] Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90** (17), 8033–8037, 1993.
 - [93] Mátrai, J., Chuah, M. K. & Vandendriessche, T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Molecular Therapy* **18** (3), 477–490, 2010.
 - [94] Atchison, R. W., Casto, B. C. & Hammon, W. M. D. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* **149** (3685), 754–756, 1965.
 - [95] Hoggan, M. D., Blacklow, N. R. & Rowe, W. P. Studies of small DNA viruses found in various

- adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55** (6), 1467–1474, 1966.
- [96] Nagai, N., Yamamoto, S., Tsuboi, T., Ihara, H., Urano, T., Takada, Y., Terakawa, S. & Takada, A. Tissue-type plasminogen activator is involved in the process of neuronal death induced by oxygen-glucose deprivation in culture. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **21** (6), 631–634, 2001.
- [97] Grienberger, C. & Konnerth, A. Imaging calcium in neurons. *Neuron* **73** (5), 862–885, 2012.
- [98] Hioki, H., Kameda, H., Nakamura, H., Okunomiya, T., Ohira, K., Nakamura, K., Kuroda, M., Furuta, T. & Kaneko, T. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. *Gene Therapy* **14** (11), 872–882, 2007.
- [99] Lee, Y., Messing, A., Su, M. & Brenner, M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* **56** (5), 481–493, 2008.
- [100] Datta, P. K. Neuronal cell culture. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols* **1078**, 35–44, 2013.
- [101] Konno, A. & Hirai, H. Efficient whole brain transduction by systemic infusion of minimally purified AAV-PHP.eB. *Journal of Neuroscience Methods* **346**, 108914, 2020.
- [102] Kitaoka, S., Morielli, A. D. & Zhao, F. Q. FGT-1 is a mammalian GLUT2-like facilitative glucose transporter in *Caenorhabditis elegans* whose malfunction induces fat accumulation in intestinal cells. *PLoS ONE* **8** (6), 1–13, 2013.
- [103] Teusink, B., Diderich, J. A., Westerhoff, H. V., Van Dam, K. & Walsh, M. C. Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *Journal of Bacteriology* **180** (3), 556–562, 1998.
- [104] Critchley, L. A. H. & Critchley, J. A. J. H. A meta-analysis of studies using bias and precision statistics to compare cardiac output measurement techniques. *Journal of Clinical Monitoring and Computing* **15** (2), 85–91, 1999.
- [105] Yin, W., Qin, W. & Gao, Y. Urine glucose levels are disordered before blood glucose level increase was observed in Zucker diabetic fatty rats. *Science China Life Sciences* **61** (7), 844–848, 2018.
- [106] Billard, J. M. D-serine signalling as a prominent determinant of neuronal-glial dialogue in the healthy and diseased brain. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12** (5b), 1872–1884, 2008.
- [107] Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L. & Foltyn, V. N. D-amino acids in the brain: D-serine in

- neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS Journal* **275** (14), 3514–3526, 2008.
- [108] Ito, T., Takahashi, K., Naka, T., Hemmi, H. & Yoshimura, T. Enzymatic assay of d-serine using d-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry* **371** (2), 167–172, 2007.
- [109] Ito, T., Hemmi, H., Kataoka, K., Mukai, Y. & Yoshimura, T. A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* **409** (2), 399–406, 2008.
- [110] Li, L., Ohtsu, Y., Nakagawa, Y., Masuda, K. & Kojima, I. Sucralose, an activator of the glucose-sensing receptor, increases ATP by calcium-dependent and -independent mechanisms. *Endocrine Journal* **63** (8), 715–725, 2016.
- [111] Liang, Y., Steinbach, G., Maier, V. & Pfeiffer, E. F. The effect of artificial sweetener on insulin secretion: 1. The effect of Acesulfame K on insulin secretion in the rat (studies *in vivo*). *Hormone and Metabolic Research* **19** (6), 233–238, 1987.
- [112] Nakagawa, Y., Ohtsu, Y., Nagasawa, M., Shibata, H. & Kojima, I. Glucose promotes its own metabolism by acting on the cell-surface glucose-sensing receptor T1R3. *Endocrine Journal* **61** (2), 119–131, 2014.
- [113] Mace, O. J., Schindler, M. & Patel, S. The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *Journal of Physiology* **590** (12), 2917–2936, 2012.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] Xiong, Y., Swaminath, G., Cao, Q., Yang, L., Guo, Q., Salomonis, H., Lu, J., Houze, J. B., Dransfield, P. J., Wang, Y., Liu, J. J., Wong, S., Schwandner, R., Steger, F., Baribault, H., Liu, L., Coberly, S., Miao, L., Zhang, J., Lin, D. C. & Schwarz, M. Activation of FFA1 mediates GLP-1 secretion in mice. Evidence for allosterism at FFA1. *Molecular and cellular endocrinology* **369** (1-2), 119–129, 2013.
- [117] Kojima, I., Medina, J. & Nakagawa, Y. Role of the glucose-sensing receptor in insulin secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **19** (Suppl 1), 54–62, 2017.
- [118] Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. P. & Zuker, C. S. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106** (3), 381–390, 2001.

- [119] Jones, E. V., Cook, D. & Murai, K. K. A neuron-astrocyte co-culture system to investigate astrocyte-secreted factors in mouse neuronal development. *Methods in Molecular Biology* **814**, 341–352, 2012.
- [120] Fernandez, M., Pironi, S., Antonelli, T., Ferraro, L., Giardino, L. & Calzà, L. Role of c-Fos protein on glutamate toxicity in primary neural hippocampal cells. *Journal of Neuroscience Research* **82** (1), 115–125, 2005.
- [121] Baldassarro, V. A., Marchesini, A., Facchinetti, F., Villetti, G., Calzà, L. & Giardino, L. Cell death in pure-neuronal and neuron-astrocyte mixed primary culture subjected to oxygen-glucose deprivation: The contribution of poly (ADP-ribose) polymerases and caspases. *Microchemical Journal* **136**, 215–222, 2018.
- [122] Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1** (1), 11–21, 2000.
- [123] Fucile, S. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* **35** (1), 1–8, 2004.
- [124] Higley, M. J. & Sabatini, B. L. Calcium signaling in dendrites and spines: Practical and functional considerations. *Neuron* **59** (6), 902–913, 2008.
- [125] Ramsey, I. S., Delling, M. & Clapham, D. E. An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology* **68**, 619–647, 2006.
- [126] Ferraguti, F. & Shigemoto, R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell and Tissue Research* **326** (2), 483–504, 2006.
- [127] Takechi, H., Eilers, J. & Konnerth, A. A new class of synaptic response involving calcium release in dendritic spines. *Nature* **396** (6713), 757–760, 1998.
- [128] Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N. D. & Helmchen, F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex *in vivo*. *Nature Methods* **1** (1), 31–37, 2004.
- [129] Inoue, M., Takeuchi, A., Manita, S., Horigane, S. I., Sakamoto, M., Kawakami, R., Yamaguchi, K., Otomo, K., Yokoyama, H., Kim, R., Yokoyama, T., Takemoto-Kimura, S., Abe, M., Okamura, M., Kondo, Y., Quirin, S., Ramakrishnan, C., Imamura, T., Sakimura, K., Nemoto, T., Kano, M., Fujii, H., Deisseroth, K., Kitamura, K. & Bito, H. Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for *in vivo* imaging of complex brain circuit dynamics. *Cell* **177** (5), 1346–1360.e24, 2019.
- [130] Bhattacharya, D., Azambuja, A. P. & Simoes-Costa, M. Metabolic reprogramming promotes neural crest migration via Yap/Tead signaling. *Developmental Cell* **53** (2), 199–211, 2020.

謝辞

本研究は、数多くの方々のご協力やご助言によって実施することができました。修士課程では第一章から第二章、博士課程では第三章の研究を遂行いたしました。

実験計画から博士論文執筆まで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 生命環境科学系の坪井貴司教授に心より深く感謝申し上げます。充実した研究環境と日常の議論を通して多くの知見を頂いた、原田一貴助教、伊藤幹さん、菅原和さんをはじめとする坪井研究室の皆様にも、心より感謝申し上げます。

分子センサー設計から評価実験、論文執筆まで多大なるご指導をいただきました、東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所の北口哲也准教授にこの場を借りて篤く御礼申し上げます。また、活発な議論を通して研究を支えてくださった、上田宏教授と上田・北口研究室の皆様にも、感謝申し上げます。

分光蛍光光度計や実験室の使用を承諾してくださり、優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 生命環境科学系の吉本敬太郎准教授と吉本研究室の皆様にも御礼申し上げます。

pPD136.61 ベクターは、Stanford University School of Medicine の Andrew Fire 教授より、*lin-44p::gfp* プラスミドは、埼玉医科大学薬理学教室の周防論博士より、pAAV-CaMKIIa-EYFP プラスミドは、Stanford University の Karl Deisseroth 博士より、pAAV-mGFAP(ABC1D)-RFlucA プラスミドは、University of Copenhagen の平瀬肇教授より譲り受けました。ここに感謝申し上げます。

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・細胞生物学講座の清野進特命教授より、GLUTag 細胞は、Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute の Daniel Drucker 教授より譲り受けました。ここに感謝申し上げます。

本研究の一部は、笹川科学研究助成費（2018-4018）と、日本学術振興会特別研究員奨励費（20J14411）の助成のもと行いました。

最後に、精神的な支えとなり学生生活を支えてくださった、東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻の先生方および学生の皆様と、家族、周りのすべての方への感謝とともに、本論文を締めくくらせて頂きます。

三田真理恵