

グルコース代謝を可視化する新規蛍光型分子センサーの開発

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 博士前期課程2年（助成時）
博士後期課程1年（現在）

三田 真理恵

グルコースは、生体におけるエネルギー源として重要な分子であり、細胞の成長や増殖、血糖を調節するインスリンの分泌反応など、さまざまな生体活動と生体恒常性の維持に関与する。細胞内でのグルコースの動態は、細胞内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しており、その代謝は、さまざまな生体反応の原動力となる分子を作り出す。また、グルコース代謝経路の破綻は、ホルモン分泌の異常を含む糖尿病を代表とした代謝疾患や神経障害など、個体レベルの疾患にも関与する。そのため、細胞や個体におけるグルコース動態の観察は、エネルギー代謝に関わる細胞生理機能の解明だけでなく、疾患研究にも応用できる。生きた細胞内でのグルコース動態やそれを制御する関連分子の動態との同時解析には、蛍光分子センサーを利用した生細胞イメージングが有効であり、時空間分解能および汎用性が高い、蛍光グルコースセンサーの開発が求められている。

本研究では、生細胞内のグルコース動態を可視化するためのツールとして、緑色蛍光型グルコースセンサー **Green Glifon (Green Glucose indicating fluorescent protein)** の開発を試みた。緑色蛍光タンパク質 **Citrine** を二分割し、その間にグルコース結合ドメインを融合して、プロトタイプを作製した（図1）。作製したプロトタイプのグルコース結合ドメインと **Citrine** との間のリンカーアミノ酸配列を最適化し、グルコース添加によって蛍光輝度が約7倍上昇する変異体を取得することができた。次に、この変異体のグルコース結合ドメインを最適化し、グルコースへの結合能が異なる3種の **Green Glifon** ($50\ \mu\text{M}$ 、 $600\ \mu\text{M}$ 、 $4000\ \mu\text{M}$) の取得に成功した。この3種の **Green Glifon** は、 $8\ \mu\text{M}$ から $15\ \text{mM}$ までの濃度のグルコースを検出でき、生理的な濃度範囲のほとんどが検出可能であることが分かった。



図1. 緑色グルコースセンサー **Green Glifon** の構造模式図

Green Glifon により、生細胞内のグルコース動態が検出可能かどうか検証するため、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞に Green Glifon を遺伝子導入し、細胞外からさまざまな濃度のグルコースを投与した。すると、Green Glifon の蛍光輝度はグルコース濃度に応答して変化し、蛍光輝度変化を通して細胞内のグルコース動態を可視化できることが分かった (図 2A)。また、マウス膵 β 細胞株 MIN6 m9 細胞に Green Glifon と赤色カルシウム蛍光指示薬 Rhod2 を同時に適用することで、細胞内のグルコースとカルシウム動態の 2 分子同時解析も可能であることが分かった (図 2B)。

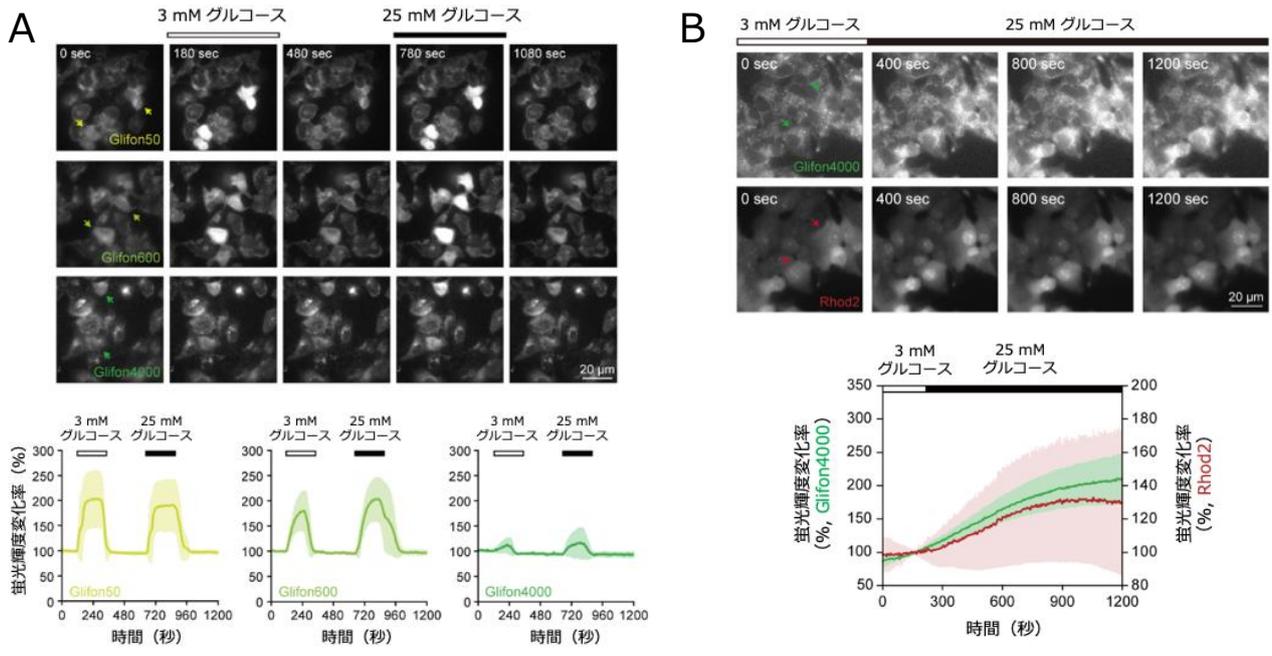


図 2. Green Glifon による生細胞イメージング

(A) HeLa 細胞でのグルコース動態可視化 (B) MIN6 m9 細胞での 2 分子同時可視化

さらに、マウス膵 β 細胞株 MIN6 m9 細胞において、細胞外にグルコースがある条件では、人工甘味料スクラロースの投与によって Green Glifon の蛍光輝度が上昇する反応が観察された。一方、細胞外にグルコースがない条件では、この反応は見られなかった。このことから、人工甘味料は、膵 β 細胞内へのグルコース取り込みを促進させることが分かった (図 3)。

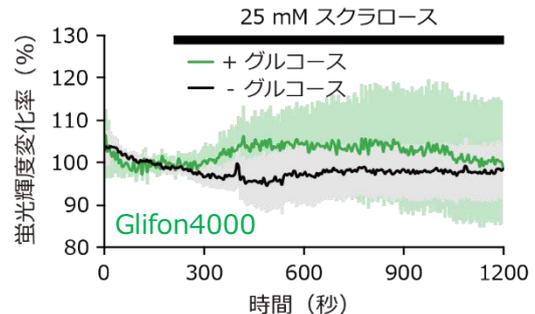


図 3. 人工甘味料投与によるグルコース動態の攪乱

これらの結果から、Green Glifon は、生細胞および生体内でのリアルタイムなグルコース動態観察を可能にし、グルコース代謝制御機構の分子基盤とその機構の破綻によって起こる様々な病態の分子メカニズム解明に貢献できると考えられる。

以上の研究成果は、Analytical Chemistry 誌に発表した(Mita et al., Green fluorescent protein-based glucose indicators report glucose dynamics in living cells, Analytical Chemistry, 2019, 91(7), 4821-4830, DOI:10.1021/acs.analchem.9b00447)。