

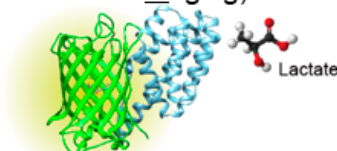
【目的】 アストロサイトは脳内に最も豊富に存在するグリア細胞で、血液由来のグルコース、また自身で産生された乳酸をニューロンに供給すると言われている。ニューロンが過興奮して起こるてんかんなどの発作時には、ニューロン内のクエン酸回路の阻害と乳酸濃度の上昇、さらに血液中への乳酸放出が報告されている。このことから研究代表者は、「アストロサイトからニューロンへのグルコースと乳酸の供給、およびニューロンでの適切な代謝が阻害されることがてんかん発作の発症に関与する」のではないかと考えているが、脳において個々の細胞のグルコース代謝関連分子の動態を観察する手段がないことがこの仮説を検証する上でのボトルネックとなっている。そこで、グルコース、ピルビン酸、乳酸の濃度変化に応答して輝度が変化する単色蛍光タンパク質センサーの開発と多色化を行い、ニューロンおよびアストロサイトでの代謝制御機構を分子レベルで理解することを目的とした。

【方法】 蛍光タンパク質を分割し、乳酸やピルビン酸に対する結合ドメインを遺伝子工学的に融合した。両者の間のリンカーの長さやその配列を最適化することで、最適な蛍光輝度変化を示すセンサーを構築した。さらに、開発した各種センサーをニューロンまたはアストロサイトに発現させるためのウイルスベクターを作製し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を投与した際の細胞内乳酸、ピルビン酸、ATP、グルコース動態を観察した。

【結果】 現在までに緑色乳酸センサーと緑色ピルビン酸センサーの開発に成功し、それぞれ Green Lindoblum (Green Lactate indicator suitable for fluorescence imaging)、Green Pegassos (Green Pyruvate sensing a single fluorescent protein-based probe) と命名した。Green Lindoblum は乳酸存在下で蛍光輝度が 5.2 倍、Green Pegassos はピルビン酸存在下で蛍光輝度が 3.3 倍に上昇し、ヒト胎児由来細胞株 HEK293T 細胞やヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞においても乳酸やピルビン酸に応じて蛍光輝度が上昇した。さらに、レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターを用いて各種センサーをニューロンまたはアストロサイトに発現させ、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を投与したところ、アストロサイトにおいて Green Lindoblum は蛍光輝度の低下を示し、先行研究で開発された緑色グルコースセンサー Green Glifon 4000 では変化が見られなかった。また、ニューロンにおいては Green Glifon 4000、および先行研究で開発された緑色 ATP センサー MaLionG いずれも蛍光輝度の低下を示した。従来、ニューロンの興奮時にはアストロサイトから乳酸が供給され、ニューロンの ATP 需要を賄うとされてきたが、本研究の結果ニューロンが活性化されてもアストロサイトで乳酸産生は促進されておらず、ニューロンでの ATP 産生も促進されていない可能性が示された。

本研究で開発した Green Lindoblum と Green Pegassos の模式図

Green Lindoblum (Green Lactate indicator suitable for fluorescence imaging)



Green Pegassos (Green Pyruvate sensing a single fluorescent protein-based probe)

