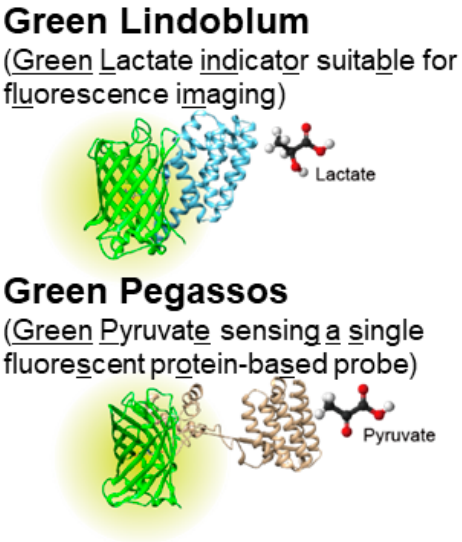
| 159　蛍光タンパク質センサーを用いた神経代謝活動の解析 | 原田　一貴 |
|---|---|

**【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、ニューロン内で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



# 159. 蛍光タンパク質センサーを用いた神経代謝活動の解析

原田　一貴

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

Key words：蛍光タンパク質，アストロサイト，ニューロン，乳酸，ピルビン酸

## 緒　言

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などをニューロンに供給し、また脳を構造的に支持する役割を持つ。特に、神経活動が活発になるときにはアストロサイトからニューロンへ乳酸が供給され、乳酸がニューロン内で ATP 源となることでエネルギー需要を満たす「アストロサイト-ニューロン乳酸経路（Astrocyte-neuron lactate shuttle：ANLS）仮説」が提唱されている［1］。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、ニューロン内で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。これらのことから、「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」可能性が考えられる。しかし、従来脳においてニューロンの代謝活動の指標とされてきた fMRI では、神経活動の上昇に続いてまず起こると考えられる血中酸素濃度の低下が検出されないといったこともあり、個々の細胞のグルコース代謝関連分子の動態を可視化する手段が存在しなかった。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指した。

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、緑色乳酸センサーGreen Lindoblum（Green Lactate indicator suitable for fluorescence imaging）と緑色ピルビン酸センサーGreen Pegassos（Green Pyruvate sensing a single fluorescent protein-based probe）の開発に成功した。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、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唆された。

## 方　法

### 1. 緑色乳酸、ピルビン酸可視化センサーの開発

緑色タンパク質 GFP を発色団付近で分割し、大腸菌由来乳酸デヒドロゲナーゼ調節因子の乳酸結合ドメイン、またはピルビン酸デヒドロゲナーゼ調節因子のピルビン酸結合ドメインを挿入した。両者をつなぐ N 末端および C 末端のリンカーアミノ酸配列の長さを様々に変更した変異体を作製し、乳酸、ピルビン酸存在下で蛍光輝度が最も上昇するものを選抜した。さらにリンカーアミノ酸に点変異を導入し、同様に蛍光輝度が最も上昇するものを選抜した。開発したセンサーを株化細胞に遺伝子導入し、様々な刺激を加えて蛍光輝度変化を解析した。

### 2. 各種センサーのニューロンおよびアストロサイトへの遺伝子導入とグルタミン酸への応答の観察

開発したセンサータンパク質を、ニューロンやアストロサイトに発現させるための遺伝子導入手法を検討した。導入手法としてレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus：AAV）ベクターを試し、ニューロンには CaMKIIa プロモーター、アストロサイトには GFAP（ABC1D）プロモーターを用いた。生後 1 日のマウスから大脳皮質と海馬を採取し、ニューロンとアストロサイトの初代共培養細胞を得た。作製した各種ウイルス

ベクターを感染させたのち蛍光顕微鏡で観察し、グルタミン酸を投与して蛍光輝度変化を解析した。動物実験は、東京大学大学院総合文化研究科の動物実験委員会の承認のもと（承認番号 29-4）実施した。

## 結果および考察

### 1. 緑色乳酸、ピルビン酸可視化センサーの開発

蛍光タンパク質と結合ドメインをつなぐリンカー領域の長さとアミノ酸配列を最適化することにより、乳酸存在下で蛍光輝度が約 5.2 倍に上昇する緑色タンパク質変異体と、ピルビン酸存在下で蛍光輝度が約 3.3 倍に上昇する緑色タンパク質変異体を得た（図 1）。これらをそれぞれ、緑色乳酸センサータンパク質 Green Lindoblum、および緑色ピルビン酸センサータンパク質 Green Pegassos とした。Green Lindoblum をヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293T 細胞に、Green Pegassos をヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞にそれぞれ発現させて蛍光顕微鏡で観察すると、細胞外から投与した乳酸やピルビン酸に応じて蛍光輝度の上昇が見られた（図 2）。Green Lindoblum および Green Pegassos は、従来開発されたフォルスター共鳴エネルギー移動（Förster resonance energy transfer：FRET）型および単色輝度変化型センサーよりも低い $EC_{50}$ 値を示し、高い親和性を持つことが示された。株化細胞での実験結果から、Green Lindoblum および Green Pegassos はいずれも細胞内の乳酸およびピルビン酸濃度変化を適切に可視化できていると考えられた［2］。

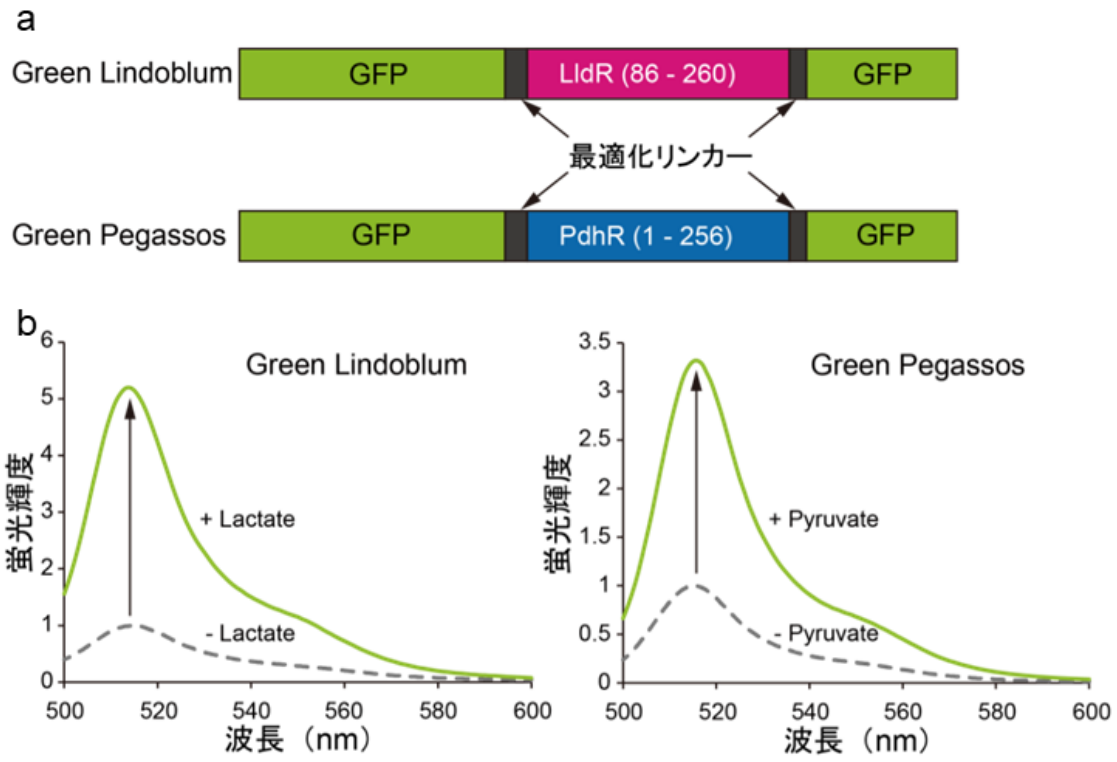



図 1. Green Lindoblum および Green Pegassos の性質

a) Grren Lindoblum および Green Pegassos の配列模式図。

b) Grren Lindoblum および Green Pegassos の蛍光スペクトル。Green Lindoblum は 10 mM 乳酸、Green Pegassos は 1 mM ピルビン酸存在下での蛍光輝度変化を示した。

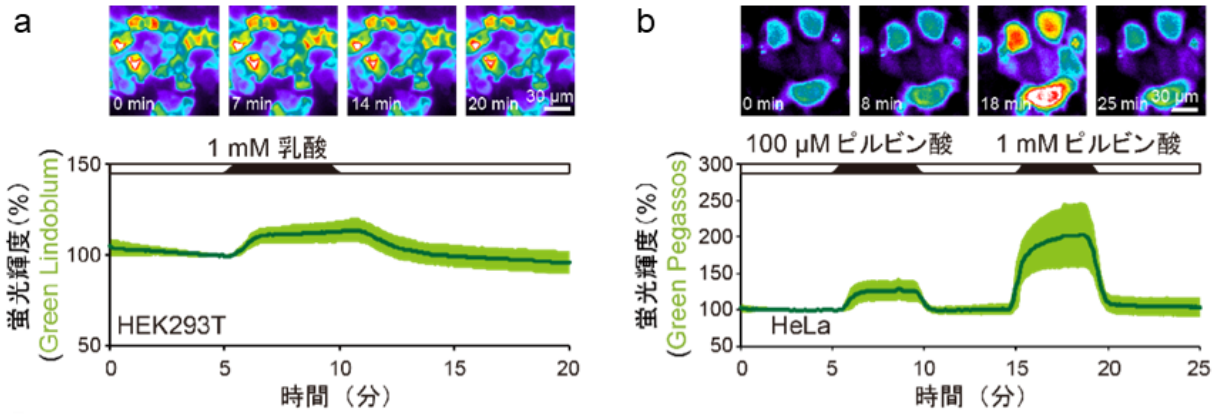



図 2. Green Lindoblum および Green Pegassos の株化細胞における応答

a) Green Lindoblum を発現させた HEK293T 細胞に乳酸を投与した際の擬似カラー画像（上）と蛍光輝度の経時変化（下）。乳酸投与に伴う蛍光輝度の上昇が見られた。スケールバー：30 μm。N＝85 細胞。平均±標準偏差。

b) Green Pegassos を発現させた HeLa 細胞に乳酸を投与した際の擬似カラー画像（上）と蛍光輝度の経時変化（下）。ピルビン酸投与に伴う蛍光輝度の上昇が見られた。スケールバー：30 μm。N＝28 細胞。平均±標準偏差。

**2. 各種センサーのニューロンおよびアストロサイトへの遺伝子導入とグルタミン酸への応答の観察**

ニューロンとアストロサイトの初代共培養細胞を得たのち、各種センサータンパク質を発現させるためのレンチウイルスベクターまたは AAV ベクターを感染させ、蛍光顕微鏡下で観察した。レンチウイルスベクターを用いて Green Lindoblum、緑色 ATP センサータンパク質 MaLionG［3］、または緑色グルコースセンサータンパク質 Green Glifon 4000［4］を発現させたアストロサイトに、神経伝達物質であるグルタミン酸を投与すると、Green Lindoblum および MaLionG は蛍光輝度の低下を示し、Green Glifon 4000 では変化が見られなかった。また、AAV ベクターを用いて Green Glifon 4000 または MaLionG を発現させたニューロンにグルタミン酸を投与した際も、いずれも蛍光輝度の低下を示した。

以上から、従来提唱されてきたアストロサイト―ニューロン乳酸経路（Astrocyte－neuron lactate shuttle : ANLS）仮説に反し、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。ANLS 仮説によれば、神経活動が活発化すると、解糖系が亢進したアストロサイトで乳酸が産生されてニューロンに供給され、ニューロンの ATP の産生源になるとされている。しかし実際には、アストロサイトでの乳酸産生、およびニューロンでの ATP 産生を示唆する結果は得られなかった。ANLS 仮説に反する研究成果として、FRET 型センサータンパク質を用いたグルコース、NADH、乳酸の動態可視化例がある［5］。海馬スライスや生きた脳組織において、ニューロンの刺激時に細胞内の NADH 濃度上昇およびグルコース濃度低下がみられるが、それらはニューロンで乳酸取り込みを阻害しても抑制されなかったことから、乳酸の供給を受けた現象ではなく、ニューロン自身で解糖系が亢進することによる現象であるとされている。ニューロンにおける Green Glifon 4000 の蛍光輝度低下は解糖系の亢進を支持する結果であったが、MaLionG の蛍光輝度低下は細胞内 ATP の枯渇を示唆する結果であった。さらに、アストロサイトにおいて乳酸、ATP のいずれの濃度も低下していることを示唆する結果が得られたことから、アストロサイトで必ずしも解糖系が亢進しているわけではなく、神経活動時にもニューロンへの乳酸供給は起きていない可能性が示された。今後は、開発した各種センサータンパク質を生きたマウス個体の脳へ発現させ、*in vivo* イメージングによる解析を行う必要がある。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻の坪井貴司教授、株式会社マイオリッジの石田賢太郎主任研究員、九州大学大学院理学研究院生物科学専攻の新井美存研究員および石原健教授、協同乳業株式会社研究所の角沙樹研究員および松本光晴主幹研究員、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および上田宏教授である。

## 文　献

1） Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. Proc Nat Acad Sci USA 1994 Oct 25;91(22):10625-9. PMID: 7938003 DOI: 10.1073/pnas.91.22.10625.

2） 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. Sci Rep 2020 Nov 11;10(1):19562. PMID: 33177605 DOI: 10.1038/s41598-020-76440-4.

3） Arai S, Rokus K, Harada K, Looi LS, Matsuda S, Wongso D, Suo S, Ishiura S, Tseng YH, Raghunath M, Ito T, Tsuboi T, Kitaguchi T. RGB‐color intensiometric indicators visualize spatiotemporal dynamics of ATP in single cells. Angew Chem Int Ed 2018 Aug 20;57(34):10873-10878. PMID: 29952110 DOI: 10.1002/anie.201804304.

4） Mita M, Ito M, Harada K, Sugawara I, Ueda H, Tsuboi T, Kitaguchi T. Green fluoresecent protein-based glucose indicators report glucose dynamics in living cells. Anal Chem 2019 Apr 2;91(7):4821-4830. PMID: 30869867 DOI: 10.1021/acs.analchem.9b00447.

5） Díaz-García CM, Mongeon R, Lahmann C, Koveal D, Zucker H, Yellen G. Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake. Cell Metab 2017 Aug 1;26(2):361-374.e4. PMID: 28768175 DOI: 10.1016/j.cmet.2017.06.021.