



Title	生物発光グルコースセンサーの開発と生物学研究への応用
Author(s)	田中, 陸登
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101885
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

生物発光グルコースセンサーの開発と 生物学研究への応用

Development of genetically encoded
bioluminescent glucose sensor and
application for biological research

田中 陸登
大阪大学生命機能研究科
2025年 3月

Abstract

Glucose is an essential energy source for cell maintenance and is involved in various cellular activities. Glucose taken into cells is consumed for energy production, and the metabolic products generated in this process are derived into the synthesis of lipids, amino acids, and nucleic acids. In addition to its roles in metabolism, glucose has a wide range of functions within cells, including as a signal molecule and in stress responses.

It is important to observe the fluctuation of intracellular glucose concentrations to understand the complex roles of glucose. There are methods of measuring intracellular glucose using pseudo-glucose labeled with radioisotopes, and chemical dye. These methods have the limitation that they can only detect increases in glucose. On the other hand, a genetically encoded fluorescent glucose sensor developed using fluorescent protein and glucose binding protein reacts with glucose to cause a signal change, which is reversible. Therefore, it can detect increases and decreases in glucose. However, there are concerns that the excitation light required for fluorescence measurement may be phototoxic to cells and may change the metabolic balance of light-sensitive cells such as plant cells. In addition, it is difficult to use it in combination with methods that control cells by light stimulation, such as optogenetics.

To solve these problems, this study focused on bioluminescence. Bioluminescence is the light emitted when a bioluminescent protein (luciferase) reacts with a luminescent substrate (luciferin). Since it does not require excitation light, problems caused by excitation light will not occur. Therefore, I attempted to develop a bioluminescent glucose sensor. By establishing a unique screening method and improving the signal change rate, I developed a bioluminescent glucose sensor, LOTUS-Glc. The addition of glucose to LOTUS-Glc changes the Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) efficiency between fluorescent proteins and luciferase, resulting in a change in luminescent color. With LOTUS-Glc, I succeeded in evaluating the effects of drug addiction and optogenetic tools in mammalian cells, and in detecting glucose fluctuations in protoplasts derived from plant cells.

These results showed that LOTUS-Glc can be applied to glucose measurement in mammalian and plant cells by taking advantage of the bioluminescence. Furthermore, given that bioluminescence imaging has also been applied to imaging deep tissues and mice, LOTUS-Glc is expected to be applicable not only to the cellular level but also to the macroscopic targets.

要旨

グルコースは、細胞維持に必要不可欠なエネルギー源であり、様々な細胞活動に関与している。細胞内に取り込まれたグルコースは、エネルギー生産のために消費され、その過程で生成された代謝産物は、脂肪酸、アミノ酸、核酸などの合成へと派生していく。また、代謝のみならずシグナル分子やストレス応答とも関わっており、細胞内でのグルコースの役割は多岐にわたっている。

このようなグルコースの複雑な役割を理解するためには、細胞内でのグルコース濃度の変動を測定することが重要である。細胞内グルコースの検出方法としては、化学色素や放射性同位体標識を施した疑似グルコースを使用する方法がある。これらの方法ではグルコースの増加しか検知できないなどの制限があった。一方で、蛍光タンパク質とグルコース結合タンパク質を組み合わせて開発された遺伝子組み込み型の蛍光センサーは、グルコースと反応することでシグナル変化が起き、その変化は可逆的である。したがって、グルコース濃度の増加と減少を測定することが可能である。しかしながら、蛍光検出に必要な励起光は、細胞への光毒性の懸念や、植物細胞など光感受性細胞の代謝バランスに影響を与える可能性がある。また、オプトジェネティクスのような光刺激により細胞を制御する技術との併用が困難である。

このような励起光による問題を解決するため、本研究では生物発光に注目した。生物発光は、生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）が発光基質（ルシフェリン）と反応する際に生じる光であり、励起光が不要なため励起光に起因した問題が生じない。この背景から、ルシフェラーゼを組み込んだ生物発光グルコースセンサーの開発を試みた。独自に確立したスクリーニング手法によりシグナル変化率を向上させることで、生物発光グルコースセンサー、LOTUS-Glcを開発した。LOTUS-Glcは、グルコース添加により蛍光タンパク質とルシフェラーゼ間での Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) 効率が変化するため、発光色が変わる。開発したLOTUS-Glcを用いて、哺乳類細胞における薬剤添加でのグルコース濃度の変動や、植物細胞での光合成に関連したグルコース濃度の変動の検出に成功した。

これらの結果より、LOTUS-Glcは生物発光による利点を活かして、哺乳類細胞や植物細胞のグルコース測定への応用が可能であることが示された。さらに、生物発光が深部組織やマウスのイメージングにも応用されていることを踏まえると、LOTUS-Glcは細胞レベルにとどまらず、マクロな対象への応用も期待できる。

目次

序論	6
1 生物発光グルコースセンサーLOTUS-Glc の開発	7
1.1 背景	7
1.1.1 細胞におけるグルコースの役割	7
1.1.2 既存のグルコース濃度の測定方法	8
1.1.3 生物発光を利用したセンサー	8
1.1.4 精製タンパク質による特性評価	10
1.2 目的	10
1.3 実験方法と実験材料	10
1.4 結果と考察	15
1.4.1 スクリーニング法の確立	15
1.4.2 スクリーニングの結果	19
1.4.3 ダイナミックレンジ	21
1.4.4 親和性と特異性	23
1.4.5 pH 依存性	24
2 哺乳類細胞でのグルコース変動の検出	26
2.1 背景	26
2.1.1 哺乳類細胞のグルコース取り込み	26
2.1.2 生物発光センサーの利点	27
2.2 目的	28
2.3 実験方法と実験材料	28
2.4 結果と考察	30
2.4.1 グルコース添加の影響評価	30
2.4.2 グルコース取り込み阻害剤の影響評価	32
2.4.3 オプトジェネティクスツールの影響評価	33
3 植物細胞への応用	36
3.1 背景	36
3.1.1 植物の光依存性	36
3.1.2 植物由来のプロトプラスト	37
3.2 目的	37
3.3 実験方法と実験材料	38

3.4 結果と考察	39
3.4.1 生物発光が植物に与える影響.....	39
3.4.2 プロトプラスト内の局在確認.....	40
3.4.3 LOTUS-Glc によるグルコース濃度変化の検出	40
4 展望	43
謝辞	45
参考文献	46
業績	52

序論

細胞は、生命の維持のために常にエネルギーを消費している。グルコースはそのエネルギーの供給源として、重要な役割を有している。ヒトを含む多くの動物ではグルコースは食事から摂取され、主に血液を介して全身の細胞内に送り込まれる。その後、細胞内で代謝されることで必要なエネルギーを生み出している。グルコースの代謝は、組織や細胞の種類によって異なっており、特に脳や筋肉ではグルコース消費量が大きい。植物では、葉緑体にて光合成によりグルコースを生産しており、ヒトと同様に生命維持のエネルギー源として利用している。

安定したグルコース供給は生命活動の維持に直結し、その乱れは個体に様々な異常を来す。糖尿病はグルコース供給に関する代表的な疾患である。糖尿病では、グルコースの取り込みを促進するホルモンであるインスリンの分泌量、もしくはインスリンに対する応答性が減少することで、血糖値が慢性的に高く維持される。これにより、血管や脳においてグルコースが過剰に取り込まれることで酸化ストレスが生じ、様々な合併症の原因となる¹。また、低血糖状態は細胞のエネルギー不足の原因となり、細胞損傷につながることが示唆されている²。さらには、がん細胞はグルコースを過剰に取り込む性質を有しており、それにより異常な代謝を可能にして、腫瘍の成長が促進されることが知られている³。個体におけるグルコース供給の意義は細胞活動と結びつけて理解する必要があり、その目的の上では、細胞にてグルコース濃度がどのように変動しているのかを知る必要がある。

細胞内分子の変動を調べる方法として、蛍光タンパク質や生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）を基盤とした遺伝的にコードされたタンパク質センサーの利用がある。蛍光タンパク質は、外部からの光（励起光）を吸収しその一部のエネルギーを光（蛍光）として放出する性質をもつ。これまで、オワンクラゲから単離された緑色蛍光タンパク質 GFP をはじめとして様々な波長の蛍光を発する蛍光タンパク質が発見、開発されている⁴⁻⁶。これらの蛍光タンパク質を用いることで、生きたまま細胞の構造や特定のタンパク質を標識することができになり、その動態を観察することができる。さらに、特定の分子と結合することで立体構造が変化するタンパク質と組み合わせることで、標的物質の有無により蛍光強度や蛍光波長が変化するセンサーが開発されている⁷。一方、ルシフェラーゼは、蛍光タンパク質とは異なりルシフェリンと呼ばれる生物発光基質を酸化した際に生じるエネルギーの一部を光として放出する。ルシフェラーゼも様々な生き物から単離及び開発されており、蛍光タンパク質と同様に生体イメージングやセンサーへ応用されている⁷⁻¹¹。

励起光は照射範囲やタイミングを調節できるため、時空間的な制御を必要とする観察を行う場合には、蛍光観察が適している。一方で、励起光は蛍光タンパク質以外の物質にも

吸収され自家蛍光や光毒性などの原因となるため、それらの影響を回避した条件としては、生物発光による観察が適している。このように蛍光と生物発光はそれぞれ特性が異なることから、観察対象や観察条件に応じて使い分けることが理想的である。グルコースの場合、蛍光センサーの開発が先行しているが、光合成によるグルコース合成など励起光の影響が無視できない環境での観察が求められる場合があった。そこで、本研究では今まで開発されていなかった生物発光グルコースセンサーの開発を行い、蛍光観察では正確な評価が困難な環境下でのグルコース濃度の変動を検出することで、開発したセンサーの有用性を確かめた。

1 生物発光グルコースセンサーLOTUS-Glc の開発

1.1 背景

1.1.1 細胞におけるグルコースの役割

細胞で最も一般的なエネルギー源の一つであるグルコースは、細胞の成長、細胞分裂、恒常性維持などに必要不可欠である¹²。哺乳類細胞では、グルコースは細胞外部から取り込まれグリコーゲンとして保存される。植物細胞は、光合成により空気中の二酸化炭素からグルコースを合成し、葉緑体にデンプンとして保存している。細胞内に取り込まれたグルコースは、解糖系や酸化的リン酸化といった反応を経ることで ATP を合成し、ATP が細胞内の様々な反応のエネルギーとして機能している。ATP は細胞がエネルギーとして即座に利用できる分子であるのに対し、グルコースは、エネルギーの供給源として機能している。また、グルコースは単なるエネルギー源にとどまらず、生体分子の原料としても重要である。例えば、ペントースリン酸経路を介して核酸の前駆体であるリボース-5-リン酸を供給し、脂質やアミノ酸の合成にも寄与している。さらに、細胞内の酸化ストレスを抑制する NADH の供給源ともなり、細胞の酸化還元状態とも関係している。加えて、グルコースは単なる代謝基質ではなく、細胞の代謝状態を感知するシグナル分子としても機能する。膵臓の β 細胞は血中グルコース濃度の変化を感知し、インスリンの分泌を調節することで細胞のグルコース取り込み活性を制御している¹³。また、細胞内のグルコースレベルは AMPK や mTOR 経路を介して細胞の成長や代謝調節にも影響を与えており¹⁴。さらに、グルコースは活性酸素種のスキャベンジャーやシグナル分子としての機能も有しており、その役割は多岐にわたる^{12,15,16}。

1.1.2 既存のグルコース濃度の測定方法

細胞でのグルコースの役割を理解する上では、環境の変化や細胞活動に応じた細胞内グルコース濃度の変動を知ることが重要であり、これまで様々な検出方法が開発されてきた。放射性同位体ラベルを施したグルコースを添加し、その蓄積からグルコースの取り込み活性を測定する方法、グルコースオキシダーゼとグルコースの反応から生じるキノン色素の蓄積による吸光度変化で細胞内グルコース濃度を測定する方法などがある^{17,18}。これらの方法では、グルコース濃度の増加は測定可能であるが、減少は測定することができない。

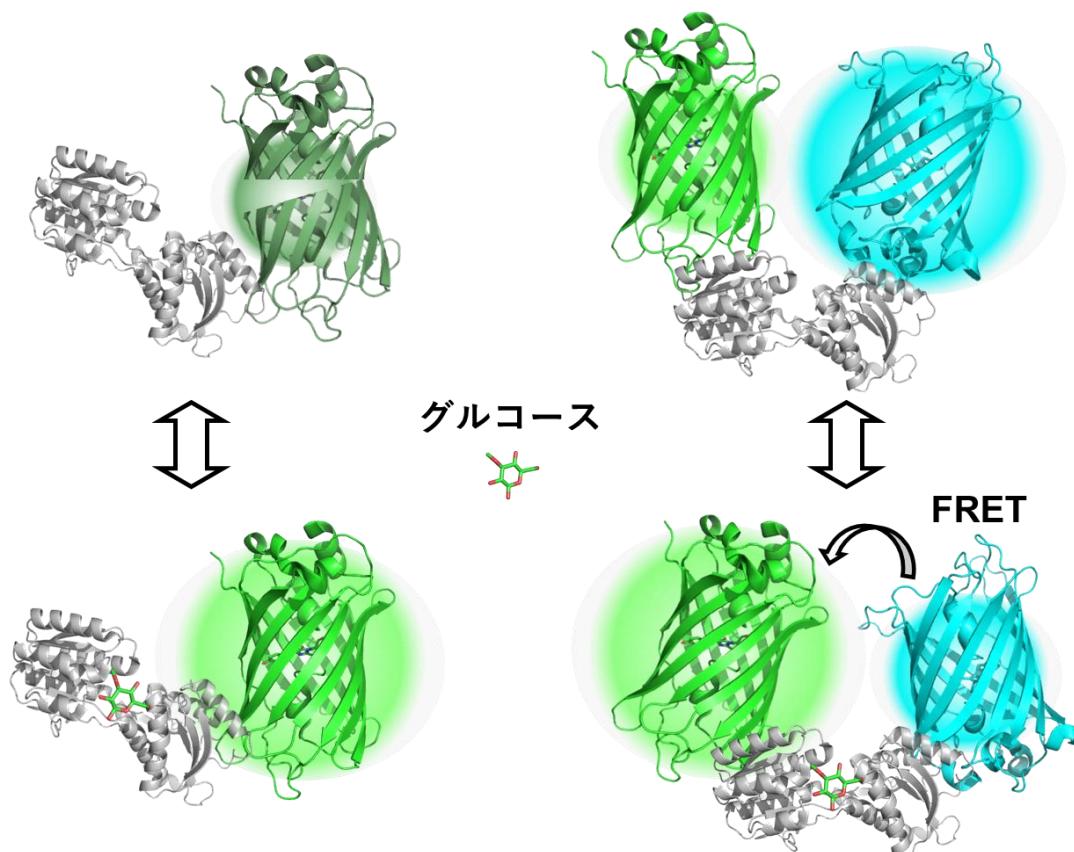
減少を含めたグルコース濃度の変動を測定する方法としては、蛍光タンパク質を基盤とした遺伝子組み込み型の蛍光グルコースセンサーを使用する方法が報告されている¹⁹⁻²²。蛍光グルコースセンサーは、グルコース存在下で蛍光強度が変化する種類と蛍光波長が変化する種類（レシオメトリック）がある¹⁹⁻²²（図1-1）。前者は、蛍光タンパク質の途中にグルコース結合タンパク質を挿入することで、グルコースの結合の有無により蛍光タンパク質の吸収スペクトルやモル吸光係数が変化し、蛍光強度が変化する。後者は、蛍光波長の異なる蛍光タンパク質二種とグルコース結合タンパク質を融合させ、グルコースの結合による立体構造の変化によってドナーからアクセプターへのFRET（Förster Resonance Energy Transfer）効率が変化することで蛍光波長が変化する。蛍光グルコースセンサーに組み込まれているグルコース結合タンパク質の構造変化は可逆的であるため、グルコース濃度の増加と減少を検出することが可能である。しかしながら、蛍光センサーの測定の際に照射する励起光は、NADHやクロロフィルといった生体内分子から自家蛍光を生じさせるため、蛍光センサーのシグナルに対するノイズとなる。また、励起光による光毒性が細胞活動に与える影響も無視できない。近年、光刺激による細胞操作から特定の生命現象を誘導するオプトジェネティクスの技術開発が盛んになっている²³。このオプトジェネティクスに対しては、蛍光観察の励起光が光刺激と重複しないよう考慮する必要性があり、両者を同時に利用する場合には制限が生じる。

1.1.3 生物発光を利用したセンサー

励起光による影響が無視できない観察対象や観察条件では、生物発光センサーによる観察が求められる。例えば、ルシフェラーゼとルシフェリンの反応は特異的であり、蛍光と比較すると生物発光のノイズは小さくなる。このことから、植物細胞に含まれるクロロフィルのように高い自家蛍光を示す分子を含む細胞においては、生物発光による観察が適している。さらに、薬剤スクリーニングのようなハイスループットな解析が求められる場面では自家蛍光の低さから、生物発光センサーによるスクリーニングが行われている²⁵。また、光合

成のように光依存的に細胞内環境を変化させる現象やオプトジェネティクスを使用する場面においては、光刺激と観察を独立して行う必要があるが、生物発光により観察を行う事でそれを可能にしている。

ルシフェラーゼは、蛍光タンパク質間の FRET と同様に、自身をドナー、蛍光タンパク質をアクセプターとしてすることで Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) を起こすことが可能である。そのため、蛍光センサーと同様に BRET 効率の変化を検出原理として、様々なレシオメトリックな生物発光センサーが開発されている²⁶⁻²⁹。この BRET を利用し、私はレシオメトリック生物発光グルコースセンサーを開発した。



蛍光強度が変化する蛍光センサー（左）。レシオメトリックな蛍光センサー（右）。灰色部分は、グルコース結合タンパク質。シアン色部分は、シアン色蛍光タンパク質。緑色部分は、緑色蛍光タンパク質。グルコースの結合による立体構造変化により、可逆的に蛍光強度または FRET 効率が変化する。

1.1.4 精製タンパク質による特性評価

細胞中のグルコース濃度変動を検出するためには、その変動に適した K_d 値を有するセンサーであることが重要である。加えて、細胞内にはグルコースのみならず様々な物質が存在しており、細胞内環境も刻々と変化している。したがって、細胞内センサーのシグナル変化を正確に評価するためには、ネガティブコントロールを含め、開発するセンサーのグルコースに対する特異性や発光波長変化の程度（ダイナミックレンジ）などの各種特性を調べておく必要がある。先行の蛍光グルコースセンサーおよび私が開発した生物発光グルコースセンサーに使用されているグルコース結合タンパク質 MgIB は、元々グルコースとガラクトースに結合するタンパク質として報告されており、既存の蛍光グルコースセンサーもガラクトースに対する応答性を有している^{19,20,30}。そのため MgIB をセンサーに組み込む場合には、ガラクトースおよび他の糖や、グルコースと構造が似ているグルコース代謝産物に対する応答性も確認する必要がある。

1.2 目的

私が開発した生物発光グルコースセンサーでは、ダイナミックレンジに影響を与えるリンカー領域を見出していた。しかしながら、そのアミノ酸配列を比較し選抜する効果的な方法が確立していなかったため、リンカーの最適化を行うことができていなかった。本章では、生物発光グルコースセンサーのダイナミックレンジの向上を目的とし、発光波長変化を指標としたスクリーニング手法を確立することでリンカーの最適化を行う。また、細胞観察の際にネガティブコントロールとして利用できる変異体を作製する。開発したセンサーの精製タンパク質を用いてダイナミックレンジ、特異性、その他パラメーターを測定し、細胞内にて機能し得る性能を有するのかを評価する。

1.3 実験方法と実験材料

プラスミド作製

PCR により各遺伝子を増幅して生物発光グルコースセンサーの発現プラスミドを作製した。PCR で使用したプライマーは北海道システムサイエンスから購入した。大腸菌用発現プラスミドは、pRSET_B (Thermo Fisher Scientific) を基盤に作製した。PCR のテンプレートには、pcDNA3.1_FLII12Pglu-700μΔ6 (Addgene plasmid #17866) および人工合成した nanoKAZ³¹ を使用した。PCR は KOD-Plus (Toyobo Life Science) を使用して行った。PCR のサーマルサイクルの条件は表 1-1 に示す。使用したプライマーの配列は付録表に示す。pRSET_B は、制限酵素 *Bam*HI (タカラバイオ) を用い、37°Cで 1 時間反応させることで制限

酵素処理を行った。PCR 産物および制限酵素処理後の pRSET_B の塩基配列の長さをアガロースゲル電気泳動で確認した後、QIAEX II Extraction Kit (QIAGEN) を用いて目的 DNA 断片の抽出および精製を行った。PCR 産物とプラスミドは Hot Fusion 法にて環状化させ、大腸菌の形質転換に使用した³²。使用した pre-assembly buffer および Hot Fusion buffer の組成は付録表に示す。プラスミド溶液 2 μL、PCR 産物溶液 2 μL と 2 × Hot Fusion buffer 4 μL を混合し、50°Cで 30 分間インキュベーションした。反応液 2 μL を氷上で融解させた大腸菌コンピテントセル (XL10-Gold) 50 μL に加えて 10 分間氷上で静置させた。その後、42°Cで 45 秒間ヒートショックを行い氷上で 3 分間静置したのち、50 μg/mL アンピシリン含有の LB 寒天培地に塗布して、37°Cで 16 時間培養することで形質転換した大腸菌コロニーを得た。

サイクル数	温度	時間
1	94°C	2分
	94°C	15秒
30	55°C	30秒
	68°C	1分/1kbp
1	68°C	5分

表 1-1. PCR のサーマルサイクルの条件

リンカーライブラーの作製

生物発光グルコースセンサーのリンカー部分を最適化するためのスクリーニング用の DNA ライブラーは PCR にて作製した。リンカー領域の塩基配列を NNK (N は A、T、G、C のいずれか、K は T もしくは G) で設計したプライマーで増幅し、上記と同様の方法で環状プラスミドを作製した。使用したプライマーの配列は、付録表に示す。作製したプラスミドを用いて大腸菌 JM109 (DE3) を形質転換し、50 μg/mL アンピシリン含有の LB 寒天培地に植菌した。

大腸菌からのプラスミド抽出

形質転換した大腸菌のコロニーを爪楊枝でつつき、50 μg/mL アンピシリン含有の LB 液体培地 2.0 mL に懸濁して 37°Cで一晩振盪培養した。菌体溶液を回収し、遠心分離後 (14,000 rpm, 1 分間, 4°C) 上清を除去した。Solution I (50 mM Tris (pH 8.0)、10 mM EDTA、100 μg/mL RNaseA) 150 μL を加えボルテックスで菌体を懸濁し、Solution II (0.2 M NaOH, 1% SDS) 150 μL を加え転倒混和した。さらに Solution III (2 M CH₃COOH, 3 M CH₃COOK (pH5.5)) 150 μL を加え転倒混和し、クロロホルム 150 μL を加え遠心分離 (14,000 rpm, 5 分間, 4°C) を行った。上層 400 μL を新しい 1.5 mL チューブに移して 100 %エタノール

800 μ L を加え、遠心分離 (14,000 rpm, 5 分間, 4°C) により DNA を沈殿させた。上清を取り除き、70%エタノール 400 μ L を添加し、遠心分離後 (14,000 rpm, 2 分間, 4°C) 液体成分を除去した。室温で 15 分間乾燥させた後、50 μ L の超純水に溶解させた。

ライブラリーからのスクリーニング

スクリーニングには、大腸菌コロニーおよび菌体破碎液を使用した。リンカーライブラリーを用いて形質転換した大腸菌コロニーJM109 (DE3) を用意した。爪楊枝にて各コロニーを別の LB 寒天培地に植菌し、一枚当たり約 100 個のコロニーを整列させた。Amersham Hybond-N+ (Cytiva) を用いてコロニーを写し取り、空のプレートに置いた。その上からアガロース溶液 (10 μ M セレンテラジン-h (和光純薬) 、5 % アガロース-S) を 25 mL 添加し、コロニー全体を均一に覆った。アガロースが固まる前に一回り小さいプレートの蓋を使い整列させたコロニー部分に窪みを作り、アガロース溶液が固った後、窪みにグルコース溶液 (10 μ M セレンテラジン-h、100 mM グルコース) を 10 mL 添加した (図 1-2 A)。その後、二種類のフィルター (Cyan: 465/30, Green: 535/50 (Semrock)) を通して CCD カメラ (QIClick, QImaging) で発光像を撮影した (図 1-2 B)。撮影はグルコース溶液添加直後と、添加後 1 時間に行った。取得した画像を基に、各フィルタ下での発光強度から、それぞれの時間でのレシオ値 (Green/Cyan) をコロニーごとに計算した。画像処理には ImageJ を使用した。レシオ値の変化率が高いコロニーについては、元のプレートから該当するコロニーを爪楊枝でつつき、100 μ g/mL カルベニシリン含有の LB 液体培地 2.0 mL に懸濁し、23°Cで 60 時間振盪培養した。遠心分離 (14,000 rpm, 10 分間, 4°C) で菌体を回収し、上清を取り除いた。回収した菌体ペレットに PBS 2.0 mL を加え、ピペッティングで懸濁した。菌体を超音波ホモジナイザー (セントラル科学貿易) にて破碎し、遠心分離 (14,000 rpm, 5 分間, 4°C) を行い上清を回収した。上清に終濃度 100 mM になるようにグルコースを加え、マルチチャネル分光器 (PMA-12, 浜松ホトニクス) を用いて発光スペクトルを測定した。発光スペクトルから、グルコース非存在下から存在下へのダイナミックレンジを計算した。ダイナミックレンジの高いコンストラクトに関しては、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies) を使いリンカー部分の DNA 配列を解読した。

大腸菌からのタンパク質精製

タンパク質発現プラスミドを用いて形質転換した大腸菌 JM109 (DE3) を 50 μ g/mL アンピシリン含有の LB 寒天培地に植菌した。その後、シングルコロニーを爪楊枝でつつき、100 μ g/mL カルベニシリンを含む LB 液体培地 200 mL に懸濁し、23°Cで 60 時間振盪培養した。培養した菌体を遠心分離 (8,000 rpm, 10 分間, 4°C) で回収し、上清を取り除いた。菌

体ペレットに PBS 10 mL を加え、ピペッティングで懸濁した。菌体をフレンチプレス (Thermo Fisher Scientific) にて破碎し、遠心分離 (14,000 rpm, 10 分間, 4°C) をを行い上清を回収した。上清に含まれている His タグが付加された目的タンパク質に対して、Ni-NTA レジン (QIAGEN) とイミダゾール/TN バッファー (2 M Imidazole, 5 M NaCl, 1 M Tris buffer (pH 7.4)) を使いアフィニティ精製を行った。さらに、PD-10 カラム (GE Healthcare) によりゲルろ過を行い、イミダゾールの除去と 20 mM HEPES (pH 7.4) へのバッファー置換を行った。

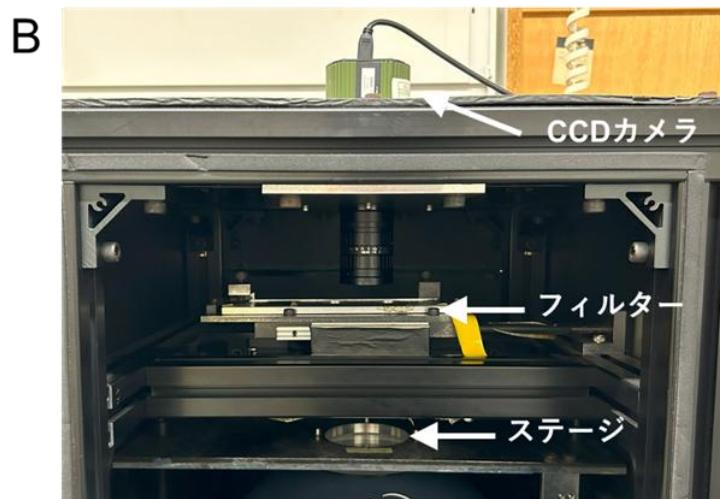
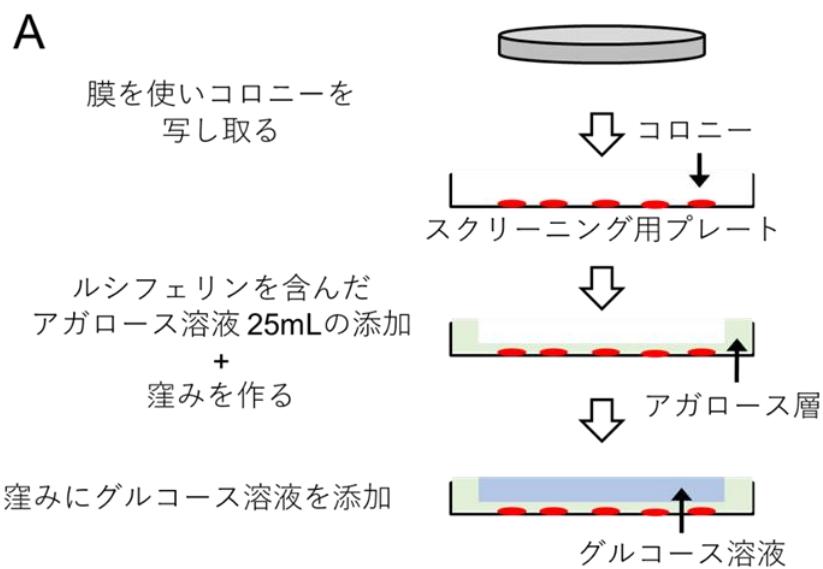


図 1-2. 大腸菌コロニーのスクリーニングの概要

- A. アガロースを用いた大腸菌コロニーのスクリーニングの工程。アガロース溶液添加後、固まる前に小さいプレートで窪みを作製した。グルコース溶液は、窪みに添加した。
- B. 大腸菌コロニーの発光像撮影システム。グルコース溶液添加後、ステージ上に大腸菌プレートを置き、フィルターを変えながら CCD カメラで撮影を行った。

蛍光および発光スペクトルの測定

グルコースが任意の終濃度になるようにグルコース溶液を加えた、菌体破碎液の上清もしくはセンサーダンパク質溶液 100 μ L に 5.0 μ M のセレンテラジン-h 溶液 100 μ L を加え、マルチチャネル分光器を用いて発光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは、センサーダンパク質溶液とグルコース溶液を混合し、蛍光分光光度計 (F-7000, HITACHI) を用いて励起波長 435 \pm 5 nm にて測定を行った。得られた蛍光および発光スペクトルは、480 nm での蛍光および発光強度で規格化を行った。

特異性と親和性の評価

センサーの特異性の評価では、センサーダンパク質の終濃度を 100 nM、グルコース、スクロース、フルクトース、ガラクトース、グルコース-1-リン酸およびグルコース-6-リン酸の終濃度を任意の濃度になるようにそれぞれ調製した。各サンプル 100 μ L に 5.0 μ M のセレンテラジン-h 溶液 100 μ L を加え、マルチチャネル分光器を用いて発光スペクトルを測定した。 K_d 値は、グルコースおよびガラクトースの終濃度が 1 nM から 100 mM までの間で計測した値を使用し、Origin7 software (LightStone) にてフィッティングを行い計算した。MglB はグルコースに対して单一結合部位を持つため³⁰、y を発光強度のレシオ値 (530/480 nm)、x をグルコース濃度 (μ M)、start をグルコースが存在しない時のレシオ値、end をグルコースが過剰に存在する時のレシオ値とし、以下の式にてフィッティングを行った。

$$y = \text{start} + \frac{(\text{end} - \text{start}) \log_{10} x}{K_d + \log_{10} x} \quad (1-1)$$

pH 依存性の評価では、pH 7.0, 7.4, 7.8 については 20 mM HEPES、pH 6.0 から 9.0 については 30 mM クエン酸ナトリウムと 30 mM ホウ酸ナトリウムを含むバッファー、pH 10.0 については 30 mM CHES にセンサーダンパク質を混合し、発光スペクトル測定を行った。

1.4 結果と考察

1.4.1 スクリーニング法の確立

博士前期課程では、レシオメトリック生物発光グルコースセンサーを二種類開発した。一つ目は、蛍光タンパク質 Citrine³³ とルシフェラーゼ nanoKAZ³¹ をグルコース結合ドメイン MgIB³⁰ で連結した「nKZ」（図 1-3 A, C）、二つ目は、蛍光タンパク質 Citrine と ECFP³⁴、 nanoKAZ および MgIB を連結した、リンカー部分のアミノ酸配列が異なる「LH」および「PY」である（図 1-3 B, D）。

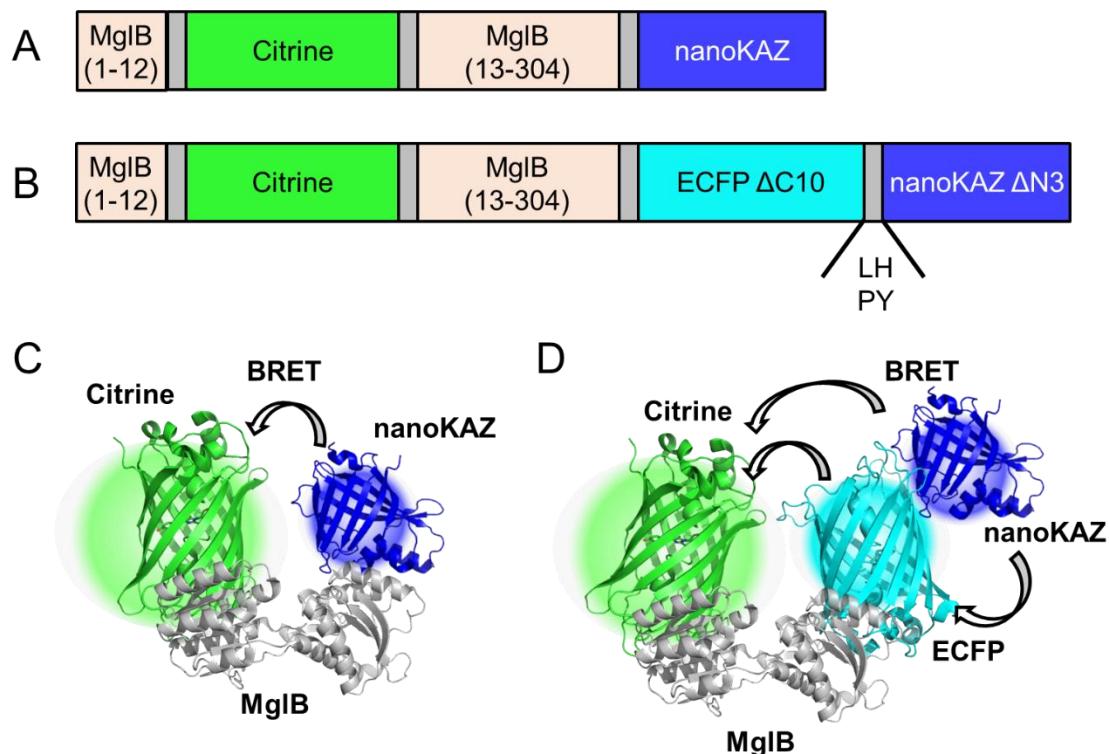


図 1-3. 開発済みの生物発光グルコースセンサー

A, B. 生物発光グルコースセンサーのアミノ酸配置 (A: nKZ, B: LH 及び PY)。MgIB における数字は、アミノ酸配列の番号を示す。C, D. 生物発光グルコースセンサーの模式図 (C. nKZ, D. LH 及び PY)。MgIB にグルコースが結合することで可逆的に BRET 効率が変化し、発光色が変化する。

ECFP と nanoKAZ を繋ぐリンカーのアミノ酸は、それぞれ Leu-His (LH) および Pro-Tyr (PY) である。nKZ では、BRET となるペアは一つであり、LH および PY では、蛍光タンパク質同士およびそれぞれの蛍光タンパク質と nanoKAZ との三つの BRET ペアがある。nKZ と LH および PY のダイナミックレンジを比較した結果、nKZ よりも LH および

PYの方が高く、PYはLHの3倍以上であった(図1-4、表1-3)。このことから、ECFPとnanoKAZを繋ぐリンカー部分はダイナミックレンジに大きな影響を与えると考えられるため、そのリンカーのアミノ酸配列の最適化を行った。

最適な配列を効率よく選抜するために、ランダムにアミノ酸を配置したリンカーライブライマーを作製しスクリーニングを行った。リンカーライブライマーは、すべてのアミノ酸の組

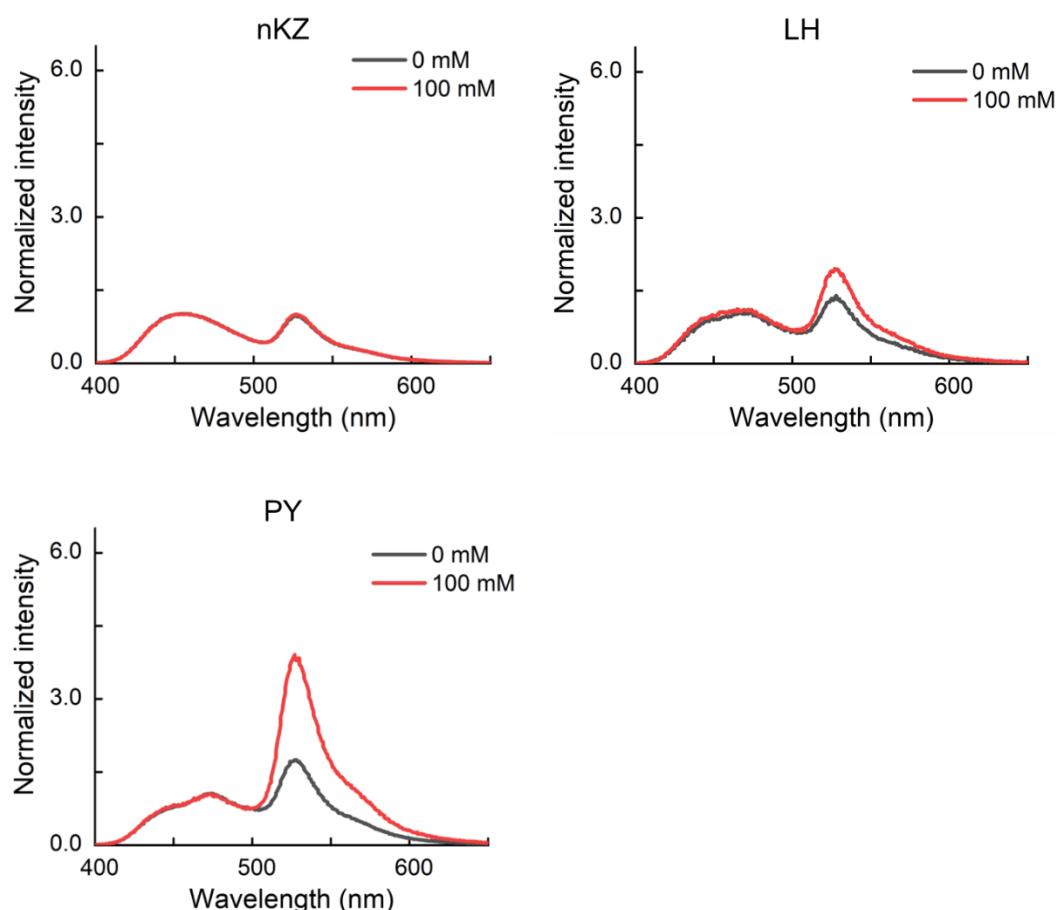


図1-4. 開発済みの生物発光グルコースセンサーの発光スペクトル

精製タンパク質の発光スペクトルをグルコース(100 mM)の有無で計測した。nKZの結果は、460 nmにおける発光強度で規格化を行った。LHとPYの結果は、480 nmにおける発光強度で平均化を行った。

	ダイナミックレンジ(%)
nKZ	4.2±1.4
LH	36.7±1.3
PY	122.7±5.6

表1-3. 開発済みの生物発光グルコースセンサーのダイナミックレンジ

み合わせを取り得るランダムな人工合成プライマーを基に作成した。ランダムなプライマーに含まれる塩基配列の確率はすべて等しくポアソン分布に従うと仮定し、全ての組み合わせに対する網羅率 P_i 、ライブラリーサイズを V とすると、網羅率 P_i を達成するために調べる必要がある変異体の数 T を表した式が以下になる³⁵。

$$T = -V \ln (1 - P_i) \quad (1-2)$$

式 1-2 の両辺を V で割り、 T/V をオーバーサンプリング係数 Q_f と定義する（式 1-3）。 Q_f は、 P_i を達成するためにどれくらいの数の形質転換体をスクリーニングする必要があるかの指標になる。

$$Q_f = \frac{T}{V} = -\ln(1 - P_i) \quad (1-3)$$

式 1-3 より 95% の網羅率 ($P_i=0.95$) を実現するには、ライブラリーサイズの約 3 倍の数の変異体 ($Q_f \approx 3$) を調べる必要がある。リンカーのアミノ酸数は 1 もしくは 2 とし、1 アミノ酸に対する塩基配列は NNK と設定した。N は A、T、G、C のいずれかの塩基であり、K は T もしくは G である。したがって、塩基配列 NNK が取り得る組み合わせは 32 ($4 \times 4 \times 2$) 通りである。リンカー部分が 1 アミノ酸の場合、ライブラリーサイズは 32 となり約 100 個の変異体を調べる必要がある。リンカーが 2 アミノ酸の場合は、ライブラリーサイズが 1,024 (32×32) となり、約 3,000 個の変異体が解析対象となる。このような多数の変異体を効果的に評価するため、大腸菌コロニーを対象としたスクリーニング手法の確立を試みた。

発光強度はルシフェリンの添加直後から減衰し、その減衰速度はルシフェラーゼおよびルシフェリンの濃度によっても変化する。今回はレシオメトリックなセンサーであるため、センサータンパク質の発現量やルシフェリン濃度の局所的な違いなど、発光強度が変化する状況でもその影響を受けにくい定量的なスクリーニングが可能であると考えた。また、大腸菌は細胞膜にグルコース輸送体を有しており、外部からグルコースを添加することで菌体内グルコース濃度が上昇する²²。したがって、センサーが発現している大腸菌コロニーにグルコースを添加することでスクリーニングが可能である。

スクリーニングでは、グルコース添加前後それぞれについて生物発光のレシオ値 (Green/Cyan) を取得し、その変動率が大きいものを選抜する。レシオ値の変動を検出するためには、センサーがグルコースと反応する前にルシフェリンを添加しておく必要があるが、大腸菌コロニーをルシフェリン溶液やグルコース溶液に浸した場合、コロニーの崩壊が起こるため正確な評価が困難になる。そこで、アガロースによるルシフェリン添加手法を考案した（図 1-2A）。高濃度のアガロース溶液とともにルシフェリンを添加することで、コロニーの崩壊を防ぎつつ発光反応を起こすことが可能になる。さらに、アガロース層の上か

らグルコース溶液を添加することで、時間経過とともにグルコースがアガロース層を透過して大腸菌コロニーに到達し、グルコース添加後のレシオ値の測定が可能になる。

ダイナミックレンジの異なるセンサー (nKZ, LH, PY) を指標として、この方法の定量性を検証した。まずルシフェリンを含むアガロース溶液を添加し、アガロースが固まった後にグルコース溶液を添加して、添加後直後 (0 min) と添加後一時間 (60 min) に二つのフィルター (Cyan, Green) を通してコロニーの発光像を撮影した。得られた画像から各コロニーでのレシオ値 (Green/Cyan) の変動率 (60 min/0 min) を計算したところ、精製タンパク質により計測されたダイナミックレンジと相関が確認された (図 1-5, 表 1-4)。この結果から、アガロースによるスクリーニング手法は、ライブラリースクリーニングに有効であると判断した。

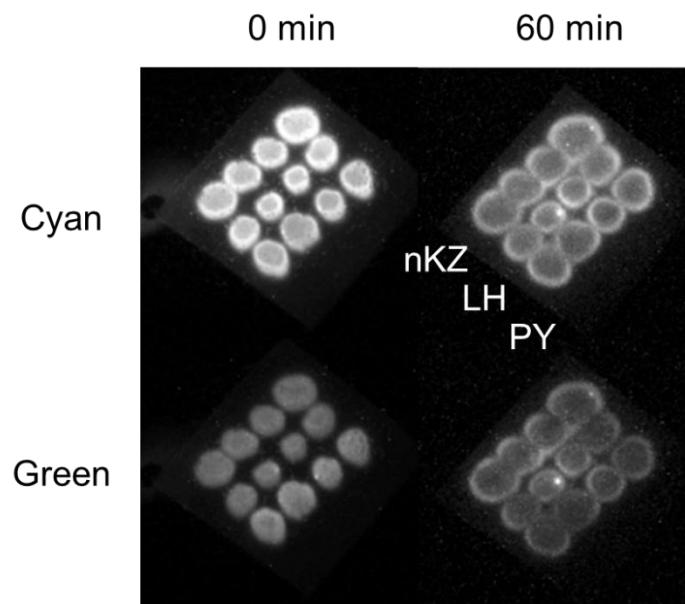


図 1-5. 大腸菌コロニーの発光像

Cyan (465/30 nm), Green (535/50 nm) のフィルターを通して発光像を取得した。
それぞれのセンサーについて 4 つずつコロニーを作製し配置した。

変動率 (60 min/0 min)	
nKZ	0.685 ± 0.01
LH	0.731 ± 0.04
PY	1.125 ± 0.10

表 1-4. コロニーの発光像から計算したレシオ値の変動率

1.4.2 スクリーニングの結果

確立したスクリーニング手法によりリンカーのスクリーニングを行った。スクリーニングに使用したコロニーの画像を図 1-6 に示す。1 回のスクリーニングで約 100 個のコロニーを調査することが可能であり、合計 31 回のスクリーニングを行った。各回のスクリーニングにて変化率が高かったコロニーを選抜し、菌体破碎液を使って改めてレシオ値の変動率を測定し、最終的に候補株のリンカー配列の決定に至った。リンカーが 2 アミノ酸の場合には 2,950 個のコロニーを調べ、そのうち 32 個は菌体破碎液での測定を行った。リンカーが 1 アミノ酸の場合には 91 個のコロニーを調査し、そのうち 5 個を菌体破碎液で測定した。それぞれのリンカーの中でダイナミックレンジが高かった変異体の生物発光スペクトルとダイナミックレンジを示す（図 1-7, 表 1-5）。結果として、リンカーアミノ酸配列として Pro-His が組み込まれたものが最も高いダイナミックレンジを示し、このセンサーを LOTUS-Glc (Luminescent Optical Tool for Universal Sensing of Glucose) と名付けた。

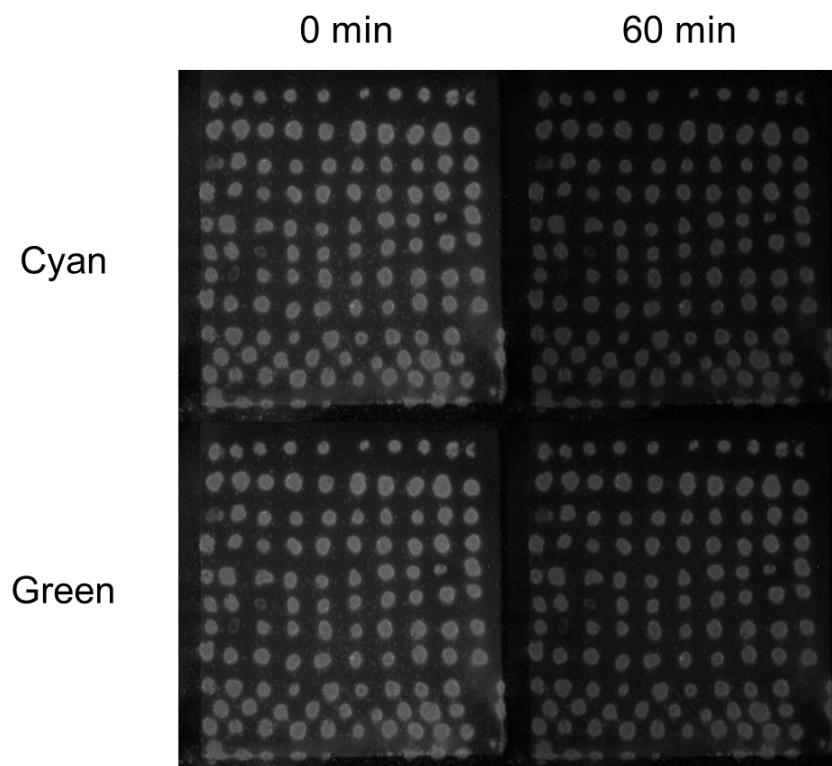


図 1-6. 実際のスクリーニングにおけるコロニーの発光像

Cyan (465/30nm), Green (535/50 nm) のフィルターを通して発光像を取得した。
一回の撮影で約 100 個のコロニーを撮影した。

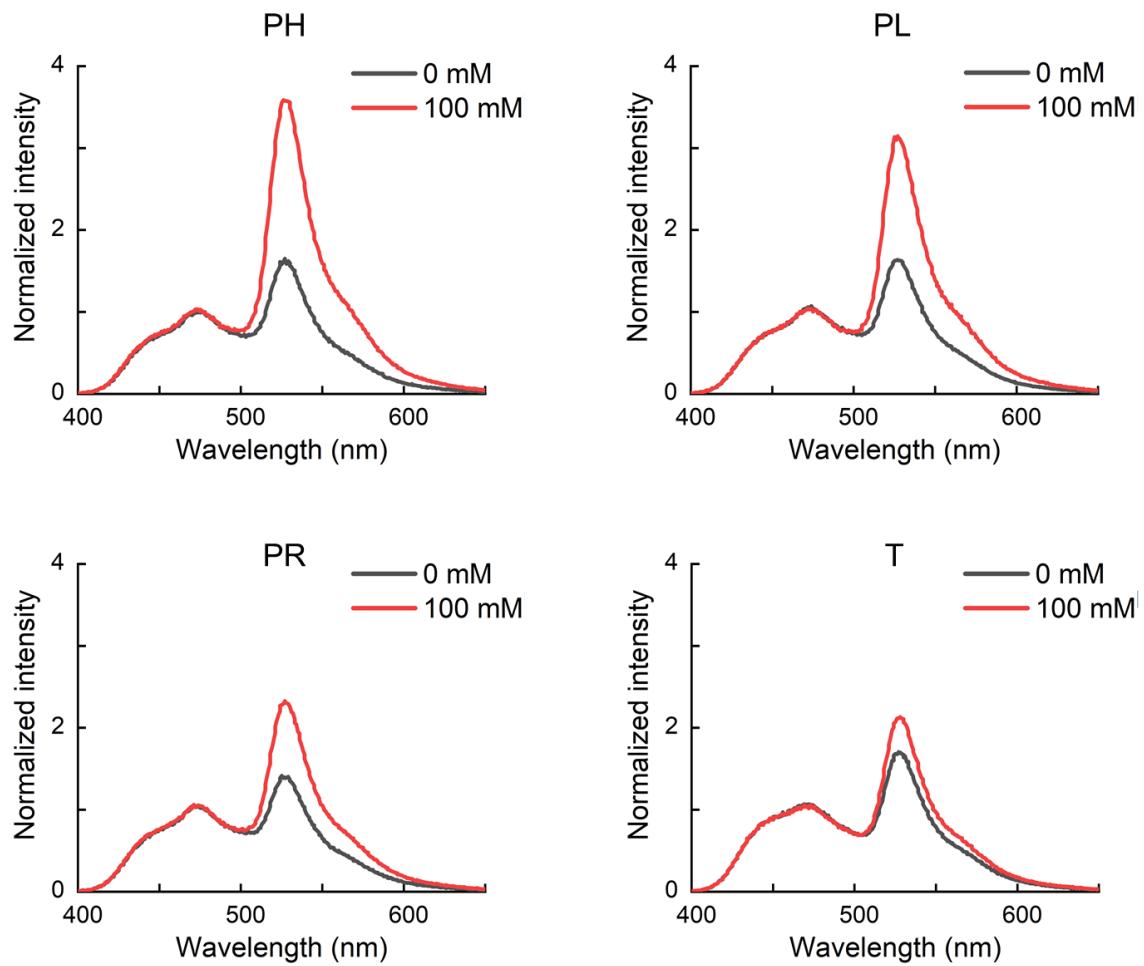


図 1-7. 菌体破碎液の発光スペクトル

スペクトル上部にリンカーアミノ酸配列を示す。480 nm における発光強度で規格化を行った。

リンカーアミノ酸 ダイナミックレンジ(%)	PH	PL	PR	T
125.4	125.4	65.6	91.8	25.6

表 1-5. 菌体破碎液のダイナミックレンジ及びリンカー部分のアミノ酸

1.4.3 ダイナミックレンジ

先行研究より、グルコース結合タンパク質 MgIB の D236A は、グルコースと二か所の水素結合を形成している³⁰ (図 1-8)。このアミノ酸をアラニンにすることでグルコースへの結合が弱くなることが報告されていることから³⁶、MgIB のアミノ酸配列に D236A の変異を導入したネガティブコントロール LOTUS-Glc (D236A) を作製した。LOTUS-Glc および LOTUS-Glc (D236A) をそれぞれ大腸菌精製タンパク質として調製し性能評価を行った。LOTUS-Glc は、グルコースの添加により BRET 効率が変化し、発光色が変化する。精製タンパク質の発光スペクトルから LOTUS-Glc のダイナミックレンジを計算した結果、約 200% であった (図 1-9 A)。LOTUS-Glc (D236A) は、グルコースの添加による発光スペクトルの変化はほとんど見られなかった (図 1-9 A)。LOTUS-Glc は蛍光センサーとしても機能することから蛍光のダイナミックレンジを計算したところ、LOTUS-Glc は 144%、LOTUS-Glc (D236A) は 14% であった (図 1-9 B)。以上の結果より、LOTUS-Glc は生物発光と蛍光の両方でグルコースに明確な応答を示した。また、既存の蛍光グルコースセンサーである FLII12Pglu-700μΔ6 のダイナミックレンジは 36% であり (図 1-9B)、LOTUS-Glc は蛍光では約 4 倍、生物発光では 5 倍以上のダイナミックレンジの改善がなされた。

LOTUS-Glc は、蛍光よりも生物発光で大きいダイナミックレンジを示した。蛍光では ECFP-Citrine でのみ FRET が起きるが、生物発光では ECFP-Citrine の FRET に加え、ECFP-nanoKAZ および Citrine-nanoKAZ の BRET も起き、これらの変化の合計が生物発光でのダイナミックレンジとなる。したがって、生物発光でのダイナミックレンジが蛍光より大きくなった要因として、ECFP-nanoKAZ および Citrine-nanoKAZ の BRET 効率の変化が影響していると推察できる。

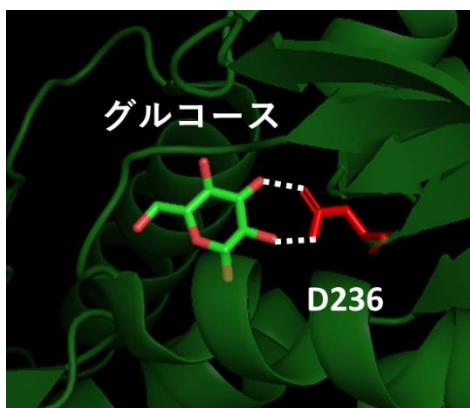


図 1-8. グルコース結合時の MgIB の立体構造

破線部分で水素結合を形成している。グルコース結合時の MgIB の立体構造情報は PDB (2GBP) から引用した。

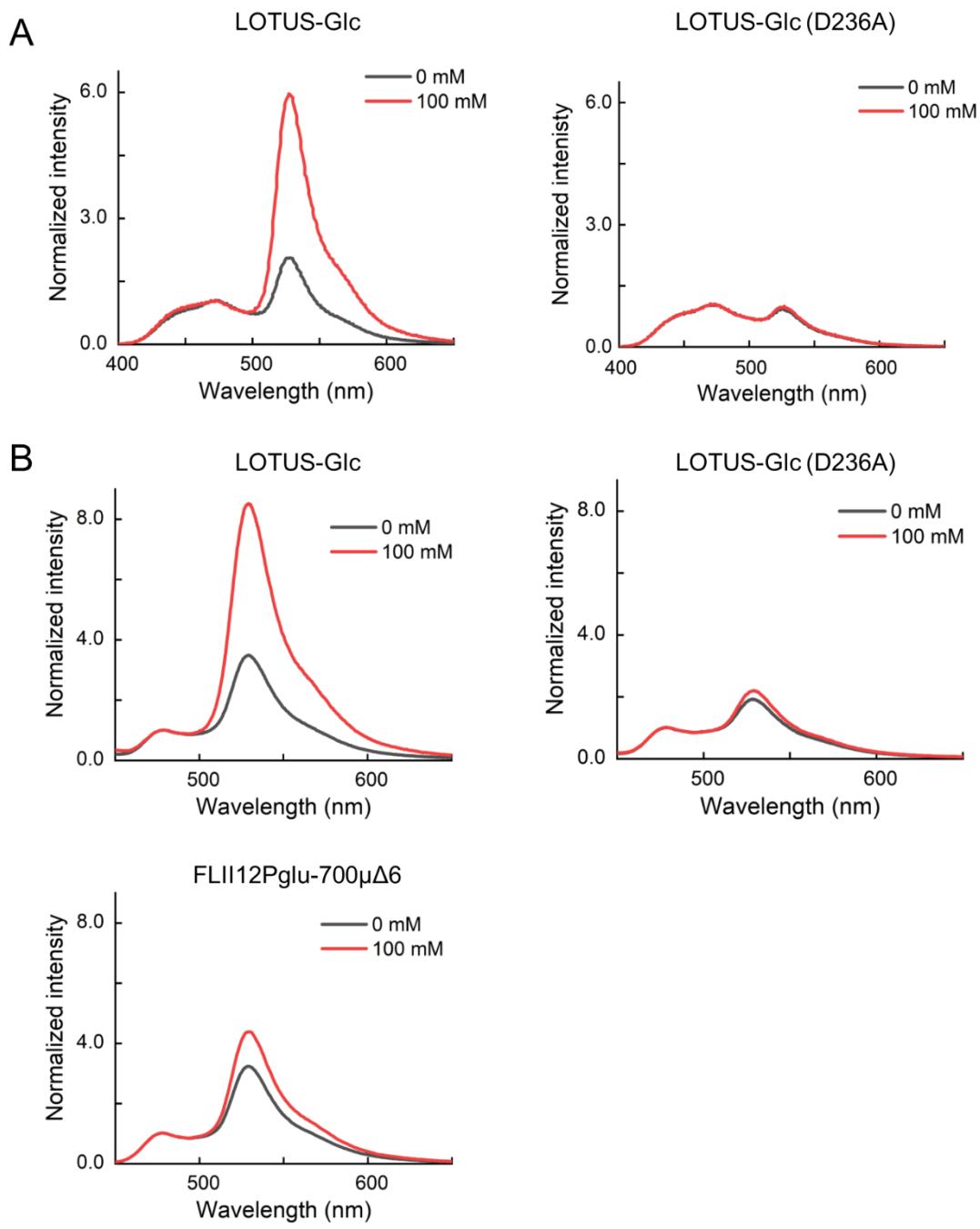


図 1-9. 精製タンパク質の発光および蛍光スペクトル

A. 発光スペクトル。480 nm における発光強度で規格化を行った。B. 蛍光スペクトル。励起波長は 435 ± 5 nm。480 nm における蛍光強度で規格化を行った。

1.4.4 親和性と特異性

既存の蛍光グルコースセンサーによる研究では、センサーの K_d 値が数百 μM から数 mM 程度であれば細胞内グルコース濃度の変動が検出されている¹⁹⁻²¹。LOTUS-Glc のグルコースに対する K_d 値は 1.1 mM であった（図 1-10 B）。したがって、LOTUS-Glc も細胞内グルコース濃度の変化が検出可能である。また MglB はガラクトースにも結合することから、グルコース以外の糖（ガラクトース、フルクトース、スクロース）およびグルコース代謝産物（グルコース-1-リン酸（G1P）、グルコース-6-リン酸（G6P））に対する応答性も併せて調査した。結果、LOTUS-Glc はグルコースとガラクトースに対して応答性を示した（図 1-10 A）。ガラクトースに対する親和性については、 K_d 値は 3.5 mM であった（図 1-10 B）。

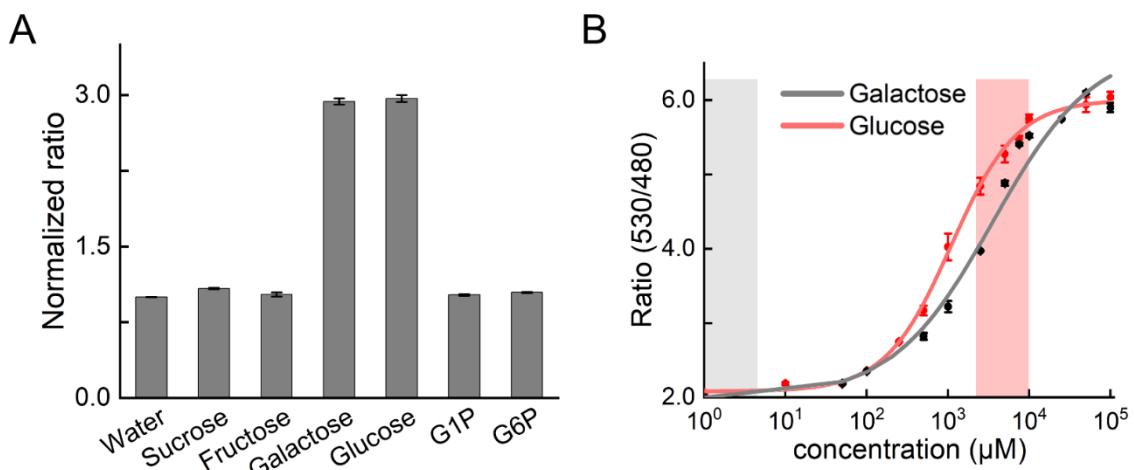


図 1-10. LOTUS-Glc の評価

A. LOTUS-Glc の特異性の評価。純水におけるレシオ値で平均化を行った。それぞれの化合物の最終濃度は 100 mM で評価を行った。B. LOTUS-Glc のグルコースとガラクトースに対するフィッティング曲線。フィッティングには、式 1-1 を使用した。灰色領域は血漿におけるガラクトース濃度の範囲を、赤色領域は血漿におけるグルコース濃度の範囲を示す。データは平均値 \pm 標準偏差を示す。

LOTUS-Glc によるグルコース検出時にガラクトースがシグナル変化に与える影響を検証するために、グルコースとガラクトースが混在している状態での発光スペクトルの変化を計測した。グルコース（Glc）とガラクトース（Gal）の合計濃度が 1 mM になるように混合したものを LOTUS-Glc と反応させ、そのレシオ値をグルコースのみの場合のレシオ値と比較した（図 1-11）。結果として、Glc : Gal = 990 : 10 の場合のレシオ値は、グルコースのみの場合と有意差はなかったが、ガラクトースの割合がそれ以上になると有意差が生じた。この結果より、細胞内にてガラクトース濃度がグルコース濃度の 1 % 以下であれば、ガ

ラクトースの影響を無視した測定が可能であると判断した。ヒトの血漿ではグルコース濃度は数 mM、ガラクトース濃度は数 μ M であると報告されており、ガラクトース濃度はグルコース濃度の 1%以下となっている^{37,38}。観察の主な対象とする培養細胞では、通常培養条件下においても同程度の濃度比であるとみなされるため、本研究ではガラクトースによるレシオ値への影響は限定的であると結論づけた。

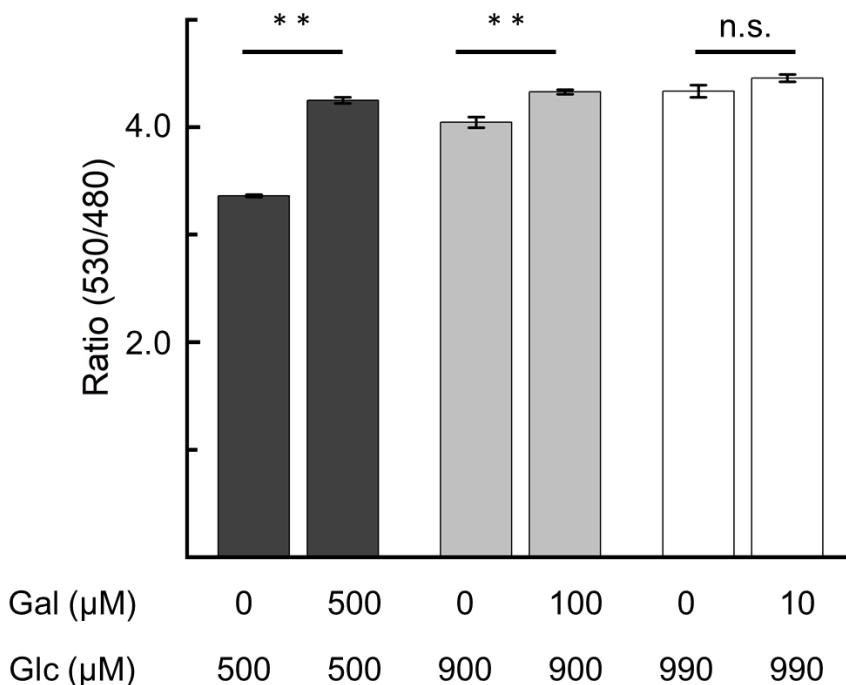


図 1-11. グルコースとガラクトースの混合状態での評価

データは平均値土標準偏差を示す。**: $p<0.01$, n.s.: 有意差なし ($p>0.05$)。

1.4.5 pH 依存性

細胞内オルガネラはそれぞれ固有の pH を有することから、LOTUS-Glc を特定のオルガネラに局在させた場合は、その pH の違いがレシオ値に影響を与える可能性がある。そこで、異なる pH 下での LOTUS-Glc のグルコースとの反応について調査した。結果、グルコース非存在下では、LOTUS-Glc および LOTUS-Glc (D236A) は pH 依存的にレシオ値が減少した (図 1-12 A)。また、pH 7.0, 7.4, 7.8 におけるグルコース濃度依存的なレシオ値の変動をそれぞれ調べた (図 1-12 B)。各 pH 下においてもグルコース濃度依存的なレシオ値変動が確認できた。これらの結果より、pH の異なるオルガネラ間でレシオ値を比較することは困難であるものの、pH 変化が小さい環境下であればグルコース濃度変動は検出可能である。

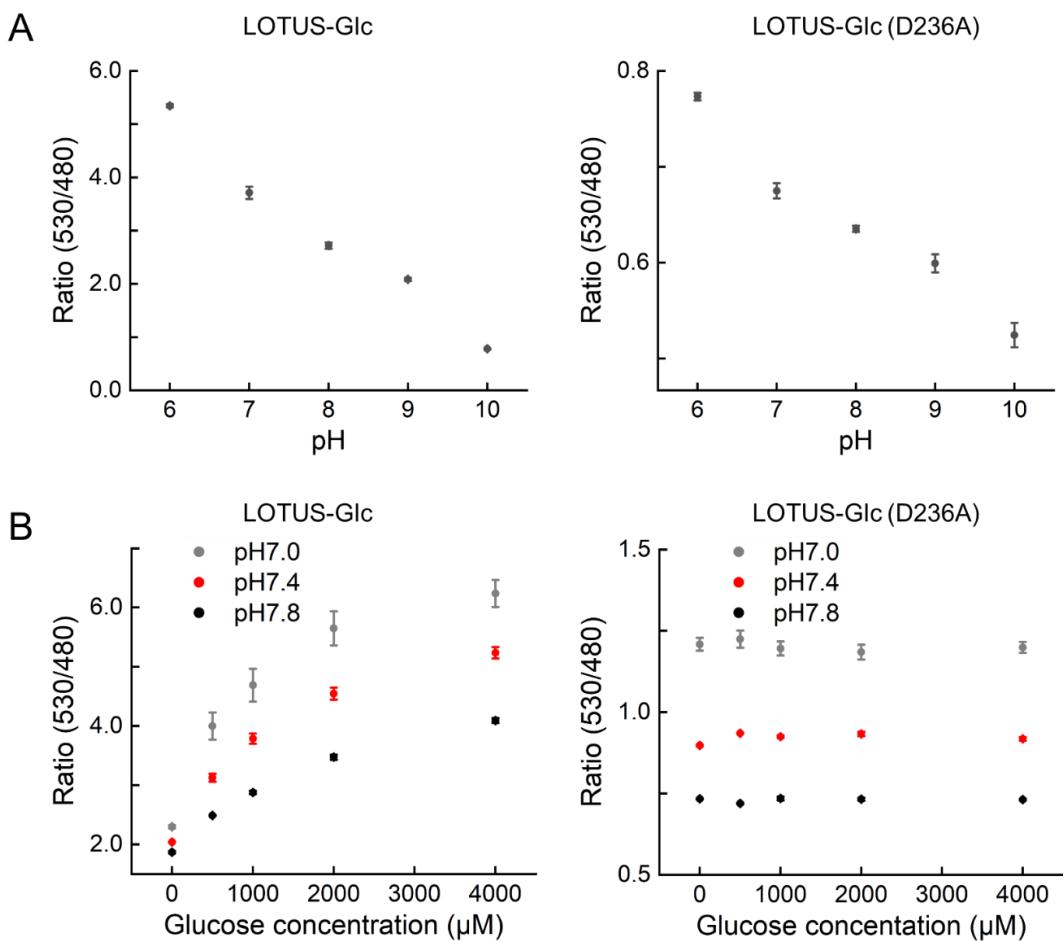


図 1-12. pH 依存性の評価

A. グルコース非存在下における pH 依存性。B. 異なる pH におけるグルコース濃度依存的なレシオ値変動。データは平均値±標準偏差を示す。

本項では、アガロース溶液を使った大腸菌コロニーのスクリーニング手法の確立に成功した。確立した手法によりリンカーのスクリーニングを行い、LOTUS-Glc の開発に至った。LOTUS-Glc は、発光で 200%、蛍光で 144% のダイナミックレンジを有する。ネガティブコントロールとして、MglB に変異を導入しグルコースへの親和性が大幅に減少した変異体 LOTUS-Glc (D236A) を作製し、グルコースによるシグナル変化をほとんど示さないことを確認した。LOTUS-Glc は、グルコースのみならずガラクトースに対しても応答性を示し、グルコースに対しては 1.1 mM、ガラクトースに対しては 3.5 mM の K_d 値を示した。通常培養条件下ではガラクトース濃度はグルコース濃度に対して十分低いため、両者が混合している状況においてはガラクトースがシグナルに与える影響は無視できる。また、LOTUS-Glc は異なる pH 条件下においても、グルコースに対する応答性を示した。以上の結果より、LOTUS-Glc は細胞内にてグルコースセンサーとして機能し得ると判断した。

2 哺乳類細胞でのグルコース変動の検出

2.1 背景

2.1.1 哺乳類細胞のグルコース取り込み

哺乳類細胞は、外部から取り込んだグルコースをエネルギー生産に利用しており、取り込みは主にグルコース輸送タンパク質 (GLUT) ファミリーが担っている。GLUT には GLUT1~14 まで種類があり三つのサブファミリーを構成している。それぞれの GLUT は、グルコースおよび阻害剤に対する親和性、組織での発現量、環境変化への応答性などが異なる³⁹。基本的なグルコースの取り込みは GLUT1 が行い、脂肪や筋肉のようなインスリン感受性組織では GLUT4 も協調的な働きを有している⁴⁰。がん細胞では GLUT1 が過剰発現しており、これによりグルコースが過剰に取り込まれ、活発な増殖や成長を可能にしている³。

GLUT1 によるグルコースの取り込みは、グルコースに対する親和性の変化、膜局在化、発現量の変化の三つの機序により制御されている。一つ目のグルコースに対する親和性の変化がもっとも早い応答であり、細胞内の刺激に応じて起こる。例えば、活性酸素種のような細胞内ストレスにより AMPK がリン酸化されると、活性化した AMPK が GLUT1 に結合している TXNIR もしくは Stomatin と反応しそれらを GLUT1 から解離させる。これにより、GLUT1 のグルコースに対する親和性が上昇しグルコースの取り込みが活性化する¹⁵ (図 2-1A)。GLUT4 は通常条件下では小胞体に局在している。インスリン受容体にインスリンが結合すると、インスリン受容体基質 (IRS) がリン酸化され PI3K/Akt シグナルが伝達する。結果、小胞体と細胞膜の融合が誘導され、GLUT4 が細胞膜に局在化しグルコースの取り込みが活性化する^{41,42} (図 2-1B)。GLUT ファミリーは、細胞内ストレスやがんや糖尿病といった疾患と関係性があり、GLUT を標的にした薬剤評価を行う上では、細胞内グルコース濃度が重要な指標となっている。

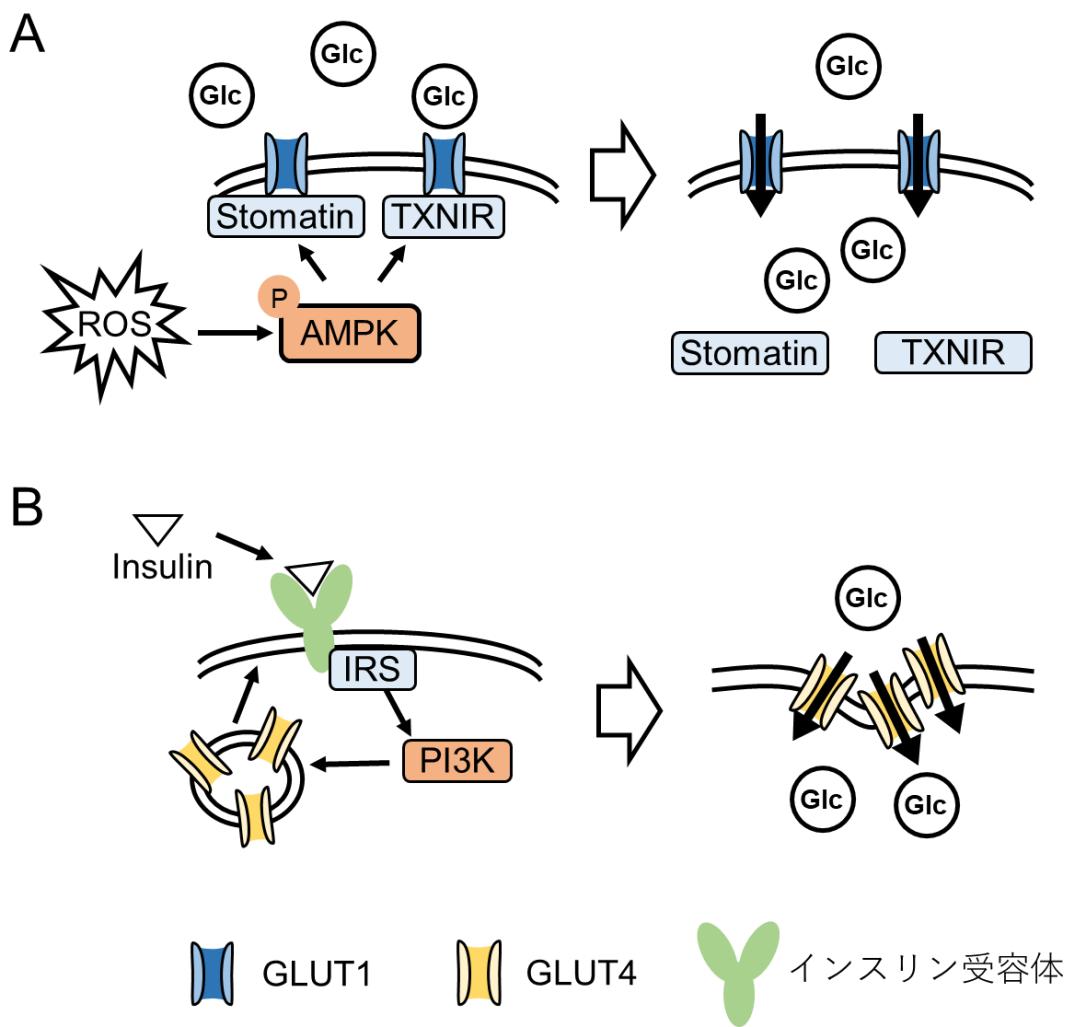


図 2-1. GLUT1, 4 のグルコース取り込み活性化の概略

A. ROS による GLUT1 のグルコース親和性の変化機序。ROS により AMPK がリン酸化されることで起きる。B. インスリンによる GLUT4 の膜局在化。インスリン受容体に結合し、自己リン酸化が起きることで開始する。

2.1.2 生物発光センサーの利点

細胞内のグルコース濃度は増減するため、可逆的な検出が可能なグルコースセンサーを使用することが適切である。しかしながら、蛍光センサーでは測定の際の励起光の必要性から、薬剤スクリーニングやオプトジェネティクスとの併用にて様々な制限が生じる。

新薬開発のスクリーニングで使用されるアッセイでは、高い再現性と安定性が求められる。生物発光センサーによる解析は、光毒性や光退色による問題がない、バックグラウンド

ノイズが低い、光感受性のある薬剤もスクリーニングできるという利点から、再現性が高く安定したアッセイが可能であり、薬剤スクリーニングにて広く使用されている²⁵。

オプトジェネティクスは、細胞中の特定の分子挙動を光照射により操作することで、細胞活動を時空間的に制御する方法である。オプトジェネティクスにて使用される制御ツールには光感受性タンパク質が組み込まれているため²³、蛍光センサーを併用した場合には、蛍光センサーの励起光とオプトジェネティクツールの制御光を厳密に使い分ける事が困難になる。観察の際に励起光が不要である生物発光は、その特性から、オプトジェネティクスと併用した観察が行われている^{43,44}。

2.2 目的

哺乳類細胞にて、LOTUS-Glc がグルコースセンサーとして機能することを確認する。また、薬剤スクリーニングへの応用の可能性を検討するために、グルコース取り込みに関する薬剤の細胞への影響を LOTUS-Glc で評価する。さらに他の技術との併用を想定して、LOTUS-Glc とオプトジェネティクツールとの同時使用を行う。

2.3 実験方法と実験材料

哺乳類細胞発現プラスミドの作製

哺乳類細胞用発現プラスミドは、pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) を基盤に作製した。PCR のテンプレートには、LOTUS-Glc-pRSET_B、LOTUS-Glc (D236A)-pRSET_B、P2A 配列および pcDNA3.1_miniSOG2 T2A H2B-EGFP (Addgene plasmid #87410) を使用し、それぞれの断片を増幅した。使用したプライマーの配列は付録表に示す。pcDNA3.1 は制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI (タカラバイオ) を用い直鎖状にし、PCR 産物と直鎖状プラスミドを Hot Fusion 法にて連結し、環状プラスミドにした。

哺乳類細胞の生物発光および蛍光イメージング

哺乳類細胞として HEK293T 細胞および C2C12 細胞を使用した。哺乳類細胞は 10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地にて 37°C で培養した。遺伝子導入の前日に細胞をトリプシン処理により剥離し、Cellmatrix Type1-C (新田ゼラチン) でコーティングされた 35 mm ガラス spot ムディッシュに移して培養した。遺伝子導入 (トランスフェクション) は、Opti-MEM (Gibco)、ポリエチレンイミン (Polyscience, PEI Max) およびプラスミドを混合した溶液を培養細胞に加え、一晩培養することで行った。遺伝子導入した細胞のイメージングでは、直前に培地を Dulbecco's phosphate buffered saline

(Fujifilm, D-PBS) に置換し、37°Cで一時間ほど培養を行った。生物発光イメージングでは、D-PBS でフリマジン (Promega, NanoGlo® Luciferase Assay System) を 500 倍希釈したフリマジン溶液を調製し、700 μ L を加えた。その後、250 mM グルコース溶液 100 μ L をフリマジンとともに添加した。観察は倒立顕微鏡 (Olympus, IX83) にて行い、対物レンズ (Olympus, UPLFLN40x)、励起光源 (Olympus, U-HGLGPS)、EMCCD カメラ (Andor, iXon Ultra)、フィルター (Olympus, U-FCFP (Cyan), U-FYFP (Yellow)) をそれぞれ使用した。生物発光イメージングでの細胞種ごとに使用した培地および発光観察の露光時間は表 2-1 に示す。蛍光イメージングは、光強度 6%、露光時間 300 msec で行った。miniSOG2 の光刺激実験では、光刺激した後にフリマジンを添加した。miniSOG2 の励起は、U-FCFP を通して光強度 50%、90 sec 露光することで行った。

	培地	露光時間 (sec)
HEK293T	D-PBS	60
	DMEM/F12+HBSS	120
C2C12	D-PBS	30
	DMEM/F12+HBSS	60

表 2-1. 顕微鏡の発光観察条件

グルコース取り込み阻害剤の評価

顕微鏡下でのグルコース取り込み阻害剤 (Phloretin) の影響の観察は、10% Hank's balanced salt solution (Sigma, HBSS) を含む DMEM/F12 を使用し、100 μ M Phloretin (東京化成工業) 溶液 100 μ L をフリマジンとともに添加した。細胞懸濁液を用いた Phloretin の影響の評価は、10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地に終濃度 10 μ M になるように Phloretin を添加し、37°Cで一晩培養した。トリプシン処理により細胞懸濁液を調製し、細胞懸濁液 100 μ L に対して 100 μ L のフリマジン溶液を添加し、プレートリーダー (CORONA, SH-9000) を用いて発光スペクトルを測定した。

活性酸素種の測定

オプトジェネティクスツール (miniSOG2) による活性酸素種の発生の確認には、ROS Assay kit-Highly Sensitive DCFH-DA (同仁化学) を使用した。miniSOG2 をトランスフェクションした哺乳類細胞を準備し、HBSS で洗浄後、染色液を添加し 37°Cで 30 分培養した。HBSS で洗浄後、トリプシン処理により細胞懸濁液を調製し、光刺激前後における蛍光強度を F-7000 (HITACHI) を用い、励起波長 500 \pm 5 nm にて測定を行った。光刺激は顕微

鏡下で光学フィルター (U-FCFP) および励起光源 (Olympus, U-HGLGPS) を用い、光強度 50%、90 秒間露光することで行った。

2.4 結果と考察

2.4.1 グルコース添加の影響評価

LOTUS-Glc を発現させた哺乳類細胞を使い、培地中のグルコース濃度を変化させることで生物発光の変動を確認した。培地へのグルコース添加後、HEK293T 細胞および C2C12 細胞の両方の細胞でコントロールと比較してレシオ値 (Yellow/Cyan) は上昇した (図 2-2 A, B)。レシオ値の上昇率は、HEK293T 細胞よりも C2C12 細胞の方が小さかった (図 2-2 B)。C2C12 細胞は骨格筋由来の細胞、HEK293T 細胞は腎臓由来の細胞であり、GLUT の発現量および種類が異なる^{40,45}。また人体では、グルコースの取り込みは腎臓よりも骨格筋の方が高い⁴⁶。したがって、C2C12 細胞は、元々の細胞内グルコース濃度が高いことから HEK293T 細胞よりもグルコース添加によるレシオ値の上昇が小さいと推測される。

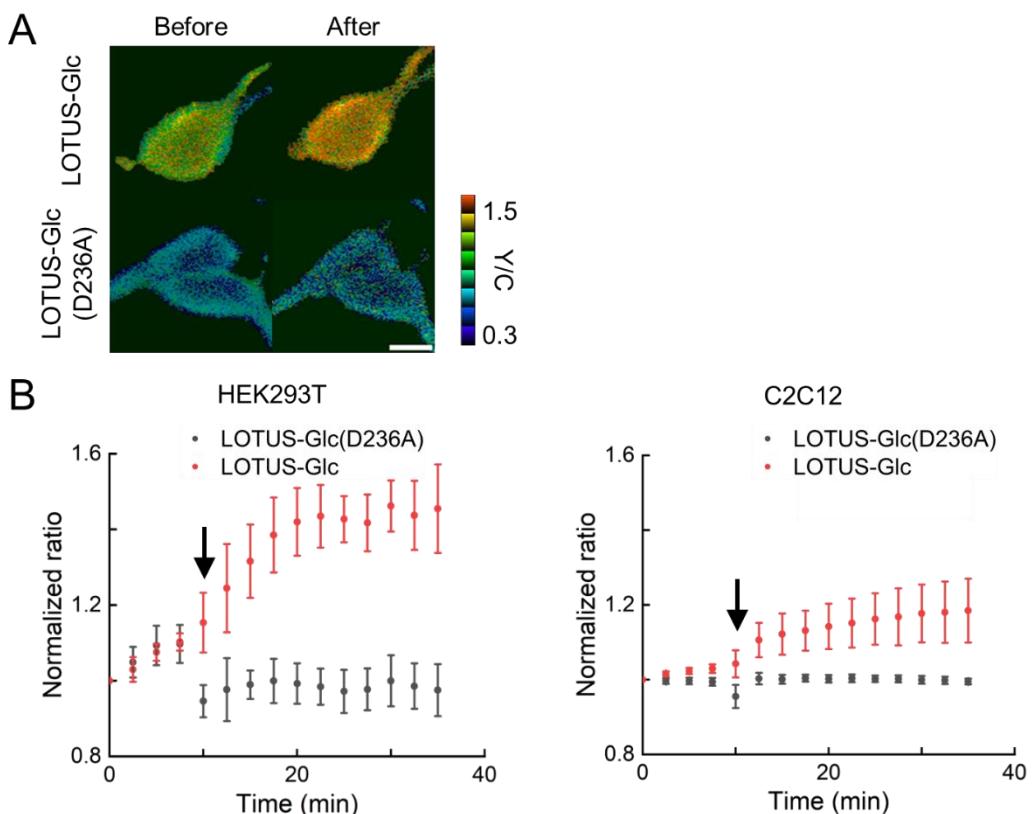


図 2-2. 哺乳類細胞におけるグルコース添加の影響評価

A. HEK293T 細胞の発光観察像。レシオ値 (Yellow/Cyan) を疑似色で示した。スケールバーは 10 μ m。B. グルコース添加後のレシオ値の時間変動。矢印時点でグルコースを添加した。データは平均値土標準偏差を示す。

発光強度はルシフェリン添加後から減少し続けるため、HEK293T 細胞における発光強度の減衰がレシオ値に与える影響を評価した（図 2-3 A）。発光強度の減衰に伴いわずかなレシオ値の上昇が確認されたが、グルコース添加によるレシオ値の変動と比較すると十分に小さいため、発光強度の減衰によるレシオ値の変動は無視してよいと判断した。

開発した生物発光センサーは、外部からのグルコースの取り込みを検出できることが示された。この現象は、従来の蛍光センサーを使用した場合でも検出可能である¹⁹⁻²²。しかし蛍光での検出では、励起光による光毒性や光退色などの影響を考慮する必要がある⁴⁷⁻⁴⁹。そこで、生物発光センサーの意義を確認するために、蛍光観察の際の励起光照射の影響を調査した。既存の蛍光グルコースセンサーFLII12Pglu-700μΔ6 および生物発光センサーのコントロールである LOTUS-Glc (D236A) を HEK293T 細胞に発現させ、グルコースを添加せずに蛍光観察を行った。FLII12Pglu-700μΔ6 では、レシオ値は時間経過とともに上昇したのに対し、LOTUS-Glc (D236A) では、レシオ値の変動は見られなかった（図 2-3 B）。また、ECFP 単体を発現させ同様の条件で蛍光観察を行ったところ、蛍光強度の減衰は見られなかった（図 2-3 C）。これらのことから、FLII12Pglu-700μΔ6 のレシオ値の上昇は、FLII12Pglu-700μΔ6 での FRET ドナーである ECFP の光退色によるものではなく、励起光による光毒性が原因だと考えられる。このように、蛍光観察を行う際には光退色と光毒性の影響によりシグナル変動が起きる可能性に注意する必要があるが、生物発光イメージングでは、励起光が必要ないことからそのような問題を回避することができる。

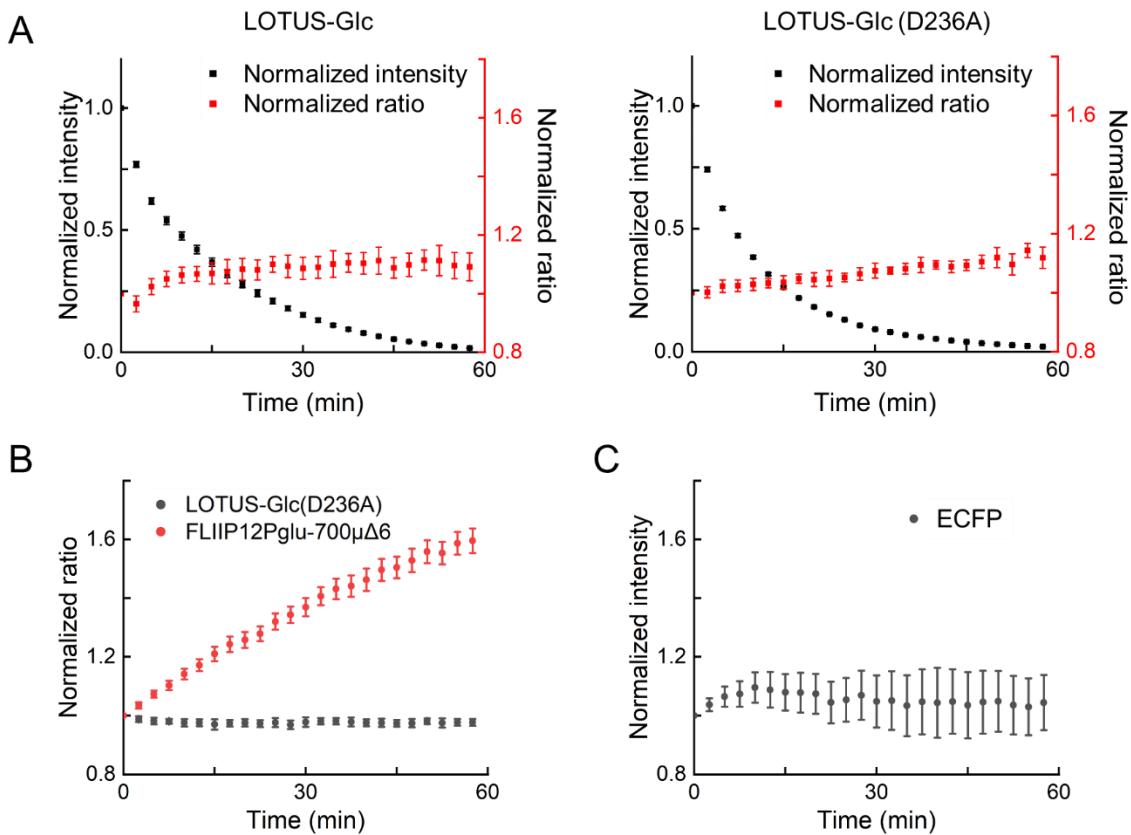


図 2-3. HEK293T 細胞における時間依存的なシグナル変化の観察

A. 発光強度とレシオ値 (Y/C) の時間変化。B. 蛍光におけるレシオ値 (Y/C) の時間変化。C. ECFP の蛍光強度の時間変化。データは平均値±標準偏差を示す。

2.4.2 グルコース取り込み阻害剤の影響評価

開発した LOTUS-Glc のスクリーニングへの適用を評価するため、グルコース取り込み阻害剤である Phloretin の影響を評価した。Phloretin は GLUT1 に結合することで、GLUT1 を介したグルコース取り込みを阻害する機能を有している⁵⁰。LOTUS-Glc が発現している HEK293T 細胞に対して Phloretin を添加し、プレートリーダーを用いて発光スペクトルを測定した。結果として、Phloretin の添加によりレシオ値 (530/480 nm) は低下した (図 2-4 A)。顕微鏡下においても、LOTUS-Glc は Phloretin の添加によるレシオ値 (Yellow/Cyan) の低下が確認された (図 2-4B)。以上の結果より、LOTUS-Glc はプレートリーダーを用いた薬剤評価に適用できる。また、顕微鏡下では細胞ごとの影響を評価することも可能である。

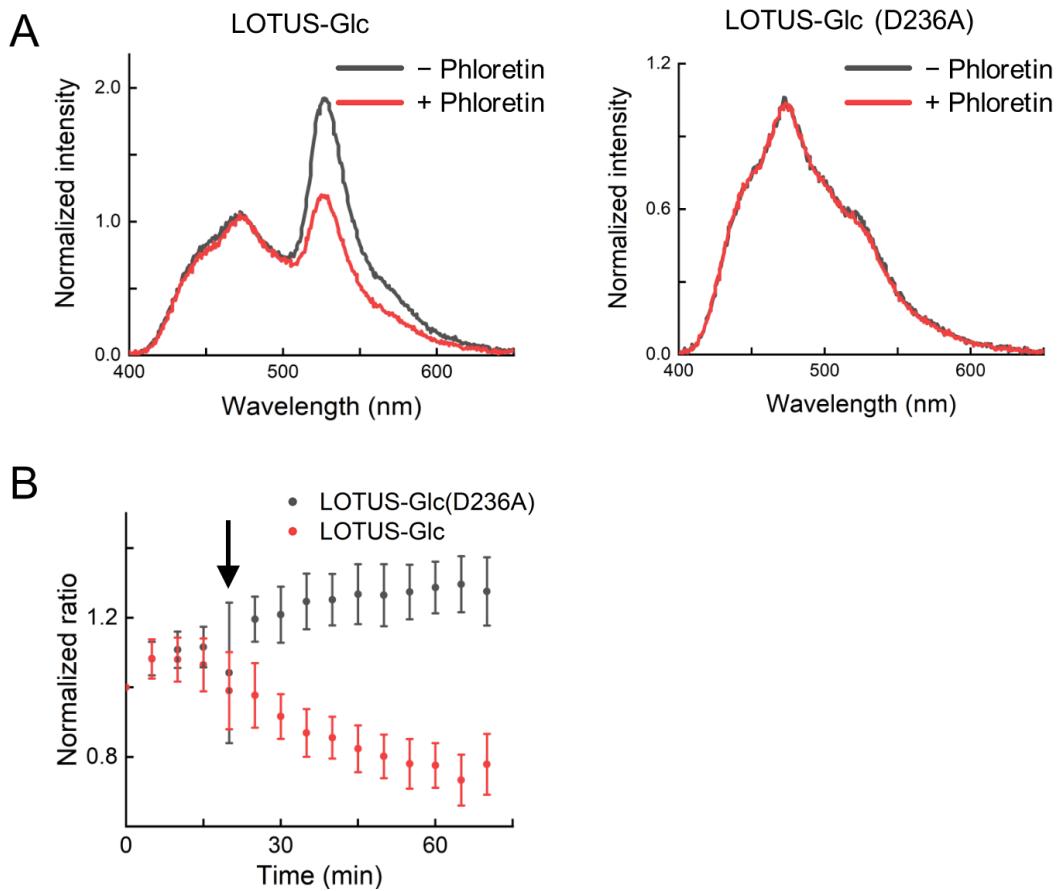


図 2-4. HEK293T 細胞における Phloretin の影響評価

- A. 細胞懸濁液の発光スペクトル。480nm における発光強度で平均化を行った。
- C. 時間依存的な Phloretin の影響評価 (矢印時点において Phloretin を添加)。データは平均値±標準偏差を示す。

2.4.3 オプトジェネティクスツールの影響評価

蛍光タンパク質 miniSOG2 は、励起光照射により蛍光とともに活性酸素種を発生する⁴³。活性酸素種存在下では、GLUT1 はグルコースの取り込みが活性化することが報告されており、このプロセスは一時間程度で誘導される¹⁵。したがって、miniSOG2 への励起光照射により GLUT1 によるグルコースの取り込み活性が促進されると予測できる。

最初に、活性酸素種感受性蛍光色素 (DCFH-DA) を用いて miniSOG2 による活性酸素種の発生を確認した。DCFH-DA は、細胞内に取り込まれエステラーゼおよび活性酸素種と反応することで蛍光性を有する蛍光色素である。miniSOG2 を発現している細胞では、青色光照射により DCFH-DA の蛍光強度が上昇したため、活性酸素種の発生が確認された (図 2-5)。

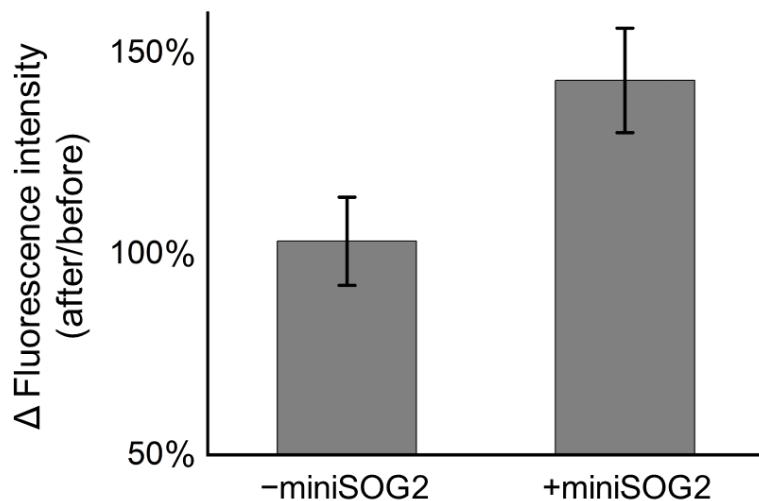


図 2-5. HEK293T 細胞での ROS の測定

HEK293T 細胞に miniSOG2 を発現させて、励起光を照射することで ROS を発現させた。励起波長は 500 ± 5 nm。526 nm における DCFH-DA の蛍光強度の変化を計算した。データは平均値土標準偏差を示す。

次に、LOTUS-Glc と miniSOG2 をそれぞれ発現させた HEK293T 細胞および C2C12 細胞に対して青色光を照射し、その影響を生物発光にて観察した（図 2-6 A）。HEK293T 細胞では、miniSOG2 が共発現している場合には、観察開始から 30 分経過後からレシオ値（Yellow/Cyan）の上昇が見られた（図 2-6B）。コントロールではレシオ値の上昇は軽微であった（図 2-6 B）。一方で、C2C12 細胞ではレシオ値の上昇は見られなかった（図 2-6 C）。C2C12 細胞は、HEK293T 細胞よりも GLUT4 の発現量が高く、恒常的なグルコースの取り込みが抑えられインスリン依存的なグルコース取り込みが活性化しやすいと考えられる⁴¹（図 2-1 B）。よって、C2C12 細胞では活性酸素種による GLUT1 活性化の影響が限定的であったと推測できる⁴⁵。

本項では、LOTUS-Glc を哺乳類細胞に発現させてその性能を評価した。LOTUS-Glc を発現した HEK293T 細胞および C2C12 細胞では、培地へのグルコースの添加によってコントロールと比較してレシオ値（Yellow/Cyan）が増加したことから、LOTUS-Glc がそれぞれの細胞内で機能することが示された。また、グルコース取り込み阻害剤 Phloretin の添加では、顕微鏡下および細胞懸濁液のそれぞれにてレシオ値（Yellow/Cyan, 530/480 nm）が減少したことから、薬剤影響の評価が可能であることを確認した。さらには、HEK293T 細胞では miniSOG2 からの活性酸素種の発生によるグルコース濃度の増加が検出され、生物発光センサーによってオプトジェネティクスによる細胞操作を評価できることも確認した。

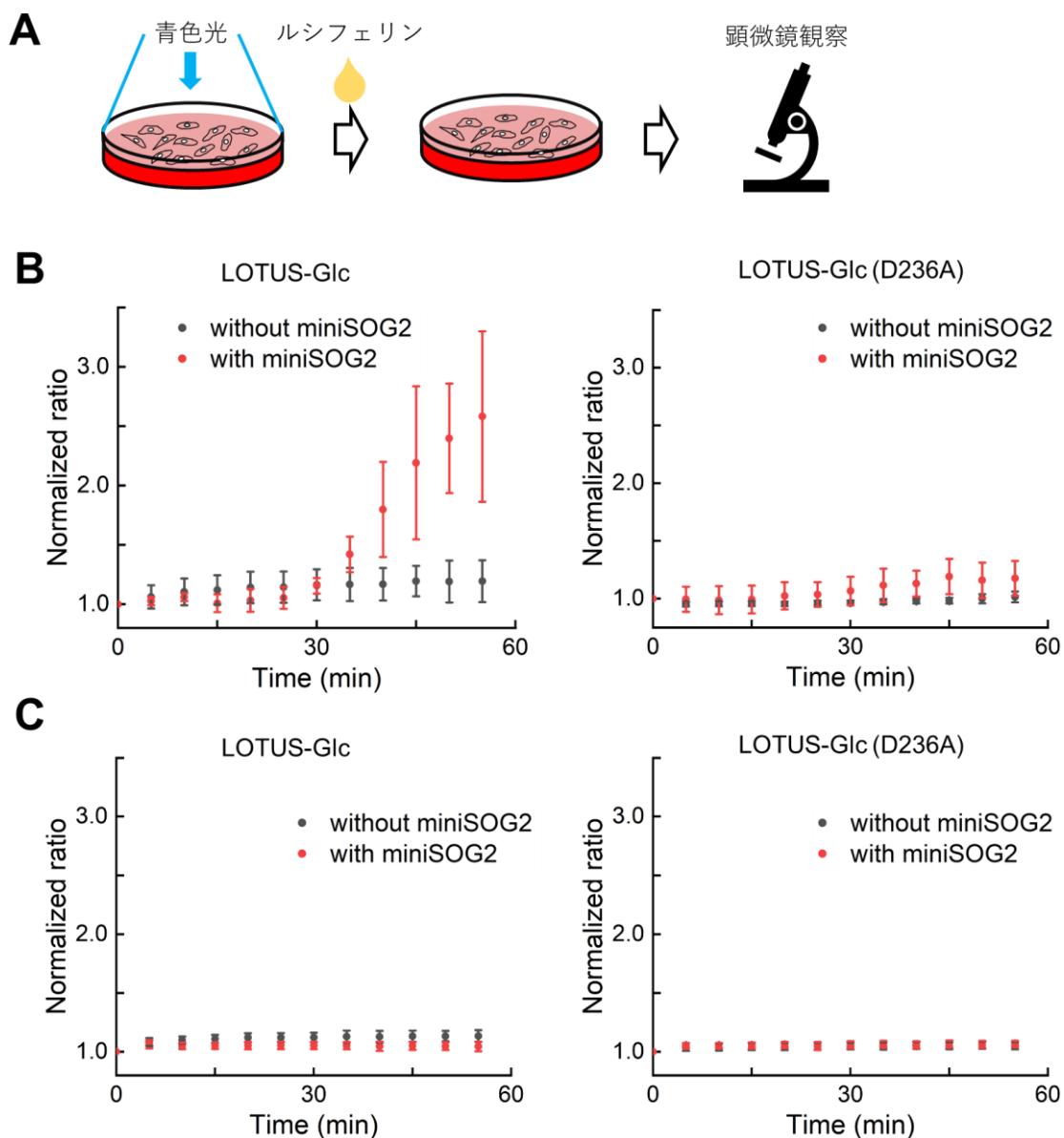


図 2-6. オプトジェネティクスツールが与える影響の評価

A. 実験の概略。操作はすべて顕微鏡下にて行った。B. HEK293T 細胞における時間依存的なレシオ値 (Y/C) の変動。C. C2C12 細胞における時間依存的なレシオ値 (Y/C) の変動。データは平均値±標準偏差を示す。

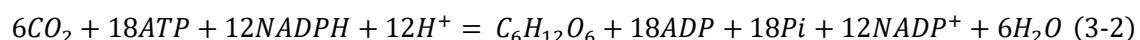
3 植物細胞への応用

3.1 背景

3.1.1 植物の光依存性

植物は、代謝や遺伝子発現などを調節することで外部環境の変動に適応している。グルコース生産を担う光合成をはじめとして、光は植物にとって影響が大きい環境要素の一つである。光合成では、葉緑体中のクロロフィルにて主に青色と赤色の光が吸収される。吸収した光エネルギーの一部は光化学系に組み込まれ、グルコース生産に寄与する。色素タンパク質であるフィトクロムは、赤色と遠赤色光を吸収することで転写因子と相互作用し、様々な遺伝子の発現を制御している。制御される遺伝子の中にはデンプン合成に関わる遺伝子も含まれており、クロロフィルと同様にエネルギー代謝に関わっている⁵¹。

光合成は、植物、藻類やシアノバクテリアなど細胞内に葉緑体を有している生物で行われている。これらの生物では、光合成により光エネルギーを化学エネルギーに変換し、グルコースを含めた有機物を合成している。光合成は、葉緑体内のチラコイド膜上で行われる光化学系Ⅰ、Ⅱと、ストロマで行われるカルビン・ベンソン回路の二つの反応経路で構成される(図3-1)。まず、光化学系Ⅱではクロロフィルが光エネルギーを吸収し、水の酸化を通して電子とプロトンを生成するとともに酸素を放出する。電子は電子伝達系を介して光化学系Ⅰに渡り、さらにATPとNADPHが合成される(式3-1)。ATPとNADPHは、カルビン・ベンソン回路での炭素固定反応(式3-2)に利用され、最終的にグルコースが生成される。



生成されたグルコースは、そのままストロマにてデンプンとして貯蔵されるか、細胞質に運搬され解糖系やスクロースの合成などに使われる。

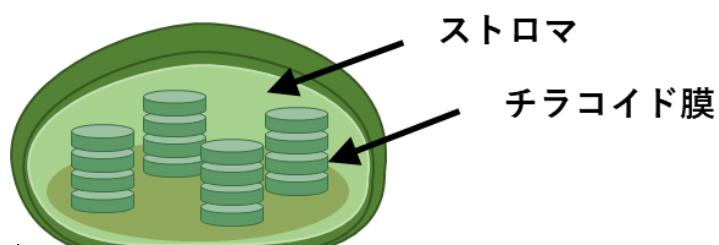


図 3-1. 葉緑体の模式図

ストロマは、チラコイド膜外の液状部分を指す。クロロフィルは、チラコイド膜に局在し、明反応のための光エネルギーを吸収している。

3.1.2 植物由来のプロトプラスト

植物細胞は細胞壁を有し、隣接する細胞同士が結合した組織を形成している。そのままの状態で個々の細胞を分離することは困難であり、薬剤刺激や遺伝子導入などの作業が細胞壁により阻まれるといった実験上の問題も生ずる。プロトプラストは酵素処理により細胞外組織および細胞壁を除去した細胞を指す（図 3-2）。細胞壁が除去されたことで浸透圧に対して敏感になるが、等張溶液中では安定し植物細胞としての機能は維持される。プロトプラストは個々の細胞が分離しているため、プレートリーダーなどを用いた計測に使用することが可能であり、外部ストレス応答の確認や薬剤スクリーニングなどで使用されている⁵²。

プロトプラストは液体培地で維持するため、光合成および合成されるグルコースなどの解析を行う場合には注意が必要となる。通常の光合成では、空気中の二酸化炭素を炭素源として使用するが、プロトプラストでは炭素源として重炭酸塩（炭酸水素ナトリウム）を培地へ添加する。この環境下においても、プロトプラストにて炭素固定および酸素発生が起き

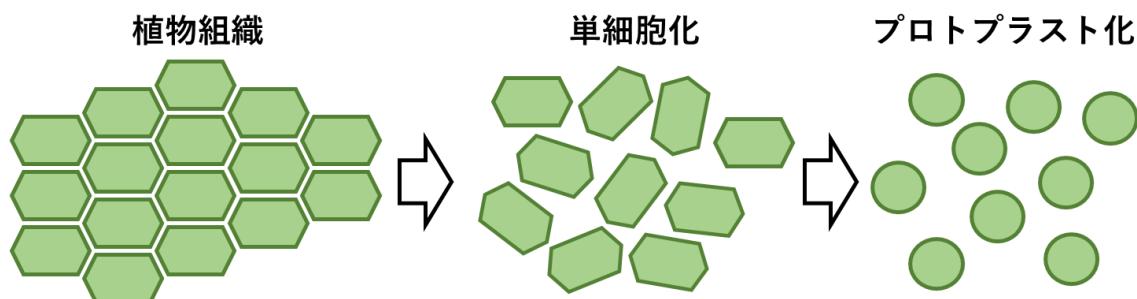


図 3-2. 植物細胞のプロトプラスト化の流れ

Macerozyme で細胞外組織（ペクチンなど）を消化し、単細胞化する。cellulase で細胞壁（セルロースなど）を消化し、プロトプラスト化する。
ていることが確認されている^{53,54}。

3.2 目的

LOTUS-Glc を導入したタバコ由来プロトプラストを使用し、植物細胞内のグルコース濃度の変動を解析する。光条件、炭素源の有無および局在の違いがグルコース濃度に与える影響を評価し、LOTUS-Glc の植物細胞への適用を確認する。

3.3 実験方法と実験材料

植物発現用ベクターの作製

植物細胞発現プラスミドは、pRI201_AN (Takara) を基盤に作製した。PCR のテンプレートには、LOTUS-Glc-pRSET_B、LOTUS-Glc (D236A)-pRSET_B および RBCS1a (ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A)⁵⁵ を使用し、それぞれの断片を増幅した。使用したプライマーの配列は、付録表に示す。pRI201_AN は制限酵素 *Nde*I (タカラバイオ) を用い直鎖状にし、PCR 産物と直鎖状プラスミドを Hot Fusion 法にて連結し、環状プラスミドにした。

植物細胞の形質転換

作製したプラスミドとアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) を混合し、37°Cで 5 分間インキュベーションした後、50 µg/ml カナマイシンおよび 15 µg/ml ゲンタマイシン含有の LB 寒天培地に播種した。30°Cで二日間培養することで形質転換したアグロバクテリウムコロニーを得た。コロニーを爪楊枝でつつき、50 µg/ml カナマイシンおよび 25 µg/ml ゲンタマイシン含有の LB 液体培地 2.0 mL に懸濁し、30°Cで一晩液体培養を行った。培養後、LB 培地を懸濁用溶液 (10 mM CaCl₂, 200 µM アセトシリンゴン) と置換し、OD₆₀₀ が 0.4 になるように調整したアグロバクテリウム懸濁液を用意した。作成したアグロバクテリウム懸濁液を *Nicotiana benthamiana* の葉に注入し、三日間室温にてインキュベーションすることで形質転換を行った。

プロトプラストの作製

形質転換した *Nicotiana benthamiana* の葉からプロトプラストを作製した。メスを使い葉を約 1cm 四方にカットし、酵素溶液 (1 % cellulase (ヤクルト薬品工業), 0.6 % macerozyme (ヤクルト薬品工業), 400 mM mannitol, 20 mM KCl, 10 mM CaCl₂ · 2H₂O, 20 mM MES, pH 5.7) に浸しアルミホイルで覆い、葉が消化されるまで約 5~7 時間室温でインキュベーションした。wash buffer (400 mM mannitol, 20 mM KCl, 10 mM CaCl₂ · 2H₂O, 10 mM MES, pH 5.7) で氷上にて洗浄を行った後、懸濁用溶液 (400 mM mannitol, 15 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) によりプロトプラストを懸濁した。重炭酸塩を添加する場合は、終濃度が 5 mM になるように NaHCO₃ を添加した。作成したプロトプラスト懸濁液は、暗条件 (アルミホイルで覆う) もしくは明条件 (60 µmol/m²/sec) で室温にて一晩インキュベートした。

プロトプラストの発光スペクトル測定

プロトプラスト懸濁用溶液でフリマジンを 500 倍希釈し、フリマジン溶液を調製した。プロトプラスト懸濁液 100 μL とフリマジン溶液 100 μL を混合し、プレートリーダー (CORONA, SH-9000) を用いて発光スペクトルを測定した。

LOTUS-Glc の局在観察

プロトプラスト内での LOTUS-Glc の局在は、倒立顕微鏡 (Nikon, Ti-2)、EMCCD カメラ (Andor, iXon Ultra)、100 倍対物レンズ (Nikon, CFI Plan Apochromat λ D 100 \times Oil)、共焦点ユニット (Andor, Dragon fly200)、蛍光フィルター (521/38 nm, 700/75 nm) を用いて確認した。励起光源は 488 nm レーザーおよび 637 nm レーザーを用いた。

3.4 結果と考察

3.4.1 生物発光が植物に与える影響

植物細胞内で生物発光が生じた場合、その発光が光化学系に影響する可能性について計算を行った。光合成による炭素固定と呼吸による炭素放出が等しくなる光強度を、光補償点と呼ぶ。光補償点は植物種によって異なり、タバコでは 20~35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ と報告されている⁵⁶ ($\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$: 光量子フラックス密度 (PPFD)。単位面積単位時間当たりに照射される光子の数を表す)。LOTUS-Glc に含まれるルシフェラーゼ nanoKAZ と同一のアミノ酸配列であるルシフェラーゼ Nanoluc の発光強度は、細胞中に数 μM 程度の濃度で発現した場合では 3~4 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ になる^{8,27,57} (W/cm^2 : 放射照度 (PFD)。単位面積当たりに放射されるエネルギーを表す)。PPFD と PFD について、nanoKAZ の生物発光のピーク波長である 460 nm を基準として単位変換の計算を行った。 E_{photon} を光子一個のエネルギー (J)、 N_A をアボガドロ定数 6.026×10^{23} (/mol)、 h をプランク定数 6.626×10^{-34} (J · sec)、 c を光速 3×10^8 (m · sec)、 λ を波長 (m) とすると E_{photon} および PPFD と PFD の関係は以下の式になる。

$$\text{PPFD} = \frac{PFD \times 10^4}{E_{\text{photon}} \times N_A} \quad (3-3)$$

$$E_{\text{photon}} = \frac{h \times c}{\lambda} \quad (3-4)$$

式 3-3, 3-4 より、

$$\text{PPFD} \doteq \frac{PFD}{26} \quad (3-5)$$

式 3-5 より、nanoKAZ の PPFD は $0.12\sim0.15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ となり、タバコの光補償点 ($20\sim35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) に対して十分小さい値となった。したがって、LOTUS-Glc の発光が植物に与える影響は軽微であると考えた。

3.4.2 プロトプラスト内の局在確認

光合成によるグルコース生産が葉緑体で行われることから、植物細胞では細胞質と葉緑体でグルコース濃度の変動に違いが見られることが予想される。LOTUS-Glc を葉緑体に局在させるため、葉緑体局在タグとして RBCS1a を使用した。RBCS1a は Rubisco の小サブユニットであり、葉緑体内のストロマに局在する。RBCS1a が融合した LOTUS-Glc の局在を確認したところ、クロロフィルの自家蛍光と一致していた⁵⁸ (図 3-3)。タグがない場合には明確に葉緑体と局在が分離していたため、LOTUS-Glc は RBCS1a の融合により、プロトプラスト内での葉緑体への局在が制御されることが確認された。

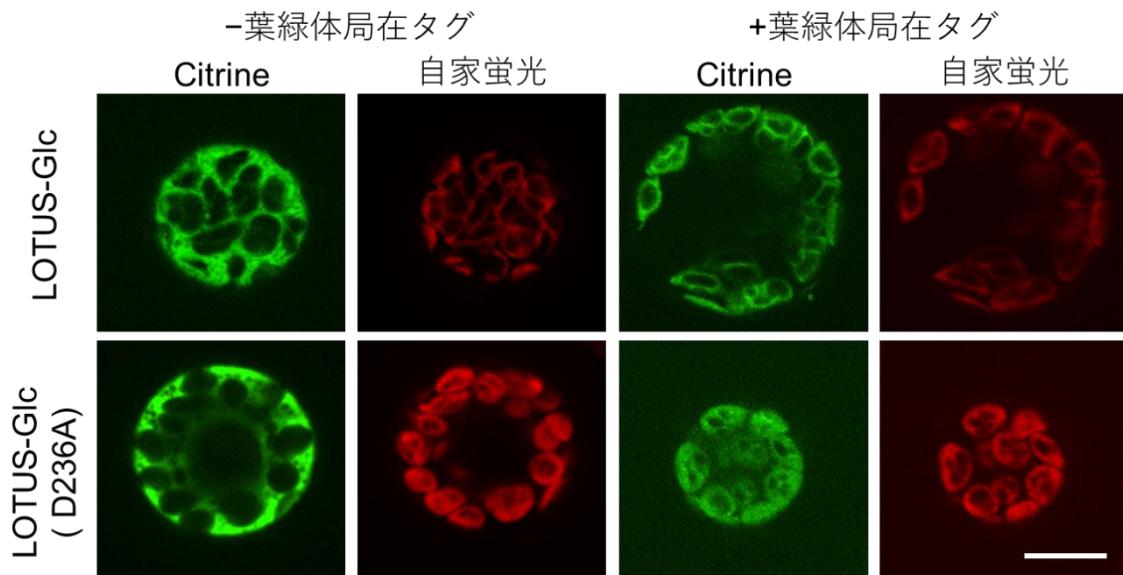


図 3-3. プロトプラストでの局在確認

励起には 488 nm 及び 637 nm レーザーを使用した。画像のコントラストは自動で調節を行った。スケールバーは、 $10 \mu\text{m}$ 。

3.4.3 LOTUS-Glc によるグルコース濃度変化の検出

LOTUS-Glc を導入したタバコ由来プロトプラストにおける、明暗条件、炭酸水素ナトリウムの有無および異なる局在の違いによるグルコース濃度変動を検出した。葉緑体局在タグを付けていない場合、明条件と比較すると暗条件の方がレシオ値が高く、炭酸水素ナトリ

ウム存在下では+21%、炭酸水素ナトリウム非存在下では+27%の変動であった（図 3-4 A）。葉緑体局在タグを付けている場合も同様に、明条件と比較すると暗条件の方がレシオ値（530/480 nm）が高く、炭酸水素ナトリウム存在下では+1%、炭酸水素ナトリウム非存在下では+15%の変動であった（図 3-4 A）。LOTUS-Glc (D236A) では条件の違いによるレシオ値変動に差はなかった（図 3-4 sB）。以上の結果より、LOTUS-Glc はタバコ由来プロトプラストにおける条件依存的なグルコース濃度変動を検出できることが示された。

明条件よりも暗条件にてグルコース濃度が高くなったことに関しては、暗条件によるグルコース代謝の制限やデンプンの分解促進などが理由として挙げられる。また炭酸水素ナトリウム存在下での明暗条件による濃度差の縮小は、炭酸水素ナトリウム存在下での炭素固定（式 3-1, 2）によるグルコース生成によるものと推測される。炭酸水素ナトリウムがレシオ値に与える影響が葉緑体よりも細胞質の方で大きかったことについては、炭素固定反応が葉緑体で行われていることが原因だと考えられる。葉緑体と細胞質のグルコース濃度を比較するには、各局在環境の pH の影響を考慮する必要がある。LOTUS-Glc および LOTUS-Glc (D236A) は pH に依存してレシオ値が低くなり（図 1-12）、一般的にはストロマ内の pH は細胞質よりも高いことが報告されている⁵⁹。プロトプラストにおける LOTUS-Glc (D236A) の発光スペクトルを比較すると、局在の違いによるレシオ値の変動は見られない（図 3-4 B）。したがって、細胞質とストロマの pH の違いがレシオ値に与える影響は無視できると考えた。そのうえで LOTUS-Glc の各局在でのレシオ値を比較すると、どの条件においても細胞質の方が高い（図 3-4 A）。すなわちグルコース濃度はストロマよりも細胞質が高いことを示しており、これは既存の研究結果と一致している⁶⁰。

本項の結果を踏まえると、LOTUS-Glc は光条件、炭素源の有無および局在によるグルコース濃度変動の違いを明瞭に検出しており、植物細胞でもグルコースセンサーとして機能することが示された。

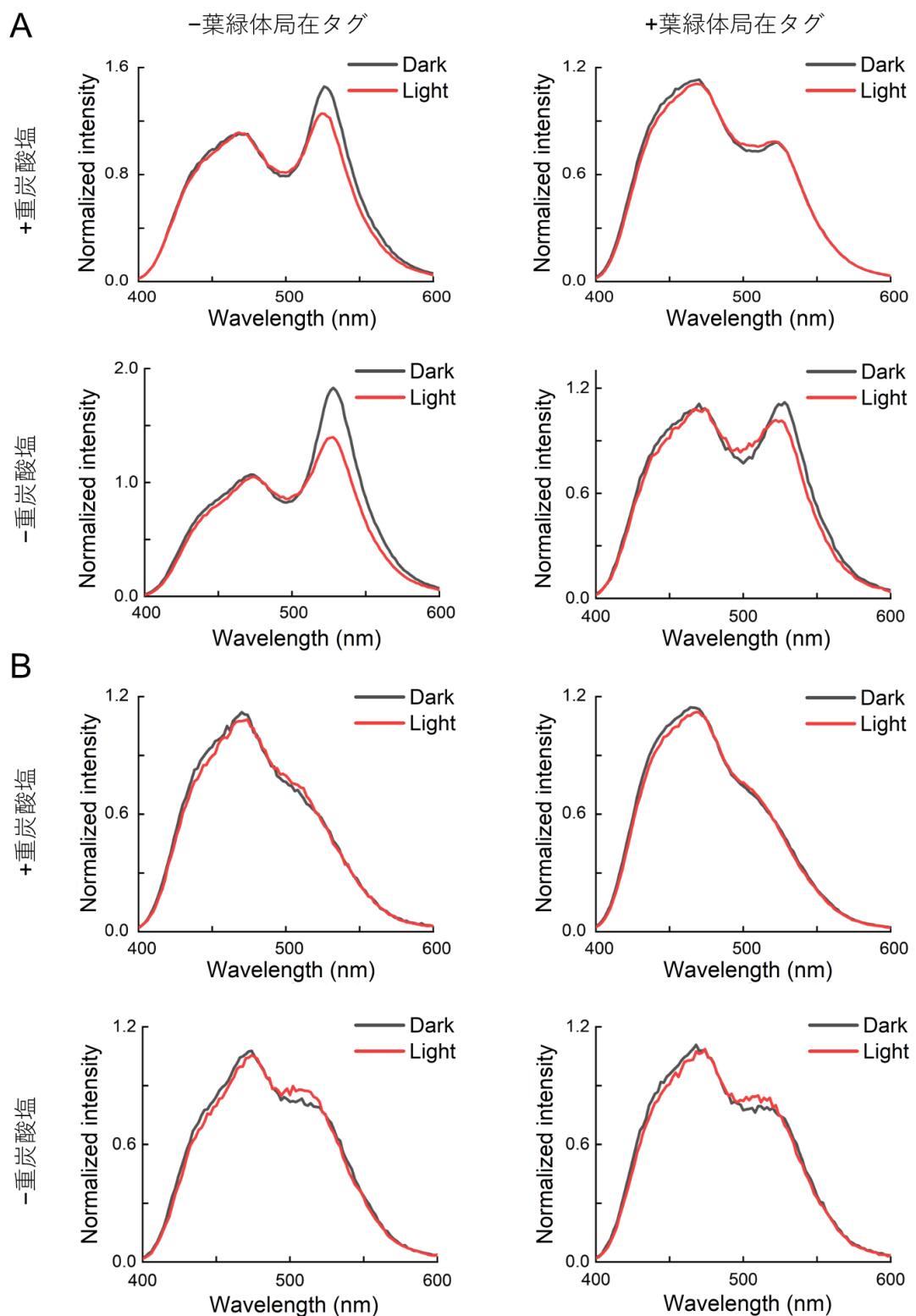


図 3-4. 各局在及び各条件におけるプロトプラスの発光スペクトル

A. LOTUS-Glc を発現。B. LOTUS-Glc (D236A) を発現。480 nm における発光強度で平均化を行った。

4 展望

生物発光センサー開発の将来展望

センサーの開発では、明瞭な検出を可能にするために、より高いダイナミックレンジを示す候補をスクリーニングすることが重要である。生物発光センサーのスクリーニングでは、検出に発光基質を添加する必要があるため、蛍光センサーと比較すると大腸菌コロニーによるスクリーニングは困難であった。今回確立したアガロースを用いたスクリーニング手法は、アガロースゲルおよび大腸菌の細胞膜を透過する分子が標的であれば同様の手法でスクリーニングを行う事が可能である事から、今後の生物発光センサー開発において、有益なスクリーニング手法になると考えられる。また、標的が大腸菌の細胞膜を透過しない分子の場合には、細胞膜を溶解させるタンパク質を一時的に発現させることで、大腸菌内からセンサータンパク質を漏出させ、同様の手法でスクリーニングすることが可能である⁶¹。

LOTUS-Glc のデザインと同様に、二種類の蛍光タンパク質とルシフェラーゼからなる生物発光センサーは開発されており、これらのセンサーも蛍光と生物発光の両方で測定が可能になっている^{28,29}。しかしながら、ダイナミックレンジは生物発光の方が低い。一方、LOTUS-Glc では、蛍光よりも生物発光のダイナミックレンジが高い。この違いは、ルシフェラーゼを繋げるリンカーの最適化によるものである。本研究の改良を参考に、既存のレシオメトリック蛍光センサーにルシフェラーゼを結合させて生物発光センサーに展開する場合には、ルシフェラーゼを繋げるリンカーに注目し最適化する事で、生物発光においても高いダイナミックレンジが達成される。

LOTUS-Glc の将来展望

細胞は、外部環境や細胞内環境の変化に応じてグルコース代謝を柔軟に適応させている。C2C12 細胞は、培地中のインスリン様成長因子やビタミン D の濃度依存的に分化や細胞分裂を起こし、結果として細胞内グルコース濃度が変動することが報告されている⁶²⁻⁶⁴。このグルコース代謝の適応は数時間から数十時間の反応であるため、この過程を追跡する場合には、長時間にわたる連続的な観察が求められる。本研究ではルシフェリンとしてフリマジンを使用したが、長時間観察を目的として開発されたルシフェリンの使用も考慮すべきである⁶⁵。長時間観察用に開発されたルシフェリンには化学修飾が施されており、ルシフェラーゼ以外の要因による酸化の抑制や細胞への取り込み速度の調節によって、一度の添加により数十時間といった長時間の発光観察が可能になる。動物個体レベルでは、糖尿病では肝臓や筋肉、神経疾患では脳、がんでは腫瘍組織において異なるグルコース代謝を示す。生物発光センサーは、細胞のみならず深部組織や動物個体のイメージングでも使用されている

ことから、疾患に応じた組織でのグルコース濃度の変動が検出可能であり、疾患に対する薬剤の評価やストレス応答の評価を個体レベルで行うことができる^{24,27,66}。さらに、既存の血糖値測定の技術と組み合わせることで、血糖値の変動と組織特異的なグルコース濃度の変動の両方を測定することが可能になり、より詳細な解析に貢献できる。

既存の蛍光グルコースセンサーFLII12Pglu-700μΔ6を用いた実験では、励起光の光毒性によるグルコース変動が確認された。光毒性が与える影響の大きさは観察条件や使用する細胞種などに依存するものの、今回の結果のような明らかな影響が出ている場合には、生物発光による観察が適していると言える。LOTUS-Glcは、蛍光センサーとしても生物発光センサーとしても使用可能であり、その選択ができる事は利点である。また、オプトジェネティクスとの組み合わせでは、光刺激と観察を独立して行えることから、細胞間相互作用の観察で特に利点がある。例えば、老化細胞は、SASP因子と呼ばれる分子を分泌し、それにより周辺細胞の細胞老化を誘導していることが報告されている⁶⁷。そのため、オプトジェネティクツールにより老化細胞特異的に細胞死を誘導し、その前後の周辺細胞を観察することで老化細胞が周辺細胞に与えている影響を評価することができる。生物発光センサーを用いることで、このようなオプトジェネティクスと組み合わせた観察も可能になることから、今後生物発光センサーの需要は高まる予測できる。

本研究では植物細胞でのLOTUS-Glcの性能評価として、ルシフェリンの細胞内供給が容易であるプロトプラストを使い実験を行った。生物発光はプロトプラストに限らず、通常の植物体においても検出可能である^{68,69}。光合成はクロロフィルを含む細胞でのみ行われており、クロロフィルを含まない細胞や光が当たっていない細胞は、光合成を行っている細胞からスクロースをエネルギー源として受け取り、植物体としてのエネルギーバランスを維持している⁷⁰。LOTUS-Glcによる植物体の生物発光イメージングを行う事で、そのような植物体全体のエネルギーバランスの調節や、暗条件下での代謝順応などの解析が可能となる。近年、植物にルシフェリン合成に関わる遺伝子を導入することで、外部からのルシフェリンの添加を必要とせずに自ら発光をする植物が開発されている^{71,72}。このシステムと生物発光センサーを組み合わせることができれば、これまでの生物発光イメージングでは困難だった数日以上の連続した観察や、植物個体間および個体群といったよりマクロなスケールでの評価など、様々な研究への応用が期待できる。

謝辞

学部生時代を含め約6年間ご指導していただいた永井健治教授、服部満准教授、長部謙二助教、圓谷徹之特任助教に深く感謝の意を表します。

大変お忙しい中、主査および副査を快く引き受けてくださいました上田昌宏教授、八木健教授、石井優教授に感謝申し上げます。

経済面および研究費の援助をしてくださいました次世代挑戦的研究者育成プロジェクトおよび卓越大学院プログラムに感謝申し上げます。

異なる研究テーマを持ちながらも日頃から研究についてのディスカッションに付き合っていただいた研究室同期の尾崎涼平、その他研究室のメンバーに深く感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Rikuto Tanaka, Kazunori Sugiura, Kenji Osabe, Mitsuru Hattori, and Takeharu Nagai

Genetically encoded bioluminescent glucose indicator for biological research

Biochemical and Biophysical Research Communications, 742, 151092 (2025)

付録表

1M Tris (pH7.5)	500 µL	5× pre-assembly buffer	160 µL
1M MgCl ₂	100 µL	Phusion polymerase	10 µL
1M DTT	50 µL	T5 exonuclease	0.3 µL
PEG-8000	250 mg	2.5 mM dNTP mix	64 µL
H ₂ O	250 µL	H ₂ O	166 µL

5× pre-assembly buffer の組成

2× Hot fusion buffer の組成

プライマーDNAのリスト

プライマー名	プライマー配列 (5' to 3')
R-2AA random linker	GACGAAGTCCTCCAGGGTKNNKNNCCGGCG
R-1AA random linker	GACGAAGTCCTCCAGGGTKNNCCGGCGGCG
R-0AA linker	GACGAAGTCCTCCAGGGTCCCAGGCGGCG
F-nkz- Δ N3	ACCCTGGAGGACTTCGTC
F-MglB-pRSETb	TACGACGATGACGATAAGATGGCTGATACTCGCATTGG
R-nkz-pRSETb	TGCAGATCTCGAGCTCGGATCTTAGGCCAGGATTCTCTCGC
F-D236A	GCGGCGCTGCCAGAAGCG

F-koz-MglB	GGTACCGAGCTGCCACCATGGCTGATACTCGCATTG
R-nkz-pcDNA3	TGATGGATATCTGCAGAATTAGGCCAGGATTCTCTCGCA
R-nkz-P2A	CGCGCCACCGGATCCGCCAGGATTCTCTCGCAC
F-P2A	GGATCCGGTGGCGCG
R-koz-pcDNA3	GGTGGCGAGCTCGGTACCAAG
F-miniSOG2-P2A	GAATCCGGACCAGCTAGCATGGAAAAAGCTCGTATTACTGAC C
R-miniSOG2-P2A	AGATGCATGCATGCTCGAGCGGCCGCTAACCATCCAGCTGAACCCC
F-MglB-pRI201	TCTTCACTGTTGATACATATGGCTGATACTCGCATTGGT
R-nkz-pRI201	CTTGCTAATCGACGGCATTAGGCCAGGATTCTCTCGCA
F-MglB-GGSGG	GGTGGCAGCGGTGGCATGGCTGATACTCGCATTGGT
F-RBCS1a-pRI201	TCTTCACTGTTGATACATATGGCTCCTCTATGCTCT
R-RBCS1a	GCCACCGCTGCCACCGGAATCGTAAGGTCAGGAA

参考文献

1. Forbes, J. M. & Cooper, M. E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* **93**, 137–188 (2013).
2. Papachristoforou, E., Lambadiari, V., Maratou, E. & Makrilia, K. Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. *J Diabetes Res* **2020**, (2020).
3. Macheda, M. L., Rogers, S. & Best, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* **202**, 654–662 (2005).
4. Tsien, R. Y. Green fluorescein protein. *Annu Rev Biochem* (1998).
5. Zimmer, M. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2823–2832 (2009).
6. Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the Luminous Hydromedusan aequorea. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223–239 (1962).
7. Greenwald, E. C., Mehta, S. & Zhang, J. Genetically encoded fluorescent biosensors illuminate the spatiotemporal regulation of signaling networks. *Chem Rev* **118**, 11707–11794 (2018).

8. Hall, M. P. *et al.* Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol* **7**, 1848–1857 (2012).
9. Belas, R. *et al.* Bacterial bioluminescence: Isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. *Science* **218**, 791–793 (1982).
10. De Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R. & DeLuca, M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7870–7873 (1985).
11. Lorenz, W. W., Mccann, R. O., Longiaru, M. & Cormier, M. J. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4438–4442 (1991).
12. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab* **7**, 11–20 (2008).
13. Kahn, A. R. S. & Ronald, C. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).
14. Mao, Z. & Zhang, W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism. *Int J Mol Sci* **19**, 1–14 (2018).
15. 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. *Arch Toxicol* **89**, 1209–1226 (2015).
16. Sheen, J. Master Regulators in Plant Glucose Signaling Networks. *J. Plant Biol* **57**, 67–79 (2014).
17. Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. clin. biochem* **6**, 24–27 (1969).
18. Fatangare, A. & Svatoš, A. Applications of 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose (FDG) in plant imaging: Past, present, and future. *Front Plant Sci* **7**, 1–11 (2016).
19. Mita, M. *et al.* Green Fluorescent Protein-Based Glucose Indicators Report Glucose Dynamics in Living Cells. *Anal Chem* **91**, 4821–4830 (2019).
20. Mita, M. *et al.* Development of red genetically encoded biosensor for visualization of intracellular glucose dynamics. *Cell Chem Biol* **28**, 1–11 (2022).
21. Takanaga, H., Chaudhuri, B. & Frommer, W. B. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity

- intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1778**, 1091–1099 (2008).
- 22. Hu, H. *et al.* Glucose monitoring in living cells with single fluorescent protein-based sensors. *RSC Adv* **8**, 2485–2489 (2018).
 - 23. Krueger, D. *et al.* Principles and applications of optogenetics in developmental biology. *Development* **146**, 1–13 (2019).
 - 24. Iwano, S. *et al.* Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science* **359**, 935–939 (2018).
 - 25. Baljinnyam, B., Ronzetti, M. & Simeonov, A. Advances in luminescence-based technologies for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **18**, 25–35 (2023).
 - 26. Inagaki, S. *et al.* Genetically encoded bioluminescent voltage indicator for multi-purpose use in wide range of bioimaging. *Sci Rep* **7**, 42398 (2017).
 - 27. Saito, K., Chang, Y., Horikawa, K., … N. H.-N. & 2012, U. Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat Commun* **1262** (2012)
 - 28. Komatsu, N. *et al.* A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging. *Sci Rep* **8**, 1–14 (2018).
 - 29. French, A. R., Tesmer, A. L. & Tantama, M. Dual-Mode FRET and BRET Sensors for Detecting cAMP Dynamics. *ACS Omega* **4**, 15504–15511 (2019).
 - 30. Vyas, N. K., Vyas, M. N. & Quiocho, F. A. Sugar and signal-transducer binding sites of the *Escherichia coli* galactose chemoreceptor protein. *Science* **242**, 1290–1295 (1988).
 - 31. Inouye, S. *et al.* C6-Deoxy coelenterazine analogues as an efficient substrate for glow luminescence reaction of nanoKAZ: The mutated catalytic 19kDa component of *Oplophorus luciferase*. *Biochem Biophys Res Commun* **437**, 23–28 (2013).
 - 32. Fu, C., Donovan, W. P., Shikapwashya-Hasser, O., Ye, X. & Cole, R. H. Hot fusion: An efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. *PLoS One* **9**, 1–20 (2014).
 - 33. 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. *J Biol Chem* **276**, 29188–29194 (2001).
 - 34. Heim, R. & Tsien, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**, 178–182 (1996).

35. Reetz, M. T., Kahakeaw, D. & Lohmer, R. Addressing the numbers problem in directed evolution. *Chem Bio Chem* **9**, 1797–1804 (2008).
36. 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. *J Biol Chem* **278**, 19127–19133 (2003).
37. Schadewaldt, P., Hammen, H. W., Loganathan, K., Bodner-Leidecker, A. & Wendel, U. Analysis of concentration and ¹³C enrichment of D-galactose in human plasma. *Clin Chem* **46**, 612–619 (2000).
38. 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 Comput Biol* **8**, (2012).
39. Scheepers, A., Joost, H. G. & Schürmann, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: Molecular basis of normal and aberrant function. *J Clin-Parenter Enter* **28**, 364–371 (2004).
40. Zhao, F.-Q. & Keating, A. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Curr Genomics* **8**, 113–128 (2007).
41. Dugani, C. B. & Klip, A. Glucose transporter 4: Cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep* **6**, 1137–1142 (2005).
42. Furtado, L. M., Poon, V. & Klip, A. GLUT4 activation: Thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiol Scand* **178**, 287–296 (2003).
43. Makhijani, K. *et al.* Precision Optogenetic Tool for Selective Single- and Multiple-Cell Ablation in a Live Animal Model System. *Cell Chem Biol* **24**, 110–119 (2017).
44. Farhana, I., Hossain, M. N., Suzuki, K., Matsuda, T. & Nagai, T. Genetically encoded fluorescence/bioluminescence bimodal indicators for Ca²⁺ imaging. *ACS Sens* **4**, 1825–1834 (2019).
45. Wong, C. Y., Al-Salami, H. & Dass, C. R. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage. *J Pharm Pharmacol* **72**, 1667–1693 (2020).
46. Meyer, C., Dostou, J. M., Welle, S. L. & Gerich, J. E. Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, 419–427 (2002).
47. Laissue, P. P., Alghamdi, R. A., Tomancak, P., Reynaud, E. G. & Shroff, H. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nat Methods* **14**, 657–661 (2017).

48. Icha, J., Weber, M., Waters, J. C. & Norden, C. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays* **39**, 1–15 (2017).
49. Pietraszewska-Bogiel, A. & Gadella, T. W. J. FRET microscopy: From principle to routine technology in cell biology. *J Microsc* **241**, 111–118 (2011).
50. Lin, S. T. *et al.* Apple Polyphenol Phloretin Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth via Inhibition of the Type 2 Glucose Transporter and Activation of p53-Mediated Signaling. *J Agric Food Chem* **64**, 6826–6837 (2016).
51. Shi, Q. *et al.* Modulation of starch synthesis in Arabidopsis via phytochrome B-mediated light signal transduction. *J Integr Plant Biol* **66**, 973–985 (2024).
52. Wang, A. *et al.* High-Throughput Screening for Engineered Nanoparticles That Enhance Photosynthesis Using Mesophyll Protoplasts. *J Agric Food Chem* **68**, 3382–3389 (2020).
53. Nishimura, M. & Akazawa, T. Photosynthetic Activities of Spinach Leaf Protoplasts. *Plant Physiol* **55**, 712–716 (1975).
54. Edwards, G. E., Robinson, S. P., Tyler, N. J. C. & Walker, D. A. Photosynthesis by Isolated Protoplasts, Protoplast Extracts, and Chloroplasts of Wheat. *Plant Physiol* **62**, 313–319 (1978).
55. Theologis, A. *et al.* Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**, 816–820 (2000).
56. Chen, Z. Y., Peng, Z. S., Yang, J., Chen, W. Y. & Ou-Yang, Z. M. A mathematical model for describing light-response curves in Nicotiana tabacum L. *Photosynthetica* **49**, 467–471 (2011).
57. Loening, A. M., Fenn, T. D., Wu, A. M. & Gambhir, S. S. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* **19**, 391–400 (2006).
58. Donaldson, L. Autofluorescence in plants. *Molecules* **25**, (2020).
59. Trinh, M. D. L. & Masuda, S. Chloroplast pH Homeostasis for the Regulation of Photosynthesis. *Front Plant Sci* **13**, (2022).
60. Servaites, J. C. & Geiger, D. R. Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *J Exp Bot* **53**, 1581–1591 (2002).
61. Sohya, S. *et al.* Biochemical and biophysical characterization of an unexpected bacteriolytic activity of VanX, a member of the vancomycin-resistance vanA gene cluster. *J Biol Chem* **289**, 35686–35694 (2014).

62. Gaboardi, G. C. *et al.* A role for PKC ϵ during C2C12 myogenic differentiation. *Cell Signal* **22**, 629–635 (2010).
63. Manna, P., Achari, A. E. & Jain, S. K. 1,25(OH)2-vitamin D3 upregulates glucose uptake mediated by SIRT1/IRS1/GLUT4 signaling cascade in C2C12 myotubes. *Mol Cell Biochem* **444**, 103–108 (2018).
64. Zesławski, W. *et al.* The interaction of insulin-like growth factor-I with the N-terminal domain of IGFBP-5. *EMBO* **20**, 3638–3644 (2001).
65. Orioka, M. *et al.* A Series of Furimazine Derivatives for Sustained Live-Cell Bioluminescence Imaging and Application to the Monitoring of Myogenesis at the Single-Cell Level. *Bioconjug Chem* **33**, 496–504 (2022).
66. Inagaki, S. *et al.* Imaging local brain activity of multiple freely moving mice sharing the same environment. *Sci Rep* **9**, 7460 (2019).
67. Tchkonia, T., Zhu, Y., Van Deursen, J., Campisi, J. & Kirkland, J. L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: Therapeutic opportunities. *J Clin Invest* **123**, 966–972 (2013).
68. Tran, Q. *et al.* Application of Green-enhanced Nano-lantern as a bioluminescent ratiometric indicator for measurement of *Arabidopsis thaliana* root apoplastic fluid pH. *Plant Cell Environ* **45**, 3157–3170 (2022).
69. Furuhata, Y., Sakai, A., Murakami, T., Nagasaki, A. & Kato, Y. Bioluminescent imaging of *Arabidopsis thaliana* using an enhanced Nano-lantern luminescence reporter system. *PLoS One* **15**, 1–12 (2020).
70. Ayre, B. G. Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Mol Plant* **4**, 377–394 (2011).
71. Mitiouchkina, T. *et al.* Plants with genetically encoded autoluminescence. *Nat Biotechnol* **38**, 944–946 (2020).
72. Kusuma, S. H., Kakizuka, T., Hattori, M. & Nagai, T. Autonomous multicolor bioluminescence imaging in bacteria, mammalian, and plant hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **121**, e2406358121 (2024).

業績

研究発表

1. 田中 陸登, 杉浦 一徳, 服部 満, 永井 健治, スマートフォンカメラによるグルコース濃度測定を可能にする生物発光センサーの開発, 日本バイオイメージング学会, 第 31 回バイオイメージング学会学術集会, 大阪大学 銀杏会館, 大阪, 2022.09.03~9.5, ポスター&口頭発表
2. 田中 陸登, 杉浦 一徳, 服部 満, 永井 健治, 唾液中グルコース濃度測定を可能にする発光センサーの開発, 日本分子生物学会, 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張メッセ, 千葉, 2022.11.30~12.2. ポスター & 口頭発表
3. 田中 陸登, 杉浦 一徳, 服部 満, 永井 健治, Development of a bioluminescent sensor for a measurement of salivary glucose level with a smartphone camera, 第 35 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 北海道大学 学術交流会館, 北海道, 2023.07.28~7.30, ポスター発表
4. 田中 陸登, 杉浦 一徳, 服部 満, 永井 健治, Establishment of a screening system for bioluminescent indicator development, 第 61 回生物物理学会年会, 名古屋国際会議場, 愛知, 2023.11.14~11.16, ポスター発表
5. 田中 陸登, 杉浦 一徳, 服部 満, 永井 健治, Development of luminescent glucose sensor and its applications, 第 21 回国際生物物理会議 IUPAB 2024, 国立京都国際会館, 京都, 2024.06.24~6.28, ポスター発表

解説記事

1. 田中 陸登, 杉浦 一徳, 服部 満, 永井 健治, 蛍光タンパク質・生物発光タンパク質を用いるバイオイメージング, 化学と教育 Vol71, No.5 『イメージングの化学』, p.192-195, 日本化学会, 2023.05

学術論文

1. Rikuto Tanaka, Kazunori Sugiura, Kenji Osabe, Mitsuru Hattori, and Takeharu Nagai, Genetically encoded bioluminescent glucose indicator for biological research, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 742, 151092 (2025)