

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06647

研究課題名（和文）ライブイメージングと数理モデルを用いたグルコース感知機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of glucose sensing mechanism using live imaging and mathematical modeling

研究代表者

佐野 浩子（Sano, Hiroko）

久留米大学・付置研究所・講師

研究者番号：90506908

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞がどのようにグルコース濃度の変化を感知しているのかを明らかにするために、細胞内に取り込まれたグルコース濃度およびグルコース応答性転写因子Mondoの活性を同時に検出するための実験系の構築を行った。ショウジョウバエ幼虫の脂肪体と呼ばれる栄養感知器官の培養系を用いて、細胞内グルコース濃度およびMondoの活性をそれぞれ緑色蛍光タンパク質および赤色蛍光タンパク質で経時的にモニターするライブイメージング実験系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の栄養摂取には変動があるため、細胞は常に栄養摂取状態を読み取り、栄養摂取に合わせて代謝を調節することにより代謝恒常性を保っている。ヒトの主要なエネルギー源であるグルコース代謝の恒常性破綻は糖尿病などの疾患につながる可能性があり、グルコース感知の分子機構の解明は疾患発症メカニズムの解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism by which cells sense changes in glucose uptake, we constructed an experimental system to simultaneously detect intracellular glucose concentration and the activity of the glucose-responsive transcription factor, Mondo. Using a culture system of the fat body, a nutrient-sensing organ of *Drosophila* larvae, we constructed a live imaging system to monitor intracellular glucose concentration with green fluorescent protein and Mondo activity with red fluorescent protein over time.

研究分野：発生遺伝学、代謝内分泌学

キーワード：グルコース感知 糖代謝 Mondo/ChREBP ショウジョウバエ マウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

動物の栄養摂取には変動があるため、細胞は常に栄養摂取状態を読み取り、代謝調節系に伝達して代謝レベルを栄養摂取に合わせることで代謝恒常性を保っている。動物の主要なエネルギー源であるグルコースはいくつかのメカニズムで感知されるが、Mondo/Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) 転写因子による細胞内グルコース感知は、進化的に保存されたメカニズムの1つである。Mondo/ChREBP はグルコース存在下で細胞質から核内に移行し、多くの代謝関連遺伝子の転写を活性化することにより、グルコースからのエネルギー産生と貯蔵のバランスがとれた適切な代謝状態を作り出す。Mondo/ChREBP を欠損したショウジョウバエやマウスが通常レベルの糖質の摂取により致死となることは、このシステムの重要性を示している。

細胞外からのグルコース取り込みは、グルコース代謝経路を経て Mondo/ChREBP に伝達されると考えられてきた。しかし、どのようなグルコース代謝経路が Mondo/ChREBP を活性化するのかについては議論が続いていた。哺乳類培養細胞を用いた解析では、グルコースの主要な代謝経路である解糖系および解糖系から分岐するペントースリン酸経路の関与が報告されていた。我々はショウジョウバエをモデルとした解析により、これまで生理機能がほとんど不明であったポリオール経路と呼ばれるグルコース代謝経路の関与を明らかにした (Sano *et al.*, 2022)。ポリオール経路は通常の生理状態においてグルコース依存的な Mondo/ChREBP の活性化に必需であるが、飢餓状態では不要であり、おそらく解糖系やペントースリン酸経路により代替されることが示唆された。しかし、ポリオール経路によるグルコース感知はショウジョウバエ独自であるのかもしくは他の動物種でも共通しているのか、および、なぜポリオール経路が通常の生理状態におけるグルコース感知に適しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、ポリオール経路によるグルコース依存的な Mondo/ChREBP の活性化が哺乳類 (マウス) でも共通しているのかどうかを明らかにすることを第一の目的とした。第二に、ポリオール経路が通常の生理状態におけるグルコース感知に適している理由を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスにおけるポリオール経路の機能

マウスにおけるポリオール経路の機能を解析するために、ポリオール経路の機能を喪失したノックアウトマウスを作製した。ポリオール経路はグルコースをソルビトールに変換し、ソルビトールをフルクトースに変換する2段階の代謝経路である。マウスにおいて、グルコースをソルビトールに変換するアルドース還元酵素をコードする遺伝子は複数存在するのに対し、ソルビトールをフルクトースに変換するソルビトール脱水素酵素は単一の Sorbitol dehydrogenase (Sord) 遺伝子にコードされている。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて Sord 遺伝子の機能ドメインを欠損したノックアウトマウスを作製した。ポリオール経路がグルコース摂取に応じた Mondo/ChREBP の活性化に関与するかどうかを検証するために、Sord ノックアウトマウスにグルコース水を経口投与し、肝細胞における ChREBP の核局在を ChREBP 抗体を用いた免疫染色により解析した。さらに、ポリオール経路の生理機能を明らかにするために、Sord ノックアウトマウスの耐糖能、肝脂肪蓄積を生化学的手法を用いて解析した。

(2) ライブイメージングと数理モデルを用いたグルコース感知機構の解析

Mondo/ChREBP はグルコース存在下で核移行し、Mondo/ChREBP の活性化は核移行で評価できることが報告されていた。そこで、ショウジョウバエゲノム中の Mondo をコードする領域の3'末端に赤色蛍光タンパク質である mApple をノックインし、内在性 Mondo を mApple の蛍光シグナルにより検出する Mondo::mApple 系統を作製した。細胞内グルコース濃度を可視化するために、グルコース濃度に応じた強度の緑色蛍光を発する GreenGlifon (Mita *et al.*, 2019) を挿入したショウジョウバエ系統を作製した。遺伝学的手法を用いて、Mondo::mApple および GreenGlifon を同一個体に導入したマーカー系統を作製した。マーカー系統の幼虫脂肪体を培養し、培地中のグルコース濃度を変化させ、細胞内に取り込まれたグルコース濃度と Mondo/ChREBP の核移行をスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブイメージングにより経時的に計測した。

4. 研究成果

(1) マウスにおけるポリオール経路の機能

野生型マウスにグルコース水を経口投与すると、肝臓において ChREBP の核局在が観察された。これに対し、Sord ノックアウトマウスでは、グルコース水投与後の ChREBP の核局在はほとんど検出されなかった。Sord ノックアウトマウスにポリオール経路の最終代謝産物であるフ

ルクトース水を投与すると核局在が見られることから、マウス肝臓におけるグルコース依存的な ChREBP の核局在はポリオール経路によって制御されていることが明らかになった。

上記の結果から、Sord ノックアウトマウスは ChREBP ノックアウトマウスと同様な表現型を示すことが期待される。ChREBP ノックアウトマウスは、グルコース投与後の血糖値の正常化が遅れる耐糖能障害を示すことが報告されていた。筆者らの解析により、Sord ノックアウトマウスにおいても耐糖能障害が起こっていることが明らかになった。耐糖能の低下はインスリンの分泌阻害に起因することが多いが、Sord ノックアウトマウスではインスリン分泌は正常であった。Sord ノックアウトマウスで耐糖能が低下する原因は不明であるが、ChREBP ノックアウトマウスやポリオール経路を阻害したショウジョウバエにおいてインスリン抵抗性が見られることから、Sord ノックアウトマウスにおいてもインスリン抵抗性が生じている可能性が考えられた。以上の結果から、ポリオール経路はショウジョウバエとマウスにおいて保存されたグルコース感知システムであり、グルコース摂取状況を Mondo/ChREBP に伝達することにより、代謝をグルコース摂取状況に合わせて調節することが明らかになった。

(2) ライブイメージングと数理モデルを用いたグルコース感知機構の解析

Mondo::mApple および GreenGlifon を持つマーカー系統の脂肪体を培養し、グルコース水を培地中に滴下し、核内 Mondo::mApple および細胞質 GreenGlifon の蛍光強度の変化をスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブイメージングにより経時的に計測した。その結果、Mondo::mApple はグルコース水滴下後数分内に核移行を示し、少なくとも2時間程度核移行が継続した。細胞質における GreenGlifon の蛍光強度はグルコース水滴下直後に顕著に増加し、その後数分間に渡り減弱し、再び増加に転じた。GreenGlifon の蛍光強度の変化は、レーザー照射による退色、代謝による細胞内グルコースの減少などが原因として考えられ、現在検討中である。また、グルコース水を培地中に滴下するという手法では、培地中のグルコースが拡散しにくく、脂肪体に高濃度のグルコースが直接作用するという問題点が浮上した。高濃度のグルコースが直接作用することにより、脂肪体の収縮およびそれに起因する蛍光強度の変化が生じたことから、培地中のグルコース濃度を変化させる手法の検討が必用であることが明らかになった。これらの問題点を解決し、野生型およびグルコース代謝経路変異体を用いてイメージングを行うことにより、数理モデルを構築するためのデータ取得が可能になると考えられる。

<引用文献>

*Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Nishimura, T., Takemoto, K., Ishiguro, K., Aoki, H., Kato, Y., and Kojima, M. The polyol pathway is an evolutionarily conserved system for sensing glucose uptake. *PLOS Biology*, 20, e3001678 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hoshino, R., Sano, H., Yoshinari, Y., Nishimura, T., and *Niwa, R.	4. 巻 9
2. 論文標題 Circulating fructose regulates a germline stem cell increase via gustatory receptor-mediated gut hormone secretion in mated <i>Drosophila</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadd5551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.add5551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 *Yamagata, N., Imanishi, Y., Wu, Hongyang., Kondo, S., Sano, H., and Tanimoto, H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Nutrient responding peptide hormone CCHamide-2 consolidates appetitive memory.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 986064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2022.986064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 *Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Nishimura, T., Takemoto, K., Ishiguro, K., Aoki, H., Kato, Y., and Kojima, M.	4. 巻 20
2. 論文標題 The polyol pathway is an evolutionarily conserved system for sensing glucose uptake.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3001678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 佐野浩子	4. 巻 45
2. 論文標題 ショウジョウバエの環境応答を支える栄養応答性ホルモン	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sano, H.
2. 発表標題 Glucose sensing by the polyol pathway and its significance in developmental biology
3. 学会等名 90th IRCMS Seminar-Symposium on New Horizons in Developmental Biology. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Nishimura, T., Araki, K., Takemoto, K., Ishiguro, K., Aoki, H., Kato, Y., and Kojima, M.
2. 発表標題 Evolutionarily conserved functions of the polyol pathway in glucose sensing.
3. 学会等名 第55回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Nishimura, T., Araki, K., Takemoto, K., Ishiguro, K., Aoki, H., and Kojima, M.
2. 発表標題 The roles of the polyol pathway in sensing glucose uptake.
3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野浩子、中村輝、山根万里子、丹羽仁史、西村隆史、荒木喜美、竹本一政、石黒啓一郎、西方美由紀、青木浩樹、児島将康
2. 発表標題 ポリオール経路によるグルコース摂取感知機構
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野浩子
2. 発表標題 ポリオール経路によるグルコース摂取の感知機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, Y., Niwa, H., Nishimura, T., and Kojima, M.
2. 発表標題 The polyol pathway is crucial for glucose sensing and sugar-responsive changes in metabolic gene expression.
3. 学会等名 第53回日本発生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Araki, K., Takemoto, K., Ishiguro, K., Takada, Y., Nishimura, T., and Kojima, M.
2. 発表標題 The polyol pathway is a crucial glucose sensor in Drosophila.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉田 松生 (Yoshida Shosei) (60294138)	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授 (63904)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	本田 直樹 (Honda Naoki) (30515581)	広島大学・統合生命科学研究科・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関