

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15691

研究課題名（和文）乳酸による細胞間エネルギー伝達を可視化する高感度蛍光乳酸センサーの開発

研究課題名（英文）Development of Ultrasensitive Fluorescent Lactate Indicator for Intercellular Metabolism

研究代表者

那須 雄介（Nasu, Yusuke）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教

研究者番号：60831328

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）：伝統的にエネルギー代謝の廃棄物と考えられていた乳酸が、近年生体内でエネルギー供給（細胞間乳酸シャトル）の役割を果たしていることが明らかになりつつある。生体内における乳酸の役割をさらに詳細に検証するためには、生体試料中の細胞外乳酸を高い時間分解能で観察する方法が必要である。その観察方法を開発するため、本研究ではタンパク質工学の技術を用いて、細胞外乳酸赤色蛍光バイオセンサーを創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞外の乳酸動態を観察する方法は、血液を採取して生化学的に解析したり、観察部位に乳酸反応性電極を挿入したりなど、乳酸に関する時空間情報の欠如や生体に対する侵襲性が避けられなかった。世界で初めて細胞外乳酸を非侵襲的に、かつ、高時間分解能で観察することが可能なバイオセンサーを開発した、という点で本研究の成果は学術的に極めて意義がある。さらに、乳酸は社会的な認知度・注目度も高いことから、本研究成果である細胞外乳酸センサーを利用することでこれまで知られていなかった乳酸の新たな知見の発見につながる可能性がある点で社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：L-Lactate, traditionally considered a metabolic waste product, is increasingly recognized as an important intercellular energy currency in mammals. Investigations of the emerging roles of intercellular shuttling of L-lactate requires a method to observe extracellular L-lactate in living tissue with high spatiotemporal resolution. To achieve this goal, we developed a genetically encoded red fluorescent biosensor for extracellular L-lactate by using technique of protein engineering.

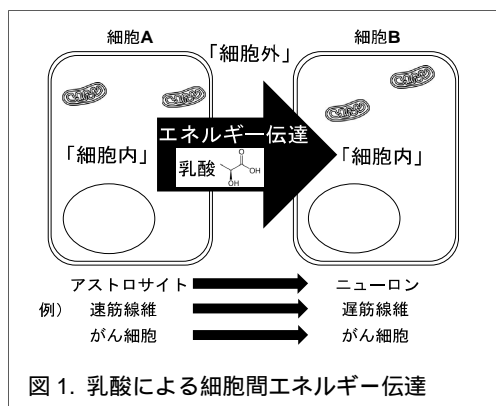
研究分野：タンパク質工学

キーワード：蛍光タンパク質 乳酸 蛍光バイオセンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む多細胞生物は、食物など外部から得られたエネルギーを細胞間で伝達することで各細胞（筋細胞、神経細胞 etc.）の活動に必要なエネルギーを供給し、細胞の集合体である個体としての活動を維持している。これまで長い間、細胞間で伝達されるエネルギー物質はグルコースだとされてきた。しかし近年、グルコースの単なる代謝副産物とされていた「乳酸」が真のエネルギー伝達物質である、という考えが相次いで提唱された



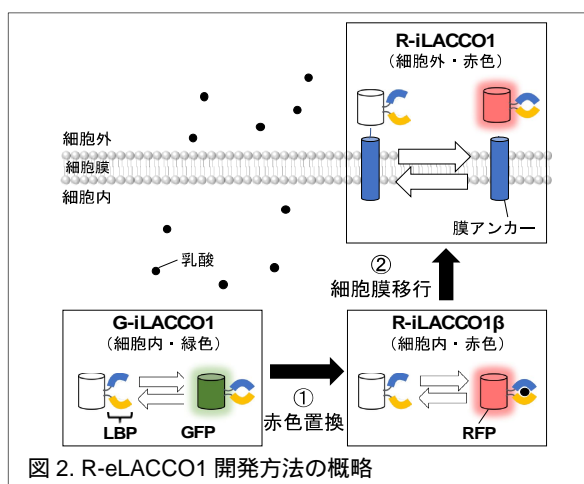
(Hui et al. *Nature*, **551**, 115 (2018), Magistretti and Allaman, *Nat.Rev.Neurosci.* **19**, 235 (2018)). 乳酸による細胞間エネルギー伝達を実証するためには「細胞内」及び「細胞外」の乳酸動態を直接観察することが必要である(図1)。しかし、乳酸を観ることができる既存の蛍光センサーは感度(乳酸依存的蛍光シグナル変化~11%)が非常に小さく生体内で信頼できる乳酸観察ができなかった(Martin et al. *PLoS ONE*, **8**, e57712 (2013))。この技術的問題を解決するため、申請者はこれまでの蛍光センサー開発で培ったタンパク質工学技術を駆使して極めて高い感度(蛍光シグナル変化~600%)を有する緑色蛍光「細胞内」乳酸センサーG-iLACC01を開発した(Nasu et al. *Anal.Chem.* **88**, 838 (2016), Nasu et al. *Sci.Rep.* **6**, 27505 (2016), 『準備状況』及び『これまでの研究活動』参照)。あとは赤色蛍光「細胞外」乳酸センサーを開発できれば、「細胞内」及び「細胞外」の乳酸を二色同時観察することでグルコースが主役とする metabolism の常識を覆す新説を実証できる状況であった。

2. 研究の目的

細胞間に存在する「細胞外」乳酸を可視化する赤色蛍光乳酸センサーR-eLACC01の開発

3. 研究の方法

本研究では、緑色蛍光「細胞内」乳酸センサーG-iLACC01を改変することで赤色蛍光「細胞外」乳酸センサーR-eLACC01を開発する。G-iLACC01は乳酸結合タンパク質(LBP)及び緑色蛍光タンパク質(GFP,  $ex/em$  488/510 nm)からなり、乳酸がLBPに結合することでGFPの蛍光強度が上昇する。はじめにG-iLACC01の色を緑色から赤色に置換した後、センサー分子を細胞内から細胞膜へ移行させる(図2)。



4. 研究成果

上述の方法に基づき研究を行った結果、細胞外赤色蛍光乳酸センサーR-eLACC01の開発に成功

した（論文準備中）.細胞外乳酸センサーは未報告であり,さらに,より生体深部を高い感度で観察可能な長波長（赤色）でその開発を実現した点において,本研究の成果は国内外問わず学術的な高い独自性・インパクトを有する.今後,G-iLACC01 及び R-eLACC01 を利用した乳酸を中心とした metabolism 研究が加速されることが期待される.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shen Y., Nasu Y., Shkolnikov I., Kim A., Campbell R.E.	4. 巻 152
2. 論文標題 Engineering genetically encoded fluorescent indicators for imaging of neuronal activity: Progress and prospects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 3-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.01.011	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 該当する

1. 著者名 Nasu Y., Shen Y., Kramer L., Campbell R.E.	4. 巻 17
2. 論文標題 Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 509-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-020-00718-x	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 該当する

1. 著者名 Nasu Y., Murphy-Royal C., Wen Y., Haidey J., Molina R. S., Aggarwal A., Zhang S., Kamijo Y., Paquet M. E., Podgorski K., Drobizhev M., Bains J. S., Lemieux M. J., Gordon G. R., Campbell R.E.	4. 巻 -
2. 論文標題 A genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.03.05.434048	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nasu Y., and Robert E. Campbell
2. 発表標題 Development of a genetically encoded intensimetric lactate indicator iLACC01
3. 学会等名 ACS Fall 2019 National Meeting & Exposition（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nasu Y., and Robert E. Campbell
2. 発表標題 Development of Genetically Encoded Fluorescent Indicator
3. 学会等名 The 4th ETH Zurich UTokyo Strategic Partnership Symposium (国際学会)
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

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			
米国	モンタナ州立大学	Janelia Research Campus		
カナダ	アルバータ大学	マギル大学	カルガリー大学	他1機関
中国	西安交通大学			