

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14738

研究課題名（和文）第三世代蛍光乳酸センサーの開発

研究課題名（英文）A third generation of genetically encoded fluorescent lactate biosensor

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） 3,500,000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空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、第三世代細胞外乳酸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、高時空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 third-generation genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate by using protein engineering.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：乳酸 蛍光タンパク質 蛍光バイオセンサー

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), 図 1)。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外の乳酸動態を直接観察することが必要である。そこで、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を有する緑色蛍光細胞外乳酸センサー-eLACCO1(蛍光シグナル変化~600%) 及び eLACCO2(同~2000%) を開発した (Nasu et al. *Nat. Commun.* **12**, 7058 (2021), Nasu et al. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.12.27.522013> (2022)). eLACCO1 及び 2 は極めて高い感度をもつが、乳酸に反応後蛍光シグナルが最大まで変化するのに約 3 分を要し、乳酸による細胞間エネルギー伝達をリアルタイム観察する上でその乳酸応答速度が問題となっていた。乳酸応答速度が早い（蛍光強度が 1 秒以内に最大変化する）細胞外乳酸センサーを開発できれば、グルコースを主役とする metabolism の常識を覆す新説を実証できる状況であった。

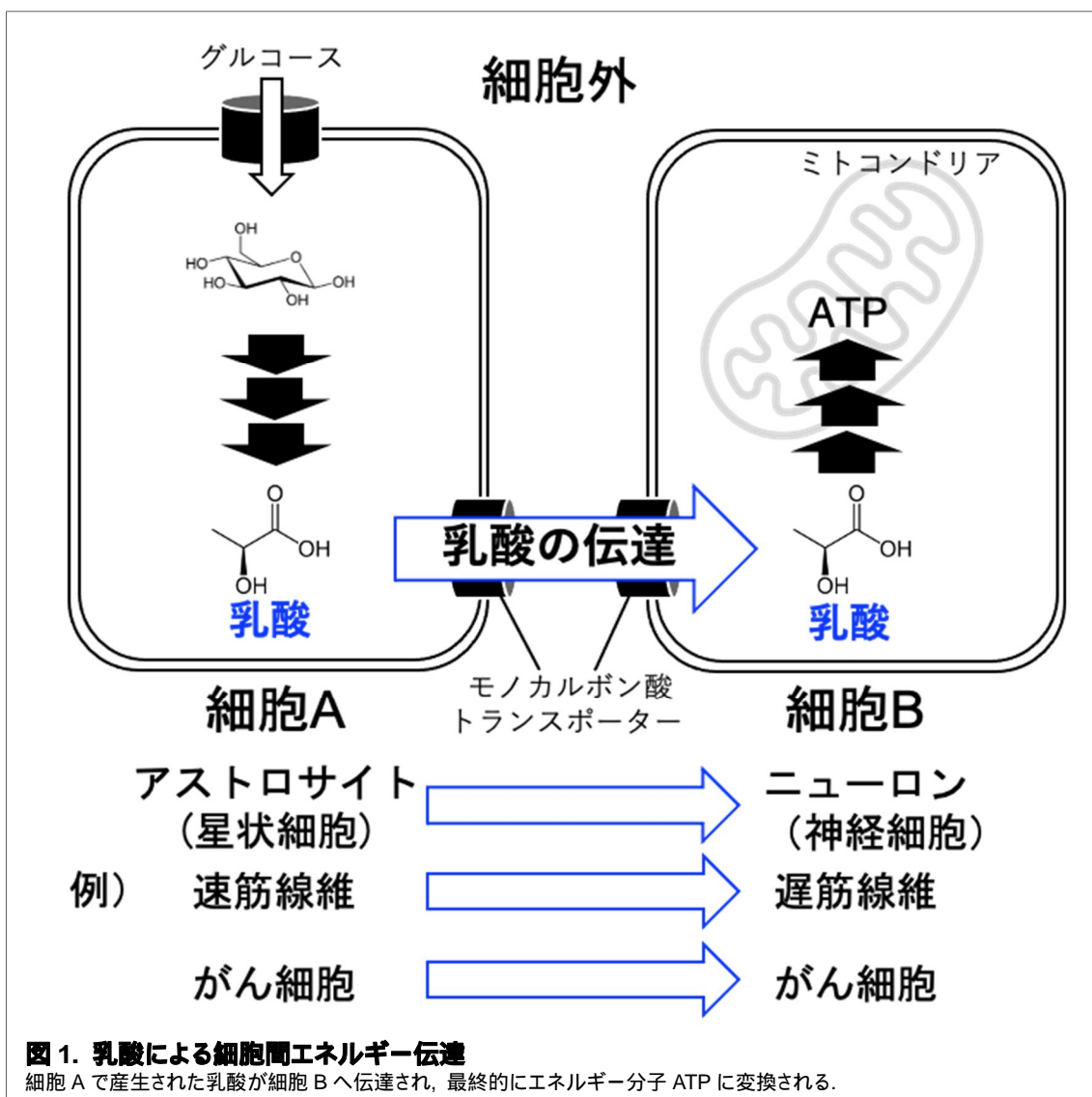


図 1. 乳酸による細胞間エネルギー伝達

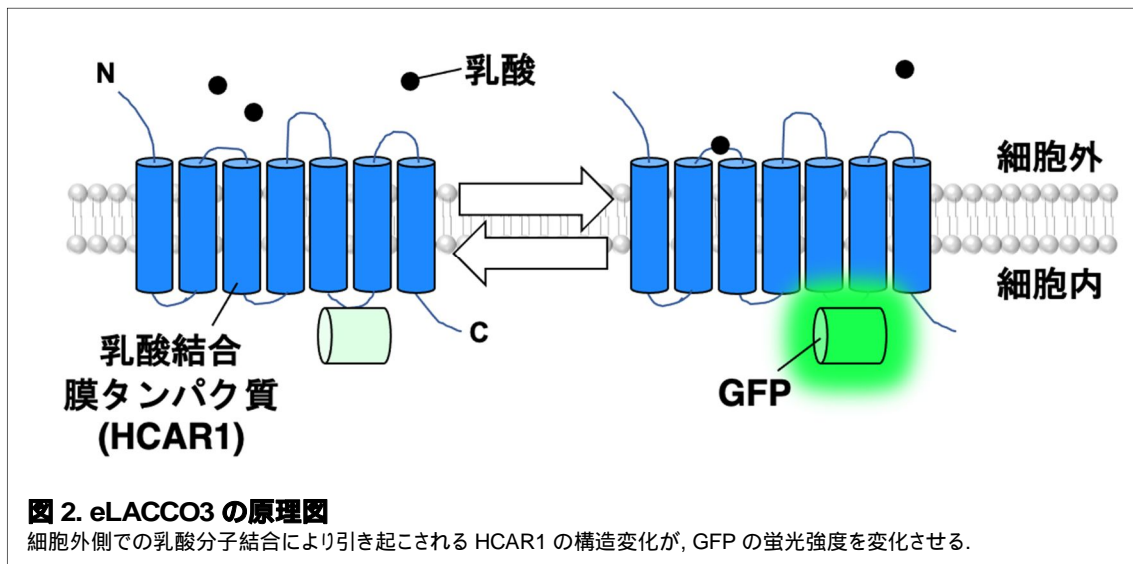
細胞 A で産生された乳酸が細胞 B へ伝達され、最終的にエネルギー分子 ATP に変換される。

2. 研究の目的

細胞外乳酸を高時間分解能で可視化する第三世代緑色蛍光乳酸センサーeLACCO3の開発

3. 研究の方法

蛍光センサーは標的分子を認識するセンシングドメインと、蛍光シグナルを発するシグナルドメインの2つのドメインからなる。本研究では、乳酸応答が早いことが示されているヒト由来乳酸結合膜タンパク質 HCAR1 (Abrantes et al. *J. Neurosci.* **39**, 4422 (2019)) をセンシングドメインに、eLACCO1 及び eLACCO2 でセンシングドメインの構造変化依存的にその蛍光強度を変化させることが申請者により示されている緑色蛍光タンパク質 GFP をシグナルドメインに用いて、緑色蛍光細胞外乳酸センサーeLACCO3を開発する(図2)。



4. 研究成果

上述の方法に基づき研究を行った結果、細胞膜に効率よく局在する細胞外緑色蛍光乳酸センサーeLACCO3の開発に成功した。高時空間分解能を有する細胞外乳酸センサー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、eLACCO3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8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Bassot A., Chen J., Takahashi-Yamashiro K., Yap M. C., Christine Silvia Gibhardt, Le G. N. T., Hario S., Nasu Y., Moore J., Gutierrez T., Mina L., Mast H., Moses A., Bhat R., Ballanyi K., Lemieux H., Sitia R., Zito E., Bogeski I., Campbell R. E., Simmen T.	4. 巻 42
2. 論文標題 The endoplasmic reticulum kinase PERK interacts with the oxidoreductase ER01 to metabolically adapt mitochondria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111899	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 該当する
1. 著者名 Zhu W., Takeuchi S., Imai S., Terada T., Ueda T., Nasu Y., Terai T.*, Campbell R. E.*	4. 巻 19
2. 論文標題 Chemigenetic indicators based on synthetic chelators and green fluorescence protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 38-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-022-01134-z	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 Hashizume R., Fujii H., Mehta S., Ota K., Qian Y., Zhu W., Drobizhev M., Nasu Y.*, Zhang J., Bito H., Campbell R. E.*	4. 巻 31
2. 論文標題 A genetically-encoded far-red fluorescent calcium ion biosensor derived from a biliverdin-binding protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4440	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 Ignacio Fernandez-Moncada et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 A lactate-dependent shift of glycolysis mediates synaptic and cognitive processes	5. 発行年 2023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) 10.1101/2023.03.15.532748	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

1. 著者名 Nasu Y.*, Aggarwal A., Le G. N. T., Kamijo Y., Boisvert M., Paquet M-E., Drobizhev M., Podgorski K., Campbell R. E.*	4. 巻 -
2. 論文標題 Improved genetically encoded fluorescent biosensors for monitoring of intra- and extracellular L-lactate	5. 発行年 2022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) 10.1101/2022.12.27.522013	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

1. 著者名 Le G. N. T., Hario S., Takahashi-Yamashiro K., Li S., Drobizhev M., Nasu Y.*, Campbell R. E.*	4. 巻 -
2. 論文標題 High performance genetically-encoded green fluorescent biosensors for intracellular L-lactate	5. 発行年 2022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) 10.1101/2022.10.19.512892	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

1. 著者名 Nasu Y.*, Kamijo Y., Hashizume R., Sato H., Hori Y., Tomita T., Drobizhev M., Campbell R. E.*	4. 巻 -
2. 論文標題 A red fluorescent genetically encoded biosensor for extracellular L-lactate	5. 発行年 2022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) 10.1101/2022.08.30.505811	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

1. 著者名 Yusuke Nasu, Ciaran Murphy-Royal, Yurong Wen, Jordan N. Haidey, Rosana S. Molina, Abhi Aggarwal, Shuce Zhang, Yuki Kamijo, Marie-Eve Paquet, Kaspar Podgorski, Mikhail Drobizhev, Jaideep S. Bains, M. Joanne Lemieux, Grant R. Gordon & Robert E. Campbell	4. 巻 12
2. 論文標題 A genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27332-2	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Nasu Y., Kamijo Y., Hario S., Le G. N. T., and Campbell R. E.
2. 発表標題 LACCO series: Genetically encoded fluorescent biosensors for extracellular and intracellular L-lactate
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nasu Y.
2. 発表標題 Lactate matters: Genetically encoded lactate biosensors
3. 学会等名 Serendipity Workshop 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nasu Y.
2. 発表標題 Genetically encoded fluorescent biosensors for neuroscience
3. 学会等名 Multiphoton Workshop 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nasu Y., Le G., Hario S., Kamijo Y., and Robert E. Campbell
2. 発表標題 乳酸バイオセンサーの開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nasu Y., Le G., Hario S., Kamijo Y., and Robert E. Campbell
2. 発表標題 High-performance genetically encoded biosensors for L-lactate
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nasu Y., Kamijo Y., Le G., Hario S., and Robert E. Campbell
2. 発表標題 高感度蛍光乳酸バイオセンサー -LACCOシリーズ-
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nasu Y., and Robert E. Campbell
2. 発表標題 An ultrasensitive fluorescent biosensor for L-lactate
3. 学会等名 Pacifichem (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nasu Y., and Robert E. Campbell
2. 発表標題 Engineering of genetically encoded fluorescent sensors
3. 学会等名 Pacifichem (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 那須雄介, 針尾紗彩, Robert E. Campbell
2. 発表標題 乳酸バイオセンサーの開発
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 那須雄介	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊細胞	

1. 著者名 那須 雄介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 2
3. 書名 化学	

1. 著者名 那須 雄介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 8
3. 書名 先端の分析法 新訂第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東大、細胞外の乳酸を緑色蛍光で低侵襲に可視化するバイオセンサーeLACC01.1を開発
https://www.nikkei.com/article/DGXLRS622938_S1A201C2000000/
 細胞外乳酸バイオセンサーの開発
<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2021/7657/>

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	Janelia Research Campus	Allen Institute	Montana State University	他1機関
カナダ	Laval University	University of Alberta		
フランス	INSERM			
カナダ	カルガリー大学	モントリオール大学	アルバータ大学	他1機関
米国	モンタナ州立大学	ハワードヒューズ医学研究所 Janelia Research Campus		
中国	西安交通大学			