

培養細胞内グリコーゲンの定量のための酵素蛍光法の検討

A sensitive enzyme fluorimetric assay for intracellular glycogen

倉若 美咲樹¹⁾

Misaki KURAWAKA

佐々木 菜穂²⁾

Naho SASAKI

志村 二三夫¹⁾

Fumio SHIMURA

山崎 優子^{*3)}

Yuko YAMAZAKI

要 旨

グリコーゲンは動物界の貯蔵多糖であり、主に肝臓や骨格筋に存在する。その定量はグリコーゲン合成・分解に関わるメカニズムや調節を理解する上で重要な意味を持つ。従来汎用されてきたフェノール硫酸法やアンスロン硫酸法等は、化学反応に基づく比色法であり、特異性に難点があるとともに、感度が低く、培養細胞スケールの実験では多くの場合、検出限界以下となる。そこで本研究では、グリコーゲンをグルコース単位で分解する酵素であるグルコアミラーゼと蛍光原基質10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazineを用いて高感度にグリコーゲンの定量ができるよう酵素蛍光法を検討し、本法の定量可能レンジと検量線の直線性を調べた。その結果、グリコーゲン標準液0.1-20 µg/mLまで良好な直線性が得られた。また、マイクロプレート対応蛍光分光光度計の代用としてリアルタイム定量PCRシステムで定量することも可能であった（定量範囲：0.1-2.0 µg/mL）。続いて、実際に培養肝細胞HepG2を用い、培養液中のグルコースの有無、グリコーゲン枯渇状態からのグルコース添加による細胞内グリコーゲン量の回復過程を本法により定量した。その結果、培養液中のグルコースの有無による細胞内グリコーゲン量の消長を本法により検出することができた。以上より、本研究の酵素蛍光法は、グリコーゲンを高感度に定量でき、培養細胞スケールのグリコーゲン量の増減を検出することが可能であると結論された。

¹⁾ 十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Human Life Sciences, Jumonji University graduate school

²⁾ 十文字学園女子大学人間生活学部健康栄養学科

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

³⁾ 十文字学園女子大学人間生活学部食物栄養学科

Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

* 投稿責任者

キーワード：グリコーゲン、酵素蛍光法、10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine、グルコアミラーゼ、培養肝細胞

1. 序

グリコーゲンはD-グルコースを構成糖とする動物界の貯蔵多糖である¹⁾。グルコース残基は α -1,4グリコシド結合で直鎖状に連なっているが、一定間隔で α -1,6グリコシド結合が存在し、分枝構造を形成している²⁾。生体内では主に肝臓や骨格筋に存在しており、必要に応じて血糖値の維持やATP生産のために利用されている。

生体内におけるグリコーゲンの合成・分解は様々な酵素反応を経て行われる。特に、肝臓におけるグリコーゲン合成は食後などの一過性高血糖を防ぐ役割も担っており、個体レベルのグルコース代謝の恒常性維持に重要な役割を果たしている。そのため先天性疾患などでグリコーゲン合成酵素が欠損していると肝臓の場合は食後高血糖、骨格筋の場合は運動不耐性などが生じ、場合に

よっては重篤な症状を引き起こすことがある²⁾。

グリコーゲン合成・分解に関わるメカニズムやその調節、個体の糖代謝の状態、グリコーゲン代謝関連疾患の解明、また食品素材のグリコーゲン量の把握等には、グリコーゲンの定量が欠かせない。従来グリコーゲンの定量にはフェノール硫酸法³⁾、アンスロン硫酸法⁴⁾などが用いられてきた。しかしながら両者とも化学反応に基づく比色法で、特異性に難点があるとともに、感度が低い。これらの方法では、培養細胞スケールの実験の場合、検出限界以下となることが多い。これらを解決するために、蛍光発光法を用いた高感度グリコーゲン定量キットが開発・市販されており、培養細胞中のグリコーゲンの定量に適用した報告が散見される^{5, 6)}。しかし、高感度グリコーゲン定量キットは高価であり、多数サンプルの定量には必ずしも適していない。また、測定キットの付

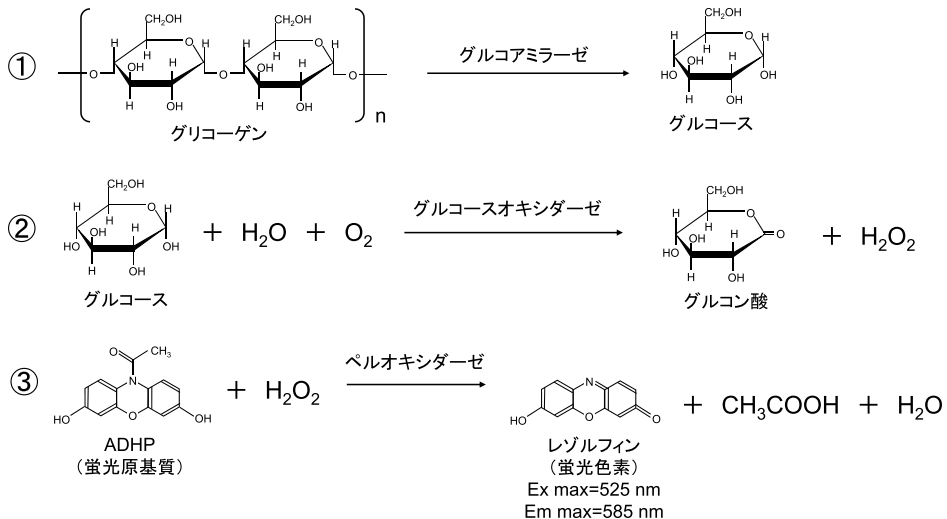


Fig. 1. 本酵素蛍光グリコーゲン定量法の反応過程.

本酵素蛍光法におけるグリコーゲン定量の3段階反応機構。①：最初にグルコアミラーゼを利用してサンプル中のグリコーゲンをグルコースに分解する。②：グルコースをグルコースオキシダーゼにより酸化し、グルコン酸と同時に過酸化水素を生成させる。③：蛍光原基質10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP)を②で生成した過酸化水素とペルオキシダーゼの作用により蛍光色素レゾルフィンに変換する。グルコースからレゾルフィン生成に至る反応は化学量論的に行われるので、適切なグルコース濃度範囲ではレゾルフィンの蛍光強度はサンプル中のグルコース濃度、すなわちグリコーゲン濃度に比例する。

属説明書には参考文献等の記載がされていないものも見受けられ、試薬組成等も明記されていない場合が多い。

そこで本研究では、Fig. 1に示す3つの酵素反応過程を組み合わせ、安価かつ高感度にグリコーゲンを定量できる酵素蛍光法を検討することを目的とした。3つの過程の第一の反応では、グルコアミラーゼによりグリコーゲンをグルコースに加水分解する⁷⁾。次いで、生成したグルコースをグルコースオキシダーゼにより酸化するとともに、過酸化水素を発生させる⁸⁾。最後に、この過酸化水素を電子受容体、蛍光原基質10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) を電子供与体とするペルオキシダーゼ反応により、ADHPを酸化して蛍光色素レゾルフィンに変換する^{9, 10)}。反応②、③のグルコースからレゾルフィン生成に至る反応は化学量論的に行われるので、適切なグルコース濃度範囲においてレゾルフィンの蛍光強度はグルコース濃度に比例する。本研究では、このような定量原理に沿って実験系を検討することを目的とし、さらに本法の検出限界、蛍光定量機器の代用、細胞実験への適用可能性等を検討した。

2. 実験材料ならびに方法

2. 1. 試薬等

ヒト肝細胞ガン由来細胞株HepG2は理化学研究所バイオリソース研究センター(茨城)から購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), ウシ胎児血清 (FBS), リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4), Bicinchoninic acid (BCA) アッセイキットはThermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA) から購入した。ADHP, ペルオキシダーゼ (西洋ワサビ由来), グリコーゲン (カキ由来, 分子栄養生物学研究用特製試薬) はそれぞれフナコシ株式会社 (東京), オリエンタル酵母工業株式会社 (東京), ナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。グルコアミラーゼ (*Rhizopus* sp.由来), グルコースオキシダーゼ (*Aspergillus niger* 由

来), グルコースC II テストワコー, その他の試薬類は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。

2. 2. 細胞培養

細胞内グリコーゲン量の定量の検討は、HepG2細胞を用いて行った。HepG2細胞は10% FBSとPenicillin Streptomycinを含むDMEM中でCO₂インキュベーターにて、37°Cで培養した。1日もしくは2日おきにDMEMを交換し、対数増殖期に継代を行った。

実験前日に細胞を6-wellプレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。実験時の培養液にはKrebs-Henseleit-HEPES (KHH) buffer (pH 7.4, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.7 mM KCl, 118.2 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0.1%牛血清アルブミン)を用いた¹¹⁾。グルコースを培養液に添加する場合は濃度を11 mMとした。グルコースを添加し、所定の時間培養後、培養液を取り除き、PBSで1回洗浄した。PBSを500 μL加え、セルスクレーパーでウェル底面より細胞を回収し、15 mL容マイクロチューブに移した。再度プレートにPBSを500 μL加え、残りの細胞を回収した。続いて、ラボ用冷却遠心機 3-16KL (久保田商事株式会社, 東京) で825×g, 5分間遠心し、上清のPBSを除去した。得られた細胞ペレットに新しいPBSを500 μL加え、ソニケーターVibra-Cell™ (Sonics & Materials, Inc., CT, USA) で30秒間超音波処理を行った。この細胞破砕液をグリコーゲン測定用サンプルとした。

2. 3. グリコーゲンの定量

2. 3. 1. 保存液等の調製

グリコーゲン (カキ由来, 分子栄養生物学研究用特製試薬, ナカライテスク株式会社, 京都) をPBSで10 mg/mLの濃度に調製し、冷蔵庫中で保存した。グルコアミラーゼ酵素原液 (25 U/mL), 1 M酢酸緩衝液 (pH 4.5) はいずれも超純

水で調製し、用時まで冷蔵保存した。蛍光原色素 ADHPは10 mMとなるようジメチルスルホキシド (DMSO) で調製し、用時まで -20°C で冷凍保存した。

2.3.2. グルコアミラーゼ処理によるグリコーゲンの分解

上記2.2. で調製したグリコーゲン測定用サンプル190 μL と1 M酢酸緩衝液10 μL それぞれを2つの1.5 mL容マイクロチューブに取り、よく混和した。2つのチューブの片方にはグルコアミラーゼ酵素液 (25 U/mLグルコアミラーゼ酵素原液1容と1 M酢酸緩衝液19容の混液)を、もう片方にはグルコアミラーゼを含まないブランク液 (超純水1容と1 M酢酸緩衝液19容の混液)を50 μL 加えよく混和させた (最終濃度: 230 mM酢酸緩衝液, 0.25 U/mLグルコアミラーゼ)。あらかじめ 55°C に設定したヒートブロックでこれらの混液を30分加熱し、グリコーゲンをグルコースに分解した。加熱後、5 N NaOH溶液を5 μL 加え、混液のpHを6付近に調整し、水冷した。

2.3.3. グルコース濃度の定量

グルコアミラーゼ処理によるグリコーゲンの分解で生成したグルコースは、Fig. 1に示す②と③の酵素反応を1つのチューブ内で連続させて生じるレゾルフィンの蛍光を測定するグルコースオキシダーゼ法で定量した。過去の研究^{8, 9, 10)}を参考に調製した蛍光グルコース定量試薬混液 (pH 7.0, 150 mM リン酸緩衝液 0.65 U/mL グルコースオキシダーゼ, 9.0 U/mL ベルオキシダーゼ, 10 μM ADHP) 140 μL とグルコアミラーゼ処理サンプル10 μL を黒色96-well平底マイクロプレートに加え、マイクロプレートミキサーで混和させた。その後 37°C で10分インキュベーションし、マイクロプレート対応蛍光分光光度計VarioskanTM LUXマルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA)を用いて励起波長Ex 525 nm, 蛍光波長Em 585 nmにおける蛍光強度を測定した。また、リアルタイム定量PCRシステム Mx3000P (Agilent

Technologies, Inc., CA, USA) で蛍光強度を測定する場合は、蛍光発光グルコース定量試薬混液とグルコアミラーゼ処理サンプルをPCR用チューブに取り、同様に反応させた後、ROXフィルターを用いて蛍光強度を測定した。

100-2000 $\mu\text{g/mL}$ のグリコーゲン標準液を測定する場合は、グルコースオキシダーゼ法に基づく比色定量用キットであるグルコースC IIテストワークー比色法を用いた。透明の96-well平底マイクロプレートに発光試薬140 μL とサンプル10 μL を取り、 37°C で10分間反応させた後、マイクロプレート対応分光光度計Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA)を用いて505 nmにおける吸光度を測定した。

2.3.4. グリコーゲン標準曲線および細胞内総グリコーゲン量の算出

細胞内総グリコーゲン量の算出のための標準曲線は、グリコーゲン保存液を適宜希釈して調製した標準液について、上記2.3.2. および2.3.3. のとおりに処理して得られた蛍光強度または吸光度に基づいて作成した。細胞内総グリコーゲン量は、VarioskanTM LUXマルチモードマイクロプレートリーダーを用いて得られたデータを採用し、グルコアミラーゼ処理試料のデータからグルコアミラーゼ未処理試料のデータを差し引いて算出した。また、超音波処理による細胞破碎液中のタンパク質濃度をBCAアッセイキットで定量し、細胞内グリコーゲン量はタンパク質1 μg あたりで表した。

2.4. 統計解析

統計ソフトはIBM SPSS Statistics ver.20 for Japan (日本アイ・ビー・エム株式会社, 東京)を用いた。2変数間の関係の強さを分析するためにPearsonの積率相関係数を算出した。さらに、独立変数 (グリコーゲン濃度) が従属変数 (蛍光強度または吸光度) をどの程度説明できるのか調べるために単回帰分析を行い、決定係数を算出した。平均値の差を検定するために、一元配置分散

分析後に Tukey HSD による多重比較を行った ($P < 0.05$).

3. 結果と考察

3.1. 定量可能レンジの検討

本研究は、Fig. 1 に示す 3 つの酵素反応過程を組み合わせ、高感度にグリコーゲンを定量できる酵素蛍光法を検討した。酵素蛍光法は感度が高い反面、様々な要因の影響を受けるので、基質濃度と蛍光強度の間の線形性を把握する必要がある。

そこで、0, 1.2, 2.4, 4.8, 12, 24, 50, 120, 240 $\mu\text{g/mL}$ グリコーゲン溶液を用いて本法の定量可能レンジを検討した。測定はグルコアミラーゼ処理試料、未処理試料共に各グリコーゲン濃度 1 点ずつ行った。その結果、グリコーゲン濃度 24 $\mu\text{g/mL}$ までは直線的に蛍光強度が増加していたが、50 $\mu\text{g/mL}$ 以上になるとむしろ蛍光強度が急激に低下し、240 $\mu\text{g/mL}$ では蛍光を検出できなかった (Fig. 2)。

本法で使用している蛍光原基質 ADHP は、過酸化水素を電子受容体とし、ペルオキシダーゼにより酵素的に酸化され、蛍光色素であるレゾルフィンに変換される。一方、過去の文献では、このペルオキシダーゼ反応液中の過酸化水素の濃度が数 μM を超えると、レゾルフィンが酵素的に低蛍光性物質に変換されること、また過酸化水素濃度が 100 μM 以上になると、ADHP からレゾルフィンへの変換が急激に抑制されることが報告されている¹⁰⁾。さらに、レゾルフィンの蛍光強度は、溶液の pH が 7 を下回ると著しく減弱することが示されている¹⁰⁾。定量反応液中のグリコーゲン濃度が高い場合、Fig. 1 の②で示した反応でより多くの過酸化水素が生成する。また、Fig. 1 の③にも示した通り、ADHP がレゾルフィンになる過程で生成される酢酸も増加する¹²⁾。これらの要因が重なり、グリコーゲン濃度が高い場合に、蛍光強度の著しい低下を来した可能性が推定される。

なお、グルコアミラーゼ未処理試料も同時に定

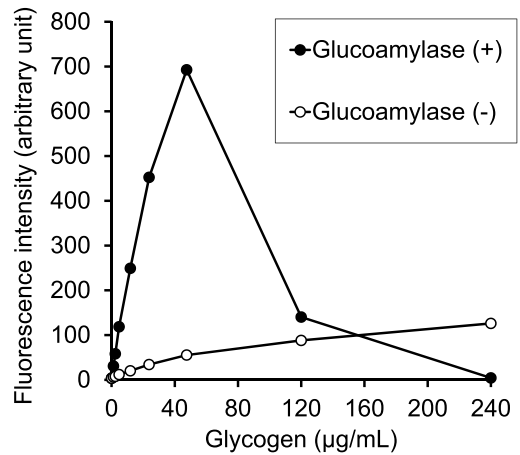


Fig. 2. グリコーゲン定量レンジの確認。

グリコーゲン標準液を 0-240 $\mu\text{g/mL}$ に調製し、本法の定量可能レンジの検討を行った。グルコアミラーゼ未処理サンプルも同様に実験を行った。

量した結果、試料中のグリコーゲン濃度依存的に蛍光強度が増強した。この原因として、グリコーゲン標品中のグルコースの混在、あるいはグリコーゲンの非酵素的分解等の可能性が考えられる。

以上の蛍光原基質 ADHP の特性とグルコアミラーゼを未処理試料の結果を踏まえると、グリコーゲンの濃度を適切な量 (20 $\mu\text{g/mL}$ まで) に適宜希釈し定量に用いることが定量系の設計および結果の解釈に重要であると考えられた。

3.2. グルコアミラーゼ処理時間の検討

実験プロトコルをさらに最適化するため、Fig. 1 中の①に当たるグルコアミラーゼによる処理時間を検討した。グリコーゲン溶液の濃度は 0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ とし、各濃度 1 点ずつ測定した。グルコアミラーゼ処理時間が 15 分までは時間の経過とともに蛍光強度が増加したが、30 分以降ではほぼ一定となった (Fig. 3A)。

また、グルコアミラーゼ処理時間 30 分について、グリコーゲン標準液の蛍光強度をグラフに示

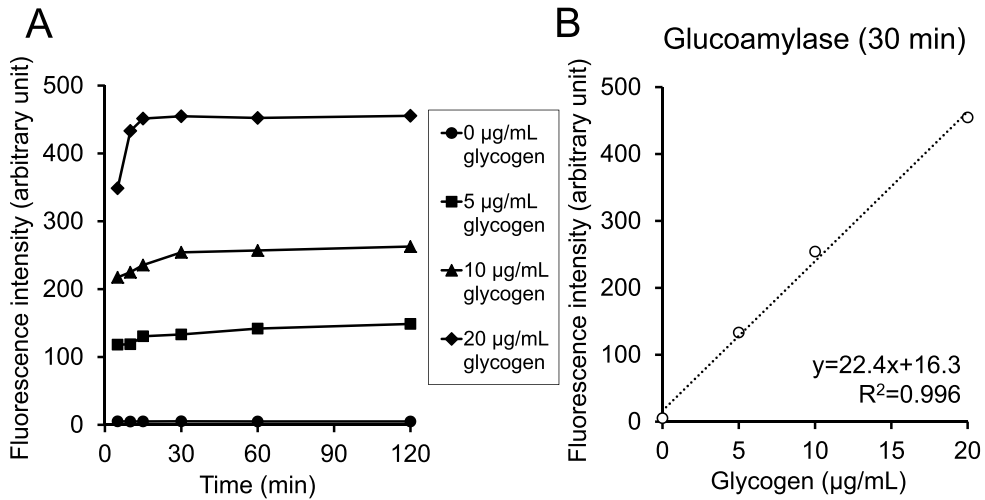


Fig. 3. グルコアミラーゼ処理時間による蛍光強度の変化.

グルコアミラーゼ処理時間を5-120分とし、処理後のサンプル中に含まれているグルコースを蛍光法で定量した。A：グルコアミラーゼ反応時間による蛍光強度の変化。B：グルコアミラーゼ反応30分時点におけるグリコーゲン濃度と蛍光強度の検量線。Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した (n=4)。

した (Fig. 3B)。その結果グリコーゲン濃度と蛍光強度間の相関係数は0.998で有意な正の相関が認められた ($P=0.002$, n=4)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=22.4x+16.3$ で示され、決定係数 R^2 は0.996 ($P=0.002$)であり、良好な直線性が得られた。

以上の結果を踏まえ、本法ではグルコアミラーゼ処理時間を蛍光強度がほぼ最大となる30分とした。

3.3. 種々の濃度に調製したグリコーゲン標準液の検量線の検討

本酵素蛍光法の検出限界を調べるため、グリコーゲン濃度2.0 µg/mL以下の濃度域における蛍光強度の用量反応性を検討した。測定は各グリコーゲン濃度1点ずつ行った。その結果、0-20 µg/mLの場合、グリコーゲン濃度と蛍光強度の間に良好な直線性が認められた (Fig. 4A)。両者の相関係数は0.998で有意な正の相関が認められ

た ($P<0.001$, n=6)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=11.8x+2.74$ で示され、決定係数 R^2 は0.996 ($P<0.001$)であった。なお、グリコーゲン濃度が0.1 µg/mLを下回ると蛍光はほぼ検出されなかった。したがって、本法のグリコーゲン検出限界は0.1 µg/mLであると考えられた。

一方、試料中のグリコーゲン濃度が50 µg/mLを超える場合は、Fig. 2のように、本酵素蛍光法による定量は不適切である。そこでグルコアミラーゼ反応までは本法の通りに行い、グルコアミラーゼ処理後のサンプル中グルコース濃度を定量する際は本法蛍光法ではなく従来の比色法を用いて検討した (Fig. 4B)。測定は各グリコーゲン濃度1点ずつ行った。その結果、グリコーゲン濃度と吸光値間の相関係数は0.999で有意な正の相関が認められた ($P<0.001$, n=6)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=0.0004x+0.062$ で示され、決定係数 R^2 は0.999 ($P<0.001$)

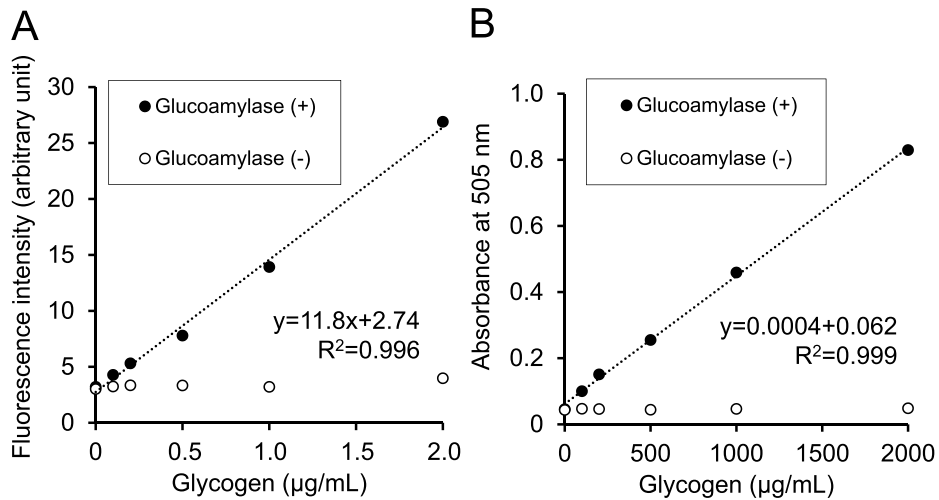


Fig. 4. 種々の濃度に調製したグリコーゲン標準液の検量線の検討.

A: 本酵素蛍光法の検出限界値を調べるため0.1-2.0 µg/mLのグリコーゲン標準液で定量した. B: 1000-2000 µg/mLのグリコーゲン標準液について, グルコアミラーゼ反応までは同様にを行い, サンプル中に含まれているグルコースは比色法で定量した. AとBいずれも Pearsonの積率相関係数を算出したのち, 単回帰分析により決定係数を算出した (n=6).

であった. グルコアミラーゼを添加していない群も同時に定量したが, 比色法では遊離グルコースが検出限界以下 (100 µg/mL以下) であった.

以上の結果より, 定量したいサンプル中のグリコーゲン濃度に合わせて本酵素蛍光法と従来の比色法を採用することにより, 様々なサンプル中のグリコーゲン濃度の定量に応用が可能であることが示された.

3. 4. リアルタイム定量PCRシステム Mx3000P の利用性に関する検討.

研究環境の状況により, マイクロプレートリーダー対応蛍光分光光度計が整備されていない場合であっても, これを代替できる装置の利用により, 本酵素蛍光法は実施可能となる. 筆者らは, PCRによるDNAの増幅を蛍光色素由来の蛍光強度の増大により検知するリアルタイム定量PCRシステムに着目した. とくにMx3000P (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) は, 励起側・蛍光

側からなるフィルターセットを複数備えており, そのうち蛍光色素の特性に対応する1つを選択することで, 96-wellマイクロプレートと同一ディメンションにセットしたPCRチューブ内試料の蛍光を測定できる可能性がある. 本法で使用している蛍光原基質ADHPはFig. 1で示したように蛍光色素であるレゾルフィンを生成する. レゾルフィンの励起・蛍光スペクトルはFig. 5Aのとおりであり, Mx3000P付属のフィルターセットのうち, ROX™/Texas Red® (ROX) フィルターはレゾルフィンの励起・蛍光極大波長をカバーしている. よって, このフィルターを用いて, 本法によるグリコーゲン定量へのMx3000Pの利用可能性を検討した.

グリコーゲン濃度0-20 µg/mLの試料について, 実際にリアルタイム定量PCRシステムで測定した. 測定は各グリコーゲン濃度1点ずつ行った. 2.0 µg/mLまでは直線性が保たれていたが, 5-10 µg/mL付近で蛍光強度は上限に達した (Fig.

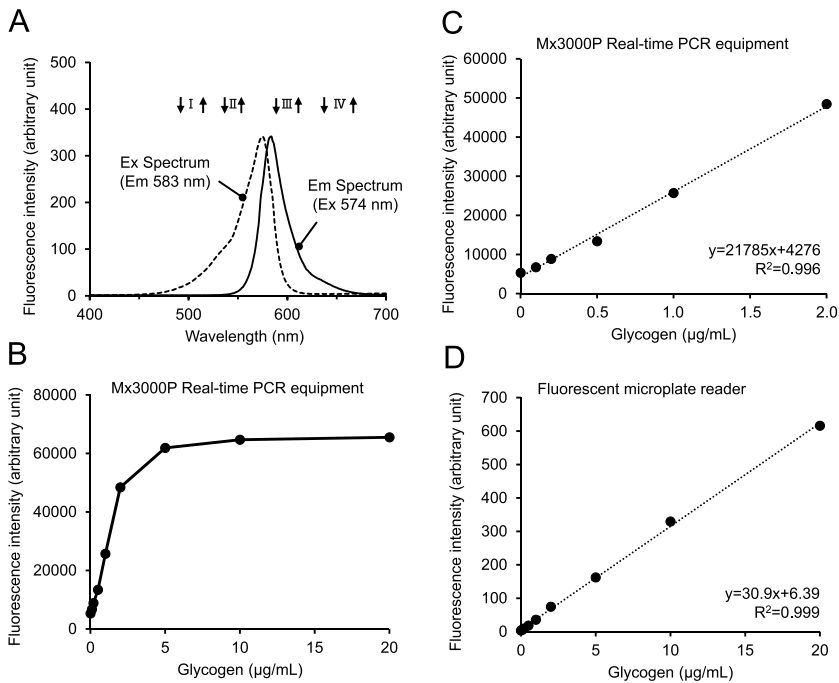


Fig. 5. リアルタイム定量PCRシステムMx3000Pの利用性に関する検討.

0-20 $\mu\text{g/mL}$ グリコーゲン標準液を調製し、リアルタイム定量PCRシステムMx3000PのROXフィルターを用いて蛍光強度を測定した。また、蛍光プレートリーダーでも同様に蛍光強度を測定した。A：レゾルフィンの励起・蛍光スペクトル。ローマ数字はMx3000P付属のフィルターセットを示す。下向きおよび上向きの矢印は、それぞれ励起および蛍光フィルターの平均波長を示す。I：FAMTM/SYBR[®] Green I (Ex 492 nm, Em 516 nm), II：HEXTM/JOETM/VICTM (Ex 535 nm, Em 555 nm), III：ROXTM/Texas Red[®] (Ex 585 nm, Em 610 nm), IV：Cy5TM (Ex 635 nm, Em 665 nm)。B：Mx3000Pで測定した0-20 $\mu\text{g/mL}$ グリコーゲン標準液の蛍光強度。C：Mx3000Pで測定した0-2.0 $\mu\text{g/mL}$ グリコーゲン標準液の蛍光強度と検量線 ($n=6$)。D：蛍光プレートリーダーで測定した0-20 $\mu\text{g/mL}$ グリコーゲン標準液の蛍光強度と検量線 ($n=9$)。Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した。

5B). そこで直線領域である0-2.0 $\mu\text{g/mL}$ を抜粋し、新たにグラフを作成した (Fig. 5C). グリコーゲン濃度と蛍光強度間の相関係数を調べたところ、0.998で有意な正の相関が認められた ($P < 0.001$, $n=6$). さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y = 21785x + 4276$ で示され、決定係数 R^2 は 0.996 ($P < 0.001$) であり、良好な直線性が確認された。

また、同様の条件で調製した試料について蛍光プレートリーダーで測定した結果を Fig. 5D に示

す。グリコーゲン濃度と蛍光強度間の相関係数は 0.999 で有意な正の相関が認められた ($P < 0.001$, $n=9$). さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y = 30.9x + 6.39$ で示され、決定係数 R^2 は 0.999 ($P < 0.001$) であった。

以上より、定量上限値は低下するが、ROX フィルターを備えたリアルタイム定量PCRシステム Mx3000P は、マイクロプレート対応蛍光光度計プレートリーダーを代行して、本酵素蛍光法に利用可能であることが示された。

3. 5. HepG2細胞のグリコーゲン量の消長の検討

続いてHepG2細胞を用いて実験を行った。HepG2細胞は長年ヒト肝臓代替モデルとして広く使用されている培養細胞株であり、グリコーゲンを合成・蓄積することができる¹³⁾。そこで、本酵素蛍光法を用いてHepG2細胞の細胞内グリコーゲン量の消長を検出可能か検討した。

3. 5. 1. グルコース非含有培養液で培養した際の細胞内グリコーゲン量の変化。

肝臓内グリコーゲンは空腹時に分解されて、エネルギーまたは血糖値維持のために利用される¹⁴⁾。そこでまず、グルコース非含有KHH bufferで培養した際の細胞内のグリコーゲン蓄積量に与える影響を、本酵素蛍光法により検出が可能であるか検討した。実験方法については、詳細をFig. 6Aに示す。実験開始前の細胞内に含まれているグリコーゲン量、すなわち0 h時点における細胞内グリコーゲン量は6.81 ng/μg protein (タンパク質

標準化前のサンプル中グリコーゲン濃度：5.4 μg/mL)であった。過去の報告^{15,16,17)}によると、HepG2細胞ではおよそ4-10 ng/μg proteinのグリコーゲンが含まれており、本研究の結果はこれらの既報値とよく一致した。一方、細胞内グリコーゲン量は、グルコースを含まない培養液に交換してから2時間後で既に、初期値のおよそ15%へと著しく減少しており、4時間後ではグリコーゲンはほぼ検出できなくなるまで枯渇していた (Fig. 6B)。

3. 5. 2. 細胞内グリコーゲン枯渇状態からの回復。

続いて、HepG2細胞をグルコース非含有KHH bufferで培養して細胞内グリコーゲンを枯渇させ、その後培養液にグルコースを添加した際の細胞内グリコーゲン量の回復を調べた。細胞内グリコーゲン枯渇状態からの回復の実験方法については、詳細をFig. 7Aに示す。グルコースを含まない培養液で2時間培養し、細胞内のグリコーゲンを枯渇させた0 h時点では0.69 ng/μg protein (タ

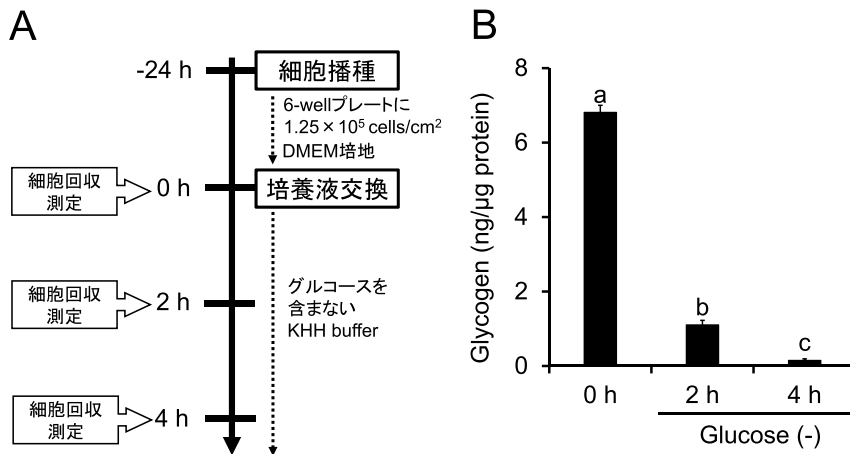


Fig. 6. グルコース非含有培養液で培養した際の細胞内グリコーゲン量の変化。

実験前日にHepG2細胞をDMEM培地中に懸濁させ、6-wellプレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。翌日に培養液をグルコース非含有KHH bufferに交換し、培養0, 2, 4時間後に細胞を回収して細胞内グリコーゲン量を定量した。細胞内グリコーゲン量はタンパク質1 μgあたりで表した。A：実験スケジュール。B：Aで示したスケジュールに沿って実験を行った際の細胞内グリコーゲン量。値は平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析後、Tukey HSDによる多重比較を行った。異なるアルファベット間に有意差あり (P<0.05)。

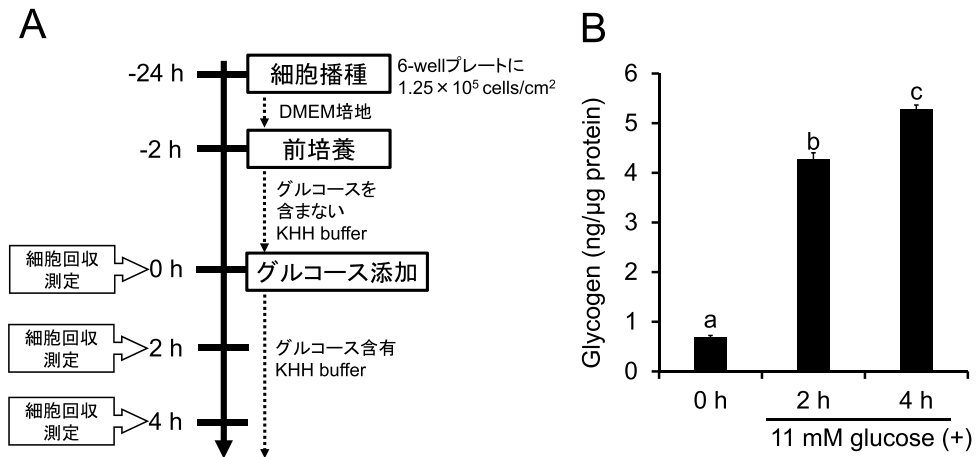


Fig. 7. グリコーゲン枯渇状態からの細胞内グリコーゲン量の回復.

実験前日にHepG2細胞をDMEM培地中に懸濁させ、6-wellプレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。翌日に培養液をグルコース非含有KHH bufferに交換し、2時間培養することで細胞内グリコーゲン量を枯渇させた。その後11 mMのグルコースを含むKHH bufferに交換し、培養0、2、4時間後に細胞を回収して細胞内グリコーゲン量を定量した。細胞内グリコーゲン量はタンパク質1 μgあたりで表した。A：実験スケジュール。B：Aで示したスケジュールに沿って実験を行った際の細胞内グリコーゲン量。値は平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析後、Tukey HSDによる多重比較を行った。異なるアルファベット間に有意差あり ($P < 0.05$)。

ンパク質標準化前のサンプル中グリコーゲン濃度：0.78 μg/mL)であったが、グルコースを添加すると細胞内グリコーゲン量は急速に回復し、グルコース添加4時間後ではFig. 6で示した実験前の細胞内グリコーゲン量とほぼ同水準まで回復した (Fig. 7B)。

以上の結果より、本酵素蛍光法は培養細胞内の微量グリコーゲンを高感度で定量することが可能であり、さらに培養条件によるグリコーゲン量の消長を鋭敏に検出できることが明らかとなった。

4. 本研究の限界と今後の展望

本法は培養細胞スケールにおけるグリコーゲン量の差異を検出できたが、まだ限定的な実験にとどまっており、グリコーゲン定量方法を構築するためにはさらなる検討を要する。今後は既存の測

定方法との比較、室内再現性や室間再現性の検討、添加回収試験の実施など、詳細な検討を進める必要があると考える。

5. 結語

本研究では、グルコアミラーゼによるグリコーゲンの分解で生成するグルコースを、蛍光原基質ADHPを用いてグルコースオキシダーゼ法で検出する、グリコーゲンの高感度定量法を検討した。本法の定量範囲は0.1-20 μg/mLであり、培養細胞スケールのグリコーゲンの定量に活用できることが明らかとなった。また、本法はROXフィルター装着リアルタイム定量PCRシステムを用いる蛍光測定への適用が可能 (定量範囲：0.1-2.0 μg/mL)であった。さらに、培養肝細胞HepG2を用いて培養液の栄養状態による細胞内グ

リコーゲン量の消長を本研究の手法により検出することを可能とした。

本研究の一部は平成29年度プロジェクト研究「肝細胞株におけるインスリンを凌ぐピルビン酸の糖・脂質代謝促進作用とその機構」の助成により行われたものである。

参考文献

- 1) 吉川 春寿, 芦田 淳 編 (1994) 総合栄養学辞典 スタンダード版, 第4版, pp 178-179. 同文書院, 東京.
- 2) Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin* 2016;5:85-100.
- 3) DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28:350-6.
- 4) Morris DL. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 1948;107:254-5.
- 5) Pelletier J, Bellot G, Pouysségur J, Mazure NM. Biochemical titration of glycogen in vitro. *J Vis Exp* 2013:e50465.
- 6) Guo J, Li C, Yang C, Li B, Wei J, Lin Y, Ye P, Hu G, Li J. Liraglutide reduces hepatic glucolipotoxicity-induced liver cell apoptosis through NRF2 signaling in Zucker diabetic fatty rats. *Mol Med Rep* 2018;17:8316-24.
- 7) Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, Frandsen TP, Mirgorodskaya E, Harrison M, Roepstorff P, Svensson B. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim Biophys Acta-Protein Struct Mol Enzymol* 2000;1543:275-93.
- 8) Raba J, Mottola HA. Glucose oxidase as an analytical reagent. *Crit Rev Anal Chem* 1995;25:1-42.
- 9) Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 1997;253:162-8.
- 10) Towne V, Will M, Oswald B, Zhao Q. Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: Appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. *Anal Biochem* 2004;334:290-6.
- 11) Kawano A, Nakamura H, Hata S, Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K. Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine* 2009;16:437-43.
- 12) Vanachayangkul P, Tolleson WH. Inhibition of heme peroxidases by melamine. *Enzyme Res* 2012; Article ID 416062.
- 13) Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Protoc Vitro Hepatocyte Res* 2015;1250:77-93.
- 14) Adeva-Andany MM, Perez-Felpete N, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep* 2016;36:e00416.
- 15) Ungaro P, Teperino R, Mirra P, Longo M, Ciccarelli M, Raciti GA, Nigro C, Miele C, Formisano P, Beguinot F. Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α -driven epigenetic silencing of the human PED gene. *Diabetologia* 2010;53:1482-92.
- 16) Liang G, Wang F, Song X, Zhang L, Qian Z, Jiang G. 3-Deoxyglucosone induces insulin

resistance by impairing insulin signaling in HepG2 cells. *Mol Med Rep* 2016;13:4506-12.

- 17) Terashima M, Fujita Y, Togashi Y, Sakai K, De Velasco MA, Tomida S, Nishio K. KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase β -subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget* 2014;5:7040-50.