

狙った細胞内小器官脂質の可視化に成功

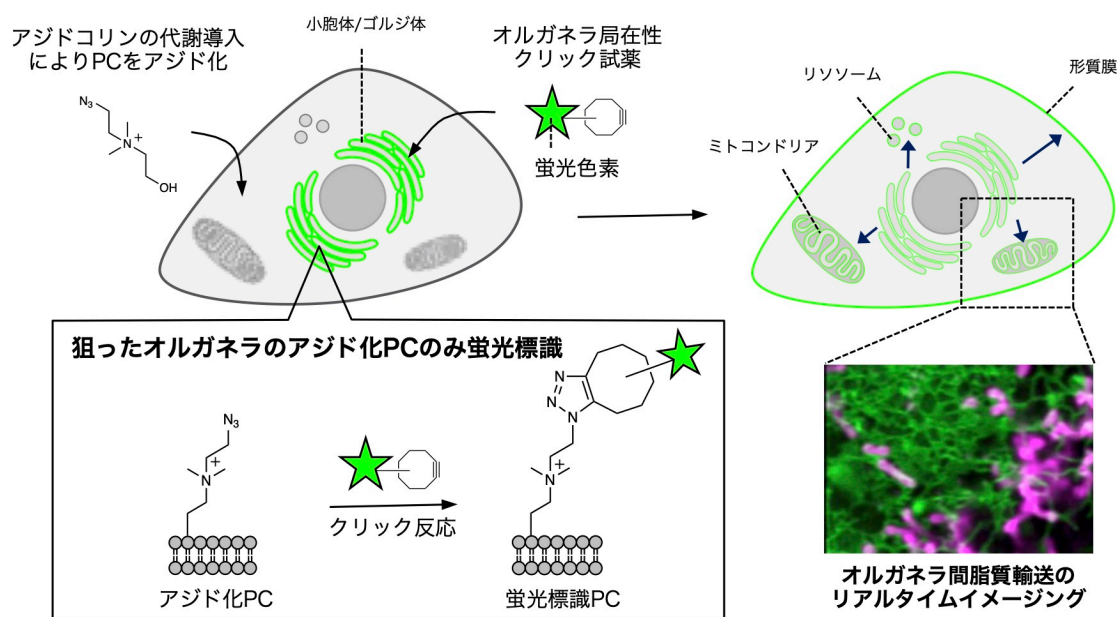
—オートファゴソーム形成機構解明に貢献—

概要

京都大学大学院工学研究科 浜地 格 教授、田村 朋則 講師らの研究グループは、細胞内小器官（オルガネラ）膜の主要構成成分であるリン脂質（ホスファチジルコリン:PC）を選択的に蛍光標識し、細胞内での動きをリアルタイムに可視化できる新しい方法を開発しました。

PCは主に小胞体やゴルジ体で生成された後、他のオルガネラ（例えばミトコンドリア膜や形質膜）に輸送されます。こうしたPC輸送は細胞の機能や生存に重要ですが、直接観察する方法が無かったため、これまで理解が不十分でした。本研究グループは、「オルガネラに局在する反応性試薬」と「PCの代謝的アジド化法」を組み合わせた独自のアイデアで、特定のオルガネラにあるPCを選択的に蛍光標識することに成功し、オルガネラ間PC輸送の可視化を世界で初めて実現しました。さらに、オートファジー（2016年に大隅良典博士がノーベル賞受賞）の際に出現する膜の起源解明に本手法を適用し、小胞体膜がオートファゴソームにPCを供給する様子を生細胞内で直接観察することに初めて成功しました。この成果は、研究ツールの乏しさゆえに不明な点の多い細胞内脂質輸送機構の解明に向けた大きなブレークスルーにつながると期待されます。

本研究成果は、2020年9月22日に国際学術誌「Nature Chemical Biology」にオンライン掲載されました。



1. 背景

私たちヒトの細胞（真核細胞）は脂質二重層からなる形質膜によって包まれ、その内側にはさらに核やミトコンドリアといった、脂質膜で形成される細胞内小器官（オルガネラ）が存在しています。これら生体膜の主要構成脂質であるホスファチジルコリン(PC)は、主に細胞内の小胞体（Endoplasmic reticulum: ER）やゴルジ（Golgi）体（以下、ER/Golgi）で生合成された後、小胞輸送や膜接触など様々な経路を介して他のオルガネラ膜や形質膜に輸送されます(図1)。輸送された PC はそこで別の構造を持つ脂質に変換されたり、さらに別のオルガネラ膜に転移したりするなど、細胞内の PC は非常にダイナミックにその性質・局在を変化させていると考えられています。

こうしたオルガネラ間 PC 輸送は各オルガネラの機能発現や恒常性維持において重要な役割を担っているとされていますが、その詳細な輸送機構や定量的なパラメータ（輸送速度、量など）はいまだ明らかとなっておりません。これは、細胞内の特定の場所に存在する PC を選択的に可視化し、その動態を解析する手法が無いからです。脂質分子は遺伝子に直接コードされていないので、近年の細胞生物学で威力を発揮してきた緑色蛍光タンパク質 (GFP) のように遺伝子レベルで蛍光プローブを標識することはできません。そのため、これまで、脂質の可視化解析は主に蛍光修飾した脂質結合性タンパク質、あるいは蛍光色素を修飾した合成脂質によって行われてきました。しかし、前者は形質膜表面の脂質にしか適用できず、後者は狙ったオルガネラの可視化ができないため、どちらも脂質のオルガネラ間輸送の解析には不向きでした。

2. 研究手法・成果

こうした背景から、本研究グループは、特定のオルガネラ脂質を生細胞内で選択的に蛍光修飾することができる新たな手法を考案しました(図2a)。本手法では、はじめにアジドコリンの代謝導入法を用いて細胞内のコリン含有脂質(主に PC)をアジド化脂質に変換します。次に、標的のオルガネラに存在するアジド化脂質を「オルガネラ局在性クリック試薬(organelle-localizable click reagent: OCR)」によって蛍光標識します。OCRはオルガネラ局在性蛍光色素と歪みアルキンから構成されており、狙ったオルガネラに自発的に濃縮し、アジド-歪みアルキン間で特異的に進行するクリック反応によってアジド化 PC を標識できます。

上述のように ER/Golgi は PC 生合成の場であり、ER/Golgi に存在する PC の動態解析は脂質輸送を理解する上で非常に重要です。そこで本研究グループは、初めに ER/Golgi に局在することが知られているロドール色素を歪みアルキンに連結した OCR 1 を合成し、ER/Golgi に存在する PC の蛍光標識を試みました(図2b)。まず OCR 1 をヒト由来 HeLa 細胞に添加し、その局在を共焦点蛍光顕微鏡によって確認したところ、OCR 1 由来の蛍光は ER/Golgi からのみ検出され、狙い通りの局在性を示すことがわかりました。次に、アジドコリンを代謝導入した細胞に対して OCR 1 を添加した後、脂質を抽出して反応生成物を解析したところ、OCR 1 がアジド化 PC と反応していることがわかりました。さらに顕微鏡観察からこの標識反応が ER/Golgi で特異的に起こっていることが実証されました(図2c)。また特筆すべきことに、未反応の OCR 1 は細胞を血清含有培地で洗浄することで除去可能であり、この操作によって OCR 1 で標識した PC (以下、1-標識 PC) のみを顕微鏡観察できました。

本手法は OCR のオルガネラ局在性蛍光色素を変更することで、容易に標的オルガネラを変更できます。実際に、色素部位をミトコンドリアに局在することが知られているローダミンに置き換えると、ミトコンドリアに存在する PC のみを蛍光標識できました。また、形質膜非透過性の AlexaFluor647 色素を用いると形質膜層の PC のみを標識でき、さらにこれらの試薬を同時に使用することで、ER/Golgi、ミトコンドリア、形質膜

表層の PC をそれぞれ異なる波長を持つ色素で別々に可視化することもできました。以上の結果から、本手法は様々なオルガネラ膜の PC を可視化することができる一般性の高い手法であることが実証されました。

続いて、1-標識 PC が天然の PC と同様に ER/Golgi から他のオルガネラ膜に輸送されるかどうかを確かめるために、標識後の細胞を顕微鏡で長時間観察しました。その結果、標識反応直後に ER/Golgi から検出された 1-標識 PC 由来の蛍光は時間経過とともに徐々に減少しました。この蛍光減少を測定することで、ER/Golgi からの PC 流出速度を世界で初めて定量解析することに成功しました(図 3 a)。また、修飾反応後 1 時間以上経過した細胞では、1-標識 PC の蛍光はミトコンドリアや形質膜、リソソームから検出されました。このことから、1-標識 PC は天然 PC と同様、他のオルガネラへの移行能を持っており、本手法がオルガネラ膜間脂質輸送のプロープとして利用可能であることが示されました。

また興味深いことに、この実験の過程で本研究グループは ER に存在する脂質がオートファゴソーム膜（およびその前駆体の隔離膜）に移動することを見いだしました(図 3 b)。こうしたオートファゴソーム膜への移行は ER 内腔タンパク質や ER 膜タンパク質では起こらず、1-標識 PC、すなわち脂質分子に特異的に観察されました。大隈良典博士のノーベル賞受賞で注目を集めたオートファゴソームは、オートファジーによって誘導されるベシクル（球殻状に閉じた膜構造を持つ小胞）であり、細胞内成分のバルク分解および再利用に関わるオルガネラです。オートファジー現象が発見されて半世紀を経て、その生理的な役割の解明は大きく進みましたが、オートファゴソーム膜の起源（膜がどこから現れるのか）や形成機構はいまだ不明のままです。近年ではその由来として ER、ミトコンドリア、細胞膜など様々な説が提唱されており、今なお議論が続いています。これまで議論に決着がつかなかったのは、生きた細胞で脂質膜そのものの動態をリアルタイムに可視化できる手法が無かったためでした。これに対して、本研究で得られた結果は、オートファゴソーム膜の由来が主に ER であること示す直接的な証拠となるものです。

3. 波及効果、今後の予定

本手法は ER/Golgi、ミトコンドリア、形質膜表層に存在する PC をそれぞれ独立に蛍光標識でき、標識された PC は天然 PC と同様にオルガネラ間を移動できます。このことから、本手法を用いることで今後は複数のオルガネラ間脂質輸送を蛍光イメージングで同時に追跡するといった応用が可能になると考えられます。また、化合物ライブラリーや遺伝子ノックアウトスクリーニングシステムと組み合わせることで、細胞内脂質輸送を制御する未知の分子やタンパク質の同定にも有効であると予想されます。こうした応用展開は脂質代謝異常の診断・治療につながると期待されます。今後は本手法に適用可能なオルガネラをさらに拡張することで、いまだ謎の多い細胞内脂質輸送の分子機構の解明に貢献したいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 総括実施型（ERATO）

研究領域：「浜地ニューロ分子技術」（研究総括：浜地 格 京都大学 教授）

文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究

研究領域：「分子夾雑の生命化学」（領域代表者：浜地 格 京都大学 教授）

研究課題名：「分子夾雑下での生命分子の直接修飾/機能解析を実現する有機化学」（研究代表者：浜地 格 京

都大学 教授)

関連研究機関

京都大学、京都産業大学、山形大学

<用語解説>

オートファゴソーム：異常な細胞内タンパク質やオルガネラを分解するために細胞内で生じる二重膜に囲まれた球状の構造。

緑色蛍光タンパク質 (GFP)：オワンクラゲが持つ蛍光性タンパク質で、タンパク質の蛍光標識に用いられる。

アジドコリンの代謝導入法：天然の細胞内には存在しないアジド基を PC に導入するための方法。コリンに類似した構造を持つアジドコリンを含む培地中で細胞を培養すると、これが代謝経路に誤導入されアジドコリンを持つ PC が生合成される。

歪みアルキン：構造的に歪んだアルキン（三重結合を持つ炭化水素）。無触媒条件下でアジド基と選択的に反応し環化付加生成物を与える。

<研究者のコメント>

この研究は、我々が進めてきたオルガネラ局在分子によるタンパク質標識と可視化という全く別のプロジェクトから、大きくはみ出した形で派生したものです。我々のグループにとって細胞膜脂質解析は全く未知の挑戦でしたが、藤沢博士（現フナコシ株式会社）と土谷博士（現浜地研青藍プログラム助教）を中心に粘り強く研究を進め、京都大学の梅田真郷先生、京都産業大学の遠藤斗志也先生、山形大学の田村康先生のご協力もあって素晴らしい成果につながりました。今回開発した手法は細胞内脂質動態解析のための有用な研究ツールとして、いまだ理解が進んでいない脂質研究を、これまでになく視点から大きく加速することが期待されます。（田村講師）

<論文タイトルと著者>

タイトル：Organelle membrane-specific chemical labelling and dynamic imaging in living cells

著者：Tomonori Tamura, Alma Fujisawa, Masaki Tsuchiya, Yuying Shen, Kohjiro Nagao, Shin Kawano, Yasushi Tamura, Toshiya Endo, Masato Umeda, Itaru Hamachi

掲載誌：Nature Chemical Biology DOI：10.1038/s41589-020-00651-z

<参考図表>

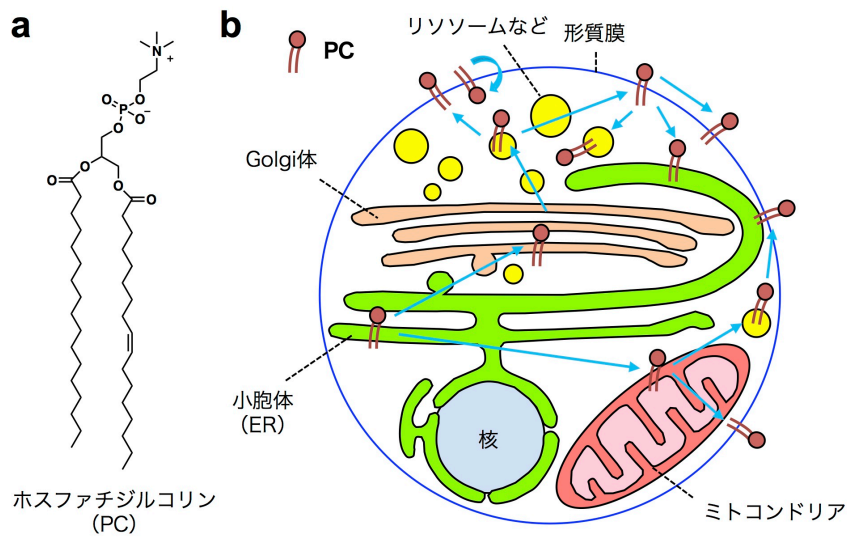


図1 (a) ホスファチジルコリン (PC) の分子構造。(b) PC は ER や Golgi 体で生合成された後、他のオルガネラに輸送される。

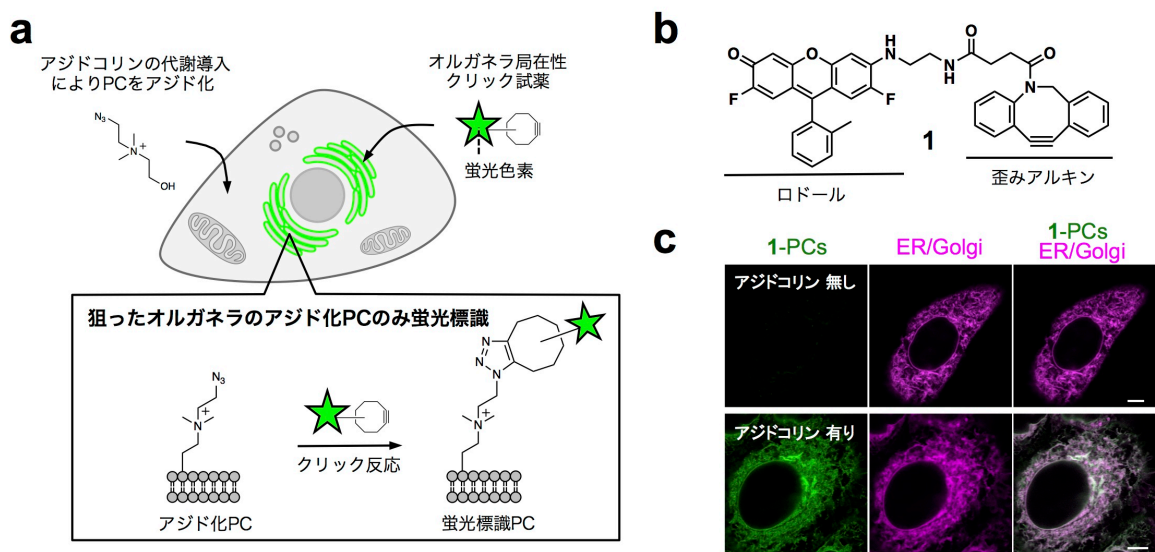


図2 (a) オルガネラ脂質選択的標識の反応スキーム。(b) OCR1 の分子構造。(c) 1-標識 PC (1-PC) の細胞内局在。その局在は ER/Golgi マーカーと一致した。

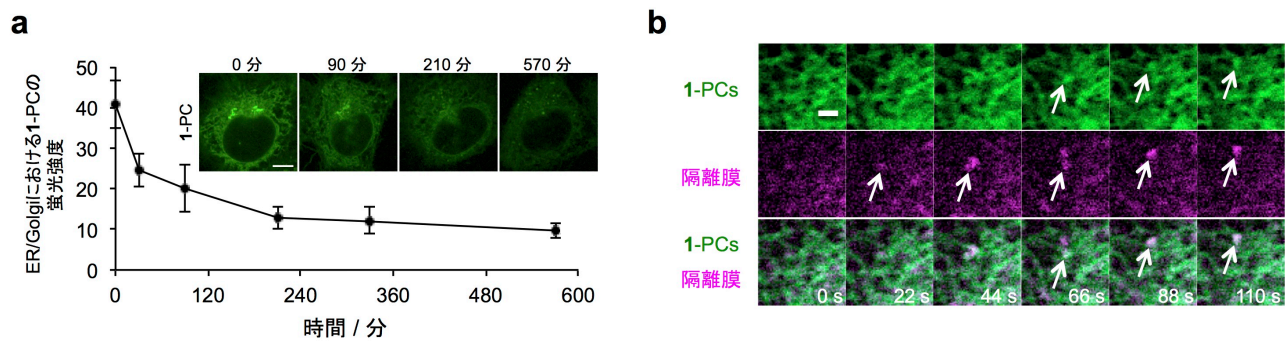


図3 (a) ER/Golgiからの1-標識PC流出過程の測定結果。(b) 1-標識PCのオートファゴソーム前駆体(隔離膜)への移行。