

**【目的】** 分子生物学の飛躍的發展とそれに基づくゲノミクス、プロテオミクスの展開により、DNA・RNA と蛋白質についての知見は急速に増加している。生体膜についても膜蛋白質に関する研究は高度化し、多くの知見が集積されている。しかし膜脂質に関しては有力な解析技術が少ないため、まだまだ未知の点が多く残されている。我々は、急速凍結・凍結割断レプリカ標識法 (Quick-freezing & freeze-fracture replica labeling method : QF-FRL) によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示し、各種脂質の二次元的分布をナノレベルで解明することに成功した。生体膜を構成する脂質は“頭部”の親水性部位とそれに結合する脂肪酸の“尾部”である疎水性部位により構成される。QF-FRL 法では、生体膜を構成する脂質の“親水性頭部”に結合するプローブで標識することにより、生体膜を構成する各種脂質の微細分布を可視化することは可能となった。しかしながら、今まで用いてきた QF-FRL 法では疎水性“尾部”の脂肪酸は全く解析することが不可能である。本研究では、QF-FRL 法をさらに改良することにより、逆転凍結レプリカ脂肪酸標識法を新たに開発し、生体膜における脂肪酸分布をナノレベルで解析することを可能にする。アルキン化した脂肪酸を投与してから急速凍結する時間を変えることにより、経時的に局在部位、微細分布の変化を明らかにし、脂肪酸が持つ生理活性化発現機序の解明を目指す。

**【方法】** HeLa 細胞の生体膜のオレイン酸を代謝標識するために、培養液内にアルキン化オレイン酸を混入して一昼夜 (14 hr) 37°C で培養した。固定後、biotin-azide 溶液で処置し、クリックケミストリー反応を起こして、生体膜内のアルキン化オレイン酸を biotin で標識した。その後、マウス抗 biotin 抗体、そして Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体で蛍光標識を行った。生体膜レプリカ標本については以下の方法を用いた。アルキン化オレイン酸存在下で培養した HeLa 細胞を加圧凍結装置により凍結し、凍結割断後レプリカ標本を作製した。レプリカ薄膜を PBS で洗浄後、上述の様に、クリックケミストリー反応を起こして、マウス抗 biotin 抗体、そして 10 nm 金コロイド標識抗マウス IgG 抗体で標識を行った。

**【結果】** HeLa 細胞の細胞膜、および細胞内の構造体に蛍光標識が確認できた (下図)。培養液内のアルキン化脂肪酸を入れて哺乳類培養細胞を培養することにより、生体膜の脂肪酸を蛍光標識し可視化できることが確認できた。一方、逆転凍結レプリカ脂肪酸標識法を用いて電子顕微鏡により脂肪酸の微細分布を検討する実験を行った。エッチングを行ったレプリカ薄膜では、アルキン化オレイン酸あるいはアルキン化アラキドン酸共に、生体膜において特異的な標識を得ることはできなかった。一方、逆転凍結レプリカ脂肪酸標識法を用いて電子顕微鏡により脂肪酸の微細分布を検討する実験を行なった。エッチングをしなかったレプリカ薄膜では、アルキン化アラキドン酸のアルキン基を標識することに成功した。これらの結果から、生体膜に存在するアラキドン酸が親水性領域側にアルキン基、つまり脂肪酸の末端が露出していることが示唆された。

アルキン化オレイン酸を取り込ませた Hela 細胞

