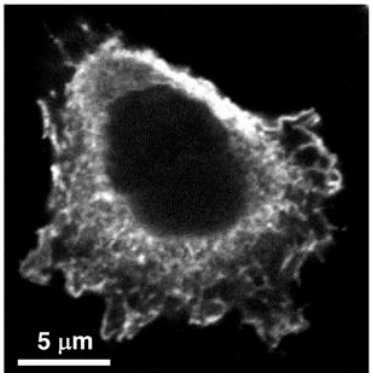
49　膜脂質の疎水性領域を可視化する逆転レプリカ法の開発	藤田　秋一

【目的】分子生物学の飛躍的発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℃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



49. 膜脂質の疎水性領域を可視化する逆転レプリカ法の開発

藤田　秋一

鹿児島大学 共同獣医学部 基礎獣医学講座

Key words：脂肪酸，微細分布，急速凍結，フリーズフラクチャー，電子顕微鏡

緒　言

分子生物学の飛躍的発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。

生体膜には数千種類にも及ぶ脂質分子が存在し、非対称で不均一な分布を示すことが提唱されている。しかしそのような膜脂質分布・動態の生理的意義、種々の病態との関わりについてはあまり理解が進んでいない。その最大の原因は蛋白質や DNA・RNA に比較して脂質を解析するための方法が極めて限られていることにある。我々は脂質の超微局在を明らかにすることが、膜脂質の機能を解明するために必須であると考え、そのための方法開発に注力してきた。その結果、急速凍結・凍結割断レプリカ標識（QF-FRL）法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、細胞膜あるいは細胞内オルガネラに存在する種々の脂質の微細分布を明らかにしてきた［1，2］。

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（図 1 上部）。QF-FRL 法（図 1）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。また蛍光標識プローブなどを用いた他の多くの研究方法でも同様であり、解析には“親水性頭部”に対するプローブが用いられている。これに対して、疎水性の脂肪酸については、生体膜の内側にあることから解析技術は非常に限られており、細胞内においてどの脂肪酸がどのように分布しているのかなどの情報は極めて少ないのが現状である。特に、生体膜における微細分布についての情報は皆無と言って良い。

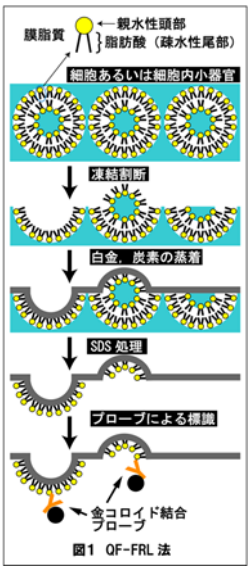


図 1. QF-FRL 法

近年、多価不飽和脂肪酸（PUFA）及び 1 価不飽和脂肪酸（MUFA）の生体内での増加が発癌、癌転移、精神疾患、炎症、血液凝固、精子機能、インスリン抵抗性の改善、寿命の延長及び心疾患改善など種々の生理機能に影響あるいは関与することがわかってきた。PUFA、MUFA は食物による補給により作用が発揮されることもわかっているが、どのように細胞に作用して機能関与するのかなど作用機序は全く不明である。

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（図 2）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。基本的には QF-FRL 法を用い、疎水性の脂肪酸がむき出しになったレプリカ薄膜が形成されると考えられる。不飽和脂肪酸の標識には、クリックケミストリー法を用い、アルキン化した脂肪酸の分布を微細レベルで明らかにできると思われる。

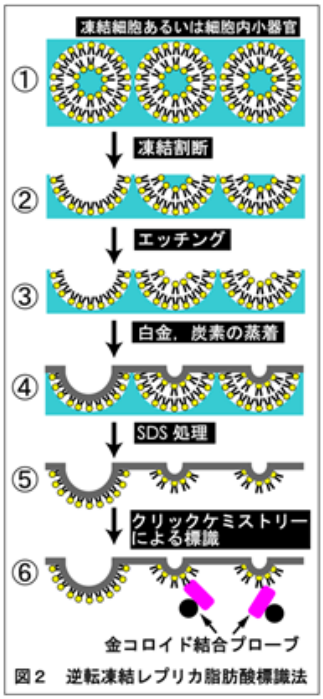


図 2. 逆転凍結レプリカ脂肪酸標識法

さらに本研究では、オートファゴソームにおけるリン脂質の微細分布についても検討を行った。酵母の遺伝的解析に端を発した研究によって動物細胞でのオートファジー制御機構の詳細が明らかにされてきた。さらに近年では、オートファジー機能不全がアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の原因になること、また悪性腫瘍の発生や抑制、そして幹細胞の未分化維持または分化など、種々の生体機能にオートファジーが関与することがわかってきた。これまでのオートファジーの研究では遺伝子や蛋白質の発現・動態・機能の変化を手がかりに進められてきた。オートファゴソームの形成には、他の細胞内小器官と同様に膜脂質が中心的な役割を担っており、その形成に不可欠な Atg8/LC3 タンパク質にリン脂質のホスファチジルエタノールアミン（PE）が結合することが形成の発端となること、さらに PtdIns（3）P はオートファゴソーム形成の初期段階に、そして PtdIns（4）P はその成熟期に不可欠な役割を担うことが明らかにされている［3］。このことは脂質の構成成分である脂肪酸の合成を抑制するとオートファジーが抑制されること、その抑制されたオートファジーは脂肪酸を添加することで復活することからもよく理解できる。

従来の技術である薄切標本を用いた電子顕微鏡レベルの研究では、オートファゴソーム膜は他の細胞内小器官あるいは細胞膜と異なり、明らかにより薄い脂質膜で形成されていることが判明しており、オートファゴソームを形成する膜が他の細胞内小器官とは異なる特殊な脂質成分であることが予想される。しかしながら、その脂質の成分、特に脂肪酸構成とその微細分布については長い間ほとんど明らかにされていない。我々は，現在までに確立した脂質の微細分布を解析するための QF-FRL 法を用いた基盤技術を駆使することにより、オートファゴソームを形成する脂質成分及びその微細局在の詳細を明らかにする。

方法および結果

1. 哺乳類培養細胞におけるアルキン化脂肪酸の導入と蛍光標識による可視化

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 1 ng/ml アルキン化オレイン酸を混入して一昼夜（14 hr）37℃で培養した。培養後、4%ホルムアルデヒド／0.1 M phosphate buffer（PB）で、室温、10 分間 HeLa 細胞を固定した。固定後、0.1%サポニン／PBS で膜透過性を施した。PBS で洗浄後、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。その結果、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（図 3）。対照実験として、培養液にアルキン化オレイン酸を含まない HeLa 細胞では、同じ蛍光標識を行っても、全く蛍光標識は確認できなかったため、本実験での HeLa 細胞で確認できた蛍光標識は生体膜に取り込まれたアルキン化オレイン酸であると考えられる。以上の実験より、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と確認できた。

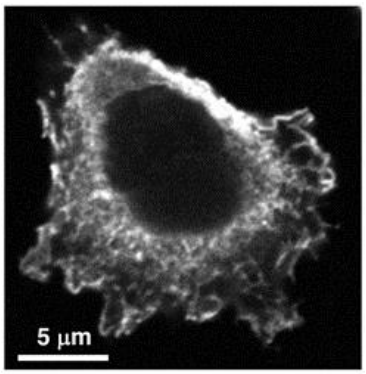


図 3. アルキン化オレイン酸を取り込ませた Hela 細胞
クリックケミストリー法を用いて biotin-azide と反応させて抗 biotin 抗体で蛍光標識した。

2. 生体膜レプリカ膜上での脂肪酸の標識

哺乳類培養細胞の HeLa 細胞を加圧凍結するために、薄い（厚さ：20 μm）の金箔の上に細胞を培養した。この時、後の凍結割断の際、細胞内を割断できるように、培養する金箔の表面に紙やすりであらかじめ傷を入れた。この時、培養液にアルキン化オレイン酸などの各種アルキン化脂肪酸を入れ、一昼夜細胞培養することにより、生体膜の脂肪酸を代謝標識した。その後、培養細胞を加圧凍結装置 HPM010 に装着して、細胞を急速凍結した。細胞を凍結後、凍結割断装置である Balzers の BAF400 を用いて、 - 130℃下で細胞を凍結割断した。その後、一部のサンプルでは、凍結割断直後、温度を - 90℃に上げエッチングをすることにより、割断表面の氷を昇華させ、生体膜の親水性領域を露出させた。その後、厚さ 2 nm の炭素（C）を蒸着後、2 nm の白金（Pt）に続いて 10 nm の C を蒸着することにより、レプリカ薄膜を作製した。作製したレプリカ薄膜を室温に戻し、そのレプリカ薄膜を 60℃で SDS 溶液に浸して処置し、レプリカ薄膜に接着していない細胞成分を除去した。レプリカ薄膜を PBS で洗浄後、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脂肪酸を biotin で標識した。その後、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。

エッチングを行な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、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（図 4）。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る。

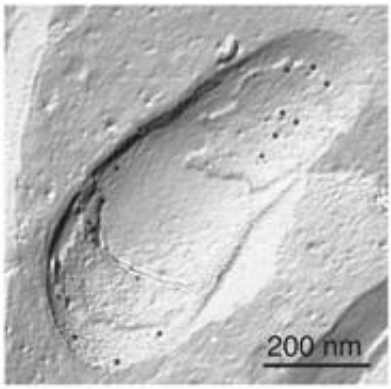


図 4. アルキン化アラキドン酸の標識
クリックケミストリーによる標識がミトコンドリアの
内膜に確認できた。

3. 酵母でのオートファゴソームにおける PtdIns（4）P の局在と PtdIns 4-kinase の役割

酵母には野生株 SEY6210 を用い、YPD 培養溶液内、30℃で培養した。オートファジーの誘導は、窒素源を取り除いた培養溶液（SC（-N））で 5 hr 培養を行なった。SC（-N）培養溶液で 5 hr 培養した酵母のレプリカ標本では、細胞質内に多くのオートファゴソームと液胞内にオートファジックボディーが観察された。これらの構造はオートファジーを誘導していないコントロールの酵母では観察されなかった。オートファジー誘導細胞のレプリカを抗 PtdIns（4）P 抗体で標識すると、哺乳類培養細胞 Huh7 細胞［3］のオートファゴソームとは異なり、二重膜の内膜と外膜共に、PtdIns（4）P の標識は主に外葉に局在することがわかった［4］。酵母には、PtdIns（4）P の産生に関与する酵素、つまり PtdIns 4- kinase（PI 4-K）が 3 つ存在する。それらは Pik1p、Stt4p、Lsb6p である。これらの PI 4-K の内、*pik1* および *stt4* のノックアウトでは致死となるため温度感受性株を作製した。以下の実験では、これらのノックアウトあるいは温度感受性酵母株を作製することにより、オートファジーにおける PI 4-K の関与を検討した。*lsb6* をノックアウトした *lsb6*Δ株では、オートファジー誘導によって野生株と同様にオートファゴソームとオートファジックボディーが観察された。しかし、Pik1 と Stt4 の温度感受性株（*pik1*^{ts} と *stt4*^{ts}）では、38℃で培養した状態、つまり Pik1p および Stt4p の酵素活性が抑制した状態では、両 PI 4-K 共にオートファジーが抑制された。オートファジーを誘導したそれぞれの株のレプリカを電子顕微鏡で観察したところ、26℃で培養した正常な酵素活性を示す *pik1*^{ts} および *stt4*^{ts} 株においては、オートファゴソームとオートファジックボディーが野生株と同様に観察された。一方、38℃で培養した *pik1*^{ts} 株では、オートファゴソームおよびオートファジックボディーは全く観察されなかった。これに対して、38℃で培養した *stt4*^{ts} 株においては、オートファゴソームは観察されたものの、オートファジックボディーはほぼ完全に観察されなかった。これらのことから、酵母が持つ PI 4-K の内、Pik1p はオートファゴソームの形成に、Stt4p はオートファゴソームと液胞の融合に関与することが示唆される［4］。

考　察

1. クリックケミストリーを用いた脂肪酸の微細分布解析

今回の研究では、当初の計画であった、培養細胞を凍結割断し、エッチングした後にレプリカ薄膜を作製することにより、疎水性領域である脂肪酸がむき出しになったレプリカ標本を作製するというアイデアは上手くいかなかった。一方、エッチングを行わずに、現在まで使用していた通常のレプリカ標本で、培養時に取り込ませたアルキン化アラキドン酸を標識することができた。この結果から、おそらく、アラキドン酸の疎水性の末端が一部親水性領域に露出していることが考えられる。

本研究で開発する凍結レプリカ脂肪酸標識法を用いた分布解析は、生化学的または光学顕微鏡的手法などを用いた

他の方法では原理的に難しい。この斬新な技術は生体膜研究に大きなインパクトを与えるものであり、世界に先駆けて開発・確立する意味は大きく、不飽和脂肪酸がもたらす生理的作用の機序解明に向けた基礎的情報を獲得できると確信する。今後はエッチングを行わない方法と行う方法の両方を用いた解析により、生体膜内における脂肪酸の極性局在を検討していきたいと考えている。

2. 急速凍結・凍結割断レプリカ標識（QF-FRL）法を用いたオートファゴソームにおける脂質の解析

本研究では、酵母のオートファジーにおいて，PI 4-K の Pik1p および Stt4p が必須の役割を担うことが明らかになった。さらには，Pik1p はオートファゴソームの形成に，Stt4p はオートファゴソームと液胞の膜の融合に関与することが示唆された。これらのことは、遺伝子の解析だけでなく、QF-FRL 法という免疫電顕法を併用することにより明らかとなった。我々の開発してきた QF-FRL 法が、オートファジーの機序解明に向け大きな役割を担うと考えられる。

今回明らかとなった結果は、従来の遺伝子と蛋白質の解析よるアプローチとは異なる次元の情報を獲得することにより、オートファジー制御と脂質あるいは脂肪酸代謝との関連が明らかになるものと期待される。今回の研究で得られる成果はオートファジーに関係する脂肪酸の機能解明に大きく貢献し、オートファジーが関与する種々の疾患の解明への新たなアプローチを提供する。さらにオートファジー関連の疾患に留まらず、脂質代謝異常をはじめ様々な疾患の原因や病態の解明、その成果に基づく新たな医薬品の開発も期待され、ライフイノベーション推進への寄与は大きいと考えられる。

謝　辞

本研究は、上原記念生命科学財団の令和元年度研究助成の支援を受けて行われました。ここに深く感謝の意を表します。

文　献

1） Fujita, A., Cheng, J., Fujimoto, T. Quantitative electron microscopy for the nanoscale analysis of membrane lipid distribution. Nat. Protoc. 5, 661-669, 2010. doi: 10.1038/nprot.2010.20

2） Cheng, J., Fujita, A., Yamamoto, H., Tatematsu, T., Kakuta, S., Obara, K., Ohsumi, Y., Fujimoto, T. Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. Nat. Commun. 5, Article number: 3207, 2014. doi: 10.1038/ncomms4207

3） Kurokawa, Y., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Hayashi, H., Tanabe, K., Fujita, A. Phosphatidylinositol 4-phosphate on Rab7-positive autophagosomes revealed by the freeze-fracture replica labeling. Traffic. 20, 82-95, 2019. doi: 10.1111/tra.12623

4） Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Futagami, T., Tamaki, H., Tanabe, K., Fujita, A. Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1864, 1214-1225, 2019. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.05.004s