

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K15715
研究課題名（和文）細胞毎の脂肪酸 酸化不均一性とその制御メカニズム解明のためのケミカルツール開発

研究課題名（英文）Development of a chemical probe for single-cell imaging of FAO pathway and the mechanism of alternation of FAO activity

研究代表者
内之宮 祥平（Uchinomiya, Shohei）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10770498
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：代謝経路の活性は疾病細胞と通常細胞とで大きく異なることから、標的代謝経路の活性を評価可能なツールの開発は疾病メカニズムの解明や創薬に重要である。本研究ではエネルギー生産経路の1つである脂肪酸 酸化を標的とし、蛍光イメージングとケミカルプロテオミクスを相補的に行うケミカルプローブを開発した。本プローブによって培養細胞での 酸化の蛍光イメージングに成功した。さらに、マウスにプローブを腹腔内投与することでマウス肝臓での 酸化の蛍光イメージングも達成した。今後は 酸化の活性変化に伴う細胞内プロテオーム変化をケミカルプロテオミクスによって解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がんを始め様々な疾病では代謝活性が大きく変化しているため、標的代謝経路の活性変化を検出する手法の開発は疾病メカニズムの理解や創薬研究に重要である。しかし、従来の同位体標識化合物を用いた測定では細胞集団の平均値しか得られず、代謝研究において重要な不均一性を検出することは困難である。本研究で開発したケミカルプローブはエネルギー生産に重要な脂肪酸 酸化経路を一細胞レベルで蛍光検出可能であり、培養細胞のみならずマウス肝臓サンプルでも 酸化経路を検出可能であった。今後は本プローブを用いて 酸化活性変化に伴うプロテオーム変化を解析することで、様々な疾病での 酸化が果たす役割を詳細に解析できると期待される。

研究成果の概要（英文）：It is widely recognized that activities of various metabolic pathways are altered in diseases such as cancer. Therefore, development of chemical probes for measuring activities of metabolic pathways is keenly desired for understanding of disease mechanisms and drug development. In this research, we have developed a new chemical probe for detection of fatty acid beta oxidation (FAO), an important metabolic pathway for energy generation. Using this probe, it was successfully achieved to fluorescently visualize FAO activity in cultured cells and mouse liver tissue. We will apply our probe for chemical proteomics to investigate the alternation of proteome upon the change of FAO activity in cultured cells and mouse liver tissue.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光イメージング 代謝経路 脂肪酸 酸化 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ガンなどの疾病では通常細胞と代謝活性が異なるため、疾病における代謝経路の研究は疾病メカニズムの理解や創薬に必要不可欠である。特に最近では代謝不均一性が代謝研究における重要なコンセプトとして認識されていることから、細胞ごとの代謝活性の違いを測定することが求められている。しかし、従来用いられてきた同位体標識化合物の代謝挙動を質量分析などで評価する手法では、細胞集団の平均値しか得られなかった。また、最近では一細胞メタボローム解析なども行われているが、高価な機器が必要などの問題点があり、未だ発展途上である。一方ケミカルバイオロジーは、一細胞毎の解析を可能とする蛍光イメージングやタンパク質ラベリングを利用した特定の酵素活性に基づくケミカルプロテオミクスなど、従来に無い解析法を提供してきた。しかし、代謝経路を構成する酵素の基質選択性が高く代謝反応を利用したケミカルツールの開発が困難なため、代謝経路を解析するためのケミカルツールはPETやMRIなどのイメージング手法を除いて現在ほとんど開発されていない。また、これらの手法も空間分解能が低い一細胞レベルでの解析が困難、プローブの半減期が短いなどの問題点がある。このように、代謝経路の活性を検出するためのケミカルツールは未だ未開拓の状態にあるが、これを打破することが出来れば代謝研究や創薬研究に大きなブレイクスルーが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エネルギー生産経路に重要な脂肪酸β酸化(β酸化)を一細胞蛍光イメージングとケミカルプロテオミクスによって同時に評価可能な新規ツールを開発することである。さらに、がん細胞およびNAFLD/NASHモデルでのプロテオーム解析及び一細胞イメージングを行い、疾病とβ酸化の関連性の検討する。

3. 研究の方法

β酸化とは脂肪酸を2炭素ずつ分解する代謝経路であり、その過程で生産されるアセチルCoAやNADH、FADH₂はATP生産に用いられることから、β酸化は重要なエネルギー生産経路である。さらに、最近では前立腺癌などでは解糖系以上の主要なエネルギー源であることや、世界中で急速な健康問題となっている非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)とβ酸化が密接に関与することも報告されている。本研究では、β酸化を検出するために脂肪酸と脱離部位、クリック反応部位からなるプローブを設計した(図1)。プローブがミトコンドリア内でβ酸化を複数回受けた後、炭素鎖が3の脂肪酸となる。この直後のβ酸化の最終サイクルにおいて、酸化・水和反応を受けヘミアセタール構造が形成し自発的にプローブが分解することで、高反応性のキノンメチドが生成する。これが近傍のタンパク質と反応した後にクリック反応によって色素を導入することで、β酸化活性に応じた一細胞蛍光イメージングを行う。さらに、蛍光色素の代わりにアフィニティーハンドルであるビオチンを導入し、ラベル化タンパク質をアビジンビーズで濃縮することで、β酸化が活性化された細胞のケミカルプロテオミクスを行う。本手法では、最終サイクルでの水和反応がキノンメチドを生じる直接のトリガーである。しかし、それまでにプローブが複数回β酸化を受ける必要があるため、本手法の結果は経路全体の活性を反映していると言える。

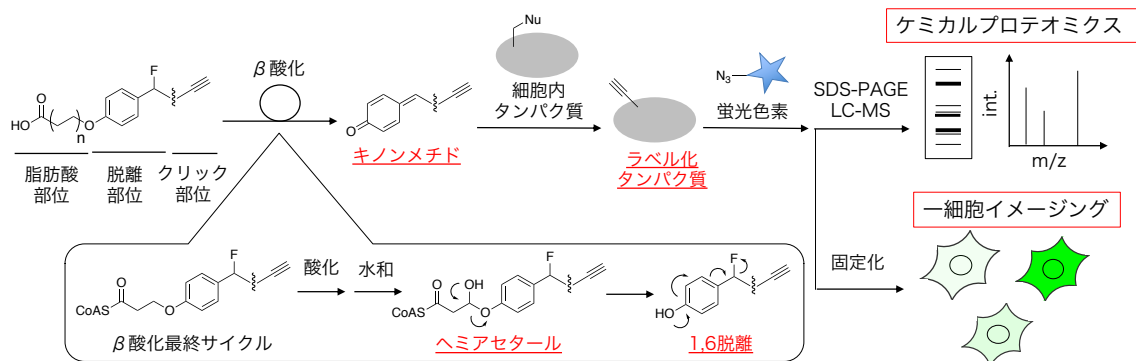


図1. β酸化活性の一細胞蛍光イメージングとケミカルプロテオミクス

4. 研究成果

脂肪酸部位にはこれまでの知見を生かして炭素鎖が9の脂肪酸（ノナン酸）を選択し、β酸化を受けて1,6脱離によって、アルキンを有するキノンメチドが生じる設計のプロープを合成した。まずプロープがβ酸化の基質になるかを検討するため、ガン細胞由来のHepG2細胞にプロープを添加し、その代謝挙動をHPLCで解析した。その結果、炭素鎖が短くなったプロープや水和されたプロープに加えて、水和されたキノンメチド由来のピークが検出された。一方、β酸化の阻害剤であるエトモキシルを添加した細胞ではこれらのピークは検出されなかったことから、本プロープがβ酸化によって分解されていることがわかった。続いて、細胞内のタンパク質がラベル化されているかをin-gel蛍光解析によって検討した。細胞を破碎して銅触媒のアジド-アルキン環化反応（CuAAC）によって蛍光色素を導入しin-gel蛍光解析したところ、様々なタンパク質がラベル化されていることが分かった。一方、エトモキシルを添加した細胞ではこれらのラベル化タンパク質は検出されなかった。さらに、コントロールプロープとして炭素鎖が8の脂肪酸（オクタン酸）を導入したプロープを合成した。コントロールプロープでは炭素鎖が偶数のためβ酸化を受けてもヘミ

アセタールが形成されないため、ラベル化が進行しないことが期待される。実際コントロールプロープをHepG2細胞に添加したが、ラベル化タンパク質は検出されなかった。以上の結果から、プロープが細胞内でβ酸化を受け、細胞内のタンパク質がラベル化されていることが示された。

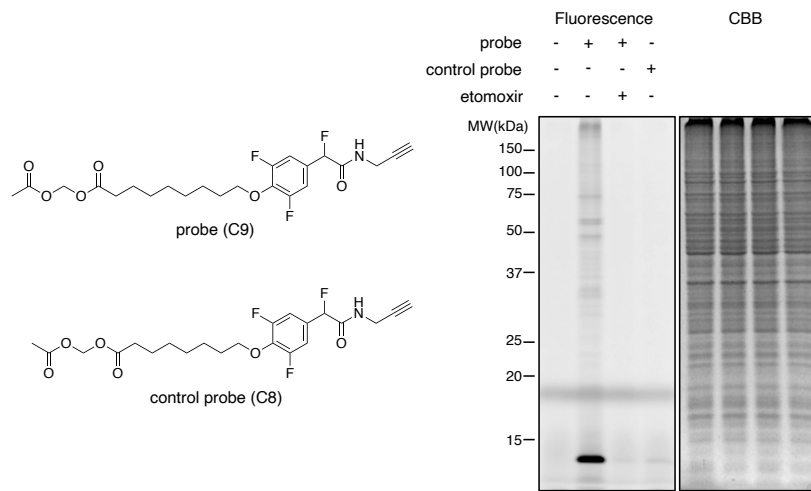


図2. β酸化依存的な細胞内タンパク質のラベル化

続いて、β酸化活性の蛍光イメージングを行った。HepG2細胞にプロープを添加し、細胞を固定化した後蛍光色素であるTAMRAをCuAACによって導入した。共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞からTAMRA由来の蛍光が確認された。この蛍光はエトモキシルを添加した細胞では検出されなかった（図3）。さらに、β酸化を活性化することが知られているAICAR (5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside)を添加したところ、TAMRA由来の蛍光強度が増加した。また、同様の結果は他の細胞株であるHeLa細胞やA549細胞でも得られた。これらの結果から、本プロープを用いて様々な細胞株でβ酸化の活性を蛍光イメージング可能であることが分かった。なお、これらのイメージングではCuAACによって色素を導入するため、細胞を固定化する必要がある。そこで生細胞でのイメージングを行うため、CuAACではなくtetrazine-ligationによって色素を導入できないかを検討した。Tetrazine-ligationでは、1,2,4,5-tetrazineを有する蛍光色素はPET消光によって初期状態では蛍光Offとなっているが、tetrazine-ligation後にPETが解消され蛍光Onとなる。これを利用し、trans-cyclooctyneを導入したプロープを設計した。このプロープをHepG2細胞に添加した後、tetrazine-BODIPYを添加したところ、細胞内からBODIPY由来の蛍光を検出した。この蛍光はエトモキシル存在下では顕著に抑えられたことから、tetrazine-ligationを利用することで生細胞でもβ酸化のイメージングが可能であることが分かった。

最後に、マウス肝臓でのβ酸化の検出を検討した。単離したマウス肝臓にプロープを灌流させた後、肝臓を破碎してCuAACによってTAMRAを導入したところ、In-gel蛍光解析によって肝臓内のタンパク質がラベル化されていることが分かった。このラベル化はエトモキシルを投与したマウスの肝臓や、コントロールプロープとしてオクタン酸（C8）を有するプロープを用いた時には確認されなかった。ここから、単離したマウス肝臓でのβ酸化の検出が可能であることが

示唆された。プローブを灌流させたマウス肝臓をスライス化し CuAAC によって TAMRA を導入したところ、肝臓スライスから TAMRA の蛍光を検出した。この蛍光はコントロールプローブの場合には検出されなかったことから、マウス肝臓での β 酸化の検出にも成功した (図 3)。さらに、マウスに直接プローブを腹腔内投与した後、マウス肝臓を単離し CuAAC によって TAMRA を導入したところ、in-gel 蛍光解析においてタンパク質のラベル化が確認された。この蛍光はエトモキシルを投与したマウスでは顕著に減少していることから、マウスにプローブを腹腔内投与することでも β 酸化が検出可能であることが分かった。

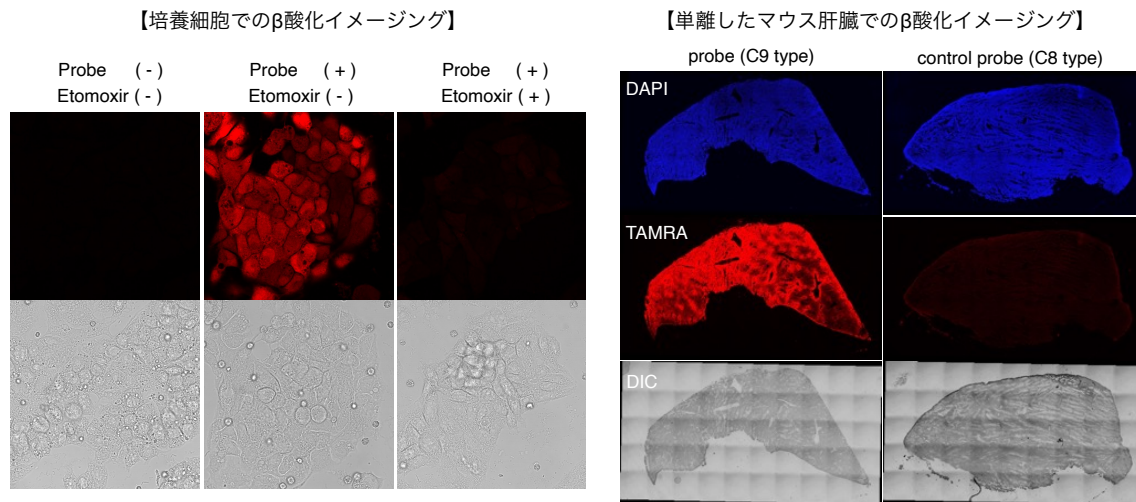


図 3. 培養細胞およびマウス肝臓での β 酸化の蛍光イメージング

以上より、培養細胞やマウスの肝臓において β 酸化を検出可能な新しいプローブを開発することに成功した。現在、ケミカルプロテオミクスによるラベル化タンパク質の同定や、病態モデルにおける β 酸化の検出を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchinomiya Shohei, Matsunaga Naoya, Kamoda Koichiro, Kawagoe Ryosuke, Tsuruta Akito, Ohdo Shigehiro, Ojida Akio	4. 巻 56
2. 論文標題 Fluorescence detection of metabolic activity of the fatty acid beta oxidation pathway in living cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3023 ~ 3026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc09993j	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 -

1. 著者名 Tabata Shigekazu, Jevtic Marijo, Kurashige Nobutaka, Fuchida Hirokazu, Kido Munetsugu, Tani Kazushi, Zenmyo Naoki, Uchinomiya Shohei, Harada Harumi, Itakura Makoto, Hamachi Itaru, Shigemoto Ryuichi, Ojida Akio	4. 巻 22
2. 論文標題 Electron Microscopic Detection of Single Membrane Proteins by a Specific Chemical Labeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 256 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.11.025	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 -

1. 著者名 Zenmyo Naoki, Tokumaru Hiroki, Uchinomiya Shohei, Fuchida Hirokazu, Tabata Shigekazu, Hamachi Itaru, Shigemoto Ryuichi, Ojida Akio	4. 巻 92
2. 論文標題 Optimized Reaction Pair of the CysHis Tag and Ni(II)-NTA Probe for Highly Selective Chemical Labeling of Membrane Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 995 ~ 1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20190034	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 -

1. 著者名 Nakamura Noriaki, Uchinomiya Shohei, Inoue Kazuya, Ojida Akio	4. 巻 25
2. 論文標題 Trimethyl-Substituted Carbamate as a Versatile Self-Immolative Linker for Fluorescence Detection of Enzyme Reactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2153 ~ 2153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25092153	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内之宮祥平、永浦智樹、松永直哉、Weber Mark、井上和也、大戸茂弘、王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによる生体組織での脂肪酸 酸化イメージング
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内之宮祥平, Mark Weber, 松永直哉, 大戸茂弘, 王子田彰夫
2. 発表標題 細胞内代謝経路を解明するケミカルツールの開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上和哉, ウェーバーマーク, 永浦智樹, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによる代謝経路の解析(1) 生体組織での脂肪酸 酸化を目指したキノンメチド放出型プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永浦智樹, 井上和哉, ウェーバーマーク, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによる代謝経路の解析(2): キノンメチド放出型 酸化検出プローブの構造検討と機能評価
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鴨田光一郎, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによる代謝経路の解析(3):尿素回路内アルギナーゼ検出蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 得丸祥貴, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 蛍光プローブを用いた細胞内フマル酸検出法の開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shohei Uchinomiya
2. 発表標題 Live-cell imaging of activity of fatty acid beta oxidation pathway with a fluorescent probe
3. 学会等名 10th Joint RSC-CSJ Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内之宮祥平, 松永直哉, 鴨田光一郎, 大戸茂弘, 王子田彰夫
2. 発表標題 小分子プローブを用いた脂肪酸 酸化経路活性の生細胞蛍光イメージング
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 善明直輝、得丸祥貴、田畑栄一、内之宮祥平、重本隆一、王子田彰夫
2. 発表標題 TEMイメージングを目指したリアクティブタグシステムの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内之宮祥平, Weber mark, 永浦智樹, 王子田彰夫
2. 発表標題 イメージングとケミカルプロテオミクスによる脂肪酸 酸化解析用ケミカルツールの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内之宮祥平
2. 発表標題 細胞代謝を解析するケミカルツール群の開発
3. 学会等名 新学術領域「分子夾雑の生命化学」第2回関東地区シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------