

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22435

研究課題名（和文）生体膜での脂肪酸ナノスケール解析技術確立による不飽和脂肪酸生理機能発現機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of functional mechanisms of unsaturated fatty acid in the biological membrane using the technique for distribution analysis at a nano scale level

研究代表者

藤田 秋一（Fujita, Akikazu）

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：60282232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：培養液にアルキン化オレイン酸を含んだ状態で培養したHeLa細胞において、クリックケミストリー反応を用いることにより、細胞内のオレイン酸の微細局在を蛍光顕微鏡において検討した。培養液内のアルキン化オレイン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。また、急速凍結・凍結割断レプリカ標識（QF-FRL）法を用いて、ホスファチジルコリンの前駆体であるプロパジルコリンを入れて培養した酵母細胞でのホスファチジルコリンをクリックケミストリー反応によって電子顕微鏡下で可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、不飽和脂肪酸の生体内での増加が発癌、炎症、精子機能、インスリン抵抗性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。不飽和脂肪酸は食物による補給により作用が発揮されるが、作用機序は不明である。本研究では、クリックケミストリー法を用いることにより、アルキン化した脂肪酸の分布を可視化することに成功した。さらに、同様にクリックケミストリー法を用いることにより、酵母細胞においてホスファチジルコリンの微細分布を観察することにより成功した。このことは、各種不飽和脂肪酸の細胞内での微細分布を検討する上で大きな進歩となり、不飽和脂肪酸の生理的あるいは病理的機能解明に貢献できると確信する。

研究成果の概要（英文）：We examined the distribution of alkyne oleic acid in HeLa cell incubated with alkyne oleic acid in the culture medium using click chemistry reaction. We observed the localization of alkyne oleic acid on the plasma membrane and intracellular organelles in HeLa cells under fluorescent microscope. However, unexpectedly we could not observe any change of the localization of alkyne oleic acid in the HeLa cells which are incubated with alkyne oleic acid for various incubation time (2-14 hr). In addition, we could observed the distribution of phosphatidylcholine in yeast cells, which were incubated with propargylcholine, at a nanoscale level under electron microscope.

研究分野：細胞生物学

キーワード：不飽和脂肪酸 クリックケミストリー 電子顕微鏡 脂質 急速凍結 フリーズフラクチャー

## 1. 研究開始当初の背景

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。

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・凍結切断レプリカ標識 (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。

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。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来の法をさらに改良することにより、新規の脂肪酸標識法 (図 2) を新たに開発し、生体膜における脂肪酸分布を解析することを検討にする。基本的には蛍光標識法を用い、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。本方法を用いることにより、脂肪酸がどの細胞から取り込まれ、その後どのように分布していくのかを検討することを試みる。

## 3. 研究の方法

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 1 ng/ml 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。培養後、4% ホルムアルデヒド/0.1 M phosphate buffer (PB) で、室温、10 min 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。さらに、培養液にアルキン化オレイン酸を添加した後、培養してから細胞固定する時間を 2 hr、4 hr、6 hr、8 hr、12 hr、14 hr に変化させることにより、アルキン化オレイン酸の分布の継時的変化を観察することを試みた。

また、QF-FRL 法による脂肪酸の標識の予備実験として、酵母細胞でのホスファチジルコリンの標識を試みた。方法は培養液にホスファチジルコリンの前駆体であるプロパジルコリンを入れ、一昼夜細胞培養することにより、ホスファチジルコリンを代謝標識した。その後、酵母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、凍結切断装置である Balzers の BAF400 を用いて、-130 °C 下で細胞を凍結切断した。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、レプリカ薄膜を作成した。作成したレプリカ薄膜を室温に戻し、そのレプリカ薄膜を 60 °C 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、生体膜内のホスファチジルコリンを biotion 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 抗体で標識を行なった。

#### 4. 研究成果

培養液にアルキン化オレイン酸を含んだ状態で培養した 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 1)。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、同じ蛍光標識を行なっても、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。しかしながら、培養液にアルキン化オレイン酸を入れて培養する時間をかえて、オレイン酸の微細分布の継時的変化を確認することを試みたが、時間的変化は確認できなかった。

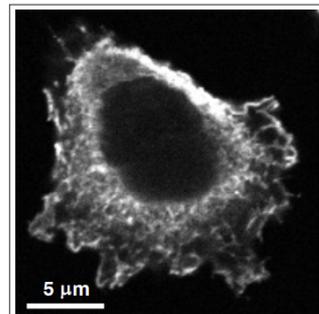


図1 アルキン化オレイン酸を取り込ませたHeLa細胞  
クリックケミストリー法を用いてbiotin-azideと反  
応させて抗biotin抗体で蛍光標識した。

QF-FRL 法を用いて脂肪酸を標識する予備実験として、酵母細胞でのホスファチジルコリンをクリックケミストリー法を用いて標識を試みた。レプリカ膜上で飢餓状態にある酵母細胞内にオートファゴソームが確認でき、その膜にホスファチジルコリンの金コロイド標識が確認できた (図 2)。以上のことから、レプリカ膜を用いてクリックケミストリー法を導入することにより生体膜にある脂質を特異的に標識することが可能であることがわかった。このことから、同じレプリカ膜上で生体膜の脂肪酸を標識することの足がかりとなり、今後、QF-FRL 法を用いて脂肪酸標識の方法確立に着手する予定である。

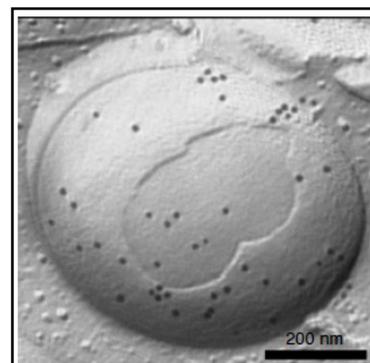


図2 プロバジルコリンを取り込ませた酵母細胞  
クリックケミストリー法を用いてbiotin-azideと  
反応させて金コロイド結合biotin抗体で標識した  
オートファゴソームのホスファチジルコリン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Muramoto Moe, Mineoka Nanaru, Fukuda Kayoko, Kuriyama Sayuri, Masatani Tatsunori, Fujita Akikazu	4. 巻 1866
2. 論文標題 Coordinated regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylserine levels by Osh4p and Osh5p is an essential regulatory mechanism in autophagy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184308 ~ 184308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2024.184308	査読の有無 無
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 Konishi Rikako, Fukuda Kayoko, Kuriyama Sayuri, Masatani Tatsunori, Xuan Xuenan, Fujita Akikazu	4. 巻 160
2. 論文標題 Unique asymmetric distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in <i>Toxoplasma gondii</i> revealed by nanoscale analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 279 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-023-02218-0	査読の有無 無
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 Muramoto Moe, Yamakuchi Yuki, Konishi Rikako, Koudatsu Shiomi, Tomikura Hiromu, Fukuda Kayoko, Kuriyama Sayuri, Kurokawa Yuna, Masatani Tatsunori, Tamaki Hisanori, Fujita Akikazu	4. 巻 1867
2. 論文標題 Essential roles of phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatases Sac1p and Sjl3p in yeast autophagosome formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 159184 ~ 159184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2022.159184	査読の有無 無
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 Yamakuchi, Y., Kurokawa, Y., Konishi, R., Fukuda, K., Masatani, T., Fujita, A.	4. 巻 595
2. 論文標題 Selective increment of phosphatidylserine on the autophagic body membrane in yeast 's vacuole.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 2197-2207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14167	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 Koudatsu, S., Masatani, T., Konishi, R., Asada, M., Hakimi, H., Kurokawa, Y., Tomioku, K., Kaneko, O., Fujita, A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Glycosphingolipid GM3 is localized in both exoplasmic and cytoplasmic leaflets of Plasmodium falciparum malaria parasite plasma membrane.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94037-3	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 -

1. 著者名 Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Tomioku, K., Tanabe, K., Fujita, A.	4. 巻 156
2. 論文標題 The distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the budding yeast plasma membrane.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 109-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-01989-8	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 Konishi, R., Kurokawa, Y., Masatani, T., Tomioku, K., Xuan, X., Fujita, A.	4. 巻 100
2. 論文標題 Raft microdomain localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living Toxoplasma gondii.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur. J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 151149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2020.151149	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 -

1. 著者名 Kurokawa Yuna, Konishi Rikako, Yoshida Akane, Tomioku Kanna, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 1862
2. 論文標題 Microautophagy in the yeast vacuole depends on the activities of phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183416 ~ 183416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183416	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 Konishi Rikako, Kurokawa Yuna, Tomioku Kanna, Masatani Tatsunori, Xuan Xuenan, Fujita Akikazu	4. 巻 100
2. 論文標題 Raft microdomain localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living <i>Toxoplasma gondii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151149 ~ 151149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2020.151149	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 -

1. 著者名 Kurokawa, Y., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Hayashi, H., Tanabe, K., Fujita, A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 4-phosphate on Rab7-positive autophagosomes revealed by the freeze-fracture replica labeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Traffic	6. 最初と最後の頁 82-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tra.12623	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 Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Futagami, T., Tamaki, H., Tanabe, K., Fujita, A.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.	6. 最初と最後の頁 1214-1225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.05.004.	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 Tsuji, T., Cheng, J., Tatematsu, T., Ebata, A., Kamikawa, H., Fujita, A., Gyobu, S., Segawa, K., Arai, H., Taguchi, T., Nagata, S., Fujimoto, T.	4. 巻 116
2. 論文標題 Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.	6. 最初と最後の頁 13368-13373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.	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 Kurokawa, Y., Masatani, T., Konishi R, Tomioku, K., Xuan, X., Fujita, A.	4. 巻 152
2. 論文標題 Nanoscale analysis reveals no domain formation of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein SAG1 in the plasma membrane of living <i>Toxoplasma gondii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histochem. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 365-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-019-01814-3.	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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山口優希、黒川夕奈、向達汐美、福田佳代子、正谷達膳、藤田秋一
2. 発表標題 酵母細胞でのオートファジーにおけるオートファジックボディーの選択的崩壊機構とオートファジックボディー膜におけるホスファチジルセリンの選択的増加
3. 学会等名 第96回 日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向達 汐美, 正谷 達膳, 小西 里可子, 黒川 夕奈, 山口 優希, 富奥 甘奈, 福田 佳代子, ハキミ ハッサン, 麻田 正仁, 金子 修, 藤田 秋一
2. 発表標題 ヒトmalaria原虫 <i>Plasmodium falciparum</i> でのラフト主成分の糖脂質GM3の局在
3. 学会等名 第96回 日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口優希、黒川夕奈、向達汐美、福田佳代子、正谷達膳、藤田秋一
2. 発表標題 酵母細胞でのautophagosome膜およびautophagic body膜における膜脂質の微細分布解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向達汐美、正谷達膳、小西里可子、黒川夕奈、山口優希、富奥甘奈、福田佳代子、Hakimi Hassan、麻田正仁、金子修、藤田秋一
2. 発表標題 ヒトmalaria原虫Plasmodium falciparumの細胞膜ではラフト主成分の糖脂質GM3は内葉と外葉の両方に局在する
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川夕奈、小西里可子、富奥甘奈、藤田秋一
2. 発表標題 急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法を用いた酵母細胞膜におけるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PI(4,5)P2)の局在解析による、PI(4,5)P2生成の制御機構の解明
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川夕奈、小西里可子、富奥甘奈、藤田秋一
2. 発表標題 酵母の液胞のマイクロオートファジーにおけるホスファチジルイノシトール4キナーゼ(Stt4p、Pik1p)の役割
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西里可子、黒川夕奈、富奥甘奈、藤田秋一
2. 発表標題 電子顕微鏡を用いたトキソプラズマ原虫の生体膜における脂質分子の微細局在解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川夕奈、小西理可子、富奥甘奈、藤田秋一
2. 発表標題 酵母および哺乳類細胞におけるホスファチジルイノシトール4キナーゼの役割
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西理可子、黒川夕奈、富奥甘奈、正谷達膳、藤田秋一
2. 発表標題 免疫電顕法を用いたヒト細胞感染トキソプラズマ生体膜における脂質分子の微細局在の検討
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学 共同獣医学部 分子細胞生物学 藤田秋一研究室  <a href="https://www.facebook.com/profile.php?id=100057246648140">https://www.facebook.com/profile.php?id=100057246648140</a>          鹿児島大学共同獣医学部分子細胞生物学藤田秋一研究室  <a href="https://www.facebook.com/113151806984749/?modal=admin_todo_tour">https://www.facebook.com/113151806984749/?modal=admin_todo_tour</a></p>
--

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
研究分担者	正谷 達膳  (Masatani Tatsunori)  (70614072)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授    (13701)	

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