

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19252

研究課題名（和文）生体膜の疎水性領域を可視化する新規凍結割断レプリカ標識法の開発

研究課題名（英文）The development of a novel freeze-fracture replica labeling method for visualizing the hydrophobic part of the biological membrane

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）：理論的にはエッチングを行なって脂質二重層の疎水性領域を暴露したレプリカ薄膜を作成できると考えられる。しかしながらこのレプリカ薄膜では、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今までの方法（QF-FRL法）で作成したレプリカ薄膜では、ミトコンドリア膜において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る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の方法とは逆に親水性頭部側から炭素を蒸着してレプリカを作成し、露出した膜脂質尾部の脂肪酸を標識する方法の開発を試みたが、現在までのところ予想したような結果は得られなかった。今後、この方法を開発するには課題は多く残るが、脂肪酸鎖の分布をナノスケールで明らかにすることができれば、これまでにない全く新しい知見を得られると確信している。

研究成果の概要（英文）：We thought that hydrophobic portion of phospholipids may be exposed in the biological membrane of the replica thin membrane by etching. However, the specific labelings of alkyne oleate or alkyne arachidonate could not be detected in these replicas of the biological membranes. On the other hand, the labeling of the alkyne arachidonate was detected in the replica membrane of the mitochondrial membrane which was made by the normal QF-FRL method. These results suggest that the alkyne of arachidonate indicating the terminal end of fatty acid of arachidonate is exposed on the hydrophilic surface of the mitochondrial membrane.

研究分野：脂質細胞生物学

キーワード：脂肪酸 ナノスケール 急速凍結 フリーズフラクチャー 電子顕微鏡 生体膜

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

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。

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。

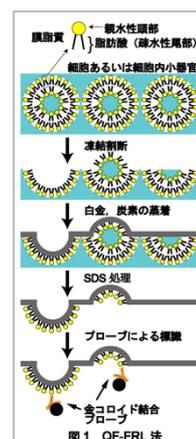


図 1 QF-FRL 法

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。

2. 研究の目的

本研究では、QF-FRL 法をさらに改良することにより、新規凍結切断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。

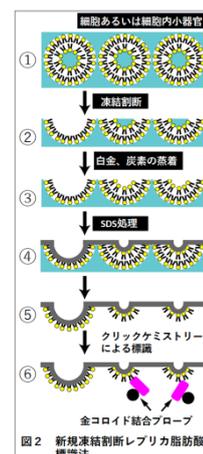


図 2 新規凍結切断レプリカ脂肪酸標識法

3. 研究の方法

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、 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、生体膜内のアルキン化脂肪酸を 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

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 3)。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。現在までのところ、各種脂肪酸を認識するプローブを作成することは難しいと思われる。そこで本研究では、アルキン基 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$) を導入した脂肪酸アナログを細胞に取り

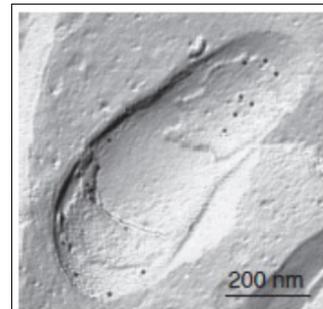


図3 アルキン化アラキドン酸の標識
クリックケミストリーによる標識が
ミトコンドリアの内膜に確認できた。

込ませ、アルキン基とアジド基 ($-\text{N}_3$) を特異的に結合させるクリックケミストリー反応を用いて検出する方法を試みた。その結果、これまで親水性頭部標識に用いてきた方法でも膜脂質の尾部を標識できる可能性があることがわかった (図 3)。しかしながら、従来の方法とは逆に親水性頭部側から炭素を蒸着してレプリカを作成し、露出した膜脂質尾部の脂肪酸を標識する方法 (新規凍結割断レプリカ脂肪酸標識法、図 2) の開発を試みたが、現在までのところ予想したような結果は得られなかった。今後、この方法を開発するには課題は多く残るが、脂肪酸鎖の分布をナノスケールで明らかにすることができれば、これまでになく全く新しい知見を得られると確信している。

5. 主な発表論文等

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

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 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 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 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 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 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2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Plasmodium falciparum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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 https://www.facebook.com/profile.php?id=100057246648140

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		
米国	Harvard University		