

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23657126

研究課題名（和文）

クリック反応による高解像度パルスチェイス法の開発

研究課題名（英文）

Development of high-resolution pulse-chase method by use of click chemical reaction

研究代表者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50115929

研究成果の概要（和文）：

アルキル基、アジド基を持つ前駆体を細胞に取り込ませた後、急速凍結し、凍結割断レプリカ上のクリック反応を用いて膜脂質、膜蛋白質を金コロイド標識し、電顕観察した。他の方法では解析が困難な phosphatidylcholine を示す標識は前駆体負荷後、経時的に増加した。出芽酵母では、小胞体、核膜、ミトコンドリア、液胞の膜両葉の phosphatidylcholine 密度がほぼ同じであるのに対し、形質膜では顕著な非対称性分布を示すことを見出だした。

研究成果の概要（英文）：

Cells cultured with precursor molecules bearing an alkyl or an azido group were quick-frozen and freeze-fracture replicas were subjected to click chemical reaction to label membrane lipids and proteins for electron microscopy. The labeling for phosphatidylcholine increased in a time-dependent manner after the precursor treatment. In budding yeast, the labeling density in the endoplasmic reticulum, nuclear membrane, mitochondrion, and vacuole was equivalent in the two membrane leaflets, whereas that in the plasma membrane showed clear asymmetry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細胞生物学、解剖学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：膜脂質、凍結割断レプリカ標識法、クリック反応

## 1. 研究開始当初の背景

放射性同位元素を用いたパルスチェイス法はPalade らによる蛋白質合成・分泌経路の解明に大きく貢献した。しかし、オートラジオグラフィーの空間分解能は1ミクロン程度であるため、細胞の微細形態との関連付けはオルガネラ単位が限界であった。近年の研究により、小胞体などのオルガネラは複数のサブコンパートメントからなり、それぞれが異なる機能を担うことが明らかになってきた。す

なわち、単一のオルガネラを形成する一続きの生体膜の中には、異なる分子動態を示す領域が存在すると考えられている。

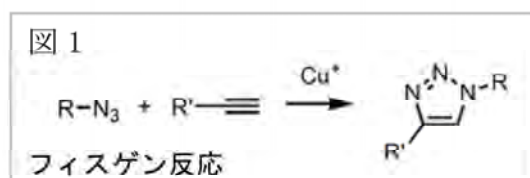
この可能性を確かめ、分子機構を解明するためには、従来の方法より遙かに高い解像度を持つパルスチェイス技術が必要である。我々は凍結割断レプリカ標識法を用いて膜脂質の局在をナノメートルレベルで定量的に可視化する方法(急速凍結・凍結割断レプリカ標識法)を発展させてきた (Fujita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 9256-9261, 2009; Nature

Prot. 5: 661-669, 2010 など)。急速凍結・凍結  
 切断レプリカ標識法では膜分子分布と微細構  
 造の関連を詳細に観察できるだけでなく、白  
 金とカーボンの薄膜による物理的固定により、  
 過酷な条件の化学反応に耐え得る膜標品を作  
 製できるという利点がある。

一方、天然化合物のアナログと、そのアナ  
 ログだけに特異的に結合するプローブがあれば、  
 原理的にはパルスチェイス実験を行うことが  
 できる。しかしアナログを認識するプローブ  
 として抗体などを用いると、反応の特異性を  
 確保するためにアナログの構造や性質は元の  
 化合物と大きく異なったものになり、内在性  
 分子の挙動を反映しなくなる。クリック反応  
 は特異性が高く、不可逆的な化学反応であり、  
 アルキン基とアジド基の間のフイスゲン反  
 応がその典型とされる(Kolb et al., *Angew.  
 Chem. Int. Ed.* 40, 2004, 2001)。

アルキン基、アジド基は小さく、また不活  
 性なので、これらを導入した化合物をアナ  
 ログとして用いれば、細胞に対する影響は少  
 なく、またアナログの生物学的性質の変化を  
 最小限に留めることができる。しかしながら  
 クリック反応の反応性は必ずしも高くないた  
 め、高温、長時間、有機溶媒中などの過酷  
 な反応条件が必要になることが多く、生物試  
 料の形態を保持しにくいという難点がある。

凍結切断レプリカでは白金とカーボンの薄  
 膜で膜分子が物理的に固定されており、2.5%  
 SDS、60°C、一晚という処理でも膜分子は  
 安定に維持される。このような特徴に着目し、  
 凍結切断レプリカにクリック反応を適用する  
 ことを着想した。



## 2. 研究の目的

上に述べた急速凍結・凍結切断レプリカ標  
 識法とクリック反応の特性を利用し、細胞に  
 取り込ませた標識アナログでラベルされた膜  
 分子の膜内分布を高解像度で追跡する技術の  
 開発を行う。

- (1) クリック反応を急速凍結・凍結切断レプリ  
 カ標識法に応用し、膜蛋白質、膜脂質を  
 超微形態レベルでパルスチェイスする方  
 法を開発する。
- (2) (1)の方法を用いて、膜蛋白質、膜脂質の新  
 規合成後の細胞内動態をサブオルガネラ  
 のレベルで解明する。変異酵母株を利用  
 して反応の特異性を担保する。

クリック反応を生物試料の標識に応用した  
 例は幾つか報告されているが、それらの方法  
 では空間解像度が十分でない。また既存の方  
 法を電顕レベルにそのまま応用しても、化学  
 固定できない膜脂質がその場に留まることは  
 なく、信頼に足る方法とは言えない。凍結割  
 断レプリカでは、白金とカーボンの薄膜によ  
 る物理的固定により膜分子は確実に捕捉され  
 ている。また凍結切断レプリカ法では膜の内  
 葉と外葉を峻別して解析できるため、フリッ  
 プフロップで両葉間を転移しうる燐脂質の動  
 態解析に関して、他の方法では得られない貴  
 重な情報が獲得できる。

## 3. 研究の方法

- (1) 急速凍結・凍結切断レプリカ標識法へのク  
 リック反応の応用

① アルキン基またはアジド基を含む前駆体  
 アナログを細胞に取り込ませ、クリック反  
 応による検出に必要な濃度と処理時間、さら  
 にチェイス時間について光顕レベルで  
 の検討を行う。

(i) 前駆体アナログとしてL-azidohomoalanine,  
 L-homopropargylglycine (アミノ酸アナログ  
 = 膜蛋白質用), propargylcholine,  
 propargylethanolamine (燐脂質合成前駆体ア  
 ナログ = 膜脂質用)などを検討する。濃  
 度0.1~10 mM で数時間~1日間負荷して  
 確実に代謝、取り込みが起こる条件をつ  
 くる。

(ii) 細胞を無固定のまま、あるいは化学固定し  
 た後、アジドビオチンとの間でクリック反  
 応を起こさせる。結合したビオチンを蛍光  
 標識ストレプトアビジンで可視化し、化合  
 物ごとに必要な最低濃度、負荷時間など  
 を確定する。

(iii) 前駆体アナログを短時間(10分~2時間)  
 負荷したのち、様々なチェイス時間(10分  
 ~24時間)をおいて固定し、(ii)と同じ方法  
 で観察して、前駆体アナログの代謝、輸送  
 に関する大まかな情報を得る。

② ①で決定した条件で処理した細胞を急速  
 凍結し、凍結切断レプリカ上でのクリック  
 反応の最適条件を見出す。

(i) アルキン基を持つ前駆体アナログを取り  
 込ませた細胞の凍結切断レプリカを作製  
 し、アジドビオチンとの間にクリック反応  
 を起こさせる。反応液中のCu<sup>2+</sup>イオン、  
 TBTA, アスコルビン酸などの濃度、反応  
 温度・時間、溶媒などの条件を最適化する。  
 結合したビオチンを抗ビオチン抗体と金  
 コロイド標識二次抗体で標識し、電顕観察  
 する。

- (ii) 細胞試料をアルミ試料台と銅箔の間に挟み込み、加圧凍結装置 (HPM010) で急速凍結する。凍結試料を凍結切断装置 (BAF400) に移して凍結切断レプリカを作製し、SDS処理等で標識可能な状態にする。
- (iii) 金コロイドにチオール化合物を結合させる方法でHS-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-EGn-N<sub>3</sub> を固相化し (Brust et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1655-1656, 1995)、凍結切断レプリカに固定されたアルキン基含有アナログ化合物との間にクリック反応を起こさせて直接標識する条件を検索する。

(2) 膜分子細胞内動態の解析

上記で最適化した条件を用い、哺乳類細胞、酵母細胞に前駆体アナログを取り込ませて膜分子を標識し、パルスチェイス実験を行う。

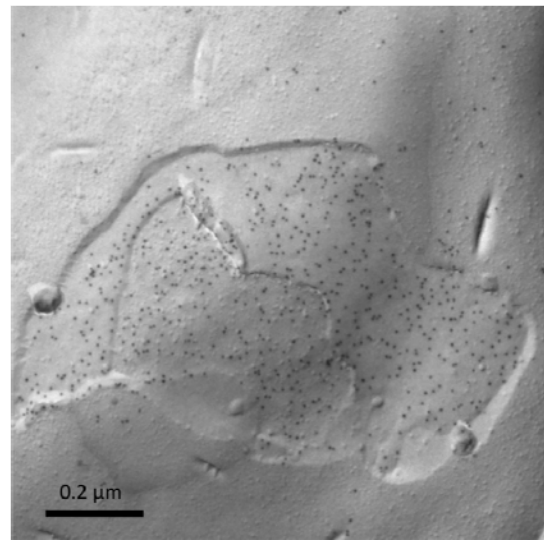
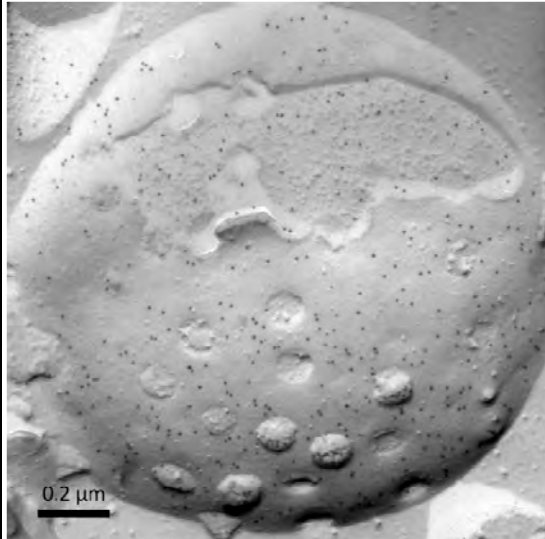
- ① 通常培養条件下の細胞に前駆体アナログを取り込ませ、様々なチェイス時間をおいた細胞の凍結切断レプリカを作製し、クリック反応で検索対象分子の局在を可視化する。小胞体、ゴルジ、脂肪滴、エンドソーム、形質膜などオルガネラごとに新規合成分子の分布を検索する。膜脂質については内葉・外葉間の存在比率の変化に関しても検討する。
- ② 小胞輸送、膜脂質のフリップフロップなどに関わる遺伝子に変異を持つ酵母株を用い、①と同様の実験を行う。

4. 研究成果

- (1) ホスファチジルエタノールアミンからホスファチジルコリンを合成する経路 (PEMT 経路) を欠き、choline 依存性となった出芽酵母変異株 (cho2Δopi3Δ) を用い、クリック反応でホスファチジルコリンを検出するための propargylcholine が完全な choline の代替物となり得るか否かを検証した。細胞は propargylcholine 添加培地でも choline 添加培地と遜色なく増殖し、propargyl 基を持つホスファチジルコリンが生理的機能を維持していることを示唆した。



- (2) propargylcholine 添加培地で培養した出芽酵母の脂質組成を薄層クロマトグラフィ



核膜 (内核膜・核質面、外核膜・内腔面)、および小胞体両面のクリック標識

一で解析し、トリグリセリド、ステロールエステル、コレステロール、グリセロ燐脂質などの組成が、通常培地で培養した場合と大きな変化がないことを確認した。

- (3) 蛍光顕微鏡レベルでクリック反応の特異性を以下の方法で確かめた。①choline を利用できない変異株 (cki1Δeki1Δ) では propargylcholine 添加培地で培養してもクリック反応による Cy3-azide 標識が得られなかった。②培地中に propargylcholine が不在の場合には Cy3-azide 標識が見られなかった。③クリック反応の反応液から

Cy3-azide を除いた場合には蛍光標識は見られなかった。

- (4) propargylcholine 存在下に 1 日以上培養した出芽酵母を急速凍結し、作製した凍結割断レプリカ上の propargyl 基に biotin-azide と結合させたのち、抗 biotin 抗体、続いて金コロイド標識二次抗体で標識した。陰性対照として、propargylcholine を与えない酵母も同様に処理し、標識が生じないことを確認した。核膜（内核膜・外核膜）、小胞体、液胞、ミトコンドリア（内膜・外膜）、ゴルジ体、エンドソームについては内葉・外葉間の標識密度に顕著な差はなく、ホスファチジルコリンは対称に分布していると考えられた。一方、形質膜ではほぼ内葉に局限して標識が認められた。propargylcholine で得られるクリック反応による標識は、スフィンゴミエリンを欠く出芽酵母ではホスファチジルコリンだけを反映すると考えられる。

- (5) propargylcholine 存在下で培養した哺乳類細胞の形質膜では内葉・外葉ともに標識が見られた。哺乳類細胞での反応はホスファチジルコリンとスフィンゴミエリンの両方を反映すると考えられる。

- (6) これらの結果より出芽酵母の細胞内膜系ではホスファチジルコリンが内葉・外葉にほぼ同じ密度で分布することが明らかになった。酵母形質膜で見られた顕著な非対称性分布は、哺乳類赤血球などの非対称性分布と内葉・外葉の関係が逆転していた。この結果についてはさらに方法を吟味するとともに、その生理的意義を検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 伊吉祥平、藤本豊士: ホスファチジルコリンの代謝的ラベル化と非対称性分布解析、第 118 回日本解剖学会総会・学術集会、平成 25 年 3 月 28~30 日、高松
- ② 藤本豊士: 電子顕微鏡による膜脂質ドメインの解析、理研コロキウム、平成 25 年 2 月 22 日、和光

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)  
名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50115929

### (2) 研究分担者

鈴木 倫毅 (SUZUKI MICHITAKA)  
名古屋大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 80456649

尾里 納美 (OZATO NAMI)  
名古屋大学・医学系研究科・COE 特任助教  
研究者番号: 60547454

### (3) 連携研究者なし