

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14506

研究課題名(和文) 膜脂質の疎水性部分を可視化する逆転凍結レプリカ法の開発

研究課題名(英文) Development of a new freeze replica method to observe the hydrophobic portion of membrane lipids

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜の基盤を形成する磷脂質は親水性頭部と疎水性尾部からなり、後者を作るアシル基は多種多様であることが知られている。しかしそれらのアシル基が生体膜中でどのような分布をとるのかはほとんど分かっていない。今回の研究ではアルキン基を付加した脂肪酸を取りこませた細胞を用い、急速凍結・凍結切断レプリカ法と組み合わせて、特定のアシル基の分布をナノレベルで明らかにする方法の開発を行った。凍結切断レプリカ上でクリック反応を行うことにより、特定のアシル基が細胞内のオルガネラ膜で観察され、またその膜中の限られた部分でクラスターを形成することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids constitute the basic framework of biological membranes and they are known to contain highly variable acyl chains in their hydrophobic tail portion. However, it is hardly known how those acyl chains distribute in the cellular membrane. In this project, we developed a method to define the nano-scale distribution of a specific kind of acyl chain by utilizing alkyne-labeled fatty acids and quick-freezing freeze-fracture electron microscopy. By performing click reaction on the freeze-fracture replica, labeling for the acyl chain was observed in cellular membranes, and moreover, it was shown to form clusters in a limited region of the membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膜脂質 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生体膜を形作る膜脂質は数千種類にのぼる。脂質ラフトをめぐる論争では、生体膜の二次元平面上で膜脂質がどのように分布するのが大きな問題となってきた。またホスホイノシチドなど生理的機能の解明が進んでいる膜脂質の詳細な分布の解明も重要な課題である。従来、膜脂質分布を可視化する方法として GFP 標識した蛋白質プローブによるイメージングが頻用され、プローブ発現自体がもたらす人工産物の危険性が指摘されつつも、ライブ観察で大きな威力を発揮してきた。一方、我々は高速で拡散し、化学固定に反応しない膜脂質の分布をナノレベルで決定するための方法として急速凍結・凍結割断レプリカ (QF-FRL) 法を確立し、ガングリオシド GM1, GM3, ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸, ホスファチジルイノシトール 3 リン酸などの詳細な分布についての観察結果を報告してきた (Fujita et al, Mol Biol Cell 18, 2812-2822, 2007; *ibid*, PNAS 106, 9256-9261, 2009; *ibid*, Nat Protocol 5, 661-669, 2010; Cheng et al, Nat Commun 5, 3207, 2014 など)。

しかしながら、これらの方法によって標識されるのは糖鎖、イノシトール環など、膜脂質の親水性頭部の違いであり、膜脂質の多様性のもう一つの要因である疎水性尾部の違いを明らかにすることは困難であった。疎水性尾部を作るアシル基には鎖長、不飽和結合の数などが異なる非常に多様な分子種が含まれており、生体膜の性質を決める決定的な要素であることが知られている。従って、これらの多様なアシル基が生体膜でどのように分布しているかを知ることは重要であり、詳細に解析するための方法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

凍結割断レプリカ法は生体膜分子の二次元的分布を物理的に固定し、安定に保持するという点で他の方法にない利点がある。今回の研究ではこの利点を活用し、膜脂質の疎水性尾部の違いを可視化する方法の開発を行う。

QF-FRL 法では生体膜を 2 枚の膜葉に分割し、疎水性部分に炭素・白金を蒸着して固定し、親水性側表面に様々なプローブを結合さ

せることによって電子顕微鏡で観察可能な標識を行う。一方、急速凍結後、凍結割断されていない膜表面に蒸着を行って固定することにより、疎水性側 (すなわち生体膜が 2 枚に分割された面の側) をプローブで標識することができると考えられる。今回の研究では、後者を用いて疎水性尾部を標識する方法を試みる。

疎水性部分は水溶液中では本来の構造を維持できず、標識分子との結合が起こらない可能性がある。このため、疎水性尾部の標識には有機溶媒を含む環境でも特異的な結合が可能な方法が必要であると考えられた。この条件に応じるため、炭化水素鎖の先端にアルキル基を付加した脂肪酸アナログを培地中に添加することによって、細胞の膜脂質を代謝ラベルし、凍結レプリカ作製後に、膜脂質のアシル基に取り込まれたアルキル基とアジド基の間でクリック反応を行わせて可視化する方法 (Iyoshi et al, ACS Chem Biol 9, 2217-2222, 2014) を試みる。

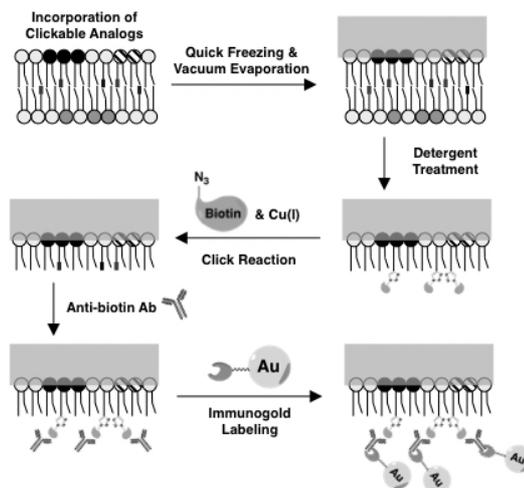


図 1. クリック反応によるレプリカ標識

3. 研究の方法

(1) アルキル基を付加した脂肪酸による代謝ラベルおよびクリック反応で蛍光ラベルした細胞の蛍光顕微鏡による観察

① カバーガラス上に培養した細胞 (HeLa 細胞など) を HEPES 緩衝生理食塩水でリンスし、10 μ M アルキンアラキドン酸 (aAA; 協同研究者の有田誠博士より供与; 予めウシ血清アルブミン溶液と混合したものを培地に添加) 存在下に 37°C で 3 時間培養する。

② アルデヒドで固定したのち、0.001%

Triton X-100 溶液で透過性処理を行う（一部は行わないサンプルも作製する）。

③ 細胞用クリック反応溶液（下記）で細胞に取り込まれた aAA のアルキン基と Cy3-アジド（baseclick 社製）の間でクリック反応を行い（室温、20分）、蛍光顕微鏡で観察する。

細胞用クリック反応溶液：10 nM Cy3-azide, 1 mM CuSO₄, 0.1 mM TBTA, 2.5 mM ascorbic acid, 2% BSA, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)

④ 対照として、aAA を添加しない細胞、クリック反応溶液から銅イオンを除いたサンプルを観察する。

⑤ 細胞内の分布を確かめるため、各種オルガネラマーカとの二重標識を行う。

(2) 疎水性部分を露出させた状態で膜脂質を保持する凍結レプリカの作製

① メタルコンタクト凍結装置（CryoPress）または加圧凍結装置（Leica HPM010）を用いて 20 μm 厚の金箔上に培養した HeLa 細胞を急速凍結する。

② メタルコンタクト凍結装置で凍結した試料については、凍結割断装置（Baltec BAF400）中に入れたあと、高真空下、凍結割断せずに-100℃～-90℃で数分～30分、凍結エッチングを行う。

③ 加圧凍結装置で凍結した試料は-105℃で凍結割断したあと、②と同様に凍結エッチングを行う（図2）。

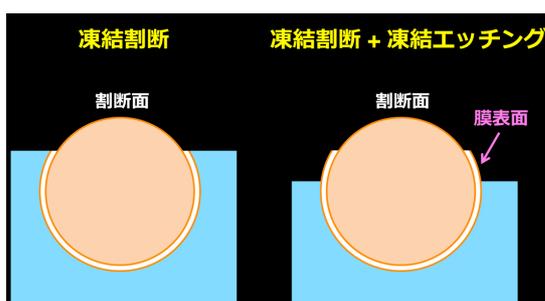


図2. 凍結割断と凍結割断後の凍結エッチング

④ ②③の試料に真空蒸着を行って、細胞やオルガネラの真表面が見える（すなわち生体膜の親水性部分が露出した）試料を高効率で見られる条件を見出す。

(3) 凍結レプリカ上でのクリック反応でアシル基末端のアルキン基を可視化する方法

① (2)の2つの方法で作製した凍結レプリ

カ、および凍結エッチングを行わず、通常の方法で凍結割断した直後に作製した凍結レプリカを 2.5% SDS 溶液で 60℃、一晚処理して膜外成分を除去する。

② 0.01% Triton X-100 を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) でリンスしたあと、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) に溶かした 2% cold fish gelatin で 10 分処理、さらに 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) でリンスする。

③ レプリカ用クリック反応溶液（下記）で biotin-azide との間にクリック反応を行わせる（室温、20分）。

レプリカ用クリック反応溶液：2 μM biotin-azide, 1 mM CuSO₄, 100 μM TBTA, 2.5 mM ascorbic acid, 2% cold fish gelatin, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)

④ PBS でリンスし、PBS に溶解した 2% cold fish gelatin で室温、30分ブロッキングする。

⑤ マウス抗 biotin 抗体、金コロイド標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（もしくはプロテイン A）で標識する。

⑥ ホルムバール膜を張ったグリッドに載せ、透過型電子顕微鏡で観察する。

⑦ 対照として aAA による代謝ラベルを行わない細胞、クリック反応液から銅イオンを除去した条件などの実験を行う。

4. 研究成果

(1) アルキン基を付加した脂肪酸による代謝ラベルおよびクリック反応で蛍光ラベルした細胞の蛍光顕微鏡による観察

aAA 存在下に3時間培養細胞した細胞を Cy3-アジドとのクリック反応で標識すると、蛍光標識は細胞内にネットワーク状に観察された。標識の大半は Tom20 の蛍光抗体標識と一致し、ミトコンドリアに分布することが分かった（図3）。一方、aAA で代謝ラベルしていない細胞、およびクリック反応液から銅イオンを除いた細胞などの対照サンプルでは蛍光は観察されなかった。

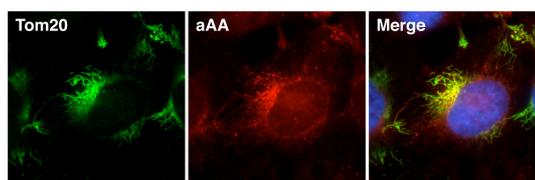


図3. aAA のクリック反応標識と Tom20 蛍光標識

(2) 疎水性部分を露出させた状態で膜脂質を保持する凍結レプリカの作製

研究方法で述べた2つの方法を比較検討した結果、凍結切断後に凍結エッチングを行う方法により、効率的に細胞膜やオルガネラ膜の真表面が観察できる（すなわち膜の親水性部分が露出した状態の）凍結レプリカを得ることができた（図4）。

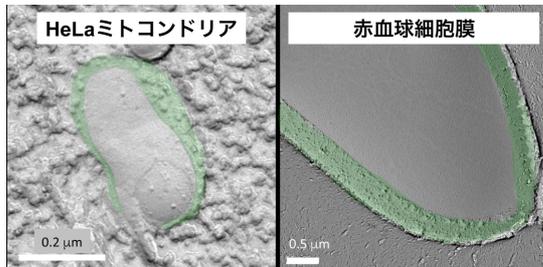


図4. 凍結エッチングで露出した膜の真表面（緑色）

(3) 凍結レプリカ上でのクリック反応でアシル基末端のアルキン基を可視化する方法

凍結切断を行わずに凍結エッチングする方法、凍結切断を行った後に凍結エッチングする方法のいずれを用いた場合でも、膜の真表面にはクリック反応で aAA の標識を得ることができなかった。

一方、凍結切断を行った直後に作製した凍結レプリカをクリック反応で標識したところ、ミトコンドリアの内膜、外膜の両方に特異的標識が得られた（図5）。

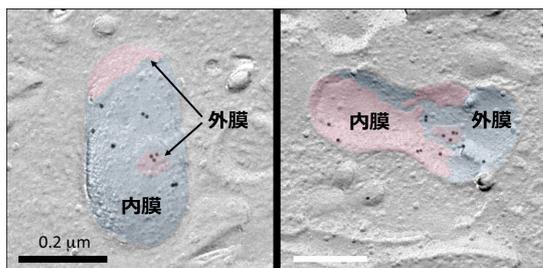


図5. ミトコンドリアの標識。内膜、外膜ともピンク色の部分は膜間腔に面した膜葉、水色の部分は内膜のマトリックスに面した膜葉、外膜の細胞質に面した膜葉を示す。

標識強度は外膜より内膜に相対的に高く、内膜の2葉のうちミトコンドリアマトリックスに向けた側の膜葉でもっとも強い標識が見られた。

さらに興味深いことに、内膜のうち膜間腔に向けた側の膜葉には標識のクラスターが頻繁に認められた（図6）。

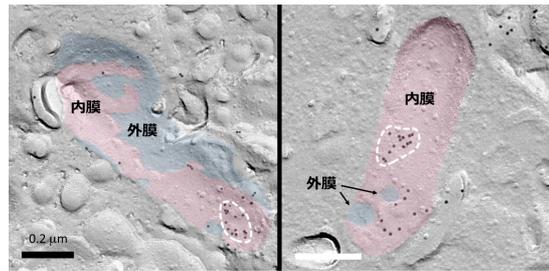


図6. ミトコンドリアの標識。内膜の膜間腔に面した膜葉には aAA 標識のクラスターが観察される。

上記で見られた標識は、生体膜の磷脂質のアシル基として取りこまれたアラキドン酸鎖の末端が脂質二重層内で屈曲し、親水性表面近くに存在することを示唆する（図7）。

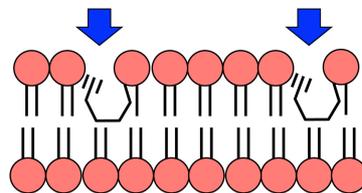


図7. 多価不飽和脂肪酸鎖が取ると思われる構造の模式図

多価不飽和脂肪酸鎖がこのようなコンフォメーションを取り得ることは人工脂質膜を用いた実験で示唆されてきたが、生体膜で証明されたことはない。今回の結果は細胞中の膜で実際に図7のような状態が生じること、しかもその現象が特定のオルガネラで高頻度に起こる可能性を示唆する。大きく折れ曲がった脂肪酸鎖の存在、特にそのような脂肪酸鎖が集中する領域の存在は、生体膜の性質に大きな影響を与えると予想され、さらにその結果として細胞やオルガネラの機能にも何らかの影響が出る可能性が推測される。

今後、他の脂肪酸についても今回と同様の方法を用いて比較を行い、さらに詳細な検討を行ったのち、論文として発表する予定である。

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）

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科・分子細胞学
ホームページ
(<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index-j.html>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50115929

(2)研究分担者

辻 琢磨 (TSUJI TAKUMA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40725628

(3)研究協力者

有田 誠 (MAKOTO ARITA)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学
研究センター・チームリーダー
研究者番号：80292952