

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05131

研究課題名(和文)細胞内共生成立過程における脂質代謝分析のためのリポミクス解析基盤創製と機能解明

研究課題名(英文)Development of a Lipidomics Platform for Analysis of Lipid Metabolism in Intracellular Symbiosis

研究代表者

青木 元秀 (Aoki, Motohide)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30418917

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)：本研究では、ミドリゾウリムシと共生する緑藻クロレラをモデルに、細胞内共生過程における脂質代謝の詳細な解析を行った。まず、高感度の液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いて脂質プロファイリング技術を確立し、これにより細胞内の脂質成分を網羅的に解析できる基盤を構築した。特に、細胞の状態や共生の有無に応じた脂質プロファイルの変動を詳細に解析し、細胞内共生に關与する可能性のある脂質成分を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、細胞内共生モデル生物における脂質機能を深く理解するための分析技術基盤を構築できた。この基盤を用いることで、共生過程で変動する脂質を経時的に追跡し、その役割とメカニズムを詳細に解明することが可能となった。また、構築された分析技術を用いたバイオマーカー探索により、細胞内小器官の脂質代謝異常に關連した疾患の早期診断や治療法の開発にも貢献できる見込みがある。本研究の成果は、細胞内共生と脂質代謝の関係を解明する上で重要な知見を提供し、今後の細胞生物学研究における新たな展開を促進するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted a detailed analysis of lipid metabolism in the process of intracellular symbiosis using the green alga *Chlorella*, which coexists with the ciliate *Paramecium bursaria*, as a model. First, we established a lipid profiling technique using high-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), thereby building a foundation for comprehensively analyzing lipid components within cells. In particular, we successfully identified potential lipid components involved in intracellular symbiosis by thoroughly analyzing the changes in lipid profiles in response to the state of the cells and the presence or absence of symbiosis.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞内共生 脂質代謝 LCMS バイオマーカー 細胞内小器官

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアや葉緑体といったオルガネラを生み出した細胞内共生は、細胞が他の細胞と共生することで新たな機能と構造を獲得し、進化を促進する原動力となっている。真核細胞の進化過程を解明するためには、細胞内共生がどのように成立し、維持されるのかを分子レベルで理解することが必要である。

細胞内共生研究のモデル生物として、ミドリゾウリムシとその共生相手である緑藻クロレラが広く用いられている。先行研究では、これらの生物間の共生メカニズムに関わる遺伝子やタンパク質などの生体物質が、細胞内で重要な役割を果たしていることが示唆されている。申請者は、2次元薄層クロマトグラフィーを用いた脂質の予備分析により、ミドリゾウリムシにおけるクロレラ共生によって脂質プロファイルが大きく変動することを示唆する結果を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、先端的な液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いて、ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立過程における脂質の網羅的解析基盤を構築することである。この基盤を用いて、細胞内共生における脂質の役割やメカニズムを明らかにし、細胞内共生の成立に必要な脂質の挙動と機能を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の方法を用いて研究を進めた。

#### (1) リピドミクス解析技術の構築

高性能液体クロマトグラフィーと高感度タンデム質量分析を組み合わせた LC-MS/MS システムを用い、ミドリゾウリムシの脂質プロファイリングを実施した。分析条件の最適化を行い、脂質成分の網羅的検出と定量を可能にした。

#### (2) 脂質挙動の経時的追跡

ミドリゾウリムシとクロレラの共生状態において、脂質プロファイルの変動を詳細に解析した。また、共生過程で特異的に変動する脂質成分を特定し、その動態を追跡した。

#### (3) 共生包膜の脂質解析

共生クロレラを取り囲む共生包膜を単離し、包膜の脂質プロファイルを詳細に解析した。共生に関連する可能性のある新規脂質を探索し、その機能を検討した。

### 4. 研究成果

本研究により、以下の成果を得ることができた。

#### (1) 脂質プロファイリング技術基盤の構築

高精度の LC-MS/MS を用いたリピドミクス解析技術を構築し、細胞内の脂質成分を網羅的に解析する基盤を確立した。これにより、細胞の状態や共生の有無による脂質プロファイルの変動を詳細に追跡することが可能となった(図1)。

本研究で構築した分析技術を用いて、シアノバクテリアの脂質機能に関する研究も行い、海水淡水両生型シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7002 において、プラストキノン B とアシルプラストキノールの二重機能合成を担う遺伝子の存在とその生理的役割を明らかにした(Kondo *et al.*, 2023a)。

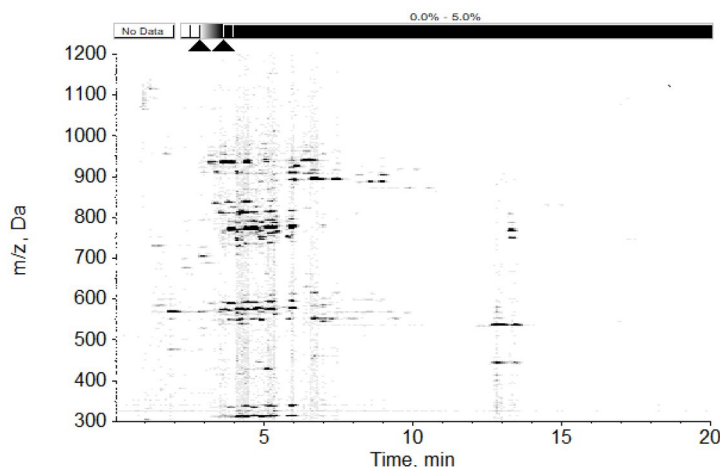


図1 LC-MSによる脂質プロファイリング 溶出時間と質量電荷比(m/z)での信号強度の濃淡プロット

## (2) 脂質成分の変動解析

ミドリゾウリムシとクロレラの共生状態で、脂質プロファイルが動的に変化することを明らかにし、細胞内共生に関与する可能性のある脂質成分を特定した。特に、共生過程で変動する脂質の役割とメカニズムの解析に取り組んだ。

また、植物の環境適応における膜脂質リモデリングに関する研究を行い、緑藻 *Chlorella kessleri* がリン欠乏条件下で特異的に生成するベタイン脂質 DGTS (ジアシルグリセリル-N, N, N-トリメチルホモセリン) について詳細に解析した。リン不足時において、DGTS 合成を介してリンを含む脂質の再編成が行われることを明らかにし、これにより細胞のリン代謝への柔軟な適応メカニズムを解明した (Ohishi *et al.*, 2022)。

## (3) 共生包膜の脂質解析

ミドリゾウリムシおよび共生クロレラを除去した白化ミドリゾウリムシから抽出した総脂質を LC-MS で分析し、ミドリゾウリムシでは 14 個の脂質クラスのシグナルを、Kb-1W では 10 個の脂質クラスのシグナルをそれぞれ検出した。検出された各脂質クラスは、溶出時間と質量スペクトルを既知の脂質と照合して同定した。特に、Phosphonylethanolamine は、既知試料が入手できなかったため、質量分析 (MS/MS) による分子構造解析により同定した (図 2)。この結果、ミドリゾウリムシには光合成生物に特徴的に見られる Monogalactosyl diacylglycerol、Digalactosyl diacylglycerol、Sulfoquinovosyl diacylglycerol、Phosphatidyl glycerol が、白化ミドリゾウリムシよりも強く検出されたことから、これらは共生藻および共生包膜に由来すると推定した。さらに、ミドリゾウリムシに特徴的な未同定の脂質成分 U3 を検出し、これが単独培養したクローン化共生クロレラには見られなかったことから、これを細胞内共生に関連する脂質成分候補として現在解析を進めている (青木, 2023)。

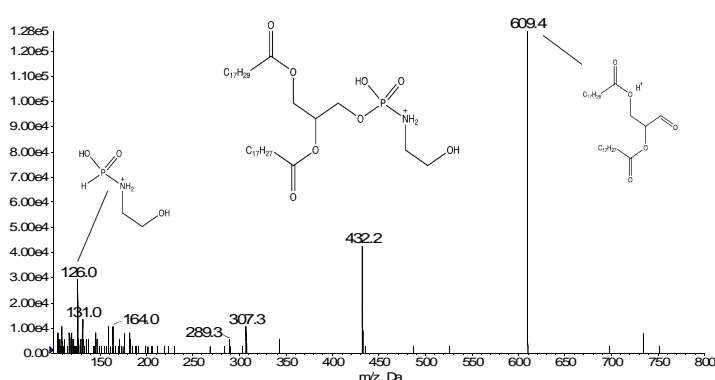


図 2 Phosphonylethanolamine の MS/MS スペクトルによる同定

## (4) バイオマーカー探索

構築されたリポドミクス解析技術を用いて、遺伝子欠損変異導入による脂質代謝異常に関連するバイオマーカーを探索することで、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるプラストキノン関連中性脂質の合成と NaCl ストレス順応への関与を調査し、遺伝子 *slr2103* が 16:0 および 18:0 とプラストキノン C をエステル化する新規アシルトランスフェラーゼをコードしていることを明らかにした。この研究により、シアノバクテリアが塩分ストレスに適応するための新しい戦略を解明し、高付加価値化合物の経済的な収穫や有害シアノバクテリアのブルージン制御のためのシステム開発の基盤を提供する成果を得た (Kondo *et al.*, 2023b)。

本研究の成果は、細胞内共生と脂質代謝の関係を解明する上で重要な知見を提供し、細胞生物学における新たな展開を促進するものである。得られた知見を基に、細胞内共生の理解をさらに深め、今後の研究や脂質関連疾患研究への新たな応用の可能性が期待される。

### < 引用文献 >

- Mimari Kondo, Motohide Aoki, Kazuho Hirai, Ryo Ito, Mikio Tsuzuki, and Norihiro Sato. 2023a. Plastoquinone lipids: their synthesis via a bifunctional gene 1 and physiological function in a euryhaline cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Microorganisms*, 11(5), 1177.
- Yutaro Oishi, Rie Otaki, Yukari Iijima, Eri Kumagai, Motohide Aoki, Mikio Tsuzuki, Shoko Fujiwara and Norihiro Sato. 2022. Diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine-dependent lipid remodeling in a green alga, *Chlorella kessleri*, *Communications Biology*, 5 (1), 19
- 青木 元秀. 2023. リポドミクスで紐解く細胞内共生の姿 細胞内共生成立過程における生体膜脂質ダイナミクス解明に向けて, *細胞*, 55(6): 78-9.
- Mimari Kondo, Motohide Aoki, Kazuho Hirai, Taku Sagami, Ryo Ito, Mikio Tsuzuki and Norihiro Sato. 2023b. *slr2103*, a homolog of type-2 diacylglycerol acyltransferase genes, for plastoquinone related neutral lipid synthesis and NaCl stress acclimatization in a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Front. Plant Sci.* 14, 1181180.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>青木 元秀   | 4. 巻<br>55(6)       |
| 2. 論文標題<br>リビドミクスで紐解く細胞内共生の姿 細胞内共生成立過程における生体膜脂質ダイナミクス解明に向けて | 5. 発行年<br>2023年     |
| 3. 雑誌名<br>細胞  | 6. 最初と最後の頁<br>78-79 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                               | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Kondo Mimari, Aoki Motohide, Hirai Kazuho, Sagami Taku, Ito Ryo, Tsuzuki Mikio, Sato Norihiro  | 4. 巻<br>14          |
| 2. 論文標題<br>slr2103, a homolog of type-2 diacylglycerol acyltransferase genes, for plastoquinone-related neutral lipid synthesis and NaCl-stress acclimatization in a cyanobacterium, <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 | 5. 発行年<br>2023年     |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Plant Science   | 6. 最初と最後の頁<br>01-14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fpls.2023.1181180   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kondo Mimari, Aoki Motohide, Hirai Kazuho, Ito Ryo, Tsuzuki Mikio, Sato Norihiro  | 4. 巻<br>11                |
| 2. 論文標題<br>Plastoquinone Lipids: Their Synthesis via a Bifunctional Gene and Physiological Function in a Euryhaline Cyanobacterium, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Microorganisms  | 6. 最初と最後の頁<br>1177 ~ 1177 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/microorganisms11051177   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Oishi Yutaro, Otaki Rie, Iijima Yukari, Kumagai Eri, Aoki Motohide, Tsuzuki Mikio, Fujiwara Shoko, Sato Norihiro | 4. 巻<br>5           |
| 2. 論文標題<br>Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine-dependent lipid remodeling in a green alga, <i>Chlorella kessleri</i>  | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>19-19 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-021-02927-z  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>青木元秀, 不破瞳, 梅村知也, 沖野晃俊      |
| 2. 発表標題<br>大気圧プラズマ処理が生物の脂質組成に及ぼす影響の解析 |
| 3. 学会等名<br>令和4年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会     |
| 4. 発表年<br>2023年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>近藤美鞠, 青木元秀, 平井一帆, 相模拓, 伊藤凌, 都筑幹夫, 佐藤典裕 |
| 2. 発表標題<br>シアノバクテリアの新規中性脂質合成能欠損株の生理生化学的解析         |
| 3. 学会等名<br>日本植物学会第86回大会                           |
| 4. 発表年<br>2022年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>前本佑樹, 前田萌羽, 青木元秀, 宇山徹, 梅村知也, 上田夏生, 吉田稔, 伊藤昭博 |
| 2. 発表標題<br>新規ドーパミンアシル基転移酵素の同定                           |
| 3. 学会等名<br>第64回日本脂質生化学会                                 |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>末永 祐磨, 大澤 泰樹, 劉 智志, 高松 利寛, 青木 元秀, 松村 有里子, 岩澤 篤郎, 沖野 晃俊 |
| 2. 発表標題<br>CO2プラズマバブリング殺菌の殺菌因子解明に向けた基礎特性評価                        |
| 3. 学会等名<br>第38回プラズマ・核融合学会年会                                       |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>川崎 悠平, 横田 壮真, 青木 元秀, 熊田 英峰, 梅村 知也, 内田 達也 |
| 2. 発表標題<br>再構築ヒト表皮の角層セラミドー斉定量分析による外用剤の有効性評価         |
| 3. 学会等名<br>本動物実験代替法学会 第34回大会                        |
| 4. 発表年<br>2021年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>太田 高志, 柳井 優作, 清水 祐哉, 沖野 晃俊, 前本 佑樹, 青木 元秀, 梅村 知也, 岩井 貴弘, 千葉 光一 |
| 2. 発表標題<br>ICP発光/質量同時分析用ドロップレット赤外線脱溶媒単一細胞試料導入システムの開発                     |
| 3. 学会等名<br>2021生体医歯工学共同研究拠点成果報告会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>平井 一帆, 青木 元秀, 西山 佳孝, 都筑 幹夫, 佐藤 典裕  |
| 2. 発表標題<br>シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 が持つ2 型ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼホモログ遺伝子slr2103の機能 |
| 3. 学会等名<br>第63回日本植物生理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Motohide Aoki, Takao Yasui, Yanbei Zhu, Akitoshi Okino, Tomonari Umemura                     |
| 2. 発表標題<br>Development of the single cell sampling device for ICP-MS elemental analysis                 |
| 3. 学会等名<br>The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takashi Ohta, Mako Yoshida, Yusaku Yanagii, Yuki Maemoto, Motohide Aoki, Takahiro Iwai, Tomonari Umemura, Koichi Chiba, Akitoshi Okino |
| 2. 発表標題<br>ICP AES/MS simultaneous analysis of single human cells applying high-throughput infrared desolvation system                            |
| 3. 学会等名<br>The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊藤 凌, 遠藤 瑞季, 青木 元秀, 大久保 秀士, 藤原 祥子, 佐藤 典裕 |
| 2. 発表標題<br>光合成生物におけるアシルプラストキノンの分布                   |
| 3. 学会等名<br>第65回日本植物生理学会年会                           |
| 4. 発表年<br>2024年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>前田 萌羽, 前本 佑樹, 青木 元秀, 平島 真一, 宇山 徹, 梅村 知也, 上田 夏生, 吉田 稔, 伊藤 昭博 |
| 2. 発表標題<br>PLAATファミリーによるドーパミンアシル化の解析                                   |
| 3. 学会等名<br>第46回日本分子生物学会年会  |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>青木 元秀, 吉野 浩太郎, 朱 彦北, 安井 隆雄, 前本 佑樹, 沖野 晃俊, 梅村 知也 |
| 2. 発表標題<br>単一細胞元素分析用ICP-MSサンプリング装置の開発                      |
| 3. 学会等名<br>第83回分析化学討論会                                     |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>近藤 美鞠, 青木 元秀, 平井 一帆, 相模 拓, 伊藤 凌, 都筑 幹夫, 佐藤 典裕 |
| 2. 発表標題<br>Synechocystisの新規中性脂質の合成におけるSlr2103タンパク質の機能    |
| 3. 学会等名<br>第64回日本植物生理学会年会                                |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Motohide Aoki, Yanbei Zhu, Takao Yasui, Akitoshi Okino, Tomonari Umemura    |
| 2. 発表標題<br>Development of ICP-MS sampling equipment for single cell elemental analysis |
| 3. 学会等名<br>The 8th International Symposium on Metallomics (ISM-8) (国際学会)               |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                       | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究協力者 | 洲崎 敏伸<br><br>(SUZAKI TOSHINOBU)<br><br>(00187692) | 神戸大学・理学研究科<br><br><br><br>(14501)           |    |
| 研究協力者 | 佐藤 典裕<br><br>(Sato Norihiro)<br><br>(50266897)    | 東京薬科大学・生命科学部・准教授<br><br><br><br>(32659)     |    |
| 研究協力者 | 沖野 晃俊<br><br>(OKINO AKITOSHI)<br><br>(60262276)   | 東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授<br><br><br><br>(12608) |    |



6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究協力者 | 梅村 知也<br><br>(UMEMURA TOMONARI)<br><br>(10312901) | 東京薬科大学・生命科学部・教授<br><br><br><br><br>(32659) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |