

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19413

研究課題名（和文）細胞内リン脂質可視化による脂質機能解析の前進

研究課題名（英文）Analysis of lipid function by visualization of cellular lipids

研究代表者

進藤 英雄（Shindou, Hideo）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・脂質生命科学研究部・テニュアトラック部長

研究者番号：10401027

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）：本研究課題は、未だ技術的に難しい細胞内脂質可視化の技術開発とその応用を目的とした。生体内に微量だが質量分析計（liquid chromatography-mass spectrometry, LCMS）で検出できる脂肪酸Xがある。今回、Hela細胞の培養液中に30マイクロM重水素ラベル脂肪酸Xを添加してラマン顕微鏡（inVia Raman microscope, RENISHAW）で観察した。その結果、ラマンスペクトルで2000-2200カイザーに特徴的な重水素由来のピークを検出し、画像では細胞内にドット状の脂肪滴様構造を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

質量分析計による脂質分析は高感度であるが、空間情報は得られない。また質量顕微鏡は空間像を得られるが今のところ細胞内の観察は難しい。本研究課題のように細胞内の脂質空間情報を得られる技術はこれまでに無い知見を得られ、生体機能理解も亢進できる。様々な方法の発展により、より高解像で精度の高い検出方法探索が必要であり、本研究課題も一助となる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to visualize intracellular lipids. For this purpose, I used Raman microscope (inVia Raman microscope, RENISHAW). Deuterium fatty acid was added to the culture medium of Hela cells and metabolized to phospholipids and neutral lipids. Raman peak of the deuterium fatty acid was detected around 2000-2200. The amount of this target fatty acid is very small in cellular membrane. I identified the lipid containing this fatty acid using liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS) and Raman microscope.

研究分野：脂質生命科学

キーワード：リン脂質 中性脂質 ラマン顕微鏡 細胞内脂質可視化 重水素ラベル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

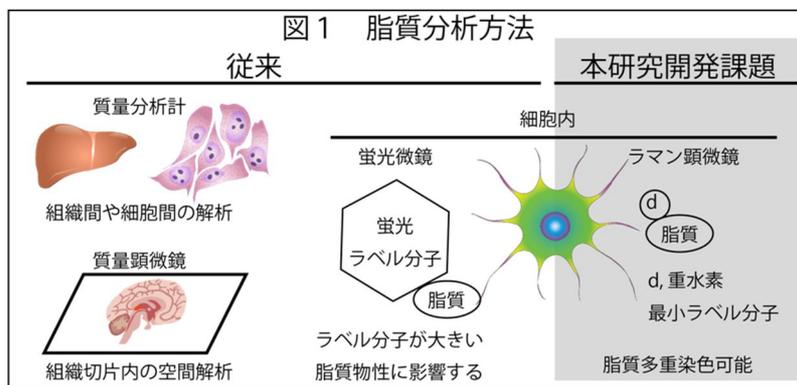
質量分析計による脂質分析は高感度であるが、空間情報は得られない。また質量顕微鏡は空間像を得られるが今のところ細胞内の観察は難しい。細胞内の脂質空間情報を得られる技術はこれまでに無い知見を得られ、生体機能理解も亢進できる。

2. 研究の目的

本研究課題は、未だ技術的に難しい細胞内脂質可視化の技術開発とその応用である。主にリン脂質をターゲットにし、未解明な点が多い細胞内脂質空間情報の取得から生体機能に寄与する局所的な脂質機能の解明を目指す。既に成功しているラマン顕微鏡による重水素ラベル脂肪酸の細胞内五重染色(脂肪滴)(Uematsu et al. FASEB J. 2020)を発展させる。

生体膜主成分であるリン脂質は、極性基に加えて脂肪酸を2本持ち多様な分子種を形成する。リン脂質の脂肪酸を決定する生合成酵素としてリゾリン脂質アシル転移酵素が1950年代に提唱されたが、酵素同定はこの十数年である。現在14種中、私たちは9種同定(真のin vivo基質同定含む)し、全14種LPLATを包括的に研究している。酵素の概念提唱から50年以上経てようやくリン脂質生体機能の分子レベルに迫れるようになった。

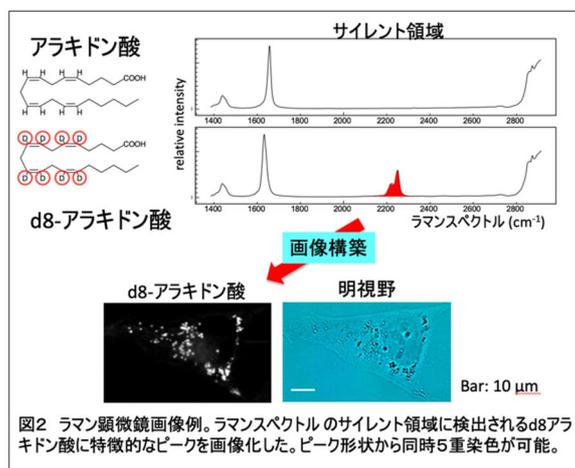
以上、脂質分析技術発展と併せてリン脂質研究ツールが整ったが細胞内の空間的な脂質機能には迫れていない。これまで、脂質空間情報を得るためにいくつか研究開発されてきた。脂質のラベル体はよく使われるが、ラベル分子が脂肪酸やリン脂質に近い分子量であるため、脂質そのものの物性に影響する。質量顕微鏡(イメージングMS)はノンラベルで解析できるが、解像度から細胞内観察はまだ難しい。そこで細胞内脂質可視化の挑戦的な技術開発を行い脂質研究を細胞内に踏み込ませることを目的とする(図1)

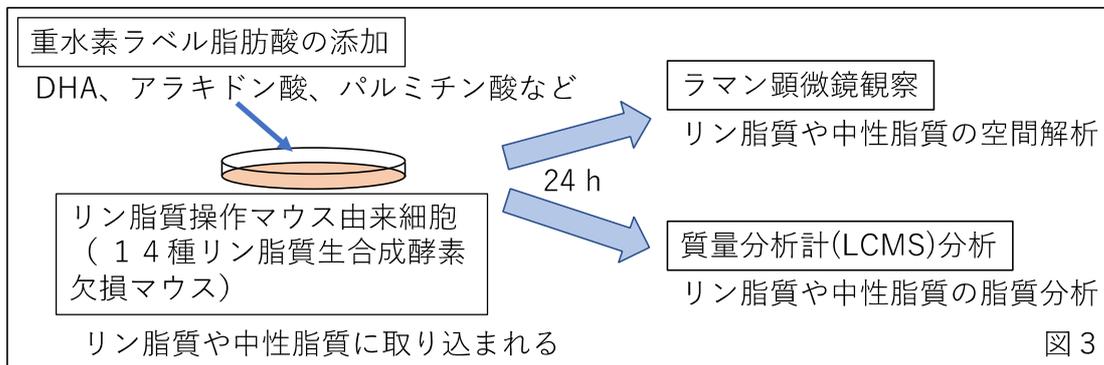


3. 研究の方法

細胞内リン脂質可視化のためにラマン顕微鏡を用いる。ラマン顕微鏡は分子間相互作用固有のラマンスペクトルを検出する顕微鏡である。最小ラベル体脂肪酸である重水素脂肪酸は生体に無い特徴的なラマンスペクトルを示すことを利用し(図2)、5種脂肪酸シグナル(中性脂質)を同時に区別できた(Uemastu et al. FASEB J. 2020)。ピーク解析ソフトウェアも開発済みである。

ラマン顕微鏡で特異的に認識される脂肪酸を利用する(図2、3)。細胞培養液に脂肪酸を添加すると、リン脂質や中性脂質に取り込まれる。重水素ラベル脂肪酸は生体に無いピークとして検出される。市販されていない脂肪酸は合成する。





4. 研究成果

生体内に微量だが質量分析計 (liquid chromatography-mass spectrometry, LCMS) で検出できるリン脂質脂肪酸 X がある。今回、その脂肪酸 X の重水素ラベル体を共同研究者に作成頂いた。脂肪酸は細胞培養液に添加すると速やかに細胞内に取り込まれ、脂肪酸 CoA に変換されたのちに、中性脂質やリン脂質に組み込まれる。今回、Hela 細胞の培養液中に 30 マイクロ M 重水素ラベル脂肪酸 X を添加してラマン顕微鏡 (inVia Raman microscope, RENISHAW) で観察した。その結果、ラマンスペクトルで 2000-2200 カイザーに特徴的な重水素由来のピークを検出し、画像では細胞内にドット状の脂肪滴様構造を確認できた。今後、中性脂質合成抑制や他の重水素ラベル脂肪酸などとの共添加を行いシグナルの空間的变化を解析する。また、リン脂質合成酵素欠損細胞を用いた解析により、リン脂質組成変動と脂肪酸局在変化の観察も試みる。同時に質量分析計によるリン脂質や中性脂質 (トリアシルグリセロールなど) の脂肪酸同定 (重水素脂肪酸) も必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Valentine William J., Yanagida Keisuke, Kawana Hiroki, Kono Nozomu, Noda Nobuo N., Aoki Junken, Shindou Hideo	4. 巻 298
2. 論文標題 Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101470 ~ 101470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101470	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 Valentine William J., Shimizu Takao, Shindou Hideo	4. 巻 215
2. 論文標題 Lysophospholipid acyltransferases orchestrate the compositional diversity of phospholipids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 24 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2023.08.012	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7件（うち招待講演 7件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 進藤英雄
2. 発表標題 生体膜リン脂質組成変動に相関する組織機能
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 進藤英雄
2. 発表標題 脂肪酸検出による脂肪滴の可視化
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 進藤英雄
2. 発表標題 リン脂質中オメガ3脂肪酸の分子レベルでの生体機能解析～なぜ体に重要な分子なのか?～
3. 学会等名 第23回公開講演会DHA・EPA協議会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideo Shindou
2. 発表標題 Phospholipid function controlled by lysophospholipid acyltransferases (LPLAT)
3. 学会等名 Seminar series; Current Discoveries in Biomedical Research “（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 進藤英雄
2. 発表標題 膜リン脂質操作マウスによる生体機能変化
3. 学会等名 第189回東京脂質談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 進藤英雄
2. 発表標題 膜を作る：リン脂質生合成酵素の新展開
3. 学会等名 第31回日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 進藤英雄
2. 発表標題 多様な生体膜リン脂質機能-リン脂質組成が生体機能を変える？-
3. 学会等名 九州大学薬学部 機能性分子の設計と機器開発 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

NCGM脂質生命科学研究所 https://www.lipid-life-science.jp
--

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
研究協力者	鈴木 知之 (Suzuki Tomoyuki) (60911112)		
研究協力者	吉田(橋立) 智美 (Yoshida-Hashidate Tomomi) (30610216)		
研究協力者	長田 克之 (Nagata Katsuyuki)		

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