

クリックケミストリーにより細胞内脂質を超高速で解析 ～代謝異常の原因遺伝子を同定する技術開発に成功～

<研究のポイント>

- これまで、脂質の解析には時間がかかり、効率の良い脂質の分析法が求められていました。
- 人の全遺伝子と脂質代謝の因果関係を網羅的に調べる超高速解析技術を開発しました。
- 代謝異常の原因となる遺伝子の特定により、さまざまな疾患の治療法開発が期待されます。

概要

JST 戦略的創造研究推進事業において、京都大学 大学院工学研究科の浜地 格 教授・田村 朋則 講師・土谷 正樹 助教らは、2022年ノーベル化学賞のクリックケミストリー^{注1)}を独自に発展させて、細胞における脂質の代謝状態を超高速に解析できる新技術「O-ClickFC」を開発しました。

従来型の細胞の脂質分析では、大量に集めた細胞抽出物の放射線分析や質量分析を行う方法が主流でした。この方法には多大な時間と労力がかかり、多数のサンプルを解析する際の課題となっています。2万種類にも及ぶ人の遺伝子と脂質代謝の関わりを突き止めるためには、本課題の解決が重要です。

本研究グループは、生きている細胞の中で脂質に蛍光色素を標識できる独自のクリック反応^{注1)}を利用して、細胞内における脂質の「存在量」と「空間分布」を、単純な蛍光シグナル情報へと変換し、超高速（1万細胞／1秒）に解析する技術「O-ClickFC」を開発しました。本技術と2020年にノーベル化学賞を受賞した「ゲノム編集」^{注2)}を組み合わせることで、人の全遺伝子の変異を持つ細胞集団から、脂質の代謝が異常な細胞を選別し、その原因遺伝子を同定することができます。本研究グループは実証実験として、人の脂質の主要成分であるホスファチジルコリン（PC）^{注3)}の代謝に重要な遺伝子49個を同定し、FLVCR1など多数の新規遺伝子を発見しました。詳細な解析から、FLVCR1は生命維持に必須の栄養素コリンを細胞内に取り込ませる役割を持つことを見いだしました。さらに、遺伝性神経疾患の原因となる変異型FLVCR1は、コリン取り込み活性を喪失するという病態発現メカニズムの一端を解明しました。

がん・肥満・糖尿病などの病気の背後には、代謝の異常があることが明らかになっています。本技術を、脂質だけでなく、糖やアミノ酸などのさまざまな代謝物の解析に応用することで、病態発現と代謝異常を結びつけている遺伝的要因の解明や、創薬標的の候補分子の発見が加速していくと期待されます。

本研究成果は、2023年3月13日午前11時（米国東部時間）発行の国際科学誌「Cell Metabolism」に掲載されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究（ERATO）

研究プロジェクト：「浜地ニューロ分子技術プロジェクト」（JPMJER1802）

研究総括：浜地 格（京都大学 大学院工学研究科 教授）

研究期間：平成30年10月～令和6年3月

上記研究課題では、独創的な「ケミカルバイオロジー分子技術」の創製により、神経系や脳内での情報伝達や細胞間ネットワーク形成を個々のたんぱく質分子レベルで精密に解明することを目的としています。

戦略的創造研究推進事業 個人型研究（さきがけ）

研究領域：「細胞の動的・高次構造体」

（研究総括：野地 博行 東京大学 大学院工学系研究科 教授）

研究課題名：「ゲノムレベルで細胞内脂質ダイナミクスを解明するラベル化戦略」
（JPMJPR20EA）

研究者：土谷 正樹（京都大学 大学院工学研究科 助教（青藍プログラム））

研究期間：令和2年12月～令和6年3月

上記研究課題では、脂質を定量的に捉える細胞測定技術の構築と、網羅的な遺伝子探索法との融合により、脂質動態の遺伝子基盤を解明する新技術の創出を目的としています。

1.研究の背景と経緯

私たちの体を作る細胞は、「脂質」と呼ばれる水に溶けにくい物質で構成されています。脂質は細胞内で合成され、細胞内のさまざまな小器官（オルガネラ）に供給されます（図1）。脂質の代謝に異常があると、細胞の働きがおかしくなり、がんなどの病気の発症につながります。これからの病気の治療や、予防法の開発のためには、脂質代謝のメカニズムの解明が必要不可欠です。

細胞内での脂質の代謝は、脂質を合成して他の小器官へと運ぶ、たんぱく質（酵素）のネットワークによって調節されます（図1）。これらのたんぱく質の遺伝子情報を特定するため、世界中で研究が行われています。対象の遺伝子が脂質代謝に関わるか否かを決めるには、その遺伝子に変異を持つ細胞の脂質代謝を調べる必要があります。

一般に、細胞の脂質を分析するためには、大量に集めた細胞から内容物を抽出して放射線分析や質量分析を行います。この方法は、時間と労力がかかります（数日／1サンプル）。少ないサンプル数の解析には問題ありませんが、2万種類にもわたる人間の遺伝子などの解析には適していません。このため、多数のサンプルを迅速に解析する、効率の良い脂質の分析技術が求められてきました。

2.研究の内容

本研究グループは、1個の細胞における脂質代謝の「量」と「空間」の特徴を超高速に捉える技術「**O-ClickFC=organelle-selective click labeling with flow cytometry**」を世界で初めて開発しました。「O-ClickFC」は「オルガネラ選択的クリックケミストリー」と「フローサイトメトリー」^{注4)}が融合した技術です（図2）。

本技術では、まず、細胞内の特定のオルガネラに絞って、標的脂質に蛍光色素を標識します（図2-①）。脂質の標識には、「クリックケミストリー」という連結反応を利用します。オルガネラの場所に依って色味（蛍光波長）が異なる色素を使用し、例えば、小胞体は緑色、細胞膜は青色、ミトコンドリアは赤色、といったように染め分けます。次に、「フローサイトメトリー」という1個1個の細胞の蛍光シグナルを每秒1万個の速度で解析する技術を利用します（図2-②）。蛍光の色味から標的オルガネラの「空間情報」を判別し、蛍光の明るさから脂質の「量情報」を把握します。一連の解析により、各オルガネラの脂質の変化を迅速に解析することが可能になります。

本技術の実証実験では、人間の細胞の主要な脂質成分である、「ホスファチジルコリン（PC）」をモデルとしました（図1）。PCは必須栄養素のコリンから生合成され、小胞体で生合成された後、細胞膜やミトコンドリアなどの他のオルガネラに運ばれます。本研究グループは、O-ClickFCを「CRISPR-KOスクリーニング」^{注2)}と呼ばれる遺伝子の網羅的探索技術に適用しました（図3）。人

間の全遺伝子の変異を網羅する細胞集団（ライブラリー）から、PC生合成が低下した細胞を選抜しました。その原因遺伝子を解析すると、PC生合成に関わる既知の遺伝子群に加えて、脂質代謝への寄与が報告されていない「FLVCR1」などの新規遺伝子が見つかりました。

本研究グループは、FLVCR1のPC代謝への関わりを詳細に調べました。FLVCR1は物質の細胞膜通過を促進する輸送体^{注5)}構造をとります（図4A）。FLVCR1は、「ヘム」と呼ばれる代謝物を細胞の内から外へと排出する役割があると考えられてきましたが（図4B左）、真の役割については、近年、議論が巻き起こっていました。

そこで、本研究グループは、O-ClickFCを活用した一連の解析を実行し、FLVCR1は、コリンを細胞内に輸送する際に欠かせない役割を果たすことを見いだしました（図4B右）。さらに、遺伝性神経疾患の原因となる変異を持つFLVCR1は、コリン輸送活性を失うことを解明しました（図4C）。なお、本研究のプレプリントでの公開から約半年後に、別の研究グループも同様の結論をプレプリントで報告しています。脂質代謝分野における過酷な研究競争の中で、本技術の妥当性と優位性が示されたものと言えます。

3.今後の展開

がん・肥満・糖尿病・神経障害・筋ジストロフィーなどの多くの疾患は、代謝の異常と密接に結びついています。病態発現メカニズムの理解や治療法・予防法の開発に向けて、鍵となる遺伝子を同定することが現代社会において強く求められています。本技術は、今後、中性脂肪などの脂質成分や、糖・アミノ酸・核酸などのさまざまな代謝物の解析にも拡張できます。また、iPS細胞技術・ゲノム編集技術・モデル動物などと本技術を組み合わせることで、実際の疾患に近い状況での遺伝子スクリーニングに応用できます。病態発現と代謝異常を結びつけている遺伝的要因の解明や、創薬標的の候補分子の発見に本技術が貢献すると期待されます。

<付記>

本研究は、京都薬科大学の長尾 耕治郎 准教授と共同で行いました。

<参考図>

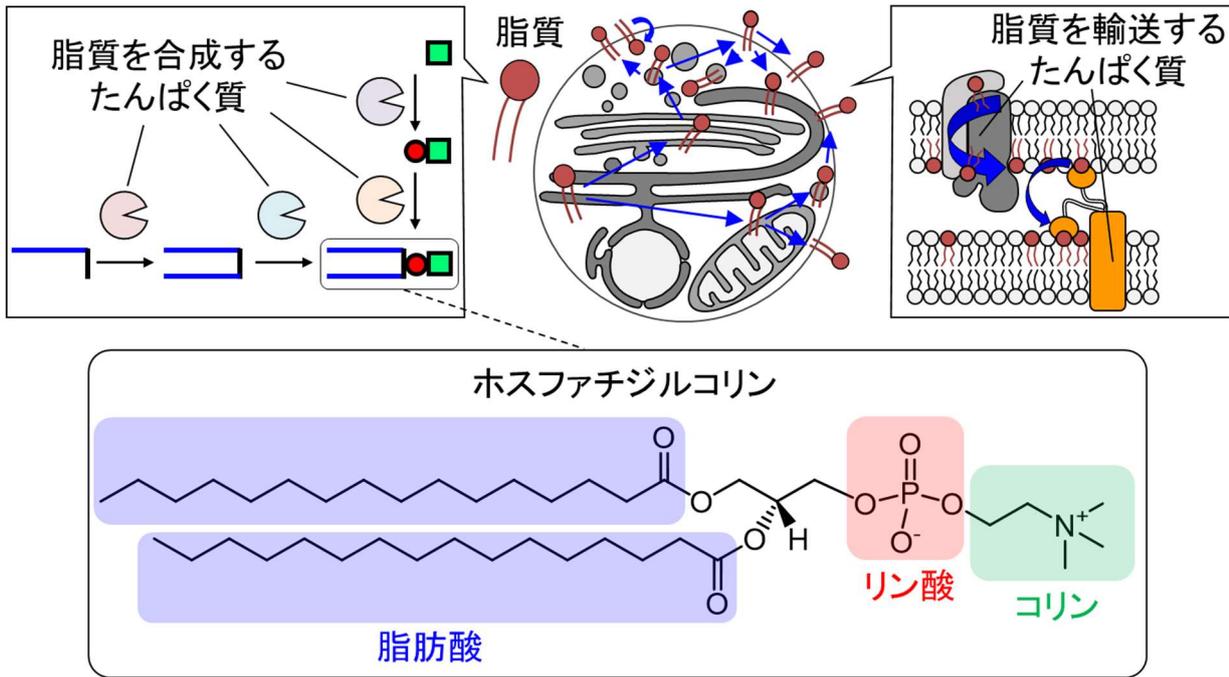


図1 細胞の脂質代謝の模式図

脂質は細胞内で合成され、他の細胞内小器官（オルガネラ）に供給される。主要な脂質成分であるホスファチジルコリンの代謝には、さまざまな種類のたんぱく質が関わっている。ホスファチジルコリンは、細胞の必須栄養素のコリンを基にして（図中の緑色部分）、他の物質（脂肪酸（青色）やリン酸（赤色））とつながられて、複数の酵素反応によって合成される。その後、小胞体を出発点としてミトコンドリアや細胞膜などへ、膜から別の膜へと脂質輸送たんぱく質によって運ばれていく。

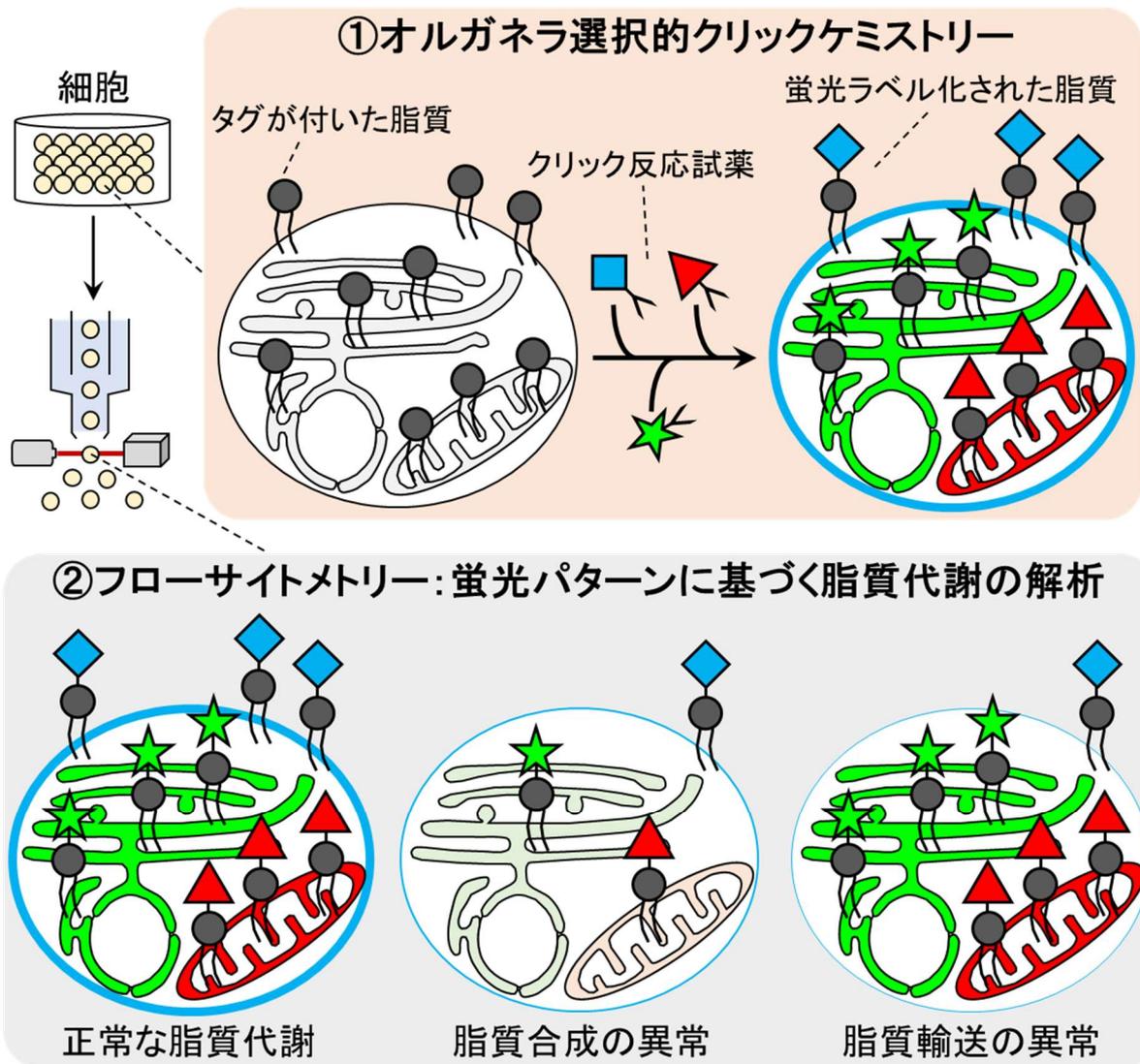


図2 O-ClickFCの模式図

本技術は、①オルガネラ選択的クリックケミストリーと②フローサイトメトリーの2つのパートから成る。①では、後のクリック反応の鍵となるタグが付いた脂質を細胞内で代謝させる (①左)。蛍光色素が付属するクリック反応試薬を細胞に投与すると、その試薬は、特定のオルガネラに移行して、タグ部分とクリック反応して脂質に結合する (①右)。色味が異なる試薬を用いると、オルガネラごとに染め分けて脂質を蛍光ラベル化できる。②では、1秒あたり細胞1万個の処理速度で、1個の細胞における蛍光信号を解析する。蛍光の色味からオルガネラの場所を判定し、蛍光の明るさからそのオルガネラでの脂質の量を数値化する。蛍光パターンを比較することで、細胞の脂質代謝の状態を識別できる。全体的に蛍光が明るい細胞は正常な脂質代謝を示し (②左)、全体的に蛍光が暗い細胞は脂質合成が不良な状態を意味し (②中央)、一部のオルガネラだけ蛍光が暗い細胞は脂質の輸送プロセスが損なわれた状態を意味する (②右)。

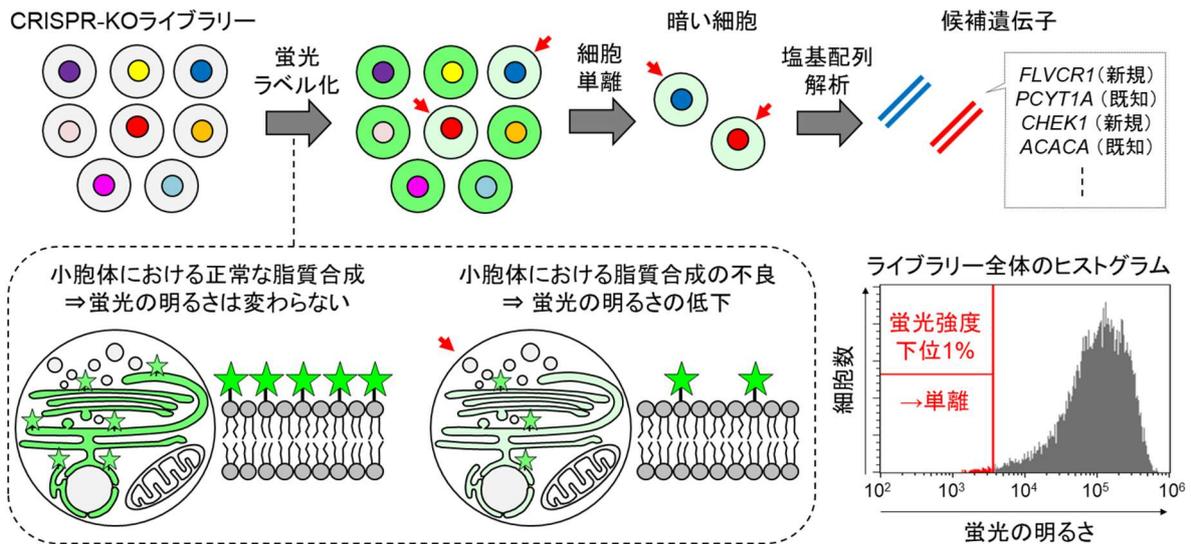


図3 O-Click FCを用いたCRISPR-KOスクリーニングの模式図

ヒト白血病細胞株K562の全遺伝子CRISPR-KOライブラリーにO-Click FCを適用し、PCの脂質合成に必須な遺伝子を探索した。脂質合成の場である小胞体を対象として、オルガネラ選択的クリックケミストリーを通じて、脂質の蛍光ラベル化を行った。正常な脂質合成を保つ細胞では蛍光ラベル化脂質の量は変わらないが、脂質合成が不良の細胞では蛍光ラベル化脂質の量が低下する。図右下のように、ライブラリー全体の内、蛍光強度が低い下位1パーセントの細胞を単離した。塩基配列の解析によって、脂質合成不良をもたらす遺伝子の候補として、FLVCR1、PCYT1A、CHEK1、ACACAなどを同定した。このうち、PCYT1A、ACACAなどはPC合成酵素の既知遺伝子である。FLVCR1やCHEK1など脂質代謝への関与がこれまで知られていなかった遺伝子が今回のスクリーニングで初めて発見された。

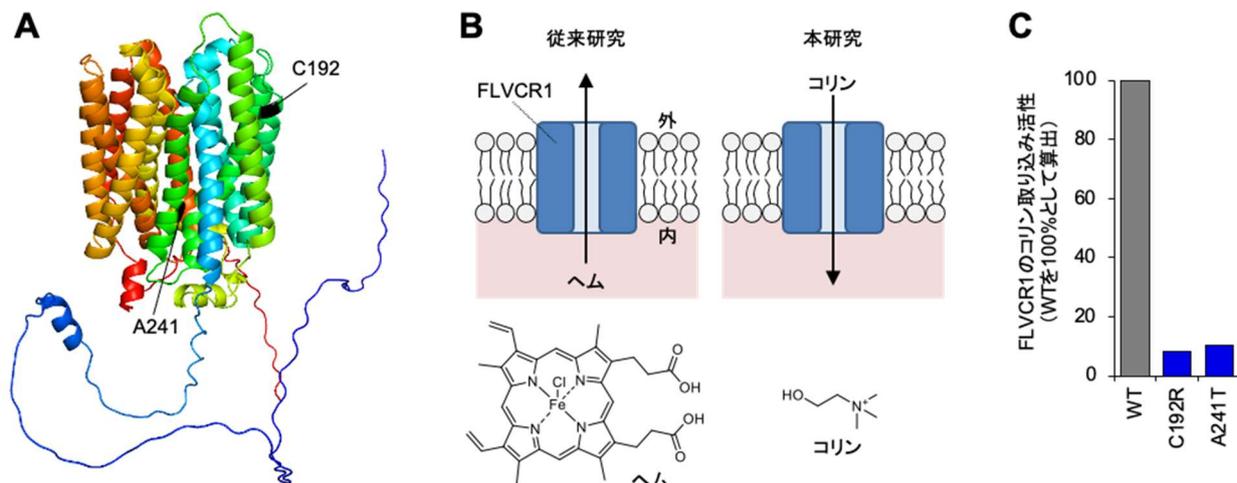


図4 FLVCR1によるコリン取り込み

(A) FLVCR1の立体構造予測。人間のFLVCR1は12回膜貫通ドメインを持つ輸送体構造をとる。192番目のシステイン(C192)および241番目のアラニン(A241)におけるアミノ酸の変異は遺伝性神経疾患の原因となる。(B) 従来研究と本研究におけるFLVCR1の物質輸送の模式図。これまでの研究において(B左)、FLVCR1は細胞内から細胞外へとヘムを排出すると考えられてきた。本研究において(B右)、FLVCR1は細胞外から細胞内へとコリンを取り込むことが見いだされた。(C) FLVCR1変異体のコリン取り込み活性の解析。ヒトFLVCR1の野生型(WT)に比べて、疾患点変異のC192R(192番目のシステインがアルギニンに変化)およびA241T(241番目のアラニンがスレオニンに変化)はコリン取り込み活性を示さなかった。

<用語解説>

注1) クリックケミストリー、クリック反応

2022年ノーベル化学賞の受賞テーマとなった物質合成反応。生体内や細胞内などの生理的な条件（室温・水中など）において、2つの分子を簡単に・迅速に・効率よく結合させることができる。代表例として、アジドおよびアルキンと呼ばれる2つの分子の結合反応が良く利用される。本技術でも、代謝経路を通じて脂質にアジドを導入し、アルキンを持つ蛍光色素と反応させることで、脂質への蛍光標識を行っている（図2）。

注2) ゲノム編集、CRISPR-KOスクリーニング

2020年ノーベル化学賞の受賞テーマとなった遺伝子改変技術。CRISPR/Cas9と呼ばれる高効率のDNA切断酵素システムを利用して、細胞のゲノム（全ての遺伝子情報が書き込まれたDNA）に変異を導入し、特定の遺伝子の機能を欠失させる（KO：ノックアウト）ことができる。CRISPR-KOスクリーニングでは、1個の細胞当たり1種類の遺伝子を欠損した細胞集団（ライブラリー）が利用され、ヒトゲノムの場合は約2万種類の遺伝子を対象とする。1億個程度の細胞ライブラリーから目的の生物学的特徴を示す細胞を数パーセントに選抜することで、その特徴を与える原因となった遺伝子変異を同定することができる。

注3) ホスファチジルコリン（PC）

人を含む哺乳動物の細胞において、脂質の主要な成分。細胞の膜を形作る土台となる分子であり、他の種類の脂質（中性脂肪など）の代謝バランスにも関わる。ホスファチジルコリンの素となるコリンは、細胞が自力で作ることができない物質であるため、食事などを通じて外部から摂取しなければならない必須栄養素である。コリンの欠乏やホスファチジルコリン合成の不良は、細胞に深刻なダメージをもたらす。人間の場合、ホスファチジルコリン合成不良の遺伝病として網膜疾患、筋疾患、脂肪異常栄養症などが知られる。

注4) フローサイトメトリー

細胞が懸濁した液体を細く流し、レーザー光を当てて1個1個の細胞を分析する技術。細胞の光学情報（蛍光の強度および波長）を高速で取得できる。顕微鏡と異なり空間分解能を持たないため、細胞1個あたりの蛍光強度を調べることができるが、その蛍光が細胞内のどこから発しているかということまでは分からない。

注5) 輸送体

親水性の物質を細胞の膜を横切って細胞内外に通過させるたんぱく質。脂質からなる細胞の膜は外界を隔てる細胞のバリアとして働いており、水に溶けている物質が勝手に細胞内に入ることを妨げる。コリンなどの親水性の栄養素を細胞内に積極的に取り込ませるために、輸送体はその物質を認識すると、たんぱく質構造を変えて物質を細胞の内側に運ぶ。輸送体は膜を貫く構造をとっており、中央に物質が通れるだけの隙間を持つ。

<論文タイトル>

“Organelle-selective click labeling coupled with flow cytometry allows pooled CRISPR screening of genes involved in phosphatidylcholine metabolism”

（オルガネラ選択的クリックケミストリーとフローサイトメトリーの技術の融合によってホスファチジルコリン代謝に関わる遺伝子の網羅的な探索が可能になる）

D O I : 10.1016/j.cmet.2023.02.014