

様々な脂肪酸含有脂質を細胞内小器官ごとに標識することに成功

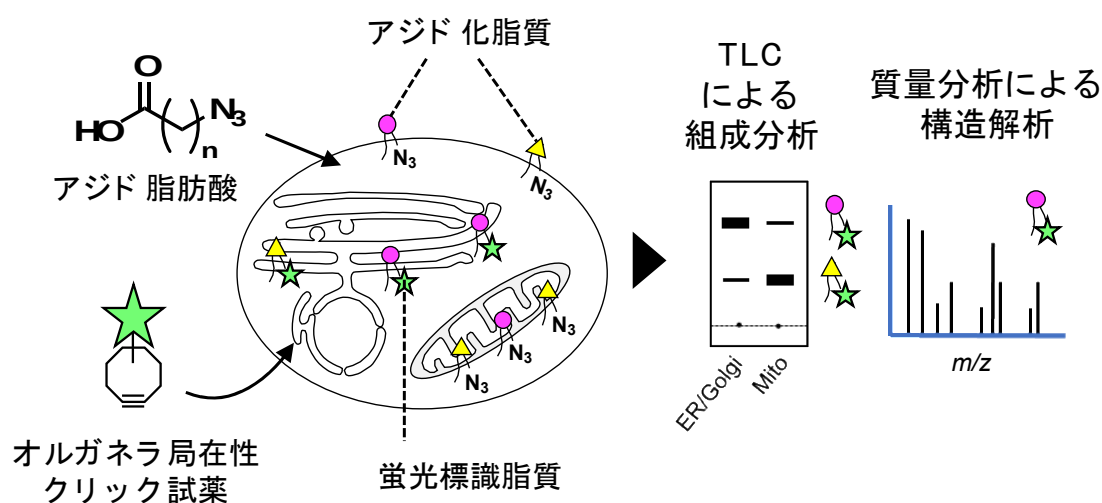
—脂肪酸代謝物の細胞内動態を解析可能に—

概要

京都大学大学院工学研究科の浜地格 教授、田村朋則 講師、木村天海 修士課程学生（研究当時）、川本青汰 修士課程学生らの研究グループは、生体膜の構成成分である脂肪酸⁽¹⁾含有脂質を細胞内小器官（オルガネラ）⁽²⁾ごとに標識し、組成や分子構造、動態解析を可能にする新しい手法を開発しました。

細胞内に取り込まれた脂肪酸は、リン脂質⁽³⁾や中性脂質⁽⁴⁾など様々な脂質へと変換され、生体膜の構成要素やエネルギー源となります。また、脂肪酸は鎖長や二重結合の数・位置の違いによって様々な種類が存在し、これが脂質の多様性を生み出すと同時に、脂質解析を複雑で困難なものにしています。本研究グループは、「アジド脂肪酸の代謝導入⁽⁵⁾法」と「オルガネラに局在するクリック試薬⁽⁶⁾」を組み合わせた独自のアイデアで、特定のオルガネラにある脂肪酸含有脂質を選択的に標識し、その種類や量の違いを高い精度で解析することに成功しました。また本研究では、オルガネラ間で脂肪酸含有脂質の種類・量の変動の様子が異なることを明らかにしました。この成果は、研究ツールの乏しさゆえに未解明な点の多い細胞内脂質代謝機構の解明に向けた大きなブレークスルーにつながると期待されます。

本研究成果は、2025 年 6 月 17 日に米国の国際学術誌「*Journal of the American Chemical Society*」にオンライン掲載されました。



本研究の概要図

1. 背景

脂肪酸はエネルギー源や細胞膜の構成成分として重要な分子です。細胞内では脂肪酸はアシル CoA に変換され、 β 酸化、鎖長伸長、不飽和化などを経て、リン脂質や中性脂質の生合成に用いられます。これらの代謝プロセスは、特定の細胞内小器官（オルガネラ）に局在する複数の酵素によって行われるため、脂肪酸およびその代謝産物はオルガネラ依存的な局在パターンを示すと考えられますが、その実態は十分には解明されていません。脂肪酸代謝物の解析や可視化には、従来、同位体やアルキン基による代謝導入を用いる方法が広く用いられてきました。これらの標識法を薄層クロマトグラフィー（TLC）や質量分析と組み合わせることで脂肪酸含有脂質の構造や組成比を詳細に解析することが可能です。しかし、これらの方法では細胞を破碎した脂質抽出物を解析するため、空間情報が失われ、オルガネラ特異的な解析は困難でした。オルガネラレベルの解析を目的とした方法として、オルガネラ分画と質量分析を組み合わせたオルガネラリポドミクスや質量分析イメージングといったアプローチも報告されていますが、それぞれ時間分解能や空間分解能が十分ではないのが現状でした。

2. 研究手法・成果

本研究ではこれらの課題を解決するため、アジド基を導入した脂肪酸（AFA）と、本研究グループが開発したオルガネラ局在性クリック試薬（OCD）を用いた新たな脂肪酸代謝物標識法を開発しました。本手法では、AFA を細胞に取り込ませた後、歪みアルキンを有する OCD を細胞に添加し、標的オルガネラ特異的に銅フリーのクリック反応（SPAAC）を行うことで、オルガネラ内の脂肪酸代謝物を選択的に蛍光標識します。蛍光標識された脂肪酸代謝物は、TLC や質量分析によって定性・定量解析可能であり、そのオルガネラ局在情報は標識される蛍光色素の波長によって識別できます。

本研究では、哺乳類細胞に最も豊富に存在する脂肪酸のアジドアナログとして Azido-palmitic acid (AzPal) および Azido-oleic acid (AzOle) を採用し、これらをヒト K562 細胞に 15 分間導入しました。質量分析の結果、これらは天然脂肪酸と同様にホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、トリアシルグリセロール（TAG）、ジアシルグリセロール（DAG）などに効率的に取り込まれることが確認されました。続いて、細胞内の小胞体/ゴルジ体、ミトコンドリア、リソソーム、形質膜といった異なるオルガネラ膜内において、アジド化脂質を OCD で選択的に蛍光標識した後、細胞から脂質を抽出して TLC 解析を行いました。その結果、AFA を取り込んだ各脂質種が OCD により標識されることが示されました。また興味深いことに、標識された脂質種間の比率がオルガネラごとに異なることが明らかとなりました。さらに、質量分析によって蛍光標識脂質の構造を解析した結果、各脂質種についてさまざまな炭素鎖長、不飽和度をもつ脂質分子が標識されていることがわかり、それらの定量解析から、ミトコンドリアでは小胞体/ゴルジ体に比べて多価不飽和脂肪酸を含む PE が多いことが示されました。この結果は過去の知見とよく一致し、本手法によってオルガネラ膜の脂肪酸組成を正しく評価できることが実証されました。さらに本研究では新たに生合成された脂肪酸含有脂質の動態をより詳細に調べるためにパルスチェイス解析を実施し、PE および PC の量的変化が小胞体/ゴルジ体とミトコンドリアで異なることを明らかにしました。

以上の結果から、本法は脂肪酸代謝物の細胞内動態をオルガネラレベルで定性・定量的に解析するために有用な手法であることが示されました。

3. 波及効果、今後の予定

本手法は各脂肪酸含有脂質の量的変動をオルガネラレベルの空間分解能で追跡可能な新しい手法であり、今後

化合物ライブラリーを用いた阻害剤スクリーニングや遺伝子ノックアウト技術と組み合わせることで、細胞内脂肪酸代謝や脂質輸送を制御する未知の分子やタンパク質の同定にも有効であると予想されます。こうした応用展開は脂質代謝異常を原因とする疾患の予防・診断・治療につながると期待されます。今後は本手法に適用可能なオルガネラの拡張や、より高感度な質量分析による微量脂質解析を実施することで、いまだ謎の多い細胞内脂肪酸代謝の分子機構の解明に貢献したいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

- ・ 科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 総括実施型（ERATO）

研究領域：「浜地ニューロ分子技術」（研究総括：浜地格 京都大学教授）（課題番号 JPMJER1802）

- ・ 文部科学省科学研究費助成事業 特別推進研究

研究課題名：「生体分子夾雑の有機化学の開拓」（研究代表者：浜地格 京都大学教授）（課題番号 23H05405）

- ・ 文部科学省科学研究費助成事業 基盤研究（B）

研究課題名：「オルガネラ代謝物の化学標識による時空間メタボローム解析」（研究代表者：田村朋則 京都大学講師）（課題番号 21H02058）

- ・ 科学技術振興機構（JST） 創発的研究支援事業

研究課題名：「光近傍ラベリングによる in vivo インタラクトーム解析」（研究代表者：田村朋則 京都大学講師）（課題番号 JPMJFR230G）

<用語解説>

1. **脂肪酸**：炭素、水素、酸素から構成される有機化合物で、長い炭素鎖の末端にカルボキシル基(-COOH)を持つ酸の一種。炭素鎖の長さや、二重結合の数や位置によって様々な種類がある。
2. **細胞内小器官(オルガネラ)**：細胞の中に存在し、それぞれが特定の機能を持つ構造体の総称。遺伝情報を管理する核、エネルギー生産の場であるミトコンドリア、タンパク質や脂質を合成する小胞体、タンパク質の修飾や分泌を行うゴルジ体、細胞内分子を分解するリソソームなどがある。
3. **リン脂質**：構造中にリン酸エステル部位をもつ脂質の総称。両親媒性を持ち、脂質二重層を形成して糖脂質やコレステロールと共に細胞膜の主要な構成成分となるほか、生体内でのシグナル伝達にも関わる。
4. **中性脂質**：グリセロールと脂肪酸がエステル結合で結びついた化合物。
5. **代謝導入**：天然の細胞内には存在しない官能基を導入するための方法。例えば、脂肪酸に類似した構造を持つアジド化脂肪酸を含む培地中で細胞を培養すると、これが代謝経路に誤導入されアジド化脂肪酸を持つ脂質が生合成される。
6. **クリック試薬**：2022年にノーベル賞受賞対象となったクリック反応を行うための試薬。本研究では特に、脂肪酸に導入したアジド基と触媒無しかつ選択的に反応する構造的に歪んだアルキンのこと。

<研究者のコメント>

「この研究は、我々がこれまで進めてきた脂質の蛍光イメージング研究から大きく派生して、質量分析を用いたオルガネラ脂質の構造解析や定量解析に挑戦したものです。我々のグループにとって網羅的な脂質の質量分析は全く未知の挑戦でしたが、木村君が本手法の基礎を固め、それを引き継いだ川本君がより最新の質量分析装置を用いて粘り強くデータをブラッシュアップしたことで素晴らしい成果につながりました。また、論文文化にあたっては、研究室卒業生である藤沢博士の秘蔵分子、土谷博士の助言がアクセプトの鍵となりました。今

回開発した手法は脂肪酸含有脂質を高い空間分解能で解析するための有用な研究ツールとして、いまだ理解が進んでいない脂質研究を、これまでにない視点から大きく加速することが期待されます。」(田村朋則)

<論文タイトルと著者>

タイトル：Subcellular analysis of fatty acid metabolism using organelle-selective click chemistry

(オルガネラ選択的クリック反応による細胞内脂肪酸代謝解析)

著 者：木村天海、川本青汰、藤沢有磨、吉田万桜、Shen Yuying, 土谷正樹、田村朋則、浜地格

掲 載 誌：Journal of the American Chemical Society DOI：10.1021/jacs.5c02871

<参考図表>

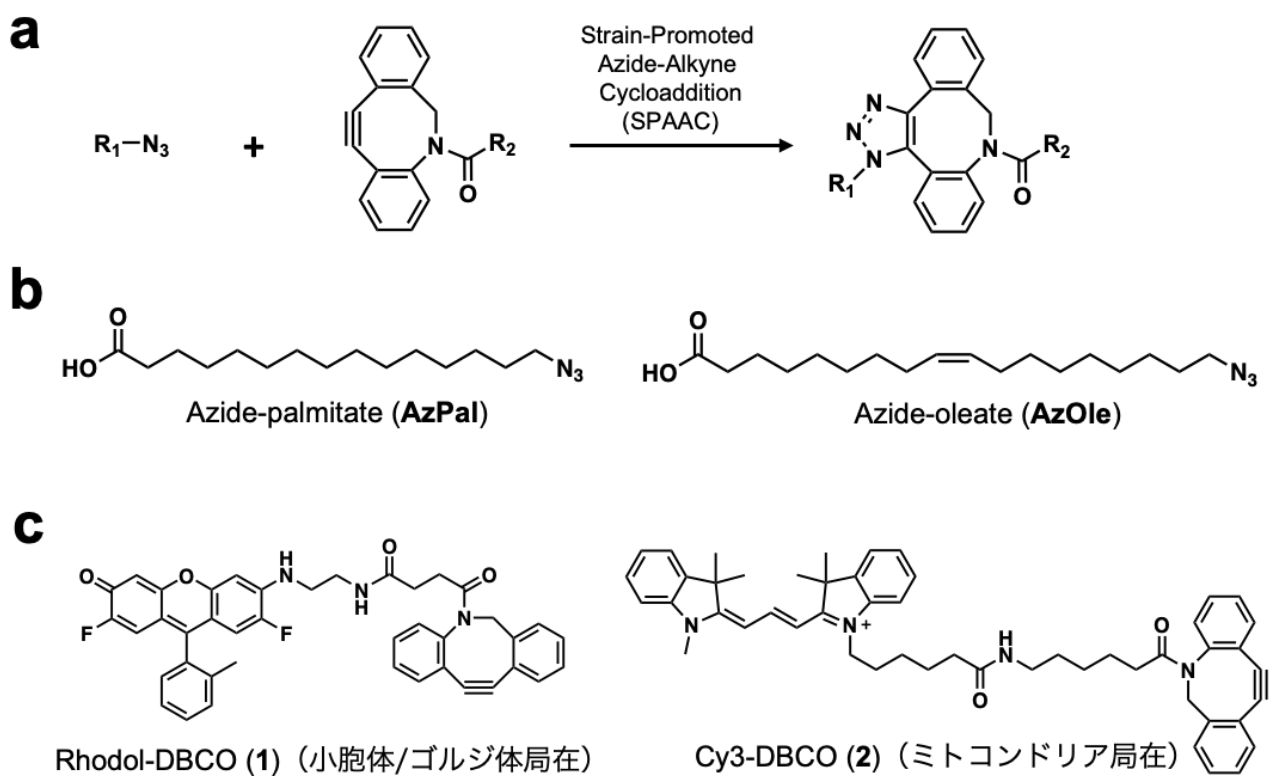


図 1 本手法の鍵となる銅触媒フリーのクリック反応 (a) SPAAC 反応スキーム (b) アジド基を導入した脂肪酸アナログ (c)本研究で使用したオルガネラ局在性クリック試薬

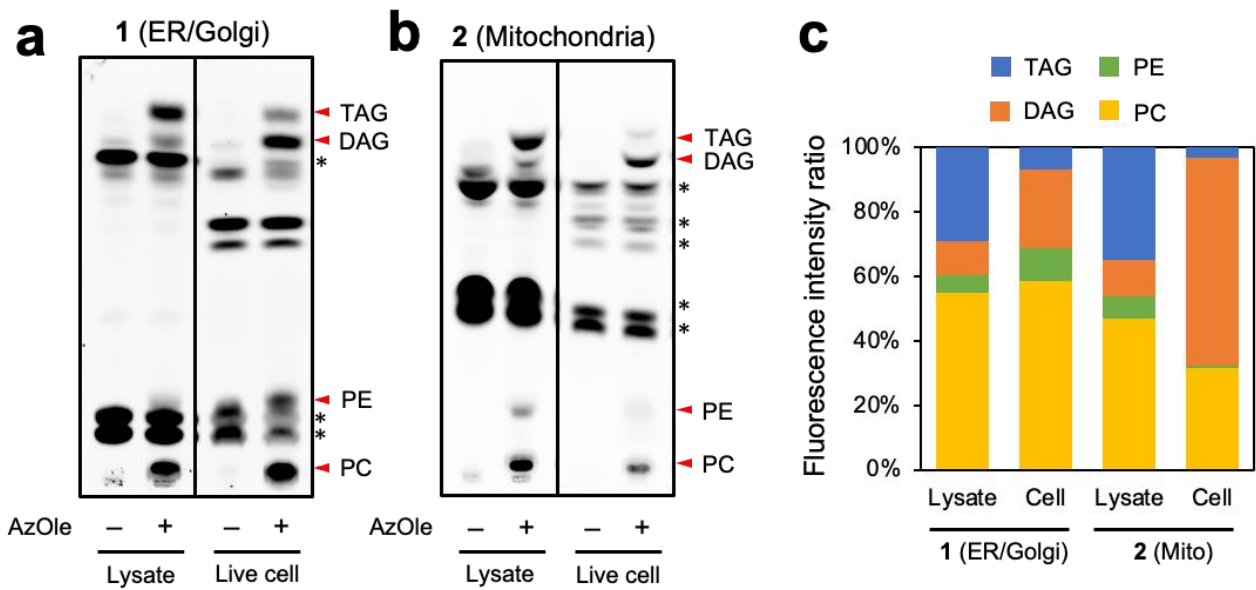


図 2 AzOle 導入生細胞(Live cell)または細胞破砕物(Lysate)における蛍光標識脂質の TLC 解析 (a) 小胞体/ゴルジ体局在性クリック試薬による標識 (b)ミトコンドリア局在性クリック試薬による標識 (c) 各蛍光標識脂質の組成比
ミトコンドリアでは小胞体/ゴルジ体に比べてジアシルグリセロール(DAG)の比率が多いことがわかった。こうした DAG の濃縮はミトコンドリアを生化学的に分画したサンプルでも確認された。

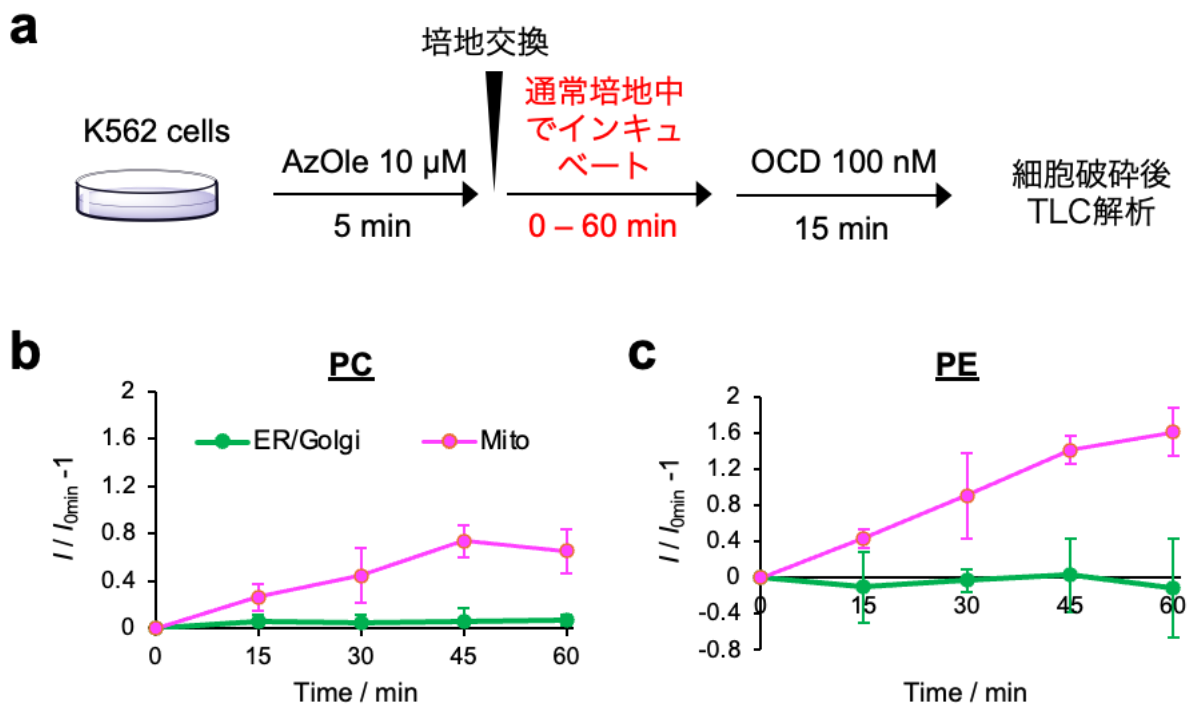


図 3 パルスチェイス解析による脂肪酸含有脂質のオルガネラ間輸送解析 (a)パルスチェイス実験のスキーム (b, c) 小胞体/ゴルジ体およびミトコンドリアにおける(b)PC および(c)PE の蛍光標識量変化

PC や PE は小胞体/ゴルジ体で速やかに合成されるため、測定開始 0 min から 60 min の間、ラベルされる量に変化がないが、ミトコンドリアの場合、小胞体/ゴルジ体で生合成された AzOle 含有脂質がミトコンドリアに輸送されるまでに時間差があるため、測定時間中にラベル化シグナルの増加が観察された。