

研究報告書

「脂質ダイナミクスの精密解析技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 多喜 正泰

1. 研究のねらい

個々の細胞の機能や個性を網羅的に解析することは、細胞生物学における大きなゴールの一つである。1細胞という極めて微小な空間内に含まれる情報を精密に読み出すために、高い時間分解能と空間分解能を併せもつ蛍光イメージング法は有用である。蛍光タンパク質や有機小分子蛍光プローブを用いた生体分子の挙動解析は生命科学研究の発展に大きく寄与してきた。しかし、細胞機能の網羅的解析を達成するためには、既存の技術では困難な生体関連物質を対象にした研究展開も必要である。

本研究では、無数にある細胞機能の中でも脂質代謝に着目した。生体膜脂質は細胞の個性を決める重要な要素であり、その合成経路は様々な要因によって調整されている。例えば、細胞内脂肪滴は脂質調整の場として知られており、リン脂質が不足している場合には脂肪滴近傍で脂質合成酵素の活性化が誘導され、ホスファチジルコリン(PC)合成を高めるといった機構が存在する。そのため、周辺の脂質濃度に応じて脂肪滴の大きさが敏感に変化するなど、脂肪滴の形態や機能は多様性に富んでいる。このように脂質代謝は細胞活動を維持するために必須の機能であるが、代謝機構に関する研究はそれほど進展しているとはいえない。これは、今の研究手法が脂質代謝に関与するタンパク質の構造や発現変化などについて検証する、いわば分子生物学的手法が主流となっていることが主な要因である。すなわち、脂質研究を飛躍的に進展させるためには、脂質ダイナミクスを直接観察するための新しい技術を創出し、その解析手法を開発することが必要不可欠であった。

本研究においては、脂質ダイナミクスを超解像レベルで精密解析可能な新技術の創出を目指し、“マルチカラーイメージングによる脂肪滴代謝機構の解明(研究テーマA)”と“超解像ライブイメージングによるリン脂質代謝解析(研究テーマB)”を実施課題として定めた。研究テーマAでは、脂肪滴特異的な染色を可能にする超耐光性蛍光プローブを開発し、超解像レベルでの脂肪滴動態追跡技術を確立する。併せて、蛍光性の長鎖脂肪酸を開発し、細胞内で代謝される様子を高精度に解析することも目標とした。研究テーマBでは、コリンアナログの代謝標識技術を活用した超耐光性色素によるリン脂質のラベル化を実施し、超解像イメージングによる代謝解析技術の創出を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、細胞内でおこる脂質代謝を高精度で解析するための新規なケミカルツールの開発、およびこれらを活用したイメージング技術の創出に取り組んだ。研究テーマAでは、脂肪滴を可視化する蛍光プローブとして、①光照射に対して極めて高い安定性を有する脂肪滴染色剤 LAQ1、および②環境応答性蛍光色素を連結した長鎖脂肪酸 AP-C12 を開発した。LAQ1

は環境応答性を有しており、高極性溶媒中では蛍光が抑制されているが、脂肪滴などの低極性環境下では強い蛍光を発する。そのため、バックグラウンドシグナルが低く、極微小な脂肪滴も検出できることがわかった。また超耐光性とも形容できる圧倒的な光安定性を示すことから、脂肪代謝過程を長時間に渡り観測することも可能になった。実際、フォルスコリン処理によって細胞内 cAMP 濃度を高めたところ、脂肪滴が加水分解を伴って縮小し、同時に分解生成した脂肪酸が再び代謝されて、新たな脂肪滴が形成される様子が観測された。蛍光性長鎖脂肪酸 AP-C12 については、細胞内で速やかに代謝され、脂肪酸代謝に関与する様々なオルガネラに取り込まれることを見出した。AP-C12 の代謝物はオルガネラの極性に応じて蛍光波長が変化する特徴をもつため、代謝物の局在を蛍光特性の違いとしてイメージングすることができる。この特性により、リポファジーによる脂肪酸代謝を検出することが可能になった。一方、研究テーマ B では当初のコリンアナログを用いたリン脂質標識から一部変更し、新たなオルガネラ膜標識技術の構築を目指した。まず、超耐光性蛍光色素 MitoPB Yellow を開発し、超解像 STED 顕微鏡で観察することによって、ミトコンドリア内膜のみを特異的に可視化できることを見出した。生きた細胞内で、内膜の折りたたみ構造であるクリステを約 60 nm の空間分解能で明瞭に捉えることができる。超耐光性を活かすことで、ミトコンドリア膨潤時の内膜動態をタイムラプス STED イメージングによって精微に追跡することに成功した。また別の耐光性色素として、リンオキンドで架橋されたローダミン誘導体 PREX 710 を開発した。700 nm を超える近赤外領域に吸収および蛍光極大を示すことに加え、既存の近赤外蛍光色素に比べても圧倒的に優れた耐光性を有していることが明らかとなった。脂質からタンパク質に至る様々な生体分子を標識することができ、1分子イメージング用プローブとしても有用であることを実証した。

(2) 詳細

研究テーマ A「マルチカラーイメージングによる脂肪滴代謝機構の解明」

脂肪滴はトリアシルグリセリド (TAG) がリン脂質単分子層で囲まれた構造をもつオルガネラである。以前は細胞内にある余剰脂肪の貯蔵庫として認識されていたが、近年では脂質代謝において中心的な役割を果たすオルガネラとして注目されるようになった。脂質代謝異常は糖尿病、動脈硬化症、肝臓・胆嚢疾患を含む様々な疾病とも深い関連性があることから、その形成機構や機能の解明が強く望まれている。従来の分子生物学的な手法では、TAG が主成分である脂肪滴を直接観測することができないため、これを可視化するための新たな分子ツールの開発が必要であった。本研究では、①超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1、および②環境応答性蛍光脂肪酸 AP-C12 をそれぞれ開発し、脂質代謝研究における有用性を実証した。

まず、光照射に対して極めて高い安定性を示す「超耐光性蛍光色素」の開発において、近年我々が提唱した「平面固定化による π 共役骨格の構造強化」の概念に基づき、リンあるいは硫黄原子で平面固定化した蛍光色素骨格を種々合成した。この骨格に対して電子供与基であるジフェニルアミノ基を導入することにより、環境応答性を有する一連の色素群を得た。脂肪細胞を用いて検証した結果、図 1a に示す LAQ1 が、脂肪滴に対する高い選択性、超耐光性、低い細胞毒性、励起・蛍光波長の点において、最も優れた脂肪滴染色能を有していることがわかった。実際、LAQ1 を用いて染色した脂肪細胞に対してフォルスコリンおよび IBMX で処理し、タイムラプスイメージングにより脂肪分解反応を追跡したところ、分解反応に伴って脂肪滴サイズ

が小さくなる一方、小胞体付近から新たな微小脂肪滴が形成される様子が観察された(図 1 b). これは、TAG の分解によって生じた脂肪酸が細胞外で補足されず、再び細胞内に取り込まれて代謝されたことによる。このとき形成した脂肪滴を超解像 STED 顕微鏡で捉えることにも成功した(図 1c)。

次に、図 1d に示す環境応答性蛍光脂肪酸 AP-C12 について検証した。アザピレン(AP)は、分子量が 300 以下の小さい蛍光団でありながら可視光で励起可能であり、さらに溶媒の極性が高くなるほど短波長シフトする負の溶媒効果を示す。AP-C12 を含む培地中で脂肪細胞、HepG2, Huh7 などそれぞれ培養したところ、いずれの場合も様々なオルガネラに分布した蛍光シグナルが得られた(図 1e)。このことは、AP-C12 が脂肪酸として細胞内に取り込まれた後、脂肪酸代謝経路に従って各オルガネラに分布されたことを表しており、それぞれ脂肪酸アシル CoA, リン脂質, TAG に変換されていることが示唆された。さらに解析を進めると、アミノ酸飢餓状態で 6 時間培養した HepG2 細胞に AP-C12 を取り込ませた場合、AP-C12 の代謝物がミトコンドリアに著しく集積する様子が認められた。AP-C12 がエネルギー源として利用され、ミトコンドリアで β 酸化が進行していることによるものと考えられる。実際、 β 酸化によって炭素鎖長が短くなった AP-C12 の代謝物が質量分析によって検出されたことから本結果は裏付けられる。最後に、リポファジー過程の可視化について検証した。リポファジーは脂肪滴が関与するオートファジーの一種であり、脂質代謝において重要なプロセスである。1% FBS を含む HBSS 培地中で HepG2 細胞を 12 時間培養後、AP-C12 でさらに 1 時間培養すると膜で囲まれたいくつかの構造体が脂肪滴近傍に確認された(図 1f)。興味深いことに、膜内部の極性環境が脂溶性のものと同様のものであることが示唆された。AP-C12 の特性から、前者が隔離膜によって取り囲まれたオートファゴソーム、後者がリソソームと結合したオートリソソームであると示唆された。実際、これらの構造体はオートファジーマーカーである LC3 に発現させた GFP のシグナルと良い一致を示すことから、リポファジーによる代謝が進行していることが支持された。

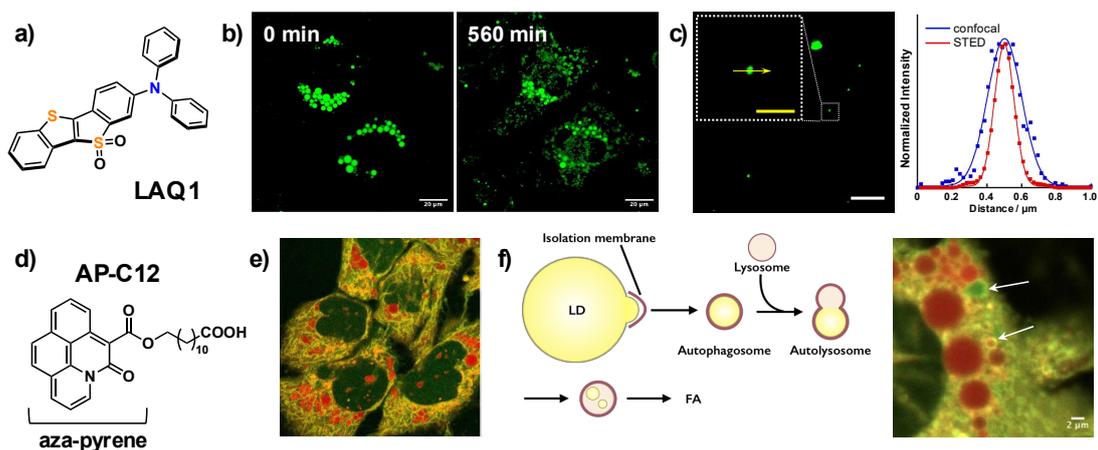


図1. a) 超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1. b) LAQ1 で染色した脂肪細胞をフォルスコリンおよび IBMX で処理すると、脂肪滴の分解と形成が同時に観測される。c) 極微小脂肪滴の超解像画像。共焦点顕微鏡に比べて格段に高い分解能を有している。d) 環境応答性蛍光脂肪酸 AP-C12. e) HepG2 細胞における AP-C12 代謝物のマルチカラーイメージング。f) リポファジー過程と AP-C12 によって検出されたオートファゴソーム

以上の結果から、LAQ1 および AP-C12 は脂肪滴の代謝解析を行う上で有用な分子ツールであることが実証された。すなわち、脂肪滴染色プローブに環境応答性を付与することにより、脂肪滴動態をより精密に追跡することが可能になった。本成果についてそれぞれ論文投稿の準備を進めている。

研究テーマ B「超解像ライブイメージングによるリン脂質代謝解析」

アジドやアルキンを有するコリン誘導体が細胞内で代謝されることを利用し、ホスファチジルコリン(PC)のヘッドグループへのこれら官能基の導入、およびクリックケミストリーによる超耐光性蛍光色素の標識を狙った。これにより、リン脂質の代謝過程を超解像レベルでタイムラプス解析することが可能になる。しかし、研究を遂行していく過程において、環境応答性を有する超耐光性色素骨格(図 2a)が特定のオルガネラ膜を選択的に染色できることを見出したため、観察対象をリン脂質からオルガネラ膜に変更し、オルガネラ膜ダイナミクスの超解像追跡とした。細胞内の脂質代謝過程には複数のオルガネラが関与し、相互に協同しながら細胞機能を維持していることが知られている。したがって、これらのオルガネラ動態を精微に解析することは脂質ダイナミクスの解明にも繋がってくる。

まず、ミトコンドリア膜構造の超解像ライブセルイメージングを指向したプローブ開発に着手した。脂溶性環境で強い蛍光を示す超耐光性蛍光色素骨格に対し、ミトコンドリアへの膜電位依存的な集積を志向した TPP、およびタンパク質結合部位として EP を導入した MitoPB Yellow を設計した(図 2a)。MitoPB Yellow は高いミトコンドリア選択性を示し、染色した細胞を固定してもミトコンドリアからのシグナルは観察されたことから、設計通りミトコンドリア膜タンパク質と結合していることが示唆された。次に、生細胞中におけるミトコンドリアの STED イメージングを行った。その結果、共焦点顕微鏡では観察することができなかったミトコンドリアの内膜構造(クリステ)を約 60 nm の空間分解能で明瞭に可視化することに成功した(図 2b)。内膜選択性は外膜タンパク質 TOMM20 との共染色によって確認し、同時にマルチカラー-STED への有用性も示すことができた。さらに、核様体欠損細胞において、同心円状に再構築されたクリステ(図 2c)や、アミノ酸飢餓条件で培養した細胞においては、クリステがより密になっている状態(図 2d)もライブセルで捉えることに成功した。また、超耐光性という特異な性質を活かし、ミトコンドリア内膜動態の STED タイムラプス計測を実施したところ、ミトコンドリアが膨潤し、クリステ同士が融合する様子が可視化された。

MitoPB Yellow と超解像顕微鏡を併せた本技術は、様々な細胞機能に関与するミトコンドリアの動態を解析する上で強力なツールである。本成果は、原著論文として Proc. Natl. Acad. Sci. USA に発表した。その後、国内外の多くの研究者から問い合わせがあり、共同研究を進めている。

このように細胞機能を高分解能で長時間にわたって計測する技術を確立することは、非常に重要な課題である。とくに光毒性の観点からは、細胞機能に対する影響が小さい近赤外領域の光は利用価値が高いが、耐光性に優れた近赤外蛍光色素はそれほど多くない。これに対し、本研究ではリンオキシドをローダミン色素の9位に導入した蛍光色素 PERX 710 を開発した(図 2d)。PERX 710 は 712 nm と 740 nm にそれぞれ吸収および蛍光極大波長を有し、水中においても蛍光量子収率 0.13 を示した。PERX 710 の光安定性を一分子レベルで評価したとこ

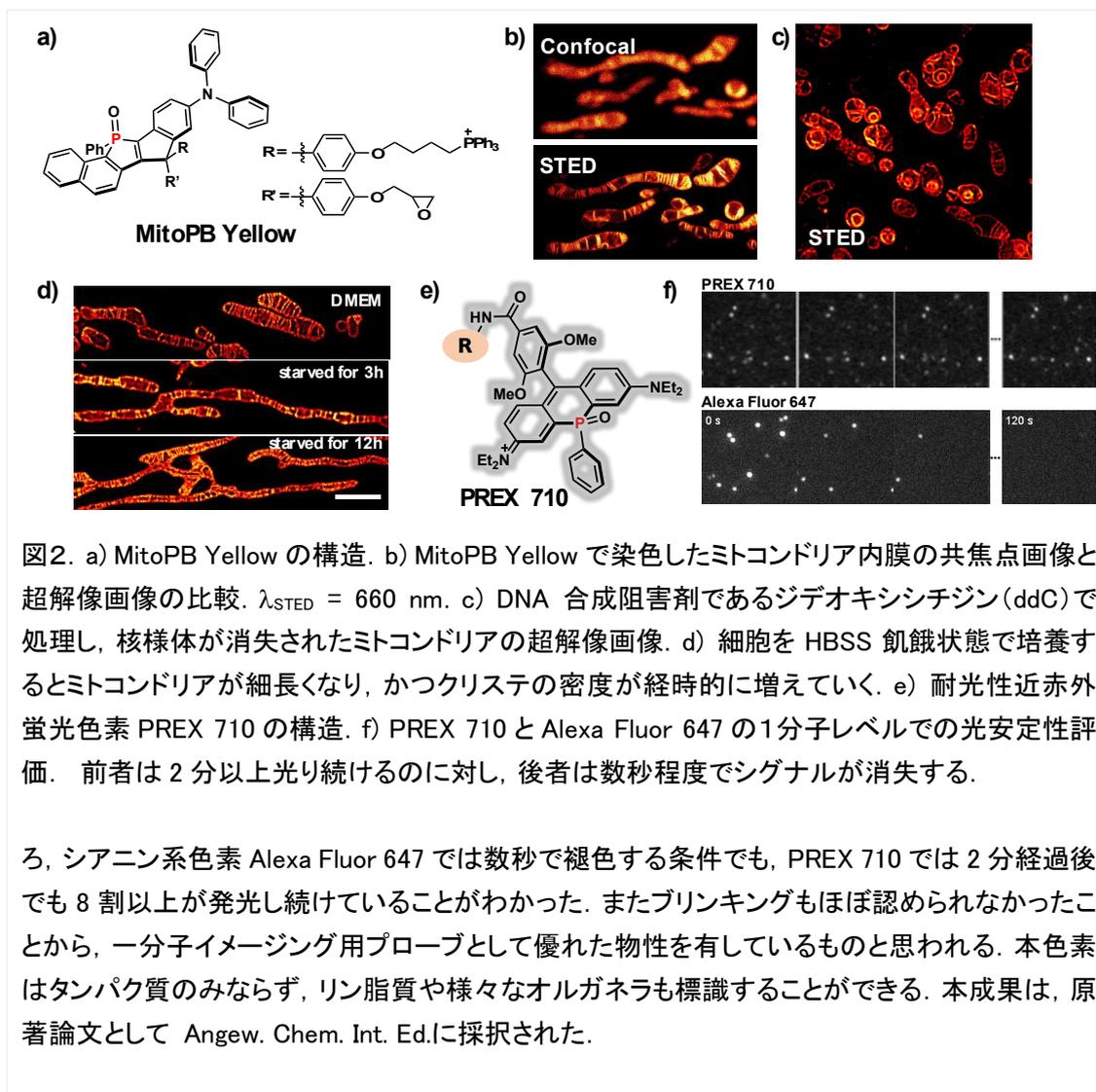


図2. a) MitoPB Yellow の構造. b) MitoPB Yellow で染色したミトコンドリア内膜の共焦点画像と超解像画像の比較. $\lambda_{\text{STED}} = 660 \text{ nm}$. c) DNA 合成阻害剤であるジデオキシシチジン (ddC) で処理し、核様体が消失されたミトコンドリアの超解像画像. d) 細胞を HBSS 飢餓状態で培養するとミトコンドリアが細長くなり、かつクリステの密度が経時的に増えていく. e) 耐光性近赤外蛍光色素 PREX 710 の構造. f) PREX 710 と Alexa Fluor 647 の1分子レベルでの光安定性評価. 前者は 2 分以上光り続けるのに対し、後者は数秒程度でシグナルが消失する.

る、シアニン系色素 Alexa Fluor 647 では数秒で褪色する条件でも、PREX 710 では 2 分経過後でも 8 割以上が発光し続けていることがわかった。またブリンキングもほぼ認められなかったことから、一分子イメージング用プローブとして優れた物性を有しているものと思われる。本色素はタンパク質のみならず、リン脂質や様々なオルガネラも標識することができる。本成果は、原著論文として *Angew. Chem. Int. Ed.* に採択された。

3. 今後の展開

研究テーマ A で開発した超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1 は、動物細胞のみならず、植物細胞など多様な細胞腫に対して適用できることを示した。従来の脂肪滴染色剤とは一線を画す超耐光性は、脂質代謝機構をライブで捉えるうえで特に重要な要素である。特に、昨今の肥満問題解消に向けた創薬開発においては、薬剤探索のケミカルツールとして利用価値が高い。また、医学分野においては、脂肪滴動態と疾病との関連性が多数報告されていることから、本プローブによって生物学的知見が得られることが期待される。一方、さらなるプローブ開発の観点からは、 π 拡張やヘテロ原子の導入による長波長化を達成することにより、*in vivo* での応用も視野に入る。蛍光性脂肪酸 AP-C12 に関しては、脂肪酸の代謝が追跡できるため、阻害剤や活性化剤を定量的に評価、さらにはケミカルスクリーニングによる創薬探索への応用が期待される。特にリポファジーは最近の脂質代謝研究においても hot topic の一つであり、本分子には高い期待が寄せられている。AP-C12 の耐光性の面では、従来の蛍光色素と同程度であるが、超耐光性を付与することができれば、長時間にわたって脂肪酸動態を追跡することが可能になり、さらなる発展が見込まれる。

研究テーマBではミトコンドリア内膜染色剤 MitoPB Yellow を開発した。すでに多くの研究者から問い合わせがあったことから本色素の期待値はかなり高い。脂質代謝はもちろん、細胞のストレス応答や疾病など、ミトコンドリアの形態と機能の関連性は深い。これまで電子顕微鏡で観察されてきた内膜構造を、ライブセルで観察し、かつ動態追跡もできることから、多くの生物学的知見が得られることが期待される。一方、MitoPB Yellow が抱える重大な課題がミトコンドリアの光毒性である。より長波長領域で利用できるミトコンドリア染色剤を開発することにより、非侵襲イメージングやマルチカラーイメージングも可能になる。PREX 710 も組み合わせることにより、「オルガネラ相互作用」における膜ダイナミクスの解明に繋げていきたい。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況

研究テーマAは研究目標を十分に達成したと考えている。当初の研究計画にあった超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1 の開発に成功し、脂肪滴動態の経時的な変化を追跡することが可能になった。環境応答性をもつ LAQ1 は非特異的吸着に伴うバックグラウンド蛍光も小さいため、極微量の脂肪滴も検出することが可能であり、超解像顕微鏡による観察も達成している。学会等で問い合わせがあった国内外の研究者とは共同研究も始めている。一方、蛍光脂肪酸 AP-C12 は本研究期間で考案したものであり、リポファジーを含む脂肪酸代謝の可視化など、予想を上回る成果を得た。

研究テーマBでは、当初の研究計画を変更し、より野心的な課題であるオルガネラ膜ダイナミクスの可視化に挑んだ。ミトコンドリアは脂質代謝のみならず、その構造と機能に関する研究は世界中で繰り広げられている。本研究で開発したミトコンドリア内膜染色剤 MitoPB Yellow を用いることにより、既存のミトコンドリアプローブとは一線を画す画像を得ることができた。また本色素骨格は拡張性が高く、多方面への応用展開も可能である。論文での発表直後から多くの共同研究の申込みもあったことから、反響の高さも窺える。また耐光性近赤外蛍光色素 PREX 710 も標識剤としてのポテンシャルが高く、多くの共同研究も展開中である。以上の結果から、当初研究計画とは異なるが、予想を上回る成果が得られたものとする。

・研究の進め方

本研究は、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の山口茂弘教授研究室で実施し、代表者が研究を総括した。研究室に所属する外国人博士研究員2名および大学院学生2名と共に実施した。超解像 STED イメージングは、本研究科のライブイメージングセンターで行った。尚、ミトコンドリア外膜との多重染色および1分子レベルでの耐光性評価は、理研 BDR の岡田康志先生(1細胞 CREST 代表者)、PREX 710 による脳血管深部イメージングは愛媛大学医学研究科 今村健志先生・川上良介先生との共同研究による成果である。研究費は予算計画を一部変更して、細胞イメージングを実施するための装置構築に充て、本計画研究の加速に繋がった。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

開発した各種蛍光プローブはすでに市販化の見通しがたっており、科学技術への高い波及効果が期待される。また、共同研究を幅広く展開し、結果をフィードバックしてもらうことで新

たな色素開発にも繋がり、基盤技術開発における「正のスパイラル」が生み出されるものと期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Wang, C., Taki, M.*, Sato, Y., Tamura, Y., Yaginuma, H., Okada, Y., Yamaguchi, S.* A photostable fluorescent marker for the super-resolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 2019, 116, 15817-15822. (責任著者論文)
2. Grzybowski, M., Taki, M.*, Senda, K., Sato, Y., Ariyoshi, T., Okada, Y., Kawakami, R., Imamura, T., Yamaguchi, S.* A Highly Photostable Near-Infrared Labeling Agent Based on a Phospho-rhodamine for Long-Term and Deep Imaging <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , 2018, 57, 10137-10141 (責任著者論文)
3. Ogasawara, H., Grzybowski, M., Hosokawa, R., Sato, Y., Taki, M.*, Yamaguchi, S.* A far-red fluorescent probe based on a phospho-fluorescein scaffold for cytosolic calcium imaging. <i>Chem. Commun.</i> , 2018, 54, 299-302 (責任著者論文)
4. Griesbeck, S., Michail, E., Wang, C., Ogasawara H., Lorenzen, S., Gerstner, L., Zang, T., Nitsch, J., Sato, Y., Bertermann, R., Taki, M., Lambert, C., Yamaguchi, S.*, Marder, T. B.* Tuning the π -Bridge of Quadrupolar Triarylborane Chromophores for One- and Two-Photon Excited Fluorescence Imaging of Lysosomes in Live Cells. <i>Chem. Sci.</i> , 2019, 10, 5405-5422.
5. Griesbeck, S., Ferger, M., Czernetzki, C., Wang, C., Bertermann, R., Friedrich, A., Haehnel, M., Sieh, D., Taki, M., Yamaguchi, S.*, Marder T. B.* Optimization of Aqueous Stability vs. π -Conjugation in Tetracationic Bis(triarylborane) Chromophores: Applications in Live-Cell Fluorescence Imaging. <i>Chem. Eur. J.</i> , 2019, 25, 7679-7688.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

国際出願 1.

発明者: 多喜正泰, 山口茂弘, 梶原啓司

発明の名称: 縮環チオフェン化合物及びそれを用いた油滴染色剤

出願人: 名古屋大学

出願日: 2018/3/2

出願番号: PCT/JP2018/008178

国際出願 2.

発明者: 多喜正泰, 山口茂弘, 大崎博司

発明の名称: アザピレン化合物又はその塩

出願人: 名古屋大学

出願日: 2018/3/2

出願番号: PCT/JP2018/008179

国際出願 3.

発明者: 多喜正泰, 山口茂弘, 中愛子, マレクガージボウスキーグジャゴツシュ

発明の名称: ホスファローダミン化合物若しくはその塩、並びにそれを用いた蛍光色素



出願人：名古屋大学
出願日：2017/8/30
出願番号：PCT/JP2017/031203

国際出願 4.

発明者：多喜正泰, 山口茂弘, マレクガージボウスキーグジャゴッシュ
発明の名称：ホスファロドール化合物若しくはその塩、並びにそれを用いた蛍光色素
出願人：名古屋大学
出願日：2018/3/28
出願番号：PCT/JP2018/012880

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 多喜正泰 「超耐光性蛍光色素が可能にする先端バイオイメージング」 生命科学 4 プラットフォーム 説明会・成果シンポジウム, 2018年6月5日, 一橋講堂 学術総合センター (招待講演, パネリスト) <http://platform.umin.jp/event/201806.html>
2. 多喜正泰 「リン含有蛍光色素による革新的生体イメージング技術」 日本化学会第99春季年会化学会 特別企画講演, 2019年3月19日, 甲南大学 (招待講演)

受賞

1. 第36回とやま賞 (2019) 「細胞機能の精密イメージングを実現する革新的蛍光色素の創出」

著作物

1. 多喜正泰, 佐藤良勝 「化学・生物学の融合研究により開発された最新のアグリバイオ蛍光分子群」 アグリバイオ, 2019年1月号, 北隆館/ニュー・サイエンス社
2. 多喜正泰, 山口茂弘 「耐光性近赤外蛍光色素が招く蛍光イメージング技術」 現代化学, 2018年11月号, 株式会社東京化学同人
3. 多喜正泰 「退色に強い蛍光標識剤と超解像イメージング」 光アライアンス, 29 (5), 26-30 (2018), 日本工業出版

プレスリリース

1. 細胞が生きたままミトコンドリアの内膜構造が鮮明に見えた～ミトコンドリアの形態制御異常がもたらす神経変性疾患の診断技術や創薬開発ツールとして期待～ (2019年7月)
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190723/index.html>
2. 長時間蛍光イメージングを可能にする近赤外蛍光標識剤を開発～蛍光1分子追跡から生体深部イメージングまで生命科学・医療分野に幅広く応用可能～ (2018年7月)
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20180709/index.html>