

研究終了報告書

「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」

研究期間:2020年12月～2024年3月

研究者:土谷正樹

1. 研究のねらい

細胞膜およびオルガネラ膜は、常に脂質分子が出入りしている動的な超分子構造体である。脂質は、細胞内では膜から別の膜へと移行し、脂質二重層内では層から層へと移行する。このような脂質のダイナミクスは、脂質の合成・分解・輸送などを担う様々なタンパク質が協調することによって制御されており、膜への脂質供給は、膜の機能発現を支え、細胞活動に不可欠である。近年、オミックス解析の台頭により、脂質の代謝動態と生命活動は強く相関する事、さらには脂質の異常が癌や神経疾患などの病態発現の背後に潜む事が明らかとなってきた。しかしながら、脂質の代謝動態と細胞活動をむすぶ因果関係つまり分子実体の解明には十分に至っていない。生命現象の鍵を握る脂質制御因子群の同定が立ち遅れているのは、細胞活動に則した形で脂質を効率よく捉える事が技術的に難しいためである。現代主流の脂質解析法は、細胞破碎液から抽出した脂質の質量分析や放射線分析である。このような方法は、時間と労力を必要とし(数日程度/1サンプル)、少ないサンプル数の解析には問題ないが、2万種類にもわたる人間の遺伝子などの大規模な探索研究には必ずしも適していない。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いる。そこで、本研究では、脂質動態と脂質制御因子の因果関係を効率よく解明することができる新技術の創出を目的とした。具体的には、細胞内局所的な脂質分子ラベル化法を駆使し、高時空間分解能で生細胞内の脂質動態を定量するハイスループットな細胞測定技術(フローサイトメトリー手法)の構築を目指した。さらに網羅的な遺伝子探索手法であるCRISPRスクリーニング法を適用する事で、脂質制御を担う遺伝子を選択的に同定する新技術の開発を目指した。

2. 研究成果

(1)概要

本研究における主要な研究成果として、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 を世界で初めて開発した。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が融合した技術である。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クリック反応により標識する。オルガネラの場所に応じて色味(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る。次に、フローサイトメトリーにより、1個1個の細胞の蛍光シグナルを毎秒1万個の速度で解析し、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」を把握できる。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る。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)をモデルとした。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る。O-ClickFC を CRISPR-KO スクリーニングに適用することで、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 生合成や PC 輸送が低下した細胞を選抜した。それらの原因遺伝子を解析すると、脂質合成、膜トラフィック、脂質輸送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 などの新規遺伝子を発見した。従来、FLVCR1 は、ヘム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たが、真の役割については、近年、議論が巻き起こっていた。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た。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た。以上の研究成果を 2023 年 *Cell Metabolism* 誌に報告した。本研究で開発した技術は、クリック反応が適用される様々な生体分子を標的にすることができ、その代謝に関わる効率的な遺伝子探索への応用や、直接的な細胞代謝状態に基づく新規臨床検査技術への展開が期待される。

(2) 詳細

研究テーマ①「脂質の量と空間の特徴を1細胞単位で超高速に捉える技術の開発」

1個の細胞における脂質代謝の「量」と「空間」の特徴をハイスループットに読み出すことができれば、既存のプール型の大規模 CRISPR スクリーニング系において脂質代謝に特化した遺伝子探索ができると考え、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が融合した技術 O-ClickFC を開発した(図1)。本研究では、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、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

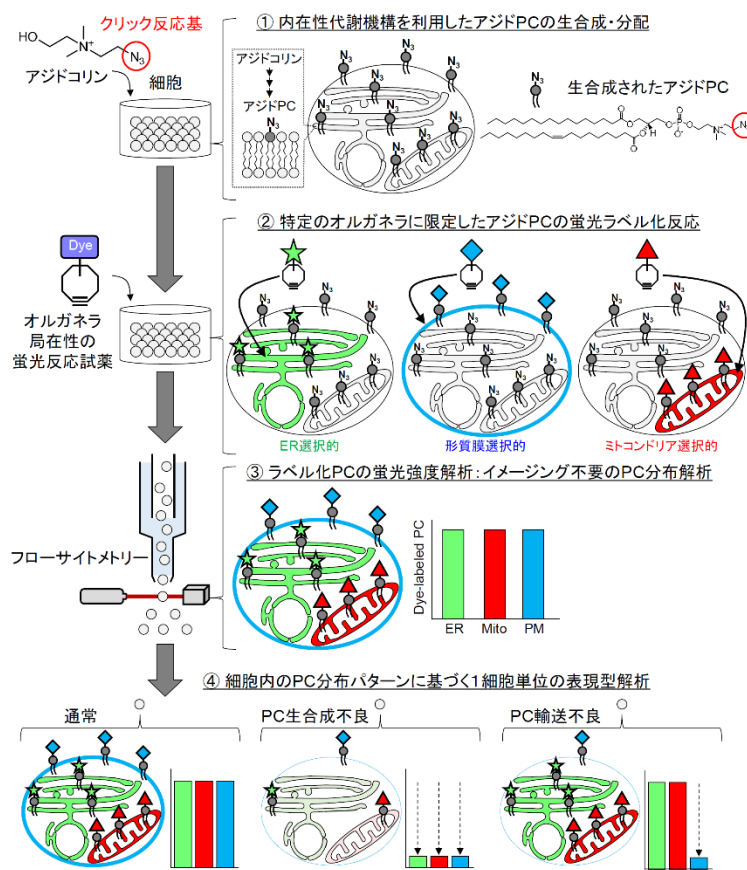


図1. PCの代謝動態を高速1細胞解析するO-ClickFC

ガネラに運ばれる。本技術の戦略は(図1)、①PCの前駆体コリンにクリック反応基を導入したアジドコリンを細胞に与え、内在性代謝機構によりアジド PC を生合成させ、細胞内に分配させる。②オルガネラ局在性の蛍光反応試薬で細胞を処理し、狙いのオルガネラでのみアジド

PC を蛍光ラベル化する。③このとき、ラベル化 PC の蛍光シグナルは位置と量を表すので、イメージング不要の蛍光強度解析のみで PC 代謝動態の情報が得られる。フローサイトメトリーを用いると、1細胞中の PC 代謝動態をオルガネラレベルの空間分解能で高速解析できる (1 万細胞/秒)。④ヒト 2 万遺伝子を網羅する全ゲノム CRISPR-KO ライブラリーを本技術に適用すると、蛍光ラベル化 PC の細胞内分布パターンから、PC 生合成不良またはオルガネラ間 PC 輸送不良を表現型にもつ変異細胞を選抜できる。この提案技術を実現するために、化学特性が異なる蛍光反応試薬の選抜や反応条件の最適化を実施し、最終的に 50 倍以上の蛍光強度増加を伴うダイナミックレンジで PC の量的変化を捉えることができる空間分解能をもったフローサイトメトリー手法を構築した (土谷 *Cell Metab.*, *STAR Protoc.* 2023)。

研究テーマ②「PC 代謝動態制御因子のヒト全ゲノム遺伝子探索への展開と技術実証」

O-ClickFC を用いて、PC の代謝動態を制御するタンパク質群を網羅的に同定できるか実証するために、ヒトの約 2 万種類におよぶ全遺伝子を網羅した機能欠損型 CRISPR-KO スクリーニングに適用し、脂質代謝動態に異常を示す変異細胞を FACS により選抜し、その原因遺伝子を同定した (図 2)。

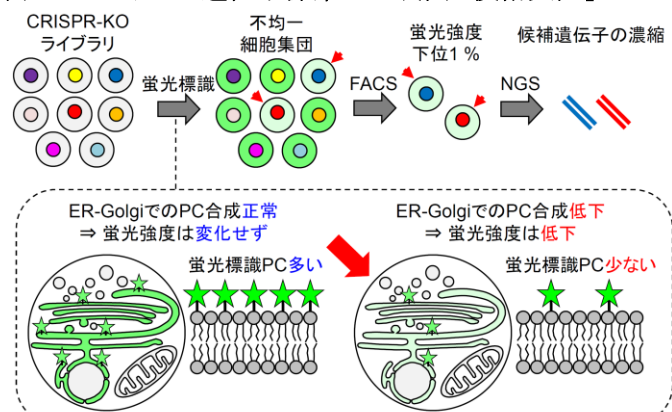
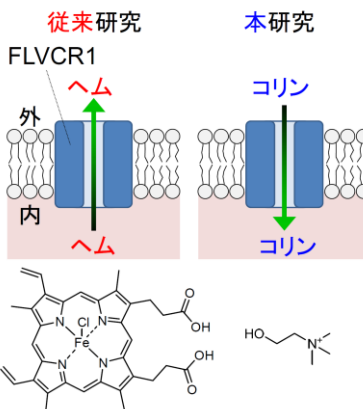


図2 PC生合成に必要な遺伝子群を探索するためのスクリーニング

まず、PC が新規合成される小胞体・ゴルジ体(ER-Golgi)において空間選択的にアジド PC を蛍光標識し、CRISPR-KO 細胞ライブラリーにおける蛍光ラベル化 PC に由来する蛍光強度が下位 1%の細胞集団を分取した(図 2)。低蛍光性細胞集団について塩基配列を解析すると、PC 合成に必須な既知遺伝子 PCYT1A が全遺伝子中上位 100 以内に濃縮されており、本戦略が PC 合成に必要な遺伝子の探索に有用なことが示された。バリデーションや詳細な検討の結果、PC 合成に必要な遺伝子として合計 36 個同定した。このうち、生物学発展に寄与する重要な成果として、FLVCR1 と CHEK1 の PC 合成における新たな役割を発見した(図 3)：①従来ヘムエクスポートとして考えられてきた FLVCR1 は実際はコリンを細胞内に取り込むトランスポーターとして働くこと。②CHEK1 は細胞周期チェックポイントキナーゼであり、CHK1/CDC25A/CDK2 経路を通じて PC 合成の律速酵素 PCYT1A (CCT α)をリン酸化することで酵素活性を制御すること。特に、コリントランスポーター FLVCR1 の発見は、本研究が他の関連類似研究に先立つ世界で最初の報告であり、代謝関連

コリン輸送体FLVCR1の発見



細胞周期とPC合成をつなぐ機構の解明

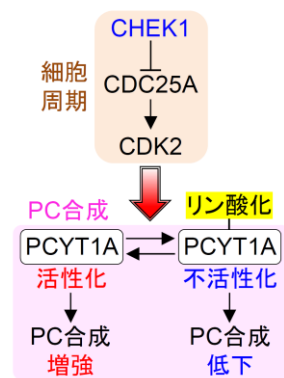


図3. FLVCR1とCHEK1のPC代謝における新たな役割の解明
原因遺伝子の探索において本技術の優位性が示される。

他に、ミトコンドリアや形質膜に選択的な蛍光ラベル化技術を用いたスクリーニングによって、PC の細胞内輸送・膜内分布に関わる既知・新規遺伝子群の同定に成功した。特に、形質膜外層に PC を表在化させるために必要な遺伝子 CDC50A を同定し、その詳細な機能解析を報告した。以上の研究成果を 2023 年に *Cell Metabolism* 誌に報告した。

研究テーマ③「技術拡張:他の種類の代謝物質への展開、多成分解析への展開など」

上記の過程で、アジド基を含む様々な生体分子アナログは本技術の解析対象となる可能性が考えられ、研究標的の代謝経路の拡張が期待された。そこで、アミノ酸・脂肪酸・スフィンゴシン・単糖などについて検討したところ、アジドコリンと同様に細胞に取り込まれ、蛍光標識できることが判明した(未発表)。そのうち、グルコーストランスポーターを介して取り込まれるアジド六単糖は細胞のエネルギー代謝状態を反映する有用なプローブとして利用できる可能性が明らかになり、in vitro 実験だけでなく ex vivo および in vivo モデルを用いた

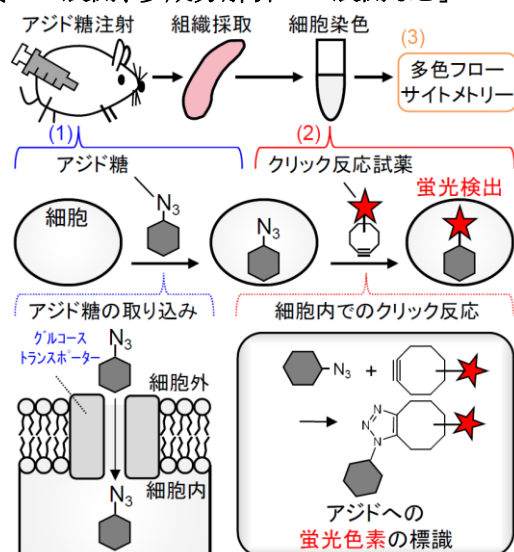


図4. 本手法のグルコース取り込み解析への展開

バリデーションを実施することとした(図 4)。詳細な検討の結果、6AzGal (6-azido-6-deoxygalactose)という化合物が、既存の生体内グルコース取り込みイメージングプローブとしてゴールドスタンダードである 18F-FDG と同等な化学物性およびマウス体内動態を示し、フローサイトメトリーを用いた 1 細胞グルコース取り込み評価に本技術を適用できることを実証した(*Commun. Biol.* 7, 459 (2024)) (図 4)。この手法は、従来の蛍光糖アナログでは困難であった *ex vivo* および *in vivo* 環境での正確なグルコーストランスポーター活性の 1 細胞解析を可能にし、広範な生物医学研究の発展に役立つことが期待される。

他に、細胞表面マーカーを用いた免疫表現型解析や、細胞内分子を標的とした免疫染色といった標準的な細胞生物学的手法と本技術の併用が可能であることが判明し、従来困難であった脂質代謝状態と他の代謝状態やバイオマーカー発現を同時解析できる技術を開発した(論文投稿準備中)。また、筑波大・戸田浩史 助教との共同研究によりクリックケミストリーを用いたミストイル化基質の探索を行い、プロテオーム解析のためのミストイル化タンパク質の効率的な検出・濃縮方法の確立に貢献した。

3. 今後の展開

本研究で提案・実証した O-ClickFC は、2022 年ノーベル化学賞受賞の頑健なクリックケミストリーを基盤としており、クリック反応基を導入可能な代謝物質アナログが利用できれば様々な代謝経路に対して応用できる高い汎用性が期待される。また、人の血液・体液サンプルについて *ex vivo* での解析を適用することで、これまで評価困難であった細胞代謝状態を直接捉えることができるようになり、医療応用の可能性が見込まれる。さらに、アジド化合物は動物実験の応用例も多く知られることから、人体での利用に際して安全性が認められれば、*in vivo* レベルの臨床検査への展開が期待できる。例えば、従来の免疫染色だけでは識別困難であった代謝状態が昂進した免疫細胞・癌細胞の検出などへの本技術の応用が期待される。このような本技術の臨床検査への展開は、専門的な外部機関の協力があれば数年程度で実現できることが見込まれる。

4. 自己評価

研究提案書で記したように、主要な研究目的の脂質代謝の 1 細胞解析技術および遺伝子スクリーニングへの展開を研究期間内に達成し、その成果を 2023 年に *Cell Metabolism* 誌に発表した。加えて、その技術をグルコーストランスポーター活性評価に応用した成果を 2024 年に *Communications Biology* 誌に発表した。特に、本技術を用いたスクリーニングにより発見された新規コリントランスポーター FLVCR1 の発見は生物学・医学研究に広くインパクトを与え、現在世界的に研究が進められている FLVCR1/2 の構造基盤および同遺伝子疾患の病態発現機構の解明に大きく寄与するものである。本技術を用いた CRISPR スクリーニング法(Masaki Tsuchiya bioRxiv 2022 年 4 月)は、メタボロミクス解析と GWAS 解析を組み合わせた競合研究(Timothy C. Kenny bioRxiv 2022 年 10 月)よりも先に上記発見の報告に成功しており、代謝異常の原因遺伝子の探索においてより優れた手法であることが示され、今後他の代謝領域の発展にも貢献できるであろう。本研究では、研究補助員の雇用、セルソーターの購入、他に必要な研究機器・試薬の購入などに集中して研究費を執行し、効率良く研究成果を創出できるように最大限に努めた。

本研究は、主に技術開発に焦点が置かれているが、スクリーニングの過程で得られた上記の PC

代謝に関する新知見は次なる脂質生物学的研究の展開に示唆を与える。本研究を足掛かりに、学術変革領域研究(B)「しなやかさ生物学」の創成に向けて(2023年に研究開始)、領域外研究者と連携して独自研究を一層発展させていく予定である。

本研究成果を報告した後、私は京都大学・工学部 助教(青藍プログラム(任期5年・再任なし))から静岡県立大学・薬学部 准教授(任期無し)へと異動する機会(2023年10月)を賜ることができた。本さがけ研究を通じて、私自身が研究者として活躍・成長することができ、より裁量性が高い環境でさらなる独自研究を進めていくことができるものであった。

以上、自己点検として、本研究はさがけの事業趣旨を十分に満たすものであった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Masaki Tsuchiya, Nobuhiko Tachibana, Kohjiro Nagao, Tomonori Tamura, Itaru Hamachi. Organelle-selective click labeling coupled with flow cytometry allows pooled CRISPR screening of genes involved in phosphatidylcholine metabolism. Cell Metabolism Volume 35, Issue 6, 6 June 2023, Pages 1072-1083.e9

細胞における脂質の代謝動態は内在的なタンパク質ネットワークにより制御されている。近年スクリーニング技術が発展しつつあるが、細胞の脂質の表現型をハイスループットに読み出すことは技術的に難しい。本研究では、ホスファチジルコリン(PC)をオルガネラレベルの空間分解能で標識・表現型解析する技術 O-ClickFC を開発し、CRISPR-KO スクリーニングを実証した。既知の脂質代謝関連遺伝子の他に、FLVCR1・CHEK1・CDC50A などの新規遺伝子进行同定し、それらの PC 代謝における新機能を発見・報告した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(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)

- 「オルガネラ選択的な脂質の蛍光ラベル化による脂質動態観察と遺伝子スクリーニング」第7回日本筋学会学術集会 2021 年 12 月(招待講演)
- 「オルガネラ選択的な脂質ラベル化法を用いた脂質動態観察と遺伝子探索」第 4 回 Organelle zone seminar 2021 年 11 月(招待講演)
- 令和5年度 日本白血病研究基金 一般研究賞(受賞)
- 日本経済新聞 web 版(2023 年 3 月 14 日)「京大など、クリックケミストリーにより細胞内脂質を超高速に解析できる技術「O-ClickFC」を開発」(プレスリリース)
- ASCII.jp×ビジネス(2023 年 3 月 16 日)「細胞内脂質を超高速解析、代謝異常の原因遺伝子进行同定＝京大」(プレスリリース)