

細胞の動的な高次構造体
2020年度採択研究者

2020年度 年次報告書

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)

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

§ 1. 研究成果の概要

本年度は、哺乳動物細胞内の脂質について、細胞内局所でのクリック反応を通じてオルガネラ選択的に蛍光ラベル化する手法、および蛍光ラベル化脂質をフローサイトメトリーにより高感度かつ効率的に解析する手法を検討した。ヒト白血病由来細胞株 K562 を実験材料として、小胞体とゴルジ体・ミトコンドリア・リソソーム・形質膜についてオルガネラ膜選択的な蛍光ラベル化を可能にするラベル化剤を開発した。標的脂質として、哺乳動物細胞の主要リン脂質ホスファチジルコリン(PC)に着目した。PC の前駆体コリンにクリック反応基を導入したアナログ(アジドコリン)から生合成されたアジド PC について、上記 4 種の蛍光ラベル化剤を用いてラベル化し、蛍光アジド PC の細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察した。蛍光アジド PC とオルガネラマーカールとの共局在解析の結果、いずれのラベル化剤についても狙い通りのオルガネラでのアジド PC への蛍光ラベル化を認めた。またフローサイトメトリーを用いて、アジドコリンの有無について蛍光ラベル化の量的変化を解析した。その結果、ラベル化反応および洗浄条件の改良により、およそ 40 倍以上の蛍光強度の増加を伴うダイナミックレンジを最終的に得た。この実験条件では、アジド PC を持つ細胞とアジド PC を持たない細胞を蛍光ラベル化およびフローサイトメトリーにより識別して、効率良く分離することができた。そこで、ヒト遺伝子の約 2 万種類を網羅するゲノムワイド CRISPR-KO ライブラリーを利用して、アジド PC について小胞体とゴルジ体選択的な蛍光ラベル化を行い、蛍光ラベル化アジド PC の含量が低下した変異細胞をフローサイトメトリーにより分取した。次世代シーケンスおよび個別遺伝子に対するバリデーションの結果、PC 生合成に必要な既知遺伝子の他に、脂質代謝動態への関与が未報告の新規遺伝子を同定した。

【代表的な原著論文情報】

- 1) “Organelle-selective labeling of choline-containing phospholipids (CPLs) and real-time imaging in living cells”, Current Protocols, vol. 1, e105, 2021