

蛍光プローブを用いた脂肪酸代謝解析

多喜 正泰

1. はじめに

脂質は、動物細胞において、水、タンパク質に次いで3番目に多く存在する成分であり、脂肪酸のグリセロールエステルからなる単純脂質、リン脂質や糖脂質など親水性と疎水性を持ち合わせた複合脂質、脂肪酸やコレステロールなどの誘導脂質に大別される。脂質分子の多くは脂肪酸を主要成分として含んでおり、脂肪酸の鎖長、二重結合の位置と数、幾何学的配置が脂質特性を決定づける大きな要因の一つとなっている。多様な脂肪酸構造に加えて、リン脂質の親水性頭部の種類も掛け合わせると、脂質分子は数万種類以上にも及ぶといわれている。これら形状やサイズ、機能の異なる脂質分子がタンパク質とともに複雑に自己組織化することで、各オルガネラはそれぞれ独自の構造と機能を持つようになる。たとえば、ミトコンドリア内膜には、特殊な脂質としてホスファチジルグリセロールの二量体であるカルジオリピンが多く含まれている。カルジオリピンは膜構造に大きな曲率を与え、ミトコンドリア内膜のひだ状構造であるクリステの構築に不可欠である。また、カルジオリピンを多く含むドメインは、呼吸鎖複合体の形成やタンパク質の結合など、ミトコンドリア機能に必須である。

リピドミクスは、細胞内の脂質成分を質量分析によって網羅的に解析する研究手法であり、国内外で盛んに行われている。これにより、脂質の多様性や脂質代謝の理解が進んだことに加え、最近では創薬開発への応用も展開されるようになった。また、脂質膜や脂肪滴の脂質形態観察については、古くから電子顕微鏡による撮影が行われてきたが、最近では、超解像蛍光顕微鏡技術の発達によって、クリステなどの超微細構造のライブセルイメージングも可能となり、脂質形態の細胞内時空間情報をリアルタイムに追

跡できるようになってきた^{1,2)}。しかし、細胞内で脂質の合成や配置、輸送がどのように制御されているのか、その機構に関してはいまだ多くの点が不明である。本稿では、脂肪酸の細胞内代謝について解説するとともに、蛍光脂肪酸プローブを用いた脂肪酸代謝の解析技術について、筆者らの研究成果を含めて紹介したい。

2. 脂肪酸代謝と脂肪滴形成

脂肪酸は、短鎖脂肪酸（炭素鎖数5以下）、中鎖脂肪酸（炭素鎖数6～12）、長鎖脂肪酸（炭素鎖数13～21）、極長鎖脂肪酸（炭素鎖数22以上）に分類される。このうち長鎖脂肪酸は、エネルギー源として、あるいは脂質膜の主成分として利用される。細胞内の脂肪酸は、トランスポーターを介して細胞外から取り込まれるか、アセチルCoAを原料として生合成される（図1）。正常な細胞では前者が主たる取り込み経路であるが、がん細胞では脂肪酸合成酵素が多く発現しており、がんの増殖に必要なエネルギーを獲得している。通常、脂肪酸は細胞膜を透過しないため、細胞外からの取り込みは脂肪酸輸送タンパク質（FATP）が担っている。細胞にとって毒性が強い遊離脂肪酸は、細胞質内のアシルCoA合成酵素によって対応するアシルCoAに速やかに変換される。アシルCoAはアシルカルニチンに変換された後、ミトコンドリアマトリックスに輸送され、 β 酸化を受けてアセチルCoAを生成し、クエン酸回路でのATP合成に利用される。

一連の脂肪酸代謝で消費されなかった余剰の脂肪酸は、小胞体膜上でジアシルグリセロール（DAG）に変換され、さらにジアシルグリセロールアシル基転移酵素（DGAT）によって中性脂肪であるトリアシルグリセロール（TAG）が合成される。小胞体の二重膜内に蓄積されたTAGは、小胞体膜から遊離して脂肪滴となる。したがって、脂肪滴の表面は、小胞体由来のリン脂質一重層で覆われた構造となっている。脂肪滴が発見された当初は、脂肪滴は余剰脂質の貯蔵庫として機能する静的なオルガネラと考えられてきたが、1991年にGreenbergらによって脂肪滴表面に存在するタンパク質Perilipinが発見され、これが脂肪滴の増大や分解において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた³⁾。それ以来、脂肪滴はエネルギー代謝やリン脂質合成を制御する動的なオルガネラとして認識され、脂

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所（〒464-8601 名古屋市千種区不老町）

Fluorescence probes for analyzing fatty acid metabolism

Masayasu Taki (Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan)
本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950072

© 2023 公益社団法人日本生化学会

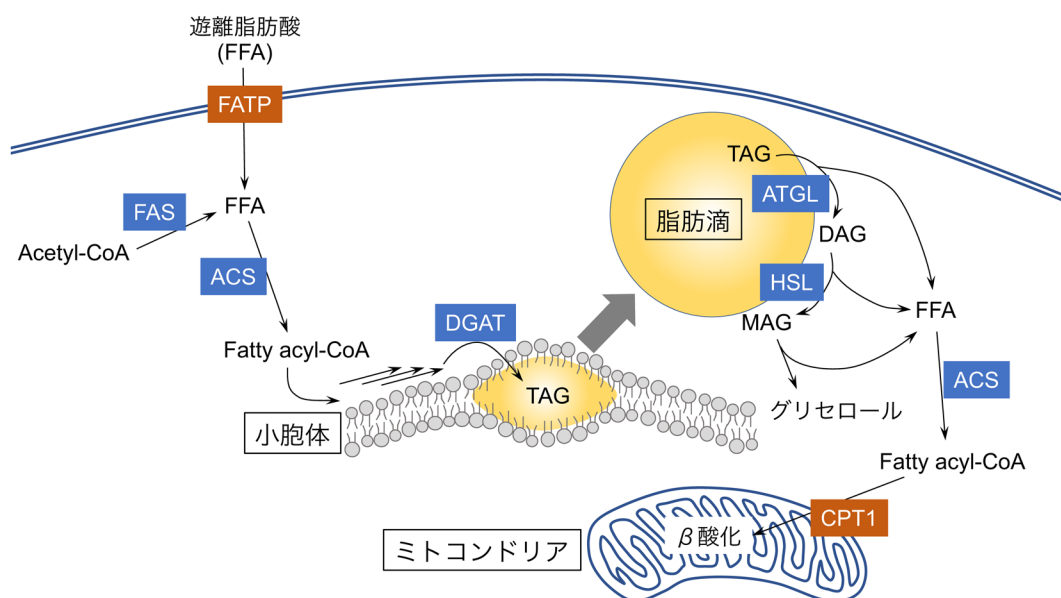


図1 脂肪酸代謝機構

FATP：脂肪酸輸送タンパク質、FAS：脂肪酸合成酵素、ACS：アシルCoA合成酵素、DGAT：ジアシルグリセロールアシル基転移酵素、TAG：トリアシルグリセロール、ATGL：脂肪トリグリセリドリパーゼ、DAG：ジアシルグリセロール、HSL：ホルモン感受性リパーゼ、MAG：モノアシルグリセロール、CPT1：カルニチンパルミトイル転移酵素、Fatty acyl-CoA：脂肪酸アシルCoA。

質エステルの加水分解によるエネルギー供給、脂質のホメオスタシス、オートファジーなどさまざまな細胞機能に関与していることがわかってきた。また、脂肪滴の機能異常は、肥満、循環器疾患、糖尿病、脂肪肝など多くの疾患と密接に関連していることなども明らかにされ⁴⁾、これをターゲットとした治療法開発なども行われている。しかし、脂肪滴がどのように形成されて成長していくのか、その機構の詳細はいまだ不明な点が多く残されている。

3. 脂肪滴分解による遊離脂肪酸の生成

細胞が栄養不足に陥ると、脂肪滴中のTAG分解に伴って遊離脂肪酸が放出され、ミトコンドリアでのβ酸化を受けてエネルギーの恒常性が維持される。脂肪滴の分解は、大きく分けて二つの機構が提唱されている。一つは、ホルモン感受性リパーゼ(HSL)や脂肪トリグリセリドリパーゼ(ATGL)などの加水分解酵素によるTAGの分解(リボリシス)である。TAGは、まずATGLによってDAGと脂肪酸に分解され、さらにHSLによってモノアシルグリセロール(MAG)まで分解される。これらの加水分解反応は、PerilipinやCGI-58といった脂肪滴表面に存在するタンパク質によって制御されている⁵⁾。もう一つは、2009年にShinghらによって報告された、オートファジーによる脂肪滴の選択的分解(リボファジー)である⁶⁾。隔離膜で囲まれた脂肪滴は、リソソームとの融合で形成されたオートリソソーム内で加水分解酵素によって分解されることで、遊

離脂肪酸の生成に至る。最近の研究によって、リボファジーに関連するタンパク質が次々と明らかになり、リボファジーの誘導機構が解明されつつある⁷⁾。しかし、リボリシスとリボファジーがどのように選択され、どのように制御されているのかは明らかにされていない。

4. 脂肪酸蛍光プローブ

細胞内脂肪酸の複雑な代謝過程を解明するためのツールとして、現在さまざまな脂肪酸誘導体が使用されている。安定同位体で標識された脂肪酸は、脂肪酸代謝解析において最もよく使われている。脂肪酸本来の代謝経路解析や代謝産物の定量解析を可能にするが、侵襲的手法であるため、生細胞中での脂肪酸代謝のようすをライブで観察することはできない。これに対し、脂肪酸の炭素鎖に有機蛍光色素が導入された蛍光性脂肪酸は、蛍光イメージングによって細胞内の脂肪酸動態の時空間変化を低侵襲に解析できるプローブ分子である(図2)⁸⁾。プローブが脂肪酸として代謝されるためには、分子サイズが小さく、中性の蛍光色素を用いることが重要である。また、蛍光イメージングにおける光毒性を考慮すると可視光領域で励起できるものが望ましい。この観点から、BODIPYは蛍光色素として数少ない選択肢の一つであり、BODIPYを含んださまざまな脂肪酸プローブが開発・応用されてきた。たとえば、Lippincott-Schwartzらは、ラウリン酸のω末端にBODIPY色素を連結させたプローブ(BODIPY 558/568 C12)を用い

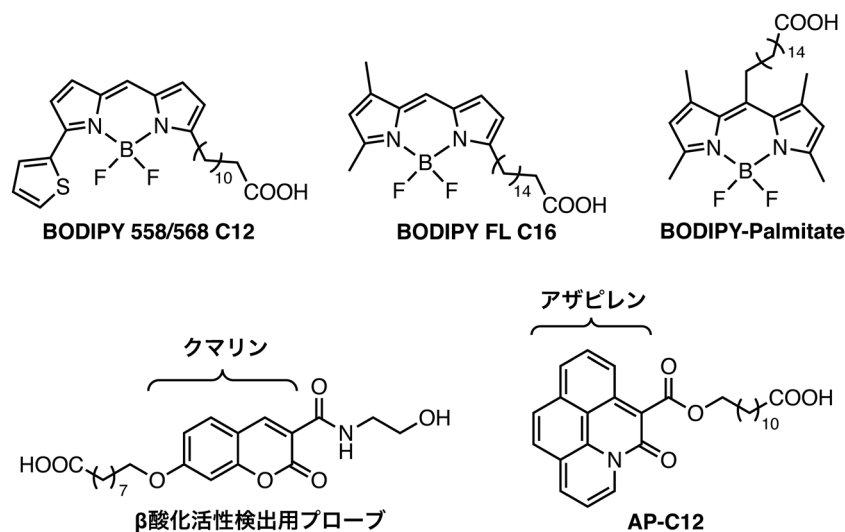


図2 蛍光性脂肪酸プローブ

て、飢餓条件下で脂肪滴から脂肪酸がミトコンドリアへどのように輸送されるのかについて検証した⁹⁾。その結果、オートファジーによる脂肪滴への脂肪酸供給、リパーゼによるTAGの加水分解、ミトコンドリアの融合など、複数の要因が複雑に絡み合って効率的なATP生産が実現されていることが明らかとなった。他にもBODIPY FL C16やBODIPY-Palmitateなども市販されており、ラットとヒト由来の β 細胞では飽和脂肪酸による脂肪毒性が異なり、ラット由来細胞では脂肪酸が速やかにゴルジ体へ集積することでゴルジ体の機能に影響を及ぼすことや¹⁰⁾、脂肪酸取り込みにおけるレジスチン作用機序などが明らかにされている¹¹⁾。また、脂肪酸プローブの蛍光色素としては、クマリン骨格も有力である。内之宮、王子田らは、クマリンを組み込んだ脂肪酸プローブを開発し、蛍光イメージングにより β 酸化の活性を可視化することに成功した¹²⁾。この場合、プローブ自体は蛍光を示さないが、代謝されてミトコンドリアに取り込まれ、 β 酸化に関連する酵素によって分解されると、クマリンが遊離して強い蛍光が観察される。この系により、薬剤投与と β 酸化活性の相関性について検証することが可能になった。

蛍光性脂肪酸プローブを用いたイメージングにより、脂肪酸代謝に関する新たな知見が得られつつある。代謝過程をより詳細に解析するためには、優れたプローブ開発が不可欠である。筆者の考える脂肪酸プローブに適用可能な理想の蛍光色素は、① β 酸化を含む脂肪酸の代謝経路を阻害しない、②代謝に応答して蛍光特性が変化する、③長時間観察が可能な耐光性と化学的安定性を有する、という特性を持つものである。これらすべてを満たす脂肪酸プローブが開発されれば、脂肪酸代謝解析における強力なツールとなるであろう。

5. 環境応答性を示す脂肪酸蛍光プローブを用いた代謝解析

最後に、筆者らが最近報告した脂肪酸プローブAP-C12について紹介したい¹³⁾。AP-C12は、長鎖脂肪酸の ω 末端にアザピレン (AP) という蛍光色素を結合させたものである (図2右下)。AP色素は分子サイズが小さく、中性であることから脂肪酸プローブの蛍光色素として適していると考えた。AP色素のユニークな点は、環境応答性、すなわち媒体の極性によって蛍光特性が変化する点である¹⁴⁾。これにより、脂肪滴のような低極性環境に取り込まれた脂肪酸と、ミトコンドリアマトリックスのような高極性環境に存在する脂肪酸を、蛍光特性の違いとして区別することが可能になる。実際、3T3-L1から分化誘導した脂肪細胞をAP-C12を含む培地中で培養すると、AP-C12は脂肪酸として振る舞うことがわかり、その代謝産物が脂肪滴、オルガネラ膜、細胞質など、さまざまな組織へ分布しているようすを蛍光マルチカラーイメージングで観察することができた。TAG、DAG、リン脂質、アシルCoAなどさまざまな脂質分子に変換されたAP-C12が、周囲の極性環境に応答して異なる蛍光特性を示したことを意味している。また、興味深いことに、ミトコンドリアからもAP色素の強いシグナルが得られた。質量分析によって、AP-C12よりも炭素鎖が短くなった成分が検出されたことから、ミトコンドリアマトリックスに輸送されたプローブが、 β 酸化の基質として機能していることが明らかとなった。脂肪酸代謝産物の細胞内分布をマルチカラーで可視化できる本プローブは、代謝解析において強力なツールといえる。

そこで筆者らは、AP-C12を用いて、栄養飢餓状態にあるヒト肝がん由来細胞株HepG2における脂肪酸代謝機構について検証した。未処理の細胞では、AP-C12の代謝産

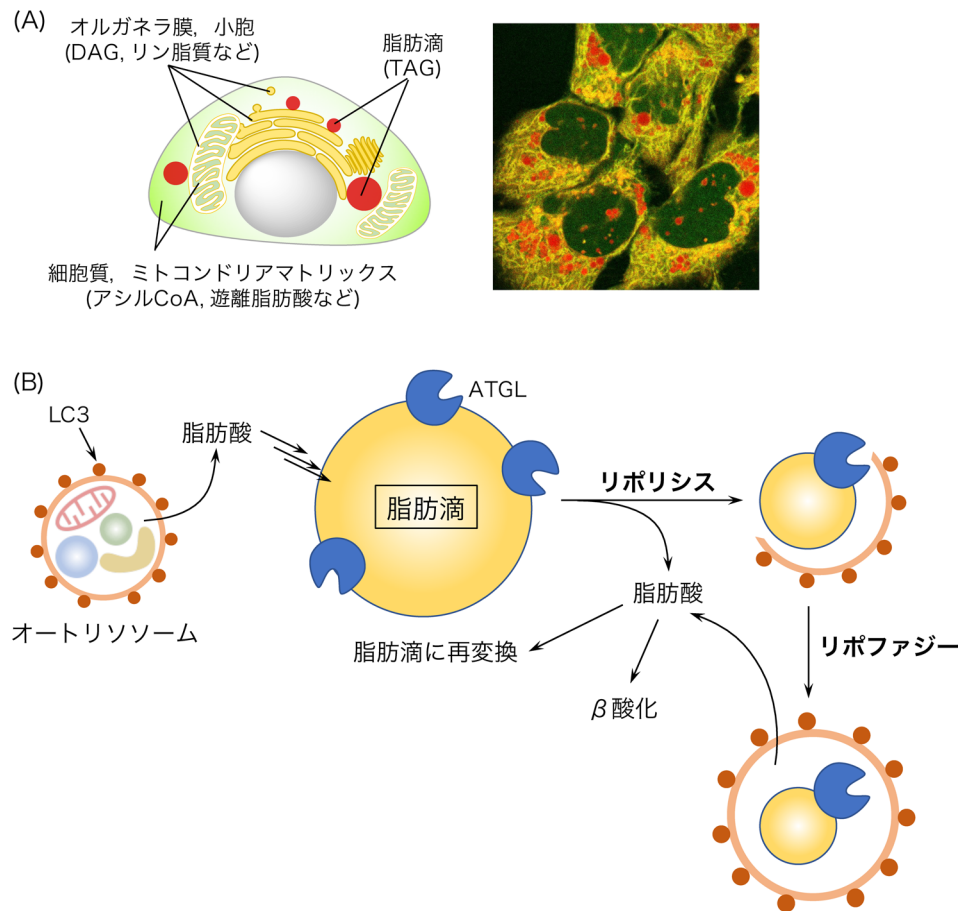


図3 脂肪滴分解による脂肪酸供給

(A) AP-C12を用いた脂肪酸代謝イメージングの模式図とHepG2細胞の画像。文献13から転載。(B) AP-C12によって得られた脂肪滴分解機構。

物が脂肪滴, 小胞体膜, ミトコンドリアマトリックスを中心に分布していることが確認された (図3A)。一方, オートリソソーム形成阻害剤であるBafilomycin A1 (Baf-A1) で細胞を処理すると, 脂肪滴由来の蛍光シグナルの著しい減少とともに, 細胞内小胞の増加が認められた。出現した小胞は, オートファゴソームの形成を表している。逆に, ATGL阻害剤であるDEUPで阻害すると, 脂肪滴と小胞体の蛍光強度が有意に増強した。さらに, オートファジー誘導剤であるラパマイシンで細胞を処理すると, 脂肪滴サイズの増大が認められ, TAG合成が促進されていることが明らかとなった。

得られた結果は, 以下の機構によって説明できる (図3B)。脂肪滴分解は, リポファジーが阻害されても進行し, ATGLの活性阻害によって効率よく抑制されたことから, ATGLを介したリポリシスがリポファジーよりも優先的に起こっていると考えられる。リポリシスによって脂肪滴サイズが小さくなった後, リポファジーが進行し, 脂肪酸供給がなされているのであろう¹⁵⁾。一方, ラパマイシンによってオートファジーを誘導した場合, 脂肪滴が大きく

なったのは, オルガネラ膜成分に由来した脂肪酸がTAGとして供給されたためである⁹⁾。また, オートファゴソーム膜にAP色素由来のシグナルが含まれていたことから, リポリシスによって生成した遊離脂肪酸の一部が再代謝され, 隔離膜の形成に必要なリン脂質合成に利用されていることが示唆された。

6. おわりに

脂質代謝は, 細胞機能維持において根幹をなす生命現象である。脂質代謝の異常は, メタボリックシンドロームやがんなど, さまざまな疾患の原因となる¹⁶⁾。したがって, 脂質代謝の制御機構の解明は, 現在の生命科学分野において重要な課題となっている。また, 脂質代謝は創薬開発の観点からも注目されており, 新規な疾患治療法の開発を目指した研究が展開されている¹⁷⁾。複雑な脂質代謝機構を解明するためには, リビドミクス, 顕微鏡観察, 分子生物学的手法, ケミカルバイオロジー的手法など, 多方面からのアプローチが必要不可欠である。本稿では, 蛍光性脂肪

酸プローブを用いたイメージング研究について紹介したが、脂質動態観察に向けた蛍光プローブ開発に関する報告は勢いを増し、日進月歩で発展している。蛍光イメージングも含めた多様な技術が融合することで脂質代謝の理解が深まり、ひいては人類の健康維持につながっていくことを期待したい。

文 献

- 1) Wang, C., Taki, M., Sato, Y., Tamura, Y., Yaginuma, H., Okada, Y., & Yamaguchi, S. (2019) A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 15817–15822.
- 2) Huang, X., Fan, J., Li, L., Liu, H., Wu, R., Wu, Y., Wei, L., Mao, H., Lal, A., Xi, P., et al. (2018) Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy. *Nat. Biotechnol.*, **36**, 451–459.
- 3) Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., & Londos, C. (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11341–11346.
- 4) Herker, E., Vieyres, G., Beller, M., Krahmer, N., & Bohnert, M. (2021) Lipid Droplet Contact Sites in Health and Disease. *Trends Cell Biol.*, **31**, 345–358.
- 5) Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S., & Osumi, T. (2004) CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J. Biol. Chem.*, **279**, 30490–30497.
- 6) Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., & Czaja, M.J. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, **458**, 1131–1135.
- 7) Zhang, S., Peng, X., Yang, S., Li, X., Huang, M., Wei, S., Liu, J., He, G., Zheng, H., Yang, L., et al. (2022) The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. *Cell Death Dis.*, **13**, 132.
- 8) Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Kier, A.B., & Schroeder, F. (2002) Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 29139–29151.
- 9) Rambold, A.S., Cohen, S., & Lippincott-Schwartz, J. (2015) Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell*, **32**, 678–692.
- 10) Thomas, P., Arden, C., Corcoran, J., Hacker, C., Welters, H.J., & Morgan, N.G. (2022) Differential routing and disposition of the long-chain saturated fatty acid palmitate in rodent vs human beta-cells. *Nutr. Diabetes*, **12**, 22.
- 11) Palanivel, R. & Sweeney, G. (2005) Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin. *FEBS Lett.*, **579**, 5049–5054.
- 12) Uchinomiya, S., Matsunaga, N., Kamoda, K., Kawagoe, R., Tsuruta, A., Ohdo, S., & Ojida, A. (2020) Fluorescence detection of metabolic activity of the fatty acid beta oxidation pathway in living cells. *Chem. Commun. (Camb.)*, **56**, 3023–3026.
- 13) Kajiwar, K., Osaki, H., Gressies, S., Kuwata, K., Kim, J.H., Gensch, T., Sato, Y., Glorius, F., Yamaguchi, S., & Taki, M. (2022) A negative-solvatochromic fluorescent probe for visualizing intracellular distributions of fatty acid metabolites. *Nat. Commun.*, **13**, 2533.
- 14) Zhao, D., Kim, J.H., Stegemann, L., Strassert, C.A., & Glorius, F. (2015) Cobalt(III)-Catalyzed Directed C–H Coupling with Diazo Compounds: Straightforward Access towards Extended π -Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 4508–4511.
- 15) Schott, M.B., Weller, S.G., Schulze, R.J., Krueger, E.W., Drizyte-Miller, K., Casey, C.A., & McNiven, M.A. (2019) Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes. *J. Cell Biol.*, **218**, 3320–3335.
- 16) Koundouros, N. & Poulgiannis, G. (2020) Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br. J. Cancer*, **122**, 4–22.
- 17) Wei, J., Leit, S., Kuai, J., Therrien, E., Rafi, S., Harwood, H.J. Jr., DeLaBarre, B., & Tong, L. (2019) An allosteric mechanism for potent inhibition of human ATP-citrate lyase. *Nature*, **568**, 566–570.

著者寸描

●多喜 正泰 (たき まさやす)



名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 特任准教授。博士 (工学)。

■略歴 1975年富山県に生る。97年同志社大学工学部卒、2002年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了、02年日本学術振興会特別研究員 (PD)、04年京都大学大学院人間・環境学研究科助手・助教、14年より現職。この間、16年JSTさがけ研究員。

■研究テーマと抱負 ユニークな蛍光色素を基盤としたプローブ開発と蛍光イメージング。オルガネラ動態を蛍光顕微鏡で観察し、形態と機能を高精度に解析することで、生命現象の解明に繋げていきたい。

■ウェブサイト <http://orgreact.chem.nagoya-u.ac.jp/members/taki-masayasu/index.html>

■趣味 天体観察、ジグソーパズル。