

1 細胞分解能を有する PC 合成量とタンパク質合成量の同時解析技術の開発

○小池佑真¹・土谷正樹^{1,2}・浜地格^{1,3} (1京大院工、²JST さきがけ、³JST ERATO)

Simultaneous analysis of the amount of PC and protein in a single cell. (Graduate School of Engineering, Kyoto University¹, JST PRESTO², JST ERATO³) KOIKE, Yuma¹; TSUCHIYA, Masaki^{1,2}; HAMACHI, Itaru^{1,3}

リン脂質ホスファチジルコリン(PC)とタンパク質は細胞増殖などの生命現象において重要な役割を果たしている。これまでに、PC合成とタンパク質合成を個々に計測する技術は開発されてきたものの、両者を同時に解析する技術は確立されておらず、両者の相関やその連携に重要な遺伝子は十分に明らかではない。本研究では、独自のクリック反応に基づくPCラベル化法^{1,2}と、ピューロマイシンによるタンパク質代謝標識を利用するSUnSET法³を組み合わせることで、1細胞単位でPC合成量とタンパク質合成量を同時に計測する新規技術の開発を目指した(Fig.1)。本手法では、① 蛍光性ラベル化剤8AB-DBCOにより細胞内のアジド化PCをラベル化する。② PFA(Paraformaldehyde)で細胞を固定化し、界面活性剤サポニンを用いて膜透過処理を行う。③ ピューロマイシンで代謝標識したタンパク質をAlexa647-抗ピューロマイシン抗体でラベル化する。このように細胞内のPCとタンパク質を二重染色し、フローサイトメトリーにより蛍光強度を1細胞単位で計測することで、両者の合成量を同時に解析できると考えた。

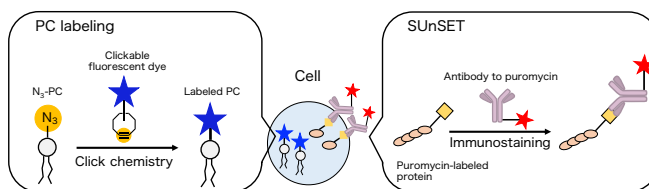


Fig.1 Strategy of this research

まず、細胞内のPCとタンパク質を高感度で同時検出するために、膜透過処理条件を検討した。一般に、抗体は細胞の脂質二重膜を通過できないため、抗体を細胞内へと導入するには、界面活性剤を用いた膜透過処理が必要とされる。しかし、細胞膜の破壊は、PCの細胞外流出を誘起するため、従来手法ではPC合成量とタンパク質合成量の同時評価が困難であった。我々は、膜脂質に対する可溶化特性が異なるサポニン、TritonX-100, NP-40を比較し、サポニン処理が蛍光ラベル化PCの流出を最も抑えることができることを明らかにした(Fig.2)。

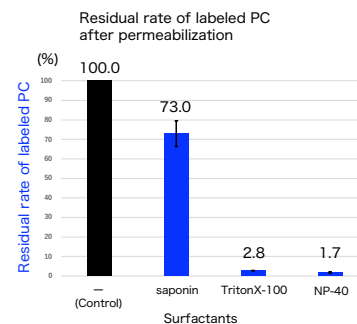


Fig.2 Residual rate of labeled PC

続いて、PC合成に必須な遺伝子PCYT1Aを破壊したK562細胞と野生型細胞に本手法を適用し、1細胞単位で蛍光強度をFACS解析した。PCYT1A欠損細胞では、野生型細胞と比較して、PC合成量の指標となる8ABの蛍光強度が大幅に減少していたとともに、タンパク質合成量の指標となるAlexa647の蛍光強度も48.5%の減少が観測された。このことから、PC合成量の低下に付随してタンパク質合成量が低下することを新しく発見した(Fig.3)。以上、本手法は、1細胞単位でPC合成量とタンパク質合成量を同時に定量解析できる新しい方法論となることを実証した。

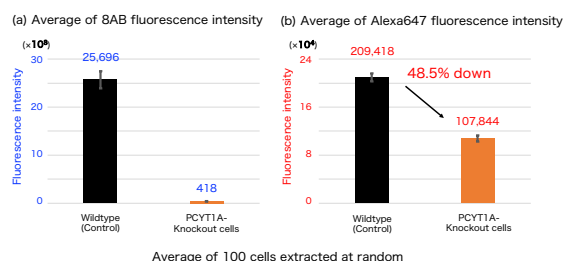


Fig.3 Simultaneous evaluation of PC synthesis and protein synthesis

1) T. Tamura, *et al.*, *Nature Chemical Biology*, **16**, 1361 (2020)

2) M. Tsuchiya, *et al.*, *Cell Metabolism*, **35**, 1 (2023)

3) Enrico K Schmidt, *et al.*, *Nature Methods*, **6**, 275 (2009)