

## 脂肪酸代謝物のオルガネラ選択的ラベリング

○木村天海<sup>1</sup>・土谷正樹<sup>1,2</sup>・田村朋則<sup>1,3</sup>・浜地格<sup>1,3</sup> ( <sup>1</sup>京大院工、<sup>2</sup>JST さきがけ、<sup>3</sup>JST ERATO)

**Organelle-selective labeling of fatty acid-derived metabolites** (Graduate School of Engineering, Kyoto University<sup>1</sup>, JST PRESTO<sup>2</sup>, JST ERATO<sup>3</sup>) KIMURA, Takami<sup>1</sup>; TSUCHIYA Masaki<sup>1,2</sup>; TAMURA, Tomonori<sup>1,3</sup>; HAMACHI, Itaru<sup>1,3</sup>

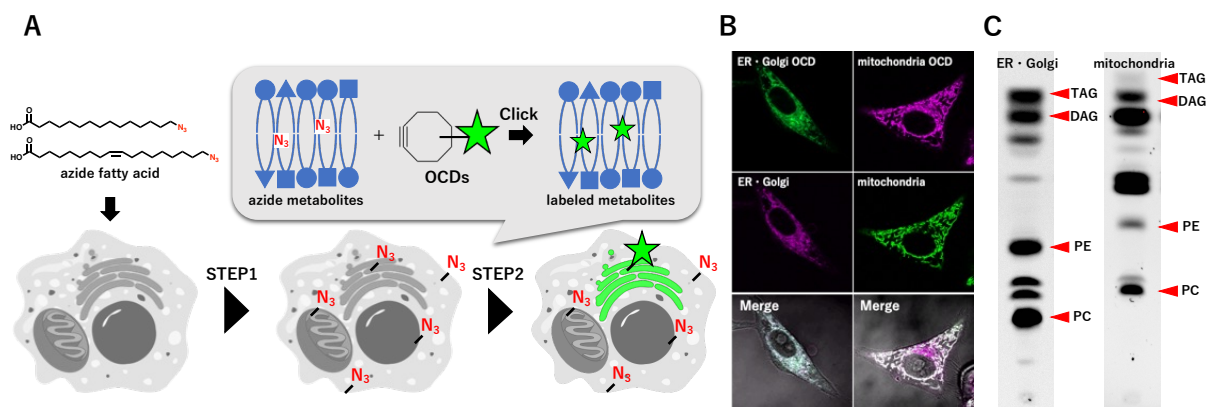
【背景】脂肪酸は脂質の主要な構成成分であり、生命活動のエネルギー源としても重要な生体分子である。細胞内に取り込まれた脂肪酸はアシル-CoA に変換された後、 $\beta$ -酸化や不飽和化、リン脂質/中性脂質への変換など様々な代謝を受ける。この代謝プロセスは細胞内の各オルガネラに局在する複数の酵素が担っていることから、脂肪酸代謝物はオルガネラごとに異なる発現プロファイルを示すと考えられるが、時空間的な代謝物解析は技術的に難しく、その実態は未だ明らかではない。

【戦略】そこで本研究では、近年我々が開発したオルガネラ脂質ラベリング法を応用し、オルガネラ内の脂肪酸代謝パターンを定量的に解析可能な手法の開発を行った。本手法では 炭素鎖末端にアジド基を導入したアジド脂肪酸の代謝導入後<sup>1</sup>に、オルガネラ局在性クリック試薬 (OCDs)<sup>2</sup>によりオルガネラ内のアジド化脂肪酸代謝物を蛍光ラベリングする (Fig1A)。このラベル化生成物を薄層クロマトグラフィー (TLC) や質量分析 (MS) に供することで、分画操作なしにオルガネラ内脂肪酸代謝物の定性・定量解析が可能となると考えた。

【結果】培養細胞に対し、オレイン酸(C18:1)やパルミチン酸(C16:0)のアジド誘導体を終濃度 10  $\mu$ M で 15 分間処置した後、小胞体・Golgi 体選択的な OCD (Rhodol-DBCO) や mitochondria 選択的な OCD (Cy3-DBCO) でアジド脂肪酸代謝物をラベル化した。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察から、反応は各オルガネラで特異的に進行していることが確認された (Fig.1B)。次に、抽出したラベル化脂肪酸代謝物を TLC や MS で解析したところ、ラベル化された 4 種の脂肪酸代謝物 (PC、PE、TAG、DAG) が検出された。これら 4 種のラベル化脂質の量を蛍光強度を基に定量したところ、オルガネラごとに異なる発現パターンをもつことがわかった (Fig.1C)。さらに、時空間的な脂肪酸代謝物の変動を追跡するために pulse-chase 実験を行ったところ、mitochondria 特異的にアジド DAG の一過的な生成量の増加が認められた。以上の結果から、本手法はオルガネラ内脂肪酸代謝物の定性・定量解析法として有用であることが示された。

[1] S. Willhelm *et al*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1976**, 357, 917-924.

[2] T. Tamura *et al*, *Nat. Chem. Biol.* **2020**, 16, 1361-1367



**Fig. 1** (A) Schematic illustration of organelle-selective labeling of fatty acid-derived metabolites. (B) CLSM images of HeLa cells labeled with azide fatty acid and OCDs. (C) TLC analysis of fluorescent metabolites labeled with azide fatty acid and OCDs.