

マウス脂肪細胞の CARS 分光イメージング ～脂肪分解過程の実時間追跡～

(東大院・理¹, 立命館大・スポーツ健康科学², 兵庫県立大院・生命理³, NCTU 分子科学研究所⁴)

○加納英明¹, 瀬川尋貴¹, 奥野将成¹, 橋本健志², 大隅隆³, 濱口宏夫^{1,4}

【序】 脂肪の蓄積及び代謝過程における異常は、メタボリックシンドロームなど各種病態と密接に関係している。従って、脂肪細胞における細胞機能異常と、組織の病態との関連を分子レベルで明らかにすることは、近年の生化学の重要な研究テーマの一つとなっている。脂肪細胞は、いくつもの巨大脂肪滴を細胞内に蓄えることで効率的にエネルギーを貯蔵し、必要に応じてそれらを分解して用いている。これまでの研究から、脂肪分解過程において微小脂肪滴が発生することがわかっているが、その役割と過程には不明な点が多い。これまで橋本、大隅らは、脂肪分解の際、脂肪滴中の中性脂肪がリパーゼにより加水分解され、それにより生じた脂肪酸が小胞体にリクルートされることで微小脂肪滴として再生産されるのではないかと、いう作業仮説を立てて研究を進めてきたが、その直接の証拠を捉えることは、これまでできなかった。そこで本研究では、我々が新しく立ち上げたマルチプレックス CARS 及び三光子と周波分光イメージング装置を用いることで、脂肪分解刺激を与えた後の脂肪細胞の動態を、非染色にて可視化追跡した。

【実験】 本研究では、我々が開発したサブナノ秒マイクロチップレーザーをベースとしたマルチプレックス CARS 顕微分光装置を用い¹、前方方向に出射する信号光を分光器及び CCD カメラにより分光測定し、イメージを構築した。その際、近赤外域及び可視域の信号を同時に取得できるようシステムを拡張することで、CARS (近赤外) 及び三光子と周波 (可視) の同時測定を実現した²。

試料にはマウス由来の脂肪細胞 (3T3-L1) を用いた。培養の過程で、重水素化されたパルミチン酸 (200 μM) を培地に導入した。これにより、パルミチン酸が細胞内に取り込まれ、巨大脂肪滴に重水素化された中性脂肪が蓄積される。細胞を顕微鏡にセットした後、アドレナリン作動薬により脂肪分解刺激を与え、動態観察を行った。細胞はすべてガラスボトムディッシュで培養したものを用い、培養液に満たされた状態で測定を行った。

【結果】 図 1 に、薬剤導入前後における脂肪細胞の動態を追跡した結果を示す。上段及び中段は CH_2 及び CD_2 伸縮振動による CARS イメージ、下段は三光子と周波によるイメージである。いずれのイメージにおいても、薬剤導入後、微小脂肪滴の出現が明瞭に観察された。 CD_2 伸縮振動でも微小脂肪滴の出現が見られたことは、これら微

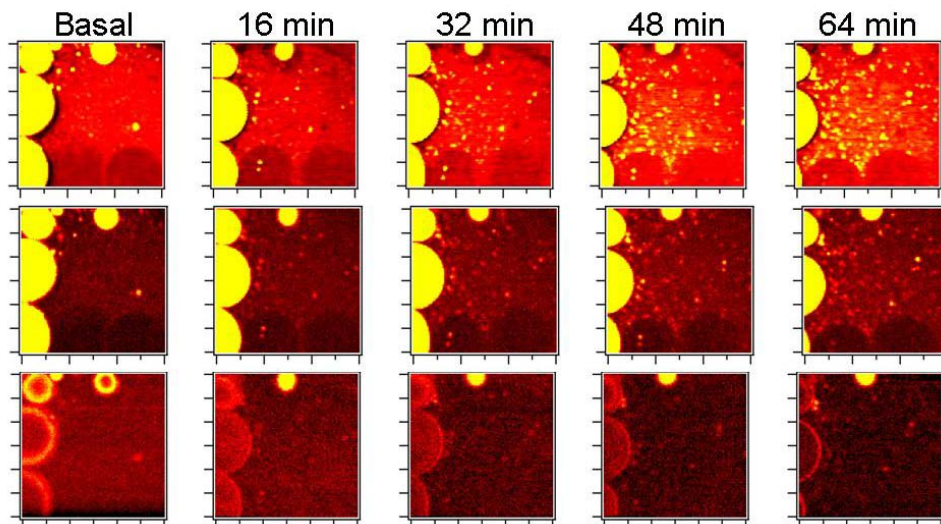


図 1. 薬剤導入前(Basal)及び導入 16, 32, 48, 64 分後の脂肪細胞の CARS (CH₂ 伸縮振動; 上段, CD₂ 伸縮振動; 中段) 及び三光子和周波 (下段) 分光イメージングの結果。イメージ取得時間は約 8 分。

小脂肪滴が細胞内の巨大脂肪滴から産生していることを示している。また、三光子和周波において巨大脂肪滴がリング状に観測されるのは、三光子和周波の信号発生機構に由来する界面選択性によるものであると考えられる²。CARS(CH₂ 及び CD₂ 伸縮)、三次和周波のイメージがよく対応することは、三次和周波が細胞内の脂肪滴の界面を選択的に可視化していることを意味している。

次に、作業仮説を検証するため、小胞体における脂肪酸の再エステル化を阻害する薬剤を用いて培養した脂肪細胞の測定を行った。図 2 に薬剤導入前(Basal)及び導入 120 分後の脂肪細胞の CARS (CH₂ 伸縮振動) 分光イメージングの結果を示す。脂肪分解刺激を与えても微小脂肪滴は出現しない。このことから、微小脂肪滴の産生は、小胞体における再エステル化能の有無により明らかに異なることがわかった。従って、微小脂肪滴は小胞体から産生されることが裏付けられ、小胞体が活発な脂肪分解の場として機能していることがわかった。

[1] M. Okuno *et. al.*,
Angew. Chem. Int. Ed
49, 6773 (2010); 特願
2008- 66832

[2] 本討論会 4P089,
瀬川, 奥野, 加納, 濱
口, “白色レーザーを
用いた生細胞の非縮
退マルチプレックス
三次和周波分光イメ
ージング”

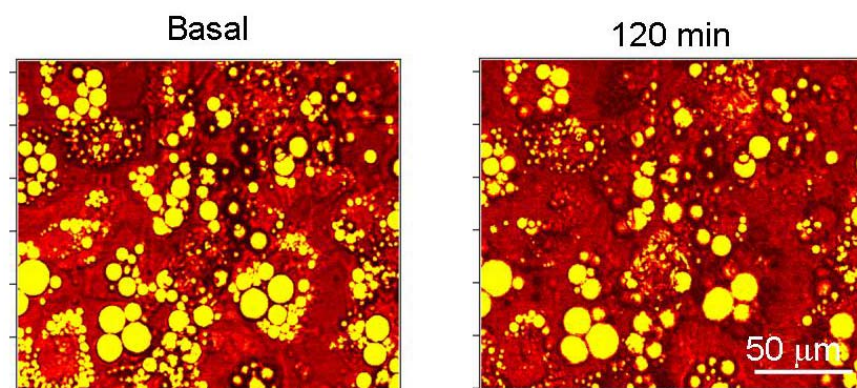


図 2 薬剤導入前(左)及び導入 120 分後(右)の脂肪生細胞の CARS 分光イメージ (CH₂ 伸縮振動)。