

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 17 年度採択研究代表者

田口 良

(東京大学大学院医学系研究科 客員教授)

「脂質メタボロームのための基盤技術の構築とその適用」

1. 研究実施の概要

ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームの進展に伴い、メタボローム解析の重要性が叫ばれている。すなわち、生命現象を直接担っている分子は、遺伝子産物であるタンパク質によって合成・分解され、結合・運搬される数多くの低分子化合物であり、これらの代謝物質を動的・包括的に解析するメタボローム研究が、生命現象や生体機能調節を解明する上で重要であると考えられるようになってきている。このメタボロームの対象分子の中で脂質分子は細胞内外の情報伝達において主要な役割を演じており、生命活動や病態を本質的に理解する上で鍵となる重要な分子群と考えられるようになってきた。しかし、脂質分子の特性から、タンパク質を中心とした従来の研究手法を直接は適用できない等の制約があるため、重要な脂質機能の多くが未解決で残されている。質量分析を基盤とした脂質メタボローム解析は、この難問を解決する突破口と期待されている。

本研究では、生命活動に伴う脂質関連代謝分子の変動について、網羅的・包括的に質量分析データを取得して解析する基盤技術を構築することを目的とする。さらには、個別の脂質研究にこの基盤技術を適用して解析することにより、脂質メタボロームのリアルデータベースの作成、未知の代謝産物や代謝経路の発見を通じて、細胞機能の有益な制御を目指す。具体的には、Ⅰ 質量分析手法の開発、Ⅱ 質量データベース構築と同定・検索ツールの開発、Ⅲ 定量的可視化ツールの作成、Ⅳ 多変量解析ツールの作成、Ⅴ 各脂質代謝系への適用とリアルデータベースの構築、の5項目について順次進めていく予定である。

2. 研究実施内容

今年度は上記の実験項目の内、ⅠとⅡの項目を重点にすすめ、Ⅴの脂質代謝系への適用に関しての予備実験を開始した。

田口グループではⅠ 脂質メタボローム解析に適した、質量分析解析手法の開発と、Ⅱ 脂質メタボロームの為の質量データベース構築と同定・検索ツールの開発、を重点的に取り組んだ。

まず、Ⅰ 質量分析解析手法の開発を考える上で、脂質メタボローム解析の基盤技術として最も重要なことは、最新の質量分析技術を脂質に適用する手法の確立である。本研究では、四重極、イオントラップ、飛行時間型、フーリエトランスフォーム型の各種質量分析計を駆使して多様な脂質分子を分析し、最適な測定条件を決定することを検討した。その結果、以下に上げる a)、b)、c) の 3 種類の特徴の異なる手法をほぼ確立した。a) 網羅的、包括的解析 -- 特定の分子群に限定せずに、LC により分離溶出された分子を、イオン強度の高い順にできるだけすべて MS/MS を用いて分析するという包括的な手法である。リン脂質のメタボローム解析に順相又は逆相 LC-MS を用いた場合、ほぼ 1 時間程度の溶出時間の条件下で、各リン脂質のクラス、サブクラス 100-200 程度の分子種同定が可能である事が判った。b) 特定の分子群にフォーカスした手法 -- グループ特異的な、フォーカスドメタボロームとも呼びうる同定法である。トリプルステージ型質量分析計の MS/MS 分析を利用した、重要な解析手法としてプレカーサーイオンスキャン (precursor ion scanning) やニューートラルロススキャン (neutral loss scanning) が挙げられる。この手法は、リン脂質の各クラスを特異的かつ網羅的に同定するために用いる事が出来る。また特定の脂肪酸を持つ分子種を選択的に同定する事が可能な手法でもある。c) 特異的な代謝物にターゲットを定めた手法 -- 特定のクラス内の特定分子種分子を対象とした個別かつ特異的同定法である。selected reaction monitoring (SRM) または multiple reaction monitoring (MRM) と呼ばれる手法である。特定の MS 値のみをスキャンするために、検出感度が高く、定量法としても用いることが出来る。非常に微量しか存在しない代謝成分の同定法として有効であることを確認した。構造的に存在が予想可能な成分に対する仮想的なデータベースを用い、拡張 MRM という、部分的に網羅性を加味した手法として確立することを目指して取り組んでいる。この内容については近々発表の予定である。

2 番目の課題であるⅡ 質量データベース構築と同定・検索ツールの開発に関しては、これまで我々が公開していたテキストファイルからの検索同定ツールに加え、2005 年 11 月末にリン脂質について質量分析メーカーの生データから直接、検索・同定が可能なツールを公開した (<http://lipidsearch.jp>)。さらに、2006 年 2 月にはトリグリセリド等の中性脂質に対する自動解析も可能なバージョンアップを行った。V 個別脂質代謝系への適用に関しては、田口グループでは酸化リン脂質の分析を血漿等を用いて開始した。同様に各個別グループにおいても、以下の取り組みがなされた。

花田グループ (組織上、田口グループ内) -- 本年度は、細胞内セラミド輸送の制御について解析を進めた。哺乳動物細胞における小胞体-ゴルジ体間セラミド選別輸送を担う蛋白質 CERT 上の 7 アミノ酸からなるペプチドモチーフ (FFAT モチーフ) が小胞体膜蛋白質 VAP との相互作用、および細胞内セラミド選別輸送に重要であることを明らかにした。

横溝グループ -- 強力な炎症起炎物質であるロイコトリエン B4 (LTB4) の高親和性受容体である BLT1 の生体内での役割を解明する目的で、BLT1 欠損マウスを作成し表現型の解析を行った。BLT1 欠損マウスから単離した好中球では LTB4 依存性のカルシウム上昇反応、脱顆粒

反応が完全に消失していたため、BLT1 が好中球において主要な LTB4 受容体であることがわかった。また、BLT1 は、抗原感作による Th2 型免疫反応に対して促進的に機能していることが明らかとなった。さらに、全てのプロスタグランディン、ロイコトリエン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、血小板活性化因子を、生体材料から抽出し、一斉に定量する系を確立した。

久下グループ— 細胞内には構成脂肪酸が異なる種々の PS 分子種が存在する。しかし現在、これら PS の分子種組成が PS 代謝のどのレベルで制御されているのかは不明であり、また PS の生理機能と PS 分子種の関連もよく理解されていない。本年度は、哺乳動物細胞に存在する 2 種類の PS 合成酵素により生合成される PS 分子種を明らかにする目的で、これら酵素の精製を試みた。その結果、2 種類の酵素をそれぞれ部分精製することに成功し、これら酵素が合成する PS 分子種特異性を明らかにするための準備が整った。

小林グループ— 1) ステロイド関連化合物の質量分析—各種ステロイド、および関連化合物の標準品を用いて、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS、機器名 Q TRAP) 測定最適化を行い、質量分析データの取得を試みた。一方で、ステロイド配当体の一種であるコレステリルグルコシドとその類似体について、TOF-MS を用いて分析する条件を確立し、分子イオン、およびフラグメントイオン情報を集積した。2) その他の生理活性脂質の質量分析 — ステロイド以外の生理活性脂質として、細胞増殖抑制作用、ガン細胞浸潤抑制作用、及び神経栄養因子作用がある、環状ホスファチジン酸 (cPA) のメタボローム解析を行った。その結果、哺乳類血清中の Autotaxin による cPA 生合成機構の一部が明らかになった。

横山グループ— 1) 細胞周期におけるリン脂質のメタボローム解析のため、HeLa 細胞を用いた同調培養の実験系を確立した。予備的に分裂期 (M期) に同調したサンプルのマススペクトル解析を行った。2) 酸化した食用油に含まれる中性脂質の薄層クロマトグラフィーを行なったところ、やや極性の高い酸化した分子種が含まれていることが示唆された。さらに分子種分析を行なう目的でマススペクトル解析をしたところ、通常の食用油成分とは異なる多数のピークが観察された。

福崎グループ— まず、脂質分析のデータとしてマウスのレチナから抽出した脂質を ESI/MS で分析したデータを用いた。このデータから、各サンプルに含まれるすべての分子種を網羅的に比較するためのマトリクスデータを作成した。次に、上記マトリクスデータに対して既存のソフトを用いて PCA 解析および BL-SOM 解析を行ったところ、生後の日数に応じて側鎖の鎖長や不飽和度が変動していく傾向が見られたものの、データ量が多くなりすぎ、詳細なデータの考察をするには不向きであることが問題点として挙げられた。そこで、今年度の研究計画でも報告したようにリン脂質の解析データを表示するための専用ブラウザの開発を行うことを今後の予定とした。

高橋グループ— 標準脂質及び脂質代謝物の高分解能・高精度質量分析及び MS/MS 測定を行うために、FTICR-MS 環境の整備を実施した。具体的には、1) 4T-Q-FTICR-MS への NanoESI

ソースの導入と最適化、及び 2) NanoLC システムとの連結を実施した。しかし、これを実施するために、大気圧インターフェイスのアップグレードが必要であるとの結論に達し、準備を行った。

3. 研究実施体制

「東京大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：田口 良（東京大学大学院・医学系研究科、客員教授）
- ② 研究項目：脂質メタボロームのための基盤技術の構築とその適用

「国立感染症研究所」グループ

- ① 研究分担グループ長：花田 賢太郎（国立感染症研究所・細胞科学部、室長）
- ② 研究項目：脂質代謝物に関するデータベースを利用したスフィンゴ脂質の代謝制御と機能の解析

「九州大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：横溝 岳彦（九州大学大学院，医学研究院・医科学分野（平成 18 年 2 月移動）、教授）
- ② 研究項目：脂肪酸及びその誘導体に関するデータベース構築と機能解明

「九州大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：久下 理（九州大学大学院理学研究院化学部門、教授）
- ② 研究項目：ホスファチジルセリンとその関連リン脂質のデータベース構築及び代謝と機能解明

「お茶の水女子大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：小林 哲幸（お茶の水女子大学・理学部、助教授）
- ② 研究項目：ステロイド関連代謝物のデータベース構築、およびその他生理活性脂質のメタボローム解析

「帝京大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：横山 和明（帝京大学・薬学部、助教授）
- ② 研究項目：グリセロ脂質とその関連代謝物に関するデータベース構築、構造と代謝

「大阪大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：福崎 英一郎（大阪大学・工学研究科、助教授）

- ② 研究項目：脂質メタボローム解析のためのデータマイニングシステムの開発

「産業技術総合研究所」グループ

- ① 研究分担グループ長：高橋 勝利（産業技術総合研究所、生命情報科学センター）
② 研究項目：脂質メタボロームのための高精度質量分析技術の開発

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

田口グループ

- Toshiaki Houjou, Kotoko Yamatani, Masayoshi Imagawa, Takao Shimizu, Ryo Taguchi.
A Shotgun tandem mass spectrometric analysis of phospholipids with normal-phase and/or reverse-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. : Rapid Commun. Mass Spectrom., 19, 654-666 (2005)
- Taguchi R, Houjou T, Nakanishi H, Yamazaki T, Ishida M, Imagawa M, Shimizu T.
Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. : J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 25;823(1):26-36 (2005)

横溝グループ

- Terawaki K, Yokomizo T, Nagase T, Toda A, Taniguchi M, Hashizume K, Yagi T, Shimizu T.
Absence of leukotriene B4 receptor 1 confers resistance to airway hyperresponsiveness and Th2 type immune responses. J. Immunol. 175, 4217-4225, 2005
- Yoshikawa K, Kita Y, Kishimoto K, Shimizu T. Profiling of eicosanoid production in the rat hippocampus during kainate-induced seizure: Dual-phase regulation and differential involvement of cox-1 and cox-2. J. Biol. Chem. 2006 (in press, DOI: 10.1074/jbc.M511089200)

小林グループ

- Satomi Tsuda, Shinichi Okudaira, Keiko Moriya-Ito, Masayuki Tanaka, Junken Aoki, Hiroyuki Arai, Kimiko Murakami-Murofushi, and Tetsuyuki Kobayashi (2006) Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. J. Biol. Chem., in press.

福崎グループ

- Fukusaki, E., K. Jumtee, T. Bamba, T. Yamaji, and A. Kobayashi, "Metabolic Fingerprinting and Profiling of Arabidopsis thaliana Leaf and its Cultured Cells T87 by GC/MS." Z Naturforsch [C]: in press.
- Bamba, T., Fukusaki, E., Minakuchi, H., Nakazawa, Y., and Kobayashi, A. : Separation of polyprenol and dolichol by monolithic silica capillary column chromatography. J Lipid Res, 46, 2295-2298 (2005)

