

「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

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。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。

田口グループはこれまでに構築した脂質メタボローム解析手法を基に、特に通常的手法では検出が困難であることが判っていた微量酸性リン脂質、酸化脂質について、高感度検出法を検討し、非常に高感度な測定手法を確立した。現在、リン脂質、中性脂質、酸性リン脂質、これらの酸化体、セラミド糖脂質等について、標準的な抽出条件や特異的解析法を確立し、これらを、肥満と各種炎症モデルマウスの解析に適用し、動脈硬化、心筋梗塞等の病態モデルにおいて、高度不飽和脂肪酸を持つ分子種を中心とした脂質代謝の異常が非常に高感度で測定できることが確認した。今後、マイクロダイセクションによる部位特異的解析とこれらの高感度解析法を組み合わせ、脂質分子種の局在とその生理的、病理的機能を解析してゆく予定である。

花田グループはセラミドの小胞体からゴルジ体への細胞内輸送を担う蛋白質 CERT の機能がリン酸化によって負に制御されていることを明らかにした。横溝グループは田口グループと共同で GPCR の一つ BLT2 の新たなリガンドを発見し、その構造を決定した。久下グループは新規ホスホリパーゼ D が、リン脂質のミトコンドリアへの輸送に関与する可能性を示した。小林グループは、病態モデルとして出血性ショックモデルラットに着目し、リン脂質を中心としたリピド

ーム解析を適用して脂質メディエーターを見出した。横山グループは極長鎖脂肪酸を結合した異常なグリセリン脂質を、生合成・蓄積することにより致死となる分裂酵母の変異株で、90kDa のタンパク質が発現することを見いだした。福崎グループは脂質メタボローム解析ツールの種々の改良を行った。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

質量分析によるデータから脂質代謝物を同定するための **Lipid Search** 自動同定システムの改訂版を 2006 年 11 月に公開したが、この検索による同定効率を高めるために LC/MS における溶出時間をスコアリングに活用する為の改良を行った。また、開発した自動定量プロファイリングシステムと **lipid Search** の自動検索結果を統合できる解析システムのテスト版が出来た。今後実際の測定サンプルに適用してさらにその改良を行う。現在すでにほぼ終わっているマウスの臓器毎のリン脂質等に関するリアルデータベースの公開はシステムの完成を待って 20 年度秋頃を目指す。

田口グループは、脂肪酸のアシル化反応の特異性について、メタボローム解析により、いくつかの新しい機能を解明した (田口 1,2)。また、HPLC による分離、定量が困難であったホスファチジン酸やホスファチジルセリン等の酸性リン脂質について質量分析による高感度測定手法を確立できた (田口 3)。18 年度に確立した酸化脂質の測定法をもちいて、19 年度に、炎症や酸化ストレスに連動して起こる脂質代謝変化とともに、微量酸化脂質、酸化リン脂質を実際に検出できた (投稿準備中)。今後は検出した酸化脂質をさらに詳細に解析し、炎症とその緩解期における対象として測定する。また、19 年度はレーザーマイクロダイセクションの新たな導入により 10 ミリミクロンの厚さで 1mm 四方の組織サンプルからほとんどのリン脂質分子種の分析が可能であることが判り、炎症部位等の組織局部における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質分子種の特異的変動が観察できた (投稿準備中)。

花田グループは哺乳動物細胞におけるスフィンゴ脂質代謝分子メカニズムの解明に向けて、本年度は、細胞内セラミド輸送の制御メカニズムについて解析を進めた。そして、セラミドの小胞体からゴルジ体への細胞内輸送を担う蛋白質 CERT の機能がリン酸化によって負に制御されていることを明らかにした(花田1)。

横溝グループ

BLT2 はロイコトリエン B4 によって活性化されるが、高濃度のロイコトリエン B4 が必要なため、他の生体内リガンドが存在することを想定し、横溝グループと田口グループが協同で高親和性リガンドの同定を試みた。ラットの様々な臓器より脂質抽出を行い、BLT2 過剰発現細胞に添加して BLT2 の活性化能を検討した。小腸から抽出したアセトン可溶性の脂質画分を HPLC にて展開したところ、LTB4 とは異なるフラクションに BLT2

活性化能を検出し、これを精製・質量分析系にて構造を決定したところ、12-HHT(12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid)であることがわかった。これまで12-HHTはトロンボキセンA2産生に伴うバイプロダクトであり生物活性は無いと考えられてきたが、強力なBLT2活性化能を有する新規生理活性脂質であると考えられた(横溝2, Okuno, J. Exp. Med.)

久下グループはリン脂質の細胞内輸送と分子種との関連を酵母変異株のメタボローム解析で明らかにする目的で、リン脂質の細胞内輸送に関与する遺伝子の同定を試みた。その結果、新規ホスホリパーゼDが、リン脂質のミトコンドリアへの輸送に関与する可能性が示唆された(久下1)。リン脂質の細胞内輸送と分子種との関連を酵母変異株のメタボローム解析で明らかにする目的で、リン脂質の細胞内輸送に関与する遺伝子の同定を試みている。今回、新規ホスホリパーゼD(PLD3と命名)が、ホスファチジルセリン脱炭酸酵素1と遺伝学的に相互作用し、両者が欠損すると酵母は増殖損傷を示し、カルジオリピン(CL)の含量が著しく低下することを見出した。CL合成には、その前駆体であるホスファチジン酸のミトコンドリアへの輸送が必要であり、今後、この過程を含めPLD3がCL合成のどの過程に関与するのかを明らかにしたい。

小林グループは昨年度に確立した、イオン化効率を高めた誘導体化法を用いたエレクトロスプレーイオン化質量分析(QTRAP)測定方法について、更に多様なステロイド化合物への適用を検討し、分子イオンやフラグメントイオン情報を集積した。また、細胞への熱ストレスに伴って誘導されるステロール誘導体の機能について、本手法を応用して解析し、合成酵素の性状を明らかにしつつある。一方、その他の生理活性脂質についても、病態モデルとして出血性ショックモデルラットに着目し、リン脂質を中心としたリポドーム解析を適用して脂質メディエーターを見出した(小林1)他、軟体動物中にユニークな構造を有するスフィンゴミエリンを同定した。

横山グループ

極長鎖脂肪酸を結合した異常なグリセロリン脂質を、生合成・蓄積することにより致死となる分裂酵母の変異株で、90kDaのタンパク質が発現することを見だし、J. Biochem.誌に発表した(横山1)。また、マウス腹腔マクロファージにコレステロール+ホスファチジルセリン含有リポソームを与えるとlipid dropletを形成するが、この動脈硬化モデルにおいてリポソームを構成するグリセロリン脂質のアシル鎖をさまざまに変えて、脂肪滴形成と脂質代謝について検討した。その結果、オレイン酸では脂肪滴が形成され、コレステリルエステルも合成されて泡沫化が起こった。しかしパルミチン酸やステアリン酸などの飽和脂肪酸では泡沫化は起こらずアシル鎖選択性があることがわかった。

田口グループと高橋グループとが共同で進めてきたFTICRMSによる精密質量分析に関しては、質量分析メーカーの協力も仰ぎ、酸化ホスファチジルコリンを中心とした酸化リン脂質について、ほぼフラグメントの元素組成レベルでのフラグメント解析を行うことが出来た。

3. 研究実施体制

(1)「田口・花田」グループ

①研究分担グループ長:田口 良(東京大学大学院、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

(2)「花田」グループ(田口グループ内)

①研究分担グループ長:花田 賢太郎(国立感染症研究所、部長)

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の解明

(3)「横溝」グループ

①研究分担グループ長:横溝 岳彦(九州大学、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

(4)「久下」グループ

①研究分担グループ長:久下 理(九州大学、教授)

②研究項目

・酸性リン脂質及びその代謝物に関するデータベース構築
・ホスファチジルセリンとその関連リン脂質の代謝と機能解明

(5)「小林」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、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

(6)「横山」グループ

①研究分担グループ長:横山 和明(帝京大学、准教授)

②研究項目

・極長鎖脂肪酸を結合した異常なグリセロリン脂質を、生合成・蓄積することにより致死となる分裂酵母の変異株で、90kDa のタンパク質が発現することを見だし、J. Biochem.誌に発表した。

- ・マウス腹腔マクロファージにコレステロール+ホスファチジルセリン含有リポソームを与えると lipid droplet を形成する。この動脈硬化モデルにおいてリポソームを構成するグリセリン脂質のアシル鎖をさまざまに変えて、脂肪滴形成と脂質代謝について検討した。その結果、オレイン酸では脂肪滴が形成され、コレステリルエステルも合成されて泡沫化が起こった。しかしパルミチン酸やステアリン酸などの飽和脂肪酸では泡沫化は起こらずアシル鎖選択性があることがわかった。

(7)「福崎」グループ

①研究分担グループ長:福崎 英一郎(大阪大学、教授)

②研究項目

- ・データマイニングシステムの開発
- ・親水性代謝産物のメタボロミクス解析系の開発

(8)「高橋」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、主任研究員)

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

田口 グループ

1. Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, Shimizu T. A single enzyme catalyzes both PAF production and membrane biogenesis of inflammatory cells: cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. J Biol Chem. 282, 6532-6539, 2007
2. Hishikawa D, Shindou H, Kobayashi S, Nakanishi H, Taguchi R, Shimizu T., Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. Proc Natl Acad Sci USA.; 105(8):2830-5. 2008
3. Ogiso H, Suzuki T, Taguchi R., Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection. Anal Biochem.; 375(1):124-31. 2008
4. Tsumoto H, Murata C, Miyata N, Kohda K, Taguchi R. Efficient identification and quantification of proteins using isotope-coded 1-(6-methylnicotinoyloxy) succinimides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass

spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*; 21(23):3815-24, 2007

5. Okuno T, Iizuka Y, Okazaki H, Yokomizo T, Taguchi R, Shimizu T:
12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid is a natural ligand for
leukotriene B4 receptor 2. *J. Exp. Med.* In press

花田グループ

1. Keigo Kumagai, Miyuki Kawano, Fumiko Shinkai-Ouchi, Masahiro Nishijima, and Kentaro Hanada: Inter-organelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent co-operativity between the PH and START domains of CERT. *J. Biol. Chem.*, 282, 17758-17766, 2007

横溝グループ

1. Ando, K., Kawamura, Y., Akai, Y., Kunitomo, J., Yokomizo, T., Yamashita, M., Ohta, S., Ohishi, T., Ohishi, Y*. Preparation of 2-, 3-, 4- and 7-(2-alkylcarbamoyl-1-alkylvinyl)benzo[b]furans and their BLT(1) and/or BLT(2) inhibitory activities. *Org. Biomol. Chem.* 6, 296-307, 2008
2. Okuno T, Iizuka Y, Okazaki H, Yokomizo T, Taguchi R, Shimizu T:
12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid is a natural ligand for
leukotriene B4 receptor 2. *J. Exp. Med.* In press

小林グループ

1. 相星淳一、小池薫、小林哲幸、大友康裕、山本保博 (2007) 出血性ショックに続発する多臓器不全のメカニズムー腸間膜リンパ液に対する保存血および代用血液の影響ー *日本腹部救急医学会雑誌*、27 (1): 51-57.
2. Yoko Nagasako-Akazome, Tomomasa Kanda, Yasuyuki Ohtake, Hiroyuki Shimasaki and Tetsuyuki Kobayashi (2007) Apple polyphenols have an influence on fat metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *Journal of Oleo Science*, 56 (8): 417-428.

横山グループ

1. Yokoyama K, Nakagawa M, Satoh M, Saitoh S, Dohmae N, Harada A, Satoh N, Karasawa K, Takio K, Yanagida M, Inoue K. Expression of a Novel 90-kDa Protein, Lsd90, Involved in the Metabolism of Very Long-chain Fatty Acid-containing Phospholipids in a Mitosis-defective Fission Yeast Mutant. *Journal of Biochemistry*、143巻、3号、369-375ページ、2008年

福崎グループ

1. Kazuo Harada, Yohko Ohyama, Tetsuya Tabushi, Akio Kobayashi and Eiichiro Fukusaki, Quantitative Analysis of Anionic Metabolites for *Catharanthus roseus* by Capillary Electrophoresis Using Sulfonated Capillary Coupled with Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry

(2) その他

① その他の成果発表

すでに公開中の脂質メタボローム自動検索システムについて、

<http://lipidsearch.jp/LipidNavigator.htm> 上にフラグメントによるスコアリングを加味した lipid Search の改訂版を公開した(2007年11月)。なお、2008年5月に LC の溶出時間をスコアリングに加えた改訂版を公開する予定である。