

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」
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

研究のねらい: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、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を通じて、病態の解析、未知の代謝産物の発見、細胞機能の制御等を目的とした。

研究の概要:質量分析手法の開発に関しては、これまで解析が困難であった酸性リン脂質のホスファチジルセリンやホスファチジンとそのリゾ体の有効な解析法を確立した。さらに生理的に重要であるが、これまで解析が非常に困難であったポリホスホイノシタイドについても、実用可能な手法を開発した。また、酸化リン脂質の選択的同定法についての手法も確立し、種々の炎症モデルに適用した。さらに、レーザーマイクロダイセクションによる部位特異的サンプル取得と開発したこれらの高感度質量分析法を組み合わせ、脂質分子種の局在とその生理的、病理的機能解析に適用した結果、この手法が局所の代謝分子やその変動の解析に非常に有効であることを見いだした。また、組織切片を用いて、脂質分子の局在を観察することが出来る imaging MS による直接的な画像取得についての測定法の検討を開始し、マウス小脳におけるリン脂質分子種の局在の解析によりその有効性を確認した。

また各グループについてもそれぞれの研究成果を得ている。

研究進展状況:当初予定した種々の質量分析解析手法はほぼ確立できた。今後、種々の病態サンプル等の解析に適用しその有効性を確認してゆく予定である。また、当初の開発予定の質量分析手法に加え、脂質分子種の局在とその生理的意義とそれを維持する機構の解明を目的として、生体サンプルからレーザーマイクロダイセクションで得、局所の微量サンプルから抽出した脂質を LC-MS/MS を用いて解析する手法の開発を試みた。その結果、虚血再還流によるマウス心筋梗塞モデルに於いて、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を含むリン脂質分子種が心筋梗塞部位で約 10 分の 1 程度に減少していることが判った。今後、種々の臓器の炎症部位等における詳細な局在変化の解析へ適用する予定である。

今後の見通し:種々の病態サンプルについて、局所的解析法を組み合わせ、脂質メタボローム解析の病態及び生理的解明への適用を各グループと共同で進めてゆく予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

研究チーム全体

1. 研究目的

生体内の脂質分子種は、遺伝的要因のみならず、食事等の生活習慣により大きく変動することが判っている。このことは、最近問題となっているメタボリックシンドローム等の病態に大きく関係し、高齢化に伴うレドックス機能の低下による酸化ストレスの蓄積は、動脈硬化やアルツハイマー等の発症要因の一つと考えられている。

このクレスト研究での解析対象としては、数百以上に及ぶ非常に多くのリン脂質のクラスや脂質分子種が、各組織、細胞、細胞内オルガネラ、細胞膜局在ドメインにおいて、その生理的機能の必要性から、どのように特異的・選択的に局在化しているかを確認し、さらにそれらが、アシル基の分解合成や転移反応を触媒する酵素によりどのように制御されているかを明らかにしたいと考えている。また、その中でアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸(DHA)等の高度不飽和脂肪酸を持つ分子種とその過酸化を調べることで、脂質過酸化の生理的機能や病態との関連を調べることを目的としている。研究材料としては、主に動物細胞や動物個体を中心に用い、遺伝子型の異なる生体サンプルの代謝変動応答の違いを比較、解析する。

2. 方法: 脂質メタボローム解析手法の開発

リポミクスにおいては、測定対象の広さ、より微量のものを検出できる感度、特定の構造特性、選択特異性という種々の観点から、目的別の異なった解析手法が必要である。我々は、以下に示す3種の手法に分けてそれぞれの脂質代謝物に適した手法を開発した(図1)。

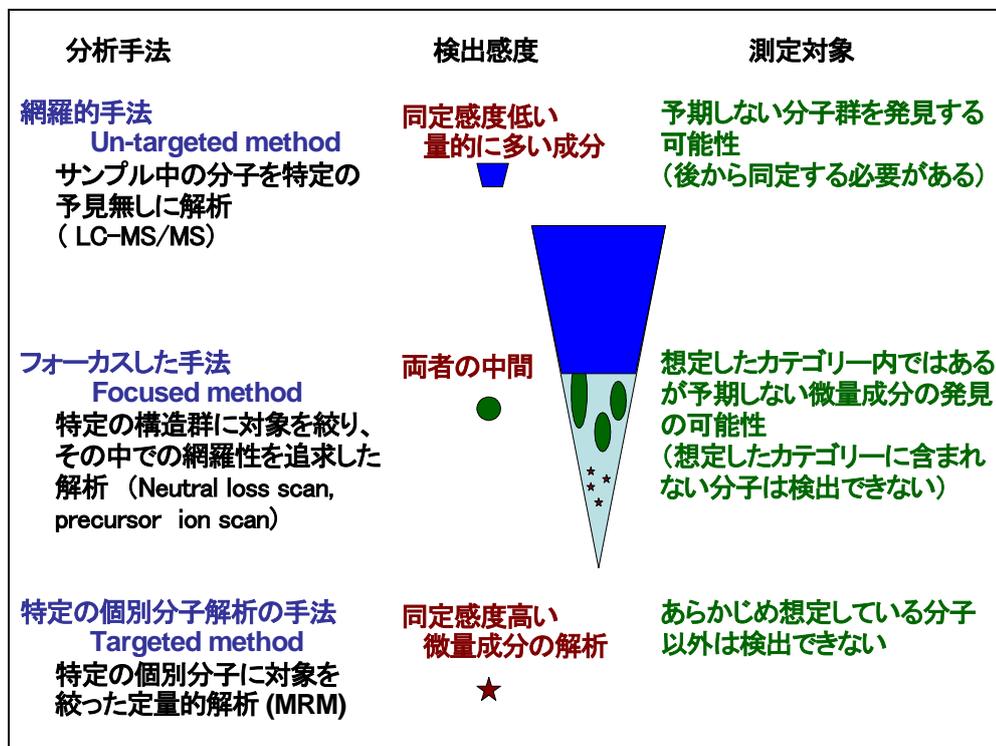


図1. メタボロームにおける3種類の質量分析手法

今年度は、これまで解析が困難であった酸性リン脂質のホスファチジルセリンやホスファチジンとそのリゾ体の有効な解析法を確立した¹。さらに生理的に重要であるが、解析が非常に困難であったポリホスホイノシタイドについても、実用可能な手法を開発した²。また、酸化リン脂質の選択的同定法についての包括的解析手法も確立し、種々の炎症モデルに対する適用を行った^{3,4}。

3. 解析手法：メタボロームデータの同定・検索手法の開発

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を 2008 年 8 月に公開した (<http://lipidsearch.jp>) (図2)。

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。現在すでにほぼ終え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 21 年度に予定している。

<http://lipidsearch.jp>

図2. 自動定性、定量解析ツール Lipid Search の検索画面 (<http://lipidsearch.jp>)

さらに、LCMS データの m/z 値、溶出時間、面積又はイオン強度からなるデータを比較し、サン

プル間の変動を差や比を自動表示するツールを作成している。

4. 新たな研究手法:脂質分子種局在の解析手法の開発と応用

脂質分子種の局在とその生理的意義、そして局在を維持する機構の解明を目的として、脂質の局在解析へのアプローチを試みた。一つは生体サンプルからレーザーマイクロダイセクションで得た、局所の微量サンプルから抽出した脂質を LC-MS/MS を用いて解析する手法である。レーザーマイクロダイセクションの使用により 10 ミリマイクロンの厚さで 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った。今後、種々の臓器の炎症部位等における詳細な局在変化の解析を行う予定である。

また、この手法と平行して質量イメージングという手法で、組織切片のサンプル表面にレーザーを照射し、イオン化した分子の局在を可視化するという手法に取り組みは始めている。手始めとして小脳のエリニ層、顆粒層、細胞層におけるリン脂質や糖脂質の局在解析を行い、レーザーマイクロダイセクションによる結果と非常に一致を見ている。今後、脳梗塞をはじめ、種々の神経性疾患で生じる脱ミエリン化等の病態モデルの解析に応用する予定である。

5. 本crest研究での生体サンプル解析への適用における各グループの主な研究成果

田口グループは、東大医学部清水グループとの共同研究により脂質のリモデリングに関与するアシルトランスフェラーゼの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をおこない、いくつかの新しい生理機能を解明した⁵。脂質のリモデリングは各臓器に特異的な個別のクラスの脂質分子種特異性を維持する重要な機構の一つであると考えられる。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やポリホスホイノシタイドについて質量分析による高感度測定手法を確立できた^{1,2}。この手法はこれら微量酸性リン脂質やそれから生じるメディエーター候補であるリゾ体の解析に有効であった。また、新たに確立した酸化脂質の測定法をもちいて、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^{3,4}。さらに、横溝グループとの共同研究により、低親和性のロイコトリエン B4 受容体と考えられていた BLT2 に対して、ロイコトリエン B4 とは異なる脂溶性リガンドが存在することを LC-MS により見だし、部分精製して構造を決定した⁶。また、レーザーマイクロダイセクションの新たな導入により炎症部位等の微量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。

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^{7,8}。

横溝グループは田口グループと共同で、低親和性のロイコトリエン B4 受容体と考えられていた BLT2 に対して、ロイコトリエン B4 とは異なる脂溶性リガンドが存在することを見だし、これを部分精製して構造を決定したところ、12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid(12-HHT)であることが判明した⁶。12-HHT はロイコトリエン B4 よりも一桁以上低い濃度で BLT2 に結合すること、細胞内シグナル伝達においてもロイコトリエン B4 よりも強力に BLT2 を活性化すること、生体内に μM の濃度で存在することから、BLT2 の内在性リガンドであることを明らかにした⁶ (図3)。さらに BLT1, BLT2 やそのリガンド LTB4 等の機能についていくつかの新たな現象を発見した⁹⁻¹³。

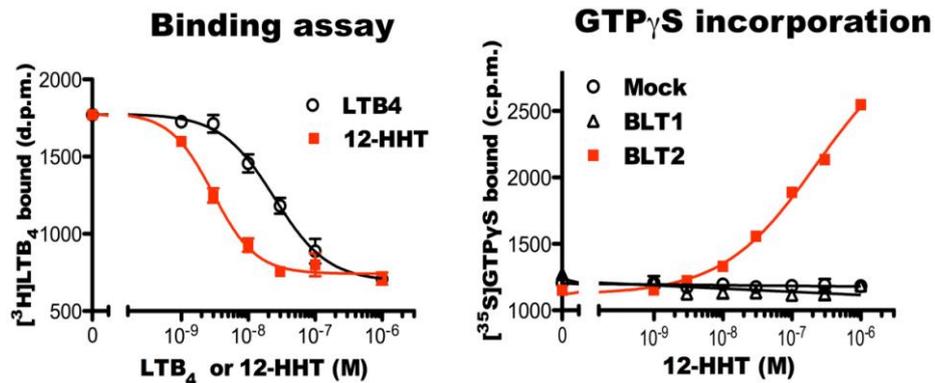


図 3. 12-HHT は BLT2 の内因性リガンドである (Okuno, *J. Exp. Med.* 2008)⁶

(左)BLT2 過剰発現 CHO 細胞の膜画分を用いたリガンド結合実験 (右)BLT1, 2 過剰発現細胞の膜画分での GTP γ S 取り込み実験。いずれにおいても 12-HHT が BLT2 のリガンドであることがわかる。

久下グループは、昨年度同定した PLD3/IGP1 に加え、リン脂質の代謝・細胞内輸送に関与する新たな興味ある遺伝子 8 個 (IGP2-9) を同定することに成功した。IGP2-4 は、その欠損変異株の解析からカルジオオリピン (CL) 合成あるいは CL の前駆体リン脂質であるホスファチジン酸の細胞内輸送に関与することを明らかとした。IGP5-7 は、その欠損変異株の解析から、これらもカルジオオリピン (CL) 合成あるいは PA の細胞内輸送に関与することを明らかとした。IGP8 と 9 は、その変異株の解析から、ホスファチジルエタノールアミン (PE) の生合成、あるいはその前駆体リン脂質であるホスファチジルセリン (PS) の細胞内輸送に関与することを明らかとした¹⁴。

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。また、分泌性ホスホリパーゼ A₂ の KO マウスやトランスジェニックマウスを用いた脂質メタボローム解析を行い、生活習慣病に関わる肥満、血漿リポタンパク質代謝異常、動脈硬化、脂肪細胞の分化における本酵素の役割について新しい知見を得た^{15,16}。

横山グループは、マウス腹腔マクロファージで lipid droplet を形成し泡沫化する動脈硬化モデルを用いて、脂肪滴形成と脂質代謝について検討した結果、泡沫化にはリン脂質を構成する脂肪酸のアシル鎖選択性があることがわかった¹⁷。また、極長鎖脂肪酸蓄積症 (ペルオキシソーム病) に関する解析では、患者由来サンプルのメタボローム解析を行い、これまで定説であった C26:0 の脂肪酸以外にも、特にホスファチジルコリンに多種のより極長鎖の脂肪酸が含まれていることを明らかとした。

福崎グループは脂質クラスによる主成分分析の分類の他、側鎖脂肪酸の組成によっても分類を行えるより使いやすいソフトウェアへの改良を試みた。読み込んだ脂質データから存在する側鎖の情報を全て読み込んだ上で、全ての側鎖の鎖長を選択、フィルタリングできるように改良を加えたが、読み込んだ側鎖の情報が重複してしまうことで、フィルタリングを反映させるためには読み込んだ脂質データを再び整理して計算し直す必要性が生じたため、現在も改良を継続して行っている。また、メタボロミクスにおける手法として、超臨海流体分離と質量分析を組み合わせる方法¹⁸、キャピラリー電気泳動と質量分析を組み合わせる方法を開発した¹⁹。

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
- ・脂質メタボロームの病態、生理的現象解明への適用
- ・スフィンゴ脂質とその関連代謝物に関するデータベース構築
- ・スフィンゴ脂質の代謝制御と機能の解明

(2)「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

- ・エイコサノイドー斉定量系の構築と応用
- ・ロイコトリエン B4 受容体(BLT1)欠損マウスの作成と表現型の解析
- ・ロイコトリエン B4 受容体(BLT2)の内因性リガンドの同定
- ・ロイコトリエン B4 受容体(BLT1)の G 蛋白質結合部位の同定

(3)「久下」グループ

①研究分担グループ長： 久下 理(九州大学大学院、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

(4)小林グループ

①研究分担グループ長： 小林 哲幸(お茶の水女子大学大学院、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

(5)「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

- ・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

(6)「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

(7)「高橋」グループ

①研究分担グループ長：高橋 勝利((独)産業技術総合研究所、主任研究員)

②研究項目

- ・オンライン LC-FTMS システムの開発
- ・オフライン LC-FTMS システムの開発

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. 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
2. Ogiso H, Taguchi R. Reverse-Phase LC/MS Method for Polyphosphoinositide Analyses: Changes in Molecular Species Levels during Epidermal Growth Factor-Activation in A431 Cells. *Anal. Chem.* 2008, in press
3. Nakanishi H, Iida Y, Shimizu T, Taguchi R. Analysis of oxidized phosphatidylcholines as markers for oxidative stress, using multiple reaction monitoring with theoretically expanded data sets with reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. B*, 2008, in press
4. Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka GI, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M. Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveals potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2008 Sep 18. [Epub ahead of print]
5. 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
6. 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.* **205**(4):759-66. 2008

花田グループ

7. Norio Kudo, Keigo Kumagai, Nario Tomishige, Toshiyuki Yamaji, Soichi Wakatsuki, Masahiro Nishijima, Kentaro Hanada, and Ryuichi Kato: Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 488-493, 2008
8. Satoko Saito, Hiroyuki Matsui, Miyuki Kawano, Keigo Kumagai, Nario Tomishige,

Kentaro Hanada, Seishi Echigo, Shinri Tamura, and Takayasu Kobayashi: Protein phosphatase 2C ϵ is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J. Biol. Chem.* 283, 6584-6593, 2008

横溝グループ

9. 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
10. Ito S, Ito Y, Katagiri H, Suzuki T, Hoka S, Yokomizo T, Shimizu T, Majima M. Leukotriene B4/Leukotriene B4 receptor pathway is involved in hepatic microcirculatory dysfunction elicited by endotoxin. *Shock* 30, 87-91, 2008
11. Kuramoto M, Sakata Y, Terai K, Kawasaki I, Kunitomo J, Ohishi T, Yokomizo T, Takeda S, Tanaka S, Ohishi Y. Preparation of leukotriene B(4) inhibitory active 2- and 3-(2-aminothiazol-4-yl)benzo[b]furan derivatives and their growth inhibitory activity on human pancreatic cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* 6, 2772-2781, 2008
12. Hennig R, Osman T, Esposito I, Giese N, Rao SM, Ding XZ, Tong WG, Büchler MW, Yokomizo T, Friess H, Adrian TE. BLT2 is expressed in PanINs, IPMNs, pancreatic cancer and stimulates tumour cell proliferation. *Br. J. Cancer* 99, 1064-1073, 2008
13. Yasuda D, Okuno T, Yokomizo T, Hori T, Hirota N, Hashidate T, Miyano M, Shimizu T, Nakamura M. Helix 8 of leukotriene B₄ type-2 receptor is required for the folding to pass the quality control in the endoplasmic reticulum. *Faseb J*, In press

久下グループ

14. Shiho Tomohiro, Ayako Kawaguti, Yukiyo Kawabe, Sakae Kitada, Osamu Kuge
Purification and characterization of human phosphatidylserine synthases 1 and 2
Biochem. J. in press

小林グループ

15. Hiroyasu Sato, Rina Kato, Yuki Isogai, Go-ichi Saka, Mitsuhiro Ohtsuki, Yoshitaka Taketomi², Kei Yamamoto, Kae Tsutsumi, Joe Yamada, Seiko Masuda, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Tetsuyuki Kobayashi, Kazutaka Ikeda, Ryo Taguchi, Shinji Hatakeyama, Shuntaro Hara, Ichiro Kudo, Hiroyuki Itabe, and Makoto Murakami (2008) Analyses of Group III Secreted Phospholipase A2 Transgenic Mice Reveals Potential Participation of This Enzyme in Plasma Lipoprotein Modification, Macrophage Foam Cell Formation, and Atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, 283 (48): 33483-33497
16. Hiroyasu Sato, Yoshitaka Taketomi, Yuki Isogai, Seiko Masuda, Tetsuyuki Kobayashi, Kei Yamamoto, and Makoto Murakami (2009) Group III Secreted Phospholipase A2 Transgenic Mice Spontaneously Develop Inflammation, *Biochem. J.* in press

横山グループ

17. 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, 3, 369-375. (2008)

福崎グループ

18. Bamba, T., Shimonishi, N., Matsubara, A., Hirata, K., Nakazawa, Y., Kobayashi, A. and Fukusaki, E. "High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics." J Biosci Bioeng 105(5): 460-469.(2008)
19. Harada, K., Ohyama, Y., Tabushi, T., Kobayashi, A. and Fukusaki, E. "Quantitative analysis of anionic metabolites for Catharanthus roseus by capillary electrophoresis using sulfonated capillary coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry." J Biosci Bioeng 105(3): 249-260.(2008)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)