

「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・特任教授

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、トリグリセリドの網羅的解析法を確立し、トリグリセリドの酸化物を初めて包括的に同定した。また、リン脂質の *sn*-1 位と *sn*-2 位が逆になった構造異性体の分離法を確立し、これら構造異性体がフラグメントの特異性からも区別できる事を示した。昨年までにすでに確立した手法の適用により酸化脂肪酸や酸化リン脂質が種々の病態においても実際に検出でき、病態原因の解明に有効であることを示した。

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解析をマウス脳の各部位の解析に適用し、主要な分子種の分布が imaging MS による直接的な局在解析と良く一致していることが確認できた。さらに、プラズマローゲン等、Imaging では解析の難しいサンプル取得についても非常に有効であることが確認できた。脳の各部位では主要脂質分子種の局在が大きく異なっていることが判った。

また、各グループについてもそれぞれ研究成果を得ている。

研究進展状況:確立した質量分析解析手法を種々の病態サンプル等の解析に適用することにより、急性、慢性炎症共に脂質酸化の大きな変化が観察された。今後さらに、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、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や脂質代謝遺伝子異常モデルについて、局所的かつ包括的解析や多変量解析を組み合わせる脂質メタボローム解析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、特任教授)、花田 賢太郎 (国立感染症研究所、部長)
- ② 研究項目
 - (ア) 脂質メタボロームのための基盤技術の構築
 - (イ) 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 (九州大学大学院、教授)
- ② 研究項目
 - ・エイコサノイド一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
 - (1) 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
 - (2) 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、教授)
- ② 研究項目

- ・グリセロ脂質のデータベース
- ・動脈硬化モデルにおける脂質代謝の解析
- ・極長鎖脂肪酸蓄積症(ペルオキシソーム病)に関する解析
- ・マウス赤血球における血小板活性化因子とその分解酵素に関する解析

(6)「福崎」グループ

- ① 研究分担グループ長:福崎 英一郎(大阪大学大学院、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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

田口グループ

1. 研究目的

メタボローム解析をはじめとする、多量の解析データが得られる、いわゆる網羅的、包括的解析手法における共通する特徴は、得られたデータから種々の相関やクラスター情報等をそれをシステム全体の理解にどのように活用して行くかにある。従来型のトップダウンによるシミュレーションとの最も大きな違いは、莫大な解析データを処理する過程で、新たな因子の発見や相互関係の発見を可能にするかという点である。

2. 本クレスト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(文献1)。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、群馬大、和泉等との共同研究ではタンパク質のパルミトイル化に関与するアシル化酵素の機能を明らかにした(文献7)。

さらに、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測定法を昨年確立し、ヒト血漿中のリゾホスファチジン酸の定量を可能にした。また新たに開発したポリホスホイノシタイドの高感度測定手法により、核内の PI や PIPs の分子種の *sn*-2位に飽和やモノ不飽和脂肪酸を持つ分子種が多く含まれ、細胞質におけるアラキドン酸を多く含む分子種と大きく異なることを明らかにした(文献16)。さらに、トリグリセリドの網羅的解析法を確立し、トリグリセリドの酸化物を初めて包括的に同定した(文献9)。また、リン脂質の *sn*-1位と *sn*-2位が逆になった構造異性体の分離法を確立し、これら構造異性体がフラグメントの特異性からも区別できる事を示した(文献14)。

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(文献 2,3,12)。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分析対象として測定する。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 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。このように、メタボロミクス解析において、組織や細胞における局在違いが大きな生理的意味を持つことが判ってきた。この点に関して、質量顕微鏡(文献6)やレーザーマイクロダイセクションとMSを組み合わせたメタボロミクスが有効な手法である。

リポミクスにおいて目的別の異なった解析手法を確立し、その特徴と使い分けについて詳しく検討した。1)対象を絞らない網羅的、包括的解析手法。2)特定の分子群にフォーカスした手法。3)特定の分子量関連イオンとそれに特異的なフラグメントを組み合わせた MRM(multiple reaction monitoring)と呼ばれる手法とそれを理論的想定した分子種に拡張して用いる手法。の3種類である。

それぞれの手法によって得られたデータからの代謝物の同定法として Lipid Search という検索エンジンを開発し、今年度は生体サンプルの定性、定量解析に十分実用可能なレベルにまで改良した。また、LCMS 測定の場合については同定前の生データから直接プロファイリングする手法として MS++の活用を試みた。さらに Lipid Search で同定したデータを主成分分析により解析する場合に Simuca-P+という多変量解析ソフトを使用し、従来の未同定代謝物の解析とは遙かに異なる、代謝分子の部分構造に由来するクラスタリングが出来ることを確認した(図1, 2)。

肥満や種々の生活習慣病に脂質代謝異常が深く関係していることから、我々はこれらの病態を呈する特定の遺伝子異常モデルマウスを用いて、リン脂質、中性脂質やその酸化物のプロファイル変化を解析し、これらのリン脂質と中性脂質の存在比の変化や構成分子種の変化が深く関係していることを見いだした。また、各種生活習慣病の進行をモニタリングする際に、リン脂質や中性脂質の酸化状態の解析がよい指標となることを確認した。

PCA scores plots of the peak intensity after normalization** to *PC, PE, PS and PI* obtained by LC-MS/MS analysis of the 14 organs (■ each color) from male mouse.

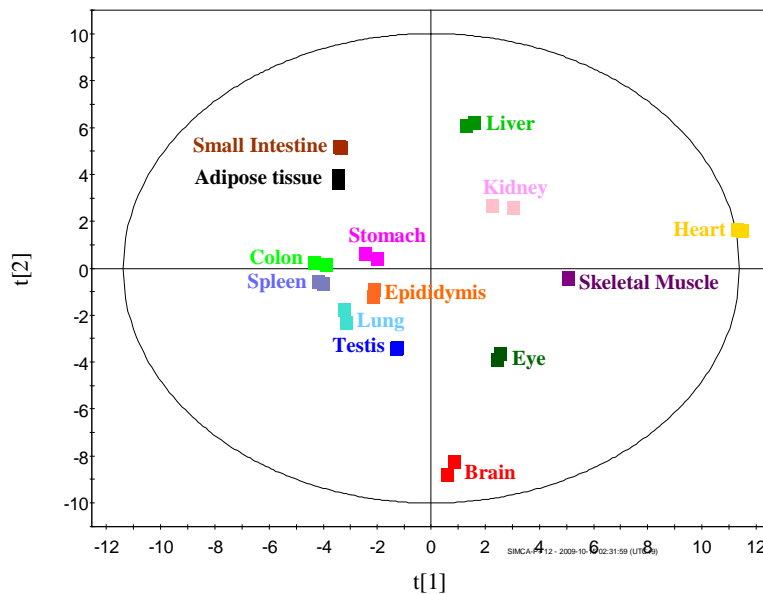


図1. マウス14臓器のLCMS/MSにより分析後、Lipid Searchで同定・定量したデータをSimca P+により主成分分析したスクエアープロット。類似した脂質分子種を持つ分子種が近い位置にクラスタリングしている。

PCA loadings plots of the peak intensity after normalization** to *PC, PE, PS and PI* obtained by LC-MS/MS analysis of the 14 organs from male mouse.

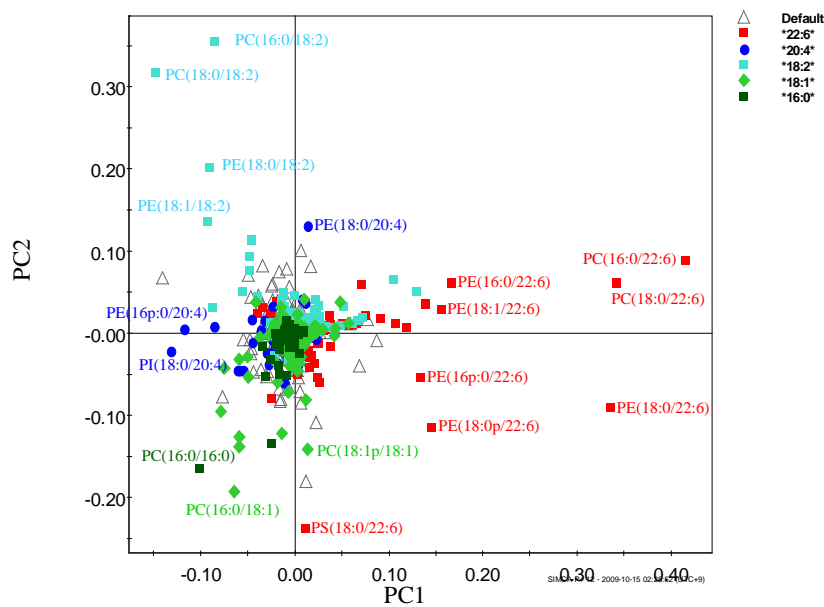


図2. マウス14臓器のLCMS/MSにより分析後、Lipid Searchで同定・定量したデータをSimca P+により主成分分析したローディングプロット。臓器の分離に最も関与が強い脂質分子種がPC1の、次に関与の強い分子種がPC2の両端に位置している。

さらに、炎症性疾患の解析においては、従来から報告されているアラキドン酸の代謝物ばかりでなく、EPA や DHA の酸化物が炎症の緩解(resolution)に深く関与していることを明らかにした。(文献 15)。

さきがけの村上グループとの共同研究では、酸化 LDL 取り込みにおけるパルミチン酸の機能を明らかにし(文献 13)、また、ホスホリパーゼ A₂ の基質特異性や機能、そして病態との関わりについて種々のデータが得られた(文献 32, 小林グループ)。

また、京都大学山崎等との共同研究では肺の成熟過程における脂質とチャンネル膜の機能の関連を明らかにした(文献 8)。

さらに糖脂質であるガングリオシドやスルファチドは膜リセプターを介する種々の生理的応答を制御する機能に関与することが判ってきた。これらは、脳の各部位、また細胞ドメインのラフト等に於いても、分子種ごとに局在が異なることが判ってきた。ガン細胞の増殖能、ウイルスの感染、増殖など、種々の生理的現象に深く関わっていることが予想されている。(文献:池田、未発表)。九大伊藤らとの共同研究では新たなガングリオシドの構造を同定した(文献 11)。

リゾホスファチジン酸(LPA)や PIPS は細胞における重要な生理活性脂質として知られている。また酸性リゾリン脂質 lysoPS, lysoPT 等(文献 4, 10)についても新たな機能があきらかになった。PIPs は生体膜を介する情報伝達や細胞内相互作用において、非常に重要な機能を担っている。しかし、これらの酸性リン脂質とそのリゾ体、ポリホスホイノシタイドの解析は、その物性故に LCMS での解析が非常に困難であった。我々は最近、これらの酸性リン脂質についての高感度な解析法を確立した。(文献 5)。

これらの解析手法をレーザーマイクロダイセクションと組み合わせて、局所における各種個別脂質分子種の局在とその変化を、その生理的機能と関連して解析することは非常に重要な課題になってきている。(中西、池田、投稿準備中)。

花田グループ

CHO 細胞由来の変異株 LY-B は、スフィンゴ脂質の初発段階を担うセリンパルミトイル転移酵素(SPT)活性が欠失している。LY-B 細胞では SPT の LCB1 サブユニット内にミスセンス変異が起り 246 番目のアミノ酸がグリシンからアルギニンへと変化しており、この変異によって LCB1 が不安定となって速やかに分解されることを明らかにした(文献 17)。また、セラミド輸送タンパク質(CERT)の脂質転移ドメインと CERT の阻害剤との共結晶を解析し、当該阻害剤がどのように CERT に結合しているのかを明らかにした(文献 18)。一方で、CERT により脂質膜からセラミドが引き抜かれていく過程をリアルタイムで測定する方法を表面プラズモン共鳴法を利用して開発した(文献 19)。

横溝グループ

新規生理活性脂質の発見: 孤児受容体に対する新規脂質リガンドの探索を行う過程で、GPR109B と呼ばれる孤児受容体が、芳香環を有する D 型のアミノ酸によって活性化されることを見

いだした(文献 21)。さらに、共役する G タンパク質の種類によらず受容体の活性化をモニターできる実験系を構築し、今後の孤儿受容体のリガンド探索を効率的に行うことを可能にした。プロトン感受性 GPCR である G2A の転写機構を解明した(文献 22)。高親和性ロイコトリエン B4 受容体 BLT1 欠損マウスの解析において、いくつか興味深い知見が得られた。BLT1 欠損マウスではエストロゲン除去(卵巣摘除)後の骨吸収が減弱しており、骨粗鬆症になりにくいマウスであることがわかった。この機序として、BLT1 が破骨細胞に発現し、骨吸収に促進的に働いていることを明らかにした(文献 23)。また、BLT1 が抗原提示細胞である樹状細胞に発現し、樹状細胞の遊走に促進的に働くこと、LTB4 刺激によって樹状細胞が IL-12 を産生し T 細胞を活性化すること、結果的に BLT1 欠損マウスでは Th1 型の免疫反応が減弱することを明らかにした(文献 24)。さらに、脊椎損傷後の好中球浸潤に BLT1 が関わっていること(文献 25)、また実験的自己免疫性脳髄膜炎(EAE)モデルにおいて、BLT1 が発症の初期段階に関わることを明らかにした(文献 26)。一方、BLT1 の結晶構造解析に向けた試みとして、酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現系を構築し、精製と活性測定を行った(文献 27)。また、12-HHT をリガンドとする BLT2 受容体の細胞膜への輸送に細胞内 C 末端のヘリックス 8 が関わることを明らかにした(文献 20)

久下グループ

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、リン脂質の代謝・細胞内輸送に関与する新たな遺伝子の同定を試みている。本年度は、これまでに同定したリン脂質関連遺伝子 PMT (Phospholipid Metabolism or Transport) 1~9 のうち、PMT2 と PMT9 解析を重点的に行った。

PMT2 が欠損した酵母では、酸性リン脂質の一つであるカルジオリピン(CL)の生合成が著しく低下し、野生株にはほとんど検出されないリン脂質 X が蓄積することが判明した。さらに、このリン脂質 X が CL の前駆体であるホスファチジルグリセロールリン酸(PGP)であることを明らかにした。酵母における CL は、CDP-ジアシルグリセロール → PGP → ホスファチジルグリセロール(PG) → CL という代謝経路で生合成されるが、これまでに PGP を PG とリン酸(Pi)に加水分解するホスファターゼは未同定であり、また PMT2 がその塩基配列からホスファターゼをコードする可能性が示唆された。従って、今回得られた結果から、PMT2 が PGP ホスファターゼをコードすることが強く示唆された。

PMT9 が欠損した酵母では、ホスファチジルエタノールアミン(PE)の含量が著しく低下することが判明した。細胞内の PE の多くは、ミトコンドリア内膜に局在するホスファチジルセリン(PS)脱炭酸酵素1により生合成される。一方、PE の前駆体である PS は小胞体で生合成される。従って、PE が正常に生合成されるためには、PS の小胞体からミトコンドリア内膜への輸送が必要である。PMT9 欠損変異株では、PS の生合成と *in vitro* で測定した PS 脱炭酸酵素活性は正常なことから、この変異株における PE 合成の低下は、PS のミトコンドリア内膜への輸送の損傷に起因することが考えられた。現在、PS のミトコンドリア内膜への輸送機構は不明であり、PMT9 の同定は際だった研究成果と考えられる(文献 29)。

PS のミトコンドリア内膜への輸送に重要と思われる、ミトコンドリア外膜と内膜の動的相互作用に
関与する新しいタンパク質を哺乳動物細胞において同定した(文献 31)。

スフィンゴミエリン合成酵素のC末のパルミトイル化が細胞膜への局在に関与していることを明らか
にした(文献 28)。

小林グループ

さきがけの村上グループとの共同研究により、リポドミクスの研究対象として分泌性ホスホリパー
ゼ A₂ (sPLA₂) のアイソザイムの一つである sPLA₂-III を全身に過剰発現させた過剰発現トランスジェ
ニックマウス(III-Tg)、および遺伝子ノックアウトマウス(III-KO)を用い、sPLA₂-III が生活習慣病の
進展と深く関わっていることを見出した。すなわち、III-Tg マウスに高脂肪食を与えると、野生型マ
ウスと比べて肥満が増悪し、臓脂肪組織での脂肪細胞の肥大化、間質へのマクロファージの浸潤
の増加、さらに炎症性サイトカインの発現増加が認められた(文献 30)。血中では血糖値やインスリ
ン、総コレステロール、レプチンの他、sPLA₂ の代謝産物であるリゾホスファチジルコリン(LPC)濃度
が増加していた。また、III-Tg マウスの脂肪組織においても LPC 量の増加が見られた。LPC は一般
に、生活習慣病の増悪因子として知られており、過剰発現した sPLA₂-III による LPC の増加が肥満
促進の一因となっているものと推察される。一方、III-KO マウスでは逆に、LPC をはじめこれら因子
の濃度は低下し、体重や内臓脂肪の低下が見られた。

また、質量分析を用いたリポドミクスにより、出血性ショックモデルラットの腸間膜リンパ液中では、
出血性ショック依存的に不飽和脂肪酸含有リゾリン脂質が増加することを明らかにすることができた。
さらに、不飽和結合含有リゾリン脂質は、炎症の引き金となる好中球のプライミング活性等を上昇さ
せることが明らかになり、炎症性メディエーターとしての役割が示された。

さらに、さきがけの村上グループとの共同研究により、III型分泌性ホスホリパーゼ A₂ が精子の成
熟を制御することを、遺伝子改変マウスのメタボローム解析から明らかにした(文献 32)。

横山グループ

——グリセロ脂質とスフィンゴ糖脂質のデータベース

従来の糖脂質の分類は酸性糖脂質と中性糖脂質を分類し、さらに酸性と中性のそれぞれの糖
脂質を糖鎖構造により主要8系統に大別することが通例であった。本年度は酸性糖脂質が中性糖
脂質へのシアル酸や硫酸の付加により生合成されることに着目し、代謝経路に基づいて酸性と中
性の糖脂質の両者を統一した形の系統分類を行うことを、日本脂質生化学会のデータベース
構築委員会で示した。現在この代謝経路に基づいた統一的な新たな分類コード作成を進めてい
る。

——極長鎖脂肪酸蓄積症(ペルオキシソーム病)に関する解析

極長鎖脂肪酸とは通常おおむね炭素数22-24以上の脂肪酸を指し、その分解系はペルオキシ
ソームに存在して、機能不全となると副腎白質ジストロフィー(ALD)やZellweger症候群という遺伝病
を起こすことが知られている。とくにALDでは発症は幼年期や青年期に脳の脱髄が起こるため、事

前診断法の確立が重要である。本年度はこれら疾患サンプルのメタボローム解析に着手した。極長鎖脂肪酸はこれまで定説であったスフィンゴミエリンにも含まれていたが、患者サンプルではむしろホスファチジルコリン(PC)に多く含まれている傾向が示された。これまでに注目されて来た飽和脂肪酸に加え、極長鎖の高度不飽和脂肪酸も多種が検出された。極長鎖脂肪酸含有PCの分子構造を決定すると、極長鎖脂肪酸はグリセロール1位に結合している例が多いことがわかった。今後症状の程度との相関や発症前後のマーカーとなりうるかなどについても検討する必要がある。

——動脈硬化モデルにおける脂質代謝の解析

マウス腹腔マクロファージにコレステロール(CH)+PC+ホスファチジルセリン(PS)をからなるリポソームを与えると、コレステリルエステル(コレステロールのエステル化体)を主体としたlipid dropletを形成し泡沫化する。この系は生体内での血管壁における動脈硬化発症の初期の脂質代謝のモデルである。本年度は、泡沫化に対するリポソーム構成リン脂質のアシル鎖選択性に関わる遺伝子の探索を目的として、DNAマイクロアレイ解析と、リアルタイムPCR解析を行った。その結果、脂肪酸の輸送に関わるとされるFABP4 (fatty acid binding protein 4)およびFABP5、PATファミリーの1種で脂肪滴タンパク質であるADRP(adipocyte differentiation-related protein)、小胞体においてTGを生成するDGAT2(diacylglycerol O-acyltransferase 2)の発現量が増加していた。今後このアシル鎖選択性の機構、病態形成における意義についてさらに検討していく。

福崎グループ

lipid search から得られるデータを用いた多変量解析システムの開発を行っており、今年度はさらにポラーヘッドや側鎖の情報によるフィルタリング機能の充実を試みた。従来のシステムはポラーヘッドの種類、側鎖の鎖長や不飽和度に対して色分けおよびフィルタリング機能を実装していたが、ポラーヘッドの種類によるフィルタリングに留まっており、側鎖の鎖長によるフィルタリングは実装されていなかった。そこで、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な機能を実装した。また、従来のシステムではポラーヘッド、側鎖脂肪酸すべてのデータを用いて主成分分析を行っているため、サンプルのクラスタリングがそのサンプルで大量に検出される脂質によって行われる。したがって、本来重要だと考えられる微小な変化のデータマイニングができない。そこで、lipid search から得られる全データの中からポラーヘッドの種類、脂肪酸側鎖の種類ごとにデータを取り出し、そのデータを用いて主成分分析を行うことによって微小な変化のデータマイニングを可能にするような機能の付加を現在試みている。(文献 33)

また、本年度はガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)による脂質の酸化分解生成物であるアルデヒド体の分析を試みた。まず、標準品を用いて、注入口温度、カラム、昇温条件をはじめとした種々の分析条件を検討し、GC/MSにおける分析条件の最適化を行った。その結果、4-oxo-2-nonenal(4-ONE)においては、scanモードにおいて0.25 pmol(S/N=23.4)で検出することに成功した。さらに、超臨界流体クロマトグラフィー質量分析による脂質プロファイリングの新技术を開発し、次年度における応用を考える。(文献 34) 引き続き他の脂質酸化分解生成物の標準

品を用いて GC/MS 分析系の構築を試みるとともに、実際にインビトロ反応物、生体試料における分析を実施する予定である。

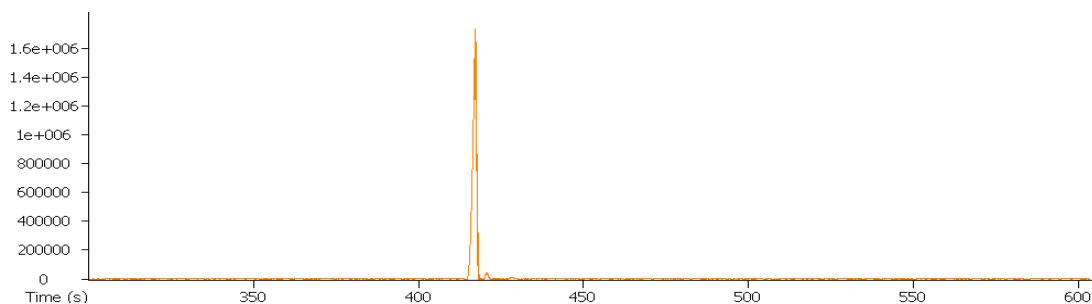


図 GC/MS 分析における 4-ONE のトータルイオンクロマトグラム

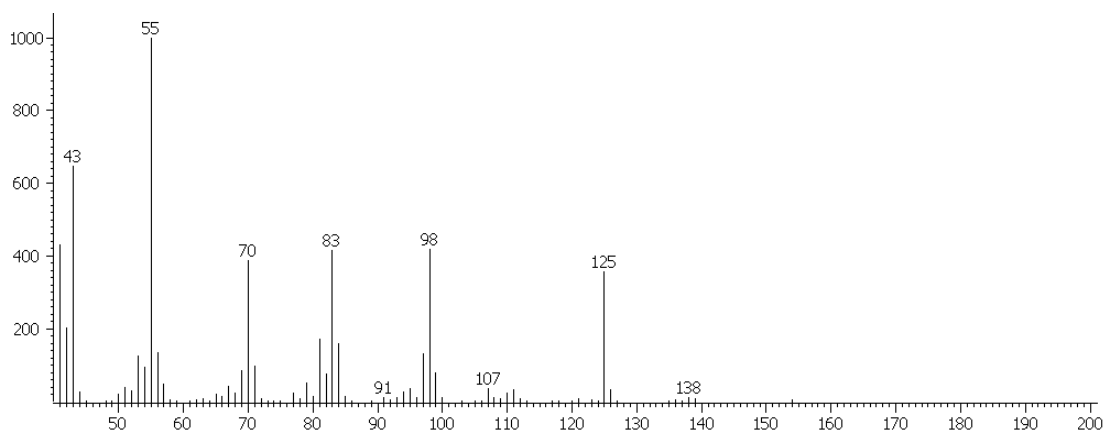


図 GC/MS 分析における 4-ONE のマススペクトル

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

田口グループ

1. Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S.,
p2y5/LPA6. *J Biol Chem.* 284(26):17731-41 (2009). Doi: 10.1074/jbc.M808506200
2. Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki

- T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K.: Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J Clin Invest.*, 119: 1477-1488 (2009). Doi:10.1172/JC137413.
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 Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877: 1366-1374 (2009).
Doi:10.1016/j.chromb.2008.09.041
 4. Endo T, Kano K, Motoki R, Hama K, Okudaira S, Ishida M, Ogiso H, Tanaka M, Matsuki N, Taguchi R, Kanai M, Shibasaki M, Arai H, Aoki J., Lysophosphatidylmethanol is a pan lysophosphatidic acid receptor agonist and is produced by autotaxin in blood. *J Biochem.* 146(2):283-93 (2009). Doi: 10.1093/lb/mvp068
 5. Ogiso H, Taguchi R.: Reversed-phase LC/MS method for polyphosphoinositide analyses: changes in molecular species levels during epidermal growth factor activation in A431 cells. *Anal Chem.*, 80: 9226-9232 (2009). Doi: 10.1021/ac801451p
 6. Sugiura Y, Konishi Y, Zaima N, Kajihara S, Nakanishi H, Taguchi R, Setou M.: Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *J Lipid Res.* 50(9):1776-88 (2009). Doi: 10.1194/jlr.M900047-JLR200
 7. Hirano T, Kishi M, Sugimoto H, Taguchi R, Obinata H, Ohshima N, Tatei K, Izumi T. 1/lysophospholipase 1. *Biochim Biophys Acta.* 791(8):797-805 (2009).
Doi:10.1016/j.bbalip.2009.05.001
 8. Yamazaki D, Komazaki S, Nakanishi H, Mishima A, Nishi M, Yazawa M, Yamazaki T, Taguchi R, Takeshima H. Essential role of the TRIC-B channel in Ca²⁺ handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development.* ;136(14):2355-61.(2009) Doi: 10.1242/dev.036798
 9. Ikeda K, Oike Y, Shimizu T, Taguchi R. Global analysis of triacylglycerols including oxidized molecular species by reverse-phase high resolution LC/ESI-QTOF MS/MS. *J*

Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 877(25):2639-47(2009).

Doi:10.1016/j.chromb.2009.03.047

10. Iwashita M, Makide K, Nonomura T, Misumi Y, Otani Y, Ishida M, Taguchi R, Tsujimoto M, Aoki J, Arai H, Ohwada T.
inducers of mast cell degranulation. Potent activities of lysophosphatidylthreonine and its 2-deoxy derivative. *J Med Chem.* 52(19):5837-63 (2009). Doi:10.1021/jm900598m
11. Chisada S, Yoshimura Y, Sakaguchi K, Uemura S, Go S, Ikeda K, Uchima H, Matsunaga N, Ogura K, Tai T, Okino N, Taguchi R, Inokuchi J, Ito M. Zebrafish and mouse alpha2,3-sialyltransferases responsible for synthesizing GM4 ganglioside. *J Biol Chem.* 284(44):30534-46 (2009). Doi: 10.1074/jbc.M109.016188
12. Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsuhashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchitti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. *Circ Res.*, 105(11):1118-27 (2009). Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206607
13. Ishiyama J, Taguchi R, Yamamoto A, Murakami M. Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells. *Atherosclerosis.* 209(1):118-24 (2010).
Doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.004
14. Nakanishi H, Iida Y, Shimizu T, Taguchi R.: Separation and quantification of *sn-1* and *sn-2* fatty acid positional isomers in phosphatidylcholine by RPLC-ESIMS/MS. *J. Biochem.*, 147(2):245-56 (2010). Doi: 10.1093/jb/mvp171.
15. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD.
Mediator Resolvin E1 Protects Mice from Bacterial Pneumonia and Acute Lung Injury. *J Immunol.*, 184 (2):836-43 (2010). Doi:10.4049/jimmunol.0901809
16. Ogiso H, Nakamura K, Yatomi Y, Shimizu T, Taguchi R., Liquid chromatography/mass spectrometry analysis revealing preferential occurrence of non-arachidonate-containing phosphatidylinositol bisphosphate species in nuclei and changes in their levels during cell

cycle., Ogiso H, Nakamura K, Yatomi Y, Shimizu T, Taguchi R., *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 24(4):436-42 (2010). Doi: 10.1002/rcm.4415

花田グループ

17. Momin, A. A., Park, H., Allegood, J. C., Leipelt, M., Kelly, S. L., Merrill, A. H. Jr., and Hanada, K.: Characterization of mutant serine palmitoyltransferase 1 in LY-B cells. *Lipids*, 44, 725-732, 2009. DOI 10.1007/s11745-009-3316-4
18. Kudo, N., Kumagai, K., Matsubara, R., Kobayashi, S., Hanada, K., Wakatsuki, S., Kato, R.: Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer. *J. Mol. Biol.*, 396, 245-251, 2010. DOI 10.1016/j.jmb.2009.12.029
19. Sugiki, T., Takahashi, H., Nagasu, M., Hanada, K., and Shimada, I.: Real-time assay method of lipid extraction activity. *Anal. Biochem.*, 399, 162-167, 2010. DOI 10.1016/j.ab.2009.12.031

横溝グループ

20. 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* 23, 1470-1481, 2009 (DOI:10.1096/fj.08-125385)
21. Irukayama-Tomobe Y, Tanaka H, Yokomizo T, Hashidate-Yoshida T, Yanagisawa M, Sakurai T. Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor, GPR109B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3930-3934, 2009 (DOI:10.1073/pnas.0811844106)
22. Murakami N., Hashidate T., Yokomizo T., Shimizu T., and Nakamura M. Transcriptional regulation of human G2A in monocytes/macrophages : involvement of c/EBPs, Runx and Pu.1. *Genes Cells* 14, 1441-1455, 2009 (DOI:10.1111/j.1365-2443.2009.01360.x)
23. Hikiji S., Ishii S., Yokomizo T., Takato T., and Shimizu T. A distinctive role of the leukotriene B₄ receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 106, p21294-21299, 2009 (DOI:10.1073/pnas.0905209106)

24. Toda A, Terawaki K, Yamazaki S, Saeki K, Shimizu T, Yokomizo T. Attenuated Th1 induction by dendritic cells from mice deficient in the leukotriene B4 receptor 1. *Biochimie*, in press.
25. Saiwai H, Ohkawa Y, Yamada H, Kumamaru H, Harada A, Okano H, Yokomizo T., Iwamoto Y, Okada S. The LTB4-BLT1 axis mediates neutrophil infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. *Am. J. Pathology*, in press.
26. Kihara Y, Yokomizo T., Kunita A, Morishita Y, Fukayama M, Ishii S, Shimizu T. The leukotriene B4 receptor, BLT1, is required for the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
27. Hori T, Sato Y, Takahashi N, Takio, Yokomizo T, Nakamura M, Shimizu T, Miyano M. Expression and characterization of leukotriene B(4) receptor, BLT1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*, in press.

久下グループ

28. Tani M, Kuge O.: Sphingomyelin synthase 2 is palmitoylated at the COOH-terminal tail, which is involved in its localization in plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 328-332 (2009) DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.02.063
29. Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, Hubstenberger A, Gay O, Merle N, Assard N, Fauvarque MO, Tomohiro S, Kuge O, Baudier J.: The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membrane. *Mol. Cell Biol.* in press. DOI:10.1128/MCB.00007-10

小林グループ

30. 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.* 421 (1): 17-27.
Doi: 10.1042/BJ20082429
31. Masako FUKUSHIMA, Emiko TAKEYAMA, Seigo SHIGA, Masao TAKEUCHI and Tetsuyuki KOBAYASHI (2010) Dietary intake of green nut oil decreases levels of oxidative stress biomarkers. *J. Lipid Nutr.*, 19 (1): 111-119, Doi: 10.4010/JLN.19.111

32. Hiroyasu Sato, Yoshitaka Taketomi, Yuki Isogai, Yoshimi Miki, Kei Yamamoto, Tomohiko Hosono, Satoru Arata, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Tetsuyuki Kobayashi, Hiroki Nakanishi⁶, Kazutaka Ikeda, Ryo Taguchi, Shuntaro Hara, Ichiro Kudo, and Makoto Murakami (2010) Group III Secreted Phospholipase A₂ Regulates Epididymal Sperm Maturation and Fertility. *J. Clin. Invest.*, in press.

福崎グループ

33. Yamamoto, H., Yamaji, H., Abe, Y., Harada, K., Waluyo, D., Fukusaki, E., Kondo, A., Ohno, H. and Fukuda, H. "Dimensionality reduction for metabolome data using PCA, PLS, OPLS, and RFDA with differential penalties to latent variables." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **98**. 136-142 (2009) [DOI: 10.1016/j.chemolab.2009.05.006]
34. Matsubara, A., Bamba, T., Ishida, H., Fukusaki, E. and Hirata, K. "Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry." *J Sep Sci* **32**(9): 1459-1464.(2009) [DOI: 10.1002/jssc.200800699]