

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22116004

研究課題名（和文）モデル生物を用いた生理活性リゾリン脂質機能の包括的研究

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of lysophospholipids using model animals

研究代表者

青木 淳賢（Aoki, Junken）

東北大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号：20250219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 98,300,000 円

研究成果の概要（和文）：近年リゾリン脂質に特異的に応答するGPCRが存在することがわかってきた。これらのGPCRは脂質メディエータリゾホスファチジン酸（LPA）やスフィンゴシン1リン酸（S1P）に対する受容体として機能する。また、これらリゾリン脂質を産生する特異的酵素も明らかとなった。興味深いことに、これらのGPCR、産生酵素は脊椎動物で高く保存されている。そこで、本研究では、マウスとゼブラフィッシュをモデル生物とし、脊椎動物で普遍的に保存されているリゾリン脂質の機能を明らかにすることを目的とした。その一つの成果として、LPA分解酵素の血管形成制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Lysophospholipids are phospholipids that have only one acy chains. In the past two decades many GPCRs have been shown to react specifically with some of lysophospholipids. These include receptor for lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine 1 phosphate (S1P). In addition, specific enzymes that produce these lysophosphospholipids have been identified. Interestingly, these receptors and synthetic enzymes for lysophospholipids are highly conserved in vertebrates. Thus, in this study, to identify the patho-physiological roles of lysophospholipids, which is conserved among the wide range of vertebrates, we performed functional analyses of lysophospholipid receptors and synthetic enzymes using zebrafishes and mice as animal models. As one of the results in this study, we found new molecular mechanism underlining the embryonic blood formation mediated by LPA-degrading enzyme.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾリン脂質 GPCR 産生酵素 マウス ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

エイコサノイド、ステロイド、ジアシルグリセロールなどに加え、この10年の間にリゾリン脂質が脂質メディエーターとして重要な機能を持つことが次々に明らかにされ、第2世代の脂質メディエーターとして、非常に注目されている。このような生理活性リゾリン脂質にリゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴシン1リン酸、リゾホスファチジルセリン(LPS)がある。これら生理活性リゾリン脂質の活性は当初 *in vitro* で発見されたが、つい最近まで、個体レベルでの役割は不明であった。他の脂質メディエーター同様、生理活性リゾリン脂質は(1)特異的な機構で産生され(産生酵素)、(2)特異的に作用し(受容体)機能を発揮するものと考えられている。申請者を中心とする国内外の研究者により、この10年の間にLPAやLPSに対するGタンパク質共役型受容体や産生酵素が次々と同定され、それらのノックアウト(KO)マウスやヒト遺伝病の解析からこれら生理活性リゾリン脂質の生体内で重要な機能を有することが明らかになってきている。

申請者これまで、これまでLPAとLysoPSの作用・産生に關与する多くの新規遺伝子を単離・同定することに成功している。まず、リゾリン脂質の作用を説明する新規受容体4種類(LPA受容体LPA₃/EDG7、LysoPS受容体LPS₂/P2Y10、LPS_{2L}、LPS₃/GPR174)を世界に先駆けて同定することに成功した。また、これらの受容体も含めLPA受容体(LPA₁₋₄)、LPS(LPS₁₋₄)のノックアウトマウスの解析を行っている。この中には、細胞遊走(LPA₁)や受精卵着床(LPA₃)、リンパ球活性化(LPS₂)などの発見も含んでいる。一方、3種類のLPA産生酵素(Autotaxin、PA-PLA_{1α}、β)を同定し、Autotaxinが血管形成に、PA-PLA_{1α}が毛根形成に關与することを示した。科学技術政策所の報告によると申請者は生理活性リゾリン脂質の分野のトップオーサーと認識され(論文引用による評価)、その業績は国内外の研究者から高い評価を受けている。

次に、生理活性リゾリン脂質研究の現状と今後解決すべき課題について述べる。他の脂質メディエーターと同様に、受容体と産生酵素の同定とその機能解析が先行していた。最近になって、生理活性リゾリン脂質機能は、(3)輸送体(トランスポーター)、(4)代謝酵素(代謝酵素)によっても厳密に制御されることが示された。しかし、これらトランスポーターや代謝酵素の分子実態、さらにはその機能に關して不明な点が多く残されている。代謝酵素、トランスポーター分子の候補分子はゲノム上に遺伝子クラスターを形成し、多種類のイソフォームとして存在しているため、遺伝子機能の重複が予想され、ノックアウトマウスを用いた機能解析は困難極める可能性がある。ダブル・トリプルノッ

クアウトマウスを作成する戦略は可能ではあるが、多大な時間と労力を要する。また、脂質の分析技術が未熟だったため、リゾリン脂質の生体内での分析に關しては大きく遅れを取っている。

これまでのリゾリン脂質研究はヒトサンプル、あるいはモデル生物としてマウスを用いた解析が主流であった。多数の遺伝子機能を網羅的に解析するためには下等なモデル動物を利用することは極めて有効である。様々なモデル生物におけるリゾリン脂質関連の遺伝子の存在を調べたところ、線虫、ショウジョウバエではほとんど存在しないものの、ゼブラフィッシュは哺乳類とほぼ同じセットのリゾリン脂質関連遺伝子が保存されていることが分かった。ゼブラフィッシュでは、リン脂質分子種も、本研究のターゲットであるLPAやLPSを含めほぼ哺乳類と同じであることを確認している。後述するように、ゼブラフィッシュではモルフォリノRNA(MO)を用いた遺伝子抑制系が使用可能である。生理活性リゾリン脂質の機能を解明する上でゼブラフィッシュは理想的なツールであると考えられる。

2. 研究の目的

以上述べた問題点を解決すべく、本研究において申請者はリゾリン脂質性脂質メディエーターの哺乳類からゼブラフィッシュまで脊椎動物で高く保存されている生体内機能を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

- マスマスプロトメトリー(以下MS)を用いたリゾリン脂質検出系を確立し、ゼブラフィッシュをモデル生物としてリゾリン脂質の発現プロファイルを明らかにする。
- ゼブラフィッシュにおけるモルフォリノRNA(以下MO)による遺伝子抑制系を用い、リゾリン脂質関連遺伝子の機能を抑制した場合の表現型を解析する(フェノーム解析)。さらに、それぞれの遺伝子抑制個体におけるリゾリン脂質の発現プロファイルを調べることで、ゼブラフィッシュにおけるリゾリン脂質代謝マップ、さらには、代謝に關わる遺伝子群を明らかにする。
- ゼブラフィッシュの実験系で機能が明確になった分子に關してはノックアウトマウスを作製し、哺乳類における機能を解明すると同時に、ヒト疾患との関連を、臨床個体サンプルを用い検討する。

4. 研究成果

4-1 リゾホスファチジン酸による血管形成制御機構の解析

【背景】

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、グリセロール骨格に1本の脂肪酸とリン酸が結合した単純な構造のリゾリン脂質であるが、LPA 特異的な6種類のGPCR (LPA₁-LPA₆) を介して多彩な生理的・病理的機能を発揮する。LPA は血中では主にリゾホスファチジルコリン (LPC) がオートタキシン (ATX) に加水分解されることで産生される。当研究室においてATX ノックアウト (KO) マウスが作製・解析され、ATX KO マウスは血管形成異常を伴い胎生致死であることが明らかとなった。一方、*in vitro* でLPA 分解活性を有するLipid phosphate phosphatase 3 (LPP3) のKO マウスも血管形成異常を示すことが報告されていることから、LPP3 がLPA の量を制御し血管形成に寄与している可能性が想定される。このようにLPA はその産生酵素や分解酵素の機能を抑制することで血管形成異常を示すことから、生体にとって重要な血管新生因子であることが明らかとなってきた。しかしながらLPA がどのように血管形成を制御しているのか詳細な機能やその分子メカニズムなどは不明である。私は、LPA の産生酵素、受容体、分解酵素の網羅的な解析から、血管形成におけるLPA の機能を探ろうと考え、研究を行った。

【方法と結果】

4-1-1 ゼブラフィッシュにおいてもATXをノックダウンすると血管形成異常を生じる

血管形成を詳細に観察でき、容易に遺伝子の機能を抑制できるゼブラフィッシュを用いてLPA の血管形成における機能の解析を試みた。

血管内皮細胞にEGFPを発現するトランスジェニック (Tg) フィッシュ (*fli1:EGFP*) 胚にATXに対するアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) をインジェクションすることで、ATX をノックダウンし、血管形成を観察した。その結果ATX ノックダウン胚では体節間血管 (intersegmental vessel, ISV) と呼ばれる血管の伸長が遅れることが明らかとなった。この血管形成異常のメカニズムを探るために、内皮細胞で核移行型EGFPを発現するTg (*fli1:nEGFP*) フィッシュを用いて解析した。結果、ATX ノックダウン胚では血管一本当たりの細胞数は変わらず、血管の先端の細胞が背側に遊走できなくなっていることがわかった。次に血管形成に関与する受容体を同定するために、LPA 受容体を単独または複数を組み合わせることでノックダウンし、血管形成を観察した。その結果ゼブラフィッシュではLPA₁, LPA₄, LPA_{6a}, LPA_{6b} が血管形成に関係する受容体だと考えられた。

4-1-2 LPP3 ノックダウンによって生じる血管形成異常はLPA_{6a} への過剰なシグナルによるものである

次に、LPA 分解酵素であるLPP3に着目し、解析を行った。ゼブラフィッシュにはLPP3

遺伝子が2つあったためその2つをLPP3a, LPP3bとした。LPP3a, 3bをノックダウンしたところ、LPP3a ノックダウン時には管腔の未形成や血管の結合が切れて退縮している様子がしばしば観察された。しかし、LPP3b のノックダウンでは特に血管に異常が見られなかったことからゼブラフィッシュではLPP3a が血管形成に重要であると考えられた。そこで、このLPP3a ノックダウンによる異常がLPA シグナルを介しているのかを検証するために、LPA 産生酵素であるATX を過剰発現させ、LPA 量を増加させることでLPP3a ノックダウン時と同様に血管の退縮や管腔の未形成が引き起こされるかどうかを調べた。その結果、ATX の過剰発現により、LPP3a ノックダウン時と同様の血管形成異常が観察された。

次にLPP3a とLPA 受容体を同時にノックダウンしたところ、LPA_{6a} を同時にノックダウンした場合血管の退縮と管腔の未形成がレスキューされた。以上の結果より、通常時ではLPA をLPP3a が分解することで、LPA_{6a} に作用するLPA 量を調節しており、LPP3a がノックダウンされた場合は、過剰なLPA がLPA_{6a} に作用し、管腔の未形成・血管の退縮が生じているものと考えられる。

4-1-3 LPA は内皮細胞間接着を弱める

LPA の細胞レベルでの機能を探るため、human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) を用いて解析を行った。コンフルエントまで培養したHUVECをLPA 刺激したところ、アクチンストレスファイバー形成が促進され、内皮細胞間接着に重要であるVE-cadherin の局在が変化し、細胞間接着が弱まっている様子が観察された。siRNAを用いたノックダウン実験から、このLPA の作用はLPA₆ 受容体を介していることが明らかとなった。またLPA 分解酵素であるLPP3 をノックダウンするとLPA の作用が増強されることがわかった。LPA₆ の下流シグナルを調べたところ、LPA 刺激によりGa₁₃/RhoA/ROCK 経路が活性化していることが示唆された。

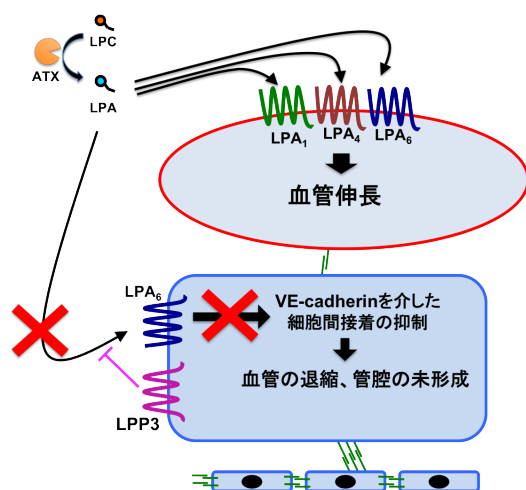
4-1-4 LPA は非接着面において作用しやすい

興味深いことに、HUVEC を用いた解析を行う中で、細胞の接着状態によってLPA に対する感受性が変化することがわかった。コンフルエントまで培養したHUVECを、チップを用いてスクラッチし、一つの細胞で接着面と非接着面を作り出し、LPA 刺激したところ非接着面で強くアクチンストレスファイバーを形成することがわかった。またLPP3 の局在を調べたところ、LPP3 は細胞間接着部位に局在していた。この結果からLPP3 の存在する細胞間接着部位ではLPA のシグナルが入りづらく、非接着面でLPA のシグナルが入りやすいことが示唆された。

4-1-4 まとめと考察

ゼブラフィッシュを用いた解析から、ATX-LPA シグナルの減弱は血管の伸長を抑制することが明らかとなった。逆に、LPA の過剰なシグナルは血管の伸長にはあまり影響を与えず、管腔形成を抑制し、血管退縮を促進した。LPA シグナルが減弱した際には主に血管の先端にいる内皮細胞に影響が出たが、LPP3 をノックダウンし、LPA シグナルが過剰になった場合には血管の先端の細胞にはほとんど影響は出ず、他の内皮細胞に異常が生じた。このことから、通常時には LPA シグナルはある一部の内皮細胞にのみ作用し、他の内皮細胞は LPP3 により LPA シグナルが入りづらい状況になっていることが想定される（下図）。培養内皮細胞を用いた解析からも細胞の状態によって LPA に対する感受性が変化することが明らかとなっており、生体内でも細胞によって LPA に対する感受性が異なっていることが考えられる。

この研究から、LPA シグナルは産生酵素、受容体、分解酵素によってその作用する部位が厳密に制御されており、この制御が血管形成に重要であることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

[1] Yukiura H, Aoki J et al. Autotaxin overexpression causes embryonic lethality and vascular defects Plos One in press (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0126734

[2] Okudaura M, Aoki J et al. Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. J Lipid Res 55, 2178-2192 (2014) (査読あり) doi:

10.1194/jlr.D048439

[3] Inoue A, Aoki J et al. TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. Nature Methods 9, 1021-1019 (2012) (査読あり) doi: 10.1038/nmeth.2172

[4] Yukiura H, Aoki J et al. Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish J. Biol. Chem. 286: 43972-43983 (2011) (査読あり) doi: 10.1074/jbc.M111.301093

[5] Nishimasu H, Aoki J et al. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. Nat Struct Mol Biol. 18, 205-212 (2011) (査読あり) doi: 10.1038/nsmb.1998

[6] Inoue A, Aoki J et al. LPA-producing enzyme PA-PLA1 regulates hair follicle development by modulating EGFR signaling EMBO J 30: 4248-4260 (2011) (査読あり) doi: 10.1038/emboj.2011.296

〔学会発表〕(計 13 件)

[1] 木瀬 亮次、青木 淳賢、ATX-LPA シグナルによる血管形成制御の解析、第 13 回ファーマバイオフォーラム 2014、富山、2014 年 9 月 20 日

[2] 雪浦 弘志、可野 邦行、青木 淳賢、マウス網膜血管新生モデルを用いたオートタキシンの機能解析、第 87 回日本生化学会、京都、2014 年 10 月 17 日

[3] 木瀬 亮次、雪浦 弘志、可野 邦行、井上 飛鳥、久野 悠、川原 敦雄、青木 淳賢、TALEN による LPA₄ 欠損ゼブラフィッシュの作製、第 87 回日本生化学会、京都、2014 年 10 月 17 日

[4] 青木 淳賢、新しい GPCR 活性化測定法 TGF α 切断アッセイ、CBI 学会年会、東京、2013 年 11 月 29 日

[5] 木瀬 亮次、雪浦 弘志、可野 邦行、青木 淳賢、妊娠後期に発現変動する ATX の機能解析、日本薬学会東北支部会、仙台、2013 年 10 月 20 日

[6] 松本宏隆、可野 邦行、井上 飛鳥、青木 淳賢、リゾホスファチジン酸 LPA による昇

圧作用メカニズムの解析、日本薬学会東北支部会、仙台、2013年10月20日

[7] 藍川志津、可野邦行、青木淳賢、リゾホスファチジン酸受容体 LPA3 による着床制御機構の解析、日本薬学会、熊本、2013年3月27-30日

[8] 青木淳賢, “新規 GPCR 活性測定法 TGF 切断アッセイ” 第 35 回日本分子生物学会 シンポジウム: 動植物におけるリガンド-受容体ペア その多様性と普遍性を探る 福岡、2012年12月11日.

[9] 青木淳賢, 巻出久美子, 井上飛鳥, “セリンリゾリン脂質を認識する新規 GPCR とその機能” 第 85 回日本生化学会 シンポジウム: 生体膜リン脂質の新たな個性に迫る 福岡、2012年12月14日.

[10] Junken Aoki “Role of LPA signaling in cartilage formation mediated by autotaxin and LPA1” The 1st International Symposium on Lipid Mediators, Hakata Japan, June 6, 2012

[11] Junken Aoki & Kuniyuki Kano “Lysophosphatidic acid in blood regulates vagal afferent nerves through LPA3 receptor” International symposium “New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences, Tokyo, Japan, September, 27-28, 2012

[12] Junken Aoki, Autotaxin regulates vascular development via multiple LPA receptors in zebrafish, 2011 FASEB Summer Research Conference, Lucca, Italy, 2011年8月15日

[13] Junken Aoki, Autotaxin and LPA Signaling in Cardiovascular Development, Keystone Symposia, Kyoto, Japan, 2010年6月8日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H24/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

青木 淳賢 (AOKI, Junken)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 20250219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし