

令和 元年 9 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2018

課題番号：15KK0320

研究課題名（和文）新規脂質メディエーター・12-HHTの生理機能と病態における役割の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Physiological and pathological roles of a new lipid mediator, 12-HHT(Fostering Joint International Research)

研究代表者

奥野 利明（OKUNO, TOSHIAKI）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：60361466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,700,000円

渡航期間： 5ヶ月

研究成果の概要（和文）：生体内には様々な位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸が存在し、その位置が不飽和脂肪酸の化学的性質や生物学的機能に影響を与えることが明らかにされている。本研究では、パターノ・ブーチ反応を用いて、不飽和脂肪酸の二重結合の位置を同定する手法の確立を行なった。また細胞膜のリン脂質は、ランズ回路による脂肪酸リモデリングによって恒常性が維持されている。栄養飢餓状態において、アラキドン酸含有リン脂質が減少し、ミード酸含有リン脂質が増加すること、また細胞刺激時に産生される脂質メディエーターもアラキドン酸由来からミード酸由来に質的に変化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、青魚に多く含まれる ω -3脂肪酸が注目されるように、脂質の質が注目されています。本研究では脂肪酸の二重結合の位置を同定する新しい手法の開発に成功しました。一方、栄養飢餓状態では不飽和度の高い必須脂肪酸が減少しますので、生体では少しでも不飽和脂肪酸を増やそうとします。その代表例がミード酸と呼ばれる不飽和脂肪酸です。栄養飢餓状態では、細胞膜を作るリン脂質が含有する脂肪酸が、アラキドン酸(20:4)からミード酸(20:3)に変化すること、また、細胞を刺激した時に作られる脂質メディエーターもアラキドン酸由来からミード酸由来に質的に変化することを明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：The positions of double bonds along the carbon chain of methylene interrupted polyunsaturated fatty acids are unique identifiers of specific fatty acids derived from biochemical reactions that occur in cells. It is possible to obtain direct structural information as to these double bond positions using tandem mass spectrometry after collisional activation of the carboxylate anions of an acetone adduct at each of the double bond positions formed by the photochemical Paterno-Buchi reaction with acetone. The rapid operation of the Lands cycle to maintain cell growth and viability by populating PUFA species; however, without sufficient n-6 fatty acids, 20:3 n-9 accumulated, resulting in altered lipid mediator biosynthesis and inflammatory response.

研究分野：脂質生化学

キーワード：脂質 質量分析 脂肪酸 脂質生化学 ミード酸 パターノ・ブーチ反応

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、アラキドン酸(AA)のシクロオキシゲナーゼ(COX)代謝物である12(S)-ヒドロキシエノイック酸(12-HHT)が、Gタンパク質共役型受容体であるBLT2の内在性リガンドであることを発見し、12-HHTの生理機能と病態における役割の解明を目的に研究を行ってきた。12-HHTはアラキドン酸から生合成される生理活性脂質であり、アスピリンに代表されるNSAIDsによって阻害されるシクロオキシゲナーゼ(COX)代謝物であるプロスタグランジンH₂(PGH₂)から生合成される。エイコサノイドは、刺激に応じて局所で産生し速やかに代謝されるため、エイコサノイドの生理機能をより詳細に明らかにするためには、いつ、どこで、どのくらい産生されるかを明らかにする必要がある。申請者は、12-HHTを含むエイコサノイドを網羅的に同定・定量するために、HPLCを用いた脂肪酸の分離と質量分析計を組み合わせたLC-MS/MSシステムを確立している。このシステムは分子の特異的な同定と高い定量性を特徴とし、約20分の測定で100種類以上の酸化脂肪酸を一斉定量することができる。しかし、臓器や組織を凍結後に破碎してから脂質を抽出して測定するため、目的とする脂質分子の組織中での局在を明らかにすることはできない。そこで本研究課題で質量顕微鏡を用いてエイコサノイドの局在を可視化することで、エイコサノイド産生の時空間機作を明らかにしようと考えた。国際共同研究を行う米国・コロラド大学のロバート・マーフィー教授は、質量分析計を用いた脂質の生化学解析のパイオニアであり、本研究課題を行うには最適な共同研究先と考えられた。

2. 研究の目的

- (1) パターノ・ブーチ反応を用いた不飽和脂肪酸の二重結合の位置を同定する手法の開発
生体内には様々な位置に二重結合を有する不飽和脂肪酸が存在し、その位置が不飽和脂肪酸の物理化学的性質や生物学的機能に重要な影響を与えることが近年明らかにされ、注目されている。従来の高速液体クロマトグラフィーと三連四重極型の質量分析計を組み合わせた手法では、リン脂質などに含まれる不飽和脂肪酸の位置を明らかにすることはできない。そこで本研究では、パターノ・ブーチ反応を用いて、不飽和脂肪酸の二重結合の位置を同定する手法の確立を目指した。
- (2) 細胞膜脂質リモデリングがエイコサノイド産生に与える影響の解明
細胞膜のリン脂質に含有される脂肪酸は、ランズ回路と呼ばれる機構により、恒常的にリモデリングされている。栄養飢餓時には、細胞の高度不飽和脂肪酸が減少し、オレイン酸(C18:1)からミード酸(C20:3, ω9)が生合成されることが知られている。アラキドン酸(C20:4, ω6)からは炎症性の脂質メディエーターであるロイコトリエンB₄(LTB₄)やLTC₄が生合成されるが、ミード酸からは、二重結合が1つ少ないLTB₃やLTC₃が生合成されることが知られている。本研究では、栄養飢餓状態において、細胞膜リン脂質の組成や細胞刺激時に産生されるエイコサノイドの分子種がどのように変化するか、また細胞膜リン脂質組成の変化が生物応答にどのような影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) パターノ・ブーチ反応を用いた不飽和脂肪酸の二重結合の位置を同定する手法の開発
パターノ・ブーチ反応は、石英ガラスから作製したキャピラリーとマキュラリーランプを用いて行なった。脂質サンプルはアセトン-水溶液に溶解させ、キャピラリーを通過する際にマキュラリーランプを用いてUV照射を行い、さらに直接ESI-MS/MSに注入して構造解析を行なった。大部分の脂質分析は、ネガティブイオンモードでABI社製の4000QTRAPを用いて解析し、より精密な質量数を求める場合は、Waters社製のSynapt G2-Sを用いて行なった。リン脂質に含

まれる脂肪酸の解析は、Bligh & Dyer 法で総脂質を回収後、けん化により脂肪酸を遊離させて行なった。

(2) 細胞膜脂質リモデリングがエイコサノイド産生に与える影響の解明

マクロファージ由来細胞RAW264.7細胞を、培地交換せずに1、2もしくは3日間培養した。細胞を回収後、イオノフォア(2 μ M A23187)で30分間37度刺激した。内部標準脂質を添加後に固相抽出を行なって脂肪酸画分を回収し、高速液体クロマトグラフィー連結型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて、エイコサノイドの一斉定量を行なった。LCはトラップカラムを用いたカラムスイッチング法を用い、分離カラムはC18カラムを用いた。脂質はリニアグラジエントで分離し、ネガティブイオンモードで測定した。エイコサノイドはMRM法で同定し、内部標準脂質とスタンダード脂質を用いて作成した検量線を用いて定量した。また、Bligh & Dyer法を用いてRAW細胞から抽出した脂質にホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルセリン(PS)の内部標準を加え、濃縮後にシリカカラムを用いた順相クロマトグラフィーのHPLCにインジェクションし、質量分析計で解析した。20:4もしくは20:3脂肪酸を含有するホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸(BMP)の脂質は、ネガティブイオンモードのMRM法で分析・同定した。データの解析は、Rを用いたボルケイノプロット解析を行い、どの脂質分子が培養日数依存的に変化しているかを可視化した。さらに、脂質リモデリングが炎症応答に与える影響を明らかにするため、リポポリサッカロイド(LPS)刺激時のTNF α の産生量を、ELISA法を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) パターノ・ブーチ反応を用いた不飽和脂肪酸の二重結合の位置を同定する手法の開発18:3の脂肪酸には、6,9,12-オクタデカエノイック酸(通称、 γ -リノレン酸)と9,12,15-オクタデカエノイック酸(通称、 α -リノレン酸)の二重結合の位置が異なる分子が存在する。これら脂肪酸をアセトンとパターノ・ブーチ反応させ質量分析計で分析したところ、それぞれ、理論通りのフラグメントが観察され、両者を区別できることがわかった。また20:3の脂肪酸には、オレイン酸から生合成される5,8,11-エイコサトリエノイック酸(ω 9, ミード酸)、 γ -リノレン酸から生合成されるジホモ γ -リノレン酸(ω 6, DGLA)、及び α -リノレン酸から合成される11,14,17-エイコサトリエノイック酸(ω 3)が存在する。アセトンとパターノ・ブーチ反応させて質量分析計で分析したところ、これらの20:3の脂肪酸がMS/MS解析によるフラグメント解析で区別できることがわかった。栄養飢餓状態のRAW細胞では、20:3の脂肪酸の中でもミード酸が、特異的に増加することが予想された。そこで培地交換なしに3日間培養したRAW細胞から脂質を抽出し、けん化により遊離させた脂肪酸をアセトンとパターノ・ブーチ反応させてMS/MS解析したところ、5,8,11位に二重結合を持つミード酸が増加していることがわかった。一方、パターノ・ブーチ反応後に質量分析計でMS/MS解析したフラグメントが、アセトン付加体であることを明確にするため、重水素ラベルしたD6アセトンと通常D0アセトンをアラキドン酸(20:4)とパターノ・ブーチ反応させMS/MS解析した。その結果、両者のフラグメントの差を解析することで、アセトンとのパターノ・ブーチ反応で生成したフラグメントを正確に同定できることを明らかにした。さらに、多価不飽和脂肪酸である5,8,11,14,17-エイコサペンタエノイック酸(EPA)と4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエノイック酸(DHA)の二重結合の位置もアセトンとパターノ・ブーチ反応させてMS/MS解析することで同定することに成功した。

(2) 細胞膜脂質リモデリングがエイコサノイド産生に与える影響の解明

マクロファージ細胞株RAW264.7 細胞を培地交換せずに、24、48、72 時間培養後、カルシウムイオノフォアで刺激し、産生するエイコサノイドを解析した。その結果、アラキドン酸(AA)のシクロオキシゲナーゼ(COX)代謝物であるPGD₂、PGE₂、TxB₂の産生量が培養日数依存的に減少した。またAAの5-リポキシゲナーゼ(5-LO)代謝物であるLTB₄とLTC₄、及び20:4脂肪酸の産生量も培養日数依存的に減少した。一方、ミード酸の5-LO代謝物であるLTB₃とLTC₃、及び20:3脂肪酸の産生量は培養日数依存的に増加した。RAW細胞から総脂質を回収し、リン脂質の解析を行なったところ、培養日数依存的にアラキドン酸含有リン脂質が減少し、20:3 脂肪酸含有リン脂質が増加した。総脂質をけん化することによって脂肪酸を遊離させ、パターノ・ブーチ反応と質量分析計を用いて解析した結果、増加した20:3 脂肪酸が ω 9 のミード酸であることを同定した。また細胞膜脂質がリモデリングされる際の細胞応答を明らかにするため、LPS刺激依存的なTNF α 産生量を調べた。その結果、72時間培養したRAW 細胞のTNF α 産生量が24時間培養したもの比べて優位に増加した。この結果は、細胞膜のリン脂質の不飽和度が低下することによって、炎症応答が亢進する可能性を示唆している。以上の結果は、脂肪酸飢餓時にランズ回路によってアラキドン酸からミード酸へのリン脂質リモデリングが起きることによって、細胞を刺激した時の脂質メディエーター産生を質的に変化させ、また炎症応答を変化させることを示唆している。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 1 8 件)

1. Okuno T, Yokomizo T. Biological functions of 12(S)-hydroxyheptadecatrienoic acid as a ligand of leukotriene B₄ receptor 2. *Inflamm Regen* 38, 29, 2018.
2. Okuno T, Gijon MA, Zarini S, Martin SA, Barkley RM, Johnson CA, Ohba M, Yokomizo T, and Murphy RC. Altered eicosanoid production and phospholipid remodeling during cell culture. *J Lipid Res* 59, 542-549, 2018.
3. Hori T, Okuno T, Hirata K, Yamashita K, Kawano Y, Yamamoto M, Hato M, Nakamura M, Shimizu T, Yokomizo T, Miyano M, and Yokoyama S. Na (+)-mimicking ligands stabilize the inactive state of leukotriene B₄ receptor BLT1. *Nat Chem Biol* 14, 262-269, 2018.
4. Okuno T, Koutsogiannaki S, Ohba M, Chamberlain M, Bu W, Lin FY, Eckenhoff RG, Yokomizo T, and Yuki K. Intravenous anesthetic propofol binds to 5-lipoxygenase and attenuates leukotriene B₄ production. *Faseb J* 31, 1584-1594, 2017.
5. Murphy RC, Okuno T, Johnson CA, and Barkley RM. Determination of Double Bond Positions in Polyunsaturated Fatty Acids Using the Photochemical Paterno-Buchi Reaction with Acetone and Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 89, 8545-8553, 2017.

[学会発表] (計 2 3 件)

[その他]

ホームページ等

http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/publication.html

6. 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名：ロバート・マーフィー

ローマ字氏名：Robert C. Murphy

所属研究機関名：University of Colorado Denver

部局名：Pharmacology

職名：University Distinguished Professor

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。