

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06648

研究課題名(和文)新奇生理活性脂質「グルコース化脂質」の解析プローブの開発と脂質機能解析への応用

研究課題名(英文) Development of probes for glucosylated lipids, novel bioactive lipids, and their application for lipid function analysis

研究代表者

長谷川 顕子(山路顕子)(Yamaji-Hasegawa, Akiko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・専任研究員

研究者番号：20332314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかの病態との関連が指摘されているグルコース化脂質について、効率的で汎用性のある解析プローブを得るためのスクリーニングを行った。その過程で、ある細胞内蛋白質が、グルコース化脂質とは異なる脂質分子種に特異的に結合することを見出した。その標的脂質は、代謝機構や細胞内動態が未解明の新規生理活性脂質であることから、これについて解析を進めた。今後、この蛋白質をプローブとして活用することにより、標的脂質が関与する生理的・病理的現象の分子機構の解明が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で特異的結合蛋白質を見出した標的脂質は、さまざまな生理的・病理的現象に関与する生理活性脂質である可能性が指摘されている。しかし、その合成・代謝経路はごく一部しか明らかになっていないうえに、生体内では極微量成分であることから、効率的で汎用性のある解析手段に乏しく、この脂質の生理機能への関与の作用機序は不明である。本研究の成果は、この脂質の機能解析に有用であり、関連する各種疾患の理解や克服につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To obtain efficient and useful probes for glucosylated lipids, which have been indicated the relationship with several pathologies, I performed various screenings. I found that one endogenous protein specifically recognizes a lipid species different from glucosylated lipids. Since the target lipid is a novel bioactive lipid whose metabolism and intracellular dynamics are still unknown, I performed further investigation for this protein and its interaction with the target lipid. By using this protein as a probe, it is expected that molecular mechanisms of physiological and pathological phenomena which the target lipid is involved will be elucidated.

研究分野：脂質生物学

キーワード：脂質解析プローブ 生体膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルコースは生命体にとって重要なエネルギー源であり、特に哺乳類の脳・中枢神経系では唯一のエネルギー源である。近年、高感度・高速度分析が可能な質量分析計の発展により、微量脂質を含めたりピドミクス解析が行われるようになった。その結果、グルコースが脂質に付加した「グルコース化脂質」の存在が明らかとなり、その生理的意義や神経変性疾患・加齢性疾患をはじめとする各種病態との関連が注目されつつある。

例えば、リン脂質の一種ホスファチジン酸にグルコースが付加したホスファチジルグルコシドは、ストレス応答・炎症・肥満などへの関与の可能性が指摘されている。その加水分解産物リゾホスファチジルグルコシドは、神経軸索ガイダンスを制御することが報告されている。また、コレステロールにグルコースが付加したコレステリルグルコシドは脳・肝臓・血中に見出され、その合成酵素はパーキンソン病・ゴーシェ病・小脳性運動失調症の危険因子として知られている。さらに、食餌から摂取した植物ステロールも、動物体内でグルコース化されている可能性が示されている。

これらの知見から、生体はグルコース転移による脂質代謝を介して脂質の量や性質を変化させ、生体の恒常性を維持したり、生理機能を調節したりしている可能性が考えられる。しかしながら、これらのグルコース化脂質はいずれも極微量成分であり、高度な質量分析技術や装置でしか捉えることができない。そのため、その代謝調節機構・細胞内分布・生体での動態・他の生体分子との相互作用などは全く明らかになっていない。したがって、グルコース化脂質についての効率的で汎用性のある解析手段の作出が必要である。

2. 研究の目的

新奇生理活性脂質であるグルコース化脂質のダイナミクス研究に有用な解析プローブを開発・利用する。具体的には、いくつかのアプローチによりグルコース化脂質に結合する分子を探索し、解析プローブの候補分子を見出す。次に、候補分子と脂質との結合様式や構造活性相関などの詳細な性状解析を行い、グルコース化脂質の特異的解析プローブを開発する。さらに、その分子を用いて、様々な細胞におけるグルコース化脂質の分布・細胞内動態・共局在分子の解析等を行うことにより、この新奇生理活性脂質の生理機能や疾患との関連の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) グルコース化脂質に結合する蛋白質のスクリーニング

ステロール 3 位水酸基を修飾した化合物を用いたスクリーニングにより、いくつかの蛋白質がステロール類結合蛋白質として報告されている。これらの蛋白質のリコンビナント蛋白質を大腸菌を用いて作製し、脂質結合性を ELISA 法により検討した。

脂質結合ドメインを有すると報告されている蛋白質のうち、脂質特異性の明らかでないものについてリコンビナント蛋白質を作製し、グルコース化脂質に結合するかどうかを解析した。

(2) スクリーニングで得られた脂質結合分子の性状解析

上記スクリーニングで脂質結合性が示された複数の蛋白質について、ELISA 法・リボソーム結合試験・TLC プロットティング法・ドットプロット法などにより、詳細な結合様式の解析を行った。脂質の骨格構造・親水性頭部構造・脂肪酸鎖長などの脂質特異性を検討した。また、この蛋白質の部分欠損変異体やアミノ酸置換変異体などを用いた解析により、蛋白質の脂質結合領域を同定した。さらに、モデル膜を用いた実験により、イオン・温度・膜流動性・共存脂質などが、蛋白質 - 脂質間の相互作用にどのような影響を与えるかを検討した。

(3) 標的脂質の細胞内分布や分子間相互作用の解析

得られた脂質 - 蛋白質間相互作用の情報をもとに、タグ付加リコンビナント蛋白質や蛍光標識蛋白質などを作製し、細胞染色実験などにより標的脂質の細胞内分布を解析した。また、この蛋白質を哺乳動物細胞内で発現させるためのプラスミドを作製し、標的脂質の細胞内動態の観察を行うとともに、標的脂質の関与が示唆されている生理機能への蛋白質の影響の解析に着手した。

4. 研究成果

(1) スクリーニングによる新規脂質結合蛋白質の同定

グルコース化されたステロール類に結合する分子を探索する目的で、既知のいくつかのステロール類結合蛋白質を探索したが、当初の目的の分子を得ることはできなかった。蛋白質とステロールの結合には、ステロールの 3 位水酸基が重要である場合があることをこれまでも経験し

ており、今回のケースもグルコースが 3 位水酸基に付加していることが障害となった可能性が考えられる。

また、脂質結合モジュールとして働く可能性が示唆されている蛋白質の領域ドメインがいくつか報告されている。その一部は、イノシトールリン脂質に結合することが示されているが、標的脂質が不明なものも多い。グルコースはイノシトールと同様に 6 員環構造を持ちかさ高いことから、それらの領域ドメインの中にグルコース化脂質に結合する分子が存在する可能性を考えて、探索を行った。その結果、脂質結合活性を示すいくつかの分子を見出した。

(2) スクリーニングで得られた脂質結合分子の標的脂質同定と性状解析

上記の二種類のスクリーニングで脂質結合活性がみとめられた複数の蛋白質について、脂質特異性を検討したところ、ある一つの蛋白質が、グルコース化脂質とは異なる脂質分子種に特異的に結合することが明らかとなった。この結合特異性は、固相条件である ELISA 法・TLC プロテイング法・ドットプロット法だけでなく、生体内と同様の膜環境であるリポソーム結合試験によっても確認された。標的脂質の脂肪酸鎖は短鎖では認識されないが、生体内に存在しうる中鎖・長鎖のものは認識された。また、細胞内と同程度の濃度のカルシウムは結合に影響しない。これらのことから、この蛋白質は、今後、標的脂質の細胞内解析に適用することが可能であると考えられた。このほかにも、この蛋白質 - 標的脂質間の相互作用における温度・膜流動性・共存脂質などの影響も検討し、今後のプローブ展開への情報を得た。

一般的に、脂質分子は蛋白質よりもはるかに分子量やサイズが小さいため、特定の脂質を検出するための解析プローブは、できるだけ低分子量であることが好ましい。そこで、同定した脂質結合蛋白質について様々な部分欠損変異体を作製し、標的脂質との結合能を測定した。その結果、結合に必要な領域は中央部の 200 余りのアミノ酸で十分であることが明らかとなった。また、アミノ酸置換変異体を用いた解析により、標的脂質との結合に関与すると考えられる残基が明らかとなった。

(3) 標的脂質の細胞内分布や分子間相互作用の解析

グルコース化脂質の特異的解析プローブの取得を目指してスクリーニングを開始したが、残念ながら当初の目的の分子は得られなかった。しかし、その過程でグルコース化脂質とは異なる脂質分子種に特異的に結合する蛋白質が得られた。この標的脂質は、グルコース化脂質と同様に、生体内では極微量成分でありながら、生理機能および炎症やガンなどの疾患への関与の可能性が示唆されている。さらに、この標的脂質の合成・代謝経路はごく一部しか明らかになっておらず、その生体内ダイナミクスはほとんど未解明である。これらのことから、同定した特異的結合蛋白質をもとに標的脂質の特異的プローブを作出し、この脂質の生理機能を解明することは科学的・社会的に極めて重要であると考え、これについて解析を進めることとした。

上の性状解析で同定した蛋白質の脂質結合領域について、タグ付加リコンビナント蛋白質や蛍光標識蛋白質などを作製し、これを用いてさまざまな細胞について染色実験を行った。各種オルガネラマーカーなどとの二重染色や、染色パターンを変化させる培養条件の探索などを行うことにより、この標的脂質の細胞内分布や細胞機能との相関の解析を進めている。また、この蛋白質を哺乳動物細胞内で発現させることにより、標的脂質の細胞内動態の観察に取り組んだ。さらに、標的脂質の関与が示唆されている各種の生理的・病理的現象において、この蛋白質を添加したり発現させたりすることで、どのような変化が起こるかを解析している。

本研究で、新規生理活性脂質の解析プローブを発見できたことは極めて有用である。今後、このプローブをさらに改変して、より脂質親和性の高いものにしたたり、細胞内や生体内の特異的領域に導入したりといった応用が考えられる。この標的脂質は、その合成・代謝経路も含めて、機能発現の作用機序がほとんど明らかになっていない一方で、炎症やガンなど現代社会が克服すべき疾患への関与が示唆されており、早急に取り組むべき研究対象である。本研究の成果は、この標的脂質についての効率的で汎用性のある新たな解析手段を提供するものであり、今後は当該疾患の理解や克服につながるような応用展開研究を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------