

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14906

研究課題名(和文) 重水素型リン脂質を用いた脂質酸化依存的新規細胞死に関わる酸化脂質代謝物の同定

研究課題名(英文) Identification of oxidized lipid metabolites in which involves lipid oxidation dependent novel cell death using deuterium-labeled phospholipids

研究代表者

坂本 太郎 (SAKAMOTO, TARO)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：10383655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、酸化されたリン脂質を還元する抗酸化酵素であるGPx4をノックアウトすると、脂質酸化依存的な新規細胞死を起こすことを明らかにしている。本研究ではGPx4欠損による新規細胞死における酸化リン脂質代謝経路の全体像を明らかにすることを目的とし、新規重水素型酸化リン脂質を用いたフラクソーム解析による酸化リン脂質代謝マップの作成、という全く新しい切り口での現状打破を試みた。その結果、GPx4欠損細胞では野生型細胞に比べリゾリン脂質への分解活性が高いこと、一方でリゾリン脂質からリン脂質への再アシル化活性は低く、未知の物質に代謝されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPx4欠損による新規細胞死は、GPx4ノックアウトマウスの胚致死を誘導するだけでなく、心不全性突然死、雄性不妊、COPDなどにも関わることを研究代表者らは明らかにしている。本研究では、GPx4欠損時にリゾリン脂質からリン脂質への再アシル化活性が低下し、代わりに未知の物質へと代謝される可能性を見出している。今後、実際にこういった代謝物に変化するのかが明らかとなれば、上記のような疾患のバイオマーカーへ利用できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Glutathione peroxidase 4 (GPx4) is a unique antioxidant enzyme that directly reduces the phospholipid hydroperoxides generated in biomembranes. We have demonstrated that the disruption of GPx4 leads to phospholipid hydroperoxide dependent novel cell death. In this study, by the fluxome analysis using deuterium labelled-phospholipid, we attempted to generate the whole aspect of metabolic map for phospholipid hydroperoxides. We found the phospholipase activity was elevated in the GPx4-depleted cells as compared with that of control cells. In addition, reacylation of lysophospholipids was decreased in the GPx4-depleted cells. These data indicate that the lysophospholipids were metabolized to unknown compounds in the GPx4-depleted cells.

研究分野：脂質生化学

キーワード：酸化脂質 フラクソーム解析 重水素型リン脂質 細胞死 脂質代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成するリン脂質には、極性頭部と脂肪酸側鎖の組み合わせの違いから数百種類の分子種が存在すると言われている。また、二重結合を複数もつ不飽和脂肪酸が結合したリン脂質は、容易に活性酸素の標的となってリン脂質ヒドロペルオキシド(PC-OOH)を生成する。PC-OOHは酸化した二重結合の位置によってさらに複雑な構造的多様性を示すだけでなく、様々な疾患や細胞死の誘発に関与するという細胞傷害性因子としての特徴を持つ。

脂質を対象としたメタボローム解析は近年急速に基盤技術が確立され、ある生物種や細胞が持つ脂質分子種を網羅的に同定することが可能になった。例えば現在の解析スペックであれば、約百個の細胞があれば、その細胞が持つリン脂質分子種を瞬時に同定することが出来ると言われている。脂質メタボローム解析の普及に伴い、PC-OOHに対する分子種分析も行われるようになってきているが、PC-OOHは生成する量が非常に少なく分子種の数も多岐にわたるため、定性的、定量的解析のどちらも非常に難しい。また、多くのPC-OOHは合成品が販売されておらず、質量分析(MS)による構造解析を行う上で標品を手に入れることすら出来ないという問題が存在する。

2. 研究の目的

研究代表者らは、PC-OOHを還元消去するセレン含有抗酸化酵素であるリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx4)をノックアウトすると、脂質酸化依存的な新規細胞死を起こし、胚発生期のかかなり早い段階で致死となることを明らかにしており、このことから、細胞内で内在的に生成するPC-OOHの消去が生体にとって極めて重要であることが分かる。一方で、現在の脂質メタボローム解析技術では、GPx4欠損による新規細胞死においてどういったリン脂質ヒドロペルオキシド分子種が生成し、どのような代謝制御を受けるのか、その全容解明には至っていない。そこで本研究では脂質酸化依存的な新規細胞死におけるリン脂質ヒドロペルオキシド代謝経路の全体像を明らかにすることを目的とし、新規重水素型リン脂質ヒドロペルオキシド(PC-OOH-D₃)を用いたフラクソーム解析によるPC-OOH代謝マップの作成、という全く新しい切り口での現状打破を試みた。

3. 研究の方法

(1) メタボローム解析では分子種の網羅的同定は出来ても、その分子の前駆体が何であり、その後何に変化していくのかという代謝の流れ(“Flux”)を捉えることは難しい。フラクソーム解析(“Flux” + “ome” = “Fluxome”)は、この点を補う解析技術であり、対象となる物質を安定同位元素で標識し、その標識部位をトレーサーとして代謝産物をLC-MSによって選択的に同定することが可能である。そこで、フラクソーム解析に用いる重水素型リン脂質ヒドロペルオキシド(PC-OOH-D₃)ライブラリーを構築した。

(2) 合成したPC-OOH-D₃と細胞ホモジネートを混合し、試験管レベルでのフラクソーム解析を行った。重水素型PCに特異的なm/z 187のフラグメントを利用し、MSによるプリカーサーイオンスキャンを行った。検出されたイオンの構造をMS/MS解析により決定し、PC-OOH-D₃の代謝マップを作成した。細胞ホモジネートは、GPx4欠損細胞と正常細胞由来のものを用いた。

(3) GPx4欠損細胞と正常細胞そのものにPC-OOH-D₃を添加し、より生理的な条件下でのPC-OOH-D₃の代謝フラクソームマップを作成し、両細胞間で動態の異なる代謝産物を同定した。

4. 研究成果

(1) PC-OOH-D₃ライブラリーのモデル分子となるパルミチン酸-リノール酸結合型PC-OOH-D₃の合成を行った。具体的には、メチル基の1つを重水素化したコリンと(S)-(-)-Glycidolをリン酸エステル化させ、次いでsn-1位炭素選択的にパルミチン酸を縮合させた。さらに、sn-2位炭素にリノール酸を縮合させ、PC-D₃を合成した。合成したPC-D₃はリポキシゲナーゼ反応により酸化し、PC-OOH-D₃とした。これまでリン脂質の有機合成にはsn-2位炭素をベンジル基で保護したグリセロールにリパーゼ酵素を用いて脂肪酸を縮合させる反応を用いていた。しかし、ベンジル保護が極めて煩雑であることに加え、市販のリパーゼ酵素の立体選択性はロット依存性が高く、従来とは異なる合成方法の確立が求められていた。(S)-(-)-Glycidolを用いた本合成法により立体異性については生物が一般的に有するL型となり、反応のステップも10段階から7段階に減らすことに成功した。

(2) 重水素型リン脂質合成の最初の反応である重水素化コリンの合成について効率化を図る目的で、重メタノールとパラトルエンスルホン酸の混合割合について検討した。その結果、従来の二倍量の重メタノールを用いることで再現性良く合成反応を行えることが明らかとなった。

(3) 生体内には様々な脂肪酸側鎖を持ったリン脂質分子種が存在することから、飽和脂肪酸(パルミチン酸、ステアリン酸)と不飽和脂肪酸(オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、EPA、DHA)の組み合わせを変えることで様々な脂肪酸組成を有したPC-OOH-D₃ライブラリーを構築した(表1)。

(4) 合成した PC-00H_D₃ と細胞ホモジネートを混合し、試験管レベルでのフラクソーム解析を行った。重水素型 PC に特異的な m/z 187 のフラグメントを利用し、MS によるプリカーサーイオンスキャンを行うことで PC-00H_D₃ の代謝マップを作成した。その結果、既存の PC-00H 代謝経路に加え、sn-1 の脂肪酸を切り出した LPC-00H や LPC-OH に代謝する経路が存在することが示唆された。

PCOOH _D ₃	PC _D ₃	LPC _D ₃
PC16:0/18:200H _D ₃	PC16:0/18:2 _D ₃	LPC 16:0 _D ₃
PC16:0/20:400H _D ₃	PC16:0/20:4 _D ₃	
PC16:0/22:600H _D ₃	PC16:0/22:6 _D ₃	
PC18:0/18:200H _D ₃	PC18:0/18:2 _D ₃	LPC 18:0 _D ₃
PC18:0/20:400H _D ₃	PC18:0/20:4 _D ₃	
PC18:0/22:600H _D ₃	PC18:0/22:6 _D ₃	
LPC18:200H _D ₃		LPC 18:2 _D ₃
LPC20:400H _D ₃		LPC 20:4 _D ₃
LPC22:600H _D ₃		LPC 22:6 _D ₃

表 1 合成した PC-00H_D₃ ライブラリー

(5) 合成した PC-00H_D₃ を培養細胞に取り込ませ、細胞

レベルでのフラクソーム解析を行った。重水素型 PC に特異的な m/z 187 のフラグメントを利用し、MS によるプリカーサーイオンスキャンを行うことで PC-00H_D₃ の代謝マップを作成した。その結果、野生型細胞に比べ GPx4 欠損細胞では、過酸化脂肪酸を切り出した LPC_D₃ への代謝活性が高いことが明らかとなった。一方で PC_D₃ への再アシル化活性は低く、GPx4 欠損細胞では PC-00H_D₃ が未知の物質に代謝されていることが示唆された (図 1)。

(6) 細胞レベルのフラクソーム解析において、添加するをリポソーム化することにより、代謝経路としてはエタノール溶解液として添加した場合と変わりはなく、細胞内への取り込み効率が約 2 倍に上昇することが明らかとなった。

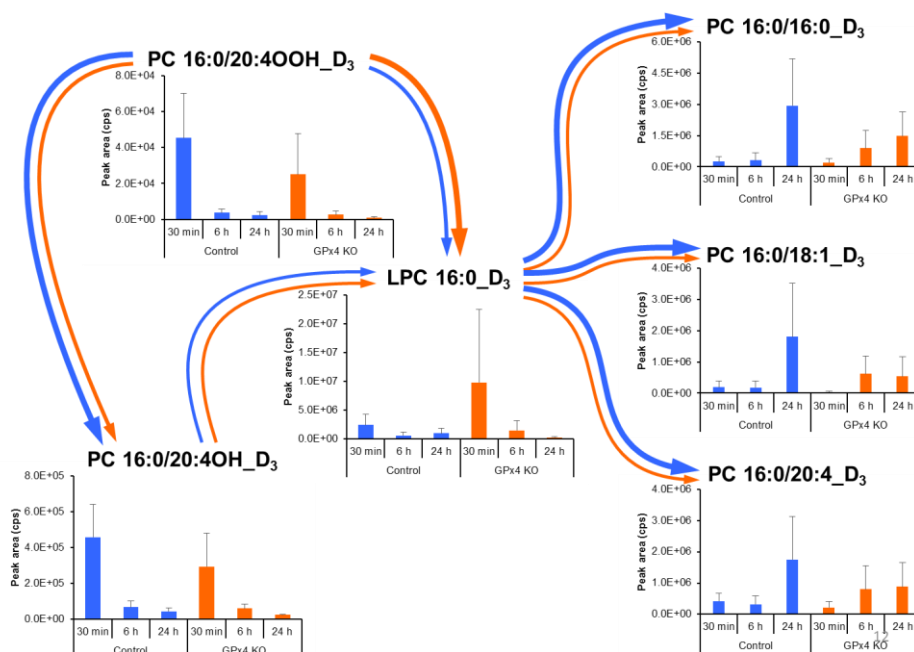


図 1 GPx4 KO MEF細胞におけるPCOOH_D₃代謝マップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto Taro, Maebayashi Kana, Tsunoda Yuka, Imai Hirotaka	4. 巻 66
2. 論文標題 Inhibition of lipid peroxidation during the reproductive period extends the lifespan of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 116 ~ 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3164/jcfn.19-51	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuya Tsubouchi, Jun Araya, Masahiro Yoshida, Taro Sakamoto, Kazuyoshi Kuwano.et. al.	4. 巻 203
2. 論文標題 Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2076 ~ 2087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masahiro Yoshida, Shunsuke Minagawa, Jun Araya, Taro Sakamoto, Kazuyoshi Kuwano et.al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41467-019-10991-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masahiro Yoshida, Shunsuke Minagawa, Taro Sakamoto, Jun Araya, Hirotaka Imai and Kazuyoshi Kuwano
2. 発表標題 Involvement of GPx4-mediated ferroptosis in COPD pathogenesis
3. 学会等名 The 7th International Selenium Conference Se2018 Selenium in Biology, Chemistry and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroataka Imai, Kahori Oka, Tomoko Koumura, Takeshi Kumagai, Taro Sakamoto and Masaki Matsuoka
2. 発表標題 Lipid peroxidation dependent cell death by GPx4 depletion involves different cell death pathway from ferroptosis
3. 学会等名 The 7th International Selenium Conference Se2018 Selenium in Biology, Chemistry and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井浩孝、品川尚久、馬場直道、坂本太郎
2. 発表標題 新規重水素型リン脂質ヒドロペルオキシドの合成と脂質酸化依存的新規細胞死におけるフラクソーム解析への応用
3. 学会等名 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第26回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷 剛、平澤星蘭、大矢梨里香、坂本太郎、今井浩孝
2. 発表標題 SMS2によるGPx4欠損による新規細胞死抑制機構の解析
3. 学会等名 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第26回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井浩孝、岡佳保里、坂本太郎、松岡正城
2. 発表標題 GPx4欠損新規細胞死実行因子lipo-3の機能解析
3. 学会等名 第4回日本セレン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井浩孝、大矢梨里香、平澤星蘭、坂本太郎、熊谷 剛
2. 発表標題 SMS 2 による脂質酸化依存的新規細胞死抑制機構の解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 品川尚久、坂本太郎、平澤星蘭、熊谷 剛、馬場直道、今井浩孝
2. 発表標題 フラクソーム解析を用いたリン脂質ヒドロペルオキシドの新規代謝機構の解明
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本太郎、品川尚久、馬場直道、今井浩孝
2. 発表標題 フラクソーム解析を介したリン脂質ヒドロペルオキシドの新規代謝機構の解明
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

〔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