

平成 22 年 2 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590307  
 研究課題名（和文）リポドミクスによるホスホリパーゼ B/リパーゼの小腸粘膜細胞分化促進機構の解析  
 研究課題名（英文）Lipidomic analysis of the action of Phospholipase B/Lipase on intestinal mucosal cell differentiation  
 研究代表者  
 東城 博雅（TOJO HIROMASA）  
 大阪大学・生命機能研究科・准教授  
 研究者番号：90135707

## 研究成果の概要：

今回新たに作成した小腸刷子縁膜に局在する Ca 非依存性ホスホリパーゼ B/リパーゼ (PLB/LIP) 欠損マウス (mPLB / ) を用いて同酵素の機能解析をした。経口脂質負荷試験では野生型と mPLB / で体重・血清脂質値などに差がなかった。回腸 Ca<sup>2+</sup>依存性ホスホリパーゼ A2 活性が代償的に増加していたことから、PLB/LIP の脂質消化機能を代償する酵素が働いていることが示唆された。最初に作成した mPLB+/ で見られた分化異常はベクター由来のプロモータの影響と考えられた。中性脂質、中性スフィンゴ脂質、リン脂質にわたる自動化脂質一斉分析システムの測定可能脂質クラス範囲を、小腸に多い中性・酸性糖脂質を含む高極性脂質まで拡張できた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：リポドミクス、ホスホリパーゼ B、リパーゼ、小腸、消化吸収

## 1. 研究開始当初の背景

我々が、小腸粘膜から精製・クローニングしたホスホリパーゼ B/リパーゼ (PLB/LIP) は、SNGH ヒドロラーゼホールドファミリーに属する膜結合型酵素である。PLB/LIP は、高いリパーゼ活性、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 活性とリゾホスホリパーゼ活性を持つ。PLA<sub>2</sub> とリゾ活性が連続して作用し、ジアシルグリセロリン脂質の二本の脂肪酸を切り出す酵素をホスホリパーゼ B (PLB) と呼ぶ。PLB/LIP は、

高い PLA<sub>2</sub> とリパーゼ活性を併せ持つはじめての酵素である。PLB/LIP は小腸刷子縁膜に存在し慢性膵炎モデルラットの膵臓リパーゼ活性低下を効果的に代償することから、回腸における脂質の膜消化に関わる酵素であると考えられている。PLB/LIP の機能をさらに詳細に検討するため、PLB/LIP 欠損マウス (mPLB) を作成したところ、ヘテロ mPLB+/ の小腸の分化異常と雄性不妊が見られた。

## 2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、健常マウスと mPLB+/マウスの小腸粘膜脂質を研究代表者が開発している高速液体クロマトグラフィー (HPLC)/質量分析 (MS) を応用した脂質の総的一斉分析法 (リピドミックス) により解析して、小腸粘膜細胞分化に関連する脂質を検索・同定し、同定脂質の特性を分子生物学的に検討することであった。この研究の成果は、発生生物学研究や消化管粘膜免疫研究に新しい方向性を与え、臨床的には消化器炎症や癌の病態解析・小腸移植後治療などの研究に新しい方向性をあたえると予測される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂質分解酵素活性の測定

脂質分解酵素活性は、研究代表者が以前に開発した、基質から遊離した脂肪酸を抽出し、9-アントリルジアゾメタン (ADAM) で誘導体化後、HPLC で分離、定量する方法 (ADAM 法) で測定した。基質として 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/cholate 混合ミセル, triolein/gum Arabic/cholate emulsion, retinyl palmitate/ gum Arabic/cholate emulsion を用い、37°C で指定時間 (30-90 分) インキュベートした後 Dole 法で脂肪酸を抽出した。PLA2 活性は基質 sn-2 位のオレイン酸遊離活性で評価した。EDTA 存在下での活性を Ca<sup>2+</sup>非依存性 PLA<sub>2</sub> 活性とし、Ca<sup>2+</sup>依存性 PLA<sub>2</sub> 活性は Ca<sup>2+</sup>イオン存在下と EDTA 存在下の活性の差で評価した。

(2) ガングリオシドを含む高極性脂質の抽出。検索対象組織 (脂肪組織のように糖脂質低含量のときは 200-400 mg、高含量の組織では 20 mg 程度) をクロロホルム:メタノールの組成の順次変えた溶媒 CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1, 1:1, 1:2) で 3 回抽出して、さらに CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (4:8:3) で 1 回抽出し、すべての抽出液を集めてプールする。これを DEAE-Sephadex カラムに乗せ、素通りと結合フラクションに分離する。それぞれをアルカリ加水分解し、C18 カートリッジで脱塩濃縮した後に直接下記の自動化脂質一斉分析装置に注入して分離分析した。

#### (3) 自動化脂質一斉分析装置

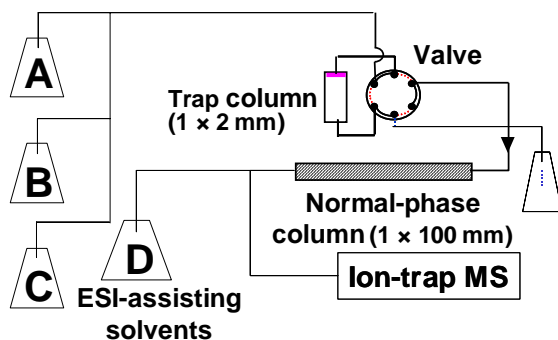


図 1. 自動化脂質一斉分析装置の概要

脂質は順相カラムで薄層クロマトグラフィーと同様に低極性から高極性に渡りクラス分離する。中性脂質から中性スフィンゴ脂質、一部のガングリオシド、リン脂質にわたる分離にはヘキサン、2-プロパノール、水、蟻酸アンモニウムからなる A-C 溶媒を用いる。それより高極性のガングリオシドスルファチド、中性糖脂質分析には研究成果で述べるように B-C 溶媒を用いた。A-D の 4 溶媒を非極性溶媒のグラジエント溶出に対応した脈流補正インテリジェント機構を有するマイクロボア送液ポンプで送液する。イオン化溶媒 D をポストカラムでディーを介して混合して非極性溶媒で先に溶出されてくる中性脂質やセラミドなどのイオン化を促進する。トラップカラムは、たとえばリン脂質など遅れて溶出する脂質の分析だけをするときに、早く溶出される脂質を除くためあるいはガードカラムとして使用する。トラップカラムと分離用カラムはヒータで温調する。質量分析器には、データ依存的 MS<sup>n</sup> を自動的オンラインで測定する機能を有するイオントラップ型装置をもちいる。

### 4. 研究成果

#### (1) mPLB / の作成

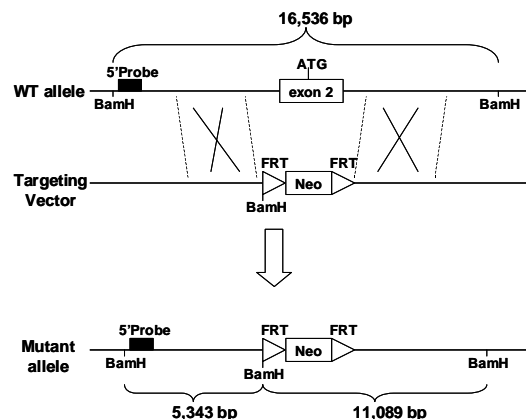


図 2. 変異遺伝子の作成法 FRT, Flippase Recognition Target 配列

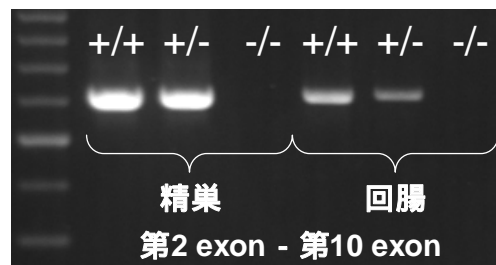


図 3. PLB/LIP の rtPCR による解析

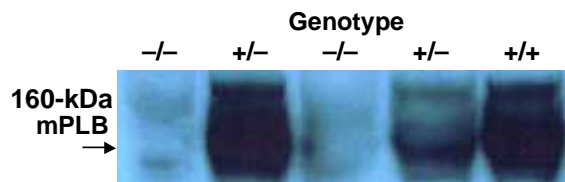


図 4. 回腸 PLB/LIP のイムノプロテイング

図 2 のターゲティングベクターと ES 細胞を用いた相同組換え法により PLB/LIP 遺伝子破壊マウスを作成した。最初に作成し、小腸分化異常の表現型解析に使用していたマウスはヘテロ接合体 (mPLB<sup>+/-</sup>) で受精卵の分化異常による雄性不妊が認められ mPLB<sup>-/-</sup> がごく少数しか得られなかった。その後、FLPeR トランスジェニックマウスと PLB<sup>+/-</sup> との交配により FRT サイトでは含まれたネオマイシン (neo) 耐性遺伝子 (図 2) を除去したマウスで交配実験を重ねるなど詳細に検討したところ、これらの現象は、ES 細胞での相同組換え不良によりターゲティングベクターがタンデムにゲノムに挿入され neo 遺伝子あるいはこれを発現させるための PGK プロモーターの支配によって引き起こされている可能性が高いと判断された。そこで、ターゲティングベクターを再構築し、染色体損傷を最小にするため新しく樹立した ES 細胞を用いて mPLB<sup>-/-</sup> を作成しなおした。rtPCR とイムノプロテイング (図 3, 4) により mPLB<sup>-/-</sup> 回腸に PLB/LIP は検出できず、遺伝子破壊は成功していた。mPLB<sup>+/-</sup> 間の交配では、仔 ( $n = 382$ ) のゲノタイプはメンデルの法則に従う比率 (+/+, 103 (27%); +/-, 178 (47%); -/-, 101 (26%)) で得られた。

(2) 新しく樹立した mPLB<sup>-/-</sup> の表現型  
mPLB<sup>-/-</sup> には発育異常やその他の異常なマクロ表現型、小腸、受精卵の分化異常も認められなかった。PLB/LIP 遺伝子破壊による脂肪消化吸収に対する効果を調べるため、高脂肪食投与後 4 週間の体重変化を調べたが野生型と mPLB<sup>-/-</sup> で有意差はなかった。胃ゾンデから 200  $\mu$ l オリーブオイルを投与して 4 時間まで経時的に血中トリアシルグリセロール (TG) 濃度をモニターした。投与後 3 時間で野生型、mPLB<sup>-/-</sup> とともに TG 濃度は最大になり最高濃度に有意差はなかった。PLB/LIP は *in vitro* では retinyl ester 分解活性を有する。20  $\mu$ l retinyl palmitate と 180  $\mu$ l オリーブオイル混液を胃ゾンデで投与し経時的に血中ビタミン A 濃度をモニターしたが、遺伝型による差は見られなかった。このことから、PLB/LIP は *in vivo* では retinyl ester 分解にほとんど寄与していないことが示唆された。以上の結果から、PLB/LIP は脂質の消化に通常の食環境ではあまり寄与していない

か、または別の消化酵素が PLB/LIP の機能を代償していることが予想された。次に回腸粘膜の Ca<sup>2+</sup>非依存性と Ca<sup>2+</sup>依存性 PLA<sub>2</sub> 活性を検討した (図 5)。mPLB<sup>-/-</sup> では、Ca<sup>2+</sup>非依存性 PLA<sub>2</sub> 活性は検出感度以下の低レベルであるが、一方、Ca<sup>2+</sup>依存性 PLA<sub>2</sub> 活性は他の遺伝子型マウスと比べ増加していた。また、小腸下部 1/3 のリパーゼ活性は mPLB<sup>-/-</sup> で減少し、逆に小腸上部 1/3 のリパーゼ活性は増加していた。これらの結果は、PLB/LIP 欠損による Ca<sup>2+</sup>非依存性 PLA<sub>2</sub> 活性とリパーゼ活性の低下を他酵素作用が代償していると解釈できる。したがって、PLB/LIP は通常の食事摂取環境で脂質消化吸収にある程度関与していることが示唆された。今後は、代償作用のシグナルは何かどこでどのように伝えるかなどの詳しい解析や、以下に述べる新しい脂質一斉分析システムを用いた、肝臓、血中、小腸粘膜 (空腸、回腸) における脂質成分分子種組成の遺伝子型における比較を通して PLB/LIP 機能をさらに詳しく検討する予定である。

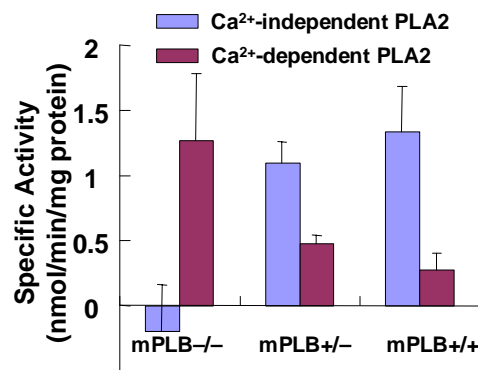


図 5. 回腸粘膜 PLA<sub>2</sub> 活性の比較

(3) 小腸に多種類存在する糖脂質測定に向けた一斉脂質分析システムの改良。

研究代表者が開発している 3 溶媒グラジエント HPLC) / MS システム (図 1) をガングリオシドなどの高極性脂質分析に対応したシステムに拡張した。ポンプや制御自動化部分はそのまま利用した。順相シリカゲル HPLC では、ヘキサン・イソプロパノール・水を主体にした溶出溶媒中の水の濃度を増加させることにより脂質を極性の順に溶出させる。グラジエント溶出に用いる 3 種類の溶媒 (A, B, C) のうち、C 溶媒組成を高極性脂質溶出用に変更した。このためには C 溶媒が二層分離しないように水含量を増加させなければならないが、Kundu と Scott により報告されている (J. Chromatogr. 232, 19-27, 2002) 組成をもとに微調整することにより、B と C 溶媒を用いたグラジエント溶出により酸性糖脂質を効率よく分離できる条件を決定した。カラムからの溶出液はオンラインでエレクトロスプレイイオン源に接続して、イオントラッ

ブ型 MS 装置 LCQdec-XPPlus (ThermoFischerScientific 社) で測定した。高極性脂質を溶出する溶媒条件では、エレクトロスプレー効率が高いので、安定なイオン化を保つために研究代表者が開発したフッ素ポリマーコーティング超撥水性 ESI チップ (FortisTip) の内径を従来より 10  $\mu\text{m}$  大きくすることにより目詰まりを防ぎ、糖脂質を安定にイオン化できることがわかった。これにより 1 pmol オーダの感度で MS スペクトルと MS/MS スペクトルを自動的に安定して測定できた。脂質は、MS<sup>2</sup> と MS<sup>3</sup> スキャンにより同定した。シアル酸や硫酸基は負電荷を持つので酸性糖脂質は負イオンモードで中性糖脂質は正イオンモードでのデータ依存的 MS<sup>2</sup>・MS<sup>3</sup> スキャンを行い一回のクロマトグラフィーで多くの情報を採取することができるようにした。

本システムでは、順相シリカゲル HPLC により脂質を低極性のものから順に極性に依りクラス分離できるので、糖鎖の少ないものから多いものに順に分離できた。さらに、ガングリオシドの場合、シアル酸の結合位置の違いにより生じる構造異性体もシリカゲルにより分離が可能であった。たとえば、シアル酸を二個含有し一個ずつ別の糖に結合する GD1a と二個のシアル酸が同じ糖に二個つながる GD1b が完全に分離され、それぞれのピークにおける MS/MS スキャンによる構造データを参考にするにより異性体の同定に威力を発揮した。一方、逆相 HPLC ではガングリオシドが含有する脂肪酸の長さ起因する疎水性の違いにより分離されるので、糖鎖の数による分離や異性体の分離が困難である。本システムは、この点において海外や国内で開発中の逆相 HPLC を用いるあるいは MS のみによるガングリオシド分析システムに比べ優れていた。

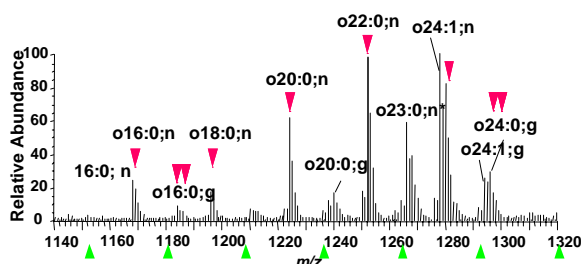


図 6. 脂肪組織ガングリオシド GM3 のマススペクトル。記号  $ox:y;n$ : o, 水酸化脂肪酸; x, 脂肪酸の炭素数; y, 脂肪酸の二重結合数; n, Neu5Ac; g, Neu5G. ▲, non-hydroxylated GM3; ▼, hydroxylated GM3; ▽, dihydroxylated GM3 などの矢印はそれぞれの GM3 分子種の  $m/z$  値を示す。

本システムの性能を検証するために、糖脂質

の含量が少なく、測定を妨害する大量の中性脂肪を含む脂肪組織のガングリオシド測定に応用した。C57BL/6J マウス脂肪組織には 3 残基の糖鎖からなる GM3 が主に存在し、さらに複雑な糖組成のガングリオシドは微量の GM1 等以外ほとんど検出できなかった。図 6 に示すように GM3 には non-hydroxyacyl 基と N-acetylneuraminy (Neu5Ac) 基を持つ分子種と hydroxyacyl 基と N-glycolylneuraminy ((Neu5G) 基を持つ分子種が主に検出された。脂肪酸とシアル酸基が二重に水酸化された分子種も存在する。分子種は MS<sup>2</sup> スキャンにより同定をした。このように測定の困難な脂肪組織を対象にしても良好な結果が得られたので、新たに作成できたホモ PLB/LIP 欠損マウスの解析を進めている。

## 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 4 件)

Tanabe, A., Matsuda, M., Fukuhara, A., Miyata, Y., Komuro, R., Shimomura, I., and Tojo, H. Obesity causes a shift in metabolic flow of gangliosides in adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 547-552 (2009) (査読有)

Jin, ZX., Huang, CR., Dong, L., Goda, S., Kawanami T., Sawaki T., Sakai T., Tong XP., Masaki Y., Fukushima T., Tanaka M., Mimori T., Tojo, H., Bloom, ET., Okazaki T., and Umehara, H. Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells. *Int. Immunol.* **20**, 1427-1437 (2008) (査読有)

Mizutani, Y., Kihara, A., Chiba, H., Tojo, H., and Igarashi, Y. 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *J. Lipid Res.* **49**, 2356-2364 (2008) (査読有)

Ikushiro, H., Islam, M., Tojo, H., and Hayashi, H., Molecular Characterization of Membrane-Associated Soluble Serine Palmitoyltransferases from *Sphingobacterium multivorun*, *Sphingobacterium spiritivorun* and *Bdellovibrio stolpii* *J. Bacteriol.* **189**, 5749-5761 (2007) (査読有)

[学会発表](計 8 件)

Tojo, H. and Tanabe, A. Lipidomics



shows that obesity causes a shift in steady-state metabolic flow of gangliosides downstream from GM3 in adipose tissues of murine genetic and nutritional disease models. Lipidomics and Lipids in Mass Spectrometry. 2009 ASMS Sanibel conference 2009年1月24日 フロリダ 米国

- ② 竹村 浩昌、東城博雅、近藤玄 遺伝子変異マウスを用いたホスホリパーゼ B/リパーゼの生理的機能の解析. BMB 2008 2008年12月9日 神戸
- ③ 田邊文, 福原淳範, 下村伊一郎, 東城博雅 肥満脂肪組織におけるスフィンゴ糖脂質代謝の変化ー HPLC/質量分析による解析. BMB 2008 2008年12月9日 神戸
- ④ Tojo, H. Igura, T., Nonomura, S., Sumi, R., Bando, Y., and Ito. T. A beneficial effect of polyphenol oligomers, oligonol, on choline deficiency induced fatty liver in mice. 49th International Conference on the Bioscience of Lipids 2008年8月29日 マーストリヒト、オランダ
- ⑤ Tojo, H. Sphingolipidomic Profiling of the Stratum Corneum of Mice with Keratinocyte-specific Deletion of Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Gene. 56th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 2008年6月4日 デンバー 米国
- ⑥ 竹村 浩昌、東城博雅、近藤玄 遺伝子変異マウスを用いたホスホリパーゼ B/リパーゼの生理的機能の解析 第80会日本生化学大会 2007年12月12日 横浜
- ⑦ Tojo, H. Lipidomic analysis based on normal-phase HPLC/mass spectrometry 5th Euro Fed Lipid Congress 2007年9月17日 ヨーテボリ、スウェーデン
- ⑧ Tojo, H. 48th International Conference on the Bioscience of Lipids Profiling of stratum corneum lipids by an HPLC/mass spectrometry-based automated lipid analyzer 2007年9月7日 ツルク、フィンランド

[図書] (計2件)

- ① 東城 博雅 リピドミクス 質量分析学 9章 大阪大学出版会 印刷中
- ② 東城 博雅 自動化脂質分析装置を用いた病態リピドミクス “メタボロミクスの先端技術と応用” 第20章、239-248頁 (シーエスシー出版) (2008)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東城 博雅 (TOJO HIROMASA)  
大阪大学・生命機能研究科・准教授  
研究者番号：90135707

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

近藤 玄 (KONDOH GEN)  
京都大学・再生医科学研究所・准教授  
研究者番号：40243258

### (4) 研究協力者

竹村 浩昌 (TAKEMURA HIROMASA)  
大阪大学・生命機能研究科・大学院生