

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：11401	
研究種目：若手研究（B）	
研究期間：2011～2012	
課題番号：23790074	
研究課題名（和文）	質量分析計を用いたアシル基多様性から紐解くホスホイノシタイドの生理機能解析
研究課題名（英文）	Establishment of the analytical method of phosphoinositide by using tandem mass spectrometry.
研究代表者	
	中西 広樹（NAKANISHI HIROKI）
	秋田大学・生体情報研究センター・助教
	研究者番号：10466740

研究成果の概要（和文）：本研究では、質量分析計を用いて生体微量成分であるホスホイノシタイドの新規定量分析法を開発した。確立した分析法は定量下限がアトモル、フェムトモルという高い感度を誇った。そして、種々の細胞や動物組織においてホスホイノシタイドの量ならびに質（アシル基多様性）を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed a sensitive and robust method to determine PIPs with different fatty acid compositions by using tandem mass spectrometry. This established analytical method was applicable to various biological samples such as cells and mouse tissues. In this research, we found that fatty acid compositions of PIPs had diversity.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リポミクス、ホスホイノシタイド、高感度分析法

## 1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトール（PI）とそのリン酸化による派生体はホスホイノシタイド（PIPs）と総称され、リン酸化状態の違いにより 8 種類に分類される。現在、PIPs 研究はこの 8 種類によってのみ理解され、生理機能解析が進められている。PIPs は 19 のリン酸化酵素と 29 の脱リン酸化酵素により代謝されるが、近年、遺伝子改変マウスやヒトの疾患遺伝子解析から PIPs は発がんやアレルギー、糖代謝、骨代謝、血管新生、神経発生など多様な生体調節機能を有することが明らかとなった。つまり、PIPs は様々な疾患実態を反映する代謝産物として期待され、これらを解析する技術を開発することは新たな予防・診断マーカーおよび創薬開発におい

て非常に意義がある。

PIPs が創薬および予防・診断マーカーとなりうるかを実証するには、様々な検体に適用可能で、かつハイスループット・高感度な定量分析法が必要である。しかしながら、現在の PIPs の主流な分析法は、放射性同位元素によって標識された脱アシル化 PIPs を HPLC で測定する半定量分析であり、試料調製に数日間を要し、また、ヒト試料に適用できない。さらに、試料調製時に脱アシル化するため脂肪酸組成（アシル基）の解析ができない。そこで、近年、脂肪酸分子種ごとに解析できる新しい PIPs の定性、定量分析法の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究は質量分析計を用いて脂肪酸分子種ごとに解析できる新しい PIPs の定性、定量分析法を開発し、種々の検体において PIPs のアシル基多様性を明らかにすることを目的とする。

本研究によりアシル基多様性を明らかにすることができれば、これまでイノシトール環のリン酸化状態により PIPs を 8 種類に分類して各 PIPs の生理機能を解析、考察、整理、理解する枠組みの中で進展してきた研究にパラダイムシフトを起こすことができる。さらに、世界で未だ絶対定量分析法が確立されていない PIPs の高感度定量分析法の開発は、将来的には診断、医薬品と治療法のイノベーションにつながる可能性をもつ。

### 3. 研究の方法

研究代表者が所属する研究室には、生化学、分子生物学の基本的実験に必要な機器を設置し、常時稼働させている。新技術開発に必要な液体クロマトグラフィーとトリプル四重極型質量分析装置、各 2 台を備えており、本研究を効率的に遂行する体制は概ね整っている。以下に研究計画の詳細を述べる。

#### (1) 試料前処理法の検討

陰イオン性代謝物である PIPs は①ピークチューブやカラムなどの LC システムライン上への吸着と、それに伴う溶出ピークのテーリングが起きやすい。さらに、②生体内微量物質であること、③代謝・分解されやすく不安定であること、が相まって分析するが難しい。そこで、各問題点について次の対応策をとる。①金属含有の少ないカラムを用いたり、インジェクター部分を非金属製のイナート材質を用いるなどの工夫で吸着軽減を目指す。さらに、②前処理段階でのカラムによる精製を行い高い濃度での PIPs 画分の回収を目指し、③イノシトール環のリン酸基を化合物により保護することで代謝と分解を極力抑えた条件を見出す。

#### (2) 高感度 PIPs 分析法の確立

LC システムの移動相や流速を加味した最適なイオン化条件を検討する。さらに、高感度かつ高分解能を誇るトリプル四重極型質量分析装置を用いた選択反応モニタリング法によりシグナル/ノイズ比をあげることで高感度化を目指す。

#### (3) 種々の培養細胞と動物組織の PIPs 分子種の定量解析

開発した分析法を用いて定常状態（無刺激）時の様々な培養細胞株とマウスの多臓器

の一斉定量解析を行い、分析法の有用性を検証するとともに、種々の検体での PIPs 内在量をデータベースとしてまとめる。

#### (4) 種々の代謝酵素欠損マウスを用いた PIPs 分子種の変動解析

PIP3 脱リン酸化酵素である PTEN と SHIP1 の欠損マウスでは、PIP<sub>3</sub> がコントロールマウスよりも蓄積していることが考えられる。T 細胞や好中球において異なる表現型を示すそれぞれの代謝酵素欠損マウスで PIP3 のアシル基が異なるかどうか確かめる。さらに、特定の刺激した際に PIPs がどのように変動するのか検証する。

### 4. 研究成果

本研究では、質量分析計を用いて PIPs の新規高感度定量分析法を開発し、基質が同じにもかかわらず異なる表現型を示す代謝酵素欠損マウスの PIPs 分子種を解析することで、アシル基の多様性による特有の生理機能を解明することを目的としている。

当初の研究計画にのっとり実験を進め、以下の成果があがった。

#### (1) 試料前処理法の検討

生体試料からの高回収抽出法と吸着低減防止策の確立を目的とし、以下の方法をとった。①金属含有量の少ないカラムや吸着保護材を用いることで LC システムライン上への吸着を軽減させた。②陰イオン交換カラムを用いて PIPs 画分を高回収した。さらに、③リン酸基の影響による不安定性（吸着と分解）と低イオン化効率を改善するためにリン酸基にメチル化処理を施した。これにより、吸着・分解・代謝を大幅に防ぐことができた。

#### (2) 高感度 PIPs 分析法の確立

標準化合物を用いて測定パラメーターの最適化、ならびに選択反応モニタリング法を用いて高いシグナル/ノイズ比での高感度分析法を確立した。開発した分析法は、繰り返し再現性と安定性に優れた強固な分析法であり、従来の放射性同位元素を用いた HPLC 法のおよそ 1,000 倍の感度を誇る数百アトモルから数フェムトモルを定量限界とした。さらに、1 試料の測定時間が 25 分と短く、同時に 100 超の多分子種の測定が可能である。

#### (3) 種々の培養細胞と動物組織の PIPs 分子種の定量解析

確立した分析法がどのような試料に対して適用可能か、培養細胞、マウス組織、ヒト血液などを用いて検証したところ、すべての検体で PIPs を感度良く測定することができた。

そして、解析結果から細胞株ごと、組織ごとで各PIPsの絶対量と主要な分子種（アシル基）の割合が異なっていた。これにより、PIPsにおけるアシル基多様性の重要性を示唆することができた。

(4) 種々の代謝酵素欠損マウスを用いた PIPs 分子種の変動解析

PIP3 脱リン酸化酵素である PTEN と SHIP1 の欠損マウスの種々の組織における PIP3 を解析し、基質特異性（アシル基の認識）が異なることを見出した。さらに、種々の代謝酵素欠損マウスや刺激の違いにより特定の PIPs 分子種の量と割合が変動ことを明らかにした。

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 9 件)

- ① 中西広樹. 酸性リゾリン脂質を量る. 実験医学別冊. 118-123. 2013. 査読無
- ② Morita M., Nakanishi H., Imai Y. (計 22 名 研究代表者は 13 番目) The Lipid Mediator Protectin D1 Inhibits Influenza Virus Replication and Improves Severe Influenza. *Cell* 153, 1-14. 2013. 査読有  
DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.027.
- ③ Maekawa K., Nakanishi H., Saito Y. (計 19 名 研究代表者は 12 番目) Global metabolomic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 59C, 76-85. 2013. 査読有  
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.008.
- ④ Yoshizawa T., Nakanishi H., Shindo T. (計 22 名 研究代表者は 18 番目) Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system. *Hypertension* 61, 341-351. 2013. 査読有  
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00647.
- ⑤ Isobe Y., Arita M., Nakanishi H., Arai H. (計 12 名 研究代表者は 6 番目) Identification and Structure Determination of Novel Anti-inflammatory Mediator Resolvin E3, 17,18-Dihydroxyeicosapentaenoic Acid. *J. Biol. Chem.* 287, 10525-10534. 2012. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M112.340612

- ⑥ Imae R., Nakanishi H., Arai H. (計 10 名 研究代表者は 7 番目) LYCAT, a homologue of *C. elegans* acl-8, acl-9, and acl-10, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice. *J. Lipid Res.* 53, 335-347, 2012. 査読有  
DOI: 10.1194/jlr.M018655
- ⑦ 中西広樹. 酸性リン脂質の高感度分析法とその臨床的有意性. JSB MS Letters・日本医用マスペクトル学会誌. 36, 24-30. 2011. 査読無
- ⑧ Arimitsu N., Nakanishi H., Tani K. (計 11 名 研究代表者は 8 番目) p125/Sec23-interacting protein (Sec23ip) is required for spermiogenesis. *FEBS Lett.* 585, 2171-2176. 2011. 査読有  
DOI:10.1016/j.febslet.2011.05.050
- ⑨ Yamamoto K., Nakanishi H., Murakami M. (計 20 名 研究代表者は 18 番目) Hair follicular expression and function of group X secreted phospholipase A2 in mouse skin. *J. Biol. Chem.* 286, 11616-11631. 2011. 査読有  
DOI:10.1074/jbc.M110.206714

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中西広樹. 質量分析計を用いたイノシトールリン脂質の一斉定量分析系の開発. 第 54 回日本脂質生化学会. 2012 年 6 月 7 日 九州大学 (福岡)
- ② 中西広樹. 脂質メタボロミクスから理解する炎症性疾患. 第 48 回シグナル伝達医学グローバル COE 学術講演会. 2011 年 9 月 7 日 神戸大学 (神戸市)
- ③ Hiroki Nakanishi. Analyses of lipid localization/lipid metabolism on mouse retina using laser microdissection. The 30<sup>th</sup> Naito Conference. 2011 年 6 月 29 日 シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (札幌市)
- ④ 中西広樹. 質量分析計を用いたイノシトールリン脂質の高感度測定. 第 10 回生命科学研究会. 2011 年 6 月 24 日 ホテルメトロポリタン高崎 (高崎市)

[図書] (計 3 件)

- ① Taguchi R., Ikeda K., Nakanishi H. Lipidomics for elucidation of Metabolic Syndrome and related Lipid Metabolic Disorder. *Lipidomics*,

*Technologies and Applications.*  
223-250. 2012.

- ② 中西広樹. リン脂質およびリン脂質酸化物の分析. 試料分析講座・脂質分析. 101-118. 2011.
- ③ 中西広樹. MS イメージングによる脂質の局在解析. 試料分析講座・脂質分析. 171-177. 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~arcbs/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 広樹 (NAKANISHI HIROKI)  
秋田大学・生体情報研究センター・助教  
研究者番号：10466740