

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253006

研究課題名(和文)新規グリセロリン脂質の発見とその代謝・生命機能の解明

研究課題名(英文)Metabolism and functions of novel phospholipids

研究代表者

佐々木 雄彦(Sasaki, Takehiko)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50333365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：疾患の原因となる遺伝子の変化や環境因子への暴露は、細胞膜のリン脂質構成に影響を与えることが多い。例えばがんにおいては、リン脂質が細胞周期、生存、細胞運動やがん細胞の代謝特性などの調節因子として働くことが知られている。本研究でわれわれは、独自に開発した質量分析をベースにした脂質動態解析方法と疾患モデル/遺伝子改変マウスを活用して、疾患に関連する膜リン脂質シグナル伝達系の解明を目指した。そして、がんや炎症性疾患モデルにおいて変動するいくつかの新規脂質を発見した。興味深いことに、そのうちの一つは細胞外にも存在することを見出し、また、その代謝に関わる酵素を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Genetic and environmental triggers of diseases often alter bioactive lipid products in cellular membranes. For example, membrane phospholipids modulate important biological processes such as cell cycle, survival, metabolism and motility, which are often disrupted in cancer. The central focus of our research is to understand disease-associated signaling networks which involve membrane phospholipids. The strength of our research relies on mass spectrometry technologies for lipidomics as well as genetically modified mouse disease models. We have identified novel phospholipids, the levels of which are increased in various pathological conditions associated with cancers and inflammatory diseases in mice. Our genetic and biochemical studies revealed that one of these novel lipids can be liberated from the membrane and acts as an extracellular signaling molecule, and identified the enzymes involved in its metabolism.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂質 細胞膜 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

脂質は、膜を構成する細胞の基本要素であり、エネルギー源としての役割に加え、局所の生理活性物質やその前駆体として働くなど、多彩な機能を持っている。特に細胞内含量が微量なリン脂質は、タンパク質の活性や局在を制御し、細胞の生理応答につながる生化学反応をオーガナイズしている。

我々は、リン脂質の一種ホスファチジルイノシトール (PI) と 7 種類のリン酸化代謝産物であるイノシトールリン脂質群 (PIPs) の生理的役割について研究を進めていた。PIPs の相互変換を司るキナーゼやホスファターゼの遺伝子欠損マウスを 30 系統以上、独自に作製・解析し、PIPs 代謝酵素の異常が細胞死、増殖、分化、遊走、物質代謝といった細胞応答の異常につながり、個体レベルでは癌、免疫・炎症性疾患、糖・脂質代謝異常、神経変性疾患、心不全といった幅広い病態を導くことを明らかにしていた。ヒト疾患においても実際に、48 種類の PIPs 代謝酵素のうち 17 種の酵素の遺伝子異常が報告されている。例えば PIPs 分解酵素の一つ PTEN の活性欠失変異は、ヒト癌で p53 に次いで最も頻繁に認められる遺伝子異常である。このように、リン脂質、特に PIPs の代謝による生体制御機構の理解は、学術的にも医薬・医療応用の観点からも、注目を集める研究分野の一つといえる。

一方で、PIPs 代謝研究には未だ十分に取組みされていない困難な課題があった。それは、代謝酵素遺伝子変異による生命現象の異常が、PIPs のいかなる変動に起因するものであるかの理解である。別の言い方をすると、PIPs 動態の視点から生体調節機構を理解することである。その背景には、PIPs 定量解析技術が未成熟であり、試験管レベルの実験で PIPs 代謝酵素と目されている

酵素の、細胞内における真の基質・生成物が多くの場合解明されていない。このような問題意識に基づき、PIPs やその他リン脂質の定量解析技術を開発し、代謝酵素遺伝子改変マウス、細胞での脂質動態解析を行っていた。

2. 研究の目的

新規生体物質の発見は、多様な研究展開の要となる大きな可能性をもつ。PIPs を含む新規リン脂質を同定し、その生成、分解を担う酵素や、脂質が制御するタンパク質を同定することで、生理的な機能の解明や関連疾患に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

脂質動態解析には主に、逆相カラムクロマトグラフィーと三連四重極型質量分析装置での選択反応モニタリングによる定量技術を用いた。一部の実験は、ラジオアイソトープ標識サンプルの強イオン交換クロマトグラフィーで行った。

疾患モデルとしては主に、PIPs 代謝酵素欠損マウスを用いた。がん、炎症性疾患、成長障害の表現型評価とともに、組織、血液などを検体として、リン脂質変動を解析した。

その他、培養細胞での遺伝子過剰発現や試験管内での酵素活性測定、脂質-タンパク質間相互作用解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアに局在する PLIP は、チロシンリン酸化タンパク質、PI5P、ならびに機能不明のリン脂質であるホスファチジルグリセロールリン酸を脱リン酸化する酵素である。活性中心近傍のアミノ酸を任意に置換した変異体タンパク質がもつ上記基質に対する活性をスクリーニングし、チロシンリン

酸化タンパク質と PI5P の脱リン酸化能を保持しつつ、ホスファチジルグリセロールリン酸の脱リン酸化活性を特異的に消失する変異体を得た。この変異体ならびに野生型酵素を発現するアデノウイルスを作製し、肝細胞特異的 PLIP 欠損マウスに静注し、肝臓にこれらを発現させた。その結果、成長障害、インスリン様成長因子レベルの低下といった表現型が、野生型 PLIP の発現で回復された一方で、変異体の導入ではレスキューされなかったことから、ホスファチジルグリセロールリン酸の蓄積が、成長障害の原因であることを明らかにした。ホスファチジルグリセロールリン酸の結合タンパク質探索を進めたが、現在までに標的タンパク質の同定には至っていない。

(2) がん抑制遺伝子 PTEN 欠損マウスから採取したがん組織や、SHIP1 をはじめとする PIPs 代謝酵素欠損マウスでの炎症組織や心筋症組織などを検体として、リン脂質動態解析を行い、研究開始当初に得ていたものを含めて 5 種類の新規リン脂質を同定した。このうちの一つである PIPX は正常前立腺には存在しないが、前立腺の前がん病変 (PIN) で高レベルに検出され、がん組織においても蓄積することを見出した。培養細胞での高発現実験によって、種々のがんで活性化型変異が見出される phosphoinositide-kinase 3 α が PIPX の生成に関与すること、また、がん抑制遺伝子産物 INPP4B が分解に関与することが明らかとなった。INPP4B と PTEN の二重欠損マウスに生じる甲状腺がん (発表論文 12: それぞれ単独の欠損マウスは発がんしない) 組織でも PIPX の蓄積が確認された。興味深いことに、ラジオアイソトープラベルによるリン脂質解析では不可能であった、細胞の培養上清や血液中の脂質解析によって、PIPX が細胞内のみならず細胞外にも存在することを見出した。さらに、3 種類の PIPX 標的タンパク質候補を同定した。

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 15 件)

1. Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, Takubo K, Goto M, Nagata K, Nakanishi H, Shindou H, Okamura T, Ito C, Toshimori K, Sasaki T, Shimizu T: Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J Biol Chem.* **in press**, 2017
2. Shindou H, Koso H, Sasaki J, Nakanishi H, Sagara H, Nakagawa KM, Takahashi Y, Hishikawa D, Iizuka-Hishikawa Y, Tokumasu F, Noguchi H, Watanabe S, Sasaki T, Shimizu T: Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem.* **in press**, 2017
3. Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A.: MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2017.58., 2017
4. Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa SI, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y,

- Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, Setou M, Yabe H.: Decreased 16:0/20:4-phosphatidylinositol level in the post-mortem prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Sci Rep*. 7:45050, 2017
5. Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T: Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. *JCI Insight* 2, e89462, 2017
 6. Morioka S, Nigorikawa K, Sasaki J, Hazeki K, Kasuu Y, Sasaki T, Hazeki O: Myeloid cell-specific inositol polyphosphate-4-phosphatase type I knockout mice impair bacteria clearance in a murine peritonitis model. *Innate Immun* 6, 444-451, 2016
 7. Huang M, Koizumi A, Narita S, Inoue T, Tsuchiya N, Nakanishi H, Numakura K, Tsuruta H, Saito M, Satoh S, Nanjo H, Sasaki T, Habuchi T: Diet-induced alteration of fatty acid synthase in prostate cancer progression. *Oncogenesis* 5, e195, 2016
 8. Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki SO, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-Ya K, Mimori K, Suzuki A.: Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- β signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 113, E71-80, 2015
 9. Norton L, Lindsay Y, Deladeriere A, Chessa T, Guillou H, Suire S, Lucocq J, Walker S, Andrews S, Segonds-Pichon A, Rausch O, Finan P, Sasaki T, Du CJ, Bretschneider T, Ferguson GJ, Hawkins PT, Stephens L: Localizing the lipid products of PI3K γ in neutrophils. *Adv Biol Regul* 60, 36-45, 2015
 10. Hammond GR., Takasuga S., Sasaki T, Balla T.: The ML1Nx2 phosphatidylinositol 3,5 bisphosphate probe shows poor selectivity in cells. *PLoS One* 10: e0139957, 2015
 11. Nigorikawa K., Hazeki K., Sasaki J., Omori Y., Miyake M., Morioka S., Guo Y., Sasaki T, Hazeki O.: Inositol polyphosphate-4-Phosphatase type I negatively regulates phagocytosis via dephosphorylation of phagosomal PtdIns(3,4)P2. *PLoS One* 10: e0142091, 2015
 12. Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T: INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discovery*. 5, 730-739, 2015
 13. Chew CL, Lunardi A, Gulluni F, Ruan DT, Chen M, Salmena L, Nishino M, Papa A, Ng C, Fung J, Clohessy JG,

Sasaki J, Sasaki T, Bronson RT, Hirsch E, Pandolfi PP: In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K/AKT signaling at endosomes. *Cancer Discovery*. **5**, 740-751, 2015

14. Ip LR, Poulgiannis G, Viciano FC, Sasaki J, Kofuji S, Spanswick VJ, Hochhauser D, Hartley JA, Sasaki T, Gewinner CA.: Loss of INPP4B causes a DNA repair defect through loss of BRCA1, ATM and ATR and can be targeted with PARP inhibitor treatment. *Oncotarget*. **6**, 10548-10562, 2015
15. Ayukawa T., Akiyama M., Mummery-Widmer JL., Stoeger T., Sasaki J., Knoblich JA., Senoo H., Sasaki T, Yamazaki M.: Dachous-Dependent Asymmetric Localization of Spiny-Legs Determines Planar Cell Polarity Orientation in Drosophila. *Cell Rep*. **8**, 610-621, 2014

[学会発表] (計 18 件)

1. 佐々木雄彦, 細胞膜リン脂質の修飾, 国際高等研究所 研究プロジェクト「生命活動を生体高分子へ修飾から俯瞰する」2014年第1回 研究プログラム、平成26年9月9-10日 京都
2. Takehiko Sasaki, Critical roles of class III PI3K in myofibril maintenance and protein quality control in cardiomyocytes, 39th Symposium on Hormones and Cell Regulation European Society of Endocrinology 平成26年10月9-12日 Mont Ste Odile, Alsace, France
3. Takehiko Sasaki, A New Methodology for Studying Phosphoinositide Signaling at the Molecular Species Level,

PI3-Kinase Signaling Pathways in Disease, Keystone Symposium, 平成27年1月13-18日, Vancouver, British Columbia, Canada

4. Takehiko Sasaki, Endosomal phosphoinositide metabolism and associated diseases, 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 平成27年2月10-12日, Tokyo, Japan
5. Hiroataka Kimura, Satoshi Eguchi, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, The Class III PI3K and phosphatidylinositol 3-phosphate ensure structural and functional integrity of cardiomyocytes, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会, 平成27年3月21-23日, 神戸
6. 中西広樹、江口賢史、石川将己、鈴木聡、佐々木純子、佐々木雄彦, ホスホイノシタイドの新しい解析方法, 第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会 合同大会 平成27年12月1-4日 神戸
7. 木村洋貴、江口賢史、久場敬司、今井由美子、高須賀俊輔、伊藤玲悦、中村亮太郎、中西広樹、石川将己、佐々木純子、山崎正和、佐々木雄彦, 心肥大におけるホスホイノシタイド代謝酵素 Vps34 のタンパク質分解機構の役割, 第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会 合同大会 平成27年12月1-4日 神戸
8. 佐々木雄彦, ホスホイノシタイドによる生体調節機構, 第28回高遠シンポジウム 平成28年8月25-26日 長野
9. 佐々木雄彦, イノシトールリン脂質代謝と病態, 日本脂質栄養学会 第25回大会 平成28年9月16日 秋田

10. Takehiko Sasaki, Hiroki Nakanishi, Satoshi Eguchi, Masaki Ishikawa, Akira Suzuki, Junko Sasaki, A method for studying quality of phosphoinositides, 第39回日本分子生物学会 平成28年11月30-12月2日 横浜

〔図書〕(計 2 件)

1. 佐々木雄彦(2015) 細胞内脂質シグナル関連因子 序. 脂質代謝異常と関連疾患 (下巻)、269、エル・アイ・シー社
2. 高須賀俊輔、佐々木雄彦 (2015) イノシトールリン脂質代謝酵素. 脂質代謝異常と関連疾患 (下巻)、303-313、エル・アイ・シー社

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：新規リン脂質およびその利用
発明者：佐々木雄彦、中西広樹、石川将己、上野紀子、江口賢史、佐々木純子
権利者：秋田大学・ALTe LLC.
種類：特許
番号：特願 2016-144177
出願年月日：平成 28 年 7 月 20 日
国内外の別：国内

名称：ホスホイノシタイト分離測定法の開発
発明者：中西広樹、佐々木雄彦、佐々木純子、江口賢史、中西貴代
権利者：秋田大学・ALTe LLC.
種類：特許
番号：特願 2017-51354
出願年月日：平成 29 年 3 月 14 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 雄彦 (SASAKI, Takehiko)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50333365

(2) 研究分担者

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

江口 賢史 (EGUCHI, Satoshi)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70457117

高須賀 俊輔 (Takasuga, Shunsuke)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90375262

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()