

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19016

研究課題名(和文)新規脂質メタボローム解析法による微量グルコース化脂質の神経機能の解明

研究課題名(英文)Development of glycosylated lipid metabolomics system for clarifying their neuronal function

研究代表者

中嶋 和紀(Nakajima, Kazuki)

藤田保健衛生大学・その他部局等・講師

研究者番号：10442998

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)：我々が長年研究を進めてきた微量グルコース化脂質は、エネルギー代謝の制御調節や神経変性疾患の発症に関与する。本研究では、従来の方法では見逃されていた微量グルコース化脂質の分析方法を開発し、その機能の全貌を明らかにすることを目的とする。具体的には脂質抽出から分離分析までを改めて見直しを図ったシステム、すなわち1)グルコース化脂質の選択的濃縮法、2)親水性相互作用クロマトグラフィーによる分離法、3)イオンモビリティシステムによる気相分離法、4)選択的なMS検出法などを融合した解析法を構築した。本法によりエネルギー代謝調節におけるGPR55を介したLPGとLPIの機能の違いについて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mono-glucosylated sphingolipids and glycerophospholipids play important roles in diverse biological processes and are linked to a variety of pathologies, such as Parkinson disease. The precise identification of the carbohydrate head group of these lipids is complicated by their isobaric nature and by a low abundant amounts in biological samples. Therefore, the challenging researches for monitoring glucosylated lipids is to develop chromatographic method to separate lipids that are not distinguished by regular MS alone. To overcome these obstacles, we have established a novel target lipidomics workflow for efficiently detecting such lipid species. The workflow includes 1) enrichment by affinity chromatography using newly developed benzoboloxole-modified column, 2) separation by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography, 3) gas-phase separation by ion-mobility system, and 4) screening assay system by triple quadrupole mass spectrometer.

研究分野：生化学

キーワード：グルコース化脂質 固相抽出 親水性相互作用クロマトグラフィー 気相分離 脂質メタボローム 神経新生 肥満 腎疾患

## 1. 研究開始当初の背景

グルコースは生命の生存と機能にとって最も重要な化合物である。特に脳では常にその大半は ATP 産生に消費され、その一部は脂質合成に使われる。脳は脂質の豊富な組織であるため、脂質研究は重要な分野として発展してきた。近年、発達進歩の著しい質量分析計(MS)により複合脂質の網羅的解析が可能になり、各種疾患マーカーの探索や新しい生物機能を持った脂質や代謝経路が明らかにされつつある。

我々が所属する研究室では幾つかのグルコース化脂質を発見し、それらがニューロン・グリア間のシグナル分子として機能することを明らかにしてきた。例えばスフィンゴ脂質の一種であるグルコシルセラミドは、ゴーシェ病等の神経変性疾患において過剰蓄積が認められる。GlcCer はグルコース化ステロール(GlcChol)合成のグルコース供与体にもなる(Akiyama et al. *BBRC*, 2013)。

グルコース含有グリセロリン脂質(ホスファチジルグルコシド: PG)は、胎児の脳に極微量に発現しており、神経発生過程のステージによってその発現量が変動する。その発現部位は胎児の幹細胞、特にラジアルグリアに特に強く、胎生後期には劇減する。PG はリン脂質であるため、ホスホリパーゼ A2 により消化されてリゾ体(LPG)を生じる。その機能について、LPG として神経細胞末端の成長円錐に働いて強力な反発応答を引き起こす。

昨今のリポミクス研究は、MS 装置の発展と、膨大な実験データを解析処理する脂質同定ソフトが整備されて、比較的含有量が多い脂質の網羅的解析が可能になりつつある。一方、脂質の精製などの試料調製過程は依然として昔ながらの方法が用いられており、進展がないままである。なかでも PG をはじめとする脳内グルコース化脂質の解析が進まない根本的な原因は、1)これらが極微量であることのほか、2)脳には構造的に糖残基のみ異なるイノシトール化脂質やガラクトース化脂質が多量に含まれるため微量グルコース化脂質の検出が難しいことによる。すなわち試料の取り扱いには生化学の知識と分離分析の経験が必要である。本研究では試料調製過程に着目して、従来のオミクス研究で見逃されていた機能的に重要な微量グルコース化脂質代謝産物の解析技術を構築する。

## 2. 研究の目的

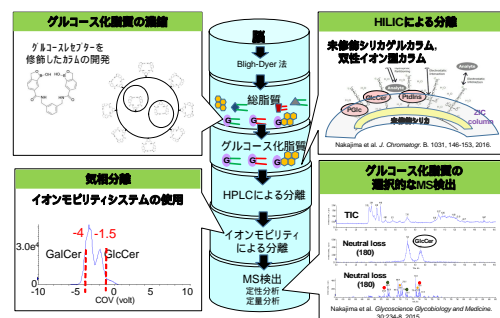
我々が長年研究を進めてきた微量グルコース化脂質は、エネルギー代謝の制御調節に関与し、神経変性疾患、自己免疫疾患、腎疾患の疾患発症に関与する。本研究では、従来の方法では見逃されていた微量グルコース化脂質代謝産物の分析方法の開発を行い、その代謝調節と機能の全貌を明らかにすることが目的である。具体的には、脂質抽出から

分離分析までを改めて見直しを図ったシステムを構築し、グルコース化脂質の生物学的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究は図1に示すように、1)グルコース化脂質の選択的濃縮法、2)それらを分離する親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)による分離、3)イオンモビリティシステムによる気相分離、4)グルコース化脂質を選択的に捉える MS 検出法を組み合わせたワークフローを構築した。また並行して、5)LC-MS システムの高感度化や6)実験動物の処理法を検討した。

図1. 微量グルコース化脂質の解析ワークフロー



さらに本システムを用いて7)グルコース関連の新規脂質代謝産物を探索、8)神経変性疾患や腎疾患の病態メカニズムを検討した。

## 4. 研究成果

### 1) グルコース化脂質に選択的なベンゾボロキソール(BB)カラムの開発および濃縮法の検討

ベンゾボロキソール誘導体(BB)はグルコース認識能を高めたグルコースレセプターである。BB は従来型のフェニルボロン酸(PBA)に比べて、グルコースに対して30倍程度高い結合能を有する。本研究ではアミノ BB を化学合成した後、アミノ BB をシリカゲルもしくはアガロースに修飾した新規固相抽出カラムを開発した。

本研究では計5種類の試作品を作成して、精製効果を検証した。BB アガロースを用いた場合、GlcCer の回収率は PBA アガロースに比べて約2倍向上した。しかし脳由来脂質混合物を精製する場合、大量に含まれる GalCer も一緒に濃縮された。すなわちグルコース化脂質に対する選択性は依然として認められなかった。本研究では BB カラムの開発を中止して、市販されている PBA アガロースを使用した。

### 2) HILIC による分離と解析

双性イオン型(ZIC)カラムを脂質分析に初めて適用した。最適化の結果、GlcCer と

ガラクトシルセラミド(GalCer)は良好に分離され、グルコース化脂質やホスファチジルイノシトールやそのリゾ体を優先的に結合する特長を見出した。GlcCerは脳の嗅球や視床下部で多く、一方、GalCerは白質が多い延髄や海馬に多く含まれた。GlcCerの脂肪酸鎖の違いによっても脂質を分離できたことから、皮膚に含まれる多様なGlcCer分子種をヒドロキシル基の違いによって分離・識別できることも明らかになった(論文1)。

### 3) イオンモビリティによる気相分離

GlcCerやPGを高選択的に定量するため、イオンモビリティシステム(SelexION)を採用した。本システムによりPGを糖の違いに基づいて気相分離が可能であった。脂肪酸鎖のsn異性体は分離できなかった。本システムによりマウス胎生13日目の頭部や肺組織からPGを定量できた。5) LC-MS測定の高感度化も併せて検討した。リゾホスファチジルグルコシド(LPG)の測定感度は約20倍高められることがわかった(論文2)。

### 4) グルコース化脂質の選択的MS検出

三連四重極型質量分析計のニュートラルスキャンモードを採用した。このモードは特定の骨格をもつ化合物を探すときに使用するモードで、MS/MS測定で得られるフラグメントイオンとプレカーサーイオンの差(ニュートラルロス)を指標にMS検出を行う。グルコース化脂質の場合、ヘキサースの脱離により生じるm/z 180の質量差を指標にした。ショウジョウバエ由来のGlcCerを解析した結果、ショウジョウバエに特有なスフィンゴシンをもつGlcCerを検出できた(論文3)。

### 6) 脳内酵素瞬時不活性化装置を用いた実験動物の処理

PGは不安定なため、脳組織を取り出す際に死後分解される、もしくは抽出後すぐ酸化されて分解されて解析が困難である。本研究ではマイクロウェーブで処置したマウスの脳からPGを調製し、回収率を検証した。その結果、マイクロウェーブで処理してもPG群の回収率が高まらないこと、すなわちマイクロウェーブの効果は認められないことがわかった。

### 7) 新規代謝物の探索およびグルコース化ステロール群の発見

これまで脳での存在は未報告であったGlcCholについて、ニワトリの脳から精製して構造決定した。今日に至るまで、動物における糖化ステロールは一種類しか報告されていなかったが、本システムによりGlcCholと構造が類似した一群の糖化ステロールが脳内に存在することを見出した(論文4)。

### 8) エネルギー代謝におけるPG関連代謝物の意義

LPGの受容体GPCR受容体(GPR55)ノックアウトマウスでは高脂肪食耐性の表現型を示すことから、LPGは肥満や加齢の基盤となるエネルギー代謝制御に関与していると考えられる。そこで肥満モデルにおけるLPGとLPI群を解析した。高脂肪食を与えた肥満マウスの血清にて、アラキドン酸をもつLPIが1.5倍に増加していた。血清中からLPGは見ることが出来なかった。そのGPR55-KOマウスでは変化が認められなかった。今後はエネルギー代謝調節におけるLPGとGPR55との関連性を検討する予定である。

### 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7件)

1. Nakajima K., Akiyama H, Tanaka K, Kohyama-Koganeya A, Greimel P, Hirabayashi Y. Separation and analysis of mono-glucosylated lipids in brain and skin by hydrophilic interaction chromatography based on carbohydrate and lipid moiety. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1031, 146-53 (2016). (査読有)

2. 長塚靖子、中嶋和紀、平林 義雄  
新しい脳脂質 - ホスファチジルグルコシドとそのリゾ体脂質の生物機能、*生体の科学*, 67.3 (2016). (査読無)

3. Nakajima K., Koyama-Koganeya, K., Hirabayashi, Y. Profiling of glucosylceramides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Glycoscience & Biology and Medicine*, 562-570 (2014). (査読無)

4. Akiyama H, Nakajima K., Ito Y, Sayano T, Ohashi Y, Yamaguchi Y, Greimel P, Hirabayashi Y. Aglycon diversity of brain sterylglucosides: Structure determination of cholesteryl- and sitosterylglucoside. *J. Lipid. Res.* 57, 11, 2061-2072 (2016). (査読有)

5. Kizuka Y, Funayama S, Shogomori H, Nakano M, Nakajima K. et al(他8名) High-sensitivity and low-toxicity fucose probe for glycan imaging and biomarker discovery. *Cell Chem. Biol.* 23, 7, 782-92 (2016). (査読有)

6. Chanmee T, Ontong P, Izumikawa T, Higashide M, Mochizuki N, Chokchaitaweek C, Khansai M, Nakajima K., Taniguchi N et al. (他3名) Hyaluronan production regulates

metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling.

*J. Biol. Chem.* 291, 46, 24105-24120 (2016).

(査読有)

7. Suzuki M, Fujikake N, Takeuchi T, Kohyama-Koganeya A, **Nakajima K**, Hirabayashi Y et al. (他 3 名) Glucocerebrosidase deficiency accelerates the accumulation of proteinase K-resistant  $\alpha$ -synuclein and aggravates neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 24, 23, 6675-86 (2015).

(査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. **中嶋和紀**、高橋和男、伊藤辰将、加藤彰浩、今西進、原田健一、長尾静子、湯澤由紀夫、腎臓スフィンゴ糖脂質網羅的ワークフローの構築、第 29 会 腎と脂質研究会、2017 年 3 月 18 日 広島、ホテルグランヴィア広島 (口頭発表)

2. **中嶋和紀**、新規グライコリピドミクス解析技術による微量糖脂質の神経機能・腎機能の解明、第 54 回環境医学研究所 第 45 回順天堂浦安病院研究推進委員会 合同セミナー、2017 年 2 月 10 日、千葉、順天堂大学医学部附属浦安病院 2 号館 8F カンファレンスルーム (招待講演)

3. **中嶋和紀**、新規脂質メタボローム解析技術を用いた微量グルコース化脂質の神経疾患・腎疾患における役割解明、糖鎖中部拠点 第 13 回若手のカフォーラム、2016 年 11 月 26 日、岐阜大学応用生物科学部講義室 (口頭発表)

4. **中嶋和紀**、秋山央子、長塚靖子、岩淵和久、高橋和男、湯澤由紀夫、平林義雄、HILIC-ESI-MS によるグルコース化異性体の定性・定量分析とその臨床応用 第 27 回クロマト科学会議、2016 年 11 月 17 日、東京、慶應義塾大学薬学部 (口頭発表)

5. **中嶋和紀**、秋山央子、長塚靖子、岩淵和久、高橋和男、湯澤由紀夫、平林義雄 HILIC-ESI-MS によるグルコース化異性体の定性・定量分析とその臨床応用、第 41 回 医用マススペクトル会議年會、2016 年 9 月 14-15 日、名古屋、ウインク愛知

6. **中嶋和紀**、秋山央子、長塚靖子、岩淵和久、高橋和男、湯澤由紀夫、平林義雄 HILIC-ESI-MS によるグルコース化異性体の定性・定量分析とその臨床応用、

第 35 回日本糖質学会年會、2016 年 9 月 1-3 日、高知、高知市文化プラザかるぽーと、口頭発表

7. **中嶋和紀**、長塚靖子、中山仁志、伊藤拓夢、上口裕之、岩淵和久、平林義雄 平林義雄、LC-Ion mobility-ESI-MS/MS によるホスファチジルグルコシド代謝物の高感度・高選択的定量法、第 34 回日本糖質学会年會、2015 年 9 月 15 日、東京、東京大学安田講堂 (ポスター発表)

8. **中嶋和紀**、分離技術を駆使した微量グルコース化脂質の解析アプローチ、第 57 回日本脂質生化学会年會 ランチョンセミナー、SCIEEX、2015 年 5 月 18 日東京、一橋講堂 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

1. 平林義雄、秋山央子、中嶋和紀、グルコース化脂質の新機能、生化学 86, 6, 735-43 (2015) 査読無

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
中嶋和紀 (Kazuki Nakajima)  
学校法人 藤田学園 藤田保健衛生大学・研究支援推進センター・学術研究支援推進室  
研究者番号：10442998

(2)研究分担者  
特に無し

(3)連携研究者  
特に無し

(4)研究協力者

平林義雄 (Yoshio Hirabayashi)  
国立研究開発法人理化学研究所  
脳科学総合研究センター・  
神経膜機能研究チーム・  
シニアチームリーダー  
研究者番号：90106435

長塚靖子 (Yasuko Nagatsuka)  
国立研究開発法人理化学研究所  
脳科学総合研究センター・  
神経膜機能研究チーム・  
研究嘱託

秋山央子 (Hisako Akiyama)  
国立研究開発法人理化学研究所  
脳科学総合研究センター・  
神経膜機能研究チーム・研究員  
研究者番号：80623462

遠田浩二 (Koji Tohda)  
富山大学・大学院理工学研究部(工学)  
・教授  
研究者番号：60212065

岩淵和久 (Kazuhisa Iwabuchi)  
順天堂大学・環境医学研究所・教授  
研究者番号：10184897

上口裕之 (Hiroyuki Kamiguchi)  
国立研究開発法人理化学研究所  
脳科学総合研究センター・  
神経成長機構研究チーム・チームリーダー  
研究者番号：10233933