

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24229003

研究課題名(和文) 生体膜リン脂質多様性の生物学

研究課題名(英文) Biology of diversity and asymmetry of membrane lipids

研究代表者

清水 孝雄(Shimizu, Takao)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・プロジェクト長

研究者番号：80127092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜主成分のグリセロリン脂質は、6種の極性基に加え、グリセロール骨格の一位、二位の多様な脂肪酸の組み合わせにより千種類を超える異なる分子が存在する。これはリン脂質が単なる細胞の隔壁である以上の意味を持つはずである。

そこで、多様性を形成する酵素分子を単離し、欠損マウスを作製した。同時に生理活性脂質やリン脂質の解析系、可視化法を開発した。欠損マウスはそれぞれ、肺サーファクタント異常、小腸のトリグリセリド運搬障害、網膜異常、雄性不妊、神経性疼痛の軽減など多彩な表現を呈した。個別の生物過程に關与する重要なリン脂質脂肪酸組成が明らかとなった。疾患の発症メカニズム解明や創薬への基盤を築いた。

研究成果の概要(英文)：Glycerophospholipids in cellular membrane possess two distinct fatty acids at the sn-1 and sn-2 positions. Combined with 6 different polar heads, glycerophospholipids consists of over 1,000 different species. While the membrane phospholipid diversity appears essential for specific cellular functions, information is limited on the role of individual phospholipids for cellular functions.

We isolated several lysophospholipid acyltransferases and bred their gene knockout mice, and established a new method to profile lipid mediators and phospholipids by LC-MS. We found that change in fatty acid species of glycerophospholipids relates to multiple abnormalities such as pulmonary surfactant dysfunction, failure of triglyceride transport in liver and intestine, retinal degeneration, male infertility and neuropathic pain, depending on the change of specific fatty acids. These studies provide an insight for disease mechanism, and novel therapeutic strategy to above disorders.

研究分野：脂質生化学

キーワード：グリセロリン脂質 アシル転位酵素 アラキドン酸 ドコサヘキサエン酸 肺サーファクタント トリグリセリド輸送 脂質可視化

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜グリセロリン脂質はケネディ経路(解糖系産物からの新生経路)で一端作られたものが、ホスホリパーゼA2で脂肪酸とリゾリン脂質となり、アシル転位酵素の働きで新たな脂肪酸が入る。これを繰り返す中で、多様で非対称的構造に成熟されると考えられ、このリモデリング経路を提唱者の名前にちなんで、ランズ回路と呼ばれている。本経路が提唱されたのは1958年(Lands, *J. Biol. Chem.* 1958)であるが、その後、数多くの研究にも関わらず、酵素の分子実態は明らかでは無かった。近年その酵素群(リゾリン脂質アシル転移酵素群)が我々を含む複数のグループから発見された。既に脂質生化学の基礎的手法や質量分析計基本技術の確立や遺伝子改変マウス樹立など研究条件は整っていた。

この様な技術的蓄積を基盤に本研究は「膜リン脂質多様性の生物学的意義」を明らかにすることを目的として開始された

## 2. 研究の目的

生体膜の主成分は両親媒性のリン脂質であり、これが二重層を作り、外界から独立した環境を持つ細胞を作り、生命誕生の基礎となった。グリセロリン脂質は極性基の違いに加え、一位、二位の脂肪酸が非対称的に配置され(一位は飽和脂肪酸あるいはモノエン、二位は高度不飽和脂肪酸)、異なる脂肪酸の組み合わせにより1000種類以上の異なる分子が存在する。この様な多様性は単なる、脂質バリアとしての機能を超えており、個々の細胞特性や生体機能と密接に関わる固有の意味を持つと考えられる。本研究は遺伝子改変マウスと脂質解析技術を駆使し、リン脂質多様性の生物学的意味を明らかにすることにある。

## 3. 研究の方法

### 1) リン脂質の高感度な定量系の確立

既に申請者らは2005年に生理活性脂質の一群(エイコサノイドとPAF)の同時定量系を世界に先駆け開発し(Kita et al., 2005; *Anal. Biochem.*, *BBRC*, 2005)、本手法を応用して、様々な生物機能との関連を報告している。リポドミクス社会連携講座で島津製作所などと協力し、新型の三連四重極型質量分析型を脂質解析用にチューンアップし、より多くのエイコサノイドの一斉定量系を開発した。

### (2) 各種酵素の生化学的解析

10種類程度のリゾリン脂質アシル転位酵素を単離し、*in vitro*での酵素学的解析を行った。

(3) 脂質膜ダイナミズムの生物学的意義  
リゾリン脂質アシル転位酵素欠損マウスの表現形解析を行った。

## 4. 研究成果

主要な成果を以下に述べる

(1) 生理活性脂質とリン脂質の高感度な定量系の確立

150種類程度のエイコサノイドを一斉定量する方法を確立した(Yamada et al. *J. Chrom. B.* 2015, Kita et al. *BBA*, 2017)。他の論文成果にも多く利用されている。リン脂質を3液により、再現性良く分離出来るシステムを開発した。

### (2) 各種酵素の生化学的解析

血小板活性化因子(PAF)生合成酵素であるLPCAT2の解析を進めた。PAFやATPによる刺激で30秒程度で活性化された。これはcPKC経路による34番目のSerのリン酸化によるものであった。これでマクロファージにおいてLPCAT2の3種類の調節機構が解明された(Morimoto et al. *J Biol Chem.* 2014)。さらに17万化合物をスタートにLPCAT2阻害剤スクリーニングも行った。LPCAT2阻害剤としてTSI-01を報告した(Tarui et al. *J Lipid Res.* 2014)。

新規にリゾホスファチジン酸アシル転位酵素4(LPAT4)を同定した。mRNA発現は脳に高く、DHA-CoA基質として好んだ。

(3) 脂質膜ダイナミズムの生物学的意義  
以下、代表的成果をまとめる

### LPCAT1 とパルミチン酸含有リン脂質

LPCAT1欠損マウスは過換気呼吸モデルで致死率が高いことがわかった。これは肺サーファクタント脂質の脂肪酸組成が変化することにより、肺に損傷がおり、炎症を誘発したためであった(Harayama et al. *Cell Metabolism.* 2014)。また、同論文でホスファチジルコリン生合成メカニズムに従来とは異なる新しい仮説を報告した。18:2や22:6の脂肪酸はホスファチジン酸生合成の段階(ケネディ経路)、16:0や18:1の脂肪酸はホスファチジルコリン生合成の段階(ランズ回路)で組み込まれやすいことがわかった。

### LPCAT2 と PAF リン脂質

血小板活性化因子(PAF)生合成酵素であるLPCAT2の欠損マウスを作製した。神経因性疼痛モデルであるpartial sciatic nerve ligation (PSL)解析をLPCAT2欠損マウスで行ったところ、疼痛を示さなかった。もう一方のPAF生合成酵素であるLPCAT1欠損マウスではこの様な疼痛軽減が観察されなかった。PAFはPAF自身やATPなど細胞外の刺激で誘導される。マウス腹腔マクロファージをPAF受容体アンタゴニストABT-491やWEB2086で処理しておく、その後のATP刺激によるPAF産生が減弱した。これは一度産生されたPAFが再びPAF産生を誘導するフィードバックループを示唆している。このループがPAF pain loopとなり持続性疼痛を維持又は悪化させているのではないかと推測した。酵素阻害剤(TSI-01他)は神経因性疼痛に対する鎮痛薬開発へ発展できる可能性がある。(Shindou\*, Shiraishi\*)

et al. *FASEB J.* 2017)

### LPCAT3 とアラキドン酸含有リン脂質

アラキドン酸をリン脂質に組み込む中心的酵素である lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3)欠損マウスを作製すると新生児致死であった。小腸に脂質蓄積が観察され、血糖値も低下していた。in vitro の実験からリン脂質膜中のアラキドン酸減少により、トリアシルグリセロールのリポタンパクへの分泌が低下し、小腸脂質が蓄積し、小腸粘膜細胞の機能異常を起こすと考えられた。リン脂質組成の局所的な違いが中性脂質輸送や脂肪肝生成に関与する可能性を示した。(Hashidate-Yoshida T et al. *elife* 06328. 2015)

### LPAAT3 と DHA 含有リン脂質

脳、網膜、精巣などには DHA が多い事は以前から知られていたが、その生理機能や分子メカニズムは不明だった。DHA を生体膜に取り込むのに重要なアシル転位酵素 (LPAAT3, Koeberle et al. *FASEB J.*, 2012; Harayama et al. *Cell Metabolism*, 2014) を欠損したマウスを解析したところ、雄性不妊、網膜異常などが観察された。DHA 含有リン脂質の物性が精子形成や視細胞形成に重要と考えられた (投稿中)

### その他、初期に予想出来なかった研究成果

\* 肺胞上皮細胞に発現する Sec14L3 タンパク質が 18:1 を多く含む膜リン脂質の隙間 (package defect) を認識し、リン脂質輸送に関与する可能性を示した (Hishikawa et al. *FASEB J.* 2013)。

\* 視床下部でモノアシルグリセロールリパーゼによって 2-アラキドノイルグリセロールから作られる PGE2 は発熱に関与する事を報告した (Kita et al. *Plos ONE* 2015)。

\* Br ラベル脂肪酸を CHO 細胞培養液に添加し、X 線顕微鏡を用いて Br シグナルを検出した。細胞内の核膜、小胞体、ゴルジ体周辺で Br 含有リン脂質シグナルを検出した。本法は従来の質量顕微鏡の解像度を上回る新しい細胞内脂質の可視化技術の基礎と考えられる (Shimura, Shindou et al. *FASEB J.* 2016)

### 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 47 件)すべて査読有

1. Kita, Y., et al. Mediator

lipidomics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017 in press

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198117300562>

2. Shindou, H.\*, et al. (2017) Relief from neuropathic pain by blocking of platelet-activating factor-pain loop. *FASEB J.* in press \*, equal contribution

<http://www.fasebj.org/content/early/2017/03/24/fj.201601183R.abstract?sid=f26e0220-67a7-454a-a767-09d74b135167>

3. Shimura, M.\* ,#, Shindou, H.\* ,#, et al. (2016) Imaging of Intracellular Fatty Acids by Scanning X-ray Fluorescence Microscopy. *FASEB J.* 30. 4149-4158. \*, equal contribution #, equal corresponding author

doi:10.1096/fj.201600569R

4. Kita, Y., et al. (2015) Fever is mediated by conversion of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol to prostaglandin E<sub>2</sub>. *PLoS ONE*, 10, e0133663 doi:

10.1371/journal.pone.0133663

5. Harayama, T., et al. (2015). Establishment of LC-MS method for the analysis of palmitoylated surfactant proteins. *J. Lipid Res.* 56. 1370-9. doi: 10.1194/jlr.D060236.

6. Yamada, M., et al. (2015) A comprehensive quantification method for eicosanoids and related compounds by using liquid chromatography/mass spectrometry with high speed continuous ionization polarity switching. *J. Chrom. B.* 995-996:74-84. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.05.015.

7. Hashidate-Yoshida, T., et al. (2015) Fatty acyl-chain remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *eLife* 21;4. doi: 10.7554/eLife.06328.

8. Asahara, M., et al. (2015) The absence of the leukotriene B<sub>4</sub> receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinal nociceptive processing following intraplantar formalin injury. *Mol Pain*. 2015 11:11 doi:10.1186/s12990-015-0010-9

9. Yasuda, D., et al. (2015) The atypical N-glycosylation motif, Asn-Cys-Cys, in human GPR109A is

- required for normal cell surface expression and intracellular signaling. *FASEB J.* 29. 2412-22. doi: 10.1096/fj.14-267096
10. Antonny, B., et al. (2015) From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle functions. *Trends in Cell Biology.* 25.427-36. doi: 10.1016/j.tcb.2015.03.004.
  11. Hishikawa, D., et al. (2014) Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J. Lipid Res.* 55:799-807. doi: 10.1194/jlr.R046094.
  12. Tarui, M., Shindou, H., et al. (2014) Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. *J. Lipid Res.* 55. 1386-1396. doi: 10.1194/jlr.M049205
  13. Harayama, T., et al. (2014) Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo. *Cell metab.* 20. 295-305. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.019.
  14. Morimoto, R., Shindou, H., et al. (2014) Rapid Production of Platelet-activating Factor Is Induced by Protein Kinase C  $\alpha$ -mediated Phosphorylation of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2 Protein. *J. Biol. Chem.* 289. 15566-15576. doi: 10.1074/jbc.M114.558874.
  15. Sumida, H., et al. (2014) Interplay between CXCR2 and BLT1 facilitates neutrophil infiltration and resultant keratinocyte activation in a murine model of imiquimod-induced psoriasis. *J. Immunol.* 192.4361-4369. doi: 10.4049/jimmunol.1302959.
  16. Eto, M., Shindou, H., et al. (2013) A Novel Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Enzyme (LPAAT4) with a Possible Role for Incorporating Docosahexaenoic Acid into Brain Glycerophospholipids. *Biochem Biophys Res Commun.* 443. 718-24. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.043
  17. Hishikawa, D., et al. (2013) Identification of Sec14-like 3 as a novel lipid-packing sensor in the lung. *FASEB J.* 27. 5131-40. doi: 10.1096/fj.13-237941
  18. Tokuoka M, S., et al. (2013) Alkylglycerol monooxygenase as a potential modulator for PAF synthesis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 436. 306-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.099
  19. Yoshikawa, K., Kita, Y., et al. (2013) Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic progressive neuronal death. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 88. 373-81. doi: 10.1016/j.plefa
  20. Shindou H., et al. (2013) Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases *J. Biochem.* 154. 21-8. doi: 10.1093/jb/mvt048.
  21. Yanagida, K., et al. (2013) Current progress in non-Edg family LPA receptor research. *Biochim Biophys Acta.* ;1831:33-41. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.08.003.
  22. Eto, M., Shindou, H., et al. (2012) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 is the key enzyme for incorporating arachidonic acid into glycerophospholipids during adipocyte differentiation. *Int J Mol Sci.* 13. 16267-80 doi: 10.3390/ijms131216267.
  23. Koeberle, A., Shindou, H., et al. (2012) Palmitoleate is a mitogen, formed upon stimulation with growth factors, and converted to palmitoleoyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 287, 27244-27254. doi: 10.1074/jbc.M111.274829.
  24. Koeberle, A., Shindou, H., et al. (2012) Polyunsaturated fatty acids are incorporated into maturing male mouse germ cells by lysophosphatidic acid

acyltransferase 3. FASEB J. 26,  
169-180. doi:  
10.1096/fj.11-184879.

他 2 4 報

〔学会発表〕(計 107件)

1. 口頭 招待講演 清水孝雄 膜リン脂質研究への誘いー脂質多様性の意味を考える 第90回日本薬理学会年会 2017年3月16日 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)
2. 口頭 招待発表 清水孝雄 Biological Roles of DHA-containing Phospholipids in vivo 国際プラズマローゲンシンポジウム 2016年11月28日 九州大学医学部百年講堂 (福岡県福岡市)
3. 口頭 清水孝雄 リン脂質研究の最新の進歩 第89回 日本生化学会大会 2016年9月25日~9月27日 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)
4. 口頭 Takao Shimizu, Mechanism of glycerophospholipid diversity and its biological consequence. 7th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators: From Bench to Translation Medicine 2016/5/20 UCSD, Ja Jolla, CA, USA
5. 口頭 Takao Shimizu Roles of PUFA-containing phospholipids in biology and pathology. LIPID MAPS Annual Meeting 2016:Lipidomics Impact on Metabolic, Cancer, Cardiovascular and Inflammatory Diseases .May 17-18, 2016, La Jolla, CA, USA.
6. 口頭 清水 孝雄 リン脂質代謝と生理機能 第44回本郷呼吸器研究会 2016年2月23日 山の上ホテル(東京都千代田区)
7. 口頭 清水 孝雄 リン脂質研究の新しい展開 第45回日本心脈管作動物質学会 2016年2月5日 阿波観光ホテル(徳島県徳島市)
8. 口頭 清水孝雄 Phospholipid remodeling and triacylglycerol transport "The 2nd Symposium Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy in Tokyo Center for Integrative Inflammolgy in Tokyo" 2015/10/26 Sanjo Conference Hall, Hongo Campus The University of Tokyo, Japan
9. 口頭 特別・招待 清水孝雄 肺疾患と脂質代謝 第25回国際喘息学会日本・北アジア部会 2015年9月3日 横浜ニューグランドホテル(神奈川県横浜市)
10. 口頭 Takao Shimizu LPA4 non-Edg type receptor in health and disease 2015FASEB SRC 2015/8/23-2015/8/28 Banff, Canada
11. 口頭 清水孝雄 リン脂質多様性の形成機構と生物学的意義 第163回東京脂質談話会 2015年7月15日 東京大学(東京都文京区)
12. 口頭 特別・招待 清水 孝雄 脂質生物学研究:過去、現在、そして未来 第57回日本脂質生化学会 羊土社座談会 2015/5/29 一橋大学 一橋講堂(東京都千代田区)
13. 口頭 特別・招待 清水孝雄 リン脂質多様性の生化学と生物学 第57回日本脂質生化学会 2015/5/28-5/29(5/28) 一橋大学 一橋講堂(東京都千代田区)
14. 口頭 清水孝雄 Diversity of membrane phospholipids: biosynthetic mechanism and biological significance. 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators. 2015年2月10日~12日 京王プラザホテル東京(東京都新宿区)
15. 口頭 清水孝雄 LPA(lysophosphatidic acid) acts on non-Edg type receptors 都医学研究所 10th 都医学研国際シンポジウム 2015/2/9 都医学研究所(東京都世田谷区)
16. 口頭 清水孝雄 LPA(lysophosphatidic acid) acts on non-Edg type receptors 都医学研究所 10th 都医学研国際シンポジウム 2015/2/9 都医学研究所(東京都世田谷区)
17. 口頭 Takao Shimizu Characterization of lysophospholipid and acyltransferase in vitro and vivo. Lipid Mediators in Health and Disease in Kalolinska Institute August 27, 2014 Sweeden Kalolinska Institutet/ストックホルム スウェーデン
18. 口頭 Takao Shimizu Regulation of membrane phospholipids in health and disease. 55th International Conference on the Bioscience of Lipids: Lipids as Mediators of Health and Disease. June 27, 2014

- University of Aberdeen, Aberdeen  
AB24 3FX Scotland
19. 口頭 Takao Shimizu Sec14L3, a novel protein recognizing liposome curvature and packing defects. LIPID MAPS Annual Meeting 2014 Lipidomics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease May 13, 2014 La Jolla, CA, USA
  20. 口頭 (招待講演) Shimizu Takao Lipid mediators: enzymes and receptors, 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer Inflammation, and Related Diseases. 2013/11/5 San Juan, Puerto Rico, USA
  21. 口頭(招待講演) 清水孝雄 Glycerophospholipid metabolism and biological functions. 2013 FASEB Summer Research Conference Lysophospholipid and Other Related Mediators - From Bench to Clinic 2013/8/5 ヒルトンニセコビレッジ(北海道ニセコ村)
  22. 口頭(受賞講演) 清水孝雄 Cytosolic Phospholipase A2 in Health and Disease. 5th International Conference on Phospholipase A2 Mediated Signaling in Translational Medicine 2013/5/21 New Orleans, LA, USA
  23. 口頭 清水孝雄 リン脂質代謝と脂質メディエーター 熊本和光ライフサイエンスフォーラム 2013年2月22日(熊本県)
  24. 口頭 Takao Shimizu Lipid mediator signaling 日本生化学会大会 2012年12月14-16日 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)
  25. 口頭 清水孝雄 リン脂質代謝-ホスホリパーゼA2とアシル転移酵素 第23回同仁フォーラム 2012年11月16日(熊本県熊本市)
  26. 口頭 清水孝雄 リン脂質代謝とリピドミクス 千里ライフサイエンスセミナー2012年11月15日(大阪府豊中市)
  27. 口頭 Takao Shimizu Lipid and aging. Ernst Schering Foundation Memorial Symposium. September 10-12, 2012 Berlin, Germany

他 8 0 件

〔図書〕(計 4 件)

1. 進藤英雄 「リン脂質リモデリング酵素」疾患モデルの作成と利用 脂質代謝異常と関連疾患(下巻) LIC (2015) 321-330

2. 徳岡涼美、進藤英雄 「PAF」サイトカイン増殖因子キーワード事典 羊土社(2015) 336-338
  3. 進藤英雄 「生体膜リン脂質多様性形成分子メカニズム-徐々にわかって来たリン脂質の生合成」循環 Plus (2015)Vol. 15 No.5. 7-9
  4. 菱川大介、進藤英雄、原山武士、小笠原理恵、諏訪部章、清水孝雄「新規は違法腔内分泌タンパク質 Sec14-like 3の生化学的機能解析」分子呼吸器病、先端医学社 (2015) Vol. 19. No. 1. 122-125
- 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncgmlipidsp.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清水 孝雄 (SHIMIZU, Takao)  
国立国際医療研究センター・脂質シグナリングプロジェクト・プロジェクト長  
研究者番号: 80127092

### (3) 連携研究者

中村 元直 (NAKAMURA, Motonao)  
岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号: 40431762

北 芳博 (KITA, Yoshihiro)

東京大学医学部ライフサイエンス支援室・准教授

研究者番号: 20401028

徳岡 涼美 (TOKUOKA, Suzumi)

東京大学医学部社会連携講座・特任助教

研究者番号: 60511376

進藤 英雄 (SHINDOU, Hideo)

国立国際医療研究センター・脂質シグナリングプロジェクト・副プロジェクト長

研究者番号: 10401027

菱川 大介 (HISHIKAWA, Daisuke)

国立国際医療研究センター・脂質シグナリングプロジェクト・上級研究員

研究者番号: 10569966

吉田 智美 (YOSHIDA, Tomomi)

国立国際医療研究センター・脂質シグナリングプロジェクト・上級研究員

研究者番号: 30610216

原山 武士 (HARAYAMA, Takeshi)

国立国際医療研究センター・脂質シグナリングプロジェクト・研究員

研究者番号: 50610218

### (4)研究協力者

なし