

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05847

研究課題名(和文) リン脂質カルジオリピン過酸化物の精密合成に基づくシトクロムcの遊離機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for cytochrome c desorption based on fine synthesis of phospholipid cardiolipin peroxide

研究代表者

安部 真人 (ABE, Masasto)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30543425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアを介したATP産生とアポトーシスの双方に關与するリン脂質カルジオリピンは、酸化ストレス条件における過酸化物への誘導に伴ってシトクロムcを遊離する。しかし、カルジオリピンの過酸化反応では、過酸化カルジオリピンが生じると直ちに二次酸化が進行してしまうためにシトクロムcの遊離を主導する成分は未同定である。そこで本研究では、過酸化カルジオリピンの全合成を達成し、シトクロムcとの相互作用解析を実現することを目的とした。これまでに過酸化カルジオリピンの2種類の異性体について選択的な化学合成を完了し、本課題の最難関を打開することに成功した。現在はさらにシトクロムcとの親和性評価を実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では前例のない過酸化カルジオリピンの立体選択的な全合成を達成することができた。このことは、他の種々のリン脂質についても応用が可能である。事実、既に過酸化ホスファチジルグリセロールの全合成も達成しており、発展的な共同研究から新たな炎症メディエーターの可能性を見出すことに繋がった。また、本研究の合成手法を基盤技術として、英国UCLとの国際共同研究にも発展しており、機能性脂質の開発も進めている。

研究成果の概要(英文)：Phospholipid cardiolipin, which is involved in both mitochondrial-mediated ATP production and apoptosis, releases cytochrome c upon induction to peroxide under oxidative stress conditions. However, in the cardiolipin peroxidation reaction, the component leading to the release of cytochrome c has not been identified because the secondary oxidation proceeds immediately after the cardiolipin peroxide is generated. Therefore, in this study, we aimed to achieve total synthesis of cardiolipin peroxide and to realize interaction analysis with cytochrome c. So far, we have completed selective chemical synthesis of two isomers of cardiolipin peroxide and succeeded in overcoming the most difficult task. Currently, further evaluation of affinity with cytochrome c is underway.

研究分野：生物有機化学

キーワード：カルジオリピン ミトコンドリア アポトーシス 脂質過酸化物

1. 研究開始当初の背景

真核生物のエネルギー生産器官であるミトコンドリアは、リン脂質ホスファチジルコリン(PC、約80%)とカルジオリピン(CL、約15%)を主成分とする二重層に覆われている。CLはミトコンドリア膜に特異的に分布し、呼吸鎖酵素群の活性発現やアポトーシスシグナルの発現調節に関わることでミトコンドリアの生理機能の特徴づけている(J. Lipid Res. 2008, 1607-1620.)。CLの脂肪酸部の組成は生物種や組織、器官によって異なり、哺乳類ミトコンドリアのCLは高度不飽和脂肪酸(PUFA)の一種であるリノール酸(C18:2, n-6系)を主組成とする。CLは呼吸鎖酵素群の電子伝達を担う可溶性タンパクであるシトクロムc(cyt c)を特異的な相互作用による複合体形成によってミトコンドリア内膜に繋ぎ留める働きをしている。この複合体は、酸化ストレス条件下になると、ミトコンドリアで産生する活性酸素種(ROS)がCLを過酸化することで解消し、cyt cは細胞質へ漏出してアポトーシスを誘導する。

これまでの研究では、CLとcyt cの複合体は図1に示すようなlipid-extendedモデル(J. Biol. Chem. 1995, 3197-3202.)が考えられてきた。そこでは、CL極性頭部の負電荷とcyt cの陽電荷に由来する非特異的な静電的相互作用と、CLのPUFAとcyt cの疎水性アミノ酸に由来する特異的な疎水性相互作用が提唱されている。このlipid-extendedモデルに基づいて、複合体の乖離は、CLのPUFAへのヒドロペルオキシ基の挿入による極性の増大に起因すると考えられてきた。しかし、2011年に応募者の研究によってCLとcyt cの複合体形成にはCLのPUFAが必須ではないことが明らかになった(Biochemistry, 2011, 8383-8391.)。これにより、CLのPUFAに由来する特異的な疎水性相互作用の存在が疑問視されるとともに、過酸化の進行による積極的な乖離機構の存在が示唆された。

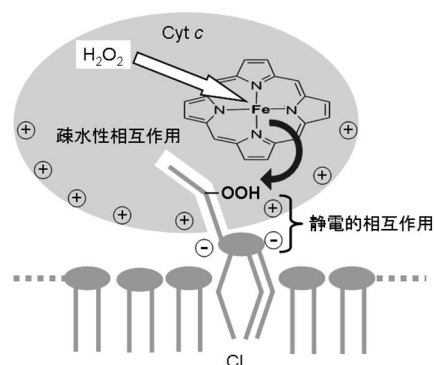


図1. "lipid-extended"モデル

従来の実験では、CLのPUFAを化学的に酸化処理することで過酸化CLの知見が得られてきた。ここで注意すべきは、ROSによって産生する過酸化CLは複数種あること。そして、過酸化CLは種々の二次酸化生成物を産生するということである。これらのことが、CLの過酸化に由来するcyt cの乖離機構を解明する上での課題になっている。特に、CLの化学的な酸化処理では非選択的に過酸化CLやそれらの二次酸化生成物が産生してしまい、構造活性相関研究を行うことができなかった。

2. 研究の目的

本研究では、「なぜ、CLの過酸化がcyt cとの複合体を解消させるのか」を学術的「問い」とした。このため、具体的な課題としてCLの過酸化によって生成する過酸化CLの全合成およびそれらのcyt cとの機能解析を設定した。

3. 研究の方法

全合成の標的となる過酸化CLは、心筋ミトコンドリアで主要な成分であるリノール酸を側鎖に有するTLCLを過酸化した分子種を対象とした。このとき、過酸化を受けるリノール酸の位置選択性については、Sn-2位およびSn-2'位のそれぞれを選択的に過酸化した立体異性体をそれぞれ作り分ける計画とした。過酸化部位の構築には市販のリポキシダーゼ(大豆由来、Cas RN. 9029-60-1、東京化成)を用いることとし、導入したヒドロペルオキシ基を保護した上で合成を進め、最後に脱保護によって過酸化CLとする経路とした。この手法であれば、過酸化部位をジアシルグリセロールに導入したうえでリン酸化する手順を入れ替えることによって導入部位のSn-2位とSn-2'位の選択性を得ることができる。

また、本研究に用いる合成経路では合成中間体としてホスファチジルグリセロールを経由することになる。このことは、本研究の遂行途上で過酸化ホスファチジルグリセロールを対象とした機能解析にも発展するきっかけとなった。

4. 研究成果

本研究で確立した過酸化カルジオリピンの全合成経路を以下に示す(図2)。市販のS-ソルケタールを出発物質とし、水酸基をTBDSで保護した上で脱アセタール化し、続くリノール酸とのDCC縮合によってジアシルグリセロールへと誘導した。脱シリル化によって一級水酸基のみを脱保護し、別途合成したTBS化グリセロールをパートナーとしたホスホロアミダイト法によってホスファチジルグリセロール型の間mediateとした。一級水酸基を選択的に脱シリル化したうえで、別途合成したMxp化モノアシルグリセロールとのホスホロアミダイト法によりリゾCLへと誘導した。最終段階においてDCC縮合により過酸化脂肪酸を導入し、脱シリル化と脱MxpによってSn-2位を過酸化した過酸化カルジオリピンの全合成を達成した。同様の手法で、導入するTBS化グリセロールの立体を反転させることでSn-2'位を過酸化した過酸化カルジオリピンの合成も達成した。これらの成果は、過酸化カルジオリピンの初めての全合成となった(日本農薬学会第47回大会、一般講演、2022年;日本農芸化学会2022年度大会、一般講演、2022年)。

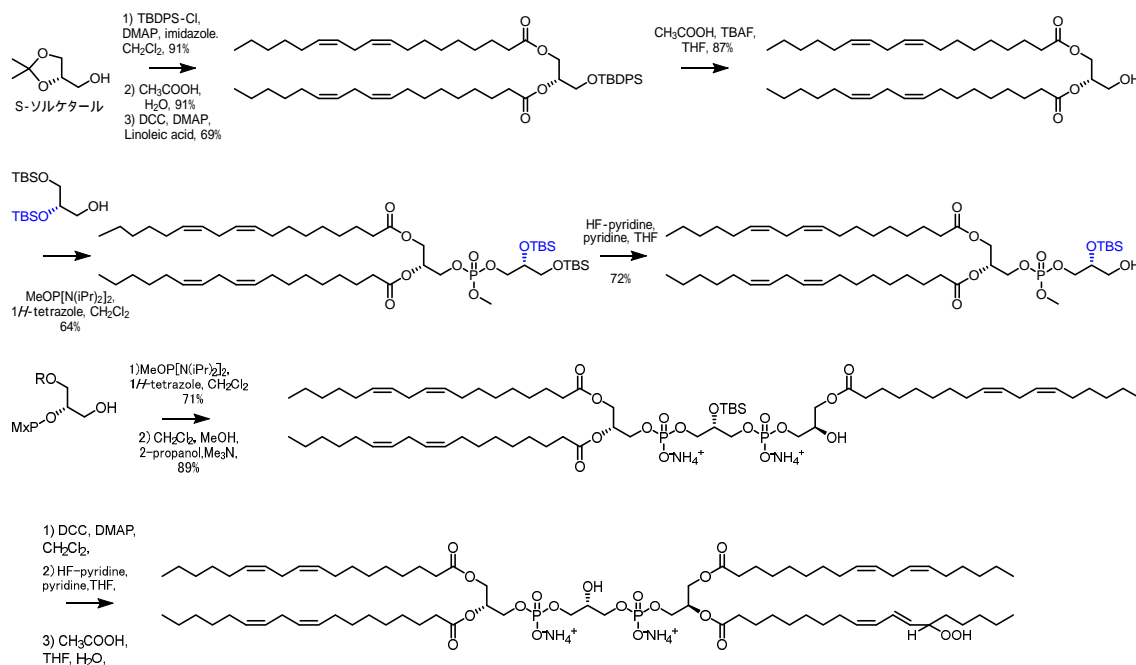


図2 過酸化カルジオリピンの全合成(中間体以降)

この合成経路を応用することで、過酸化ホスファチジルグリセロールの合成も達成し、東京大学薬学系研究科の青木淳賢教授との共同研究に発展した。

合成した過酸化ホスファチジルグリセロールについて、TNF 切断アッセイによる炎症誘導性GPCRの活性化を評価したところ新規の炎症メディエーターであることが強く示唆された(第64回脂質生化学会、一般講演、2022年)。

一方、ホスファチジルグリセロールの類縁体合成も展開し、脂肪酸部をアルコキシル基に変換した一連のエーテル型類縁体を合成した。これらは、東京大学総合文化研究科の和田教授との共同研究に発展し、シアノバクテリアのPGSミュータントを用いたホスファチジルグリセロールの補完試験にて活性評価を行った。その結果、細胞外から培地を通じて与えたエーテル型ホスファチジルグリセロールは、アルコキシル基の長さに依存して補完能力を変化させることが初めて明らかになった。特に、天然型ホスファチジルグリセロールの脂肪酸部はC16が主であるのに対し、最も補完能力が高かった類縁体のアルコキシル基の長さもC16と対応した結果になった。対して、C16から鎖長がC18やC20またはC14やC12と乖離するにつれて補完能力が顕著に低下することが分かった(BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2022, 159158-159164.)。

また、本合成を基盤技術とした新規の機能性膜脂質の合成を英国UCL(University College London)のH.C.Hailes教授とともに国際共同研究として推進している。

今後は、合成を完了した過酸化カルジオリピンを対象に、Cyt cとの親和性試験を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 S. Yuki, A. Uemura, M. Hakozaiki, A. Yano, M. Abe, Y. Misawa, N. Baba & H. Yamada | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Identification of a novel enzyme from <i>E. pacifica</i> that acts as an eicosapentaenoic 8R-LOX and docosahexaenoic 10-LOX | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific reports | 6. 最初と最後の頁 20592 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77386-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 K. Igawa, Y. Kawasaki, S. Nozaki, N. Kokan, K. Tomooka | 4. 巻 85 |
| 2. 論文標題 Ozon Oxidation of Silylalkene: Mechanistic Study and Application for the Synthesis of Silacarboxylic Acid Derivatives | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Organic Chemistry | 6. 最初と最後の頁 4165-4171 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.9b03350 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1. 著者名 Kaichiro Endoa, Masato Abe, Nobumasa Kawanishi, Haruhiko Jimbo, Koichi Kobayashi, Tomoko Suzuki, Noriko Nagata, Hideto Miyoshi, Hajime Wada | 4. 巻 1867 |
| 2. 論文標題 Crucial importance of length of fatty-acyl chains bound to the sn-2 position of phosphatidylglycerol for growth and photosynthesis of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids | 6. 最初と最後の頁 159158-159164 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbalip.2022.159158 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Yoshihara A, Endo K, Abe M, Wada H, Kobayashi K |
| 2. 発表標題 Roles of galactolipids in plastid development during skotomorphogenesis to photomorphogenesis |
| 3. 学会等名 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 安部真人 |
| 2. 発表標題 Synthetic study of bioactive phospholipids |
| 3. 学会等名 香川大学 Phytogene symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 安部真人 |
| 2. 発表標題 脂質分子が繋ぐ生命と環境 |
| 3. 学会等名 第37回農業環境科学研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名 安部真人 |
| 2. 発表標題 生命を化学する -脂質分子の個性とデザイン- |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第37回市民フォーラム (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------------|
| 1. 発表者名 安部真人 |
| 2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸を有するホスファチジルセリンの合成研究 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名 田中遼太郎 |
| 2. 発表標題 生理活性脂質を目指したMixed Acetalの合成研究 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 安部真人 |
| 2. 発表標題 リン脂質の化学合成を基盤とした生理機能解析の展開 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名 結城彩花 |
| 2. 発表標題 新奇8Rリボキシゲナーゼ同定とプロテクチンD1酵素合成への応用 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 安部真人 |
| 2. 発表標題 合成リゾカルジオリピン類縁体のトランスアシラーゼtafazzinに対する阻害効果 |
| 3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 ○廣角道信、安部真人 |
| 2. 発表標題 リン脂質リゾカルジオリピンの立体選択的全合成 |
| 3. 学会等名 日本農薬学会 第47回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 ○廣角道信、安部真人 |
| 2. 発表標題 リゾカルジオリピンおよび過酸化カルジオリピンの全合成 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 ○藤原 朋哉、渡辺 麻友美、三澤 嘉久、馬場 直道、阿部 一啓、安部 真人 |
| 2. 発表標題 ホスファチジルコリンの効率的アナログ合成の確立 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 ○多田 大輝、阿部 一啓、馬場 直道、三澤 嘉久、安部 真人 |
| 2. 発表標題 ホスファチジルセリンの収束型類縁体合成 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名 ○安部真人、渡辺麻友美、三澤嘉久、馬場直道 |
| 2. 発表標題 PCおよびPEをモチーフとした頭部改変型リン脂質のアナログ合成 |
| 3. 学会等名 日本脂質生化学会 第63回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 ○多田大輝、三澤嘉久、馬場直道、安部真人 |
| 2. 発表標題 高度不飽和脂肪酸結合型リン脂質の全合成 |
| 3. 学会等名 日本脂質生化学会 第63回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------|
| 1. 発表者名 河崎悠也、井川和宣、友岡克彦 |
| 2. 発表標題 付加型オゾン酸化反応の開発 |
| 3. 学会等名 第54回 酸化反応討論会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|------------------------------------------------|-----------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 河崎 悠也 (Kawasaki Yuya) (00781999) | 九州大学・先端物質化学研究所・学術研究員 (17102) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|---------------------------|--|--|--|
| 英国 | University College London | | | |