

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19287

研究課題名（和文）新規リン脂質の網羅的な探索とその分子基盤の解明

研究課題名（英文）Comprehensive search for novel phospholipids and elucidation of their functions

研究代表者

長谷川 純矢（Hasegawa, Junya）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：00533788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：リン脂質はグリセロール骨格のsn-1,2位にそれぞれ脂肪酸を有し、sn-3位に特徴的な極性基を持つ。リン脂質の極性基の種類は極めて限局的で、コリンやセリン等わずか5種類しか知られていない。その原因として、脂質は遺伝子にコードされていないため、シークエンス技術が飛躍的に進歩した昨今でも、未知の脂質の探索は容易ではないことが挙げられる。申請者は、独自の手法によりすでに新規リン脂質を4つ同定している。本研究期間内で、新規リン脂質のさらなる同定を試んだが、現在のところ検討段階でまだ実施には至っていない。今後、新規脂質の同定とともに、それら脂質の機能解明に拍車をかける。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン脂質は細胞膜を構成する主要因子であり、細胞・オルガネラの形や固さを制御しているだけでなく、膜を起点とした様々シグナル伝達に寄与している。細胞内外で多彩な機能を担っているリン脂質だが、その特徴的な極性基に関して、わずか数種類しか知られていない。申請者は、細胞は多くの種類の極性基を持つリン脂質が存在するはずと想定し、質量分析技術を利用した新規リン脂質の探索を開始した。その結果、幾つかの新規リン脂質を発見できた。この発見により、遺伝子・タンパク質から解析不可能だった、新しい生理現象の解明に繋がるだけでなく、脂質の変化により引き起こされる各種疾患発症機構の解明並びにその創薬標的の提示に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Phospholipids have fatty acids at the sn-1 and sn-2 positions of the glycerol backbone, and a characteristic polar group at the sn-3 position. The variety of polar groups in phospholipids is extremely limited, including choline and serine. The reason for this is that lipids are not encoded by genes.

I have already developed a novel method to search for unknown lipids. I have already identified four new phospholipids by my original method. During the period of this study, we attempted to further identify novel phospholipids, but this has not yet been done because I am still in the reviewing stage. In the future, I will accelerate the identification of new lipids as well as the clarification of their functions.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リン脂質 質量分析

1. 研究開始当初の背景

リン脂質はグリセロール骨格の sn-1 位、sn-2 位にそれぞれ脂肪酸を有し、sn-3 位にリン酸基を介して極性基を持つ (図 1)。リン脂質は、細胞膜の主要構成分子として膜の形態変化や構造維持に重要なだけでなく、各々の極性基を認識するタンパク質をリクルートすることで、膜を起点としたシグナルも厳密に制御している。極性基 (図 1, X) の種類は極めて限局的で、コリンやセリン等わずか 5 種類しか知られていない。その原因として、脂質は遺伝子にコードされていないため、シーケンス技術が飛躍的に進歩した昨今でも、未知の脂質の探索は容易ではないことが挙げられる。しかし、細胞膜が司る多くの重要な機能を考慮すると、多様な極性基を持つリン脂質が存在する可能性は高い。そこで申請者は、これまでのリン脂質の知識・技術を結集し、質量分析技術を利用した新規リン脂質の探索を開始した。

2. 研究の目的

申請者は、まず細胞内に豊富に存在するアミノ酸に着目し、それらがリン脂質の極性基となり得るのかを検討した。アミノ酸の一つ、セリンがホスファチジルセリンとしてすでに存在が明確になっていることも、その探索を開始した一因である。総脂質抽出法である Bligh & Dyer 法で抽出した

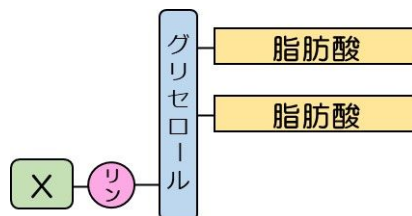


図 1 リン脂質の構造。グリセロール骨格の sn-1,2 位に脂肪酸、sn-3 位にリン酸基を介して極性基 (X: コリン, イノシトール, セリンなど) が結合する。

画分を疎水性カラムクロマトグラフィ / タンデム質量分析法を用いて検討した。親イオンと娘イオン

の質量電荷比をペアとして分子を同定する多重反応モニタリングの方法により、得られた電荷分子量から極性基を同定した。その結果、申請者は極性基にアラニン、グリシン、ヒスチジン、スレオニンを持つ新規リン脂質群の発見に成功した (図 2)。これらリン脂質群は、多くの培養細胞株並びにマウス臓器でも検出され、普遍的な分布を示すことも明らかにしている。

申請者はさらに、網羅的に新規リン脂質群を探索する目的で、申請者独自の方法の開発を試みた。リン脂質の構造上の特性から、強酸性条件においてはリン酸エステル結合 (図 1 のリンと X の間の結合) のみが加水分解を起こす。その特性を利用して、遊離した極性基を分取し、質量分析装置で、極性基を網羅的に解析できるのではと着想した。

そこで本申請課題は、申請者が考案した独自の手法で、新規極性基を有するリン脂質を包括的に見出すことを目的とする。

既知の極性基

コリン
エタノールアミン
セリン
イノシトール
グリセロール

申請者が発見した極性基

アラニン
グリシン
ヒスチジン
スレオニン

3. 研究の方法

上述したように、リン脂質は、強酸性の水溶液 (具体的には 6M HCl) 中で、リン酸エステル結合 (図 1 のリンと X の間の結合) が加水分解

図 2 リン脂質の極性基の種類。極性基を持たないホスファチジン酸を含め、現在 6 種類のリン脂質が知られている。

を起こし、極性基が部分的に遊離する。申請者はその原理を利用し、脂質抽出方法である Bligh&Dyer 法で抽出した総脂質画分を強酸性の条件に暴露させ、極性基を遊離させる。その後、遊離した画分 (水溶性画分) に含まれる低分子物質を網羅的に解析する。解析には、申請者の所属する東京医科歯科大学と島津製作所が共同で最近立ち上げた「シェアラボ」という質量分析の

ファシリティを利用する。東京医科歯科大学内に島津製の最新質量分析機器を設置した「シェアラボ」では、質量分析に詳しい島津の専門家の助言を受けながら、細胞内代謝物質について網羅的な解析ができる。申請者はすでに「シェアラボ」に登録済みで、また島津の専門家の方と密に連絡を取り開始できる状況である。「お茶ラボ」にて、網羅的な低分子物質の探索を行い、極性基の候補分子を見出す。上記の網羅的解析には、多種多様な細胞株、マウス臓器からの総脂質画分を用いる予定である。その検討により、細胞・臓器特異的な低分子物質（特異的なリン脂質）の発見が期待される。見出した低分子物質に関しては、安定同位体を処理した細胞から総脂質画分を分取後、質量分析にて目的のリン脂質の m/z の値が予想通りにシフトするかを指標に、実際にリン脂質として存在するか検証する。存在が確認されたら、有機合成の手法を用いて新規リン脂質の標品を合成する（共同研究者に委託）。そのリン脂質を結合させたシリカビーズを用いた系（所属研究室で確立済み）で結合タンパク質を網羅的に解析する。興味深い分子については適宜クローニングを行う。以上より、網羅的解析を通じて新規リン脂質群を発見・同定し、その生理機能解明を行い、新規リン脂質群の基盤的研究を遂行する。

4．研究成果

本研究期間内にまずは、リン脂質の極性基が遊離する最適な条件を見出すこととした。先行研究では、強酸性の試薬として塩酸を用いていたが、他の酸性試薬（ギ酸、硫酸、硝酸など）についても検証した。その結果、やはり塩酸（6 M）が最も効率よく極性基の遊離効果が高かった。次に、処理時間についても検討した。Blight & Dyer 法で抽出した画分総脂質画分に、6M HCl を添加し、10分から2時間まで時間をふり、質量分析装置で脂質レベル並びに遊離した極性基（セリンやコリン）の量を測定した。短時間（10分）だと極性基が残存したリン脂質レベルが高く、長時間（1-2時間）ではリン脂質の残存率は低かったものの、遊離したと思われる低分子物質のシグナルも極端に低くなった。多くの検討を重ね、30分が最も良い反応条件とした。

次に、リン脂質から遊離した極性基（低分子物質）を、島津のシェアラボにて網羅的に解析を行った。しかしながら、ホスファチジルコリン（コリン）やホスファチジルセリン（セリン）など生体内に高いレベルで存在するリン脂質の極性基の検出には成功していたのだが（それでも質量分析装置の検出ギリギリのレベル）、その他の低分子物質のシグナルに関してはほとんど検出できなかった。この原因としては、1) 強酸性の条件で遊離した極性基は徐々に分解されてしまう、2) 液体クロマトグラフィーもしくは質量分析装置の測定方法に問題がある（もっと感度を上昇させることが可能）、の2つがメインとして考えられる。今後、強酸性で抽出したサンプルを中性化するなど、サンプル処理の問題を解決するとともに、液体クロマトグラフィー並びに質量分析装置の高感度で検出できる条件を見出すことを考えている。早急に問題解決を図り、新規リン脂質の網羅的な解析・同定、そして、それら新規リン脂質の生理機能解明を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tran Dang Minh, Yoshioka Nozomu, Bizen Norihisa, Mori-Ochiai Yukiko, Yano Masato, Yanai Shogo, Hasegawa Junya, Miyashita Satoshi, Hoshino Mikio, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Takebayashi Hirohide	4. 巻 16
2. 論文標題 Attenuated cerebellar phenotypes in <i>Inpp4a</i> truncation mutants with preserved phosphatase activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm050169.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dmm.050169	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 Morioka Shin, Nakanishi Hiroki, Yamamoto Toshiyoshi, Hasegawa Junya, Tokuda Emi, Hikita Tomoya, Sakihara Tomoko, Kugii Yuuki, Oneyama Chitose, Yamazaki Masakazu, Suzuki Akira, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko	4. 巻 13
2. 論文標題 A mass spectrometric method for in-depth profiling of phosphoinositide regioisomers and their disease-associated regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27648-z	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 Hasegawa Junya, Tokuda Emi, Yao Yao, Sasaki Takehiko, Inoki Ken, Weisman Lois S.	4. 巻 33
2. 論文標題 PP2A-dependent TFEB activation is blocked by PIKfyve-induced mTORC1 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 ar26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E21-06-0309	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 該当する

1. 著者名 Kanemaru Kaori, Shimosawa Makoto, Kitamata Manabu, Furuishi Rikuto, Kayano Hinako, Sukawa Yui, Chiba Yuuki, Fukuyama Takatsugu, Hasegawa Junya, Nakanishi Hiroki, Kishimoto Takuma, Tsujita Kazuya, Tanaka Kazuma, Itoh Toshiki, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Fukami Kiyoko, Nakamura Yoshikazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is critical for determination of epithelial characteristics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30061-9	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 Benyair Ron, Panapakkam Giridharan Sai Srinivas, Rivero-R?os Pilar, Hasegawa Junya, Bristow Emily, Eskelinen Eeva-Liisa, Shmueli Merav D, Fishbain-Yoskovitz Vered, Merbl Yifat, Sharkey Lisa M, Paulson Henry L, Hanson Phyllis I, Patnaik Samarjit, Al-Ramahi Ismael, Botas Juan, Marugan Juan, Weisman Lois S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Upregulation of the ESCRT pathway and multivesicular bodies accelerates degradation of proteins associated with neurodegeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy Reports	6. 最初と最後の頁 2166722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/27694127.2023.2166722	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------