

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770114

研究課題名(和文) 胚発生を制御するリゾホスファチジン酸シグナルの時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) analysis of spacio-temporal lysophospholipid signaling in zebrafish embryo

研究代表者

濱 弘太郎 (Hama, Kotaro)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：20534481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題はゼブラフィッシュを用いて、リゾリン脂質の一つ、リゾホスファチジン酸(LPA)の作用機序解明を目的とした。過剰なLPAシグナルは、癌、肺線維症等の様々な病態に関与することが示されているが、異常なLPAシグナル病態を引き起こす分子機構は明らかでない。代表者は個体レベルでこれを明らかにするため、ゼブラフィッシュを用いた。ゼブラフィッシュ胚にLPA産生酵素を過剰発現させたところ、二股心臓の表現型が見られた。この表現型は、スフィンゴシン1リン酸シグナル異常時に見られる表現型に酷似しており、過剰なLPAシグナルは、スフィンゴシン1リン酸シグナルを抑制する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is clarifying the molecular machinery of lysophospholipid signaling using zebrafish. Aberrant lysophosphatidic acid signaling is involved in multiple diseases including cancer and pulmonary fibrosis, although the how the excessive lysophosphatidic acid signaling cause these diseases is still unknown. We overexpressed the lysophosphatidic acid-producing enzyme, autotaxin, in zebrafish embryo. Unexpectedly, the embryo displayed cardia bifida phenotype, that is rescued by down-regulating the lysophosphatidic acid signaling by lysophosphatidic acid receptor morpholino. Cardia bifida phenotype is typically observed in the hypo-sphingosine 1-phosphate signaling embryo, and therefore, excessive lysophosphatidic acid signaling may be involved in down regulating the sphingosine 1-phosphate signaling.

研究分野：脂質生化学

キーワード：脂質

1. 研究開始当初の背景

単純な構造を有するリゾホスファチジン酸 (LPA) は、6 種類の LPA 特異的 G 蛋白質共役型受容体 (LPA₁₋₆) を介して多彩な生体機能を発揮することから、第 2 世代の脂質メディエーターとして注目を集めている。申請者はこれまでに LPA₁ ノックアウト (KO) マウスおよび LPA₃ KO マウスを用いた解析により、LPA 刺激による細胞運動促進に LPA₁ の機能が必須であること、および受精卵の着床過程において母体側の LPA₃ の機能が必須であることを明らかにした。一方、過剰なリゾホスファチジン酸シグナルは、癌や肺線維症などの様々な病態に寄与していることが示されているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では過剰な LPA シグナルの影響を個体レベルで検証するため、ゼブラフィッシュを用いることとした。また、皮膚などにおける重要性が明らかにされている極長鎖脂肪酸含有リン脂質の産生、代謝機構を解析する。

2. 研究の目的

過剰な LPA シグナルがゼブラフィッシュ胚に及ぼす影響、およびその作用機序を検証する。また、極長鎖脂肪酸含有リン脂質の定量系の構築を行う。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ胚に LPA 産生酵素であるオートタキシンを過剰発現させ、得られた表現型が、LPA シグナル依存的であるか、およびその類似の表現型を生じる変異体との遺伝学的関連性を検証する。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ LPA 産生酵素ホモログのクローニング、およびその生化学的解析 マウスおよびヒト LPA 産生酵素オートタキシンを元にゼブラフィッシュゲノムデータベースをサーチし、LPA 産生酵素ホモログ候補遺伝子を挙げた。当該遺伝子をクローニングし、培養細胞に発現させたところ、培養上清

中に LPA 産生活性が認められた。以上の結果は、オートタキシンのゼブラフィッシュホモログも、細胞外に放出され、LPA 産生酵素として機能しうることを示唆する。

(2) 過剰な LPA シグナルがゼブラフィッシュ胚発生におよぼす影響の検証

ゼブラフィッシュオートタキシンおよびマウスオートタキシンの mRNA をゼブラフィッシュ胚に注入し、過剰な LPA シグナルを胚に生じさせた。その結果、ゼブラフィッシュ胚は、二股心臓の表現型を呈した。この表現型は、酵素活性中心に変異を入れた変異体オートタキシンでは観察されなかったこと、および、LPA 受容体に対するモルフォリノアンチセンスオリゴをオートタキシンの mRNA と同時に注入することで、二股心臓の表現型が緩和したことから、過剰な LPA シグナルに依存することが示された。二股心臓の表現型は、スフィンゴシン 1 リン酸の受容体あるいはそのトランスポーターに関する変異体の表現型と酷似していることから、過剰な LPA シグナルが、S1P シグナルを抑制する可能性が示された。また、極長鎖含有リン脂質の定量系を、LC-MS を用いて構築した。極長鎖含有リン脂質は生体中に微量しか存在しないため、高感度を維持し、かつ測定対象の網羅性を高めるため、多段階 MRM 法を用いた。

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 3 件)

1. Nakanaga K., Hama K., Kano K., Sato T., Yukiura H., Inoue A., Saigusa D., Tokuyama H., Tomioka Y., Nishina H., Kawahara A., Aoki J. Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling

in zebrafish embryo. J Biochem. 2014 155 (4) 235-241 査読有

2. Hama K., Nagai T., Nishizawa C., Ikeda K., Morita M., Satoh N., Nakanishi H., Imanaka T., Shimozawa N., Taguchi R., Inoue K., Yokoyama K. Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. Lipids. 2013 48 (12) 1253-1267 査読有

3. Saigusa D., Shiba K., Inoue A., Hama K., Okutani M., Iida N., Saito M., Suzuki K., Kaneko T., Suzuki N., Yamaguchi H., Mano N., Goto J., Hishinuma T., Aoki J., Tomioka Y. LPA3, Simultaneous quantitation of sphingoid bases and their phosphates in biological samples by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2012 403 (7), 1897-1905 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 横山 和明、濱弘太郎、藤原 優子、ペルオキシソーム病:脂質のメタボローム解析によるバイオマーカーの探索、日本薬学会第 135 回年会、2015. 3. 25-2015. 3. 28、神戸、神戸学院大学
2. Kotaro Hama, Yuko Fujiwara, Kazutaka Ikeda, Tsuneo Imanaka, Nobuyuki Shimozawa, Ryo Taguchi, and Kazuaki Yokoyama、Metabolomic analysis of phospholipids of X-linked adrenoleukodystrophy、6th international conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015)、2015. 2. 10-2015. 2. 12、東京、京王プラザホテル

3. 濱弘太郎、藤原優子、今中常雄、下澤伸行、横山和明、ESI-LC/MS によるリン脂質の分子種別の網羅的解析方法の樹立-ALD における病型診断バイオマーカーの発見を目指して-、第 56 回 日本先天代謝異常学会総会、2014. 11. 13-2014. 11. 15、仙台、江陽グランドホテル

4. 濱弘太郎、藤原優子、今中常雄、下澤伸行、横山和明、副腎白質ジストロフィー患者血漿中リン脂質の網羅的解析、第 87 回 日本生化学会、2014. 10. 15-2014. 10. 18、京都、国際会館

5. 飯塚貴博、植野陽子、川口智也、武ゆかり、村上翔子、森山遥加、濱弘太郎、藤原優子、横山和明、ESI-LC/MS によるリン脂質および糖脂質の網羅的解析方法の検討、第 58 回 日本薬学会関東支部大会、2014. 10. 4、東京、昭和薬科大学

6. 百瀬絵理、小宮芽以、濱弘太郎、横山和明、分裂酵母変異体株 *lsd1* の網羅的脂質解析、第 57 回日本薬学会関東支部大会、2013. 10. 26-2013. 10. 26、東京、帝京大学

7. 濱弘太郎、横山和明、Lipids with very long chain fatty acids in yeast mutant *lsd1*、第 86 回日本生化学会大会、2013. 9. 11-2013. 9. 13、横浜、パシフィコ横浜

8. 西澤千穂、濱弘太郎、永井徹、池田和貴、守田雅志、唐澤健、原田史子、谷川和也、佐藤典子、田口良、下澤伸行、今中常雄、井上圭三、横山和明、極長鎖脂肪酸含有脂質の定量解析による 2 つのペルオキシソーム病の比較、日本薬学会第 133 回年会、2013. 3. 27-2013. 3. 30、横浜、パシフィコ横浜

9. 藍川志津、濱弘太郎、可野邦行、青木淳賢、LPA は LPA3 受容体を介し、着床期子宮の血管新生を更新させる、第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 14-2012. 12-16 福岡、

福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

10. 可野邦行、遠藤智子、濱弘太郎、新井洋由、Jerold Chun、青木淳賢、リゾホスファチジン酸受容体 LPA3 の活性化は迷走神経刺激の感受性を亢進させる、第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 14-2012. 12-16 福岡、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
11. 雪浦弘志、濱弘太郎、奥平真一、井上飛鳥、青木淳賢、Lipid phosphate phosphatase 3 (LPP3)による血管形成制御機構の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 14-2012. 12-16 福岡、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
12. 板井恵理子、有馬直明、濱弘太郎、井上飛鳥、奥平真一、青木淳賢、軟骨形成における LPA signal の機能解析、第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 14-2012. 12-16 福岡、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱 弘太郎 (HAMA KOTARO)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：20534481

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：