

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460380

研究課題名(和文)特徴的なリン脂質組成形成による生体機能調節の解明

研究課題名(英文)Analysis of biological function regulated by membrane phospholipid diversity

研究代表者

進藤 英雄 (SHINDOU, Hideo)

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・副プロジェクト長

研究者番号：10401027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜グリセロリン脂質は脂肪酸の特徴の違いなどから多様で、細胞機能発揮に必要と考えられる。本研究では、lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1)/dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)の呼吸機能、LPCAT2/血小板活性化因子(PAF)の神経因性疼痛、LPCAT3/アラキドン酸含有リン脂質によるトリアシルグリセロール分泌、との関連がわかった。また、LPCAT2の活性調節や阻害剤スクリーニングも行った。さらに脂質の細胞内動態を観察するためにBr脂肪酸を作製し、X線での細胞内脂質可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Membrane glycerophospholipids are important not only as structural and functional components of cellular membranes, but also as precursors of various lipid mediators, such as platelet-activating factor (PAF). In this study, we reported three phospholipid functions. (i) Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) produced by lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) is important for respiratory function. (ii) Platelet-activating factor (PAF) by LPCAT2 exacerbated neuropathic pain. (iii) Arachidonic acid containing phospholipid by LPCAT3 were needed for triacylglycerol secretion. Molecular mechanism of LPCAT2 activation and screening of LPCAT2 inhibitor were also reported. Additionally, we established a new method to visualize lipid in cells.

研究分野：脂質生化学

キーワード：生化学 リン脂質 生体膜 リゾリン脂質アシル転移酵素 脂質メディエーター

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜グリセロリン脂質は組織や細胞によって異なり多様な分子種(約1000種類)が存在する。sn-2位の脂肪酸はランズ回路(Lands, W. E. M. J. Biol. Chem. 1958)でホスホリパーゼA2(PLA2)による切り出しとリゾリン脂質アシル転移酵素による再結合(アシル化)によって入れ換えられる。このステップで組織や細胞に特異的なグリセロリン脂質を合成できる。それぞれの組織や細胞に特徴的な複数のリゾリン脂質アシル転移酵素が働き、多様な生体膜グリセロリン脂質を合成できる。生体膜リン脂質生成の概念の発表から50年以上経て責任酵素群(リゾリン脂質アシル転移酵素群)が発見されたため、近年、生体膜リン脂質解析はまさにアウトブレイクを起こしている。しかし、まだ遺伝子同定から日が浅く、世界的に見ても生化学的な解析に留まっている。今後、酵素遺伝子の欠損細胞や欠損マウスの解析から生体内での機能を明確にすることが重要である。

### 2. 研究の目的

生体膜グリセロリン脂質は脂肪酸の特徴の違いなどから約1000種類程存在する。それらは組織得意的な脂肪酸組成をなし、細胞機能発揮に必要とされている。このリン脂質の多様性は脂肪酸が組織や細胞特異的に入れ換えられるランズ回路で決定されると考えられている。この反応を触媒するのが本研究課題のターゲット遺伝子群であるリゾリン脂質アシル転移酵素群である。本酵素群は存在の確認から50年を経て近年13種類(私達は7種類発見)遺伝子同定された。これらを解析し、生体膜生合成機構の解明から細胞理解を深めたい。さらに細胞機能に必須な特徴的な生体膜リン脂質の解析から、新しい視点からの疾患解明や治療法開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### LPCAT1

欠損マウスの呼吸機能解析、過換気呼吸も出る解析とリン脂質生合成解析を行った。

#### LPCAT2

活性調節や阻害剤スクリーニング、欠損マウスで疼痛解析、神経因性疼痛モデル解析を行った。

#### LPCAT3

欠損マウスの新生児致死の原因解析、アラキドン酸含有リン脂質とトリアシルグリセロール分泌を調べた。

#### 細胞内脂肪酸可視化技術開発

細胞に臭素(Br)ラベルパルミチン酸やステアリン酸を導入し、X線顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### LPCAT1

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質が変化することにより、肺にダメージがあり、炎症を誘発したためであった(Harayama et al. Cell Metab. 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の一端を報告した。18:2や22:6の脂肪酸はホスファチジン酸生合成の段階、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で組み込まれやすいことがわかった。

#### LPCAT2

血小板活性化因子(PAF)生合成酵素であるLPCAT2の解析が進んだ。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)。

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欠損マウスは疼痛軽減が無かった。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。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

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分泌が低下し、小腸での脂質が蓄積、さらに血中への輸送量が減ったと考えられた。リン脂質組成の局所的な違いが与える生命機能の一端の報告となった。(Hashidate-Yoshida T et al Elife 06328)

2015)

#### 可視化技術

細胞内脂肪酸可視化技術を発表した。Br ラベルパルミチン酸と Br ラベルステアリン酸を CHO 細胞培養液に添加し、Spring 8 の Scanning X-ray fluorescence microscopy 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 シグナルを検出できた。同時に脂質解析を行い、ほとんどがリン脂質由来である事、また多様なリン脂質となっている事も確認した。新しい細胞内脂質の可視化技術として、今後発展させたい。(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 14 件)

(1) Shindou, H.\*, Shiraishi, S.\*, Tokuoka, M. S., Takahashi, Y., Harayama, T., Abe, T., Bando, K., Miyano, K., Kita, Y., Uezono, Y., Shimizu, T. (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>

(2) Shigematsu, M., Koga, T., Ishimori, A., Saeki, K., Ishii, Y., Taketomi, Y., Ohba, M., Jo-Watanabe, A., Okuno, T., Harada, N., Harayama, T., Shindou, H., Li JD, Murakami, M., Hoka, S., Yokomizo, T. (2016) Leukotriene B4 receptor type 2 protects against pneumolysin-dependent acute lung injury. Sci Rep. Oct 5;6:34560. doi: 10.1038/srep34560.

(3) Doi, H., Sato, K., Shindou, H., Sumi, K., Koyama, H., Hosoya, T., Watanabe, Y., Ishii, S., Tsukada, H., Nakanishi, K., and Suzuki, M. (2016) Blood-brain barrier permeability of ginkgolide: Comparison of the behavior of PET probes 7a-[18F]fluoro- and 10-O-p-[11C]methylbenzyl ginkgolide B in monkey and rat brains. Bioorg. Med. Chem. 24. 5148-5157. doi: 10.1016/j.bmc.2016.08.032.

(4) Shimura, M.\*#, Shindou, H.\*#, Szyrwiel, L.\*, Tokuoka, M.S., Hamano, F., Matsuyama, S., Okamoto, M., Matsunaga, A., Kita, Y., Ishizaka, Y., Yamauchi, K., Komura, Y., Lobinski, R., Shimizu, I., Shimizu, T. (2016) Imaging of Intracellular Fatty

Acids by Scanning X-ray Fluorescence Microscopy. FASEB J. 30. 4149-4158. DOI: 10.1096/fj.201600569R

\*, equal contribution

#, equal corresponding author

(5) Tabe, S., Hikiji, H., Ariyoshi, W., Hashidate-Yoshida, T., Shindou, H., Okinaga, T., Shimizu, T., Tominaga, K., and Nishihara, T. (2016) Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 1/membrane bound 0-acyltransferase 1 regulates morphology and function of P19C6 cell-derived neurons. FASEB J. 30. 2591-2601. doi: 10.1096/fj.201500097R

(6) Akagi, S., Kono, N., Ariyama, H., Shindou, H., Shimizu, T., and Arai, H. (2016) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 protects against cytotoxicity induced by polyunsaturated fatty acids. FASEB J. 30. 2027-39. DOI: 10.1096/fj.201500149

(7) Harayama, T., Shindou, H., Kita, Y., Otsubo, E., Ikeda, K., Chiba, S., Weaver, T. and Shimizu, T. (2015). Establishment of LC-MS method for the analysis of palmitoylated surfactant proteins. J. Lipid Res. 56. 1370-9. doi: 10.1194/jlr.D060236.

(8) Taniguchi K., Hikiji H., Okinaga T., Hashidate-Yoshida T., Shindou H., Ariyoshi W., Shimizu T., Tominaga K., and Nishihara T. Essential Role of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 in the Induction of Macrophage Polarization in PMA-Treated U937 Cells. (2015) J. Cell Biochem. 116. 2840-8. doi: 10.1002/jcb.25230.

(9) Hashidate-Yoshida T., Harayama T., Hishikawa D., Morimoto R., Hamano F., Mitamura-Tokuoka S., Eto M., Tamura-Nakano M., Yanobu-Takanashi R., Mukumoto Y., Kiyonari H., Okamura T., Kita Y., Shindou H., and Shimizu T. (2015) Fatty acyl-chain remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. eLife 21;4. doi: 10.7554/eLife.06328.

(10) Antonny B., Vanni, S., Shindou H., and Ferreira T. (2015) From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle functions. Trends in Cell Biology. 25:427-36. doi: 10.1016/j.tcb

(11) Koeberle, A., Pergola, C., Shindou, H., Koeberle, SC., Shimizu, T., Laufer, SA., and Werz O. (2015) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in linking stearyl-CoA desaturase-1 activity with ER homeostasis. *FASEB J.* 29. 2439-2449. doi: 10.1096/fj.14-268474

(12) Tarui, M., Shindou, H. (corresponding author), Kumagai, K., Morimoto, R., Harayama, T., Hashidate, T., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Nagase, T., and Shimizu, T. (2014) Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. *J. Lipid Res.* 55. 1386-1396 10.1194/jlr.M049205

(13) Harayama, T., Eto, M., Shindou, H., Kita, Y., Otsubo, E., Hishikawa, D., Ishii, S., Sakimura, K., Mishina, M., and Shimizu, T. (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. (corresponding author), Tarui, M., and Shimizu, T. (2014) Rapid Production of Platelet-activating Factor Is Induced by Protein Kinase C -mediated Phosphorylation of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2. *J. Biol. Chem.* 289. 15566-15576 doi: 10.1074/jbc.M114.558874.

〔学会発表〕(計 27 件)

進藤英雄

2種の機能性リン脂質解析：血小板活性化因子と神経因性疼痛・DHAリン脂質と視覚機能  
第5回 生体情報研究シンポジウム

2017年2月17日

秋田大学 本道会館

進藤英雄

一元素ラベルによる細胞内脂肪酸運命の可視化

第15回ホスファチジルセリン研究会

2016年11月18日、早稲田大学 日本橋

赤木聡介、河野望、有山博之、進藤英雄、清水孝雄、新井洋由

高度不飽和脂肪酸負荷に対する細胞応答とその生理的意義の解析

第58回 日本脂質生化学会

2016年6月9、10日

にぎわい交流館 AU、秋田

花香博美、進藤英雄、北芳博、徳岡涼美、今城純子、清水孝雄

膜結合型プロスタグランジンE合成酵素ノックダウン細胞における統合オミクス解析

第58回 日本脂質生化学会

2016年6月9、10日

にぎわい交流館 AU、秋田

進藤英雄、志村まり、Lukasz Szyrwił, 岡本真由美、浜野文三江、徳岡涼美、北芳博、清水功雄、清水孝雄

細胞内脂肪酸運命の可視化

第58回 日本脂質生化学会

2016年6月9、10日

にぎわい交流館 AU、秋田

Hideo Shindou, Takao Shimizu

Platelet-activating factor and eicosanoid regulation by LPCAT2

第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会大会 合同大会

2015/12/4

神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市中央区港島中町 6-11-1)

橋立(吉田)智美、原山武士、菱川大介、森本亮、浜野文三江、徳岡涼美、衛藤樹、北芳博、進藤英雄、清水孝雄

The role of lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3) modulating triacylglycerol transport

第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会大会 合同大会

2015/12/3

神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市中央区港島中町 6-11-1)

進藤 英雄

生体機能に寄与する生体膜リン脂質の多様性形成

第一回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム

2015/11/12

群馬大学 (群馬県前橋市昭和町 3-39-15)

進藤 英雄

IPAを活用した生体膜リン脂質代謝解析

Ingenuity ユーザーグループミーティング

2015/10/2

大手町サンケイプラザ (東京都千代田区大手町 1-7-2)

William Valentine, Hideo Shindou, Daisuke Hishikawa, and Takao Shimizu

Lysophospholipid Acyltransferases (LPLATs) modulate lipid compositions of cellular membranes during myoblast differentiation

第57回日本脂質生化学会

2015/5/28-5/29(5/29)  
一橋大学 一橋講堂 (東京都千代田区一ツ橋 2-1-2)

橋立(吉田) 智美、原山 武士、菱川 大介、森本 亮、浜野 文三江、徳岡 涼美、衛藤 樹、北 芳博、進藤 英雄、清水 孝雄  
リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 3(LPCAT3) による トリアシルグリセロール輸送の調節機構  
第 57 回日本脂質生化学会  
2015/5/28-5/29(5/29)  
一橋大学 一橋講堂 (東京都千代田区一ツ橋 2-1-2)

Ryo Morimoto, Hideo Shindou, Megumi Tarui, Takao Shimizu  
Regulatory mechanisms of platelet-activating factor (PAF) production in macrophages and identification of a specific inhibitor for PAF synthetic enzyme (LPCAT2) by high-throughput screening - Poster #29  
LIPID MAPS Annual Meeting 2015:Lipidomics Impact on Cancer, Metabolic, and Inflammatory Diseases  
May 12-13, 2015, La Jolla, CA  
Scripps Seaside Forum of the University of California San Diego's Scripps Institution of Oceanography (8610 Kennel Way formerly Discovery Way, La Jolla, CA 92037)

進藤 英雄  
生体膜脂質の多様性形成と多様な役割  
第 9 回 レドックス・ライフイノベーションシンポジウム  
2015 年 3 月 12 日~13 日  
神奈川県横浜市 理化学研究所横浜キャンパス

進藤 英雄  
生体膜リン脂質脂肪酸多様性形成メカニズムの解析  
第二回 JFAS(Japan/Joy of Fatty Acids Secrets/Society)  
2015 年 2 月 15 日  
東京都千代田区 アキバホール

Miki Eto, Hideo Shindou, Takao Shimizu  
Lysophosphatidic acid acyltransferase 4 (LPAAT4), a novel enzyme with activity for incorporating DHA into glycerophospholipids  
6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators  
2015 年 2 月 10 日~12 日  
新宿 京王プラザホテル東京

Miki Eto, Hideo Shindou, Takao Shimizu

Identification of lysophosphatidic acid acyltransferase 4 (LPAAT4), a possible role for incorporating DHA into glycerophospholipids  
Max Planck-The University of Tokyo Center Symposium 2014  
December 17, 2014  
Harnack House. The Conference Venue of the Max Planck Society Ihnestr. 16-20 - 14195 ( Berlin)

Hideo Shindou and Takao Shimizu  
Membrane remodeling by lysophospholipid acyltransferases  
Conferences Jacques Monod  
November 15-19, 2014  
Roscoff (Brittany), France

衛藤 樹, 橋本 唯史, 進藤 英雄, 岩坪 威, 清水 孝雄  
ドコサヘキサエノイル-CoA (DHA-CoA) 特異的新規リゾホスファチジン酸アシル転移酵素 LPAAT4 の同定およびアルツハイマー病との関連についての解析  
第 87 回日本生化学会大会  
2014 年 10 月 17 日  
国立京都国際会館

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  
新規肺胞腔内脂質結合タンパク質 Sec14-like 3 の生化学的機能解析  
第 87 回日本生化学会大会  
2014 年 10 月 16 日  
国立京都国際会館

進藤 英雄, 森本 亮, 垂井 愛, 衛藤 樹, 原山 武士, 清水 孝雄  
生体膜リン脂質多様性形成メカニズム  
第 87 回日本生化学会大会  
2014 年 10 月 15 日  
国立京都国際会館

Daisuke Hishikawa, Hideo Shindou, Takeshi Harayama, Rie Ogasawara, Akira Suwabe, and Takao Shimizu  
Identification of novel pulmonary surfactant lipid-related protein, Sec14-like 3  
FASEB The Lung Epithelium in Health and Disease  
July 27-August 1, 2014  
Vermont Academy  
Saxtons River, Vermont, USA

Ryo Morimoto, Hideo Shindou, Megumi Tarui, Takao Shimizu  
Phosphorylated lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (LPCAT2) mediates rapid

platelet-activating factor (PAF) production following PAF- or ATP-stimulation in macrophages  
55th International Conference on the Bioscience of Lipids: Lipids as Mediators of Health and Disease  
June 23-27, 2014  
University of Aberdeen  
Aberdeen AB24 3FX Scotland

Miki Eto, Hideo Shindou, Takao Shimizu  
Identification of a novel lysophosphatidic acid acyltransferase enzyme (LPAAT4) with preference for polyunsaturated fatty acyl-CoA  
55th International Conference on the Bioscience of Lipids: Lipids as Mediators of Health and Disease  
June 23-27, 2014  
University of Aberdeen  
Aberdeen AB24 3FX Scotland

垂井 愛、進藤 英雄、森本 亮、原山 武士、橋立 智美、熊谷 和夫、長野 哲雄、長瀬 隆英、清水 孝雄  
High-throughput screening による PAF 生合成酵素 (LPCAT2) 阻害剤の同定  
第 56 回 日本脂質生化学会  
2014 年 6 月 7 日  
近畿大学 東大阪キャンパス

森本 亮、進藤 英雄、垂井 愛、清水 孝雄  
PKC を介した血小板活性化因子合成酵素 LPCAT2 のリン酸化  
第 56 回 日本脂質生化学会  
2014 年 6 月 7 日  
近畿大学 東大阪キャンパス

衛藤 樹、進藤 英雄、清水 孝雄  
多価不飽和脂肪酸含有リン脂質合成に関わる新規リゾホスファチジン酸アシル転移酵素(LPAAT4)の同定  
第 56 回 日本脂質生化学会  
2014 年 6 月 6 日  
近畿大学 東大阪キャンパス

Hideo Shindou, Ryo Morimoto, Megumi Tarui, Takao Shimizu  
Rapid phosphorylation and activation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 via protein kinase c  
FASEB  
Phospholipid Cell Signaling and Metabolism in Inflammation and Cancer  
June 1-6, 2014  
Sheraton At The Falls

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
進藤 英雄 (SHINDOU, Hideo)  
国立国際医療研究センター 副プロジェクト長  
研究者番号: 10401027

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
菱川 大介 (HISHIKAWA, Daisuke)  
国立国際医療研究センター 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 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 研究員  
研究者番号: 50610218

菱川 佳子 (HISHIKAWA, Yoshiko)  
国立国際医療研究センター 研究員  
研究者番号: 60436574

垂井 愛 (TARUI, Megumi)  
国立国際医療研究センター 研究員  
研究者番号: 40727749

(4) 研究協力者  
柳田 圭介 (YANAGIDA, Keisuke)  
William Valentine (VALENTINE, William)

高橋 佳一 (TAKAHASHI, Yoshikazu)

長田 克之 (NAGATA, Katsuyuki)

衛藤 樹 (Eto, Miki)

森本 亮 (MORIMOTO, Ryo)

雨宮 愛美 (AMEMIYA, Ami)

等々力 成葉 (TODORIKI, Naruha)

伊東 完 (ITO, Hiroshi)