

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670132

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of a method for quantification of phosphoinositides molecular species

研究代表者

佐々木 純子 (Sasaki, Junko)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30333371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜リン脂質の一種であるイノシトールリン脂質(PIPs)はシグナリング脂質として様々な細胞生理応答に関与する。近年、質量分析法を用いた解析方法が開発され、アシル基を含むPIP_s解析が可能となってきた。しかしながら現法では、同一の質量となる3種のPIP₁アイソマーや、3種のPIP₂アイソマーを見分けることができない。本研究では、これらのPIP_sアイソマーを検出可能とする新規のPIP_s解析技術の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Phosphoinositides (PIPs) are membrane lipids which play a role in various cellular functions. Recently a sensitive method for measuring PIPs molecular species is developed using mass spectrometry, however this method cannot discriminate among PIP₁ and PIP₂ isomers. We tried to establish a new method for measurement of these PIPs isomers.

研究分野：脂質生化学

キーワード：細胞内シグナル伝達 イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質 (PIP_s) は、グリセロールにイノシトール環と2つのアシル基が結合した構造を有する。これまでの研究から、極性基であるイノシトール環のリン酸化状態により7種類に分類されたPIP_sは、それぞれに特有の機能を有し、シグナリング分子として多岐にわたる細胞応答に関与することが明らかになっている。近年、質量分析法を用いた高感度かつ定量性に優れた解析方法が開発され、アシル基を含むPIP_s解析が可能となってきた。しかしながら現法では、同一の質量となる3種のPIP₁アイソマーや、3種のPIP₂アイソマーを見分けることができない。現在のところ、これらのアイソマーを分離・解析する方法としては、ラジオアイソトープ標識した細胞から脂質を抽出し、脱アシル化後、強アニオン交換カラムで分離する手法が確立されているが、感度が十分ではなく、また脱アシル化するため、アシル基を含めた分子種は解析できない。そのため、アシル基を含めたPIP_s分子種の生理的な意義については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、アシル基を保持したままのPIP_sアイソマーを検出できる、新規のPIP_s解析技術の開発を目指す。そして、PIP₁やPIP₂のアシル基の変動をきたす細胞応答を見出し、アシル基を含むPIP_s分子種の生理機能を解析する。

3. 研究の方法

- (1) カラムの検討。
- (2) 培養細胞由来脂質を用いた解析。
- (3) 測定条件、機器の見直し。
- (4) PIP_sアシル基の変動をきたす細胞応答の探索と生理機能。

4. 研究成果

(1) PIP₁、PIP₂アイソマー分離が期待されるカラムとして、極性の違いにより分離可能な順相カラム、酸性の物性をもつ分子を分離できるアニオン交換カラム、光学異性体の分離に用いられるキラルカラムが候補として考えられた。そこでこれらのカラムを用いて順次検討を行った。検出には、当研究部門で既に確立しているPIP_s測定方法(三連四重極質量分析計を用いた選択反応モニタリング法)を適用した。その結果、PIP₁アイソマーの分離には至らなかったものの、標準品のPIP₂アイソマーを分離できるカラムを見出すことができた。

(2) 上記(1)で見出した条件を用いて、

培養細胞におけるPIP₂アイソマーを測定した。その結果ピークが複数検出されてしまい、ピーク同定ができないことが判明した。アシル基組成が異なる標準品を用いた場合でもピークがブロードもしくは複数検出されたことから、カラムがリン酸基の位置だけでなく、*sn*-1,2位脂肪酸の位置異性体なども認識して分離しているためと考えられた。

(3)(2)の問題点を解決するために、脱アシル化した標準品を用いての条件検討、リン酸基の保護、カラムの種類と質量分析装置の見直しについて検討を加えた。その結果、アシル基組成の異なるPIP₂標準品を再現性良く分離可能な測定条件を見出すことに成功した。細胞由来の脂質や、PIP₁アイソマーについては現在解析を進めている。

(4) PIP_sアシル基の変動をきたす細胞応答を探索したところ、炎症性刺激を施したRaw264.3細胞では、38:4(主に18:0-20:4の組合せ)PIP₁分子種が減少することを見出した。炎症性刺激における38:4PIP₁の機能を調べるために、リゾホスファチジルイノシトール(LPI)の*sn*-2位にアラキドン酸を導入するLPIAT1やLPIの*sn*-1位にステアリン酸を導入するLYCATを薬剤誘導性に過剰発現する細胞を作製した。そして炎症性刺激により産生されるサイトカイン量をELISA法にて測定した。その結果、LPIAT1の過剰発現によりサイトカイン産生は減弱したが、LYCATの過剰発現では差が認められなかった。さらに培地にアラキドン酸を添加するとサイトカイン産生量は減少したが、ステアリン酸添加では変動しなかった。以上の結果より、PIP_sのアシル基変動は炎症性刺激におけるサイトカイン産生に関与することが示唆された。今後、(3)で進めているPIP₁アイソマー解析方法を用いて、どのPIP₁アイソマー分子種が重要であるのかを明らかにする予定である。

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7件)

Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. JCI Insight., 12, 2(1), e89462, (2017), 査読有, doi:

10.1172/jci.insight.89462.

Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa S, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, Setou M, Yabe H. Decreased 16:0/20:4-phosphatidylinositol level in the post-mortem prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Scientific Reports*. 7, 45050-45060, (2017), 査読有, doi: 10.1038/srep45050.

Abe F, Kitadate A, Ikeda S, Yamashita J, Nakanishi H, Takahashi N, Asaka C, Teshima K, Miyagaki T, Sugaya M, Tagawa H. Histone deacetylase inhibitors inhibit metastasis by restoring a tumor suppressive microRNA-150 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Oncotarget* 8, 7572-7585, (2017), 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.13810.

Morioka S, Nigorikawa K, Sasaki J, Hazeki K, Kasuu Y, Sasaki T, Hazeki O. Myeloid cell-specific inositol polyphosphate-4-phosphatase type I knockout mice impair bacteria clearance in a murine peritonitis model. *Innate Immun*. 22(6), 444-51, (2016), 査読有, doi: 10.1177/1753425916652714.

Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discov*. 5(7), 730-739, (2015), 査読有,

doi: 10.1158/2159-8290.

Chew CL, Lunardi A, Gulluni F, Ruan DT, Chen M, Salmena L, Nishino M, Papa A, Ng C, Fung J, Clohessy JG, Sasaki J, Sasaki T, Bronson RT, Hirsch E, Pandolfi PP. In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K/AKT signaling at endosomes. *Cancer Discov*. 5(7), 740-751, (2015), 査読有, doi: 10.1158/2159-8290.

Nigorikawa K, Hazeki K, Sasaki J, Omori Y, Miyake M, Morioka S, Guo Y, Sasaki T, Hazeki O. Inositol Polyphosphate-4- Phosphatase Type I Negatively Regulates Phagocytosis via Dephosphorylation of Phagosomal PtdIns(3,4)P2. *PLoS One*, 4, 10(11), e0142091, (2015), doi: 10.1371/journal.pone.0142091.

Ip LR, Poulogiannis G, Viciano FC, Sasaki J, Kofuji S, Spanswick VJ, Hochhauser D, Hartley JA, Sasaki T, Gewinner CA. Loss of INPP4B causes a DNA repair defect through loss of BRCA1, ATM and ATR and can be targeted with PARP inhibitor treatment. *Oncotarget*, 30, 6(12), 10548-10562, (2015), 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.3307

[学会発表](計 5件)

Takehiko Sasaki, Hiroki Nakanishi, Satoshi Eguchi, Masaki Ishikawa, Akira Suzuki, Junko Sasaki, A method for studying quality of phosphoinositides, 第39回日本分子生物学会, 2016年11月30日-12月2日, パシフィコ横浜

Junko Sasaki, Satoshi Kofuji, Hiroataka Kimura, Hiroki Nakanishi, Shunsuke Takasuga, Takehiko Sasaki, INPP4B

suppresses thyroid tumorigenesis by dephosphorylating PI(3,4,5)P3, Colloquium on Emerging Metabolomics, July 25-27, 2016, Las Vegas, USA

中西広樹、江口賢史、石川将己、鈴木聡、佐々木純子、佐々木雄彦、ホスホイノシタイトの新しい解析方法, 第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会, 2015年12月1-4日, 神戸ポートアイランド

Hiroataka Kimura, Satoshi Eguchi, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, The class III PI3K and phosphatidylinositol 3-phosphate ensure structural and functional integrity of cardiomyocyte, The 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists, the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, 2015年3月21-23日, 神戸コンベンションセンター
Junko Sasaki, Satoshi Kofuji, Takahiro Kimura, Shunsuke Takasuga, Hiroki Nakanishi, Takehiko Sasaki, The novel mechanism of tumor suppression by INPP4B, 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 2015年1月23-24日, 東京大学医科学研究所

〔図書〕(計 2件)

Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, Regulation of Chronic Inflammation by Control of Macrophage Activation and Polarization, Chronic Inflammation, (2016), 97-107, Springer

中西広樹, 最先端リポドミクスで膜リン脂質を測定する, 生体の科学, 67, 193-197, (2016), 医学書院

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: ホスホイノシタイト分離測定法の開発

発明者: 中西広樹, 佐々木雄彦, 佐々木純子, 江口賢史, 中西貴代
権利者: 国立大学法人秋田大学, ALTe
種類: 特許
番号: 特願 2017- 51354
出願年月日: 平成 29 年 3 月 16 日
国内外の別: 国内

名称: 新規リン脂質およびその利用
発明者: 佐々木雄彦, 中西広樹, 石川将己, 上野紀子, 江口賢史, 佐々木純子
権利者: 国立大学法人秋田大学, ALTe
種類: 特許
番号: 特願 2016-144177
出願年月日: 平成 28 年 7 月 22 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ
<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐々木 純子 (SASAKI JUNKO)
秋田大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 30333371

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
中西 広樹 (NAKANISHI HIROKI)
秋田大学大学生体情報研究センター・助教
研究者番号: 10466740

(4) 研究協力者 ()