

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：脂質メタボロームのための基盤技術の構築とその適用

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)：

研究代表者

田口 良(東京大学大学院医学系研究科 特任教授)

主たる共同研究者

久下 理(九州大学大学院理学研究院 教授)

小林 哲幸(お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 教授)

福崎 英一郎(大阪大学大学院工学研究科 教授)

横溝 岳彦(九州大学大学院医学研究院 教授)

横山 和明(帝京大学薬学部 教授)

高橋 勝利((独)産業技術総合研究所生命情報科学研究センター

細胞情報チーム長)(平成17年4月～平成21年3月)

3. 研究実施概要

目的:本研究では、生命活動に伴う脂質関連代謝分子の変動について、網羅的・包括的に質量分析データを取得して解析する基盤技術を構築すること、さらには、脂質メタボロームのリアルデータベースの作成を通じて、病態の解析、未知の代謝産物の発見、細胞機能の制御等にこの基盤技術を適用して解析することを目的とした。

方法:主要なグリセロ脂質、スフィンゴ脂質及びそれらの代謝物の包括的解析手法(Houjou T, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005)を開発し、かつ特定のグループを迅速に測定するフォーカスした手法(Taguchi R, et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2005)、さらに、通常的手法では検出が困難である酸化脂質(Nakanishi H, et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2009)、スフィンゴ糖脂質(Ikeda K, et al., *J Lipid Res.*, 2008)については、非常に高感度な特異的測定手法を確立した。また、これらの測定法により得られたデータから自動的に定性、定量が可能な検索ツールを開発した("Lipid Search") (<http://lipidsearch.jp>)。また種々の統計解析についても検討し、最も適した統計解析手法と、その適用の際の、脂質分子種のカテゴリー化の重要性について調べた。

結果:脂質メタボロームの為の質量分析手法の開発については、主要な脂質に対する網羅的手法(Houjou T, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005)(Taguchi R, Ishikawa M. *J Chromatogr A*;1217(25):4229-39. 2010)のほか、酸化脂肪酸、酸化リン脂質、酸性リン脂質、糖脂質等、メディエーターのような微量脂質成分の個々の分子をターゲットとした特異的な分析手法も確立できた(Taguchi R, et al., *Methods in Enzymol.*, 2007)(Nakanishi H, et al., *Methods Mol Biol.*, 2009)。また、同定検索エンジンである Lipid Search についても、実際の脂質混合物の測定データに応用し、実用可能なレベルの精度まで改良することが出来た。また、生体脂質の定性、定量データを多変量解析の主成分分析その他の手法で解析し、効率よく、サンプル間の類似性や差異を抽出するのに適した解析法を確立できた。これらの基盤技術を駆使した手法を、遺伝子変異マウスや病態モデルマウスを中心とする生体サンプルに適用し、以下の成果を得た。

田口グループは、これらの技術を肥満や各種炎症モデルマウスの解析に適用し、動脈硬化、心筋梗塞等の病態モデルにおいて、高度不飽和脂肪酸を持つ分子種を中心とした脂質代謝の異常をきわめて高感度で測定できることを確認した(Tokudome S, et al., *J Clin Invest.*, 2009)(Endo J, et al., *Circ Res.*, 2009)。また、いくつかの共同研究により、複数のリゾリン脂質が膜受容体のリガンドとしての活性を持つこと(Yanagida K, et al., *J Biol Chem.*, 2009)(Endo T, et al., *J Biochem.* 2009)(Iwashita M, et al., *J Med Chem.*, 2009)や、エイコサペンタエン酸の酸化代謝物の生理機能(Seki H, et al., *J Immunol.*, 2010)やそれに属する新たな抗炎症性脂質メディエーターを発見した。

開発した網羅的リン脂質の解析法により、動物の臓器が非常に大きな脂質分子種の特異性を持ち、それが臓器の生理的機能と密接に関連している可能性を確認できた。そして、これらの臓器特異的リン脂質分子種の維持に関係していると考えられるホスホリパーゼ A (Sato H, et al., *J Biol Chem.*,283(48):33483-33497,

2008) (Sato H, et al., J Clin Invest., 2010)やアシルトランスフェラーゼ(Nakanishi H, et al., J. Biol. Chem., 2006)(Shindou H, et al., J Biol Chem., 2007)(Hishikawa D, et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2008)の機能をそれらの基質特異性から推定することができた。さらに、レーザーマイクロダイセクションによる部位特異的サンプル取得法を組み合わせ、脂質分子種の局在とその生理的、病的機能解析に適用した結果、この手法が局所の代謝分子やその変動の解析に非常に有効であることを見いだした。また imaging MS による直接的な画像取得についても開発を開始した(Hayasaka T, et al., Rapid Commun Mass Spectrom., 2008)(Sugiura Y, et al., J Lipid Res., 2009)。さらに多変量解析の内、主成分分析が多様なサンプル間の差異や類似の解析に有効であり、判別分析解の一種である OPLS が、疾患マウスと正常マウスの間や遺伝子欠損マウスと野生型マウスの間における主要な変動因子を顕在化するのに非常に有効であることが判った。開発した脂質の自動同定ツール“Lipid Search”と多変量解析の組み合わせによる脂質メタボロームの包括的解析手法を確立することが出来た。脂質代謝分子の詳細な解析には、脂質分子種を同定し、カテゴリーに絞って解析することが非常に大切であることが証明された。現在、種々の疾患モデルや病態サンプルの解析での脂質バイオマーカーの具体的検出を行っている。

花田グループは、セラミドの小胞体からゴルジ体への細胞内輸送を担う蛋白質 CERT の機能がリン酸化によって負に制御されていることを明らかにし(Kumagai K, et al., J. Biol. Chem., 2007)、さらに CERT のセラミド認識機構を結晶解析などから明らかにした(Kudo N, et al., J. Mol. Biol., 2010)。横溝グループは、ロイコトリエン受容体である BLT1 と BLT2 の新しいドメインの機能を明らかにするとともに(Kuniyeda, K., et al., J. Biol. Chem., 2007, Yasuda D, et al., Faseb J., 2009、これら受容体の生体内での役割について病態との関係から明らかにした(Hikiji S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2009, Saiwai H, et al., Am. J. Pathology, 2010)。BLT2 受容体の生体内リガンドを精製し、12-HHTと呼ばれる不飽和脂肪酸であることを見いだした(Okuno T, et al., J. Exp. Med, 2008)。また、多数のエイコサノイドを一斉定量する系を確立した(Kita Y, et al; Anal. Biochem., 2005)。久下グループは、酵母を用いて、PS を中心としたリン脂質の代謝や輸送に関与する新たな遺伝子を多数同定した(Tomohiro S, et al., Biochem. J., 2009)。小林グループは、ステロイド関連代謝物のデータベース構築を行った。また、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 遺伝子改変マウスにリピドーム解析を適用して、動脈硬化や肥満への関与を明らかにした(Sato H, et al., J. Biol. Chem., 2008)。横山グループは、グリセロ脂質のデータベース構築に必要なデータを集積した。また、極長鎖脂肪酸を結合した異常なグリセリン脂質が生合成・蓄積することにより致死となる分裂酵母の変異株において、新規タンパク質が発現することを見だし、その機能を明らかにした(Yokoyama K, et al., J. Biochem., 2008)。福崎グループは、脂質メタボローム解析ツール(データマイニングシステム)の種々の改良を行った(Bamba T, et al., J. Biosci. Bioeng., 2008)。また GC/MS による脂肪酸アルデヒドの包括的測定の有効性を確認した。高橋グループの精密質量測定については、田口グループが引きついで、Orbitrap を用いた LCMS/MS 手法が新規脂質代謝物の構造解析に有効であることを確認した。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

脂質メタボローム解析の基盤技術として、主要グリセロ脂質、スフィンゴ脂質及びそれらの代謝物を対象とした包括的な解析手法、並びに特定の脂質グループをフォーカスして迅速に測定する方法や通常的手法では検出困難な酸化脂質、スフィンゴ糖脂質の高感度特異的測定法を確立した。また、データ解析に関しても同定検索エンジンである Lipid Search の開発や統計解析手法の開発が行われた。当初計画では想定されていなかった成果として、レーザーマイクロダイセクション法と Nano-ESI イオン化装置を組み合わせた部位特異的解析法や、MALDI/MS イメージング法による脂質局在の分析手法も開発された。これらの技術を肥満や各種炎症モデルマウスの解析に適用し、動脈硬化、心筋梗塞等の病態モデルにおける脂質代謝異常の高感度検出、新たな抗炎症性脂質メディエーターの発見、臓器特徴的な脂質分子種の同定とその生物学的役割の解明など、数多くの成果を挙げた。方法論および生物学的発見など、広範な研究について、共同研究者からの発表も含め、数多くのオリジナルな成果が論文(欧文原著論文107件)や口頭で発表されている。

##### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

脂質メタボローム研究の基盤技術の開発、並びにその実用化と応用による成果は、世界的にも先導的なものであり、高く評価できる。本研究で開発された技術は、共同研究者は勿論、さきがけ研究「代謝と機能制御」の研究者やその他国内の研究者に広く技術伝承され、脂質メタボローム研究の普及に大きく貢献してきた。三井情報開発と共同で開発したソフトウェア Lipid Search が市販され始めたことで、更なる普及が期待される。また、脂質メタボローム研究により、脂質を巡る基礎生物学、創薬、臨床応用の面で今後もさらに新しい展開

がなされることも大いに期待できる。領域の戦略目標への貢献が大きいことは明らかである。

#### 4-3. 総合的評価

質量分析器を用いた脂質の網羅的解析法や脂質解析ソフト **Lipid Search** の開発などによる脂質メタボローム解析の技術革新に大きく貢献し、その技術を多数の研究者に提供して共同研究を活発に行うと共に、この領域の若手の育成にも大きく貢献した。論文発表と学会発表も多数行われ、学術的貢献も多大である。本領域の戦略目標の趣旨に最も合致した研究成果を挙げたものであり、脂質メタボローム解析による脂質の機能や病態との関連の解明など、今後も大きな発展が期待できる。ここで開発された基盤技術は、国際的にもトップ水準にあり、今後も国際的な優位性を保つために、欧米で既に開始されているような国家プロジェクトとして支援されるように努力することを希望する。