

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明

### 2. 氏名

青木 淳賢

### 3. 研究のねらい

近年、リゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴシン 1-リン酸(S1P)、リゾホスファチジルコリン(LPC)、リゾホスファチジルセリン(LPS)などのリゾリン脂質が生理活性脂質として細胞間(あるいは膜間)のシグナリング分子として機能し、生体内で重要な役割を持っていることが明らかになってきた。これらの分子は、従来盛んに研究されてきたプロスタグランジン・ロイコトリエンとは構造・機能が大きく異なる第二世代の生理活性脂質として注目されている。我々は、これらの生理活性リゾリン脂質に関して、作用(受容体)・代謝(産生・分解酵素)機構を解明し、さらにノックアウトマウスを解析することによりその個体レベルでの意義を明らかにしてきている。これらの研究過程で、これらのリン脂質性生理活性脂質には、リン脂質頭部の極性基と脂肪酸の種類・結合様式により実に多様な分子種が存在し、それらが特有の機能を有することが明らかとなってきた。例えば、我々が同定したLPA受容体LPA<sub>3</sub>は、グリセロール骨格の *sn*-2 位に不飽和の脂肪酸を結合した特殊なLPA分子種にのみ反応し、受精卵の着床過程に関与する。また、様々な組織・細胞由来の脂質をマスマスペクトロメリーの手法で網羅的に解析すると、実に多様かつ未同定なリン脂質の分子種が実在することが分かってきている。これらの中には微量で強い生物活性を有するものが存在する可能性がある。本研究では、生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義を明らかにすることを目標に、(1)従来のリン脂質性生理活性脂質(LPA, LPS)の多様な分子種の実態とその意義を明らかにし、(2)さらに新規生理活性リン脂質の同定、代謝機構、さらにその機能に関する解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸(LPA)の産生機構とその意義

##### (A) LPA 産生酵素オートタキシンの機能

LPAの産生経路は複数想定されているが、生化学的に考えると、主に二つの経路に大別できる。1 つ目は、まず、リゾホスファチジルコリン(LPC)などのリゾリン脂質が産生され、続いてリゾリン脂質にリゾホスホリパーゼDという血漿酵素が作用しLPAが産生される経路である(図1 A)。この経路の存在は古くから知られていたが、この経路に関与する酵素の実態は不明であった。我々はこのリゾホスホリパーゼDが癌細胞浸潤促進因子として知られていたオートタキシン(Autotaxin; ATX)と同一であることを明らかにした。さらにATXが脳腫瘍、リンフォーマなど様々な癌細胞で発現が亢進してこと、ATXはLPAを産生しLPA<sub>1</sub>受容体を介し癌細胞の細胞運動を促進すること(図2)、血中ATXは慢性肝硬変、妊娠末期で顕著に上昇し、手術後一過的に減少するなど様々な生理的条件、病態で血中ATX

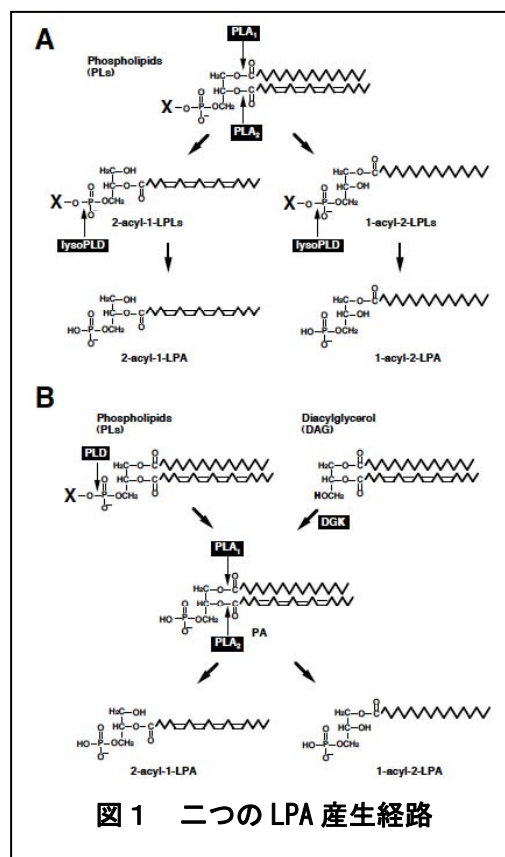
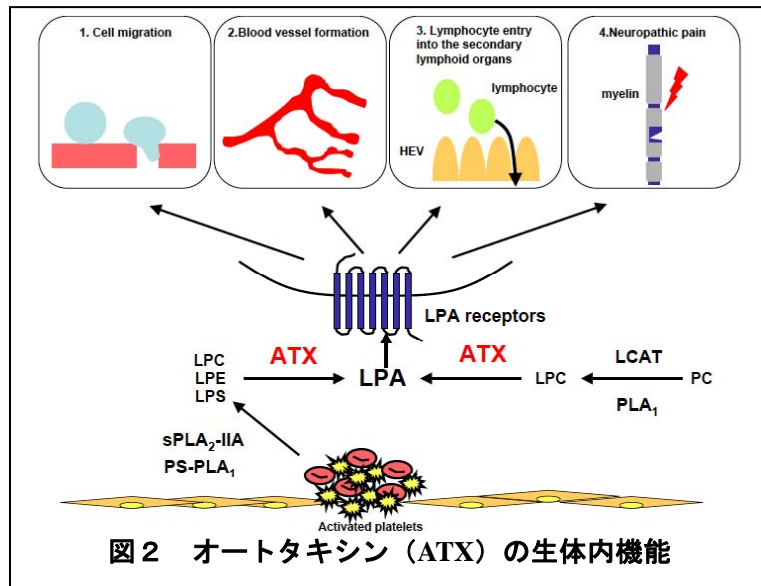


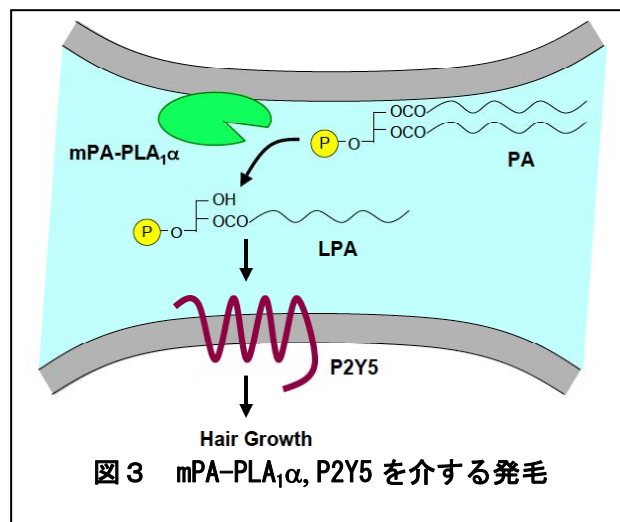
図1 二つのLPA産生経路

レベルが変動することなどを明らかにした。また、ATX KOマウスを解析し、KOマウスは血管形成不全により胎生致死となり、ATXが胎生期の血管新生に必須の分子であることも明らかにした。このような結果から、ATXは癌細胞の運動性を促進するだけでなく、ホストの血管形成を促進することにより癌の形成に深く関与することが想定された(図2)。また、我々は担癌モデルでATX阻害剤が有効である知見を得ている。一方、ATXはリンパ節内へのリンパ球の流入、神経因性疼痛に關与する重要な因子であることも明らかにしている(図2)。



#### (B) LPA産生酵素mPA-PLA<sub>1α</sub>の発毛における機能

2つ目は、ホスファチジン酸(PA)が産生され、次にPAのアシル基が加水分解されLPAが産生される経路である(図1B)。PAは細胞膜に存在するため、この経路は主に細胞からのLPA産生に重要であると考えられる。PAを産生する酵素としてホスホリパーゼD(PLD)とジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)が、PAからLPAを産生する酵素としてホスホリパーゼA<sub>1</sub>(PLA<sub>1</sub>)とPLA<sub>2</sub>が挙げられる。これらの酵素については未だ不明な点が多かったが、我々は、PAからLPAを産生するPLA<sub>1</sub>、膜結合型ホスファチジン酸特異的ホスホリパーゼA<sub>1</sub>(mPA-PLA<sub>1α</sub>)を同定し、ノックアウト(KO)マウスの解析を行った。mPA-PLA<sub>1α</sub>は毛包に特異的に発現し、KOマウスは縮毛の表現型を示した。興味深いことに、ヒトでもmPA-PLA<sub>1α</sub>の遺伝性変異が見つかり、mPA-PLA<sub>1α</sub>の欠損者は脱毛症を引き起こすことが報告された。また、P2Y5という機能未知のオーファンGPCRの欠損が、ヒトにおける脱毛症の原因遺伝子であることも報告された。P2Y5はmPA-PLA<sub>1α</sub>と同じく毛包に高いレベルで発現し、また、LPAに対する4番目の受容体であるLPA<sub>4</sub>と高い相同性を示し、LPA受容体であることが予想されたが、生化学的にLPA受容体であることがどの研究者によっても証明されず、既存のGPCRとは異なったシグナル系を有するものと予想されていた受容体である。我々は、最近、mPA-PLA<sub>1α</sub>により産生されたLPAがP2Y5を効率よく活性化すること(図3)、また、その下流で膜結合型プロテアーゼを活性化するというユニークなシグナル系を持っていることを明らかにした。



#### (2)新規生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジルスレオニンの発見

リゾホスファチジルセリン(LPS)は、LPA、S1P に続く新しいリゾリン脂質メディエーターとして注目されている。LPS は極性頭部にアミノ酸の一つであるセリン残基を有しており、マスト細胞脱顆粒促進活性、細胞遊走、T 細胞増殖抑制活性、神経細胞突起伸長促進作用などが報告されている。中でも、LPS によるマスト細胞の脱顆粒促進作用は、多くの研究グループにより解析されている(図4)。しかし、LPS の作用メカニズムは全く不明であった。LPS は極性頭部に L-セリンを持つリゾリン脂質であるが、この L-セリンの構造は非常に厳密に認識されていることが分か

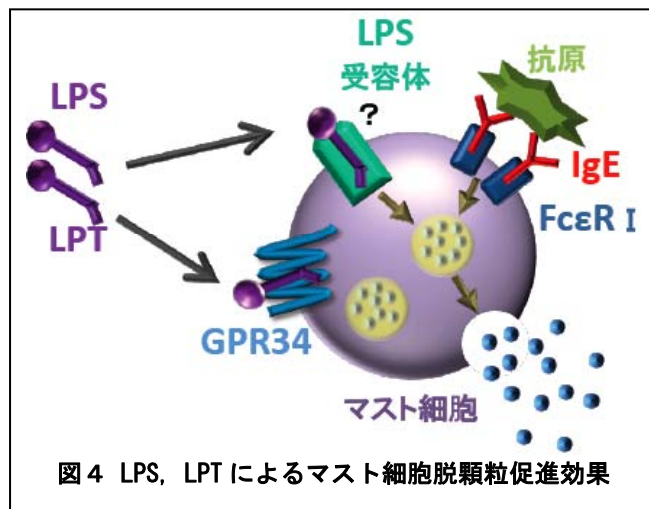


図4 LPS, LPT によるマスト細胞脱顆粒促進効果

っていた。そこで、我々は様々な LPS 誘導体を有機化学的に合成し、マスト細胞の脱顆粒促進活性を示す化合物の探索を行った結果、LPS よりも数十倍強い活性を示す誘導体、リゾホスファチジルスレオニン(LPT)が同定された。スレオニンはセリンのβ位の炭素にメチル基を持つアミノ酸である。また、LPT はラット、マウス血清に存在することが明らかになり新規生理活性リゾリン脂質である可能性が想定された。

## 5. 自己評価

本研究では、(1)新たなリゾリン脂質の発見、(2)新規脂質代謝系の発見、(3)新しい脂質の機能解明を目指した。

まず、「(1)新たなリゾリン脂質の発見」においては、本研究において、極性頭部にアミノ酸の一種であるスレオニンを持つユニークなリゾリン脂質、リゾホスファチジルスレオニン(LPT)を発見し、LPT がマスト細胞の脱顆粒を強く促進する物質であることを明らかにした。次に、「(2)新規脂質代謝系の発見」に関しては、LPT が産生される生合成系に関して検討を加え、LPT が生体内に存在すること、その生合成系は LPT 類似脂質リゾホスファチジルセリン(LPS)とは全く異なることを明らかにし、新規 LPT 生合成系の存在を示した。「(3)新しい脂質の機能解明」に関しては、LPT がマスト細胞の脱顆粒を引き起こすことを示した。また、別のタイプの生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸(LPA)が血管形成、育毛に関与することを明らかにした。このように、本研究を開始する際に掲げた目標は達成できたと考えている。

## 6. 研究総括の見解

リゾホスファチジン酸(LPA)産生酵素オートタキシン(ATX)により作られる LPAがLPA<sub>1</sub>受容体を介して、肺の線維化を起こす原因となっていることをノックアウトマウスで証明した。また、LPA産生酵素mPA-PLA<sub>1α</sub> - LPA受容体P2Y5 の系が毛包の形態、機能に関与することを見出した。LPA の受容体の一つと考えられたP2Y5 が、その受容体であることを独自のアッセイ系を構築して確定したこと、また、LPAが関係する特発性肺繊維症の機構解明、発毛におけるLPAの機能解明は、高く評価すべき成果である。また、新規生理活性物質と想定される候補物質を同定し、生理機能の解明を行うなど興味深いデータも多く、今後の発展も期待できる。医療応用に繋がる国際レベルの成果を挙げることが出来たものと考ええる。

## 7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表 \* Corresponding author

1. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid.

- Yasuhiro Kishi, Shinichi Okudaira, Masayuki Tanaka, Kotaro Hama, Dai Shida, Joji Kitayama, Takao Yamori, **Junken Aoki\***, Takamitsu Fujimaki, and Hiroyuki Arai  
*J. Biol. Chem.* 281, 17492–17500 (2006)
2. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid.  
 Masayuki Tanaka, Shinichi Okudaira, Yasuhiro Kishi, Ryunosuke Ohkawa, Sachiko Iseki, Masato Ota, Sumihare Noji, Yutaka Yatomi, **Junken Aoki\***, and Hiroyuki Arai  
*J. Biol. Chem.* 281, 25822–25830 (2006)
3. Embryo Spacing and Implantation Timing Are Differentially Regulated by LPA3–Mediated Lysophosphatidic Acid Signaling in Mice.  
 Hama K, **Aoki J\***, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H.  
*Biol. Reprod.*, 77, 954–959 (2007)
4. Beta-catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions.  
 Kanamori T, Inoue T, Sakamoto T, Gengyo-Ando K, Tsujimoto M, Mitani S, Sawa H, **Aoki J\***, Arai H.  
*EMBO J.* 27, 1647–1657 (2008)

## (2)特許

研究期間累積件数:4 件

- 発明者:大和田智彦、岩下真純、新井洋由、青木淳賢、巻出久美子  
 発明の名称:リゾホスファチジルスレオニンおよびその誘導体  
 出願人:東京大学  
 出願日:2006 年 4 月 19 日  
 出願番号:特願 2006-116114
- 発明者:青木淳賢、矢富裕、新井洋由、池田均、五十嵐浩二、井手和史  
 発明の名称:天然形態ヒトオートタキシン特異的抗体及びそのスクリーニング方法  
 出願人:東京大学／東ソー株式会社  
 出願日:2006 年 8 月 3 日  
 出願番号:特願 2006-212275
- 発明者:五十嵐浩二、新井洋由、青木淳賢  
 発明の名称:ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1測定方法および検査試薬  
 出願人:東ソー株式会社／東京大学  
 出願日:2007 年 2 月 19 日  
 出願番号:特願 2007-038304
- 発明者:五十嵐浩二、井手和史、新井洋由、青木淳賢、矢富裕、中村和宏  
 発明の名称:ヒトオートタキシンの免疫学的定量方法および定量試薬  
 出願人:東ソー株式会社／東京大学  
 出願日:2007 年 3 月 31 日  
 出願番号:特願 2007-092412

## (3)招待講演(国際)

- 2007 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES 「Lysophospholipid Mediators in Health & Disease」  
 Patho-physiological role of autotaxin  
 Tucson, Arizona, USA, June, 2007
- The 10th International Conference of International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases

Recent progress in study of lysophosphatidic acid production  
Montreal, Canada, September, 2007

(B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

1. Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II PAF-acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo.  
Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H.  
*J. Biol. Chem.* 283, 1628–1636 (2008)