

課題番号 : 24指001
研究課題名 : 生体膜脂質生合成メカニズム解明と脂質バイオマーカーの探索
主任研究者名 : 清水孝雄
分担研究者名 :

キーワード : 生体膜リン脂質、リゾリン脂質アシル転移酵素、生理活性脂質、脂質バイオマーカー、生体膜認識

研究成果 :
生体膜リン脂質生合成メカニズムを代表的なホスファチジルコリン (PC) 生合成酵素を中心に調べた。現在知られている酵素リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 (LPCAT) 1, 2, 3 と 4、さらに前駆体リン脂質であるホスファチジン酸 (PA) 生合成酵素リゾホスファチジン酸アシル転移酵素 (LPAAT) 1, 2, と 3 の寄与を解析した。その結果、脂肪酸組成によってリン脂質に組み込まれる (アシル化) ステップが異なる事がわかった。なかでも呼吸に必須な肺サーファクタント脂質であるジパルミトイル PC (DPPC) の生合成には LPCAT1 の寄与が大きい事も証明できた。次に、LPCAT1-KO マウスを作成したところ、肺サーファクタント脂質の質の低下 (DPPC の低下) を観察した。また、急性肺障害に高い感受性を持っており、正常な生体内リン脂質脂肪酸組成の重要性を示唆した。(Harayama et al. Cell Metab. 2014)

強力な生理活性リン脂質である血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) の生合成酵素 LPCAT2 の活性調節メカニズムの一端を解明した。これまで、LPCAT2 はマクロファージにおいて GPCR 刺激後秒単位で、細菌内毒素刺激分単位や時間単位で活性が上昇する事がわかっていた。後者の調節は Ser34 のリン酸化と発現誘導であった。今回、前者の秒単位の活性化も Ser34 のリン酸化であることがわかった。しかし、キナーゼは異なり PKCa と予測できた。(Morimoto et al. J. Biol. Chem. 2014) また、LPCAT2 の阻害剤スクリーニングも 17 万化合物から行った。TSI-01 という化合物が LPCAT2 に対して特異性を見せた。(Tarui et al. J. Lipid Res. 2014)

脳の脂肪酸にはドコサヘキサエン酸 (DHA) が多い。今回、DHA をリン脂質に組み込むアシル転移酵素を想定し、LPAAT4 と名付けた。脳における DHA の役割の解明や疾患治療への発展を期待できる。(Eto et al. BBRC 2014)

肺サーファクタント脂質輸送に関わる可能性の高いタンパク質 Sec14-like3 を同定した。脂質膜のパッキングの隙間 (lipid packing defect) に結合する事を示した。今後、どのような脂質を運べるのか、どう制御されているか、などの解析が重要になる。(Hishikawa et al. FASEB J. 2013)

上記の一部の内容も含めたレビューも報告している。(Hishikawa et al. J. Lipid Res. 2014)

Subject No. : 24指001

Title : Analysis of cellular membrane phospholipid biosynthesis and screening of lipid biomarkers

Researchers : Takao Shimizu

Key word : Cellular membrane phospholipid, Eicosanoid, Lipid biomarker

Abstract :

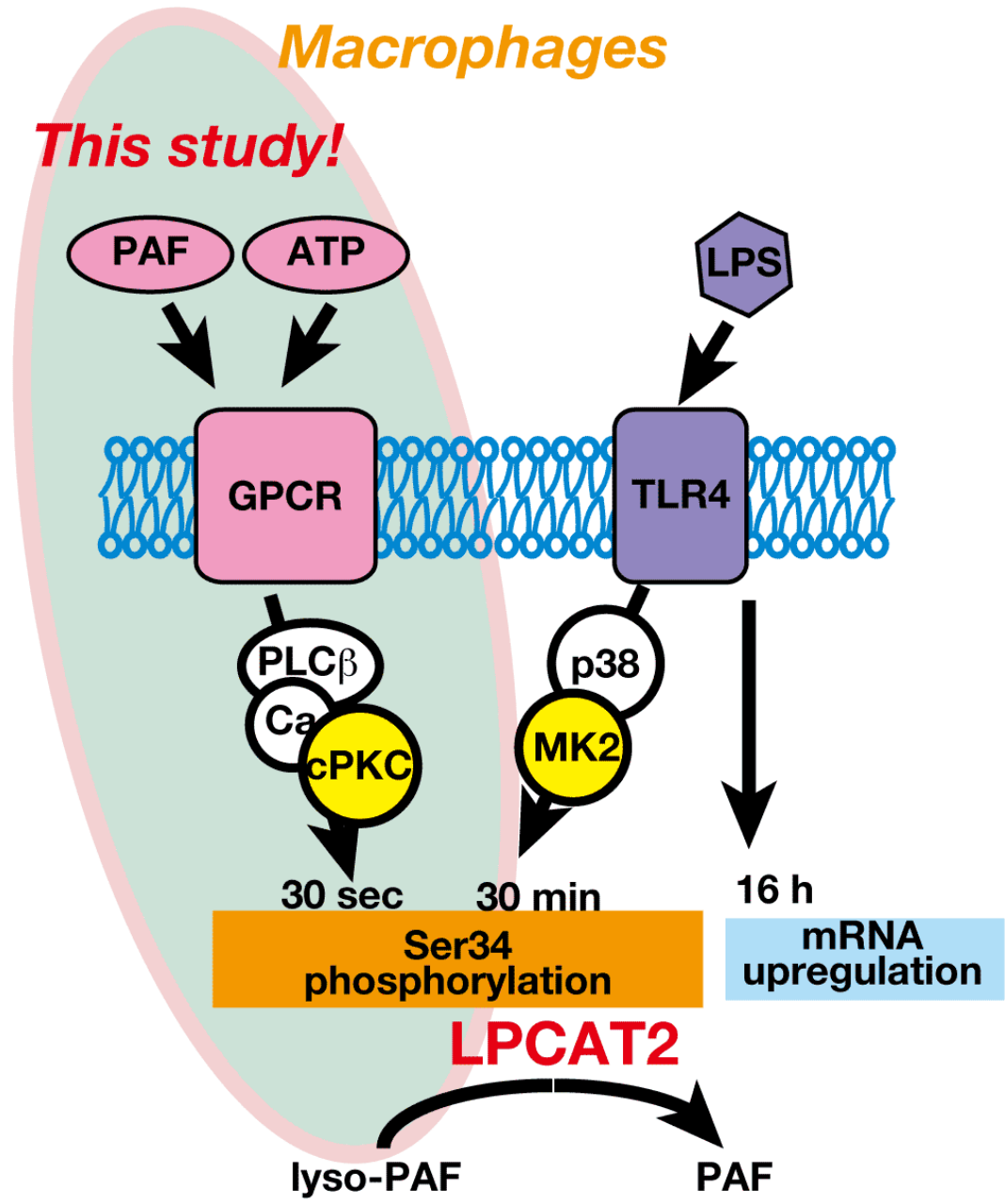
Phosphatidylcholine (PC) is biosynthesized from lyso-PC (LPC) by LPC acyltransferase (LPCAT). Until now, four kinds of LPCAT were identified; LPCAT1, LPCAT2, LPCAT3, and LPCAT4. Phosphatidic acid (PA) is a precursor phospholipid of PC, and three PA biosynthetic enzymes from lyso-PA (LPA) were also identified; LPAAT1, LPAAT2, and LPAAT3. We reported here that biosynthesis of most PC species were regulated by LPCATs or LPAATs. Especially, dipalmitoyl-PC (DPPC) was mainly biosynthesized by LPCAT1. We also showed that LPCAT1-KO mice had the high sensitivity for acute lung injury. (Harayama et al. Cell Metab. 2014)

Platelet-activating factor (PAF) is a potent lipid mediator. In response to extracellular stimuli, PAF is biosynthesized by lyso-PAF acetyltransferase, LPCAT2. We identified that the acute LPCAT2 activation is regulated its phosphorylation at Ser34. LPCAT2 may be phosphorylated in the Ca/Protein kinase C α pathway. (Morimoto et al. J. Biol. Chem. 2014). We also screened LPCAT2 specific inhibitor from 170,000 compounds and identified TSI-01 as a candidate of species for PAF related diseases. (Tarui et al. J. Lipid Res. 2014)

Brain is abundant in docosahexaenoic acid (DHA). In this study, we identified a novel LPAAT, LPAAT4 with preference for DHA-CoA. LPAAT mRNA was mainly detected in the brain. This findings will contribute to study on the role of DHA in the brain (Eto et al. BBRC 2014)

We identified a candidate gene, Sec14-like 3 associated with transport of pulmonary surfactant lipid. Sec14-like 3 was mainly expressed in the lung, and recognized lipid packing defect. We speculated that Sec14-like 3 may transport target lipids to intraalveolar space by the binding to the lipid packing defect. (Hishikawa et al. FASEB J. 2013)

We summarized the recent phospholipid studies in the review. (Hishikawa et al. J. Lipid Res. 2014)



LPCAT2阻害剤スクリーニング

酵素アッセイ (Microsomal fraction)

High-Throughput Screening (HTS)

1. 主活性を蛍光測定

LC-MS/MS を用いた活性測定

2. LPCAT2のPAF生合成活性(主活性)

3. LPCAT1の活性(酵素特異性)

4. 濃度依存性試験

(酵素および基質特異性)

5. 0.4% BSAアッセイ(主活性)

6. 種差アッセイ

細胞アッセイ (RAW267.4-mLPCAT2 cells)

7. 細胞毒性試験

8. 培養細胞PAF測定

174,131

↓

1,794

↓

617

↓

32

↓

24

↓

13

↓

10

↓

TSI-01

PAF生合成酵素阻害剤の同定

Tarui et al. J. Lipid Res. 2014

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：24指001

研究課題名：生体膜脂質生成メカニズム解明と脂質バイオマーカーの探索

主任研究者名：清水 孝雄

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis.	Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Nishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb MH, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M.	Nat Immunol	14	2013
Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic progressive neuronal death. Prostaglandins Leukot. Essent.	Yoshikawa, K., Kita, Y., Furukawa, A., Kawamura, N., Hasegawa- Ishii, S., Chiba, Y., Takei, S., Maruyama, K., Shimizu, T., Shimada, A.	Fatty Acids.	88	2013
Alkylglycerol monooxygenase as a potential modulator for PAF synthesis in macrophages.	Tokuoka M, S., Kita, Y., Shindou, H., Shimizu, T.	Biochem Biophys Res Commun.	436	2013

研究発表及び特許取得報告について

Acute inhibition of diacylglycerol lipase blocks endocannabinoid-mediated retrograde synaptic suppression: evidence for on-demand biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol.	Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Kita, Y., Sano, Y., Shimizu, T., Marzo, Vincenzo Di, and Kano, M.	J. Physiol.	591	2013
Identification of Sec14-like 3 as a novel lipid-packing sensor in the lung.	Hishikawa, D., Shindou, H., Harayama, T., Ogasawara, R., Suwabe, A. and Shimizu, T.	FASEB J.	27	2013
TDAG8 activation inhibits osteoclastic bone resorption.	Hikiji, H., Endo, D., Horie, K., Harayama, T., Akahoshi, N., Igarashi, H., Kihara, Y., Yanagida, K., Takeda, J., Koji, T., Shimizu, T., and Ishii, S.	FASEB J.	28	2013
Antiobese function of platelet-activating factor: increased adiposity in platelet-activating factor receptor-deficient mice with age.	Sugatani, J., Sadamitsu, S., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Higa, R., Hattori, Y., Uchida, T., Ikari, A., Sugiyama, W., Watanabe, T., Ishii, S., Miwa, M., Shimizu, T.	FASEB J.	28	2013
A Novel Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Enzyme (LPAAT4) with a Possible Role for Incorporating Docosahexaenoic Acid into Brain Glycerophospholipids.	Eto, M., Shindou, H., and Shimizu, T.	Biochem Biophys Res Commun.	443	2013
Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells.	Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., and Shindou, H.	J. Lipid Res.	55	2014

研究発表及び特許取得報告について

Interplay between CXCR2 and BLT1 facilitates neutrophil infiltration and resultant keratinocyte activation in a murine model of imiquimod-induced psoriasis	Sumida, H., Yanagida, K., Kita, Y., Abe, J., Matsushima, K., Nakamura, M., Ishii, S., Sato, S., and Shimizu, T.	J. Immunol.	192	2014
12-Hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via BLT2 receptor.	Liu, M., Saeki, K., Matsunobu, T., Okuno, T., Koga, T., Sugimoto, Y., Yokoyama, C., Nakamizo, S., Kabashima, K., Narumiya, S., Shimizu, T., and Yokomizo, T.	J. Exp. Med.	in press	2014
Rapid Production of Platelet-activating Factor Is Induced by Protein Kinase C α -mediated Phosphorylation of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2.	Morimoto, R., Shindou, H., Tarui, M., and Shimizu, T.	J. Biol. Chem.	in press	2014
Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo.	Harayama, T., Eto, M., Shindou, H., Kita, Y., Otsubo, E., Hishikawa, D., Ishii, S., Sakimura, K., Mishina, M., and Shimizu, T.	Cell metab.	in press	2014
Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2.	Tarui, M., Shindou, H., Kumagai, K., Morimoto, R., Harayama, T., Hashidate, T., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Nagase, T., and Shimizu, T.	J. Lipid Res.	in press	2014
血小板活性化因子(PAF)生合成酵素(LPCATs)阻害剤の検討	垂井愛、進藤英雄、森本亮、衛藤樹、原山武士、長瀬隆英、清水孝雄	分子呼吸器病、先端医学社	17	2013
グリセロリン脂質リモデリング	進藤英雄	医学のあゆみ	248	2014

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
「脂肪細胞分化におけるリン脂質リモデリング酵素(リゾリン脂質アシル基転移酵素)の解析」	衛藤樹、進藤英雄、原山武士、柳田圭介、清水孝雄	日本脂質生化学会	ホテル松島大観荘、日本、松島	2013年6月
High-speed monitoring method for eicosanoids and related compounds using liquid chromatography / mass spectrometry	Masaki Yamada, Yoshihiro Kita, Suzumi Tokuoka, Takahiro Kohira, Takao Shimizu	61st ASMS Conference on Mass Spectrometry	米国 ミネアポリスコンベンションセンター	2013年6月
A very fast triple quadrupole mass spectrometer as a tool for SRM-based phospholipidomics	Yoshihiro Kita, Suzumi M.Tokuoka, Masaki Yamada, and Takao Shimizu	61st ASMS Conference on Mass Spectrometry	米国 ミネアポリスコンベンションセンター	2013年6月
Glycerophospholipid metabolism and biological functions	清水孝雄	2013 FASEB Summer Research Conference Lysophospholipid and Other Related Mediators – From Bench to Clinic	ヒルトンニセコビレッジ 北海道ニセコ村 日本	2013年8月
Monoacylglycerol lipase mediates lipopolysaccharide-induced fever in mice	Yoshihiro Kita, Asami Tanimura, Maya Yamazaki, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Takao Shimizu	FASEB Science Research Conferences (Lysophospholipid and other Related Mediators - From Bench to Clinic)	ヒルトンニセコビレッジ (北海道ニセコ町)	2013年8月
リゾリン脂質アシル転移酵素による生体膜リン脂質多様性形成	進藤英雄、清水孝雄	第86回日本生化学会シンポジウム	パシフィコ横浜、神奈川県	2013年9月
Analysis of human leukotriene B4 type I receptor phosphorylationsites by Phos-tag SDS-PAGE	Yoshimitsu Nakanishi, Keisuke Yanagida, Takao Shimizu, Motonao Nakamura	Bioactive lipid in Cancer, Inflammation, and Related Diseases, 13th International Conference	Sheraton Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico	2013年11月

研究発表及び特許取得報告について

Lipid mediators: enzymes and receptors	Shimizu Takao	3th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases	Sheraton Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico	2013年11月
Discovery of a selective inhibitor for the PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	Megumi Tarui, Hideo Shindou, Ryo Morimoto, Miki Eto, Takeshi, Harayama, Kazuo Kumagai, Tetsuo Nagano, Takahide Nagase, Takao Shimizu	13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases	Sheraton Puerto Rico Hotel , Puerto Rico, San Juan	2013年11月
Acceleration of platelet-activating factor biosynthesis by phosphorylated lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	Ryo Morimoto, Hideo Shindou, Megumi Tarui, and Takao Shimizu	13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases	Sheraton Puerto Rico Hotel , Puerto Rico, San Juan	2013年11月
肺サーファクタントのリン脂質と呼吸機能	進藤英雄	日本肺サーファクタント・界面医学会 第49回学術研究会 特別講演	東京医科大学、東京都新宿区	2013年11月
イミキモド誘発マウス乾癬様皮疹における好中球浸潤の機序と役割の解明	住田隼一、柳田圭介、北芳博、阿部淳、松島綱治、中村元直、石井聡、佐藤伸一、清水孝雄	第41回日本臨床免疫学会総会	海峡メッセ下関、下関市、日本	2013年11月
Sec14L3 a novel protein recognizing liposome curvature and packing defect	清水孝雄	LIPID MAPS Annual Meeting 2014:Lipidmics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease	Scripps Seaside Forum UCSD、La Jolla CA, USA	2014年5月

研究発表及び特許取得報告について

Monoacylglycerol lipase mediates fever via hypothalamic prostaglandin E2 production	Yoshihiro Kita, Kenji Yoshida, Suzumi M. Tokuoka, Fumie Hamano, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Takao Shimizu	LIPID MAPS Annual Meeting 2014:Lipidmics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease	Scripps Seaside Forum UCSD, La Jolla CA, USA	2014年5月
Development of glycerophospholipid profiling methods using ternary gradient liquid chromatography/high-speed triple quadrupole mass spectrometry	Suzumi Tokuoka, Yoshihiro Kita, Masaki Yamada, Takao Shimizu	LIPID MAPS Annual Meeting 2014:Lipidmics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease	Scripps Seaside Forum UCSD, La Jolla CA, USA	2014年5月
Deficiency of monoacylglycerol lipase attenuates diet-induced obesity in an endocannabinoid system-independent manner	Kenji Yoshida, Yoshihiro Kita, Suzumi Tokuoka, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Takao Shimizu	LIPID MAPS Annual Meeting 2014:Lipidmics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease	Scripps Seaside Forum UCSD, La Jolla CA, USA	2014年5月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。