

脂肪酸を「重く」する方法の開発 —脂肪酸の選択的重水素化法の開発と酸化脂肪酸の代謝過程の解明—

1. 発表者：

滝田 良（東京大学大学院薬学系研究科附属ワンストップ創薬共用ファシリティセンター 准教授）

濱 弘太郎（帝京大学薬学部 物理薬剤学研究室 准教授）

渡辺 順子（東京大学大学院薬学系研究科附属ワンストップ創薬共用ファシリティセンター 特任研究員）

渡邊 康平（東京大学大学院薬学系研究科 特任助教）

村田 茂穂（東京大学大学院薬学系研究科附属ワンストップ創薬共用ファシリティセンター 教授・センター長）

藤原 優子（帝京大学薬学部 物理薬剤学研究室 講師）

横山 和明（帝京大学薬学部 物理薬剤学研究室 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆安価で取扱容易な重水および重水素原子を含むメタノール（ CH_3OD 、注1）と触媒（注2）・試薬を用いて、様々な脂肪酸（注3）に決まった数の重水素を導入する簡便な方法を開発しました。
- ◆特定の位置に重水素（注4）を導入したリノール酸を合成し、人の血小板（注5）が作り出す酸化脂肪酸（注6）がリン脂質（注7）の一部として取り込まれる機構を明らかにしました。
- ◆開発した脂肪酸の重水素化法を用いて、未標識の脂肪酸を簡便に重水素で標識することが可能になり、生体内の個々の脂質の機能解明に貢献することが期待されます。

3. 発表概要：

計測技術の発達に伴って、我々の体では新たな脂質が次々と発見されています。そして、それぞれの脂質が、体の中でどのような化学反応を受けるかという過程（代謝過程）を追跡することは、その脂質の役割を解明するうえで大変重要です。代謝過程を追跡するための1つの方法として、目的の脂質に成り代わって代謝される脂質を人工的に作製し、分子プローブ（注8）として細胞や生体に取り込ませる実験を行います。しかし、次々に見つかる新しい脂質それぞれの分子プローブを安価で簡便に合成できる方法はこれまで限られていました。

今回、東京大学大学院薬学系研究科附属ワンストップ創薬共用ファシリティセンター 滝田良 准教授、帝京大学薬学部物理薬剤学研究室 濱 弘太郎 准教授らの研究グループは、安価で取扱容易な重水素源と触媒・試薬を用いて脂肪酸の特定の位置に決まった数の重水素を導入し、重水素で標識した脂肪酸を簡便に合成する方法を開発しました。さらに本方法を用いて合成した重水素化脂肪酸を利用して、血小板が作り出す酸化脂肪酸が、リン脂質の一部として取り込まれる機構を明らかにしました。本成果を基に、重水素化脂肪酸のライブラリーを構築することにより、それぞれの脂質の代謝過程を明らかにするための強力なツールを提供できることが期待されます。

4. 発表内容：

【研究の背景】 我々の体を構成する脂質は主に炭素と水素から構成される物質であり、エネルギー源や細胞間の情報伝達など様々な機能を有していることが知られています。近年、様々な分析技術の発展に伴って、生体内には大きさや形が異なる膨大な種類の脂質が存在することが明らかになってきました。それぞれの脂質の役割を明らかにするうえで、その脂質が体の中でどのように構造変化し、またどのように作用するか、その代謝過程を追跡することは極めて重要です。複雑な代謝過程を追跡するためには、質量の違いを元に様々な分子を検出・測定できる質量分析計（注9）が、強力な解析手法です。特にタンデム質量分析計は、脂質をはじめとする分子の部分構造を解析可能であり、脂質の代謝過程の解明に大きく貢献します。この分析技術を基盤に、ターゲットとする脂質分子を構成する元素の一部を質量の異なる同位体（注10）に置換したプローブ分子を用いることで、脂質の構造変化を詳細に追跡できます（図1）。そのようなプローブ分子の構造要件として、目的とする脂質分子の特定の位置に、特定の数だけ重水素などの安定同位体が導入された化合物が必要です。しかし、脂質分子中の特定の元素を厳密に安定同位体に置換することは複雑な合成を必要とするなど困難であることが多く、膨大な種類の脂質を解析するための一般性の高い方法論が必要とされていました。

【研究の内容】

本研究グループは、①目的とする脂質の特定の元素を厳密に安定同位体に置換できること、②様々な種類の脂質について適用可能であること、③安価・安全な試薬を用いた簡便な反応を用いること、を特徴とする安定同位体の新たな導入方法の開発を目指し、脂質の基本構造である脂肪酸に注目しました。脂肪酸は多くの種類の脂質の一部として含まれる脂質の基本構造であることから、脂肪酸を安定同位体で標識することができれば、標識脂肪酸を部品として用いることで様々な脂質を合成できます。脂肪酸の側鎖は炭素数や二重結合の数や位置、酸素官能基の有無など多様な構造により構成されていますが、すべての脂肪酸は共通して末端にカルボキシ基を有しています。このカルボキシ基を足がかりとすることで、少ない工程数かつ温和な反応条件で、多様な脂肪酸に重水素を位置および数を制御して導入する方法を開発しました（図2）。実際にこの方法を用いて、4つの重水素を位置選択的に導入したリノール酸（リノール酸- d_4 ）をグラムスケールで容易に合成できることも示しました。

次に、得られた安定同位体標識脂肪酸の有用性を確かめるため、リノール酸- d_4 を人の血小板に添加し、リノール酸の代謝産物を質量分析計によって網羅的に解析しました。その結果、リノール酸の一部は血小板によって酸化脂肪酸へと変換され、さらにリン脂質の一部として取り込まれることがわかりました。さらに、酸化脂肪酸がリン脂質に取り込まれる過程を詳細に解析したところ、複数のアシル基転移酵素（注11）が寄与することを明らかにしました（図3）。生体で生じる活性酸素などの作用によって酸化脂肪酸が生じることは知られていますが、生じた酸化脂肪酸がどのようにリン脂質に取り込まれるかという機構に関して不明な点が多く残されています。本研究では適切な位置・数の重水素を導入した脂肪酸を用いることで、酸化脂肪酸の代謝過程に関して新たな知見を得ることができました。

【今後の展望】

本研究で開発した方法は、安価で扱いやすい重水および重水素原子を含むメタノール（ CH_3OD ）と触媒・試薬を用いて、脂肪酸の特定の位置に重水素を導入する簡便な方法です。さらに、未標識の脂肪酸から直接安定同位体である重水素を導入した脂肪酸を合成可能であるため、本成果を用いることで希少な脂肪酸を含む様々な脂肪酸に関する重水素化プローブ分子

を供給できます。その分子機能や効果が注目されている酸化脂肪酸やトランス脂肪酸など、多様な脂質の代謝過程や、固有の機能を明らかにできることが期待されます。

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) [科学研究補助金 基盤研究 (C) (19K06992 : 研究代表 滝田良、19K11777 : 研究代表 濱弘太郎)]、内藤記念科学振興財団 [内藤記念科学奨励金・研究助成 : 研究代表 滝田良]、医用薬物研究奨励富岳基金 [研究代表 滝田良、濱弘太郎]などの支援を受けて実施しました。

5. 発表雑誌 :

雑誌名 : 「Angewandte Chemie International Edition」 (オンライン版 : 4月27日)
論文タイトル : Controlled Tetradeuteration of Straight-Chain Fatty Acids: Synthesis, Application, and Insight into the Metabolism of Oxidized Linoleic Acid
著者 : Ayako Watanabe⁺, Kotaro Hama^{*+}, Kohei Watanabe, Yuko Fujiwara, Kazuaki Yokoyama, Shigeo Murata, and Ryo Takita^{*} (* : Corresponding authors, + : Equally contributed)
DOI 番号 : 10.1002/anie.202202779
アブストラクト URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.202202779>

6. 問い合わせ先 :

東京大学大学院薬学系研究科附属ワンストップ創薬共用ファシリティセンター
准教授 滝田 良 (タキタ リョウ)
Tel : 03-5841-0279
E-mail : [takita\[at\]mol.f.u-tokyo.ac.jp](mailto:takita[at]mol.f.u-tokyo.ac.jp)

帝京大学薬学部物理薬剤学研究室
准教授 濱 弘太郎 (ハマ コウタロウ)
Tel : 03-3964-8197
E-mail : [khama\[at\]pharm.teikyo-u.ac.jp](mailto:khama[at]pharm.teikyo-u.ac.jp)
[at]を@に置き換えてください。

7. 用語解説 :

注1 重水および重水素原子を含むメタノール

一般的な水分子は、1個の酸素原子と2個の水素(軽水素)原子から構成されますが、重水は、1個の酸素原子と2個の重水素原子から構成されます。また、重水素入りのメタノールとして、本研究では重水素が1個入ったメタノール(CH₃OD)を用いました。いずれも化学的に安定であり、安価で容易に用いることが可能です。

注2 触媒

目的の化学反応の活性化エネルギーを下げることで反応を進行しやすくするために用いられます。触媒自身は、化学反応の前後で変化しません。

注3 脂肪酸

その基本構造として、炭素-炭素結合が連なって構成される炭化水素鎖と、末端に酸素原子を2個含むカルボキシ基を有します。炭化水素鎖が直鎖状のもの（直鎖脂肪酸）や、一部枝分かれして結合したもの（分岐脂肪酸）に分類される他、炭素-炭素結合の結合様式が単結合のみのもの（飽和脂肪酸）や、二重結合を含むもの（不飽和脂肪酸）などに分類されます。このうち、二重結合を複数個含むものは多価不飽和脂肪酸と呼ばれます。本研究で特に用いたリノール酸は、脂肪酸の中の9番目と12番目の炭素の位置に2箇所含まれている多価不飽和脂肪酸です。

注4 重水素

一般的な水素原子（軽水素）は1個の陽子のみから構成されますが、重水素は1個の陽子と1個の中性子から構成されます。極めて安定な水素の同位体であり、放射性はありません。重水素の天然存在比は0.015%であり、大部分の水素は軽水素です。重水素を導入した物質は、もともと体に存在する物質よりも中性子の数だけ質量が増加します。この質量の違いを活用して、注目する物質を外から細胞や体に取り込んだ際にどのような化学変化を受けるかを質量分析計によって追跡することが可能になります。決まった質量の違いに着目して追跡するため、特定の位置に、決まった数の重水素が導入された物質を用いることが重要です。

注5 血小板

血液中に存在する血液成分の1つで、血管の損傷時に活性化し、血液の凝固を促進することで止血します。血小板の活性化時には、酵素の働きによって様々な化学反応が生じることが知られており、疾患への関与も注目されています。

注6 酸化脂肪酸

生体内の活性酸素の作用等により、酸素原子の付加や電子を失うなどの化学変化（酸化）を受けることによって、構造の一部が変化した脂肪酸を指します。特に、脂肪酸の中に二重結合が複数個含まれる多価不飽和脂肪酸は、酸化を受けやすいことが知られています。本研究では、リノール酸（上述注3）に酸素原子が1つ付加したヒドロキシオクタデカジエン酸に関して解析しました。

注7 リン脂質

1つの分子の中にリン酸と脂肪酸を有することを特徴とする、脂質の種類を指します。

注8 分子プローブ

生体内の特定の分子の動態や分布を把握するために用いられる、その分子と特異的に相互作用し、観察可能な特徴を有する物質の総称です。本研究では、新たな脂質の機能（動態や分布も含めて）を明らかにするために、多くの脂質の一部として存在する脂肪酸に重水素を導入することで、質量分析計によって質量差を検出することを可能しました。

注9 質量分析計・タンデム質量分析計

質量分析計は、測定対象分子をイオン化し磁場を通過させることで、質量を電荷数で割った値（質量電荷数比）によって分離・検出するユニット（質量分離部）を有する装置を指します。タンデム質量分析計の多くは、2個の質量分離部と、イオンを解離・断片化するコリジョ

ンセルから構成される分析機器です。タンデム質量分析計では、1つ目の質量分離部で測定対象分子に相当するイオン（プリカーサーイオン）を分離し、このイオンをコリジョンセルで断片化します。この際、適切なエネルギーを適用することで、プリカーサーイオンはその構造上の特徴（原子間の結合様式）に依存して断片化しプロダクトイオンを生じます。さらに、測定対象分子内の特徴的な構造に相当するプロダクトイオンを、2つ目の質量分離部で分離したうえで検出します。測定対象分子と構造は異なりますが、質量が同じ分子はコリジョンセルにて異なるプロダクトイオンを与えるため、測定対象分子をより選択的に分離・検出可能になります。このタンデム質量分析計を用いて安定同位体を導入した測定対象分子を分離・検出する際、安定同位体の数や導入部位が制御されていない場合、生じるプロダクトイオンの質量電荷数比が一定にならないため安定かつ高感度な計測の妨げになります。このため、導入された安定同位体の位置および数が厳密に制御された測定対象分子を用いることが重要です。生体由来の試料を測定する際、高速液体クロマトグラフィーの検出部としてタンデム質量分析計が用いられる場合もあり、クロマトグラフィーによる分離の効果も得ることができます。

注10 同位体

原子核を構成する陽子の数が同じ（同一の原子番号を持つ元素）で、中性子の数が異なる原子を指します。

注11 アシル基転移酵素

脂肪酸（アシル基）を別の脂質などに導入する活性を有する酵素の総称です。導入先の物質としてはコレステロールやタンパク質などがあり、本研究では特にリン脂質（およびその基本構造のグリセロール3リン酸）に対してアシル基を導入する活性が報告されているアシル基転移酵素群に注目しました。

8. 添付資料：

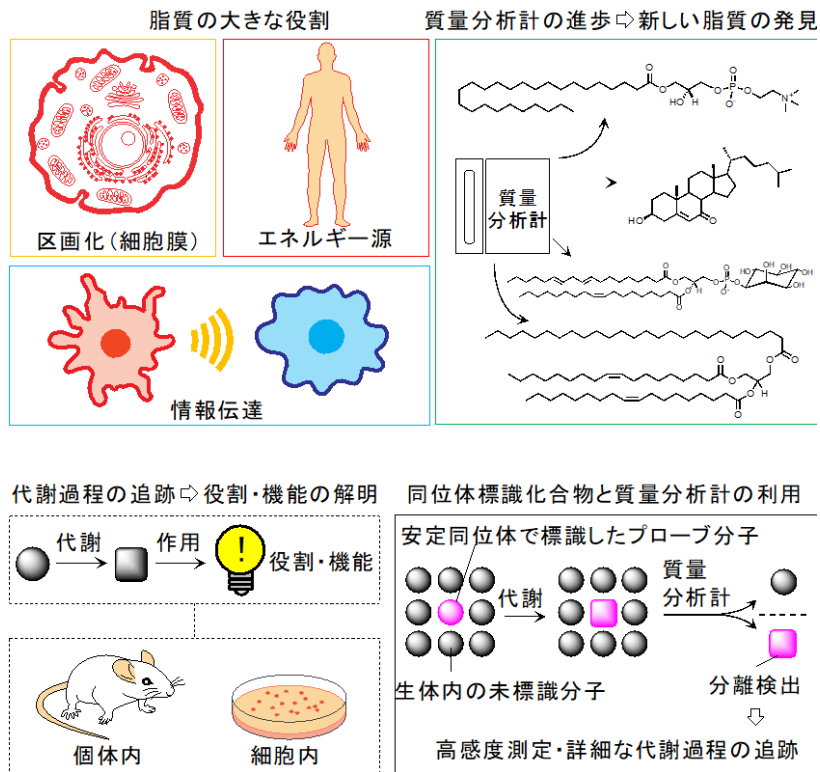


図1 生体内の様々な脂の中の脂肪酸

脂質には、細胞膜の主要な構成成分として区画化に寄与する、貯蔵されてエネルギー源として用いられる、そして細胞間・細胞内の情報伝達物質として機能するなどの役割があります（左上図）。近年、質量分析計などの分析機器の進歩に伴って微量の生体物質を網羅的に検出できるようになりました。その結果、次々と新しい脂質が発見されており、これらの脂質の役割に注目が集まっています（右上図）。目的とする脂質が個体内あるいは細胞内でどのように変化（代謝）され、作用（受容体など）するかということ調べることは、新しい役割や機能解明において非常に重要です（左下図）。このため、安定同位体で標識したプローブ分子を質量分析計によって分離して検出することにより、生体内の物質の代謝過程を高感度・詳細に解析できるようになります（右下図）。

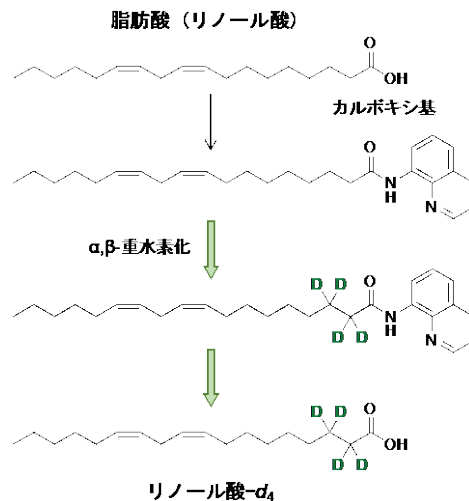


図2 開発した脂肪酸への重水素化導入反応

全ての脂肪酸に共通して含まれるカルボキシ基を足がかりとして、アミド基に変換した後に α 位と β 位の2箇所に計4つの重水素を導入します。その後、再度アミド基を加水分解することで重水素化脂肪酸を合成します。上図ではリノール酸を基質とした変換を示しています。

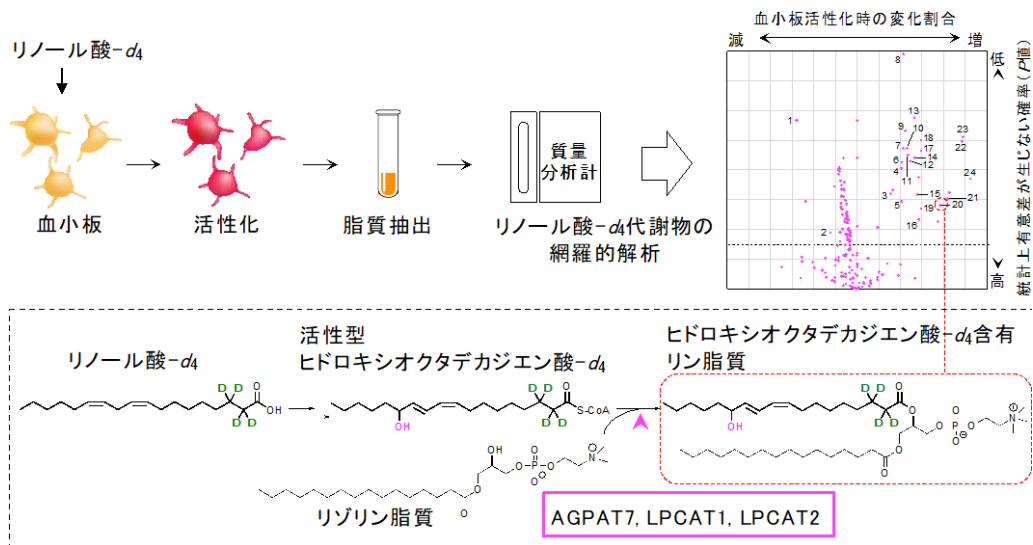


図3 血小板における酸化脂肪酸の代謝機構

人の血小板に合成したリノール酸-d₄を添加し、血小板を活性化させた後に脂質を抽出しました (左上図)。その後、質量分析計を用いてリノール酸-d₄の代謝物を網羅的に解析したところ、リノール酸-d₄が酸化されて生じるヒドロキソクタデカジエン酸-d₄を含むリン脂質分子種が複数検出されました (右上プロット図)。このため、分子生物学的および生化学的な解析手法を用いて、ヒドロキソクタデカジエン酸-d₄を含むリン脂質分子種の産生に寄与する複数のアシル基転移酵素 (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase family 7 (AGPAT7)、および acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1)と LPCAT2) を見出しました。