

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08625

研究課題名(和文) 質量分析を用いた糖脂質解析法の確立と先天性代謝異常症の診断への臨床応用

研究課題名(英文) Establishment of glycosphingolipid analysis in biological samples and application in clinical diagnosis of inherited metabolic disorders

研究代表者

藤原 優子 (Fujiwara, Yuko)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：70722320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、スフィンゴ糖脂質の網羅的定量解析系を確立することにより、スフィンゴ糖脂質の各分子種の代謝変動の解析をする事を目的にした。主に有機合成物における光学異性体分析に用いられているキラルカラムを用いることにより、従来用いられている疎水カラムでは難しかった糖鎖構造およびセラミド骨格構造の違いによりスフィンゴ糖脂質を分離可能な条件を見出した。また生体サンプルへの適応として、HeLa細胞およびブタ脳より抽出したスルファチド中のスフィンゴ糖脂質における脂肪酸分子種ごとの定量解析を行った結果、以前に報告のあった分子種以外の分子種も多く存在することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive quantitative analysis of glycolipids targeting molecular species has not studied fully yet because of the diverse structures of sugar and ceramide moieties of glycosphingolipids(GSLs). To establish a method for comprehensive quantitative analysis of GSLs by LC-ESI-MS, the investigation of separation of GSLs using a chiral column has been done. IF-3 chiral column has an advantage in separating GSLs according to not only their ceramide types but also the differences in sugar moieties. Next, the quantitative analysis of GLS in HeLa cells, and also sulfatide standards from porcine brain by multiple reaction monitoring mode. IF-3 was able to detect GSLs present in trace amounts in the total lipid extracts from biological samples.

研究分野：脂質分析化学

キーワード：糖脂質 質量分析 先天代謝異常症

1. 研究開始当初の背景

先天性遺伝疾患であるペルオキシソーム病はペルオキシソームの代謝機能に異常を来たす疾患群で、Zellweger 症候群のようにペルオキシソーム形成異常症と、ペルオキシソームに局在する酵素タンパクの単独欠損症との2つに大別される。単独欠損症である副腎白質ジストロフィー (ALD) は、ABCD1 と呼ばれる遺伝子によってコードされるペルオキシソーム膜輸送蛋白 ALDP の欠損によって引き起こされる疾患であり、脳白質の脱髄や神経細胞の変性、および副腎機能不全を主体とする、最も患者数の多いペルオキシソーム病である。本疾患の生化学的な特徴として、脳や血中など全身の組織において炭素数 24 以上の極長鎖脂肪酸の蓄積があげられ、特に脳ではこの蓄積が神経変性の要因の一つと考えられている。診断方法として血漿、血清、赤血球膜中の極長鎖脂肪酸分析を行い、C24:0、C25:0、C26:0 の上昇を証明することが用いられている。しかしながら、これらの上昇はかならずしも病態の進展との相関性が見られない。そこで、移植に踏み切る為の炎症の発症を見極める新しいマーカーが必要だと考えられる。脳白質にはガングリオシドを始めとする糖脂質が多く含まれ、糖脂質こそが炎症反応のきっかけとなっている事が考えられる。しかし、LC-MS の発達により脂肪酸の違いを見分ける分子種分析が可能になって来たのにも関わらず、副腎白質ジストロフィーをはじめとするペルオキシソーム病における詳細な糖脂質分子構造までは解明されていないのが現状である。したがって、LS-MS/MS により生体内の様々な糖脂質の各分子種を識別できる網羅的な糖脂質検出系を構築する事で、副腎白質ジストロフィーの病態を反映する診断、治療のバイオマーカーを見いだす事、および病態のメカニズムの解明に役立てる事が出来ると考える。

2. 研究の目的

LS-MS/MS により生体内の様々な糖脂質の各分子種を識別できる網羅的な糖脂質検出系を構築する事で、副腎白質ジストロフィーの病態を反映する診断、治療のバイオマーカーを見いだす事、および病態のメカニズムの解明に役立てる事が出来ると考えた。よって本研究では、生体内の様々な糖脂質そのものを検出する方法を構築し、副腎白質ジストロフィーの診断および治療の為のバイオマーカーの発見と発症のメカニズムを研究目的とした。

3. 研究の方法

1) スフィンゴ糖脂質の分子種を対象とする網羅的な解析系の構築
入手可能なスフィンゴ糖脂質の標品を用いて液体クロマトグラフィーによる分離系の検討を行った。スフィンゴ糖脂質の疎水部で

の分離と同時に、親水基が違う糖脂質のクラスでの分離が良好に行えるカラム、および移動相、グラジエントの検討を行う。さらに、イオン化条件の検討、構造解析の為のフラグメントイオン生成条件の検討、各糖脂質分子種の定量測定条件の検討を行う。

2) 生体サンプルを用いた組織におけるスフィンゴ糖脂質の網羅的解析。
生体サンプルを用いて、高感度で定量的な網羅的解析をおこない、さらに、定量解析で差があったシグナルについて MS/MS 解析を行い、フラグメントイオンを測定し、構造決定を行う。

4. 研究成果

1) 糖脂質解析の為の MS 測定条件の最適化の検討

ESI-LS-MS/MS により糖脂質の構造決定、および分子種ごとの定量を目的とした系を確立することを目標に MS 測定条件の最適化を行った。プリカーサーイオン検出高感度に測定するためには Curtain Gas, Turbo gas, Nebulizer Gas の最適化が重要であり、Ion Spray Voltage はシグナルの強度にはあまり影響しないこと、さらに、Temperature はイオン化に大きく影響するので個々のサンプルでの最適化が重要であることがわかった。

次に、構造解析のための MS/MS 条件の検討を検討した所、negative ion mode では糖脂質ごとに糖鎖構造解析に適な collision energy (CE) が異なることがわかった。また negative ion mode での測定が通常行われているが、positive ion modeの方がイオン強度が高く、解析にふさわしい事が分かった。また、negative ion mode での測定に比べると低い CE でフラグメントイオンが生じることがわかった。

2) スフィンゴ糖脂質を対象とする網羅的解析の為のキラルカラムによる分離系の検討。
まず、ブタの脳から抽出した酸性スフィンゴ糖脂質であるガングリオシド混合物、および中性スフィンゴ糖脂質であるセラプロシド混合物を用いてスフィンゴ糖脂質のセラミド部との疎水性に着目し分離の検討を行った。C18 逆相カラムとメタノール-イソプロパノール-ギ酸アンモニウムのグラジエントにより分離が可能になった。しかし、この条件では疎水部での分離は可能であるが、親水基が違う糖脂質も同時に溶出される傾向にあった。よって、次に HILIC カラムによる分離の検討に着手した。HILIC カラムではセラミドの疎水部による分離が行われず、スフィンゴ糖脂質の分離には適さない事が分かった。そこで、立体選択性を有するキラルカラムによる分離系の検討をおこなった。キラルカラムは主に有機合成の分野で、光学活性体を分離するために用いられており、その特徴はアミロースやセルロース

などの多糖類にリガンドを結合しているため立体選択性を有することである。そこで、キラルカラムの立体選択性に着目して、6種類のキラルカラムでのスフィンゴ糖脂質の分離を検討した。その結果、アミロース誘導体を使用した IF キラルカラムを用いた場合、脂質クラス、セラミド分子種の違いに加えて、糖鎖構造の違いによっても分離できる点で C18 逆相カラムや HILIC カラムより利点があることを見出した。

3) キラルカラムを用いたヒドロキシ脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析。

これまでに確立したキラルカラムによる分離系を用いた、ヒドロキシ脂肪酸含有ガラクトシルセラミドの d18:1-C18:0h を用いて測定を行った所、セラミド分子種が同じ場合、ヒドロキシ脂肪酸を有するガラクトシルセラミドの方が有さないガラクトシルセラミドより約 4.5 分早く溶出された。また ms/ms によりフラグメント解析を行ったところ、CE を変えることにより、positive ion mode では、糖鎖部分が分離したフラグメント、セラミドのフラグメント、およびスフィンゴイド長鎖塩基のフラグメントが検出され、2-ヒドロキシ脂肪酸に由来するフラグメントは検出されなかった。一方 negative ion mode では同様に、糖鎖部分が分離したフラグメント、セラミドのフラグメント、およびスフィンゴイド長鎖塩基のフラグメントに加え、脂肪酸由来のフラグメントが確認できた。また、ヒドロキシ基を脂肪酸に持つ化合物特有のフラグメントが検出され、未知の化合物の構造解析に有益になる可能性があることがわかった。

つぎに天然由来のサンプルである、ブタ脳由来の sulfatide 混合物におけるヒドロキシ脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析を行った。ガラクトシルセラミドの合成品の時と同様に、それぞれ脂肪酸鎖が同じものでく比べると、ヒドロキシ脂肪酸を有する sulfatide の方が有さない sulfatide より約 4~4.5 分早く溶出された。これをもとに、脂肪酸プロファイルを解析したところ、セラミドに d18:1-C24:1, d18:1-C24:0, d18:1-C18:0, d18:1-C26:1, d18:1-C22:0 および d18:1-C24:1h を持つ sulfatide が主に検出され、さらに微量ながらも d18:1-C26:1h, d18:1-C24:0h および d18:1-C22:0h などヒドロキシ脂肪酸をもつ sulfatide も検出された。

4) キラルカラムを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析

HeLa 細胞よりメタノール抽出した脂質画分を用い、セラミド由来のプロダクトイオンを用いたプレカーサーイオンスキャン、および multiple reaction monitoring 法で測定し、定量解析した。さらに構造解析には、プロダクトイオンスキャンモードで測定を行った。

ガングリオシド GM3 の脂肪酸プロファイルを解析したところ、セラミドに d18:1-C24:1, d18:1-C16:0, d18:1-C22:0 および d18:1-C24:0 が主に検出された。

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1件)

Fujiwara Y, Hama K, Tsukahara M, Izumi-Tsuzuki R, Nagai T, Ohe-Yamada M, Inoue K, Yokoyama K.

Acyl Chain Preference in Foam Cell Formation from Mouse Peritoneal Macrophages.

Biol Pharm Bull. (2018) 41(1):86-91.

[学会発表](計9件)

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. 糖脂質解析の為に MS 測定条件の最適化の検討. 第 57 回脂質生化学会 2015

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. 糖脂質解析の為に MS 測定条件の最適化の検討. 第 57 回日本先天代謝異常学会 2015

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. 多段階 MRM モードを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析. 第 58 回脂質生化学会 2016

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. MRM モードを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析. 第 58 回日本先天代謝異常学会 2016

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. スフィンゴ糖脂質を対象とする網羅的解析の為にキラルカラムによる分離系の検討. 第 59 回脂質生化学会 2017

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. LC-ESI-MS を用いたスフィンゴ糖脂質の網羅的解析の為にキラルカラムによる分離系の検討と生体サンプルへの適用. 第 42 回日本医用マススペクトル学会 2017

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. キラルカラムを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析. 第 59 回先天代謝異常学会 2017

藤原優子、濱弘太郎、横山和明. キラルカラムを用いた生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の解析. 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 優子 (FUJIWARA, Yuko)

帝京大学 薬学部 助教

研究者番号：70722320

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()