

平成30年6月16日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09401

研究課題名(和文) リピドミクスを活用するエネルギー吸収の複合動態解析法の開発

研究課題名(英文) Complex energy absorption process analysis by lipidomics

研究代表者

袴田 秀樹 (Hakamata, Hideki)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70284750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体物質を網羅的に定性/定量するオミクスのうち、リピドミクスの腸管でのエネルギー吸収機構解析への応用を志向したものである。代表的な脂質として19種類を選択し、それらの標品を用いてイオントラップ型と飛行時間型のハイブリッド型の質量分析計を搭載したLC-IT-TOF-MSによる新規リピドミクス法を開発することができた。実試料として経腸栄養剤のツインラインNF 配合経腸用液を用い、Bligh-Dyer法による抽出分画のLC-IT-TOF-MS測定を行ったところ、MS/MSパターンを基に、リノール酸、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルコリン、トリアシルグリセロールを検出できた。

研究成果の概要(英文)：Among omics methods for the quantification/qualification of biological substances, this study is oriented to clarify the mechanisms for the intestinal energy absorption by lipidomics. By selecting nineteen types of lipid as analytes, a new lipidomics method was developed by liquid chromatography ion-trap time-of-flight mass spectrometry (LC-IT-TOF-MS). Real sample analysis showed that linoleic acid, lysophosphatidylcholines, phosphatidylcholines and triacylglycerols in enteral nutrition Twinline were detected by LC-IT-TOF-MS.

研究分野：分析化学/生化学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常 膜輸送と輸送タンパク質 リピドミクス

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する物質を網羅的に解析するオミクスの領域では、次世代シーケンサーとDNAマイクロアレイの開発によって、ゲノミクスとトランスクリプトミクスの方法論がほぼ確立した。一方、生体の代謝物の定性/定量を取り扱うメタボロミクスにおいては、技術革新が進行中であり、核磁気共鳴スペクトル測定法 (NMR; nuclear magnetic resonance spectroscopy) と質量分析法 (MS; mass spectrometry) が主に利用されている。

MS のモードは種類が多く、代謝物や薬物の定量分析には一般に三連四重極 (Q-q-Q) の質量分析計を用いる。本研究で着目しているリポドミクスは、従来は液体クロマトグラフィーに Q-q-Q を連結したシステム、又はガスクロマトグラフィーなどを用いて開発されてきた。しかし、Q-q-Q の特徴として、質量の真値との一致度 (質量精度) が低いことが挙げられる。一方、飛行時間型 (TOF; time of flight) の質量分析計は質量精度が高く、高分解能である。しかし、従来は MALDI (マトリックス支援レーザーイオン化) と組み合わせる使用が多かった経緯があり、MALDI-TOF の定量的リポドミクスへの活用は少なかった。これは、MALDI-TOF が定量分析に不向きなことに起因する。

以上の背景から、本研究では Q-q-Q と MALDI-TOF の弱点を克服し、高質量精度、高定量精度を実現した新しいシステムである液体クロマトグラフィー-イオントラップ飛行時間型質量分析法 (LC-IT-TOF-MS) に着目した。本研究の申請時点では、本法のリポドミクスへの活用例は 1 報しかなく、上記の特長を活かしたメソッド構築が可能であると考え、LC-IT-TOF-MS による新規リポドミクス法を開発することにした。

2. 研究の目的

(1) LC-IT-TOF-MS によるリポドミクス法開発

高質量精度、高定量精度のリポドミクス法として確立するため、LC 条件、IT-TOF-MS 条件を検討し、脂質の網羅的定量分析法を開発する。

(2) LC-IT-TOF-MS によるリポドミクス法の実試料への応用

開発したリポドミクス法をエネルギー吸収機構の解析へと適用するため、実試料として経腸栄養剤中の脂質量を行う。

3. 研究の方法

(1) LC-IT-TOF-MS によるリポドミクス法開発

装置は、島津製作所製の液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-IT-TOF を用いた。

LC 条件については、カラムは Mightysil RP-18 MS (直径 2 mm × 長さ 150 mm、粒子径 5 μm、関東化学)、カラム温度は 55、移

動相は、5 mmol/L ギ酸アンモニウムを含む水/アセトニトリル混液 (1:1, v/v) と 5 mmol/L ギ酸アンモニウムを含む 2-プロパノール/アセトニトリル混液 (9:1, v/v) のグラジエント溶出、流速は 0.2 mL/min とした。

MS 条件は、イオン源としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI)、イオンモードはポジティブ (又はネガティブ)、キャピラリーへの印加電圧は +4.5 kV、測定 m/z は、MS は 100 ~ 1000、MS/MS は 50 ~ 500 とした。

測定対象は、リゾホスファチジン酸、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、セラミド、ヘキソセラミド、コレステロール、コレステロールエステル、ジアシルグリセロール、トリアシルグリセロールの 19 種の脂質とし、これらの内標準物質を Avanti Polar Lipids 社 (トリアシルグリセロールは SIGMA 社、安定同位体標識したコレステロール -2,2,3,4,4,6- d_6 は C/D/N ISOTOPES 社) から購入した。

(2) LC-IT-TOF-MS によるリポドミクス法の実試料への応用

経腸栄養剤の実試料は、ツインライン[®] NF 配合経腸用液 (大塚製薬) を用いた。

試料前処理法は、Bligh-Dyer 法による脂質抽出を行った。

4. 研究成果

(1) LC-IT-TOF-MS によるリポドミクス法開発

脂質の検出条件を確立するため、内標準物質の混液を LC-IT-TOF-MS に注入して得られた全イオンクロマトグラム (全イオン電流クロマトグラム) に、各脂質に由来するイオンの m/z を入力して抽出イオンクロマトグラムを描いた。結果の解析から、10 μmol/L 又は 100 μmol/L の濃度で、19 種類全ての内標準物質のイオン化パターンを特定することができた。

定量分析へ展開するため、直線性について検討した。ESI(+) で脂質内標準物質 15 種を検出でき、ジアシルグリセロール、トリアシルグリセロール、コレステロールエステル、コレステロール- d_6 以外の 11 種は設定した濃度範囲で相関係数 $r = 0.984$ 以上の直線性を示した。また、ESI(-) では脂質内標準物質 15 種 (このうち 11 種は ESI(+) と重複) を検出でき、ホスファチジン酸とホスファチジルセリン以外の 13 種は設定した濃度範囲で相関係数 $r = 0.982$ 以上の直線性を示した。

19 種類の脂質のうち、実試料中に検出可能な濃度で存在が期待されるものを、文献を精

査して選択した。内標準物質とは脂肪酸側鎖長が異なる測定対象を、内標準法によって定量できることを確認するために、リゾホスファチジルコリン(12:0及び16:0)、ホスファチジルコリン(16:0/16:0)、ホスファチジルエタノールアミン(16:0/16:0)、ホスファチジルグリセロール(14:0/14:0)、スフィンゴミエリン(18:0/16:0)、トリアシルグリセロール(8:0/8:0/8:0及び18:2/18:2/18:2)の標準品のピーク面積と、一定濃度の内標準物質のピーク面積との相関関係について検討した。その結果、0.05~10 $\mu\text{mol/L}$ の範囲で何れも相関係数 $r = 0.988$ 以上の直線性を示し、内標準法による定量が可能であることが分かった。ただし、脂質は同一種の物質であっても、側鎖の異なる多様な分子が存在しており、ここでは個々の全ての脂質分子について内標準物質とのピーク面積比の相関を示した訳ではないので、本法で求める定量値はあくまで予測である。繰り返し測定 ($n=6$) のピーク面積の相対標準偏差 (RSD) は、13.4%以下であり、精度よく定量することができた。

(2)LC-IT-TOF-MS によるリポドミクス法の実試料への応用

実試料として経腸栄養剤のツインラインNF配合経腸用液を用い、Bligh-Dyer法による抽出分画のLC-IT-TOF-MS測定を行った。得られた全イオンクロマトグラムを解析したところ、データベース(MassBank)上のMS/MSパターンとの一致から、リノール酸、リゾホスファチジルコリン2種、ホスファチジルコリン4種、トリアシルグリセロール5種を検出できた。

定量に関しては、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルコリン、トリアシルグリセロールの内標準物質を経腸用液に添加して前処理し、LC-IT-TOF-MS測定を行った。その結果、内標準物質とのピーク面積比から、上記で検出できた脂質のうち、リゾホスファチジルコリン(16:0, 18:2)、ホスファチジルコリン(16:0/16:0, 16:0/18:1, 18:1/18:1, 18:2/18:2)の6つの分子について定量値が求められ、本研究で開発したLC-IT-TOF-MSによるリポドミクス法は、エネルギー吸収機構解析のための細胞実験に用いる実試料に適用できること示すことができた。

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 9 件)

Oshima, R., Kotani, A., Kuroda, M., Yamamoto, K., Mimaki, Y., Hakamata, H. (2018) Discrimination of Schisandrae Chinensis Fructus and Schisandrae Sphenantherae Fructus based on fingerprint profiles of hydrophilic components by high-performance liquid chromatography

with ultraviolet detection. *J. Nat. Med.* 72: 399-408.

Akutsu, H., Nakashima, K., Yanai, H., Kotani, A., Hirashima, S.-i., Yamamoto, T., Takahashi, R., Yoshida, A., Koseki, Y., Hakamata, H., Matsumoto, T., Miura, T. (2017) Design of novel hydrogen-bonding donor organocatalysts and their application to asymmetric direct aldol reaction. *Synlett* 28: 1363-1367.

Yanai, H., Takahashi, R., Takahashi, Y., Kotani, A., Hakamata, H., Matsumoto, T. (2017) 2-(Pyridinium-1-yl)-1,1-bis(perfluoroalkylsulfonyl)ethan-1-ide: a practical reagent for synthesis of strongly acidic 1,1-bis(perfluoroalkylsulfonyl)alkanes. *Chemistry - A Eur. J.* 23: 8203-8211.

Taguchi, A., Kobayashi, K., Kotani, A., Muguruma, K., Kobayashi, M., Fukumoto, K., Takayama, K., Hakamata, H., Hayashi, Y. (2017) 3-Nitro-2-pyridinesulfenates as efficient solution- and solid-phase disulfide bond forming agents. *Chemistry - A Eur. J.* 23: 8262-8267.

Yamamoto, K., Ueki, T., Higuchi, N., Takahashi, K., Kotani, A., Hakamata, H. (2017) A flow-through column electrolytic cell for supercritical fluid chromatography. *J. Sep. Sci.* 40: 4085-4090.

Ohtsubo, T., Kageyama, R., Koseki, Y., Hagi, J., Kotani, A., Yamamoto, K., Kusu, F., Miura, T., Hakamata, H. (2016) Determination of serum brassicasterol in spontaneously hypertensive rats stroke-prone fed a high-ergosterol diet by ultra performance liquid chromatography. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118: 1074-1083.

Sakai, Y., Kotani, A., Umemura, T., Mori, Y., Kusu, F., Yamamoto, K., Hakamata, H. (2016) Electrochemical determination of synephrine by hydrophilic interaction liquid chromatography using a zwitterionic monolith column. *Electroanalysis* 28: 1947-1950.

Kotani, A., Watanabe, M., Yamamoto, K., Kusu, F., Hakamata, H. (2016) Determination of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and arachidonic acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Sci.* 32: 1011-1014.

Kotani, A., Tsutsumi, R., Shoji, A., Hayashi, Y., Kusu, F., Yamamoto, K., Hakamata, H. (2016) Theoretical repeatability assessment without repetitive measurements in gradient high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1454: 26-31.

[学会発表](計 41 件)

小谷 明、袴田秀樹、日本酒および焼酎の酸度測定用センサの開発、第 77 回分析化学討論会、20170527、京都

北村香苗、小谷 明、金子直人、山本法央、袴田秀樹、ポルタンメトリーによる余剰酸測定に基づくアミノ酸の定量、第 77 回分析化学討論会、20170527、京都

袴田秀樹、石田萌実、山本法央、小谷 明、LC-IT-TOF-MS によるリポドミクスのための脂質イオン化パターンの同定、第 6 回医薬工包括連携推進シンポジウム、20170617、東京

大嶋龍誠、小谷 明、黒田明平、山本法央、三巻祥浩、袴田秀樹、北五味子と南五味子の鑑別のための吸光検出 HPLC、平成 29 年度 日本分析化学会関東支部若手交流会、20170714、栃木

町田晃一、古石裕治、小谷明、山本法央、三浦剛、袴田秀樹、エルゴステロールとブラジカステロールの重水素標識体の合成及び液体クロマトグラフィー-質量分析法による定量法の開発、平成 29 年度 日本分析化学会関東支部若手交流会、20170714、栃木

山本法央、池澤美野里、小谷 明、袴田秀樹、CaCo-2 細胞を用いた in vitro 小腸モデルへの siRNA 導入法の開発、平成 29 年度 日本分析化学会関東支部若手交流会、20170714、栃木

町田晃一、古石裕治、小谷明、山本法央、三浦剛、袴田秀樹、SHRSP ラット血中のエルゴステロール-d₁ 及びブラジカステロール-d₁ の LC-MS/MS による定量、第 30 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2017)、20170828、東京

小谷 明、袴田秀樹、酸と塩基の電気化学検出法の開発と病態モニタリングへの応用、日本分析化学会第 66 年会、20170909、東京

山本法央、植木達也、樋口尚之、高橋浩司、小谷 明、袴田秀樹、炭素繊維を用いる 2 電極式電解セルの超臨界流体クロマトグラフィーへの応用、日本分析化学会第 66 年会、20170909、東京

小谷 明、金子真紀、大嶋龍誠、山本法央、袴田秀樹、キノンの還元前置波を利用した五味子 (Schisandrae Fructus) の酸度の定量法の開発、第 63 回ポーラログフィーおよび電気分析化学討論会、20171120、山口

石川久喜、小谷 明、黒田明平、山本法央、三巻祥浩、袴田秀樹、生薬中のシュウ酸定量のための電気化学検出 HPLC の開発、日本薬学会第 138 年会、20180325、石川

金子真紀、小谷 明、山本法央、袴田秀樹、ポルタンメトリーによる酸度測定に基づく北五味子と南五味子の鑑別、日本薬学会第 138 年会、20180325、石川

上原英恵、菅原啓資、浅見達彦、古石裕治、山本法央、小谷明、三浦剛、袴田秀樹、アセトニトリル中でのコレステロールの電解酸化に対する除酸素の影響、日本薬学会第 138 年会、20180325、石川

黒田 明平、米倉 萌実、椎 崇、小谷 明、袴田 秀樹、三巻 祥浩、漢方薬中の生薬成分に関する研究(8)大建中湯構成生薬の成分分析 - カンキョウ中のシュウ酸量およびコウイ中の糖類量について -、日本薬学会第 138 年会、20180325、石川

Z. Xue, A. Kotani, B. Yang, H. Hakamata, Development of a column switching LC with electrochemical detection system for determining phenylethanoid glycosides from *Magnoliae officinalis* cortex. 日本薬学会第 138 年会、20180325、石川

A. Kotani, K. Kitamura, F. Kusu, K. Yamamoto, H. Hakamata, Development of a sensor for determining amino acidity in Japanese sake by means of voltammetric measurement of surplus acid. The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE 2015), 20160821-26, The Hague, The Netherlands

大嶋龍誠、小谷 明、黒田明平、山本法央、三巻祥浩、袴田秀樹、五味子中の有機酸の UV 検出 HPLC による定量、第 60 回日本薬学会関東支部大会、20160917、東京

山本法央、池澤美野里、小谷 明、袴田秀樹、ストレプトリジン O を用いる CaCo-2 細胞への siRNA 導入法の開発、第 60 回日本薬学会関東支部大会、20160917、東京

- 矢内 光、高橋流太、小谷 明、袴田秀樹、松本隆司、ビス(ペルフルオロアルキル)アルカン類の合成と有機溶媒中での酸性度評価、第 39 回 フッ素化学討論会、20160929-30、佐賀
- 袴田秀樹、メタボロームを指向したアンペロメトリック検出法の開発と質量分析法との比較、第 10 回メタボロームシンポジウム、20161020-21、山形
- 21 小谷 明、北村香苗、山本法央、袴田秀樹、日本酒のアミノ酸度測定のための電気化学検出法の開発、新アミノ酸分析研究会第 6 回学術講演会、20161104、東京
- 22 矢内 光、石井信幸、小谷 明、袴田秀樹、松本隆司、強酸性炭素酸誘導体を用いたイソクマリン類とケテンシリルアセタールの反応、第 42 回反応と合成の進歩シンポジウム、20161107-08、静岡
- 23 大嶋龍誠、小谷 明、黒田明平、山本法央、三巻祥浩、袴田秀樹、UV 検出 HPLC による北五味子と南五味子の鑑別法、日本薬学会第 136 年会、20160324-27、仙台
- 24 山本法央、植木達也、樋口尚之、高橋浩司、小谷 明、袴田秀樹、超臨界流体クロマトグラフィーのためのカラム電極電解セルの感度評価、日本薬学会第 136 年会、20160324-27、仙台
- 25 A. Kotani, M. Watanabe, K. Yamamoto, F. Kusu, H. Hakamata, High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for determining a ratio of eicosapentaenoic acid to arachidonic acid in human plasma. The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE 2015), 20151004-09, 台北、台湾
- 26 小谷 明、小島妃南子、板垣摩利、楠 文代、袴田秀樹、コーヒーの酸度測定用センサの開発、第 75 回分析化学討論会、20150523-24、山梨
- 27 酒井悠希、小谷 明、梅村知也、森 宥貴子、袴田秀樹、HILIC カラムを用いたシネフリンの電気化学検出 HPLC、第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム(PPF 2015)、20150820-21、長崎
- 28 堤 理紗、小谷 明、袴田秀樹、林 譲、ISO 11843-7 を利用したグラジエント HPLC におけるベースラインノイズ解析、第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2015)、20150821-22、長崎
- 29 花光真里奈、山本法央、小谷 明、袴田秀樹、LC-IT-TOF-MS による血清脂質のマスクロマトグラム測定、第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2015)、20150821-22、長崎
- 30 蔭山 涼、大坪孝彰、羽木順也、山本法央、小谷 明、楠 文代、袴田秀樹、高エルゴステロール食によって SHRSP ラット血中に出現するプラジカステロールの LC-MS/MS による検出、日本分析化学会第 64 回年会、20150909-11、福岡
- 31 小谷 明、陳 両綿、林 譲、楠 文代、袴田秀樹、3 流路系電気化学検出 HPLC の確率論的手法による測定精度評価、2015 年電気化学秋季大会、20150911-12、埼玉
- 32 津崎 茜、小谷 明、山本法央、小川寛恭、秋山治彦、袴田秀樹、高脂肪酸食を負荷したマウスの血中遊離脂肪酸の分離定量、第 59 回日本薬学会関東支部大会、20150912、千葉
- 33 植木達也、樋口尚之、高橋浩司、山本法央、小谷 明、袴田秀樹、電気化学検出超臨界流体クロマトグラフィーシステムの構築のためのノイズのスペクトル解析、第 59 回日本薬学会関東支部大会、20150912、千葉
- 34 渡部仁美、大石青希、山本法央、小谷 明、袴田秀樹、エメラルド緑色蛍光タンパク質の化学修飾、第 59 回日本薬学会関東支部大会、20150912、千葉
- 35 松本萌起、羽木順也、山本法央、小谷 明、袴田秀樹、ピコリン酸エステル化した酸化ステロールのタンデム質量分析、第 59 回日本薬学会関東支部大会、20150912、千葉
- 36 石田萌実、花光真里奈、山本法央、小谷明、袴田秀樹、LC-IT-TOF-MS による経腸栄養剤中脂質の検出、第 59 回日本薬学会関東支部大会、20150912、千葉
- 37 薦田裕昌、浅見達彦、山本法央、小谷 明、袴田秀樹、エルゴステロールのカラム型フロー電解、第 59 回日本薬学会関東支部大会、20150912、千葉
- 38 小谷 明、北村香苗、中島美優、山本法央、袴田秀樹、余剰酸の電気化学計測に基づく日本酒のアミノ酸度測定法の開発、日本薬学会第 136 年会、20160326-29、横浜

- 39 宮本友貴、山本法央、袴田秀樹、小谷 明、
血中ニコフェノール酸測定のための電気
化学検出 HPLC の開発、日本薬学会第 136
年会、20160326-29、横浜
- 40 阿久津裕士、山本智之、中島康介、矢内
光、高橋流太、小谷 明、平島真一、古
石裕治、袴田秀樹、松本隆司、三浦 剛、
新規水素結合供与型有機分子触媒の設計
と不斉アルドール反応への適用、日本薬
学会第 136 年会、20160326-29、横浜
- 41 高橋浩司、山本法央、小谷 明、袴田秀
樹、佐藤弘人、今田啓介、稲葉二郎、本
多秀雄、立川英一、分析化学実習の形成
的評価への e-learning system 「Webclass」
の効果的利用、日本薬学会第 136 年会、
20160326-29、横浜

〔図書〕(計 2 件)

Akira Kotani, Fumiyo Kusu, Hideki
Hakamata, Kiyoko Takamura, Determination
of Acid Content. Flow Injection Analysis of
Food Additives. Ed. Claudia Ruiz-Capillas
and Leo M. L. Nollet, CRC Press, 2015,
693-711

袴田秀樹、分子構造解析のための分析、
薬学性のための分析化学 第 4 版、洪澤
庸一、楠 文代 編、廣川書店、2017、
193-245

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/bunsekikagaku/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

袴田秀樹 (Hideki Hakamata)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70284750