

令和元年5月10日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05828

研究課題名(和文)リン脂質への選択性を飛躍的に向上した抽出法の開発とターゲットリポドミクスへの応用

研究課題名(英文) Development of selectivity-improved extraction method for phospholipids and its application to targeted lipidomics

研究代表者

巴山 忠 (Hayama, Tadashi)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：90549693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フルオラス相互作用を利用してリン脂質類を選択的に抽出できる方法の開発を行った。フルオラスとはパーフルオロアルキル基同士の特異な親和性のことを指す。本親和性によって、パーフルオロ化合物は、パーフルオロアルカン類などのフルオラス溶媒中に極めて選択的に抽出される。本法では、パーフルオロポリエーテルカルボン酸の金属固定化体を用いてリン脂質類を捕捉し、その複合体のみをフルオラス溶媒に選択的に抽出した。本法をヒト血漿中リン脂質の抽出に適用したところ、何ら妨害を受けることなく、LC-MS/MS測定が可能であり、本法がリン脂質類を対象としたターゲットリポドミクスに応用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内における脂質類は多種多様であり、それらを網羅的に分析・解析することは一般に困難である。そこで本研究では、生体内において極めて重要な役割を果たし、種々の疾病とも深く関与しているリン脂質に焦点を当て、それらのみを選択的に抽出・分析できる手法を開発した。本法の開発により、リン脂質類を、他の生体成分から何ら妨害を受けることなく測定することを可能とした。今後、本法が、疾病の診断やバイオマーカー探索など関連分野に大きく貢献できることを期待する。

研究成果の概要(英文)：In this study, a selective extraction method for phospholipids with fluoros affinity has been developed. Perfluoroalkyl-containing compounds show unique "fluorous" properties, which are related to the specific affinity between perfluoroalkyl groups. Therefore, fluoros compounds can be easily and selectively extracted utilizing fluoros solvents, such as perfluoroalkanes. In this method, phospholipids could be selectively extracted into fluoros solvent with capturing by metal-immobilized perfluoropolyether carboxylic acid. Furthermore, this method was successfully applied to extraction of phospholipids in human plasma and they could be analyzed by LC-MS/MS without any interference. This result supported that this method will be a powerful tool for phospholipids analysis in targeted lipidomics.

研究分野：分析化学

キーワード：リン脂質 フルオラス溶媒抽出 金属キレートアフィニティ 液体クロマトグラフィー/質量分析計

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

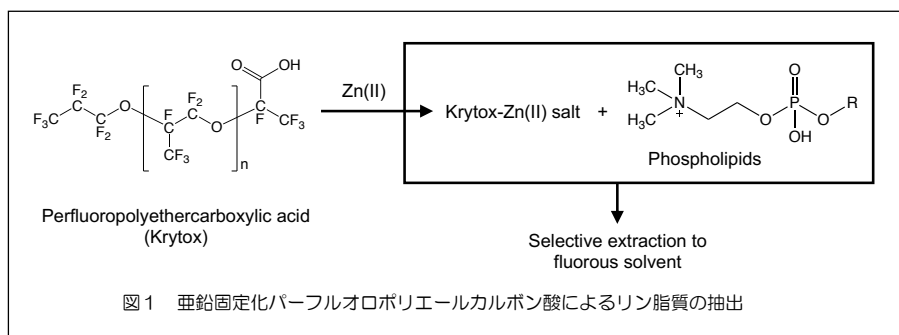
1. 研究開始当初の背景

生体内における代謝物を網羅的に解析し、生命現象を動的に捉えることを目的とした「メタボロミクス」に近年注目が集められている。その中でも脂質に焦点を当てた「リポドミクス」には、生活習慣病（ガンや肥満など）といった脂質代謝異常への関与が疑われる疾病に対する有効なマーカーの発見や、それらの病態解明へと貢献できる可能性があるとして、大きく期待されている。生体内における脂質の役割は広く、またその分子種もバラエティーに富んでいるが、リポドミクスでは、総脂質を網羅的に測定する「ノンターゲットリポドミクス」と、ある種の脂質のみを対象とする「ターゲットリポドミクス」という手法が用いられる。いずれにおいても質量分析装置（MS）による測定が主に用いられるが、脂質構成は複雑であることから、その測定は容易なものではない。特に、データ量が膨大となるノンターゲットリポドミクスでは、得られる知見も大きなものとなる可能性が高い反面、総脂質の一斉測定のための煩雑さやコストの点においてやや難がある。一方、ターゲットリポドミクスは、対象となる脂質を限定していることからデータ解析の煩雑さが改善され、多検体のルーチン分析を実現しやすいという利点を有しているが、対象となる脂質への選択性を確保しつつ、それらを高感度、高精度かつハイスループットに測定できる方法論を構築する必要がある。今回、本研究では、ターゲットリポドミクスをより効果的かつ実用的に遂行すべく、リン脂質への選択性を飛躍的に向上させた前処理技術の開発を行う。リン脂質をターゲットとしたリポドミクスは臨床的にも実現しつつあり、実際に、アテローム型動脈硬化症 (*J. Chromatogr. A*, **1171** (2014) 154) やアルツハイマー病 (*Nat. Med.*, **20** (2014) 415) などの疾病の早期診断法として有用であることが既に報告されている。さらなる技術開発による発展が強く望まれているが、そのためには「検出法」というよりはむしろ「選択性」に焦点を当てた方法論が必要である。特に MS 検出を行う際は、マトリックス効果などによって測定対象物質の定量値が大きく変動する場合があるため、抽出・精製といった前処理の是非が、その結果を左右するといっても過言ではない。

2. 研究の目的

本研究では、フルオラスと呼ばれるパーフルオロアルキル鎖同士がもつ特異的な親和性を利用し、ターゲットリポドミクスのための新規かつ有用なリン脂質抽出法の構築を試みた。フルオラスとは「親フッ素性の」という意味の造語であり、パーフルオロアルキル化合物同士のみが示す特異的な親和性のことを指す。本親和性は、「パーフルオロアルキル基が修飾されたシリカゲルによる LC (あるいは固相抽出法)」や「パーフルオロアルカン類などフルオラス溶媒による液液分配法」にて利用可能であり、これまでに申請者らは、主に前者を利用することによる測定対象物質の超選択的な分析法の開発に成功している (例えば, *Anal. Chem.*, **84** (2012) 8407 や *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **115** (2015) 201 など)。今回、本研究では後者を利用した抽出法を構築することとした。フルオラス溶媒は一般に、① 極性の有無にかかわらず、多くの溶媒と混和しない、② 同一分子内に概ね 39 以上のフッ素原子を有するパーフルオロアルキル化合物のみ溶解できる、などの性質を示す。リン脂質やその他の脂質も例外なくフルオラス溶媒には全く溶解しない。そこで本研究では、リン脂質を選択的に捕捉してフルオラス溶媒へと抽出するため、フッ素系潤滑油として広く工業利用されている Krytox を媒体として利用することとする。Krytox は、パーフルオロポリエーテル構造を有していることからフルオラス溶媒に可溶化できるばかりか、末端にはカルボキシル基を有していることからフルオラス溶媒中にてある種の金属類 (例えば亜鉛) の固定化が可能であることが知られている (*J. Phys. Chem. B*, **113** (2009) 7449)。

すなわち、本試薬を用いることで、金属キレートアフィニティー様の原理によってリン脂質を捕捉し、得られた複合体のみをフルオラス溶媒中へと



極めて選択的に抽出可能となる (図 1)。フルオラス溶媒に抽出されたリン脂質は、脱配位試薬を含む非フルオラス溶媒にて逆抽出した後、直接 MS 分析 (あるいは LC-MS 分析) に供することとした。本研究では、本抽出法の基盤を整備し、実試料 (ヒト血液など) への有用性を検証するとともに、ターゲットリポドミクスへの応用性や実用性を評価した。

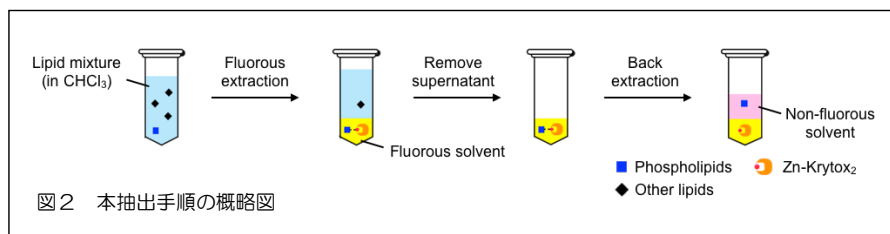
3. 研究の方法

リン脂質は、グリセロリン脂質及びスフィンゴリン脂質に大別される。さらにグリセロリン脂質には、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、ホスファチジルセリン及びホスファチジレイノシトールなどといった種が存在する。まずは、本法の基盤を整備すべく、それらリン脂質の中から適当なモデルを選別し、抽出条件の基礎的検討を行うこととした。一般に総脂質は、クロロホルムを抽出溶媒として用いる Bligh-Dyer 法に

て抽出可能である。従って本法では、Bligh-Dyer 法でまずは総脂質を抽出することを想定し、クロロホルム中からリン脂質類のみをフルオラス溶媒抽出する方法を開発した。本研究にて行った主な基礎的検討は、① Krytox への金属固定化条件、② フルオラス溶媒の種類、③ 逆抽出条件、④ MS 測定条件である。① については、複数の金属種を対象に、既報 (*J. Phys. Chem. B*, **113** (2009) 7449) による手順に従って検討した。② については、テトラデカフルオロヘキサンなどのアルカン類を中心に検討し、本抽出操作を行うに当たり、最も適した溶媒を選定した。次いで、③ については、フルオラス抽出液中のリン脂質を、非フルオラス溶媒 (アセトニトリルやメタノールなど、あるいはそれらと水の混液) に逆抽出するための条件を探った。これは、ほとんどの溶媒と混和しないフルオラス溶媒のままでは、その後の MS 測定が困難となるためである。これについても既報 (*Anal. Chem.*, **85** (2013) 8979 や *J. Chromatogr. A*, **1171** (2014) 154 など) による方法に従い、効率良く逆抽出できる条件を探った。④ の MS 測定条件については、LC による分離条件の検討も含め、抽出したリン脂質の分析に至適な測定条件を整えることとした。

4. 研究成果

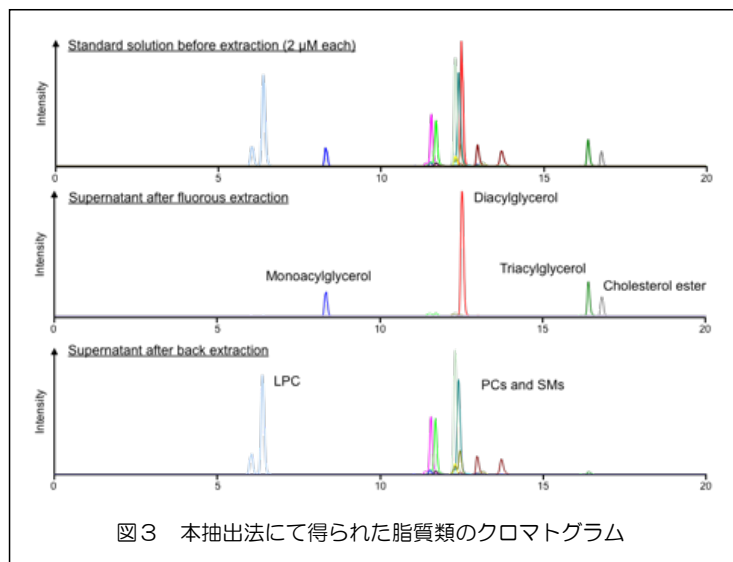
本法における抽出条件を確立するため、まずは、モデル化合物としてホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジン酸 (PA)、スフィンゴシル-1-リン酸 (S1P) 及びスフィンゴシルホスホコリン (SPC) の 7 種のリン脂質を用いて抽出条件の最適化を行った。種々の検討を行った結果、抽出手順は以下のとおりにした。試料溶液 (クロロホルム) に、0.2% トリフルオロ酢酸 (メタノール溶液) 及び Zn(II) 固定化 Krytox 溶液 (テトラデカフルオロヘキサン溶液) を加えて室温で振とうした。次いで、遠心分離後、上層を除去し、下層 (フルオラス層) を洗浄後、2% トリフルオロ酢酸 (80% メタノール溶液) を加えて逆抽出した。再度遠心分離し、上層を LC-MS/MS に注入した (本抽出手順の概略は図 2 に示す)。本抽出法により、対象としたリン脂質類は



についても同様

の抽出を行ったところ、それらは抽出されなかったことから、本法のリン脂質に対する選択性を確認することができた。なお、抽出に用いた Krytox へ固定化する金属種として、亜鉛以外に鉄、銅、ランタノイド類を用いて検討を行ったところ、いずれの金属種を用いた場合においてもリン脂質類の抽出が可能であったが、本法では最も抽出効率の良かった亜鉛を用いることとした。以上の基礎的検討の結果をもとに、ヒト血漿中リン脂質の抽出及び分析に本法を適用すべく検討を行った。血中脂質類としては、アシルグリセロール類やコレステロールエステル類の他、リン脂質の中でも PC、スフィンゴミエリン (SM) 及びリゾホスファチジルコリン (LPC) の存在

量が高い。従って、血中リン脂質の測定は、これらの 3 種のリン脂質類に焦点を当て、さらに、本抽出法によって血中に多量に含まれるアシルグリセロール類やコレステロールエステル類から、それらを精製できるか検討を行った。その結果を図 3 に示す。図中上段は、対象とした脂質類の混合標準液から



得られたクロマトグラムである。中段は、本法における最初のフルオラス溶媒抽出後に得られた上清 (非フルオラス溶媒層) を測定したもの、下段はフルオラス溶媒抽出後、得られた下層を逆抽出して得られたクロマトグラムである。本結果から、アシルグリセロール類やコレステロールエステル類とリン脂質類は、本法によって完全に分離抽出できることが示され、リン脂質類のみを選択的に測定可能であることが確認された。さらに、本法を実際のヒト血漿試料に適用した。PC、SM 及び LPC は、MS/MS 分析において共通のフラグメントイオンを有することが知られている。そこで、これら 3 種の血漿中リン脂質類の分析には、プリカーサーイオンスキャンを利用した。その結果、本法によって、ヒト血漿中における少なくとも 6 種の LPC、

10種のSM及び34種のPCを、何ら他の成分に妨害されることなく、LC-MS/MSにて検出同定することが可能であった。以上、本研究により開発した方法論は、リン脂質が関与する様々な疾病等の原因解明やバイオマーカー探索など、ターゲットリポドミクスにおける有用なツールになり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① T. Hayama, E. Kiyokawa, H. Yoshinda, O. Imakyure, M. Yamaguchi, H. Nohta, Fluorous-assisted metal chelate affinity extraction technique for analysis of protein kinase activity, *Talanta*, 156-157 (2016) 1-5.
- ② T. HAYAMA, E. TAMASHIMA, H. YOSHIDA, M. YAMAGUCHI, H. NOHTA, Multi-perfluoroalkyl derivatization of polyamines for selective liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis utilizing fluoruous affinity, *Chromatography*, 38 (2017) 107-113.
- ③ E. Kiyokawa, T. Hayama, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta, Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction for Nucleotides Followed by HILIC-MS Analysis, *J. Chromatogr. B*, 1074-1075 (2018) 86-90.
- ④ T. Hayama, K. Ohyama, Recent development and trends in sample extraction and preparation for mass spectrometric analysis of nucleotides, nucleosides, and proteins, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 161 (2018) 51-60.

〔学会発表〕(計12件)

- ① 賀来祐美, 巴山 忠, 鶴田夏野, 福原 翠, 富田陵子, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, 藤岡稔大, フルオラスイオンペアを利用したパーフルオロ関連化合物の選択的抽出法の開発, 第34回九州分析化学若手の会 夏季セミナー (2016)
- ② 久保田桃子, 清川恵奈, 巴山 忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, マルチフルオラス誘導体化による脳内ペプチド類の選択的 LC-MS/MS 分析, 第34回九州分析化学若手の会 夏季セミナー (2016)
- ③ Ena Kiyokawa, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta, Analysis of protein kinase activity with fluoruous-assited metal chelate affinity extraction of phosphopeptide followed by fluorescence detection, International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS2016)
- ④ Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Yohei Sakaguchi, Jun Ikenaga, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta, Fluorous derivatization technique for selective analysis of biogenic-related compounds with HPLC-fluorescence detection, International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS2016)
- ⑤ 清川恵奈, 久保田桃子, 巴山 忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, 脳内ペプチド類の選択的 LC-MS/MS 分析法の開発とマウス脳組織への応用, 第33回日本薬学会九州支部大会 (2016)
- ⑥ 清川恵奈, 巴山 忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, 金属固定化フルオラス試薬を用いたリン脂質の選択的抽出法の開発, 日本薬学会第137年会 (2017)
- ⑦ 清川恵奈, 竹下阿紗子, 巴山 忠, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, オンライン-フルオラス誘導体化によるクルクミンの高感度 LC-MS/MS 分析, 日本分析化学会第66年会 (2017)
- ⑧ 福原 翠, 安東有紀, 巴山 忠, 富田陵子, 藤岡稔大, フルオラス溶媒を用いた分散液-液マイクロ抽出によるパーフルオロ関連化合物の選択的抽出, 第35回九州分析化学若手の会 夏季セミナー (2017)
- ⑨ 巴山 忠, フルオラス化学を利用した分離分析手法, 日本分析化学会 第66年会 (招待講演) (2017)
- ⑩ 清川恵奈, 田坂友里恵, 巴山 忠, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, パーフルオロポリエーテルカルボン酸を用いたリン脂質のフルオラス金属キレートアフィニティー抽出, 第28回クロマトグラフィー科学会議 (2017)
- ⑪ 巴山 忠, 可逆的相互作用を利用した生体関連物質のフルオラス溶媒抽出, フルオラス科学研究会第11回シンポジウム (招待講演) (2018)
- ⑫ 安東有紀, 巴山 忠, 富田陵子, 藤岡稔大, パーフルオロポリエーテルカルボン酸 Krytox の Zn(II)塩を利用したリン脂質類の選択的抽出, 第36回九州分析化学若手の会夏季セミナー (2018)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：清川 恵奈

ローマ字氏名：Ena Kiyokawa

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。