

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780110

研究課題名（和文） 新規リポドミクス解析手法の確立

研究課題名（英文） Establishment of new lipidomics approach

研究代表者

井上 菜穂子 (Naoko Goto-Inoue)

首都大学東京・人間健康科学研究科・特任助教

研究者番号：00509515

研究成果の概要（和文）：従来から脂質解析に汎用される「薄層クロマトグラフィー」によって得られた脂質パターンを、新しい分析技術である「質量分析イメージング」で可視化する新規リポドミクス手法“TLC-Blot-MALDI imaging”を確立した。研究期間において確立した手法の妥当性を評価し、更に実際の生体試料の解析に応用した。その結果、これまでの方法では同定解析できなかった微量脂質の解析や、多検体の脂質発現解析を行う事に成功した。

研究成果の概要（英文）：We successfully established the new lipidomics approach named “TLC-Blot-MALDI imaging” which visualizes the lipid pattern obtained from thin layer chromatography by imaging mass spectrometry which is new analytical skills.

In this study, we evaluated the validity of the technique, and also applied to the biological samples. As a result, we succeeded to detect very small amounts of lipids which hardly detected by conventional methods. Moreover, comprehensive analyses were also performed to know the lipid dynamics change with molecular species level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：分析化学、脂質

1. 研究開始当初の背景

21 世紀の人类的な課題である再生可能な資源利用と天然志向という時代の要請に対して、脂質は高いポテンシャルを有しており、脂質の高度利用への期待が高まっている。また脂質は、3 大栄養素として主要カロリー源となっているだけでなく、高度不飽和脂肪酸や共役不飽和脂肪酸、あるいは抗酸化物質などの有用生理活性物質としての機能性が明

らかにされている。

質量分析イメージングは数 10 μm オーダーの解像度において、組織切片から直接質量分析及びイメージングが可能な分子イメージングの方法として、注目を浴びている。従来の脂質解析の手法は、抽出・精製を伴う破壊解析であるため、分子の局在をみることは不可能であった。そのため局在可視化と同時に同定を可能にする質量分析イメージングに

対する期待は大きく、更に微量脂質を対象とした解析技術の発展が求められる。申請者はこれまでに、マウスの精巣から中性糖脂質を抽出し、フコース含有型の新規糖脂質を4種発見した。これらの糖脂質は精製後構造が不安定であることから、抽出による脂質構造同定には至らなかった。しかしTLCプレート上ではその構造が安定に保たれていたことから、TLCプレートをそのまま質量分析計に導入するTLC-MALDIの重要性に着目し、この手法を用いて新規糖脂質の構造解析を行った。その結果、多価不飽和脂肪酸(hC28:5, hC30:5)を持つ糖脂質であることが明らかになった。TLC-MALDIを用いた報告は複数存在するが、構造解析、並びに感度の観点から、発展途上な技術であると考えられる。特に、TLCプレートに直接レーザーを照射するTLC-MALDIにおいては、夾雑物の影響から感度が不十分である。

そこで申請者はTLCプレートからPVDF(ポリビニルデンフルオライド)膜へ脂質を転写し、PVDF膜をMS解析へ供するTLC-Blot-MALDIの手法に注目している。

質量分析イメージングはレーザーを二次元走査してスペクトル上のピークに相当する物質の局在を画像化する技術であるが、TLCプレートから熱転写したPVDF膜上をイメージングすることによって、これまでは検出できなかった微量な脂質の検出が可能になると考えた。また、質量分析で得られる分子量情報と、イメージングにより数10 μ mオーダーの解像度で得られる局在(Rf値)の情報をあわせることにより、TLC上での簡易的な分子種発現解析(ディファレンシャルディスプレイ)が可能になる。よって、これまでの染色法に変わる、新しいリピドミクスの解析手法として、質量分析イメージングを応用した解析手法の確立を考案した。

2. 研究の目的

農芸化学において、植物、海産物、畜産物、林産物等の品種改良、食品評価、機能性食品開発、新規エネルギー源探索は主要な課題であり、その基盤として高感度高分解能の分析手法は極めて重要である。しかしそれら一次産品の主要な構成成分である脂質の分析についての分析手法はまだ十分とは言えない。本研究では、申請者らが開発した薄層クロマトグラフィー(TLC)によって得られた脂質パターンを質量分析イメージングで可視化する新規リピドミクス手法を農芸化学に応用する。

3. 研究の方法

まず初年度においては方法論を確立し、これまでの脂質解析で不十分とされていた感度の問題を重点的に克服するような系を確

立する。次年度は更に包括的な解析手法として発展させるため、広範囲質量分析イメージングの条件を確立する。最終年度は本手法を生体試料へと応用し、これまでの方法では同定解析できなかった微量脂質の解析や、多検体の脂質発現解析を行う。

4. 研究成果

21年度

当該年度は実施計画通り、標準試料であるホスファチジルコリンおよびスフィンゴミエリンをTLCによって展開し、TLC-Blot-MALDIの手法を用いて検出限界を求め(図1)、実際にMsⁿ解析を行い、構造を決定した。その

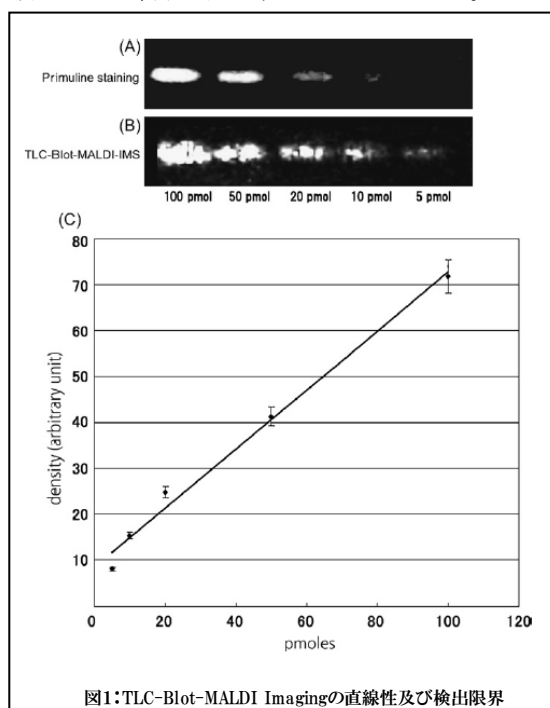


図1: TLC-Blot-MALDI Imagingの直線性及び検出限界

後、ヒト試料から総脂質を抽出し、混合物の状態からTLCによって各脂質に分画し、PVDF膜へ転写ののち、TLC-Blot-MALDIで測定を行った。その結果、標品同様に、複数の分子種を検出することができた(原著論文1)。さらには5種類以上の分子種が存在すると報告されている糖脂質、セミノリピドを精巣より抽出し、TLC-Blot-MALDIの手法を用いてイメージングし、分子種解析も行った(原著論文2)。

22年度

当該年度も実施計画通り、多数検体を一度に解析できるように、広範囲をイメージングする手法を開発し、多検体のディファレンシャル解析を可能とした(原著論文3)。この時、イオン化補助剤の塗布方法に注意が必要であったため、その最適化に特に留意した。その結果、これまでTLC上で明らかにするこ

とが困難であった分子種ごとの定量解析を簡便に行う事が可能となった。そして、本手法に関わる総説も発表し、広く脂質研究を行っている研究者へ本法をアピールした(原著論文4)。更に、高感度化についても検討を行い、微量な脂質の検出を試みた。応用研究として、マウス精子に特異的に検出される新規の糖鎖構造をもった糖タンパク質の解析を行った。まず、この糖タンパク質を特異的に検出する抗体を用いて、同じ糖鎖構造をもつ糖脂質をスクリーニングした結果、血球細胞に同様の糖鎖構造をもつ糖脂質の発現を明らかにすることができた。その後、本手法を用いることで詳細な糖鎖配列を明らかにすることができた。(原著論文5)。

23年度

初年度に、転写から質量分析までの分析技術の再現性を得る事に成功した。次年度には、質量分析における解析範囲を一次元から二次元に高め、多数検体を一度に解析できるよう広範囲をイメージングする手法を開発し、多検体のディファレンシャル解析を可能とした。更に、微量な脂質の検出を目指した手法の高感度化についても検討を行い、微量な脂質の検出を試みた。

当該年度は実際の生体試料の解析を行い、確立した技術の応用性を検討した。甲殻類の卵巣成熟段階に伴い、卵巣含有脂質が変化する事が知られていたが、その分子種レベルの解析は未だ行われていなかった。そこで、本法を用いて発生段階に伴う脂質変化を明らかにした(原著論文10)。また、マウスを用いた骨格筋収縮刺激に伴う脂質変化についても解析を行い、収縮後に中性脂肪が減少し、特定の高度不飽和脂肪酸を持つリン脂質が増加する傾向を観察できた(原著論文11)。更には肝切除後の脂肪肝における脂質分子種解析、牛肉の産地判別のための脂質分子種解析を明らかにした(原著論文7, 8)。

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11件)

1. Goto-Inoue N, Hayasaka T, Taki T, Valdes Gonzalez T, Setou M., Journal of Chromatography A, 査読有, Vo. 1216, 2009, pp 7096-7101.
2. Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Setou M., Glycobiology, 査読有, Vo. 19, 2009, pp 950-957.
3. Zaima N, Goto-Inoue N, Setou M. J Oleo Sci., 査読有, Vo. 60, 2010, pp 93-98.
4. Goto-Inoue N, Hayasaka T, Setou M.,

Methods Enzymol., 査読無, Vo. 478, 2010, pp 287-301.

5. Katagiri U Y, Sato B, Yamatoya K, Taki T, Goto-Inoue N, Setou M, Okita H, Fujimoto J, Ito T, Toshimori K, Kiyokawa N., Biochem Biophys Res Commun., 査読有, Vo. 406, 2011, pp 326-331
6. Valdes-Gonzalez*, Goto-Inoue N*, Hirano W, Ishiyama H, Hayasaka T, Setou M, Taki T. *筆頭著者 J Neurochem., 査読有, Vo. 116, 2011, pp 678-683.
7. Zaima N, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Enomoto H, Setou M., Anal Bioanal Chem, 査読有, Vo. 400, 2011, pp 1865-1871.
8. Miyamura N, Nakamura T, Goto-Inoue N, Zaima N, Hayasaka T, Yamasaki T, Terai S, Sakaida I, Setou M, Nishina H., Biochem Biophys Res Commun., 査読有, Vo. 408, 2011, pp 120-125.
9. Xu H, Kongmanas K, Kadunganattil S, Smith CE, Rupa T, Goto-Inoue N, Hermo L, Faull KF, Tanphaichitr N., J Lipid Res., 査読有, Vo. 52, 2011, pp 2187-2197.
10. Chansela P, Goto-Inoue N, Zaima N, Hayasaka T, Sroyraya M, Kornthong N, Engsusophon A, Tamtin M, Chaisri C, Sobhon P, Setou M., PLoS One, 査読有, Vo. 7, 2012, pp e33154.
11. Goto-Inoue N, Manabe Y, Miyatake S, Ogino S, Morishita A, Hayasaka T, Masaki N, Setou M, Fujii NL., Anal Bioanal Chem, 査読有, 2012, in press

[学会発表] (計5件)

1. 井上菜穂子、早坂孝宏、財満信宏、瀬藤光利
イメージングマスペクトロメトリーによる糖脂質の局在解析
日本糖質学会(2009)
2. 井上菜穂子、早坂孝宏、財満信宏、瀬藤光利
イメージングマスペクトロメトリーを用いたマウス精巢の脂質解析
日本質量分析学会(2009)
3. 井上菜穂子、早坂孝宏、柏木行康、山本真理、中許昌美、瀬藤光利
イメージングマスペクトロメトリーにおける金ナノ微粒子の応用
質量分析総合討論会, 第1回アジア・オセアニア質量分析会議(2010)
4. 井上菜穂子
Imaging mass spectrometry for glycomics
BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第

83 回日本生化学会大会 (合同大会) 招待講演
(2010)

5. 井上菜穂子、内田良一、早坂孝宏、中
島喜美子、佐野栄紀、瀬藤光利
イメージングマスマススペクトロメトリーによ
る皮膚臨床組織切片の解析
日本医用マスマススペクトル学会(2011)

[図書] (計 1 件)

井上菜穂子、瀧孝雄

[質量顕微鏡法 4.7 薄層クロマトグラフ
ィー上でのイメージング(TLC-Blot-MALDI イ
メージング)]

シュプリンガー・ジャパン株式会社(2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 菜穂子 (Naoko Goto-Inoue)

首都大学東京・人間健康科学研究科・特任
助教

研究者番号：005009515