

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860021

研究課題名(和文) LC/MS/MSを用いたリゾリン脂質超高感度精密定量分析に関する研究

研究課題名(英文) Development of determination method for lysophospholipids by LC/MS/MS

研究代表者

三枝 大輔 (Saigusa, Daisuke)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：90545237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、LC/MS/MSを用いる超高感度リゾリン脂質検出系を構築し、レーザーマイクロダイセクション(LMD)によって切り出された微量組織切片によるリゾリン脂質解析を実施することである。

初めに、分析カラムの最適化、カラムスイッチング法の導入、流路の改善等のHPLC条件の最適化により、リゾリン脂質の検出限界を100倍程度向上させた。さらに、ヒートスタビライザーを用いたLMD処理中における組織中リゾリン脂質の分解を抑制する条件を最適化し、構築した定量法を用い、マウス組織切片(肝臓及び脾臓)数百から数千細胞におけるリゾリン脂質の検出に成功し、組織分布局在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the analytical protocol for demonstrating the intracellular distribution and gradation and localization of lysophospholipids (LPL) using a LC/MS/MS. First, we developed an ultra-high sensitive method for LPL by LC/MS/MS coupled with a column switching. Second, we have evaluated the LPL decomposition in mouse liver by a heat stabilizer. Finally, we detected and determined LPL from the frozen sections of tissue (10 μ m) of mice that was cut by laser micro dissection and determined LPL by LC/MS/MS.

研究分野：分析化学

キーワード：リゾリン脂質、スフィンゴ脂質、LC/MS/MS、レーザーマイクロダイセクション、ヒートスタビライザー、微量組織切片

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質は、リゾフォスファリジン酸やスフィンゴシンーリン酸 (S1P) に代表される化合物群であり、脂質メディエーターとして様々な生理機能が着目されている¹⁾。しかしながら、リゾリン脂質の生体組織局在性や濃度勾配は未解明であり、微量組織中のリゾリン脂質濃度を直接定量する手法の開発が望まれている。

リゾリン脂質の分析には、先行研究において質量分析計 (MS) を用いる定量手法が散見され、好適な分析手法であることが示唆されている²⁾。しかしながら、微量組織におけるリゾリン脂質含有量は、数 fmol (10^{-15}) 以下と想定され、既存の手法では検出感度の不足により測定することが困難であった。リゾリン脂質は、リン酸基等のイオン性官能基を有する一方で、疎水性の高い脂質構造に多くの分子種を有することから、液体クロマトグラフィー / 三連四重極型質量分析計 (LC/MS/MS) が分析に好適であると考えられている。我々は、現在までに LC/MS/MS を用いる精密定量分析法の開発を実施し、血液及び組織 (数 mg 程度) に含有されるリゾリン脂質濃度を明らかにしている³⁾。

< 引用文献 >

- 1) Nat. Chem. Biol. 6 (2010) 489, Biochim. Biophys. Acta 1781 (2008) 513
- 2) Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 2953, J. Chromatogr. B 883-884 (2012) 141
- 3) Anal. Bioanal. Chem. 403 (2012) 1897

2. 研究の目的

このような背景から、微量組織におけるリゾリン脂質の組織局在性や細胞毎の濃度勾配を精密に定量評価することが可能な、超高感度微量定量分析法の構築が求められている。我々は、これまでに構築した定量法を発展させ、LC/MS/MS を用いるリゾリン脂質超高感度精密定量分析法を開発し、生体組織の凍結切片からレーザーマイクロダイセクション (LMD) によって切り出された数千細胞に含有されるリゾリン脂質を定量することにより、*in vivo* におけるリゾリン脂質の分布局在を細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

初めに LC/MS/MS を用いたリゾリン脂質の超高感度精密定量分析系を構築した。超高感度化に向け、カラムスイッチング法の導入、分析カラムの内径、長さ及び粒子径を最適化した。リゾリン脂質測定に選択的なカラムは、資生堂の共同研究により作製した。

次いで、LMD 処理中におけるリゾリン脂質の分解を抑制することを目的とし、マウス肝臓組織を用い、ヒートスタビライザーによる分解抑制条件を最適化した。最後に、構築した定量法を用い、マウス組織切片 (肝臓及び脾臓) を定量マッピングすることにより、リゾリン脂質の分布局在を明らかにした。

4. 研究成果

(1) LC/MS/MS を用いたリゾリン脂質の超高感度精密定量分析系を構築

分析カラムの最適化、カラムスイッチング法

の導入、流路の改善等の HPLC 条件の最適化により、リゾリン脂質の検出限界を 100 倍程度向上させた。特に現在までの手法において安定して検出することが難しいとされていた、生体内リゾフォスファチジルセリン (LysoPS) の定量に成功した (図 1)。

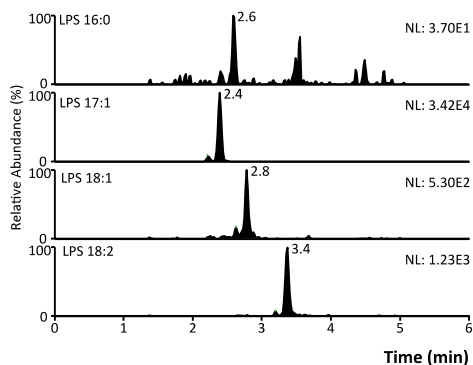


図1) LysoPS の超高感度検出 (10 pmol/L)

LysoPS 定量法は、分析法バリデーションを実施したところ、添加回収試験による日内及び日間変動係数の評価から、高い真度及び精度が得られた。さらに、S1P は、分析カラム内の金属イオンや固定相となる球状シリカの残存シラノール基との相互作用により、ピークテーリングが引き起こされ再現性の低下が懸念されていたが、金属処理をした分析カラムを作製することにより、ピークテーリングの大幅な改善に成功した。

(2) 生体組織から凍結切片の作成、LMD 条件の最適化

LMD は、室温にて処理を行うことから、生体試料に含有されるリゾリン脂質は LMD 処理中に分解することが懸念されていた。我々は、ヒートスタビライザーを用い、生体組織を短時間で高温加熱処理することで、リゾリン脂質の分解を抑制することに成功した。特に、S1P はヒートスタビライザー処理を施す

ことで脱リン酸化酵素を失活させ、室温 30 分程度まで分解を抑制することを明らかとした (図 2)。

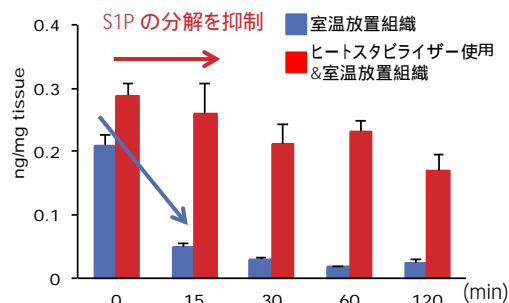


図2) ヒートスタビライザーによるS1P安定条件の検討

(3) マウス組織切片の定量マッピングによる分布局在の解明

マウス脾臓における S1P の濃度分布解明初めに、脾臓組織切片からの図 3 の様に微量組織を採取した。分析法の超高感度化により、リゾリン脂質の分布が比較的低いとされている脾臓において、600 細胞程度からの定量に成功した (図 4)。現在までに LMD による組織切片の定量に必要な細胞数は数百から数千細胞と考えられる。

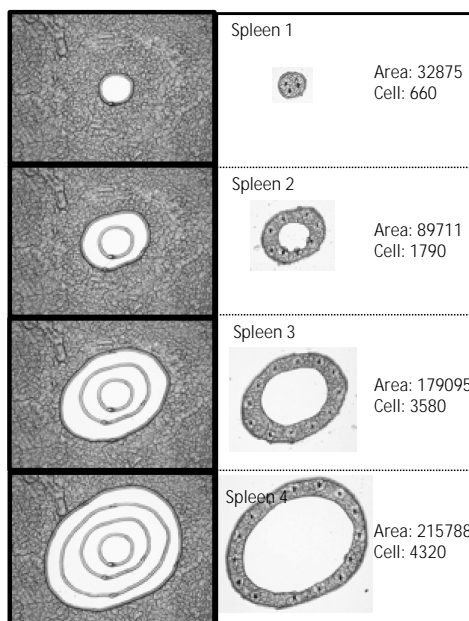


図3) 脾臓における微量組織切片の作成

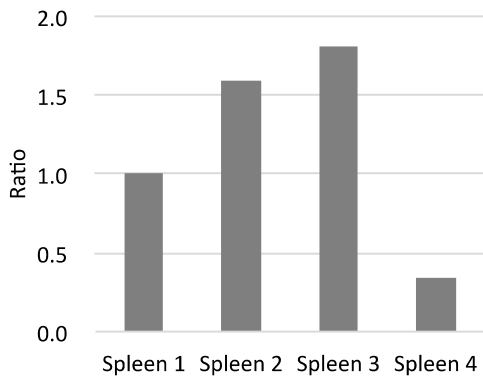


図4) 脾臓組織におけるS1Pの分布

マウス肝臓におけるスフィンゴ脂質の濃度分布解明

次に、LMD による微量組織切片を作成し、肝臓におけるスフィンゴ脂質の定量を実施した。測定対象はS1Pを含め、スフィンゴ脂質代謝系に存在する化合物群であることから、分析手法の最適化を実施し、スフィンゴ脂質の定量分析法の構築に成功した(図5)。次に、構築した測定系を用い、肝臓組織切片におけるスフィンゴ脂質の定量を実施し、組織分布を明らかにすることに成功した(表1)。

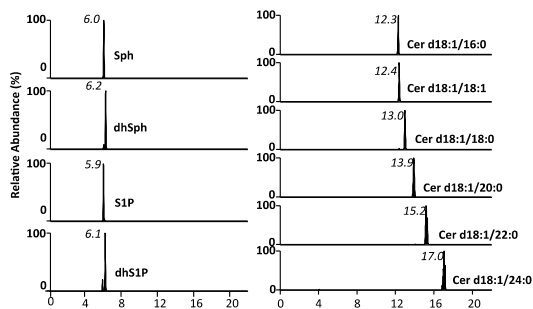


図5) 新たに構築したスフィンゴ脂質定量法

Liver section	pmol/mg		
	1	2	3
Sph	13.4±4.9	12.9±2.4	11.2±5.2
dhSph	87.0±11.7	82.7±7.1	73.7±10.9
S1P	0.92±0.61	0.14±0.09	0.57±0.32
Cer d18:1/16:0	15.8±6.3	11.1±4.4	11.6±3.2
Cer d18:1/18:1	4.89±2.41	5.34±3.04	3.83±1.17
Cer d18:1/18:0	7.72±1.84	6.74±1.34	5.81±1.24
Cer d18:1/20:0	1.67±0.80	1.30±0.24	1.09±0.47
Cer d18:1/22:0	15.9±7.7	9.91±5.90	11.4±3.3
Cer d18:1/24:0	42.0±20.8	27.6±16.1	33.9±11.6



表1) 肝臓組織切片に含まれるスフィンゴ脂質の定量分布の解明

以上の成果から、本研究により開発したLC/MS/MSを用いるリゾリン脂質超高感度定量法及びLMD組織切片定量プロトコル(図6)は、今後のリゾリン脂質解析に大きく貢献すると考えられる。



図6) LC/MS/MSによる組織切片中リゾリン脂質定量プロトコル

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

Saigusa D, Okudaira M, Wang J, Kano K, Kurano M, Uranbileg B, Ikeda H, Yatomi Y, Motohashi H, and Aoki J. Simultaneous quantification of sphingolipids in small quantities of liver by LC-MS/MS. *Mass Spectrometry*, 3, S0046 (2014) (査読有り)

DOI: 10.5702/massspectrometry.S0046

Okudaira M, Inoue A, Shuto A, Nakanaga K, Kano K, Makide K, Saigusa D, Tomioka Y and Aoki J. Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. *Journal of lipid research* 55, 2178-2192 (2014) Epub 2014 Aug 11. (査読有り)

DOI: 10.1194/jlr.D048439

Nakanaga K, Hama K, Kano K, Sato T, Yukiura H, Inoue A, Saigusa D, Tokuyama H, Tomioka Y, Nishina H, Kawahara A, and Aoki J. Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. *Journal of biochemistry* 155, 235-241 (2014) Epub 2014 Jan 21. (査読有り)

DOI: 10.1093/jb/mvt114

Atsushi Nakamura, Risa Ebina-Shibuya, Ari Itoh-Nakadai, Akihiko Muto, Hiroki Shima, Daisuke Saigusa, Junken Aoki, Masahito Ebina, Toshihiro Nukiwa, and Kazuhiko

Igarashi*, Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function, *Journal of Experimental Medicine*, 210 (11), 2191-2204, 2013 (査読有り)

DOI: 10.1084/jem.20130028

[学会発表] (計2件)

Simultaneous quantification of sphingolipids in small quantities of tissue by LC-MS/MS. Daisuke Saigusa, Michiyo Okudaira, Jiao Wang, Kuniyuki Kano, Makoto Kurano, Baasanjav Uranbileg, Hitoshi Ikeda, Yutaka Yatomi, Hozumi Motohashi, and Junken Aoki, PLM2015, 10th – 12th, Feb, 2015 (Oral), Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan

LC-MS/MS による生体試料を用いた超高度感度標的リピドミクス解析手法の構築. 三枝大輔・奥平倫世・井上飛鳥・青木淳賢・五十嵐和彦. 第62回質量分析総合討論会, ホテル阪急エキスポパーク 大阪, 2014年5月14-16日 (口頭/ポスター発表)

[図書] (計1件)

三枝大輔 他、メディカルドゥ、最新生理活性脂質研究-実験手法, 基礎知識とその応用-, 2013、pp55-62

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 大輔(SAIGUSA, Daisuke)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号: 90545237