

平成30年6月8日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06637

研究課題名(和文) LC-MS/MSによる変性・修飾脂質の異性体解析法の構築と機能性の解明

研究課題名(英文) Development of LC-MS/MS methods to analyze lipid molecules that possess unique structures for the elucidation their functions

研究代表者

伊藤 隼哉 (ITO, Junya)

山形大学・農学部・研究支援者

研究者番号：50781647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、これまでに過酸化脂質の分析に有効であった、アルカリ金属イオンを用いたLC-MS/MS分析法を特異な構造を有する他の過酸化脂質・脂質分子種(SQOOH、糖化脂質、プラスマローゲン)に応用し、分析法を構築した。これらの解析手法は、これまでに解析が困難であり、食品や生体における機能や活性に不明な点が多くある「特異な構造を有する脂質分子」のさらなる機能解明に大きく寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed "lipid molecules that possess unique structures" (i.e., squalene hydroperoxide, glycated lipids and plasmalogen) by LC-MS/MS analysis in the presence of alkali metal ions, since such methods were previously proved to be effective for the analysis of lipid hydroperoxides (e.g., fatty acid hydroperoxide). Since the analysis of these "lipid molecules that possess unique structures" were previously difficult to perform, the developed analytical methods are expected to greatly contribute to the elucidation of further functions and activities of such lipids in foods as well as in animals and humans.

研究分野：食品科学

キーワード：食品科学 過酸化脂質 糖化脂質 質量分析

1. 研究開始当初の背景

従来、過酸化脂質は食品劣化や生体老化・疾患に大きく関係すると考えられてきたが、実際の食品中や生体における過酸化脂質の生成機構については未だ不明な点が多い。この問題を解決するにあたり、過酸化脂質の分子種を精密に評価することが極めて重要かつ有効と考えられた。脂質は *in vitro* で、酵素酸化、自動酸化、一重項酸素酸化のいずれかの酸化機構によって過酸化脂質となる。そして、酸化メカニズムの違いにより、それぞれ特徴的な過酸化脂質異性体を生じる (図1)。この現象に基づき、異性体解析を通して、食品や生体内に存在する過酸化脂質分子種を詳細に解析・評価できると考え、質量分析装置 (MS, MS/MS) を用いた過酸化脂質の精密かつ詳細な異性体解析法を構築した。

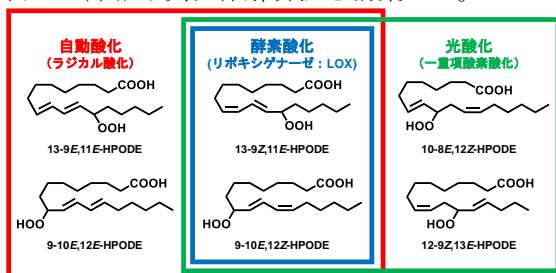


図1 酸化機構の違いにより特徴的な過酸化脂質分子種が生じる

申請者は、これらの研究に取り組む中で、LC-MS/MS 分析時にアルカリ金属イオン (例: ナトリウムイオン) を用いることで、過酸化脂質分子 (脂肪酸ヒドロペルオキシド) のフラグメンテーションが生じやすくなり、化合物の構造解析・同定が非常に容易になることを見出した (図2)。過酸化脂質の分析は一般的に非常に困難であるが、申請者の研究グループは世界の過酸化脂質研究をリードしており、特に本手法は、過酸化脂質の異性体解析を飛躍的に向上させた分析手法として国際的にも非常に高い評価を受けている。

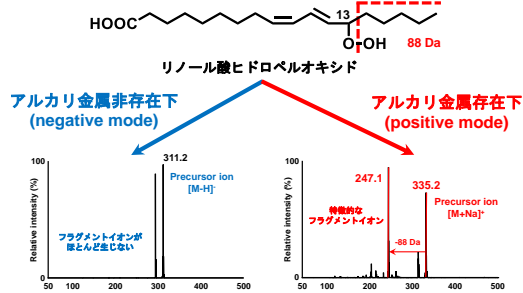


図2 アルカリ金属イオンを使用することで過酸化脂質の高感度・高選択的解析を可能にした

2. 研究の目的

上述のように申請者は、過酸化脂質の異性体解析に取り組み、従来困難と考えられてきた過酸化脂質の詳細な異性体解析を達成した。他方、上述の脂肪酸ヒドロペルオキシド以外の過酸化脂質分子種 (例: スクアレンヒドロペルオキシド (SQOOH)) や過酸化脂質以

外にも特異な構造を有する脂質分子 (例: 糖化脂質やプラズマローゲン) は多様であり (図3)、食品や生体において重要な役割を担うことが予想されるにも関わらず、その化学特性 (反応性、安定性) や存在比等の関係で、詳細に解析することが困難な分子種が数多く存在する。このような種々の脂質分子の解析が達成できれば、未知の脂質機能の解明に真に寄与すると考えられる。その中で申請者は、これまでに構築してきた研究成果が、解析が困難と考えられてきた特異な構造を有する脂質分子の詳細な解析にも応用展開できると考えた。そこで本研究では、これまでに構築してきた脂肪酸ヒドロペルオキシドの新規分析方法を、従来、解析が困難であった種々の過酸化脂質・脂質分子 (SQOOH、糖化脂質、プラズマローゲン) に応用展開しその有用性を検討した。ここでは特に、スクアレンヒドロペルオキシド異性体の解析法、についてその成果を報告する。

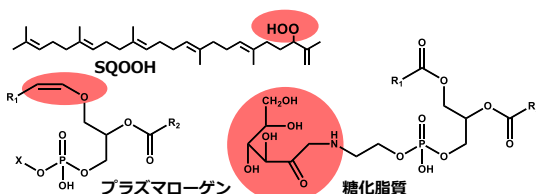


図3 特異な構造を有する過酸化脂質、脂質分子の分析法を検討した

3. 研究の方法

分析法の構築に向けて、標準品の調製を試みた。原料となるスクアレン (SQ) を光酸化させ、HPLC-UV により種々SQOOH 異性体を単離し (図4)、その後精製した。得られた各異性体の標品を用いてアルカリ金属イオンを用いた MS/MS、LC-MS/MS 分析法を検討した。さらに、SQOOH の酸化機構と生成する異性体パターンを *in vitro* で検討した。また、SQ は皮膚に存在する皮脂の主要脂質の一つであることから、太陽光の暴露などにより SQOOH がヒト皮脂中に生じることが知られている。そこで、上記で検討した分析法を用いてヒト皮脂中の SQOOH を解析した。

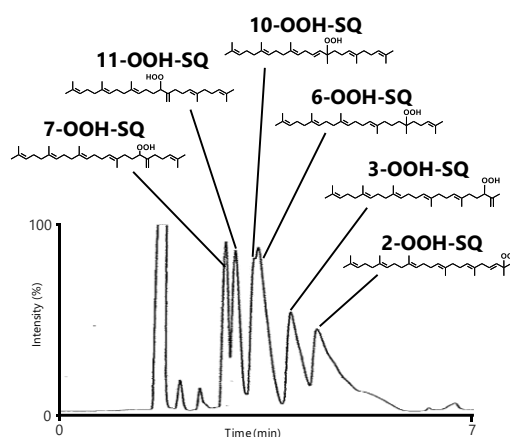


図4 6種のSQOOH異性体の標品をHPLC-UVで調製した

4. 研究成果

6種のSQOOH異性体の標品をHPLCで単離した。各SQOOH異性体標品のMS/MS分析を行い、SQOOHのナトリウム付加体から各異性体に特異的なフラグメントイオンを生じることを見出した(図5)。新たに見出したこれらのフラグメントイオンをもとにLC-MS/MS分析の条件を検討し、SQOOH異性体の高感度・高選択的な分析を可能にした(図6)。

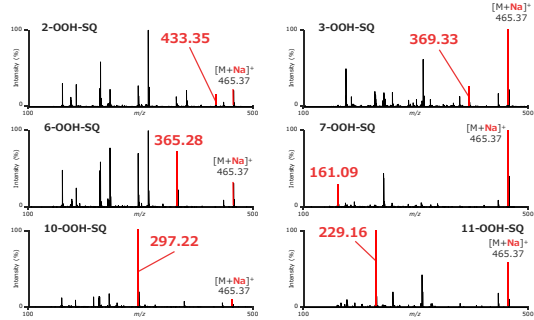


図5 ナトリウム付加体から特徴的なフラグメントイオンを同定した

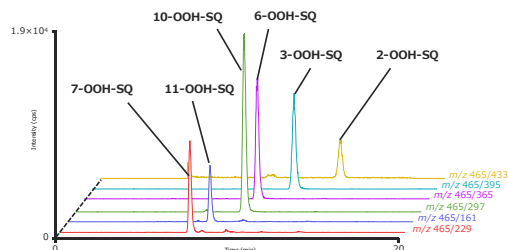


図6 SQOOHのLC-MS/MS分析法を構築した

続いて、未酸化のSQに対して一重項酸素酸化、ラジカル酸化、および光を照射したサンプルを調製し、本法にて分析を行った結果、酸化機構ごとの異性体生成パターンが異なることが明らかとなった(図7)。さらに本法を応用してヒト皮脂の分析を行うと、ヒト皮脂中のSQOOH異性体の存在比は未酸化SQを一重項酸素酸化したものと同様のパターンを示した。以上よりヒト皮脂中のSQは主に光増感剤を介した一重項酸素酸化によって酸化されていることが示唆された。今後は、本手法を活用することで、皮膚に関する疾患と酸化障害の関係がより詳細に明らかになることが期待される。

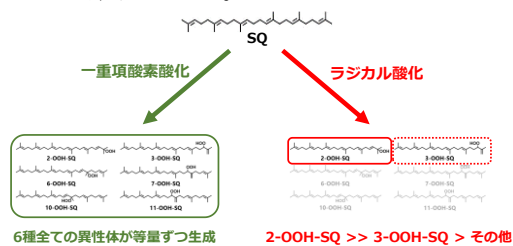


図7 酸化機構によりSQOOH異性体の生成パターンが異なる

以上より、本研究課題では、これまでに脂肪酸ヒドロペルオキシドをはじめとした過酸化脂質の分析に有効であった、アルカリ金属イオンを用いたLC-MS/MS分析法を特異な構造を有する他の過酸化脂質・脂質分子種(SQOOH糖化脂質やプラズマローゲン)に応用し、分析法を構築することを目的とした。その結果、SQOOHの解析にも非常に有効であることを明らかにするとともに、本法を用いて生体サンプルの解析を実施し、これらの分析手法が生体老化に関与する脂質過酸化の評価に有効であることを実証した。加えて、糖化脂質やプラズマローゲンの解析にも有用であることを見出した。これらの解析手法は、従来解析が困難であり、食品や生体における機能や活性に不明な点が多くある「特異な構造を有する脂質分子」のさらなる機能解明に大きく寄与すると期待される。

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4件)

- 1) Shimizu, N., Ito, J., Kato, S., Otoki, Y., Goto, M., Eitsuka, T., Miyazawa, T., Nakagawa, K. Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers. Scientific Reports, accepted for publication (2018) (査読有り)
- 2) Kodate, A., Otoki, Y., Shimizu, N., Ito, J., Kato, S., Umetsu, N., Miyazawa, T., Nakagawa, K. Development of quantitation method for glycated aminophospholipids at the molecular species level in powdered milk and powdered buttermilk. Scientific Reports, accepted for publication (2018) (査読有り)
- 3) Ito, J., Shimizu, N., Kobayashi, E., Hanzawa, Y., Otoki, Y., Kato, Shunji., Hirokawa, T., Kuwahara, S., Miyazawa, T., Nakagawa, K. A novel chiral stationary phase LC-MS/MS method to evaluate oxidation mechanisms of edible oils. Scientific Reports, 7, 10026. (2018) (査読有り)
Doi: 10.1038/s41598-017-10536-2
- 4) Shimizu, N., Bersabe, H., Ito, J., Kato, S., Towada, R., Eitsuka, T., Kuwahara, S., Miyazawa, T., Nakagawa, K. Mass spectrometric discrimination of squalene monohydroperoxide isomers. J. Oleo Sci. 66, 227-234. (2018) (査読有り)

〔学会発表〕(計13件)

- 1) 清水 直紀, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. ヒト皮脂中のスクアレン酸化機構の解析および抗酸化物質によるスクアレン酸化抑制効果の評価. 日本農芸化学会 2018年度(平成30年度)大会(2018)
- 2) 丹野 玲菜, 加藤 俊治, 清水 直紀, 伊藤 隼哉, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. トコフェロール酸化物の検出と抗酸化機序の評価: 食用油脂への応用. 第29回ビタミンE研究会(2018)
- 3) 伊藤 隼哉, 塩見 大樹, 加藤 俊治, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. リノール酸過酸化物を指標とした食品の酸化機構の評価. 第51回日本栄養・食糧学会東北支部大会(50周年記念)および市民公開講座(2017)
- 4) Junya Ito, Shunji Kato, Teruo Miyazawa, Kiyotaka Nakagawa. Development of analysis method for linoleic acid hydroperoxides using chiral stationary phase LC-MS/MS: Evaluation of lipid oxidation mechanisms. The Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2017, "Stage-2, New Horizons in Food Science via Agricultural Immunology" (2017)
- 5) Naoki Shimizu, Junya Ito, Shunji Kato, Takahiro Eitsuka, Teruo Miyazawa, Kiyotaka Nakagawa. LC-MS/MS analysis of squalene hydroperoxide isomers in human skin surface lipids. The Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2017, "Stage-2, New Horizons in Food Science via Agricultural Immunology" (2017)
- 6) 清水 直紀, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. LC-MS/MS を用いたヒト皮脂中のスクアレン酸化機構の解析. 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第25回年会(2017)
- 7) 清水 直紀, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. 過酸化脂質の異性体解析を通じた皮脂の酸化機構の解明. 第59回日本脂質生化学会(2017)
- 8) 小室 麻里菜, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. HPLC-MS/MS を用いたリノール酸エステルヒドロペルオキシド異性体の分析法の構築. 第71

回日本栄養・食糧学会大会(2017)

- 9) 清水 直紀, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. ヒト皮脂中のスクアレンヒドロペルオキシド異性体の分析. 第71回日本栄養・食糧学会大会(2017)
- 10) 伊藤 隼哉, 小舘 愛, 乙木 百合香, 加藤 俊治, 池田 郁男, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. 質量分析を用いた粉乳に含まれる脂質糖化産物の分析法の構築. 日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会(2017)
- 11) 上吉原 怜奈, 乙木 百合香, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 山下 慎司, 池田 郁男, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. エタノールアミン型プラズマローゲンの吸収評価: とくにコリン型への変換について. 日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会(2017)
- 12) 伊藤 隼哉. リノール酸ヒドロペルオキシドの異性体解析による食品の脂質過酸化機構の評価. 平成28年度第3回油化学セミナー(招待講演)(2017)
- 13) 清水 直紀, Hannah Bersabe, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 十和田 諒, 桑原 重文, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. スクアレンヒドロペルオキシド異性体の高選択的な分析法の構築. 第50回日本栄養食糧学会東北支部大会(2016)

〔図書〕(計0件)

特になし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

特になし

○取得状況(計0件)

特になし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/kinoubunshi/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隼哉 (ITO Junya)

山形大学・農学部・研究支援者

研究者番号: 50781647

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし

(4)研究協力者

特になし