

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07047

研究課題名(和文) 生体内脂質ラジカルの構造解析手法の開発とその応用

研究課題名(英文) Structural analysis method for lipid-derived radicals and its application

研究代表者

松岡 悠太 (Matsuoka, Yuta)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：20783509

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)：脂質過酸化反応はラジカル反応により進行し、その過程により「脂質ラジカル」を生じる。これら分子種は連鎖的かつ爆発的にその酸化障害を拡大させる。したがって、疾患発症時に生成する脂質ラジカルの構造解析は、疾患メカニズムの詳細な究明や予防法の提案への貢献が期待される。そこで我々は、ニトロキシドの脂質ラジカルへの結合能を応用し、脂質ラジカルの構造解析手法の構築を目指した。開発した手法を応用することで、4種の不飽和脂肪酸より生成する合計80種もの脂質ラジカルの同定に成功した。さらに本手法は、実験動物を用いた系にも応用可能であり、11種もの生体内脂質由来ラジカル種の検出にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Lipid peroxidation is the critical process for many pathological events, and it's drastically initiated and propagated by lipid-derived radicals. Therefore, the identification of lipid radicals would contribute to elucidation of pathological mechanisms of several oxidative diseases. We herein describe the structural identification method for lipid radicals. By using this system, we successfully identified a total of 80 radical species in 4 polyunsaturated fatty acids peroxidation. This analytical system was applicable to the animal experiments, and a total of 11 radical species was structurally identified, and in our knowledge, this is the first identification system for endogenous lipid radicals.

研究分野：分析科学

キーワード：脂質 質量分析

1. 研究開始当初の背景

脂質分子は、生体内の重要な構成要素であり、エネルギー産出やシグナル伝達など様々な生理学的機能を有する。しかしながら、脂質分子は活性酸素種により容易に酸化され、過酸化脂質を生じ、その後、変異原性アルデヒド体へと分解される。近年、これらのアルデヒド体とタンパク質との複合体が血管新生や加齢性黄斑変性の発症といった新たな機能を有することが明らかとなった。ここで、脂質過酸化反応はいずれもラジカル反応により進行し、その過程により「脂質ラジカル」を生じる。これら分子種は連鎖的かつ爆発的にその酸化障害を拡大させる。つまり、脂質ラジカルは、言わば疾患における最もアクティブな分子であるとともに、シグナル伝達での最上流に位置する。したがって、疾患発症時に生成する脂質ラジカルを検出・構造解析することが出来れば、疾患メカニズムの詳細な究明やその早期発見、予防法の提案に貢献すると考えた。しかしながら、従来のラジカル評価法は、一次因子である活性酸素種や最終生成物のアルデヒド体などを指標としており、疾患発症時に中心的役割を担う脂質ラジカルを選択的に検出する手法は全く存在しない。

一方で我々は、有機スピン化合物であるニトロキシドの新規合成法を確立し、脂質ラジカル種に対して高い反応性を有した脂質親和性ニトロキシド誘導体を合成した。これに加え、有機スピン化合物特有の蛍光抑制作用を応用し、最近、脂質ラジカルと鋭敏に反応することで蛍光発光を示す、全く新たな蛍光検出プローブの開発に成功した。本蛍光プローブは培養細胞・生体組織切片を用いた評価系にも十分応用可能であり、疾患モデル動物において発生した脂質ラジカルの検出にも成功している。我々の開発した脂質ラジカル蛍光プローブは、脂質ラジカルとのラジカル

-ラジカル反応により、安定な共有結合を形成し、蛍光発光を示す。すなわち、脂質ラジカルを検出すると同時に、不安定なラジカル種を安定な蛍光標識体へと変換することができる。そこで、これら蛍光標識した脂質酸化物を含む生体試料を採取し、結合した蛍光団をマーカーとしLC-FL (蛍光検出)による分離・付加体の選定、ならびにMS (質量分析)を行うことで、生体内脂質ラジカルの構造解析が可能となる。つまり、疾患発症時において生成した生体内脂質ラジカルを蛍光検出し、反応生成物を後の構造解析技術により特定することで、疾患発症メカニズムを時間的、さらに分子レベルで明確化することが出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

以上の研究背景より、本研究では「疾患発症時に生成する生体内脂質ラジカルの蛍光検出ならびに、構造解析手法の構築」を大目標とする。さらに、同定された生体内脂質ラジカルの化学構造を元に、生体内における脂質過酸化連鎖反応の詳細な伝搬経路についても議論する。

3. 研究の方法

これまでに申請者らが開発した脂質ラジカル蛍光検出プローブを用い、酵素的・非酵素的ラジカル反応開始剤を用い、試験管レベルで不飽和脂肪酸より発生させた脂質ラジカルを反応させ、蛍光・質量分析器により、各測定時における検出感度を評価した。さらに、開発した脂質ラジカル構造解析法を用いて、各脂質ラジカル-プローブ付加体のクロマトグラムパターンをリストアップし、より包括的かつ簡便に多様な脂質ラジカルを一斉解析可能なシステムを構築した。確立した解析技術を用いて、病態モデル動物において

生じる各脂質ラジカルの量的変動を追跡した。

4. 研究成果

(1) 蛍光ニトロキシドプローブによる脂質由来ラジカル種の蛍光検出と構造解析

これまでに開発した蛍光ニトロキシドプローブを用い、試験管内にて発生させたラジカル種の解析を行った。添加した酸化刺激濃度依存的に蛍光プローブの蛍光強度上昇が観測された。さらに反応後生成物を脂質抽出し、LC-FL-MS システムにより解析したところ、計 4 種の不飽和脂肪酸より、合計 80 種ものラジカル付加体の解析に成功し、そのうち 62 種が新規ラジカル種に由来するものであった。以上の結果より、蛍光ニトロキシドプローブと LC-MS 装置に蛍光分析器を統合させた LC-FL-MS 装置を応用することにより、脂質ラジカルの高感度且つ選択的な蛍光検出ならびに構造解析が可能となった。

(2) 培養細胞・疾患モデル動物における脂質ラジカルの蛍光検出・構造解析

(1)にて開発したラジカル解析システムを、培養細胞を用いた評価系へと応用した。培養細胞に不飽和脂肪酸を添加し、それら由来のラジカル種を生成させ、本蛍光プローブによる解析を試みたところ、種々のラジカル付加体の解析に成功し、これらはその蛍光強度からラジカル発生量の定量も可能であった。また、本実験では従来法に比べ、遥かに低濃度のプローブ量にてその解析が可能であったことから、高い生体適合性が示唆された。

そこで続いて、本手法を、疾患モデル動物を用いた評価系へと応用させた。ニトロソアミンは肝臓において代謝活性化を受けることにより、脂質過酸化反応を惹起し、後に種々の肝疾患を誘発する。そこで、これら疾患発症初期課程において、生成するラジカル種の解析を進めた。その結果、11 種もの脂質

由来ラジカル種の検出に成功し、これらもまた、蛍光強度よりその発生量が定量可能であった。これらは内因性の脂質ラジカルを同定した初めての研究成果である。

以上の結果より、本研究では実験動物にも応用可能な全く新たな脂質ラジカル解析法を構築することに成功した。今後更に本手法に改良を重ね、その高感度を図るとともに、検出されたラジカル種が疾患にどのように関与しているかを明らかとしていく予定である。

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) Shinto S, Matsuoka Y, Yamato M, Yamada KI. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 62, 132-138, 2018

DOI; 10.3164/jcbrn.17-60

(2) Ishida Y, Okamoto Y, Matsuoka Y, Tada A, Janprasit J, Yamato M, Morales NP, Yamada KI. *Free Radical Biol. Med.* 113, 487-493, 2017

DOI; 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.388

(3) Enoki M, Shinto S, Matsuoka Y, Otsuka A, Kaidzu S, Tanito M, Shibata T, Uchida K, Ohira A, Yamato M, Yamada KI. *Chem. Commun.* 53, 10922-10925, 2017

DOI; 10.1039/c7cc03387g

(4) Emoto MC, Matsuoka Y, Yamada KI, Sato-Akaba H, Fujii HG. Non-invasive imaging of the levels and effects of glutathione on the redox status of mouse brain using electron paramagnetic resonance imaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485(4):802-806

DOI; 10.1016/j.bbrc.2017.02.134

〔学会発表〕(計13件)

- (1) 阿部雅史、**松岡悠太**、山田健一、「脂質断片化物の一斉分析法の開発とデータベース構築」、日本薬学会第138年会、2018年3月25-28日、石川
- (2) 石田南人、進藤早紀、**松岡悠太**、山田健一、「萎縮型加齢黄斑変性症モデル動物への漢方薬の応用」、日本薬学会第138年会、2018年3月25-28日、石川
- (3) 齋藤耕太、**松岡悠太**、山田健一、「脂肪酸酸化酵素を用いた脂質過酸化反応機序の解明」、日本薬学会第138年会、2018年3月25-28日、石川
- (4) **松岡悠太**、「有機スピン化合物の物理化学的性質を応用した蛍光検出試薬の開発」、サントリー生有研シンポジウム2017、2017年11月28日(京都)
- (5) 三倉唯、**松岡悠太**、山田健一、「Click Chemistryを応用した脂質ラジカル標識化剤の開発」、第34回日本薬学会九州支部大会、2017年11月25-26日、熊本
- (6) 多田有佐、**松岡悠太**、山田健一、「四塩化炭素誘発肝障害における脂質過酸化反応の役割」、第34回日本薬学会九州支部大会、2017年11月25-26日、熊本
- (7) **松岡悠太**、和泉自泰、高橋政友、馬場健史、山田健一、「脂質由来ラジカルの選択的蛍光標識化法と構造解析・定量分析への応用」、第29回ケミカルバイオロジー学会、2017年6月7-9日、北海道
- (8) 三倉唯、**松岡悠太**、山田健一、「レドックス応答型プローブ・HPLC蛍光検出系を用いた細胞内レドックスバランスの評価法の開発」、日本薬学会第137年会、2017年3月24-27日、仙台
- (9) 生津慎、**松岡悠太**、和泉自泰、高橋政友、馬場健史、山田健一、「脂質由来フラグメントラジカルを標的とした脂質ラジカル構造推定手法の開発」、第33回日本薬学会九州支部大会、2016年12月3-4日、鹿児島

(10) **Yuta Matsuoka**, Kei Ohkubo, Shunichi Fukuzumi, Yamada Ken-ichi, Long wavelength fluorescent probe for a highly sensitive quick detection of ascorbic acid, SFRBM's 2016 Annual Meeting, 16-20 November 2016, San Francisco, United States.

(11) Ayano Fujiki, Satsuki Ide, Arisa Tada, **Yuta Matsuoka**, Yamada Ken-ichi, Lipid radicals promote the pathogenesis of nitrosamine induced hepatocellular carcinoma, SFRBM's 2016 Annual Meeting, 16-20 November 2016, San Francisco, United States.

(12) 生津慎、**松岡悠太**、和泉自泰、高橋政友、馬場健史、山田健一、「HPLC-蛍光・質量分析システムによる脂質由来ラジカルの構造解析」、第29回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2016年9月2-3日、京都

(13) **松岡悠太**、大久保敬、福住俊一、山田健一、「アスコルビン酸の迅速かつ高選択的な検出に向けた長波長蛍光ニトロキシド化合物の開発」、第29回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2016年9月2-3日、京都、**星野賞研究奨励賞受賞**

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://bukka-kyushu.wixsite.com/pcls>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 悠太 (Matsuoka, Yuta)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20783509

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者