

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14884

研究課題名（和文）脂質アルデヒドの体系的プロファイリングシステムの構築およびその応用

研究課題名（英文）Development of comprehensive analytical system for lipid derived aldehydes

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂質過酸化反応は、様々な酸化ストレス性疾患への関与が認知されつつある。その一方、最終産物であり、疾患発症を助長する脂質アルデヒドの構造情報については未だ不明瞭な点が多い。その要因としては、脂質アルデヒドが複雑かつ多彩な反応機構を經由して生成する点や、適切な測定技術が不足している点が挙げられる。そこで本研究では、我々が近年開発した脂質ラジカル構造解析技術を発展させることで、新規化学種を含む計140種の脂質アルデヒドの構造推定に成功した。さらにこれら構造情報を活用することで、酸化LDL中にて生成する脂質アルデヒドの体系的解析を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患発症時における脂質アルデヒドの重要性はかねてより、多くの研究者の間で議論されてきた。しかしながら、その構造情報が不足していたため、具体的にどのようなアルデヒド種が増減しているかは不明であった。一方、我々が新たに提唱した脂質アルデヒド解析手法は、反応系中において生成する様々な脂質アルデヒドを体系的に評価することができる。このため、本手法を今後さらに応用することで、「脂質の酸化反応」に焦点を当てた新たなバイオマーカー探索および疾患メカニズム解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：Lipid derived aldehydes have been recognized as significant bioactive substances in the pathogenesis of several oxidative diseases. However, due to the complexities of lipid peroxidation mechanisms, the number of identified lipid aldehydes remains low. Here, we performed the comprehensive identification of lipid aldehydes by applying the analytical system for lipid radicals, and constructed a database of a total of 140 lipid aldehydes. Using this technique, we achieved the comprehensive analysis of lipid aldehydes produced in oxidized low density lipoprotein.

研究分野：脂質過酸化反応

キーワード：フリーラジカル 酸化ストレス疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

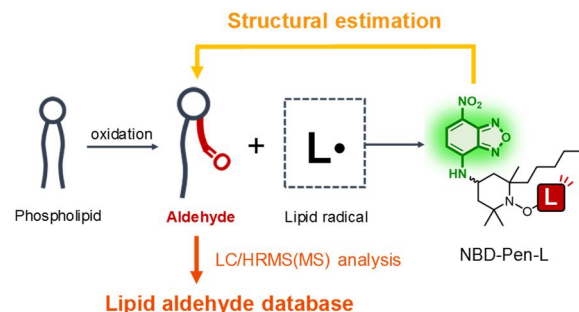
生体内には実に数千種類もの脂質分子が存在し、生体膜の構成やエネルギー産出、シグナル伝達など数多くの生理学的機能を果たしている。一方、脂質分子の多くは分子内に極めて酸化されやすい多価不飽和脂肪酸構造を有しており、これにより活性酸素種による酸化反応を容易に受ける。その結果、膨大な数の「脂質アルデヒド」が生成する。近年、これらがタンパク質の求核性アミノ酸残基に結合し、複合体を形成することで、血管新生や加齢性黄斑変性など様々な疾患の発症に密接に関与することが報告された[1, 2]。その一方で、これまでに生化学的評価の対象とされている脂質アルデヒドは、malondialdehyde (MDA)や4-hydroxynonenal (4-HNE)など数種類に限定されており、実際に疾患の原因物質もしくはバイオマーカーとなり得る脂質アルデヒドの体系的な解析が為された例はほとんどない。

脂質アルデヒドは、脂質の多様性に加え、複雑かつ多彩な酸化分解反応にて生成することから、生成物の推測が困難である。さらに、微量成分であり、適切かつ汎用的な測定技術が不足していることから、その同定が十分に行われていない。このように、脂質アルデヒドは疾患発症時における重要性とは裏腹に、その構造情報や適切な解析技術の不足により、疾患との詳細な関連性については不明瞭な点が多い。

一方、我々は近年、様々な脂質アルデヒドの高反応性前駆物質である「脂質ラジカル」に対する蛍光検出プローブ 4-(4-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-7-ylamino)-6-pentyl-2,2,6-trimethylpiperidine-1-oxyl (NBD-Pen)の開発に成功した[3]。本蛍光プローブは、脂質ラジカルと安定な共有結合を形成することで蛍光発光を示す。そのため、反応後生成物を抽出し、質量分析を行うことでこれらラジカル種の構造を推定できる。そこで我々は、付加体の蛍光ピークを「目印」とした脂質ラジカル種の簡便かつ選択的な構造解析法を新たに構築し、百種類を超える脂質ラジカル種を構造解析に成功した[4]。すると興味深いことに、観測されたラジカル種の中には、分子内ラジカル反応によって脂肪酸部位が断片化した際、脂質アルデヒドと同時に生成する「断片化ラジカル」が数多く検出された。そこで、これら脂質ラジカル種の構造情報をもとに、その対をなすアルデヒドの構造推定ならびにリスト化、解析が可能となるのではないかと考えた。さらにこうして、集約した脂質アルデヒド構造情報をデータベース化することができれば、これまでに例を見ない脂質アルデヒドの体系的プロファイリングシステムの構築が実現できると考えた (図-1)。

### 2. 研究の目的

よって、本研究ではこれまでに我々が構築した脂質ラジカル構造解析法を、さらに応用した「脂質アルデヒドの体系的プロファイリングシステムの構築およびその応用」を目的とした。



### 3. 研究の方法

脂肪酸アシル部位に様々な多価不飽和脂肪酸を有する Phosphatidylcholine (PC) に対して、ラジカル反応開始剤である 2,2'-azobis(2-methylpropanimidine)

図-1: 脂質ラジカル構造情報を基としたリン脂質アルデヒドの構造解析法。PC をラジカル発生剤である AAPH にて酸化し、その後ラジカル捕捉プローブである NBD-Pen を用いて解析。得られたラジカル情報より逆断面アルデヒド構造を推測する。

(AAPH) を添加し、脂質過酸化反応を惹起させた。この際、生じる脂質ラジカル種を蛍光プローブ

にて捕捉し、high performance liquid chromatography-fluorometry and high resolution tandem mass spectrometry (LC/FL/HRMS/MS)にて解析した。得られた脂質ラジカル構造情報をもとに、同時に生成する脂質アルデヒド構造を推測・解析した。こうして検出された脂質アルデヒドの構造情報をデータベース化した。さらに、構築したデータベースを用いることで低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein: LDL)中にて生じる多種多様な脂質アルデヒドの包括的解析へと応用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PC 酸化時に生じる脂質ラジカル種および脂質アルデヒドの解析

不飽和脂肪酸としてリノール酸 (LA)、アラキドン酸 (AA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)を有する3種のPCを用い、AAPH添加時に生じたPC由来ラジカル種をNBD-Penにより捕捉し解析した。AAPH添加により、プローブ-脂質ラジカル付加体由来する蛍光ピークが数多く観測された。そこで、これら蛍光ピークが観測されたカラム保持時間における質量分析結果を解析し、その化学構造の推定を行った。その結果、計35種類のPC由来ラジカル構造の推定に成功した。さらに、これらの化学構造より、同時に生成する脂質アルデヒドの構造情報を推測した。

##### (2) 脂質アルデヒドの構造解析およびデータベースの構築

脂質ラジカル構造情報より、生成が推測された脂質アルデヒドをLC/HRMS/MSにて解析した。まず、各脂質アルデヒドに相当する質量電荷比のHRMSピークを分析し、AAPH添加時において強度が上昇したピークに対してHRMS/MSを用いた詳細な構造解析を実施した。PCは、グリセロール骨格に2つの疎水性尾部(脂肪酸アシル基)と1つの極性頭部(ホスホコリン基)を有することから、それぞれを定義するプロダクトイオンを観測することで分子の構造推定を実施した。その結果、3種のPCより計96種類のPCアルデヒドの検出に成功した。このうち、78種の化学種についてはこれまでに報告例のない新規の脂質アルデヒドであった。これらの構造情報をもとに脂質アルデヒドデータベースを構築した。

##### (3) LDL 中脂質アルデヒドの包括的解析および疾患モデル動物への応用

LDLは、種々の循環器疾患のリスクファクターとして注目されてきた。近年では、特に酸化されたLDL(酸化LDL)が、動脈硬化症の発症をより強く誘発することが報告され[5]、新たなバイオマーカーの候補分子としても期待されている。そこで、これまでにデータベース化したアルデヒドが酸化LDL中において生成し得るか検証した。酸化LDLはLDLにAAPHを添加することで作成した。すると、本研究にて我々が新たに構造推定したアルデヒドのうち、41種の脂質アルデヒドにおいて生成量の上昇が観測された。また、特にLDL中に豊富に含まれる1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PLPC)由来の脂質アルデヒドが最も多く生成することが明らかとなった。一方、LDLの粒子内部には、中性脂肪の一種であるコレステリルエステルが豊富に存在する。また、コレステリルエステルは、リン脂質同様に脂肪酸アシル部位を有することから、同様の断片化機構にてアルデヒドが生成することが推測された。そこで、これまでに構造推定した脂質アルデヒド情報をもとに解析を進めたところ、計44種のコレステリルエステル由来アルデヒドの構造推定に成功した。さらに、これら分子種は、動脈硬化症モデルであるapoE遺伝子欠損マウスの血漿試料中においても、その生成が観測された。

以上の結果より、脂質アルデヒドの体系的プロファイリングシステムを開発した。本研究では、我々が近年開発した脂質ラジカル構造解析技術を発展させることで、新規化学種を含む計140種類の脂質アルデヒド構造情報を得ることに成功した。さらにこれらデータベースを活用するこ

とで、酸化 LDL 中にて生成する脂質アルデヒドの体系的解析を達成した。また、これら脂質アルデヒドは疾患モデル血漿試料中においてもその生成が観測されてことから、今後本データベースおよび解析技術をさらに発展させることで、新たな疾患バイオマーカーの探索および、脂質過酸化反応に焦点を当てた新たな疾患メカニズム解明に貢献できると考えている。

<引用文献>

1. West, X.Z., et al., *Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands*. Nature, 2010. **467**(7318): p. 972-6.
2. Weismann, D., et al., *Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress*. Nature, 2011. **478**(7367): p. 76-81.
3. Yamada, K., et al., *Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(8): p. 608-13.
4. Matsuoka, Y., et al., *Method for Structural Determination of Lipid-Derived Radicals*. Anal Chem, 2020. **92**(10): p. 6993-7002.
5. Que, X., et al., *Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice*. Nature, 2018. **558**(7709): p. 301-306.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamasaki Toshihide, Azuma Risa, Sano Kohei, Munekane Masayuki, Matsuoka Yuta, Yamada Ken-ichi, Mukai Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Radioiodinated Nitroxide Derivative for the Detection of Lipid Radicals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 45 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraishi Ryoma, Kaneko Tomoyo, Usui Kazuteru, Naganuma Tatsuya, Iizuka Naoko, Morishita Kosuke, Kobayashi Shigeki, Fuchi Yasufumi, Matsuoka Yuta, Hirai Go, Yamada Ken-ichi, Karasawa Satoru	4. 巻 4
2. 論文標題 Effects of Substituents on the Properties of Metal-Free MRI Contrast Agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 20715 ~ 20723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b03003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Yuta, Izumi Yoshihiro, Takahashi Masatomo, Bamba Takeshi, Yamada Ken-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Method for Structural Determination of Lipid-Derived Radicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c00053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Kota, Matsuoka Yuta, Yamada Ken-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Reaction targets of antioxidants in azo-initiator or lipid hydroperoxide induced lipid peroxidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1761020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Emoto MC, Sato-Akaba H, Matsuoka Y, Yamada KI, Fujii HG.	4. 巻 690
2. 論文標題 Non-invasive mapping of glutathione levels in mouse brains by in vivo electron paramagnetic resonance (EPR) imaging: Applied to a kindling mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 6-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita A, Yamaguchi H, Yamasaki R, Cui Y, Matsuoka Y, Yamada KI, Kira JI.	4. 巻 15
2. 論文標題 Connexin 30 deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation.	6. 最初と最後の頁 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-018-1251-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yuta Matsuoka, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Takeshi Bamba, Ken-ichi Yamada
2. 発表標題 A Method for the Structural Determination of Lipid-derived Radicals
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡悠太、和泉自泰、高橋政友、馬場健史、山田健一
2. 発表標題 脂質由来ラジカル種の構造解析法
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡悠太、阿部雅史、和泉自泰、高橋政友、馬場健史、山田健一
2. 発表標題 脂質由来 アルデヒド化合物の構造同定と包括的解析法開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡悠太
2. 発表標題 脂質由来酸化物の包括的解析技術
3. 学会等名 レドックス・ライフイノベーション第170委員会 20周年記念若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡悠太・山田健一
2. 発表標題 ニトロキシラジカル誘導体による脂質由来ラジカル種の解析
3. 学会等名 第22回ESRフォーラム研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----