

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870769

研究課題名(和文) リピドミクス技術を用いた新規有害物質生物検定バイオマーカーの開発と応用

研究課題名(英文) Development of biomarkers for hazardous material assessments based on lipidomics technique

研究代表者

青木 元秀 (AOKI, MOTOHIDE)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30418917

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)：有害物質による環境汚染が発生した際には、汚染の環境影響を評価するために、その原因物質を正確かつ迅速に特定することが重要である。生物は環境変化に対応して生体成分を調節して適応する能力を備えている。本研究では、生物が有害物質に反応した時に見せる特異的な脂質成分組成変化パターン(バイオマーカー)を捉える方法を開発し、新しい環境分析手段とすることを目指した。水圏環境指標生物である微細藻類の一種であるラン藻の脂質をLC-MS/MSを用いて多数の脂質成分を一斉に解析する手法を開発した。また、有害金属に反応する脂質バイオマーカーを探索することが可能であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：When unexpected environmental pollution is suspected, the pollutants are needed to be quickly identified for evaluating its environmental impacts. Organisms have an ability to adapt to environmental changes by adjusting the biological components. Lipids are one of the major biological components, and environmental changes or diseases have an influence on its composition. We examined whether LC-MSMS analyses can capture the specific change patterns of lipid composition response to a toxic material stresses. Detecting condition of the lipid components was studied as a sample the total lipid extracted from cyanobacteria, and it has been established that analysis method that can be separated and detected simultaneously approximately a hundred and several tens of components. Then, discovery of lipid biomarkers response to some heavy metals exposure is attempted, and some components were successfully found as lipid to increase or decrease more than twice.

研究分野：生体物質分析化学

キーワード：環境モニタリング リピドミクス バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 重金属、変異原(発癌性)物質や内分泌攪乱(ホルモン類似作用)物質などの生態系破壊を引き起こす一連の環境汚染物質群は、主に工業排水や燃焼生成物を汚染源として水圏や土壌、大気環境中に放出される。有害物質による環境汚染が発生した際には、汚染の環境影響を評価し、汚染に対する最適な除染法を決定するために、その汚染物質を正確かつ迅速に特定することが必要不可欠である。従来、特定の環境汚染原因物質は、定性分析、元素分析や各種クロマトグラフィーなどの分析化学的な試験や分析を通じて、同定、定量する方法が主として用いられてきた。これらの方法では、一般に各種の試験に必要とされる量の分析試料を得るために、分析対象成分毎に溶媒抽出や誘導体化をはじめ少なくとも半日を要する煩雑な試料の前処理が必要となるものの、精度良く分析対象物質の同定、定量が可能となっている。しかしながら被疑物質が広範にわたる時には、それらの中から環境汚染原因物質を特定するのに、場合によっては数日間から数カ月間におよぶ分析作業が必要であったり、分析者にかなりの専門的な知識や経験が要求されたりするといった問題がある。

(2) 上述した分析化学的手段の問題点を補完し、未知の環境汚染源物質の特定を迅速かつ簡便に行うことができる実用的な環境汚染源物質のモニタリング手段として、バイオアッセイ(生物検定)法が挙げられる。バイオアッセイ法は、微生物や培養細胞および生物個体の化学物質に対する応答を利用して化学物質の作用を検出・定量する方法である。これを用いれば、煩雑な試料前処理を行うことなく、未知物質であっても生理活性から有害性の定量化や生態影響を把握することが可能である。一方で、既存の手法は様々な有害物質の生理作用を一斉に検出することは難しく、検知対象物質毎に適切なアッセイ法を選択する必要がある。そこで、新たなバイオアッセイ手法の開発が望まれている。

(3) 生体における脂質成分修飾や発現は、生体の恒常性の維持や、外来の生物や物質からの生体防御など、外部環境の変化に素早く応答している。脂質レベルで環境ストレスを検出し、その影響の程度を評価する手法を開発することは、新たなバイオアッセイ手段として応用できる可能性がある。近年、クロマトグラフィー手法による脂質分離と、質量分析計による検出同定解析を高度に融合させた、生体脂質成分を高感度に一斉解析するリポドミクス技術が目覚ましく発展し、医科学分野で疾病や感染の脂質バイオマーカーの開発などに多数の実績を挙げている。その分析手法は環境中の有害物質を特定するバイオマーカーの探索手段として有用であると考えられた。しかしながら同法を環境中の有害

物質の同定法として評価した先行研究は殆ど見当たらなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、先端的リポドミクス技術を新たに化学物質の環境モニタリングに適用して、既知の有害物質に対する環境指標モデル生物の脂質応答パターン収集方法の確立を目指した。

(2) また、環境中の有害物質を迅速に検出する特異性の高い新規のバイオマーカーを探索し、バイオマーカーの発現プロファイルから未知の物質であっても有害性を評価できるアッセイ法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

環境指標モデル生物として、微細藻類、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を分析対象とした。ラン藻の脂質は、Bligh & Dyer法により抽出した。HPLCと連結したトリプル四重極リニアイオントラップ型質量分析システムを用いて、抽出した脂質を一斉分析して、有害物質応答性脂質バイオマーカーを探索した。

抽出された全脂質はイソプロパノール/メタノール/水(5:4:1)に溶解し、LC-MS/MS(3200QTRAP, ABSciex)のリニアイオントラップスキャンモードで正イオン(Positive)及び負イオン(Negative)検出条件で一斉分析した。LCのカラムには逆相 C8 カラム(UNISON UK-C8 Φ2.0 x 50 mm 3μm, Imtakt)を使用した。移動相には A) 20 mM 酢酸アンモニウム、及び B) アセトニトリルを用いて、移動相 B の初期濃度を 60%とし、12分で95%、その後25分まで95%となるようにグラジエントプログラムを設定した。必要に応じて、ポストカラムでイオン化モディファイアーとなる塩類を添加した。

得られた分析データから多変量解析手法の一種である主成分分析-判別分析により、有害物質に曝露した藻類から抽出した脂質サンプルに特異的な成分を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) 微細藻類の脂質プロファイリング方法の開発

藻類の生体膜を構成する主要な脂質である、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)およびホスファチジルグリセロール(PG)をターゲットとして、ESI-MS/MSで分析するため分析方法を検討した。ラン藻の各膜脂質クラスの参照試料を精製して、逆相 C8 カラムを備えた HPLC と連結した ESI-MS/MS を用いて各脂質の分子種を一斉分析する条件を検討したところ、MGDG と DGDG はニュートラルロススキャン(NL Scan)、SQDG と PG はプリカーサ

イオンスキャン (Prec Scan) の測定モードで脂質クラス選択的に分子種を分析可能であることを確認した。

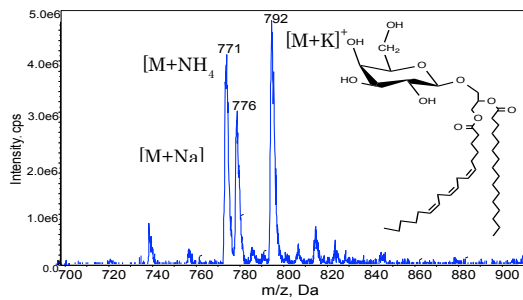


図1 MGDG (16:0/18:3)のマススペクトル

対数増殖期まで生育したラン藻から抽出した全脂質を LC-MS/MS で一斉分析したところ、Positive イオンとして MGDG、DGDG、SQDG が、Negative イオンとして SQDG、PG が主に検出できた。Positive 検出では、同一の脂質分子種より Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が付加した複数の分子関連イオンが検出された(図1)。

脂質分子関連イオンを感度よく検出するため、また後の解析を単純化するために付加するカチオンが統一されることが望ましい。

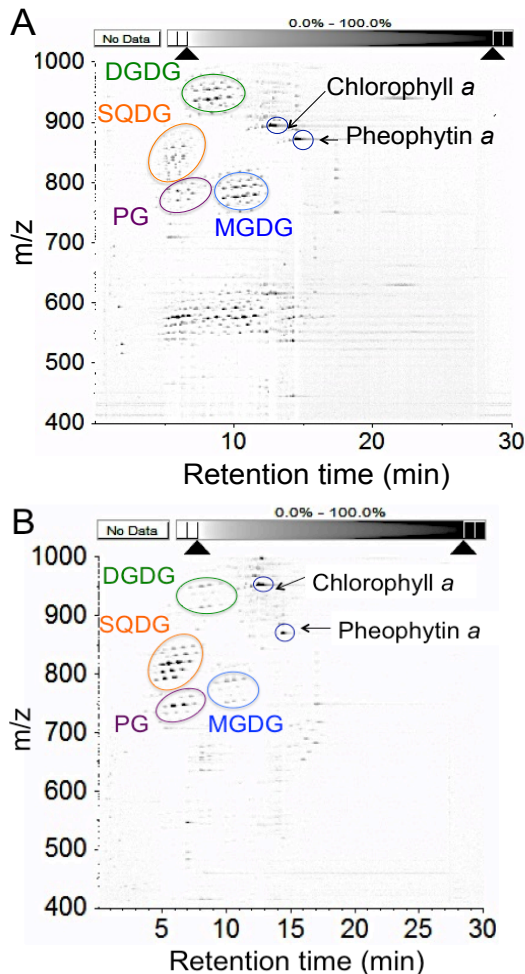


図2 LC-MS によるラン藻の脂質成分の一斉検出 (A) Positive モード, (B) Negative モード. 横軸に保持時間, 縦軸に m/z をとり, シグナル強度を濃淡で表した。

そこで、脂質分子種を Positive 検出する時のイオンソースにおける脱溶媒温度、移動相の pH がカチオン付加に及ぼす影響について検討した。その結果、脱溶媒温度が 350°C 及び移動相の pH が 6.0 の時に最も NH<sub>4</sub><sup>+</sup>付加イオンが強く検出されることが分かった。さらに、LC で分離後にポストカラム法で各種の塩類を展開することによる効果を検討したところ、MGDG 及び DGDG はクエン酸ナトリウムを展開した時に Na<sup>+</sup>付加イオンとして、また SQDG は酢酸アンモニウムを展開した時に NH<sub>4</sub><sup>+</sup>付加イオンとして高感度に検出できることを見出した。

以上の成果を基にして、ラン藻脂質をノンターゲットで一斉分析する、エンハンストマススキャン (EMS) モードについて検討した結果、*Synechocystis* から粗抽出した全脂質を試料としたときに、およそ 150 シグナルを一斉に検出できる分析方法を確立した(図2)。

## (2) 重金属元素応答性脂質バイオマーカーの探索能力の評価

これまでに開発した脂質成分一斉分析手法を用いて、有害化学物質として各種重金属元素を暴露した際の脂質プロファイルの取得を試みた。

六価クロムと三価クロムを暴露したラン藻の脂質プロファイルを取得して、クロムに応答する脂質成分を多変量解析により探索した結果、コントロール群、三価クロム曝露群および六価クロム曝露群を識別可能な主成分パラメータの取得に成功した(図3)。現在、この主成分パラメータへの各成分の寄与度から、脂質バイオマーカー候補のシグナルを5個見いだしている。

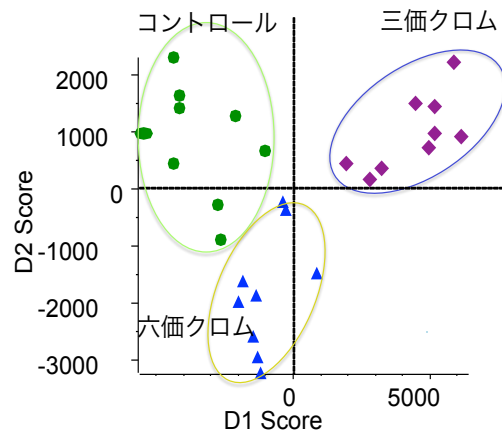


図3 主成分分析-判別分析によるクロムストレス変動成分のスクリーニングスコアプロット; 横軸に第一主成分、縦軸に第二次主成分をとり、3つのグループでの差異をプロット。

また、これまでに *Synechocystis* のタリウム毒性には脂質代謝が関与している可能性が示唆されていることから、タリウムに応答する脂質バイオマーカーを探索した。得られた分析データから主成分分析-判別分析によりタリウム曝露サンプルに特異的な成分を抽出したところ、200%以上に増加したもの

を4成分、50%以下に減少したものを6成分見出した。

### (3) 糖脂質の精製前処理を目的とした新規ボロン酸型固相抽出モノリスカラムの開発

生体内には多様な糖鎖構造をもつ糖脂質分子種が存在し、細胞内外の情報伝達などの重要な機能に参与している。また、糖脂質は、細菌毒素やウイルスのリガンドになったり、細胞の癌化により組成が変化したりするなど、さまざまな病気との関わりも報告されている。糖脂質の生理機能を包括的に理解するためには、これらの網羅的解析が不可欠である。生体内に存在する個々の糖脂質分子種の濃度は極微量であることから、これらを一斉分析するためには、夾雑物の除去や濃縮操作が必要とされている。糖のように複数の水酸基を有する化合物は、塩基性条件でフェニルボロン酸と可逆的にボロン酸エステルを形成することから、この性質を利用した糖脂質の選択的な精製前処理が可能であると考えられる。本研究では、ボロン酸基を導入した有機ポリマー型モノリスカラムを作製し、糖脂質の精製前処理条件を検討した。

機能性モノマーとして4-ビニルフェニルボロン酸と架橋剤として二メタクリル酸エチレンを、ジエチレングリコールとエチレングリコール混液に溶解し、固相抽出カラム管に充填して75°C、12h熱重合した。重合後のカラムはメタノールで洗浄した。カラムの糖脂質抽出能力の評価には、スフィンゴ糖脂質の混合標準試料を用いた。塩基性条件に調整した試料を固相抽出カラムに負荷し吸着させて、夾雑物を洗浄した後に、酸性条件下で脱離し回収した。回収した糖脂質はESI-MS/MSのポジティブモードで検出した。このボロン酸型モノリスカラムを用いると、スフィンゴ糖脂質はpH11の塩基性条件下で選択的にカラムに捕捉され、酸性条件下で脱離することが確認できた。また、糖脂質のカラムへの結合は、溶媒のpHによるコントロールが可能であり、段階的な溶出による分画も可能であった。

### (4) 研究成果の総括

本研究では、環境指標生物である微細藻類の脂質をLC-MS/MSを用いて一斉プロファイリングする方法を確立した。この方法を用いて、重金属類曝露に応答するラン藻の脂質バイオマーカー候補を一斉にスクリーニングできることを確認した。以上の結果より、本法は、様々な有害物質を鋭敏に検出する新規の脂質バイオマーカー探索手法として有用でと考えられる。また、本研究において見いだされた新規の環境指標バイオマーカー候補は、生物の毒性生理解明の為の基礎的な知見とも成り得る。

本研究により開発された分析方法は、未知の環境汚染物質の探索・リスク評価法の確立

や環境ストレス因子による生体への負荷の診断等への応用展開への布石として、化学物質のリスク評価管理の効率的な実施に貢献するものと期待される。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Sakurai, T., Aoki, M., Ju, X., Ueda, T., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Umemura, T., Tsuzuki, M., Minoda, A., Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*, *Bioresource Technology*, 査読有, **200**, 861-866. (2016)  
doi:10.1016/j.biortech.2015.11.014.
- ② Sato, N., Kobayashi, S., Aoki, M., Umemura, T., Kobayashi, I., Tsuzuki, M., Identification of genes for sulfolipid synthesis in primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, **29;470(1)**:123-129. (2016)  
doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.006.

〔学会発表〕(計26件)

- ① 佐藤 典裕, 小林 里美, 青木 元秀, 小林 功, 都筑 幹夫, 紅藻シアニディオシゾンのスルホ脂質合成系遺伝子, 第57回日本植物生理学会年会, 2016/3/18-20, 岩手大学, 上田キャンパス, 岩手
- ② 青木 元秀, 松本 七虹, 別所 夏歩, 片山 由美子, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, 糖脂質のボロン酸型固相抽出モノリスカラムによる精製前処理とESI-MS/MSによる検出, 日本分析化学会第64年会, 2015/9/9-11, 九州大学, 伊都キャンパス
- ③ 松本七虹, 青木 元秀, 熊田 秀峰, 内田 達也, 梅村 知也, ボロン酸型固相抽出モノリスカラムによる糖脂質の選択的捕集とLC-MS/MSによる検出, 第22回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015/5/28-30, 近畿大学, 東大阪
- ④ 尾村 宏美, 青木 元秀, 内田 達也, 梅村 知也, 熊田 英峰, 堆積物試料中のバクテリア細胞膜由来ホパノイドの抽出方法の検討, 第22回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015/5/28-30, 近畿大学, 東大阪
- ⑤ 赤嶺 瑠奈, 青木 元秀, 重田 朋美, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, クロムストレス下における微細藻類の脂質プロファイリング, 第25回クロマトグラフィー科学会議, 2014/12/10-12, 京都大学, 京都
- ⑥ 松井 雄一郎, 松下 莉那, 宮下 振一, 藤井 紳一郎, 稲垣 和三, 青木 元秀,

熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, 細胞分画法により単離したオルガネラの微量元素組成分析, 第 4 回メタロミクスフォーラム, 2014/11/7-8, 武蔵野大学, 東京

- ⑦ 青木 元秀, 中村 好佑, 赤嶺 瑠奈, 梅村 知也, 微細藻類の膜脂質プロファイリング法による有害物質応答分析, 第 25 回日本微量元素学会学術集会, 2014/7/03-4, 岡山
- ⑧ 青木 元秀, 中村 好佑, 赤嶺 瑠奈, 熊田英峰, 梅村 知也, 脂質分析に基づくラン藻の有害金属応答バイオマーカーの探索, 日本分析化学会第 62 年会, 2013/9/10-12, 大阪
- ⑨ 松井 雄一郎, 青木 元秀, 藤原 祺多夫, 熊田 英峰, 梅村 知也, 都筑 幹夫, 微細藻類のセシウムおよびストロンチウムの回収能力評価, 第 22 回環境化学討論会, 2013/7/31-8/2, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~aoki/lipidomics/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

青木 元秀 (AOKI, Motohide)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号 : 30418917