

マウス脳内微小器官中のエポキシエイコ サノイド定量分析法の開発

山田 真希

ユーザーベネフィット

- ◆ エポキシエイコサノイドの高感度定量分析が可能です。
- ◆ 15分サイクルで分析できます。
- ◆ エポキシエイコサノイドの新機能解析や疾患マーカー探索にご利用ください。

■はじめに

アラキドン酸から生じる生理活性脂質には、プロスタグランジン類やロイコトリエン類の他に、エポキシエイコサノイド (Epoxyeicosatrienoic acid, EET類) と呼ばれる一群があります。EET類はアラキドン酸からCytochrome-P450 (CYP) により生成します (図1)。5(6)-EETについては血管弛緩などの生理機能を有する脂質メディエーターとして報告されています^{1), 2)}。

著者らが開発したLC/MS/MSメソッドパッケージ脂質メディエーター ver.3では、EET類を含めた脂肪酸代謝物196成分の網羅的分析が可能です。この網羅的分析法では20分間のリニアグラジエントで分析しますが、EET類は他の脂肪酸代謝物に比べて疎水性が高く、18分以降に溶出します (図2A)³⁾。

本稿では、マウス脳内微小器官 (終板脈管器官) 中のEET類の定量分析法の開発について紹介します。ヘプタコシル基を基材とするカラムを用い、EET類が8分~9分に溶出する分析条件を開発し、カーブグラジエントによりEET類の分離度は著しく改善しました (図2B)。本手法により、1 mgに満たないマウスの脳内微小器官について、5(6)-EETと8(9)-EETの定量分析ができました。

■分析条件

表1 HPLCとMSの分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™)	
Column	: CAPCELL CORE C27*1 (75 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm)
Mobile phases	: A) 0.1 % Acetic acid in water B) Methanol
Gradient Program	: B conc. 20 % (0 min) – 20 % (1.0 min) – 40 % (2.0 min) – 80 % (10.0 min) – 95 % (10.1 min) – 95 % (12.0 min) – 20 % (12.1 min) – stop (15 min), curve –3 (2.0 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection volume	: 5 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Negative mode)
Probe Voltage	: -3 kV
MRM Mode	: m/z 319.2 > 191.1, 5(6)-EET (ピンク、図2B、図5) m/z 319.2 > 179.2, 8(9)-EET (青、図2B、図5)
Nebulizing gas flow	: 2.5 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
DL Temp.	: 250 °C
Heat Block Temp.	: 400 °C
Interface Temp.	: 300 °C

*1 現 CAPCELL CORE AQ (Osaka Soda)

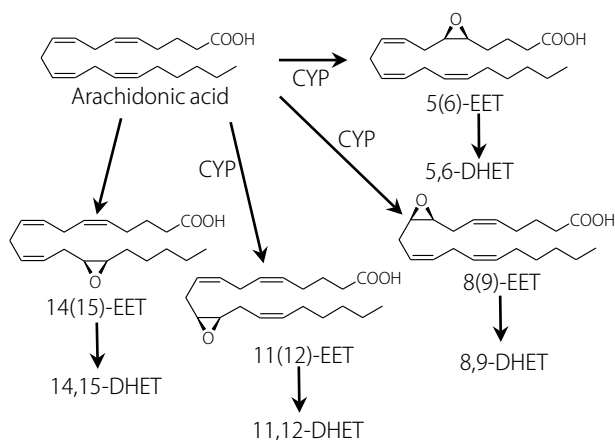


図1 EET類の構造と代謝マップ
DHET: Dihydroxyeicosatrienoic acid

■分離条件の最適化

5(6)-EETと8(9)-EETを各5 pg注入し、得られたMRMクロマトグラムを図2に示しました。脂質メディエーターメソッドパッケージでは、5(6)-EETが18.28分に、8(9)-EETが18.24分に溶出し、分離度Rは0.3程度でした (図2A)。

ヘプタコシル基 (C27) を導入したコアシェルカラムを用いて分離条件の最適化を行いました。表1の条件により得られたMRMクロマトグラムを図2右に示します。5(6)-EETと8(9)-EETは8.63分と8.44分に溶出し、分離度Rは2.3でした。良好な分離結果を得ました。

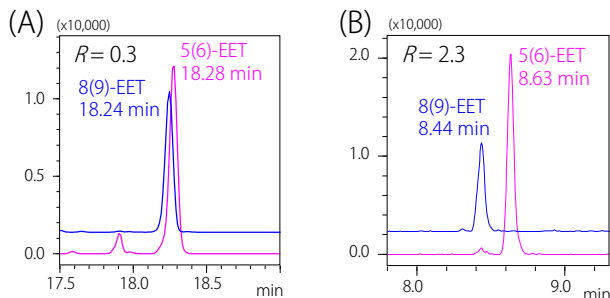


図2 5(6)-EETと8(9)-EETのMRMクロマトグラム
(A)は脂質メディエーターメソッドパッケージで得られたクロマトグラム (溶離液Aは0.1 % 酢酸水を用い、溶離液Bにアセトニトリルを使用) Kinetex C8, 150 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm (Phenomenex) を用い、リニアグラジエントを使用
(B)は表1の分析条件で得られたクロマトグラム

■ EET類の感度と定量下限

表1に示した分析条件により、5(6)-EETと8(9)-EETの標準品0.5 pgを分析し、得られたMRMクロマトグラムを図3に示します。分析を3回繰り返して得られたクロマトグラムを重ね描きました。検量線では5(6)-EETと8(9)-EETともに0.5~500 pgの範囲で良好な直線性 ($R^2 > 0.999$) が得られました(図4)。LC/MS/MSメソッドパッケージ脂質メディエーター ver. 3では溶離液Aに0.1%ギ酸水を用いていますが、本手法のように0.1%酢酸水を用いることで、EET類の感度は約10倍改善しました。

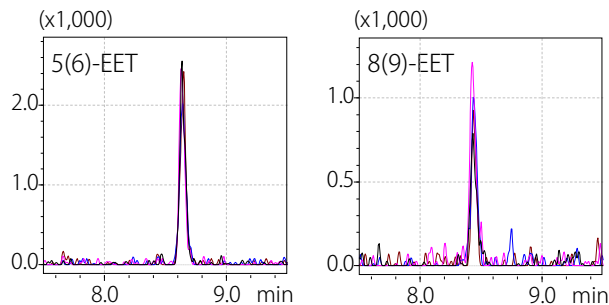


図3 5(6)-EETと8(9)-EETのMRMクロマトグラム (注入量は0.5 pg)

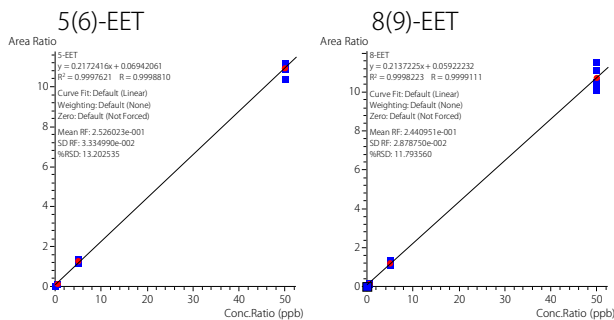


図4 5(6)-EETと8(9)-EETの検量線

■ マウス脳微小器官の分析

マウス脳の終板脈管器官 (OVL) の脂質抽出液の分析結果を図5に示します。マウス5匹から採取したOVL組織片 (1 mg未満) に0.1%ギ酸入りメタノールを500 μ L添加し、脂質抽出を行いました。遠心後の上清について固相抽出を行い、脂質抽出液を50 μ Lに濃縮し、5 μ LをLC/MS分析に供しました。各クロマトグラムにおいて未知成分 (図5*) が検出されましたが、対象成分と未知成分は十分に分離しました。内部標準法により5(6)-EETと8(9)-EETの濃度を見積もることができました。

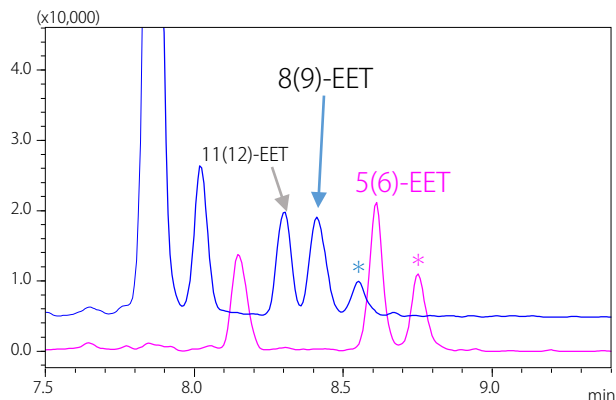


図5 マウス脳の終板脈管器官からの脂質抽出液のMRMクロマトグラム
*は未知成分のピーク

■ まとめ

EET類の高速・高感度検出法を開発しました。5(6)-EETと8(9)-EETの定量下限は0.5 pgでした。ヘptaコシル基を基材とするカラムを用い、カーブグラジエントを利用することで分離度が改善しました。5(6)-EETと8(9)-EETの分離度が改善されたことにより、実試料の分析で検出された未知成分を区別することができました。カラム洗浄および初期化を含め、15分サイクルの分析時間となり、スループットの高い高感度エポキシエココサノイド分析法を構築できました。

新規に開発したEET類分析法により、1 mgに満たないマウス脳内器官 (OVL) サンプルから5(6)-EETと8(9)-EETを検出し、定量的に解析することができました。この分析結果により、5(6)-EETと8(9)-EETが、脳内で「のどの湯き」を伝える脂質メディエーターとして働いていることが明らかになりました⁴⁾。

EET類についてはELISA法が開発されていません。プロスタグランジンやロイコトリエン類に比べると、その生理活性については未解明な部分が多いと考えられます。本手法を疾患マーカー探索や新規機能解析にご利用ください。

<参考文献>

- 1) Vriens, J. et al., *PNAS*, 101, 396-401 (2004).
- 2) Berna-Erro, A. et al., *Sci. Rep.*, 7(1):10522 (2017).
- 3) Yamada M. et al., *J. Chromatography B*, 995, 74-84 (2015).
- 4) Sakuta, H. et al., *Neuroscience Res.* 154, 45 - 51 (2020).

<謝辞>

マウス脳の終板脈管器官 (OVL) の脂質抽出液は、基礎生物学研究所の作田拓先生と野田昌晴先生 (現 東京工業大学科学技術創生研究院) よりご提供いただきました。

NexeraおよびLCMSは、株式会社 島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00147-JP 初版発行：2021年4月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021