

Application News

No. C151

LC/MS

SimLipid ソフトウェアを用いた リン脂質解析

リン脂質は生体内における細胞膜の構成を担うとともに、生理活性脂質の前駆体であるアラキドン酸、EPA や DHA などの不飽和脂肪酸の供給にも関与しています。また、血中・組織中におけるリン脂質の変動は、さまざまな疾患との相関が知られており、高脂血症や動脈硬化では血中リン脂質濃度が上昇することや、一部の神経疾患では血中のリン脂質における脂肪酸の構成比が変化することも報告されています。このようにさまざまな生体機能や疾患との関連が報告されているリン脂質ですが、その種類は多岐にわたっており、その構造骨格からグリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質の二つに大きく分類されます。また、特徴的なヘッドグループの構造から、PC、PE、PG、PI、PS、PA、SM などの各リン脂質クラスに分類され、構成要素である脂肪酸も鎖長、二重結合の数、グリセロール骨格への結合様式の組み合わせにより、さまざまなリン脂質が知られています。

本稿では、長波長の蛍光プローブを尾静脈に投与したマウスと未投与のマウスにおいて、投与後の肝組織におけるリン脂質の変動を LCMS-8060 にて分析した結果を示します。また、変動しているリン脂質の解析にあたっては、PREMIER Biosoft 社 (www.premierbiosoft.com) の SimLipid ソフトウェアを用いて、リン脂質の同定・変動評価を行いました。

T. Nakanishi

■ 試料調製および分析

長波長の蛍光プローブである Carbon Nano Tube (CNT) をマウス尾静脈に 300 μg/mL 濃度にて 100 μL 投与したマウスと未投与のマウスを対象として、投与後 5 時間後に肝臓組織の摘出を行いました (日本学術会議の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (2006 年 6 月 1 日)」に準拠して実験を行っています)。

摘出した肝臓組織は速やかに液体窒素で凍結した後、適当な大きさに砕いて秤量しました。次にビーズスマッシャーにて凍結組織の破碎を行った後、クロロホルム/メタノール/水による脂質抽出を行いました。クロロホルム層を回収して、溶媒を乾固した後、クロロホルム:メタノール (1:1) 溶液に溶かしました。これをメタノールにて適宜希釈したものを試料として、LCMS-8060 によるプリカーサーイオンスキャンおよびニュートラルロススキャンによるリン脂質分析を行いました。ここでは、PC および SM の特徴的なヘッドグループ由来のプロダクトイオン m/z 184 のプリカーサーイオンスキャン、PE についてはエタノールアミンのニュートラルロス 141 のニュートラルロススキャンを実施しています (図 1)。それぞれのスキャン分析において検出されたピークに関しては、SimLipid ソフトウェアを用いたデータベースサーチを行い、候補となるリン脂質を推定しました (図 2)。

表 1 HPLC 条件

Column	: Phenomenex Kinetex C8 (150 × 2.1 mm, 2.6 μm)
Mobile phase A	: 20 mmol/L 酢酸アンモニウム
Mobile phase B	: アセトニトリル/イソプロパノール (11)
Flow rate of mobile phase	: 0.3 mL/min
Time program (B%)	: 20% (0 min) → 20% (1 min) → 40% (2 min) → 92.5% (25 min) → 100% (26 - 30 min) Curved gradient from 2 min to 25 min.
Column temp.	: 45 °C
Injection volume	: 3 μL

表 2 MS 条件 (LCMS-8060)

Ionization	: ESI (+) / (-)
Nebulizer gas flow rate	: 3 L/min
Heating gas flow rate	: 10 L/min
Drying gas flow rate	: 10 L/min
Probe voltage	: 4 kV (+) / -3 kV (-)
Interface temperature	: 300 °C
DL temperature	: 250 °C
Block heater temperature	: 400 °C

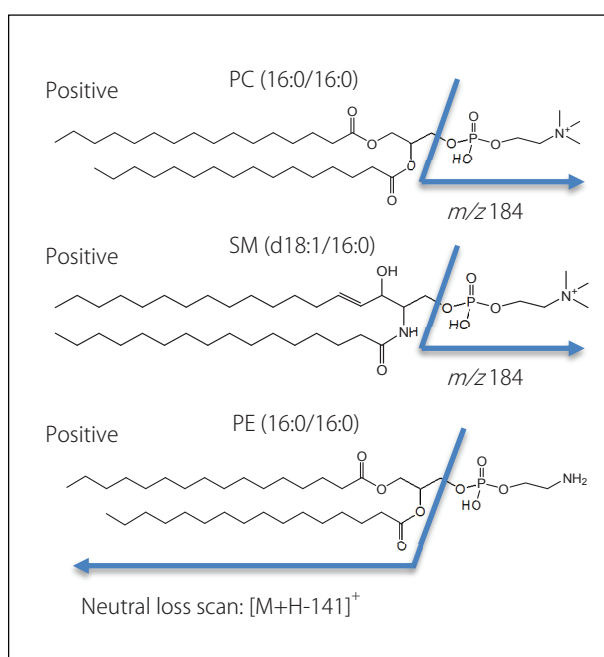


図 1 PC、SM および PE の構造式

■ SimLipid ソフトウェアによるデータベース検索

図2ではPCおよびSMを対象としたプリカーサイオンスキャンの分析結果をもとに、検出された各ピークに相当するリン脂質をデータベース検索した後、各候補リン脂質化合物を保持時間情報や鎖長を考慮した上で、マニュアル操作にてさらに候補化合物を絞り込んでいます。

The screenshot shows a table with columns: Obs. No., Ret. Time (min), Duty No., Obs. No., Obs. No., Total Abn., Formula, Class, Abundance, #C#O, Name, Short No., Lipid ID, and a checkmark column. Below the table, a chemical structure of a lipid molecule is displayed with the label 'Lipid ID: LMS0201000'.

図2 SimLipid ソフトウェアによるリン脂質候補化合物の推定

■ プローブ投与による肝組織でのリン脂質変動

次に推定した各リン脂質 (PC, SM および PE) のピーク高さを試料グループごと (ここでは未投与とプローブ投与群、各 n=3) に総和した値、Total Abundant をグラフにプロットしたのが図3になります。ここでは、検出された各リン脂質ピークのうち、いずれの試料中でも検出されたものを示しています。また、それぞれの試料におけるピーク高さは、前処理に用いた肝組織重量で補正しています。

図3に示すように、プローブ投与の影響で各リン脂質が大きく増大していることが確認できます。SM (38:1)、SM (40:3)、SM (42:3)といったスフィンゴリン脂質でその傾向が特に顕著に確認できます。また、多価不飽和脂肪酸を含むと思われる PC (38:6)、PC (40:6)、PE (38:6)、PE (40:6)といったリン脂質の増大も同様に確認することができました。一方、プローブ投与によって減少するリン脂質も確認されており、PC (34:1)および PE (34:1)ではプローブ投与後に減少していることが確認されました。これらの結果は、同様の脂肪酸組成を含む各クラスのリン脂質の増減が関連していることを示唆しています。

このように LCMS-8060 を使ったプリカーサイオンスキャンおよびニュートラルロススキャンを用いたリン脂質一斉分析結果を、SimLipid ソフトウェアによるデータベースサーチから候補リン脂質化合物を絞り込むことで、各種リン脂質の増減を評価することができます。

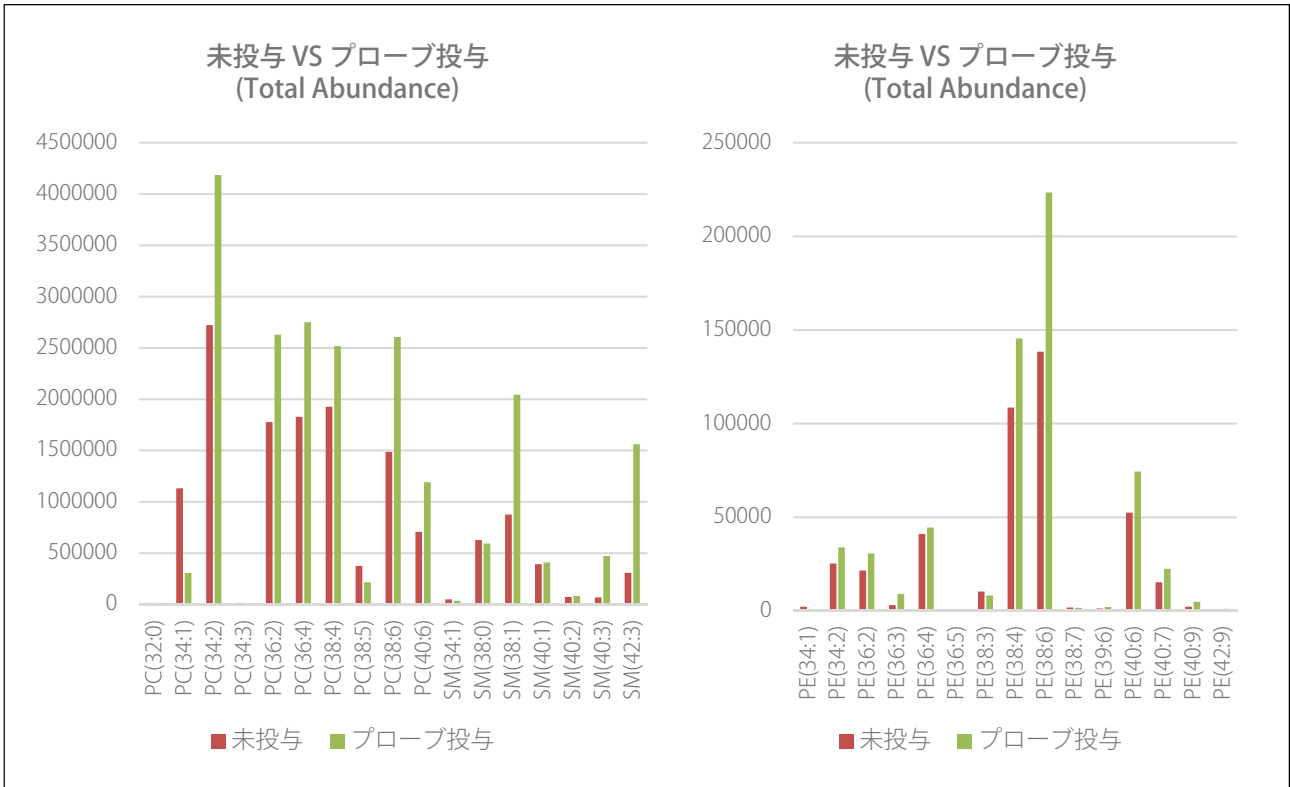


図3 未投与とプローブ投与 (5時間) マウスにおける肝臓組織でのリン脂質変動