OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis of Polyunsaturated Fatty Acids by Electrospray Ionization Mass Spectrometry
Author(s)	Zhu, Huibin
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/93021
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　朱　慧彬　）	
論文題名	Analysis of Polyunsaturated Fatty Acids by Electrospray Ionization Mass Spectrometry （エレクトロスプレーイオン化質量分析法による多価不飽和脂肪酸の解析）

論文内容の要旨

生体内に存在するアラキドン酸やドコサヘキサエン酸の代謝産物が高い生理活性を持つ脂質で、HETEs、HDoHEs、Lipoxins、Resolvins等に分類されて、多くは抗炎症作用がある。それらを分離して検出する方法は多く報告されているが、これらの多価不飽和脂肪酸（PUFA）は不飽和二重結合を多く含むため分解されやすく、また、構造が類似し、異性体が多数存在するため、それらを確実に同定、定量することは難しい。特に、生体試料に含まれるPUFA類の測定では、試料の前処理等の工夫を行っても低分子の夾雑物が多いため、より困難ことが多い。

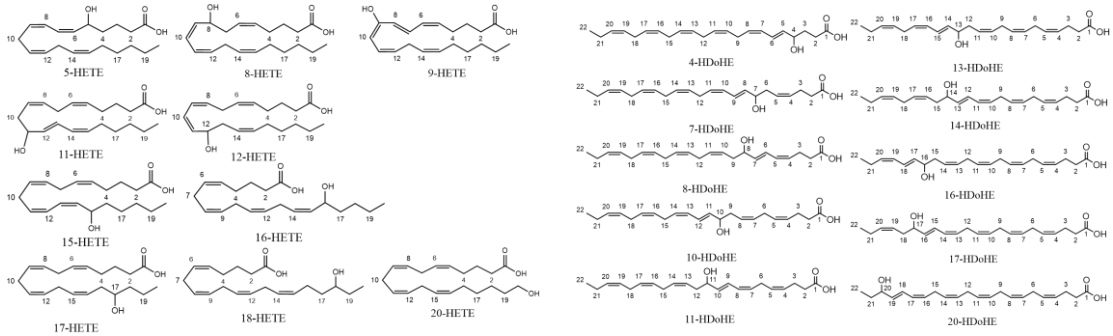


Figure 1. HETE、HDoHE類の構造

近年、化学誘導化剤を用いて脂肪酸を誘導化し、液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC-MS）で検出、比較定量する方法が報告されている。しかし、それらの構造異性体の分離、検出は難しく、目標とする脂肪酸類の性質に合わせて分離効果を最適化できるような新規な誘導化剤の開発が必要であると考え、誘導化剤として新たに短鎖ペプチドを用いる方法を試みた。この方法の利点としては、1）脂肪酸はペプチドのN末端に簡単に結合できる。2）任意のアミノ酸配列を設計することで、疎水性・親水性の調整や質量分析での測定感度を向上させることができる。3）任意の数および種類の安定同位体（^{13}C、^{15}N）を導入することができる⇒内部標準物質としての利用、複数の試料間での比較定量解析が可能。

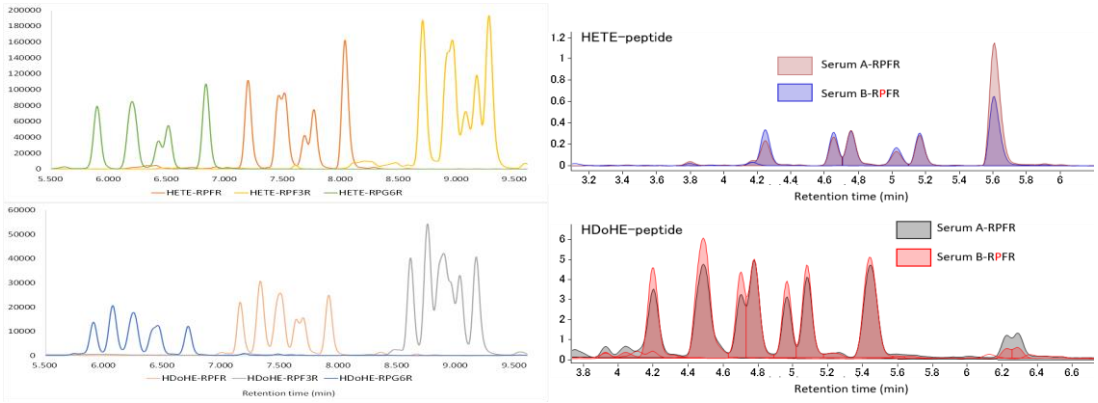


Figure 2. HETE及び HDoHE 類の3種類のペプチドによる誘導化後のLCによる分離比較（左）と2人の血清を用いた比較定量分析(右)。Serum BはPro（$^{13}C_5$, ^{15}N)を含ペプチドで標識。

以上に基づいて、ここでは3種類のペプチド（Arg-Pro-Phe$_3$-Arg-NH$_2$、Arg-Pro-Phe-Arg-NH$_2$、Arg-Pro-Gly$_6$-Arg-NH$_2$）を調製し、それらを用いてHETE及び HDoHE 類の誘導化を行って、分離効果と異なる検体間での比較解析について検討した。血清を用いた分離能を試験した結果、HETEおよび HDoHEの場合、Arg-Pro-Phe-Arg-NH$_2$が良好な分離を示すことがわかった（Fig. 2左）。また、安定同位体標識Proを導入したペプチドを誘導化剤として用いることにより、異なる2つの検体に対して一度の分析で比較解析が可能であることを示した（Fig. 2右）。

レゾルビン（RvD, RvE）、マレシン（Mar）、リポキシン（Lx）類は、抗炎症や、ヒトT細胞反応の制御やヒトの免疫機能の改善に重要な役割を果たしている。しかし、これらの物質の検出方法に関する研究は少ない。本研究では、全てのPUFA類の中でアリル位に隣接ジオール基を持つRvD1、 RvD2、RvD4、RvE3、LxA4、LxB4、Mar2（Figure 3A)に対して、誘導化後のMS/MSにおいて、アリル位に隣接するジオール基間で観測される断片化を見出した。（Figure 3B, 3C）

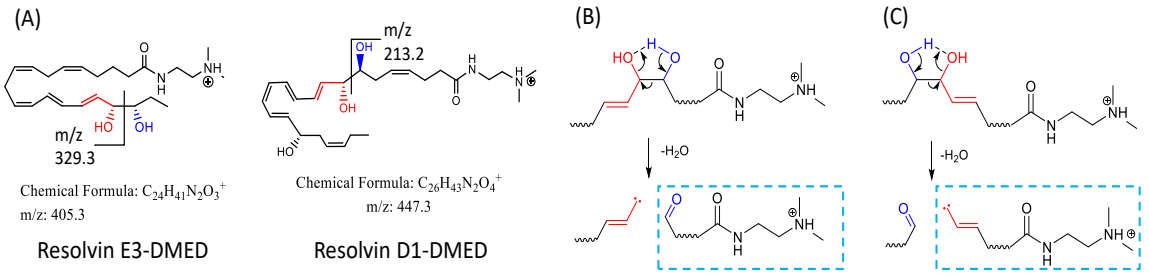


Figure 3. DMED化されたRvE3及びRvD1の構造（A)、及び、MS/MSにおいてアリル位に隣接ジオール基間で観測される開裂と観測されるフラグメントイオン（B, C）。

アリル性水酸基が、末端DMED部分に対して遠位にある場合(RvD1、RvD4、LxA4)、アルデヒド（-CH=O）タイプのイオンが観察され（Fig. 3B）、DMED側にある場合(RvD2、RvE3、LxB4、Mar2)、アリルカルベン（-CH=CH-CH:）タイプのフラグメントイオンが観察される（Fig. 3C）。

これら7種のPUFAで特徴的に観測されるフラグメントイオンを基に、定量測定のための検量線をUPLC/ESI-MS/MS（multiple-reaction monitoring（MRM)法）を用いて作成し、それをヒト血清中のPUFAの定量に応用した。通常の測定では、これらのPUFAの検出には脱水によるフラグメントイオンが用いられるため、同じ質量をもつ異性体の区別はしばしば困難であるが、上記の特徴的なフラグメントイオンを用いることにより、ヒト血清中(市販されている健康なボランティア 8人（20~36 歳）の血清)全てにおいて、LxA4、LxB4、RvD1が、一部の検体でそれら3種に加えてRvD2、RvE3R、RvE3Sが観測された。本分析では血清20μLという微量試料からの測定が可能であることを示すことができ、本方法は、試料の前処理が容 易かつ実行的であるのみならず、限られた量の臨床サンプルや生体から得られたサンプルに適用できるものと考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　朱 慧彬　）

	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	高尾　敏文
	副 査　教授	村田　道雄
	副 査　教授	鈴木　孝禎

論文審査の結果の要旨

生体内に存在する多価不飽和脂肪酸（PUFA）の代謝産物は高い生理活性を持つ脂質である。その中で、 HETEs、HDoHEs、Lipoxins、Resolvins 等に分類されるものの多くは抗炎症作用があり、それらの分離、定量は生理機能を知るうえで重要である。しかし、PUFA は不飽和二重結合を多く含むので分解されやすく、また、構造が類似し、異性体が多数存在するため、それらを確実に定量することは難しい。近年、化学誘導化剤を用いて脂肪酸を誘導化し、液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC-MS）で検出、定量する方法が数多く報告されている。しかし、誘導化後の PUFA においても分離、検出は尚難しい。本研究は、PUFA 類の性質に合わせて LC での分離能を調整でき、さらに、MS で高感度で検出できる新規な誘導化剤を開発することを目的としている。本論文では、誘導化剤として、新たに短鎖ペプチドを考案し、次の 3 つの利点と効果について示している。1）脂肪酸 はペプチドの N 末端に簡単に結合できる。2）任意のアミノ酸配列を設計することで、疎水性・親水性の調整や質量分析での測定感度を向上させることができる。3）任意の数および種類の安定同位体（^{13}C、^{15}N)を構成アミノ酸に導入することができる⇒内部標準物質としての利用や複数の試料間での比較定量解析に応用できる。種々の短鎖ペプチドの中で、Arg-Pro-Phe-Arg-NH_2 を誘導化剤として用いた場合、HETE 及び HDoHE 類の LC での分離が良好であること、また、安定同位体標識 Pro を導入した同じペプチドを誘導化剤として用いて、2 人のヒト血清間で HETE 及び HDCE 類の比較解析が一回の分析で行えることを示している。(第一章）このような比較解析を PUFA の分析で初めて示した結果と評価される。

レゾルビン（RvD, RvE)、マレシン（Mar)、リポキシン（Lx）類は、抗炎症や、ヒト T 細胞反応の制御やヒトの免疫機能の改善に重要な役割を果たしている。第二章では、アリル位に隣接ジオール基を持つ RvD1、RvD2、RvD4、RvE3、LxA4、LxB4、Mar2 に対して、誘導化後の MS/MS において特徴的に観測される断片化を見出してる。すなわち、アリル性水酸基が、末端の誘導化剤部分に対して遠位にある場合(RvD1、RvD4、LxA4 において)、アルデヒド(-CH=O)タイプのイオンが観察され、それに対して、誘導化剤側にある場合(RvD2、RvE3、LxB4、Mar2 において)、アリルカルベン(-CH=CH-CH:)タイプの断片イオンが観察されることを見出している。これら 7 種の PUFA に対して特徴的に観測される断片イオンは、各 PUFA の MS/MS における同定確度の向上につながる。第 3 章では、この断片イオンの情報を基に測定パラメーターを作成し、ヒト血清中の PUFA の定量解析に応用している。その結果、ヒト血清中(市販のボランティア 8 人)全てにおいて LxA4、LxB4、RvD1 が、一部の検体でそれらに加えて RvD2、RvE3 が観測された。また、本分析は血清 20μL という微量試料からの測定が可能であることも示している。

以上のように，本論文は生理活性をもつ PUFA 類の高感度分析のための方法として有用であるのみならず、実際の臨床検体に応用可能であることを示しており、理学、医学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。