

全主要リン脂質クラスに対する酵素蛍光定量法の開発

森田 真也

はじめに

リン脂質とは、親水性のリン酸頭部基と疎水性のアシル鎖領域を持つ両親媒性化合物の総称であり、地球上のほぼすべての動物細胞・植物細胞・真菌細胞・細菌において必須の膜構成分子となっている。また、ヒトを含む哺乳類の体内では、血漿リポタンパク質・細胞外小胞・胆汁混合ミセル・肺サーファクタントなどの主要成分である。そして、体内でのリン脂質の代謝や輸送の異常が、脂質異常症や動脈硬化性疾患（心筋梗塞・脳梗塞）・肝疾患・神経疾患・自己免疫疾患・がん・筋障害・呼吸器疾患などの原因となることが報告されている。本稿では、リン脂質の構造と役割について概説し、筆者が開発した全主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法について紹介する。

リン脂質の構造

リン脂質は、分子構造からグリセロール骨格を有するグリセロリン脂質とスフィンゴシン骨格を有するスフィンゴリン脂質の大きく2種類に分けられる。さらにグリセロリン脂質は、頭部基の構造によりクラスに分けられ、哺乳類細胞には主に以下のクラスが存在している：ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL) (図1)¹⁾。一方、哺乳類細胞における主要なスフィンゴリン脂質は、頭部基としてリン酸コリンを持つスフィンゴミエリン (SM) である。これらのリン脂質には、さまざまな炭素数・二重結合数のアシル鎖が結合しており、その2本のアシル鎖の組合せにより、分子種としては数千種にもなる。さらに、グリセロール骨格にエステル結合したアシル鎖以外に、エーテル結合したアルキル鎖やアルケニル鎖を有するエーテル型リン脂質も存在している。また、結合しているアシル鎖が1本のみのリゾリン脂質も存在しており、それぞれリゾホスファチジルコリン (LPC)・リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)・リゾホスファチジルセリン (LPS)・リゾホスファチジン酸 (LPA)・リゾホスファチジルイノシトール (LPI)・リゾホスファチジルグリセロール (LPG) やスフィンゴシルホスホコリン (SPC) などと呼ばれている。

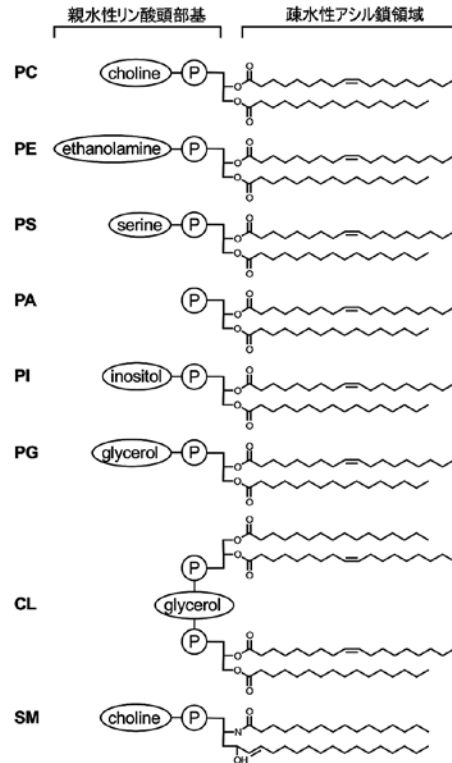


図1. 主要リン脂質クラスの分子構造。頭部基の構造により各クラスに分けられ、それぞれにさまざまな2本のアシル鎖が結合している。

リン脂質の役割

細胞膜 水溶液中のリン脂質は、自発的に疎水性のアシル鎖領域を内側に、親水性のリン酸頭部基を外側に向けることで二分子膜を形成する。その性質により、リン脂質はコレステロールとともに、細胞膜を形成している。細胞表面膜に加えて、小胞体・ミトコンドリア・核膜・ゴルジ体・リソソーム・エンドソーム・ペルオキシソームなどの細胞内小器官もリン脂質二分子膜により形成している。哺乳類の細胞膜を構成するリン脂質は、PCがおおよそ40～60%と最も多く、次いでPEが20～50%となっている。細胞膜での構造的役割や脂肪酸を供給するエネルギー源としての役割に加え、各リン脂質クラスそれぞれが、多種多様な膜タンパク質（トランスポーター・チャネル・レセプター・酵素など）の活性あるいは局在を調節する役割や、細胞内小胞輸送・細

胞内シグナル伝達・細胞増殖・細胞分化・細胞移動・オートファジー・アポトーシスなどにおいて欠かせない重要な役割をすることが知られている¹⁾。しかし、これらの細胞プロセスと各リン脂質クラスとの定量的関係についての検討はあまり行われていない。

血漿リポタンパク質 哺乳類の血漿中に存在する高密度リポタンパク質 (HDL)・低密度リポタンパク質 (LDL)・超低密度リポタンパク質 (VLDL)・カイロミクロンなどの血漿リポタンパク質は、リン脂質とコレステロールによる表面単分子膜がコレステリルエステルやトリグリセリドなどのコア脂質を包み込む粒子構造をしており、その粒子表面に数種類のアポリポタンパク質が結合している²⁾。リポタンパク質粒子表面に含まれるリン脂質は、主にPCとSMである。VLDLでのSM/PC比は約1/4であるが、LDLのSM/PC比は1/2程度にまで増加する。また、HDLでのSM/PC比は、約1/5である。リポタンパク質粒子表面のリン脂質は、アポリポタンパク質や酵素の粒子への結合を調節することにより、リポタンパク質粒子の代謝をコントロールしている。しかし、それぞれのリン脂質クラスがリポタンパク質代謝においてどのような働きをするのかは、ほとんど分かっていない。

従来のリン脂質定量分析法

薄層クロマトグラフィー (TLC) 従来、リン脂質定量分析法としてもっとも広く利用されてきたのは、TLCを用いる方法である (図2)。TLCで展開したリン脂質は、そのスポットの大きさや濃さからおおよその量を知ることができる。しかし、正確な量を求めるためには、そのスポットの境界を厳密に把握し、スパーテルなどを用いて丁寧に回収した後にリン定量を行わなければ

ならない。このため、TLC-リン定量法で各リン脂質クラスの量を正確に決定するには、熟練の技術が必要とする。また、感度が低いため、多量のサンプルを調製しなければならない。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) HPLCでリン脂質を分離した後、紫外分光検出器 (UVD) もしくは蒸発光散乱検出器 (ELSD) を用いて定量する方法も用いられている。しかし、UVDは、リン脂質分子内のアシル鎖二重結合の紫外吸収で検出するため、アシル鎖の種類による影響を強く受け、飽和アシル鎖のみを有するリン脂質は検出されない。また、ELSDは、すべてのリン脂質を検出できるが、その検出されるピークの大きさはアシル鎖の種類により変化する。このため、HPLC-UVDあるいはHPLC-ELSDでは、各リン脂質クラスの物質質量 (モル濃度) を求めることはできない。

質量分析 近年、生体組織サンプルに含まれる脂質分子を網羅的に分析する研究分野 (リポミクス) が、急激に活発になっている。質量分析は、そのリポミクスで用いられる手法の主流となっており、リン脂質に対してアシル鎖の種類を区別した分子種ごとに、きわめて高感度に検出する。一方で、PC・PE・PSなどリン脂質クラスとしての定量や比較は困難である。たとえば、哺乳類細胞内のPCに関して、2本のアシル鎖の組合せにより100種類以上の分子種が存在する。質量分析ではそれぞれの分子種がイオン化効率の異なるピークとして検出され、定量にはそれぞれの検量線が必要となる。そのため、質量分析は、アシル鎖組成の評価には非常に有効であるが、PCというクラス単位で量を正確に求めることには不向きである。

酵素定量法 酵素定量法とは、複数の酵素反応と化合物を組み合わせ、測定対象分子に特異的な吸光度もしくは蛍光強度の増加を生じさせることにより、その対象分子の量を求める方法である。リン脂質に対する酵素発色定量法は、1977年に高山らによって開発され、キット製品が販売されており、長年、基礎研究ならびに臨床検査において広く用いられている³⁾。この方法では、極性頭部基にコリンを有するリン脂質クラスであるPC・LPC・SMの合計量を求めている。その原理としては、まず、ホスホリパーゼDによりPC・LPC・SMからコリンを切り離し、続いて、コリンオキシダーゼにより過酸化水素 (H₂O₂) を発生させる。そして、ペルオキシダーゼ存在下で、H₂O₂は4-アミノアンチピリンとフェノールを酸化縮合させ、赤色キノンイミン色素を産生させる。この色素の吸光度 (極大吸収波長505 nm) を測定することにより、PC・LPC・SMの定量を行うことができる。

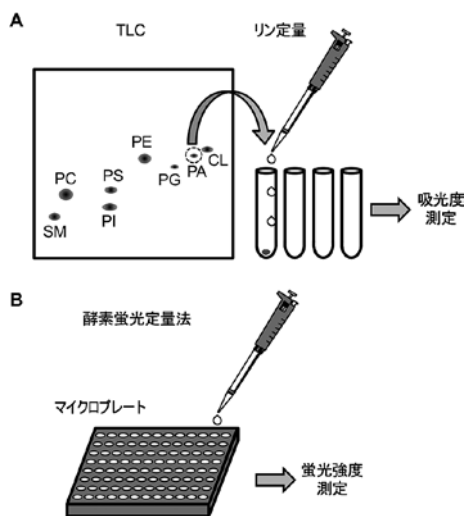


図2. TLC-リン定量法 (A) と酵素蛍光定量法 (B)

しかし、この酵素発色定量法では、PC・LPC・SMそれぞれを区別することはできない。

リン脂質クラス酵素蛍光定量法の開発

このように、従来の方法では、微量の生体サンプルに含まれているリン脂質をクラスごとに定量分析するには十分でなかった。そこで筆者は、リン脂質クラスごとに特異的に高感度かつハイスループットに定量できる方法を構築することが、脂質代謝研究のみならず、生命科学研究全般を進展させるために必要であると考え、各リン脂質クラスに対する酵素蛍光定量法の開発に取りかかった。そして、リン脂質クラスとしてPA・PC・PE・PS・SM・PG+CL・PIの酵素蛍光定量法を順番に開発し、主要リン脂質クラスに対する高感度ハイスループット定量法が遂に完成した^{1,4-9)}。以下に、これまでに開発したリン脂質クラス酵素蛍光定量法の原理ならびに特徴を紹介する。

PC酵素蛍光定量法 原理として、最初にPCにグリセロリン脂質特異的ホスホリパーゼD（ストレプトマイセス属由来）を作用させてコリンを遊離させる（図3）⁵⁾。次にコリンオキシダーゼ（アルカリゲネス属由来）によりコリンからH₂O₂を発生させる。ペルオキシダーゼ（セイヨウワサビ由来）の存在下で、H₂O₂により10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン（アンブレックスレッド）を蛍光化合物レゾルフィン（最大励起波長571 nm, 最大蛍光波長585 nm）へと変化させ、蛍光強度を測定することでPCの定量を行う。アンブレックスレッドを用いることで、前述した酵素発色定量法と比べてはるかに（約100倍）高い検出感度を得ることができ、このPC酵素蛍光定量法の検出限界は10 pmolである。グリセロリン脂質特異的ホスホリパーゼDは、LPCとSMに対して活

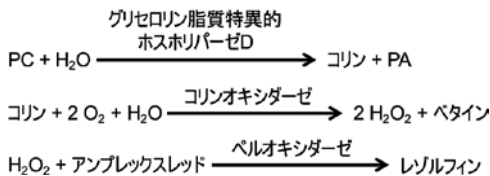


図3. PC酵素蛍光定量法の原理。PCから3段階の酵素反応を経て生成するレゾルフィンの蛍光強度を測定することにより、PCの量を求めることができる。

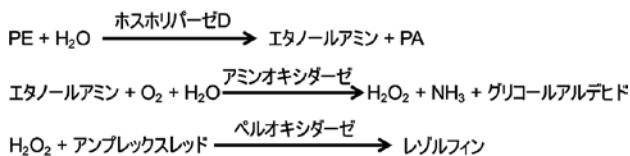


図4. PE酵素蛍光定量法の原理

性を示さないため、本定量法はPCに特異的である。また、分子内にさまざまなアシル鎖を有するPCならびにエーテル結合型（プラズマローゲン型）PCを区別なく同様に定量する。

PE酵素蛍光定量法 原理では、まず、ホスホリパーゼD（ストレプトマイセス属由来）によりPEからエタノールアミンを分離させる（図4）⁵⁾。続いて、アミノオキシダーゼ（アルスロバクター属由来）によりエタノールアミンを酸化することでH₂O₂を生じさせ、ペルオキシダーゼを用いてアンブレックスレッドをレゾルフィンに変化させ、蛍光強度測定を行う。このPE酵素蛍光定量法では、さまざまなアシル鎖を有するPEとエーテル結合型PEならびにLPEを同様に定量する。

PS酵素蛍光定量法 原理として、まず、PSからセリンをホスホリパーゼDにより切り離す（図5）⁶⁾。そして、アミノ酸オキシダーゼ（ガラガラヘビ由来）によりセリンを酸化し、H₂O₂を産生させ、アンブレックスレッドとペルオキシダーゼを用いてH₂O₂を検出する。この定量法では、さまざまなアシル鎖を有するPSとLPSを同様に定量する。

PA酵素蛍光定量法 原理の第一段階で、PAをリパーゼ（シュードモナス属由来）によりグリセロール-3-リン酸（G3P）と脂肪酸に分解する（図6）⁴⁾。次に、G3Pオキシダーゼ（ストレプトコッカス属由来）によりH₂O₂を発生させ、アンブレックスレッドとペルオキシダーゼにより検出する。この定量法では、PAとLPAにおいて同量で同等の蛍光強度増加が示され、PAとLPAの合計量を求めることになる。また、第一段階で代わりにモノグリセリドリパーゼ（バチルス属由来）を用いることにより、LPAのみの量を求めることができる。このLPAの量をPAとLPAの合計量から差し引くことにより、PAの量を知ることができる。

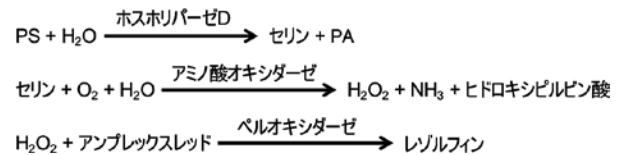


図5. PS酵素蛍光定量法の原理

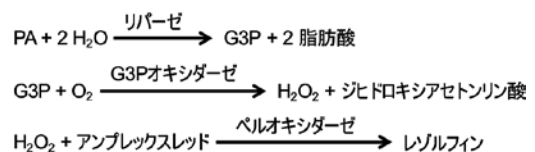


図6. PA酵素蛍光定量法の原理

PI酵素蛍光定量法 原理において最初の段階で、PIにホスホリパーゼDを作用させ、イノシトールを分離させる(図7)⁹⁾。続いて、イノシトールとNAD⁺にイノシトールデヒドロゲナーゼ(バチルス属由来)を作用させることにより、NADHを産生させる。次に、NADHオキシダーゼ(バチルス属由来)によりH₂O₂を生じさせ、アンプレックスレッドとペルオキシダーゼを用いて検出する。この定量法では、さまざまなアシル鎖のPIとLPIに加えて、さらにリン酸化されたPI(4)PとPI(5)Pと同様に定量するが、PI(3)PやPIP₂・PIP₃は検出されない。

PG+CL酵素蛍光定量法 PGとCLの合計量を求める酵素蛍光定量法では、まず、ホスホリパーゼDを働かせ、CLとPGからグリセロールを遊離させる(図8)⁸⁾。次に、グリセロールキナーゼ(セルロモナス属由来)によりグリセロールをG3Pとし、G3PオキシダーゼによりH₂O₂を生成させ、アンプレックスレッドとペルオキシダーゼにより検出する。この定量法では、さまざまなアシル鎖を持つPGとCLならびにLPGを区別せず同様に定量する。

SM酵素蛍光定量法 最初に、スフィンゴミエリナーゼ(バチルス属由来)によりSMからリン酸コリンを切り離し、続いて、アルカリホスファターゼ(ウシ由来)による脱リン酸化でコリンを産生させる(図9)⁷⁾。そして、コリンオキシダーゼによりH₂O₂を発生させ、ペルオキシダーゼ存在下でアンプレックスレッドに反応させることで検出する。非イオン性界面活性剤トリトンX-100を加えた反応溶液中では、スフィンゴミエリナーゼがLPCやSPCに活性を示さないため、SMを特異的

に定量できる。また、この定量法は、SMのアシル鎖の種類による影響を受けない。

以上の各リン脂質クラス酵素蛍光定量法の検出限界ならびに特異性を表1にまとめる。これらの定量法は、TLCやHPLCを使用する従来法と比べて高感度かつ高精度である。測定のための操作は、主にピペットによる96穴マイクロプレートへのサンプルと反応液の分注で、簡便に行うことができ、短時間でハイスループット定量が可能である(図2)。さらに、キット化することで自動測定も可能となるが見込まれる。

リン脂質クラス酵素蛍光定量法の応用

これまでに筆者らは、開発したリン脂質クラス酵素蛍光定量法を培養細胞実験に応用してきている。その中で、細胞内のリン脂質クラス組成が、細胞密度とともに劇的に変化することを明らかにした⁹⁾。このことから、細胞内リン脂質代謝は、細胞増殖や細胞間接着に伴って厳密に調節されていることが推察された。また、各種リン脂質合成関連酵素やリン脂質トランスポーターの機能について、酵素蛍光定量法を用いた検討を行っている^{5,6,8-12)}。さらに、培養細胞から単離したミクロソームやミトコンドリアなど細胞内小器官におけるリン脂質クラス組成評価も可能にしている^{8,9)}。従来の方では、培養細胞におけるリン脂質クラス定量分析は、細胞が密集したコンフルエントな状態でのみ行われていた。しかし、高感度な酵素蛍光定量法の開発により、細胞が分散した低細胞密度の状態や細胞内小器官レベルでのリン脂質クラス定量分析が可能となった。そして、酵素蛍光定量法での各

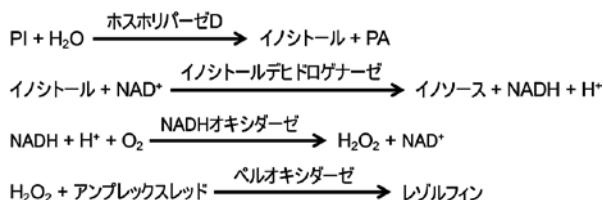


図7. PI酵素蛍光定量法の原理

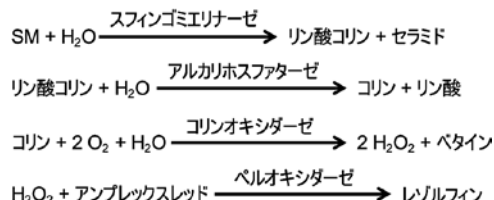


図9. SM酵素蛍光定量法の原理

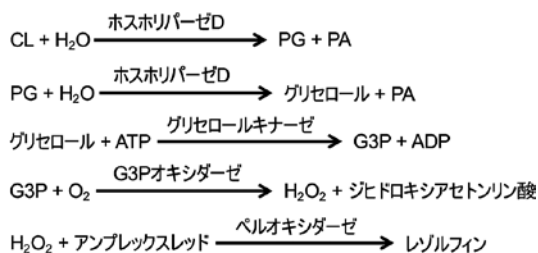


図8. PG + CL酵素蛍光定量法の原理

表1. リン脂質クラス酵素蛍光定量法の感度と特異性

定量法	検出感度 (pmol)	検出リン脂質クラス
PC	10	PC, エーテル結合型PC
PE	10	PE, エーテル結合型PE, LPE
PS	50	PS, LPS
PA	50	PA, LPA
PI	20	PI, LPI, PI(4)P, PI(5)P
PG + CL	10	PG, CL, LPG
SM	5	SM

リン脂質クラスの定量分析に加えて、さらに質量分析でアシル鎖分子種の評価を行うことで、リン脂質組成に関する情報がほぼすべて得られることになる^{5,10)}。

この全主要リン脂質クラス酵素蛍光定量法は、動物・植物・微生物実験を含む生化学・分子生物学分野や生理学分野、生物工学分野、薬理・創薬科学分野、栄養科学分野など生命科学全般で役立つ分析技術となり、各種疾患の治療や予防にも貢献できることを期待する。

文 献

- 1) Morita, S. Y. *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1032 (2020).
- 2) Morita, S. Y.: *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 1 (2016).
- 3) Takayama, M. *et al.*: *Clin. Chim. Acta*, **79**, 93 (1977).
- 4) Morita, S. Y. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **50**, 1945 (2009).
- 5) Morita, S. Y. *et al.*: *Biochem. J.*, **432**, 387 (2010).
- 6) Morita, S. Y. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **53**, 325 (2012).
- 7) Morita, S. Y. *et al.*: *Chem. Phys. Lipids*, **165**, 571 (2012).
- 8) Morita, S. Y. and Terada, T.: *Sci. Rep.*, **5**, 11737 (2015).
- 9) Tsuji, T. *et al.*: *Sci. Rep.*, **9**, 8607 (2019).
- 10) Morita, S. Y. *et al.*: *FEBS J.*, **278**, 4768 (2011).
- 11) Morita, S. Y. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **54**, 1221 (2013).
- 12) Ikeda, Y. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1864**, 1495 (2019).