論文要旨

総合論文

質量分析を利用した脂質メタボロミックスの現況

東 城 博 雅

大阪大学大学院 医学系研究科 生化学・分子生物学(H1) 生命機能研究科 細胞ネットワーク
(〒565-0871 吹田市山田丘 2-2)

エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法の進歩によって多種類の脂質の分子種組成を迅速に評価できるようになってきた。脂質は表面活性化合物であるため、イオン性のリン脂質だけでなく多くの中性脂質が ESI により高い効率でイオン化できる。常法の二層分離法により抽出した脂質を直接分析して各種脂質の分子種組成を調べるのに二つの方法が用いられている。ひとつは、他の分離技術を用いずに特定の脂質群のイオン化効率が高くなる溶媒条件下に、プリカーサイオンスキャンやニュートラルロススキャンなどのタンデム質量分析の技術を駆使する方法である。もう一つは、順相高速液体クロマトグラフィーで中性脂質からリン脂質にわたり一斉分離して質量分析計にオンライン接続して分析する方法である。これらの方法により効率の良い脂質メタボローム解析が可能になる。病態解析・創薬研究の牽引役であるプロテオミックスのパートナーとして脂質メタボロミックスの活躍が期待できる。

(連絡者：東城博雅) Vol.4, No.4, 147 (2004)

総合論文

脂質の蛍光検出とそのアプリケーション

森 山 達 哉

京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻 食品健康科学講座 食品分子機能学分野
(〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄)

近年、様々な新しい蛍光試薬が開発されてきている。これらは核酸やタンパク質などの染色や標識に多用されている。また、これらの新しい蛍光試薬の検出のための高感度蛍光検出装置の発展もめざましい。とくに、蛍光スキャナや蛍光イメージャーはその汎用性などから近年広く普及してきた。これらの装置は、TLC などで分離された脂質種を蛍光試薬で染色し、定量することにも用いられる。中性脂質やリン脂質を TLC にて分離した後、ローダミン、ジクロロフルオレセイン、プリムリンなどの蛍光試薬にて染色し、レーザー蛍光スキャナにて検出・定量した。また、最近では多くの種類の蛍光標識脂質が開発されており、さまざまな実験に用いられている。これらの脂質の蛍光検出を用いた実験手法は、ポストゲノム時代の脂質研究に有益に適用できるものと考えられる。

(連絡者：森山達哉) Vol.4, No.4, 157 (2004)

脂質の蛍光検出とそのアプリケーション

Fluorescence Detection of Lipids and Its Application

森山達哉

京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻

食品健康科学講座 食品分子機能学分野

〒611-0011

京都府宇治市五ヶ庄

Tatsuya MORIYAMA

Laboratory of Food Bioscience, Division of Molecular Function of Food

Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

Gokasho, Uji, Kyoto, 611-0011, JAPAN

Abstract: Recently various fluorescent reagents have been developed for detecting or probing nucleotides, proteins, and other molecules. Highly sensitive detection devices have also been developed. One of the most popular devices is fluorescent scanner or fluorescent imager. These analyzers are useful for detection and quantification of lipids stained with various fluorescent dyes and fluorescent lipids. Neutral lipids or phospholipids were separated on TLC and stained with fluorescent dyes. Stained lipids could be detected and quantified by a laser-fluorescent scanner. In addition, various kinds of fluorescent lipids have been developed and used for various experiments. Thus, fluorescence detection of lipids is useful and applicable to various lipid studies in post-genome era.

Key words: Lipid, Fluorescence Detection, Fluorescent Scanner, Thin Layer Chromatography (TLC), Fluorescent Lipid

1 はじめに

近年、分子生物学を中心としたバイオサイエンスの分野では、蛍光法や化学発光法を用いた実験手法が広く普及してきている。また、蛍光スキャナや蛍光イメージャーなどの蛍光検出機器にも著しい発展がある。これらの蛍光検出機器の発展は核酸やタンパク質の蛍光試薬による高感度検出の需要の高まりを追い風になっているが、脂質の検出・定量などにも応用可能である。また、脂質を蛍光標識するための蛍光誘導体化試薬や蛍光標識脂質もさまざまなバリエーションの化合物が開発されている。そこで本稿では、蛍光検出に関する一般論を概説したのち、蛍光スキャナによる脂質の蛍光検出について私たちのデータを中心に紹介する。また、その他の脂質の蛍光検出や、蛍光標識脂質を用いた研究に関しても少し紹介したい。

2 蛍光検出の利点、特性および実験方法

蛍光検出を用いた実験の利点は、1) 発色法と比べて一般的により高感度である。2) クエンチングや FRET,

溶媒効果、蛍光偏光、時間分解蛍光といった特有の性質を利用できるものがあり、これらを応用した“トリッキー”な実験系が組める(後述する)。3) 励起波長や検出波長の異なるさまざまな蛍光物質があり、これらをうまく組み合わせることによってマルチラベル(多重標識)が可能である。4) 蛍光染色の場合、対象物質に対して非破壊的であることが多いので、染色・検出後に他のより詳細な解析が可能である。などの点が挙げられる。また、蛍光検出を用いた実験手法では一般的に、プレラベル法やポストステインなどの方法がある(Table 1)。これらの蛍光検出の利点や特性、実験方法は脂質の蛍光検出にも当てはまる。

3 蛍光検出機器

このような蛍光検出のメリットを生かすためには、適切な蛍光検出装置が必要となる。蛍光検出装置には大きく分けて3種類あり、1) 溶液(溶媒)中の物質の蛍光強度を総和として測定する蛍光分光光度計、2) ゲルやメンブレンフィルターなどにトラップされた物質の蛍光強度のイメージを2次元的に解析する蛍光検出イメージャー(蛍光スキャナなど)、さらに、3) よりマイクロなエリアでのサンプル中の蛍光を検出するための蛍光顕微

連絡者: 森山 達哉
E-mail: moriyama@kais.kyoto-u.ac.jp

Table 1 蛍光検出を用いる一般的実験手法

分 類	方 法	適 応 例
プレラベル法	分析したいサンプルをあらかじめ蛍光標識しておき、分離後、目的のサンプルを蛍光検出する。	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質のプレラベル・ディフェレンシャル検出 (DIGE 法) DNA の蛍光シーケンス 蛍光誘導体化した脂質を HPLC にて分離後検出 など
ポストステイン法	分析したいサンプルを分離後、蛍光染色剤によって染色し、蛍光検出する。	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質や核酸のゲル電気泳動後の蛍光染色 TLC 上の脂質の蛍光試薬による染色 ポストステイン蛍光ディフェレンシャルディスプレイ など
酵素標識法	酵素によりサンプルを直接または間接的に標識し、分離後に酵素反応を行わせ、生成した蛍光酵素反応産物を検出する。	<ul style="list-style-type: none"> ウエスタンブロッティングの化学蛍光検出 蛍光 ELISA など
蛍光標識プローブハイブリダイゼーション法	蛍光標識したプローブを用いて、対象サンプルにハイブリダイズさせたのちに蛍光検出を行う。	<ul style="list-style-type: none"> DNA マイクロアレイ解析 蛍光標識プローブを用いた <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション 蛍光標識抗体を用いたウエスタンブロッティング など

鏡などである。1) のタイプには、HPLC の蛍光検出器や蛍光マイクロタイタープレートリーダーなども含まれる。また、DNA マイクロアレイスキャナは 2) のタイプに分類される。その他、蛍光セルソーター (FACS) なども蛍光検出装置の一種として分類できる。また、時間分解蛍光や蛍光偏光を測定する場合は、これらを測定モードとして有する蛍光マイクロタイタープレートリーダーが必要である。

4 蛍光検出イメージャーについて

蛍光検出装置のうち、多くの実験に利用できる汎用性の高い機器として、蛍光検出イメージャーが挙げられる。蛍光検出イメージャーとは、励起光をサンプルに照射し、その結果得られる蛍光シグナルを種々のエミッションフィルターによって選択的に検出し、2次元の蛍光イメージ画像を得る装置の総称である。大きく分類すると、スキャナタイプと CCD カメラタイプに分かれる。スキャナタイプは一般に蛍光スキャナとも呼ばれる。これらの蛍光検出イメージャーの励起光源には主に 2 通りあり、レーザー光源を採用したものと、ランプ光源を光学フィルターにて分光して励起光源とする方法がある。近年の装置では、スキャナタイプ (蛍光スキャナ) ではレーザー光源を、CCD カメラタイプのイメージャーではランプ光源を採用したものが多く、レーザー光源の場合、単一の波長の光を極めて高いエネルギーで狭い範囲に照射できるため、感度や分解能が優れている。近年の蛍光スキャナは、複数のレーザー光源を搭載していることが多いので、汎用される蛍光試薬のほとんど大半が高感度に検出可能である。これらの蛍光検出イメージャーは電気泳動ゲルによって分離されたタンパク質や核酸の蛍光検出に汎用されている。また、レーザー光源を搭載した高性能蛍光スキャナの場合、イメージングプレート (富士写真フイルム社) やストレージフォスファスク

リーン (コダック社) などの媒体を介して放射性同位体 (RI) 化合物の検出も可能であり、X 線フィルムよりも感度が良く定量解析もできて、便利である。また、一部の蛍光スキャナや大半の CCD カメラタイプイメージャー (冷却 CCD を装着している機種) では、ウエスタンブロッティングなどで汎用される化学発光 (ケミルミネセンス) シグナルも検出できる。

近年の蛍光スキャナには、532 nm の SYAG レーザー、633 nm の He-Ne レーザー、488 nm, 457 nm の Ar レーザーなどが単独、または複数で搭載されている。また、近赤外領域の半導体レーザー (700 nm, 800 nm) を搭載し、長波長域に吸収・蛍光スペクトル有する蛍光試薬の検出に特化したユニークな蛍光スキャナも開発されている。このような長波長域での検出のメリットは、サンプルやメンブレンなどが有する自家蛍光の影響が少なく、シグナルノイズ比が極めて優れている点である。

このように、さまざまな波長のレーザー光源を搭載した蛍光スキャナが開発され、またそれに合わせるように多彩な蛍光試薬が開発されてきている。その恩恵によって、蛍光スキャナは色々な実験に適用可能であり、多くのアプリケーションに利用できるようになっている (Table 2)。

5 TLC 上の脂質の蛍光スキャナによる蛍光検出

Table 2 にも示すように、脂質の検出・定量にも蛍光スキャナが利用できる。特に、薄層クロマトグラフィー (TLC) にて分離した脂質の検出や定量に便利である。TLC は脂質成分を簡便に分離するために古くから用いられているが、この TLC 上で分離された脂質成分を検出・定量するために蛍光試薬を噴霧する方法がある。これまでは噴霧後、200-300 nm 付近の励起波長を有する紫外線ランプで検出することが多かったが、近年普及してきたレーザー蛍光スキャナが高感度な検出を可能とし

Table 2 蛍光スキャナを用いる各種実験手法

解析対象	実験手法	用いられる蛍光染色試薬・蛍光標識物質	備考
タンパク質	<ul style="list-style-type: none"> • SDS-PAGE • 2D-PAGE • メンブレン上のタンパク質検出 • ウェスタンブロッティング (直接標識) • ウェスタンブロッティング (酵素標識) • 抗体アレイ・プロテインアレイ • 蛍光タンパク質タグの検出 	<ul style="list-style-type: none"> • Sypro-Ruby, Deep Purple, Sypro Red など • Sypro-Ruby, Deep Purple, Sypro Red など • Sypro-Ruby for Blot • Fluorescein, Alexa Fluor など • ECL plus (HRP 用基質), ECF (AP 用基質) • Cy3, Cy5 など • GFP などの蛍光タンパク質 	<p>Sypro-Ruby や Deep Purple は銀染色に近い感度を有する。</p> <p>抗体アレイ・プロテインアレイはまだ発展途上の手法。</p>
核酸 (DNA)	<ul style="list-style-type: none"> • ゲル中の DNA (一般的な電気泳動) • 蛍光ディフェレンシャルディスプレイ • DNA マイクロアレイ (スライドガラス) • DNA マクロアレイ (メンブレンタイプ) 	<ul style="list-style-type: none"> • SYBR Green, SYBR Gold, Vistra Green など • SYBR Green など • Cy3, Cy5 など • ³²P シグナルをストレージフォスファを介して検出 	DNA マイクロアレイには専用の蛍光スキャナが開発されている。
脂質	<ul style="list-style-type: none"> • TLC プレート上の全脂質 • TLC プレート上の蛍光標識脂質 • メンブレン上の全脂質? • メンブレン上の蛍光標識脂質 	<ul style="list-style-type: none"> • ローダミン 6G, DCF, プリムリンなど • BODIPY-標識脂質など • ローダミン 6G, DCF, プリムリンなど? • BODIPY-標識脂質など 	本文参照

Sypro-Ruby, Sypro Red, Sypro-Ruby for Blot, Alexa Fluor, SYBR Green, SYBR Gold, BODIPY は Molecular Probes 社の商品。
Deep Purple, ECL plus, ECF, Vistra Green は Amersham Biosciences 社の商品。

た。また、これらの蛍光スキャナには、定量解析を可能とするような画像解析ソフトがセットになっていることが多いので、既知量のスタンダード脂質と同時に展開することによって未知試料中の脂質種の大まかな定量解析が可能となった。また、後述する蛍光標識脂質を TLC にて分離したのち、蛍光スキャナにて検出・定量することも可能である。

5.1 ローダミン 6G を用いた中性脂質種の蛍光検出・定量

私たちは、主要な中性脂質種 (コレステロール, コレステロールエステル, トリグリセリド, ジグリセリド, モノグリセリド, 遊離脂肪酸) を展開溶媒 (ヘキサン: ジエチルエーテル: 酢酸 = 70:30:1, v/v) の 2 重展開 (同一方向への重複展開) にて分離後, 0.00003 % のローダミン 6G を噴霧し, これらの主要な中性脂質種を蛍光スキャナにて検出・定量し, 報告した¹⁾。この方法では, 各脂質種の量と蛍光強度との対応を, およそ 20-1000 μg の範囲で検量線を描くことができ, スタンダード脂質を同時に分離することによってこの範囲で定量することが可能であることを示した。一般的に, ローダミンを噴霧し, UV ランプ等で検出する際は, 0.03 % 程度の濃度を用いるが, レーザー蛍光スキャナによって検出する際には, この濃度では濃すぎてバックグラウンドシグナルが高くなった。そこで 1000 倍薄い 0.00003 % の極めて低濃度のローダミンを噴霧した。検出後に脂質スポットを掻き取り脂肪酸をメチル化しガスクロマトグラフィーにて脂肪酸分析を行うことも可能であった。噴霧した蛍光試薬は各脂質種に対して非破壊的なので, おそらく質量分析 (MS) によっても解析可能であると思われる。

ローダミンによって検出した蛍光シグナルが脂質種を構成する脂肪酸の種類によって変化するかどうか, コレステロールエステル, トリグリセリド, 遊離脂肪酸に関して, 一定量のさまざまな分子種の脂質を展開し, 本法にて検出・測定したが, 分子種による蛍光強度の変化はほとんど見られなかった。また, 肝臓から脂質を抽出し, トリグリセリド量や総コレステロール量を酵素法と本法の 2 通りで測定した結果, 非常に良い相関が見られた。

5.2 ジクロロフルオレセインやプリムリンを用いた中性脂質, リン脂質種の蛍光検出・定量

その後, ローダミン 6G よりも高感度な蛍光検出試薬をスクリーニングした²⁾。用いた蛍光試薬の構造を Fig. 1 に示す。その結果, Fig. 2 に示すように, 蛍光試薬によって感度やバックグラウンドシグナルの強度などが異なった。これらは蛍光スキャナのエミッションフィルターの種類によっても変わり, また, 当然のことながら, フォトマルチチューブ感度 (PMT 値) によっても変動した。これらの多くの蛍光試薬のうち, 2', 7'-ジクロロフルオレセイン (以下ジクロロフルオレセインと略す) やダイレクトイエロー 59 (別名プリムリン; 以下プリムリンと表記する) が感度やシグナルノイズ (S/N) 比などで優れていた。そこで, これら 2 つの蛍光試薬を選び, その感度や特異性などについてさらに調べた³⁾。

まず, はじめに, 検出限界について調べた。その結果, プリムリンでは 1-5 μg 程度, ジクロロフルオレセインでは 2-5 μg 程度の脂質まで検出可能であった。スタンダードの脂質量を変え, 蛍光検出強度との相関をしらべたところ, 300-500 $\mu\text{g}/\text{band}$ 程度までほぼ直線的

に相関した (Fig. 3)。従って、この範囲であれば、既知量の標準脂質を同時展開することによって、目的の脂質の量を見積もることが可能であった。

Fig. 1 脂質を蛍光検出するためにスクリーニングした蛍光試薬類の構造

つぎに、検出する脂質の分子種による蛍光強度の違いを調べた。Fig. 4 には2つの蛍光試薬による各種分子種の検出イメージと蛍光検出強度の違いを示す。ジクロロフルオレセインの場合はローダミン 6G の場合と同様に分子種による蛍光強度の違いがほとんど見られなかったが、プリムリンの場合は二重結合が2つ以上あると蛍光強度が著しく増大することがわかった。これらの結果から、不飽和脂肪酸を含む脂質種を感度よく検出するにはプリムリンが適しており、逆に生体から抽出してきたような多様な分子種からなる脂質種を公平に検出・定量するためにはジクロロフルオレセインが適していることが明らかとなった。いずれの蛍光試薬も脂質サンプルに対して非破壊的であり、その使用濃度も極めて薄いので、検出・定量に続いて TLC プレートから対応する画分を分取し、ガスクロマトグラフィーや質量分析などに供することが可能である。

実際に、ジクロロフルオレセインにて検出したのち、TLC プレートから脂質を抽出し、メチル化サンプルをガスクロマトグラフィーにて検出した。蛍光試薬を用いずに TLC プレートから脂質を抽出した場合とクロマトパターンに差は見られなかった。

また、主要な中性脂質とリン脂質を1枚の TLC プレートに2次元展開し、ジクロロフルオレセインを噴霧後、蛍光スキャナにて検出した。Fig. 5 には、標準脂質を用いた検出イメージを示すが、この方法を2つの比較したい生体由来の脂質サンプル間で行うことにより、2つの異なるサンプル中で大きく変動する脂質種を網羅的に判定することが可能である。この方法は最も簡便なりピドーム解析（あるいはリピッドディフェレンシャルディスプレイ解析）と定義することができる。

現在、生体中の脂質の量的・質的な変動を網羅的に解析する研究（リピドーム解析、脂質のメタボローム解析、リボミクスなどと呼ばれる）が注目を集めている。本方法はその最も簡便でラフな分析手法と位置付けることができるが、より微量成分を精密に分析するためには HPLC とエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) を用いた分析法⁴⁾ が有効である。

今回は検討していないが、532 nm 以外の励起レーザー光源に適合した脂質検出用の蛍光試薬も見いだされる可能性がある。これらの異なる波長でのレーザー励起において感度やシグナル/ノイズ比、分子種特異性などがどのようになるかは今後の検討が必要である。

6 蛍光標識脂質について

蛍光試薬のリーディングカンパニーである Molecular Probes 社が BODIPY 標識脂肪酸をコアとした各種蛍光

Fig. 2 蛍光検出試薬のスクリーニング (中性脂質)

Fig. 3 ジクロロフルオレセインを用いた中性脂質種の検出と検量線

A, Scanning image. 各標準中性脂質種を等量ずつ混合し, TLC プレートにアプライして常法に従って展開・分離した。分離した脂質は 2',7'-Dichlorofluorescein をスプレーし, Typhoon 8600 にて蛍光検出した。Excitation laser は 532 nm, Emission filter は 560 nm を使用した。

B, A で得られた各スポットを ImageQuant software (Amersham Biosciences) にて定量化し, 対応する脂質種について横軸に脂質量, 縦軸に蛍光強度をとって検量線を作成した。

[森山達哉ら, 実験医学, 21(3), 403-8(2003)]

標識脂質を開発し, 販売している。これらの蛍光標識脂質は主に蛍光顕微鏡と組み合わせて細胞の膜構造の検出に用いられるが, それ以外にもさまざまなアプリケーションが可能である。蛍光標識脂質を含むさまざまな蛍光試薬について膨大な情報が掲載された, 非常に詳細でかつ美しいハンドブックが Molecular Probes 社から

供給されており, 詳細はこのハンドブック⁵⁾を参照されたい。また, このメーカーの web ページ (<http://www.probes.com>) も充実している。

6.1 蛍光標識脂肪酸

Molecular Probes 社が開発・市販している蛍光標識脂肪酸には, さまざまな種類がある。標識蛍光官能基とし

Fig. 4 分子種による蛍光強度の差

図中に示した中性脂質の各分子種を 100 μ g ずつ TLC プレートにアプライし、展開・分離した。各脂質を分離後、0.0002 % のジクロロフルオレセイン(a) または 0.05 % のプリムリン(b) をスプレーし、蛍光検出した。検出したイメージを定量解析ソフトにて定量化し、縦軸に標準脂質 (各々 16:0) に対する蛍光強度 (%) をとってグラフ化した。

[森山達哉ら, 実験医学, 21(3), 403-8(2003)]

では、BODIPY シリーズのほか、NBD (nitrobenzoxadiazole), Pyrene, Dansyl, などがある。その他、自然界に存在する蛍光脂肪酸として、cis-parinaric acid がある。BODIPY には、光学特性の異なるさまざまな分子があり、使い分けができる。

6.2 蛍光標識リン脂質

蛍光標識リン脂質には、大きく分けて 2 種類ある。1 つは蛍光標識脂肪酸をアシル鎖に有するもので、もう 1 つは極性頭部に蛍光標識がされたものである。前者は、上で述べた種々の蛍光標識脂肪酸をアシル基として有する。一方、極性頭部の蛍光標識には、Dansyl, Marina Blue, Pacific Blue, NBD, BODIPY, フルオレセイン, などが使われている。極性頭部の蛍光標識にはラベルのし易さから、PE (ホスファチジルエタノールアミン) が多い。

6.3 その他の蛍光標識脂質

スフィンゴ脂質やステロイド, トリグリセリド, リポポリサッカライドなどに関しても蛍光標識されたものが開発されている。また、これらは主に (1) の蛍光標識脂肪酸をベースにして合成されたものである。また、脂質ではないが、蛍光標識リポタンパク質も開発されている。

7 FRET とクエンチング

蛍光標識脂質を用いたさまざまなアプリケーションが開発されているが、その背景として、蛍光物質特有の性質である FRET とクエンチングの存在を忘れることはできない。これらのユニークな特性を応用して蛍光物質のさまざまなアプリケーションが成り立っている。

7.1 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

ある条件を満たした 2 種類の蛍光物質 (ドナーとアクセプター) が、ある条件下に共存したとき、ドナー蛍光物質が吸収したエネルギーをアクセプター蛍光物質に与える。このとき、アクセプター蛍光物質は励起され、蛍光を発する。この現象を FRET という。FRET が起こるためには、ドナーとアクセプターが接近していることや、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なりが大きいことなどの条件がある。また、当然のことながらアクセプターの極大吸収波長はドナーの極大吸収波長よりも長波長側になる必要がある。この FRET は、蛍光標識された 2 分子間の相互作用の解析に主に応用されている。

7.2 クエンチング (蛍光消光)

励起された蛍光分子に、クエンチャーと呼ばれる分子

Fig. 5 2次元 TLC による主要な生体由来脂質種の一括分離と蛍光検出

標準中性脂質 6 種 (MG, DG, TG, FA, FC, CE) および標準リン脂質 (SPM, PC, PS, PI, PE, PA) を 50 μ g ずつ原点 (origin) にアプライした。これを 3 種の溶媒で 3 重展開し、全ての脂質種を TLC 上に二次元的に分離した。続いて 0.0002 % の 2', 7'-ジクロロフルオレセインをスプレーし、蛍光検出した。

[森山達哉ら, 実験医学, 21(3), 403-8(2003)]

が共存すると、蛍光エネルギーが散逸し蛍光が消失する。従って、ある分子に蛍光標識しておき、その蛍光物質に対するクエンチャーを有する分子との相互作用を起こさせると、蛍光強度が減少する。反対に、クエンチャーと共存している環境下から、蛍光標識された分子のみが移動することによって蛍光が増加する。酵素活性測定用の蛍光基質にこのクエンチングを応用したものや、脂質転送タンパク質の活性測定に応用した例などがある。

8 蛍光標識脂質を用いた種々のアプリケーション

さて、さきに述べた多彩な蛍光標識脂質を用い、FRET やクエンチングなどの特性を利用してさまざまな解析を行うことが可能である。その主な例をいくつか紹介する。

8.1 メンブレンプローブとして

蛍光標識脂質などのハイドロフォobicな蛍光分子は、生きたままの細胞中の細胞膜のリン脂質 2 重層へと容易に取り込まれる。したがって、細胞膜の形態や動的な変化を蛍光顕微鏡などを用いて追跡することが可能となる。

8.2 脂質代謝をモニターするツールとして

一部の BODIPY 標識脂肪酸などの蛍光標識脂肪酸は、代謝的に細胞に取り込まれ、細胞のリン脂質や中性脂質中に取り込まれる。この現象を利用して、細胞のリン脂質や中性脂質生合成の機構を解析することが可能である⁶⁻⁸⁾。堀内らも、PPAR γ アゴニスト刺激を行い、分化と脂肪合成を誘導させたヒト血液細胞株 (NB4) 細胞に蛍光標識脂肪酸 (BODIPY-C12) を取り込ませた後、脂肪球にこの蛍光脂質が取り込まれ、また、脂質抽出後 TLC にて解析し、蛍光標識トリグリセリドや蛍光標識コレステロールエステルなどが生成していることを見だしている⁹⁾。このように、近年では、実験系によっては、脂肪酸の取り込みや生合成・代謝系などをトレースするためのアイソトープ標識脂肪酸の代替としてこの蛍光脂質が使用されつつある。しかしながら、蛍光官能基の存在が生理的な反応に干渉する可能性もあるため、この点に留意する必要があると思われる。

また、当然ながら、蛍光標識脂肪酸を含む脂質は TLC での移動度が本来の脂質と異なるために注意が必要である。

8.3 脂質の転送・移動をモニターするツールとして

蛍光標識した中性脂質のリボソーム間の転送反応をモニターすることによって、CETP (コレステロールエステルトランスファープロテイン) や MTP (マイクロソームトリグリセリドトランスファープロテイン) の活性を測定することも可能である。CETP はリポタンパク質 (HDL と VLDL) 間で、トリグリセリドとコレステロールエステルを交換する活性を有するタンパク質である。その生理的な意義等、議論が分かれているが、CETP 阻害剤によってウサギの動脈硬化が改善したという報告¹⁰⁾があり、注目に値する。MTP は肝臓や小腸などにおいて、低密度リポタンパク質 (VLDL やカイロミクロン) の生合成の際に、トリグリセリドなどの中性脂質をアポ B タンパク質に転移させる働きをしている。この分子はこれらのリポタンパク質の生合成・分泌過程にきわめて重要な役割を演じており¹¹⁾、血清脂質レベルを低下させるためのターゲット分子の一つである。これら 2 つの脂質転送タンパク質は、蛍光標識された中性脂質を用いた類似の原理で測定できる^{12, 13)}。すなわち、ドナーリボソーム中では蛍光中性脂質はクエンチングを受けており、蛍光が消光されているが、CETP や MTP などの脂質転送活性によってアクセプターへ移行することによってクエンチングから逃れ、蛍光の増大が観察される。この蛍光強度の増加をもって、これら脂質転送タンパク質の活性を評価する仕組みとなっている。この蛍光の増加を蛍光マイクロタイタープレートリーダーによ

Fig. 6 ヒト肝臓またはアストロサイトーマ細胞のマイクロソーム画分における MTP 活性 (蛍光中性脂質の転送活性にてモニターした。)

て測定する。私たちは、このアッセイ系を用いて、ヒト肝臓マイクロソーム画分のみならず、ヒト脳アストロサイトーマ細胞 CCF-STTG1 のマイクロソーム画分中にも、MTP 活性があることを示した (Fig. 6)。また、活性測定に加えて、RT-PCR やウエスタンブロットティングによって、MTP の組織分布を詳細に調べた。その結果、この MTP は、肝臓、小腸だけでなく、心臓や脳、脾臓、腎臓などにも存在することを見いだした¹⁴⁾。CETP についても、ヒト CETP のトランスジェニックマウスにおいては、野生種マウスと比べて著しい蛍光強度の増大が見られ、このアッセイ系によって CETP 活性を評価できることが強く示唆された。私たちはこれらの測定系を用いて、ヒトの MTP や CETP を抑制する食品成分の探索を行っている。

8.4 膜の融合をモニターするツールとして

エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの細胞内での膜小胞のオルガネラ膜との融合 (membrane fusion) は、重要な細胞機能の一つである。このような膜の融合にはさまざまなタンパク質や脂質が関与していることが知られており、精力的に研究が行われている。このような膜の融合のプロセスを解析するために、蛍光標識脂質は有効なツールとなる¹⁵⁻¹⁸⁾。原理としては、FRET やセルフクエンチングなどを応用している。すなわち、FRET を引き起こすような組み合わせの 2 種類の蛍光標識リン脂質を含むリポソームに、これらを含まないリポソームを融合させる。うまく融合すれば、2 種類の蛍光標識リン脂質が希釈され、蛍光官能基間の距離が離れ、FRET が減弱する。これを検出することによって膜融合をモニターできる¹⁷⁾。また、セルフクエンチングしている蛍光標識脂質を含むリポソームと、これらを含まないリポソームを用意し、膜の融合によっておこるクエンチングからの解放に伴う蛍光強度の増加をモニターする方法¹⁸⁾ などがある。

8.5 脂質代謝酵素活性測定のための基質として

Pyrene 標識脂肪酸を 2 本のアシル側鎖に有するホスファチジルコリン (PC) は、eximer として 470nm 付近の波長域に蛍光を発するが、ホスホリパーゼ A₂ の作用によって 1 本のアシル側鎖が遊離すると Pyrene 標識脂肪酸がモノマーとなり、エミッションシフトが起こり、400 nm 付近の蛍光を発するようになる。この性質を利用してホスホリパーゼ A₂ の基質として利用できる¹⁹⁻²¹⁾。

また、Pyrene 標識脂肪酸を有するトリグリセリドはリポタンパク質リパーゼや肝性リパーゼの基質として利用される²²⁾。また、ユニークな例として、蛍光コレステロール (NBD-cholesterol) を用いた ACAT の活性測定 of cell-base assay 系が構築され、ACAT 活性阻害剤のスクリーニングに応用されている²³⁾。

8.6 脂質とタンパク質の相互作用を解析するツールとして

脂肪酸結合タンパク質 (FABP) と蛍光脂肪酸の結合²⁴⁾ や、ステロールキャリアプロテイン (SCP) と蛍光ステロールとの結合、植物のリピッドトランスファープロテイン (LTP) と蛍光脂肪酸との結合²⁵⁾ などの解析例が報告されている。

9 脂質のプレラベル蛍光標識と HPLC による分離・定量

9.1 脂肪酸の蛍光標識と HPLC による分離・定量

脂肪酸はメチル化後、ガスクロマトグラフィーにて分離定量する方法が一般的であるが、蛍光試薬によって標識し、HPLC にて分離・定量する方法も知られている。この目的のための蛍光標識試薬として、ADAM (9-Anthryldiazomethane) がよく知られている。このほかに、近年では Br-DMEQ, BMBT などが知られている。これらは市販の試薬として、フナコシ (ADAM) や、ドージン (Br-DMEQ, BMBT) などから入手可能である。

9.2 ジアシルグリセロールの蛍光標識と HPLC による分離・定量 (リン脂質分子種分析)

リン脂質の分子種分析を行うために、ホスホリパーゼ C 処理によってリン脂質の極性頭部を切断し、得られたジアシルグリセロールなどのジラシルグリセロールをアンソイル化し、蛍光検出器を装備した HPLC にて分離・定量する方法が報告されている²⁶⁾。この方法では、フェムトモルレベルの微量サンプルの検出も可能である。

10 脂質のプレラベル蛍光標識とミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) による分離・定量

近年、リン脂質などの脂質の分離・検出・定量などにキャピラリー電気泳動システムを用いたミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) が適用可能であり、注目を受けている²⁷⁻³⁰⁾。この方法では、TLCやHPLCのように移動層として多量の有機溶媒を用いる必要がない。MEKCでは、イオン性の界面活性剤を泳動バッファーに添加し、ミセルを形成させる。脂質などの極性に乏しい物質はミセル内部との疎水性相互作用によりミセルとともに移動する。疎水性相互作用の違いによって脂質などの疎水性物質の移動度が異なり、分離することができる。このシステムの検出部にレーザー蛍光検出装置を装着することによって、蛍光標識された脂質を分子種レベルで分離・定量検出できる。Zhangら³¹⁾は、PEなどのアミノリン脂質を標識する蛍光物質 (3-(2-Furoyl) Quinoline-2-carboxaldehyde) を開発し、さまざまな分子種のPEを蛍光標識し、メチル β シクロデキストリンを用いたMEKCによって分離し、蛍光検出した。また、Linら³²⁾は、レーザー励起の蛍光検出装置を検出部に備えたMEKCベースの微流路チップシステムを用いて、蛍光脂質を基質としたハイスループットな脂質代謝酵素 (ホスホリパーゼA₂など) 活性のアッセイ方法を報告している。

11 おわりに

ポストゲノム時代の幕開けとともに、多くのバイオサイエンスの研究者たちは、遺伝子の構造から、タンパク質や脂質、糖鎖、低分子代謝産物などにその興味の対象を移しつつある。そして、生物そのものの巧妙な仕組みを理解するためには、ゲノムとこれらの“ゲノムの産物”との対応を有機的に解析し、線で結ぶ作業が重要になってくると思われる。このような時代において、脂質の生理機能に関する研究や脂質代謝の変動解析の重要性は増えつつある。脂質の蛍光検出を用いたさまざまな実験手法がこのような研究に役立つものと考えられる。

謝辞

本稿で紹介した著者らの研究の一部は、生研機構 (現・生研センター) からの研究助成を受けて行われた。

文 献

- 1) K. Kishimoto, R. Urade, T. Ogawa & T. Moriyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281, 657-62 (2001).
- 2) 前淵元宏, 内山元子, 岸本恵子, 待鳥美佳, 裏出令子, 小川 正, 森山達哉, 脂質生化学研究, 44, 121-4 (2002).

- 3) 森山達哉, 前淵元宏, 岸本恵子, 実験医学, 21, 403-8 羊土社 (2003).
- 4) 田口 良, ファルマシア, 36, 283-7 (2000).
- 5) R.P. Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 9th edn, Molecular Probes (2003).
- 6) J. Kasurinen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 1594-601 (1992).
- 7) N.J. Faergeman, C.C. DiRusso, A. Elberger, J. Knudsen & P.N. Black, *J. Biol. Chem.*, 272, 8531-8 (1997).
- 8) Y. Kliger, S.A. Gallo, S.G. Peisajovich, I. Munoz-Barroso, S. Avkin, R. Blumenthal & Y. Shai, *J. Biol. Chem.*, 276, 1391-7 (2001).
- 9) 堀内晶子, 大熊恵美子, 中津雅美, 佐伯久美子, 八杉悦子, 湯尾 明, 神坂 泰, 脂質生化学研究, 45, 279-80 (2003).
- 10) H. Okamoto, F. Yonemori, K. Wakitani, T. Minowa, K. Maeda & H. Shinkai, *Nature*, 406, 203-7 (2000).
- 11) J.R. Wetterau, L.P. Aggerbeck, M.E. Bouma, C. Eisenberg, A. Munck, M. Hermier, J. Schmitz, G. Gay, D.J. Rader & R.E. Gregg, *Science*, 258, 999-1001 (1992).
- 12) C.L. Bisgaier, L.L. Minton, A.D. Essenburg, A. White & R. Homan, *J. Lipid. Res.*, 34, 1625 (1993).
- 13) C.L. Bisgaier, A.D. Essenburg, L.L. Minton, R. Homan, C.J. Blankley & A. White, *Lipids*, 29, 811-8 (1994).
- 14) 小森将史, 前淵元宏, 待鳥美佳, 裏出令子, 小川 正, 森山達哉, 脂質生化学研究, 45, 217-20 (2003).
- 15) D. Hoekstra & N. Duzgunes, *Methods Enzymol.*, 220, 15-32 (1993).
- 16) Y. Barenholz, R. Pal & R.R. Wagner, *Methods Enzymol.*, 220, 288-312 (1993).
- 17) D.K. Struck, D. Hoekstra & R.E. Pagano, *Biochemistry*, 20, 4093-9 (1981).
- 18) D. Hoekstra, T. de Boer, K. Klappe & J. Wilschut, *Biochemistry*, 23, 5675-81 (1984).
- 19) H.S. Hendrickson & P.N. Rauk, *Anal. Biochem.*, 116, 553-8 (1981).
- 20) T. Bayburt, B.Z. Yu, I. Street, F. Ghomashchi, F. Laliberte, H. Perrier, Z. Wang, R. Homan, M.K. Jain & M.H. Gelb, *Anal. Biochem.*, 232, 7-23 (1995).
- 21) T. Thuren, J.A. Virtanen, P.J. Somerharju & P.K. Kinunen, *Anal. Biochem.*, 170, 248-55 (1988).
- 22) N. Dousset, A. Negre, R. Salvayre, P. Rogalle, Q.Q. Dang & L. Douste-Blazy, *Lipids*, 23, 605-8 (1988).
- 23) A.T. Lada, M. Davis, C. Kent, J. Chapman, H. Tomoda, S. Omura & L.L. Rudel, *J. Lipid Res.* Nov. 16 (E-published) (2003).
- 24) J. Storch, *Mol. Cell Biochem.*, 123, 45-53 (1993).
- 25) A. Zachowski, F. Guerbette, M. Grosbois, A. Jolliot-Croquin, J.C. Kader, *Eur. J. Biochem.*, 257, 443-448 (1998).
- 26) H. Takamura & M. Kito, *J. Biochem.*, 109, 436-9 (1991).
- 27) L. Ingvarsen, S. Michaelsen & H. Sorensen, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 71, 183-8 (1994).
- 28) R. Szucs, K. Verleysen, G.S.M.J.E. Duchateau, P. Sandra & B.G.M. Vandeginste, *J. Chromatogr.*, A 738, 25-9 (1996).
- 29) Y. Kobayashi, J. Matsui & F. Watanabe, *Biol. Pharm.*

- Bull.*, 18, 1614-6. (1995).
- 30) L. Zhang, S.N. Krylov, S. Hu & N.J. Dovichi, *J. Chromatogr., A* 894, 129-34 (2000).
- 31) L. Zhang, S. Hu, L. Cook & N.J. Dovichi, *Electrophoresis*, 23, 3071-7 (2002)
- 32) S. Lin, A.S. Fischl, X. Bi, W. Parce, *Anal. Biochem.*, 314, 97-107 (2003).
-