

免疫受容体の脂質リガンド探索に資する解析プラットフォームの開発

富安, 範行

<https://hdl.handle.net/2324/7182323>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (工学) , 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 富安 範行

論 文 名 : 免疫受容体の脂質リガンド探索に資する解析プラットフォームの開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

脂質はエネルギー源、生体膜構成、受容体を介した生理活性の誘発などの様々な役割を担う。これまで脂質によって駆動される生理活性作用は多数報告されており、樹状細胞やマクロファージが有する免疫受容体の一種のC型レクチン受容体 (CLRs) は、損傷自己成分や病原性細菌が有する特有の脂質分子を認識し、生体の危機を感知するセンサーとして働いていることが知られている。他にも、インバリアントナチュラルキラーT (iNKT) 細胞は一部の糖脂質の立体異性体を識別し、免疫を制御している。将来の新規治療薬の開発には、生体内の受容体に対する未知のリガンドの構造決定およびそれらの生合成機構の解明が必要である。天然化合物の構造決定にはクロマトグラフィー質量分析が広く用いられる。クロマトグラフィー質量分析は生体試料中の夾雑な化合物を物理化学的性質に基づきクロマトグラフィーにて分離することでイオン化でのマトリクス効果が低減され、質量分析にて多種多様な代謝物情報を高感度かつ高い質量確度で取得できる。そのため、クロマトグラフィー質量分析は生体試料中の代謝物の構造解析手段として非常に有効である。一般的に幅広い脂質分子の分析には、疎水性相互作用を利用した分離手法である液体クロマトグラフィー (LC) の逆相モードが用いられる。しかし、化合物の疎水性に基づく疎水性相互作用では立体異性体の分離は難しいため、糖脂質の立体異性体を識別する iNKT 細胞のリガンド探索には不適である。近年、超臨界流体二酸化炭素を移動相とした超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) が新たな脂質分析技術として発展している。SFC は脂質のような疎水性化合物の分離に優れているが、特に光学活性医薬品の分離など立体異性体分離に優れた分離手法である。本研究では、脂質リガンドの構造を迅速かつ正確に決定するために、LC と SFC の2種のクロマトグラフィー分離手法と高分解能タンデム質量分析 (HRMS/MS) を基盤とした分取・分析・レポーター細胞アッセイを融合した解析プラットフォームの開発に取り組んだ。

はじめに、微量の生体試料抽出液 (1~10 mg DW/mL) から微量分取を行うと同時に HRMS および HRMS/MS スペクトル情報を取得することができるよう LC/HRMS/MS あるいは SFC/HRMS/MS と分取装置 (FRC) を組み合わせた解析システムを開発した。本システムを用いて微量分取した試料は、レポーター細胞アッセイに供することにより、活性画分の特定に利用することが可能である。次に、各脂質分子種のタンデム質量分析におけるフラグメンテーションパターンは脂質クラスごとに規則性を有しているという特徴に基づき、90 種の脂質クラス、35 種の脂肪酸側鎖から *in silico* で予測される 10,000 種以上の脂質分子種の保持時間情報、精密質量、フラグメンテーションパターンを格納した *in-house* リピドミクスライブラリーを構築した。リガンド候補化合物の構造推定は、活性画分に該当する HRMS スペクトルおよび HRMS/MS スペクトルを、構築した *in-house* リピドミクスライブラリー中の化合物情報と照合することで実施した。実際に、LC-FRC/HRMS/MS システム、SFC-FRC/HRMS/MS システムおよび *in-house* リピドミクスライブラリーにより構成される解析プラットフォームを駆使することにより、CLRs と iNKT 細胞の脂質リガンドの探索と構造決定に成功した。今後、本解析プラットフォームはハイスループットかつ網羅的な脂質リガンド探索や別の生物アッセイと組み合わせた新規代謝物の機能性評価のための有効な手段として活用が期待される。