

メタボロミクスにおける 超臨界流体クロマトグラフィーの可能性

馬場 健史*

研究ノート

Potential of supercritical fluid chromatography in metabolomics

Key Words : supercritical fluid, metabolomics, metabolome, chromatography, mass spectrometry

1. はじめに

メタボロミクスとは、生体内に含まれる代謝産物を包括的にかつ網羅的に解析することにより、生体内での反応を全体的に把握可能にする技術・学問分野である。代謝物質はゲノム情報からの最終生成物であり、タンパク質とともに細胞内で活動する遺伝子の実体（表現型）である。したがって、細胞に密接に影響を及ぼしているメタボローム（代謝物質総体）を調べることで、直接遺伝子の機能解析が可能であり、これまで、ゲノム解析が行われていない生物に対しても適用可能な技術として注目されている。メタボローム解析は、遺伝子の機能解析以外にも、シグナル伝達経路、タンパク質の機能などの解明、代謝異常やガンなどの病態の診断メカニズムの究明、あるいは、微生物発酵による医薬品の高効率生産などに対して有効な解決策を与えるものでないかと期待されている。

メタボロミクスにおいては、一般的に各代謝経路の構成成分である親水性の低分子代謝物が解析のターゲットになっている¹⁻⁵⁾が、近年の研究で脂質がシグナル伝達に関与していることが明らかにされ、脂質も解析の対象にされるようになってきた⁶⁻⁹⁾。今後、さらに脂質のメタボロミクスを進めることにより、脂質の生体内での機能を把握でき、関連する遺伝子の機能を明らかにできるだけでなく、親水性

の代謝物の解析だけでは理解できなかった複雑な生体内の代謝・反応機構の解析が可能になると思われる。

脂質の化学構造は比較的単純であるが、含有脂肪酸の多様性や構造異性体などを考慮に入れると10の3乗オーダーの種類が存在する。また、一般的に疎水性化合物とされているが、リン酸、糖などの極性の高い分子種が結合することによって極性が増加し、結果として脂質全体としては幅広い極性を示すことになる。それぞれの脂質を分離同定するためには高度な分離分析技術が必要とする。そこで、著者らのグループでは、新たな分離系として超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）に注目し、脂質を中心とした代謝物解析におけるSFCの適用技術の開発に取り組んでいる。

2. 超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）とは

超臨界流体は、臨界点の温度と圧力を越えた状態の流体である（図1）。気体の拡散性と液体の溶解性を有し、クロマトグラフィーにおける移動相として好ましい性質の流体である。低粘性であるためカラム背圧が低いことを利用して、高速モードでの分離やカラム長を伸ばすことにより分離能を向上させることが可能である。また、温度や背圧を変化、すなわち、移動相の状態を変化させることによりガスクロマトグラフィー（GC）や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にない幅広い分離モードを選択できる特徴を有する。また、通常HPLCで使用する充填型カラムが使用でき、カラムや移動相に添加するモディファイヤーを選ぶことによって、種々の化合物の分離に適用可能である。二酸化炭素は、臨界圧力が7.38 MPaであり、臨界温度が31.1℃と比較的常温に近く、引火性や化学反応性がなく、純度の高いものが安価に手に入るなどから、SFC



*Takeshi BAMBA

1971年5月生
大阪大学・大学院工学研究科・応用生物工学専攻（2001年）
現在、大阪大学 大学院工学研究科 生命先端工学専攻 准教授 博士（工学）
メタボロミクス、超臨界流体工学
TEL : 06-6879-7418
FAX : 06-6879-7418
E-mail : bamba@bio.eng.osaka-u.ac.jp

に最もよく利用される。超臨界二酸化炭素はヘキサンに近い低極性であるが、メタノールのような極性有機溶媒をモディファイヤーとして添加することによって、移動相の極性を大きく変化させることが可能である。さらに、分取クロマトグラフィーの際に、超臨界流体に二酸化炭素を用いることによる実用上の利点がある。有害で可燃性の有機溶媒を大量に扱うわずらわしさがなく、また、溶出したフラクションを常圧に戻すと瞬時に二酸化炭素は蒸発するため、濃縮の手間が省ける。

著者らは、これまでに上記のSFCの特質を利用して、植物に存在する複雑な幾何異性類縁体の解析や分子量7000を越えるポリマーの分離に成功している^{10), 11)}。また、グリセリド、ステロール類、脂溶性ビタミン、脂肪酸などのSFCを用いた分析例が多数報告されており、疎水性化合物の分離分析におけるSFCの有用性が示されている¹²⁻¹⁴⁾。

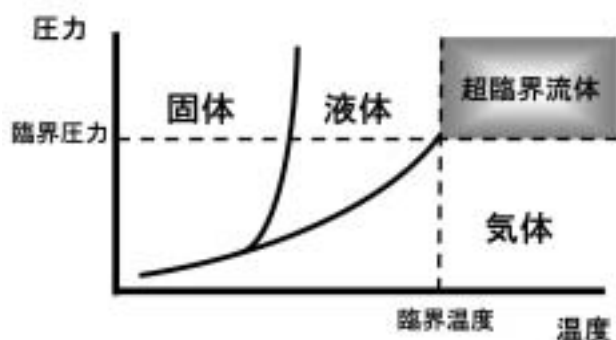


図1 物質の状態図

3. 超臨界流体クロマトグラフィー /

質量分析 (SFC/MS) の脂質メタボロミクスへの適用技術開発

SFCの脂質メタボロミクスへの適用を目的として、リン脂質、糖脂質、中性脂質、スフィンゴ脂質などの多様な脂質の一斉分析が可能なシステムの構築を目指して各種技術開発に取り組んだ。SFC/MS分析系の構築で最も苦労したのが、質量分析計との接続であった。多成分の一斉分析を目的とするメタボロミクスにおいて、クロマトによる時間分離が困難な成分や微量成分にも対応でき、構造情報の取得も可能な質量分析計との接続は必須である。SFCから質量分析計へは、T型コネクタによりスプリッ

トされた一部が導入されるが、その流量はSFCの操作圧力、流量、接続配管の内径、長さなど様々な因子によって変動するため、その調節は非常に難しい。安定したイオン化のための種々の条件検討にかなりの時間を要した。SFC/MS分析におけるイオン化法としては、移動相であるSCCO₂が低極性であるため、主として疎水性の化合物が分析の対象になることが多く、一般的に大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) が用いられることが多い。しかし、本研究では、リン脂質のような極性脂質も対象となるため、エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) の適用を試みた。イオン化条件の最適化により、各種リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質の良好なイオン化が観測され、グリセリドのような非極性脂質についても十分な感度が得られた。また、モディファイヤーにギ酸アンモニウムを添加することにより、メタノールのみでは検出されなかったホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol, PI) の検出に成功し、また、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC) の感度も約390倍上昇した。その他、カラムや分離条件など種々の分析条件の検討を重ね、各種リン脂質、糖脂質、中性脂質、スフィンゴ脂質混合物の一斉分析系の構築に成功した。分離カラムとしてシアノカラムを用いたときに、全ての脂質が検出され、LC/MS分析系と比べてクラスごとの分離が良好であった¹⁵⁾ (図2A, 2B)。また、分析時間が10分余りと短く、さらに次の分析に移るまでに必要な平衡化の時間も約1分程度と非常に短時間であった。ほとんどの脂質は、ポジティブイオンモードにおいてプロトン付加分子、または、アンモニウムイオン付加分子として検出された (図2A)。特に、中性脂質 (triacylglycerol, TG; diacylglycerol, DG) は正イオンのみ検出された。一方、ホスファチジン酸 (phosphatidic acid, PA) とPIについては、脱プロトン分子やギ酸イオン付加分子が検出されるネガティブイオンモードのほうが強く検出された (図2B)。また、ODSカラムを用いた場合には、シアノカラムに比べて分子種ごとの分離能が高く、当該条件においては特にTGにおいて構成脂肪酸の鎖長の違いによる分離が認められた¹⁵⁾。以上の結果から、全脂質の網羅的な解析にはシアノカラムを、構成脂肪酸などの分子種の詳細な解析が必要な場合には

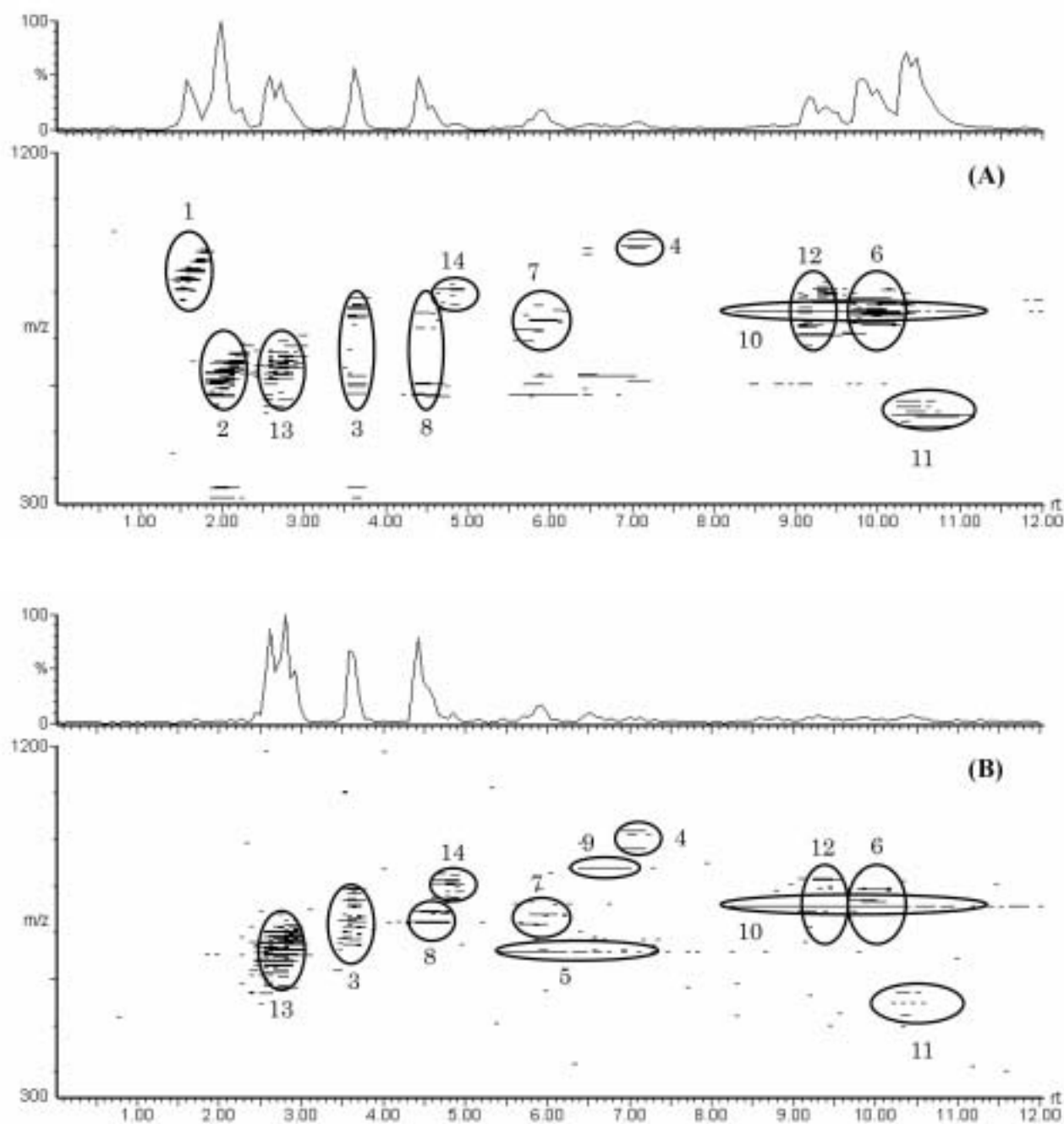


図2 SFC/MSによる脂質混合物の一斉分析（シアノカラム）（文献15より引用）

(A) ポジティブイオンモード, (B) ネガティブイオンモード.

1, TG; 2, DG; 3, MGDG monogalactosyldiacylglycerol; 4, DGDG digalactosyldiacylglycerol; 5, PA; 6, PC; 7, PE phosphatidylethanolamine; 8, PG phosphatidylglycerol; 9, PI; 10, PS phosphatidylserine; 11, LPC lysophosphatidylcholine; 12, SM sphingomyelin; 13, Cer ceramide; 14, CB cerebrosides.

ODS カラムを使用するといったように、目的に応じてカラムを使い分けることにより SFC の特徴を生かした効果的な解析ができることがわかった。

4. SFC の可能性について

SFC は、超臨界流体抽出（supercritical fluid ex-

traction, SFE）や各種検出器との接続により、さらにメタボロミクスなどの代謝プロファイリングに有用な技術となる。HPLC では現実的には難しいオンラインの抽出・分析系を構築することにより、溶媒抽出法では分解され易い代謝物の解析や多検体のハイスループットスクリーニングが可能になる。また、

前処理や誘導体化もオンラインで行うことができる。検出に用いる質量分析計についても、目的に応じて三連四重極型や飛行時間型、また、各種ハイブリッド型の装置を用いることにより、高感度分析や代謝物の構造情報を得ることが可能になる。また、超臨界流体の特徴を最大限に生かすことのできるカラムを開発することにより、多くの化合物の分離分析にSFCが適用できる。さらに、キャピラリーカラムを用いた微量分析系を構築することにより、高感度化が可能になる。

現在、SFC/MSを用いたカロテノイド類や脂溶性ビタミン類の分析にも取り組んでいる。カロテノイド類の分析においては、一般的に用いられている粒子充填型のカラムの代わりにモノリス型のカラムを用いることにより分離の向上と分析時間の短縮が可能になった¹⁶⁾。また、光合成細菌中のコエンザイム Q10 の分析において、オンライン SFE-SFC/MS を用いることにより、溶媒抽出法で確認できなかった還元体が検出できた。今後、さらに超臨界流体の代謝物分析における適用技術の開発が進み、脂質以外の代謝物においてもその有用性が示されることにより、メタボロミクスにおけるキーテクノロジーとして医学、薬学、工学、生物学などのあらゆる分野で利用されるようになることを期待する。

文献

- 1) T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka, M. Tomita, *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768 (2006)
- 2) C. Denkert, J. Budczies, T. Kind, W. Weichert, P. Tablack, J. Sehouli, S. Niesporek, D. Kongsengen, M. Dietel, O. Fiehn, *Cancer Res.*, **66**, 10795 (2006)
- 3) T. Kuhara, *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 814 (2005)
- 4) S. G. Villas-Boas, J. F. Moxley, M. Akesson, G. Stephanopoulos, J. Nielsen, *Biochem. J.*, **388**, 669 (2005)
- 5) M. Y. Hirai, M. Yano, D. B. Goodenowe, S. Kanaaya, T. Kimura, M. Awazuhara, M. Arita, T. Fujiwara, K. Saito, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **101**, 10205 (2004)
- 6) C. N. Serhan, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **77**, 4 (2005)
- 7) M. Morris, S. M. Watkins, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 407 (2005)
- 8) X. Han, R. W. Gross, *J. Lipid Res.*, **44**, 1071 (2003)
- 9) M. R. Wenk, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 594 (2005)
- 10) T. Bamba, E. Fukusaki, S. Kajiyama, K. Ute, T. Kitayama, A. Kobayashi, *J. Chromatogr. A*, **995**, 203 (2003)
- 11) T. Bamba, E. Fukusaki, S. Kajiyama, K. Ute, T. Kitayama, A. Kobayashi, *Lipids*, **36**, 727 (2001)
- 12) E. Lesellier, *J. Chromatogr. A*, **936**, 201 (2001)
- 13) C. Turner, J. W. King, L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A*, **936**, 215 (2001)
- 14) F. J. Senorans, E. Ibanez, *Anal. Chim. Acta*, **465**, 131 (2002)
- 15) T. Bamba, N. Shimonishi, A. Matsubara, H. Hirata, Y. Nakazawa, E. Fukusaki, A. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460-469 (2008)
- 16) A. Matsubara, T. Bamba, H. Ishida, E. Fukusaki, K. Hirata, *J. Sep. Sci.*, **32**, 1459-1464 (2009)