

超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた脂質メタボロミクス

馬場健史

1. はじめに

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^{1,2)}。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非常に多くの分子種が存在する。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非常に高度な分離分析技術を要する。これまで各種クロマトグラフィーを駆使して、各種の脂質の分析が行われてきた³⁾。近年では検出に質量分析計を用いることにより、クロマトによる完全分離が困難な成分の解析や結合する個別分子種の同定まで可能になり、最近では、質量分析計の進化に伴ってさらに詳細な解析が可能な分析系が構築され、これを用いて脂質メタボロミクスが進められている⁴⁻¹¹⁾。しかし、スループット、糖脂質、中性脂質などの他の成分との一斉分析という点で、改良の余地を残している。メタボロミクスを進めていく上で、いかにして代謝物を漏れなく検出することができるかということは非常に重要な課題である。また、脂質メタボロミクスにおいては、包括的に脂質を分析することを目的とすべきであるがまだその

手法は確立されていない。現在、HanらによってESI-MSにインフュージョンで分析する手法の開発に力が入れているが^{4,5)}、イオンサプレッションの問題等課題は多い。やはり、脂質をまず分離して分析することが必要である。そこで、当該研究では上記の問題に対応可能な高解像度・高精度でハイスループットの脂溶性代謝物解析技術の構築を目的として、超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析(SFC/MS)を用いた脂質メタボミクス技術の開発に取り組んだ。

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、SFCでは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、SFCは、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ことなどから、SFCに最もよく利用される。超臨界二酸化炭素(SCCO₂)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。これまでにSFCを用いた疎水性代謝物解析技術の開発およびその応用研究に取り組んできており、HPLCでは分離困難な異性体や分子量7000を越えるポリマーの分離に成功している^{12,13)}。また、高感度で高選択性の質量分析計(MS)を検出器としてSFCに接続するための技術を開発し、リン脂質、糖脂質、中性脂質などの14種類の脂質混合物のハイスループット一斉分析にも成功した¹⁴⁾。

当該研究ではメタボミクスにおけるSFC/MSのさらなる可能性を追求すべく、酸化脂質やトリグリセロール異性体の精密分析に取り組んだ。また、超臨界流体抽出(SFE)とのオンライン

ン接続を試み、不安定な物質をマイルドかつ迅速に高効率で抽出し、そのままダイレクトに分析が可能なSFE-SFC/MSシステムの開発についても取り組んだ。

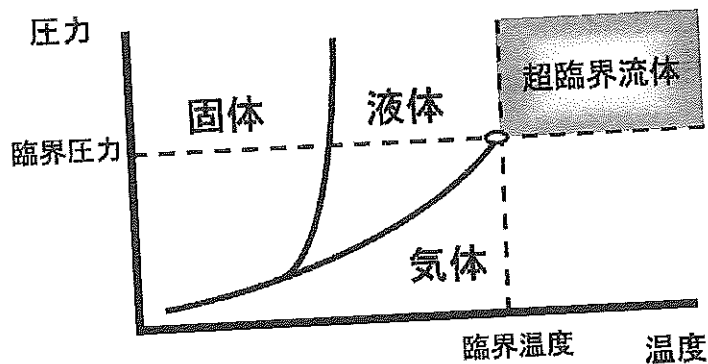


図1 物質の状態図

2. 研究成果

2-1 SFC/MSによる脂溶性化合物分析系の構築と応用

2-1-1 SFC/MSを用いた酸化リン脂質分析系の開発

酸化リン脂質分析においては、これまでにLC/MSをベースとした分析系が構築されているが、ヒドロキンド、エポキンド、ヒドロペルオキシドといった修飾基ごとの分離ができていない。また、エポキンドの異性体の分離が不十分であるため、個々の構造解析ができていない。生体中の酸化リン脂質を解析するためには構造類縁体の分離が可能な解像度の高い分離技術が必要である。そこで、酸化リン脂質分析にSFC/MSの適用を試みた。

まず、ラジカル発生剤を用いてリノール酸やアラキドン酸を側鎖に持つホスファチジルコリンをインビトロ酸化し、酸化リン脂質の標準品を調製した。モデルリン脂質として1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycerophosphatidylcholine (PLPC) を用い、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩(AAPH)、過酸化水素、リポキシゲナーゼを用いて酸化リン脂質をインビトロ合成し、生成した酸化リン脂質をSFC/MSにより分析を試みた。PLPCの酸化物質としてジヒドロキシ、エポキシ・ヒドロキシ、オキシ・エポキシといった既存のLC/MSでは分離が

困難な各生成物の解析に成功した¹⁵⁾。さらに、モデルリン脂質として1,2-ジアシルグリセロ-3-ホスホコリン(PC)として2位の脂肪酸にリノール酸を含むPC(16:0/18:2 PC, PLPC)に加えて、アラキドン酸を含むPC(16:0/20:4 PC, PAPC)、ドコサヘキサエン酸を含むPC(16:0/22:6 PC, PDPC)について、酸化リン脂質を同様にインビトロ合成し、生成した酸化リン脂質をSFC/MSにより分析した。各種の酸化物としてジヒドロキシ、エポキシ・ヒドロキシ、オキシソ・エポキシといった修飾基ごとの分離が可能となり、エポキシドについては位置異性体も分離できた(図2A)¹⁵⁾。さらにMS/MS分析によるフラグメントイオンの解析を行い、それぞれの酸化リン脂質の構造を推定することができ、実サンプルの解析に利用可能なフラグメント情報を蓄積することができ、各種酸化PCの解析が可能なSFC/MS分析系を構築できた(図2B)¹⁵⁾。

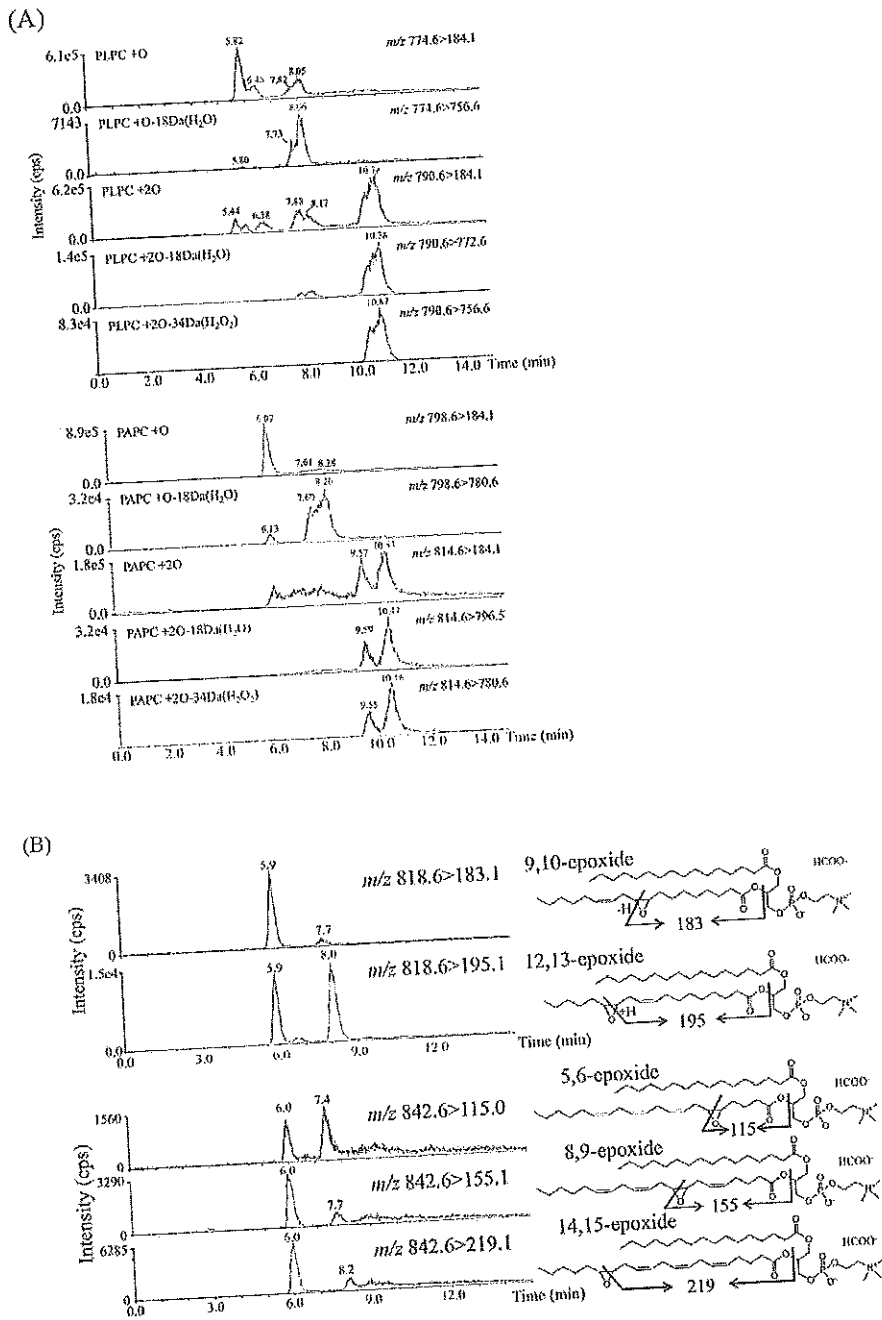


図2 2-Ethylpyridineカラムを用いた酸化ホスファチジルコリン (PC) の分析。(A) 標準品を *in vitro* 酸化させて分析して得られた酸化PCのマスクロマトグラム。(B) 酸化位置の異なる各エポキシ体のマスクロマトグラム。(文献15より引用)

2-1-2 SFC/MSを用いたダイズ脂質プロファイリング

ダイズは食用油や醤油・味噌の原料として、また、煮豆、納豆、枝豆などに加工されて食品として広く利用されており、食品分野において重要な素材である。ダイズ中には、トリグリセロール(TAG)をはじめ、リン脂質などの多くの脂質が含まれている。TAGやリン脂質は、極性基や脂肪酸の組み合わせから構造異性体まで含めると数千種以上の分子種が存在すると考えられる。そのプロファイルを精密にとらえるためには、高い分離能を有し幅広い性質の化合物に適用可能な分析系が必須となる。そこで、疎水性化合物の分析に有用であるSFC/MSを用いてダイズ脂質プロファイリングを行った。さらに、ダイズ中の脂質プロファイル情報と品種との関連を調べた。

これまでに我々が構築したSFC/MSを用いた分析系を用いて12品種のダイズを分析し、主成分分析(PCA)に供した。主要成分としてTAGとホスファチジルコリン(PC)が確認され、PCAではダイズの用途による各種品種のクラスター分離が認められた(図3)¹⁶⁾。また、そのローディングを見ることでTAGがクラスターの分離に寄与している重要成分であることがわかった(図4)¹⁶⁾。TAGは、グリセロール骨格に3つの脂肪酸を有することから、分子イオンピークの解析だけでは脂肪酸の結合様式を含めた分子種の同定はできない。そこで、TAGの分離条件の改善とイオン化電圧を高くすることによるフラグメント解析を行い、ダイズ中TAGのより詳細なプロファイル解析が可能な分析系の構築を試みた。各種標準品や実試料を用いて分析条件の検討、各分子の保持時間やフラグメントの解析を行うことにより、保持時間、 m/z の情報からTAGの一斉プロファイルが可能な分析系を構築した(図5)¹⁶⁾。当該分析系は、基準となるTAG標準品を1種類揃えることで他のTAGの一斉同定ができるダイズ以外のTAGの解析にも利用可能な汎用性のある分析系である。

当該研究においてSFC/MSを効果的に利用することで脂溶性代謝物情報に基づくダイズの用途ごとの品種の判別ができた。今後、豆腐、納豆、味噌などの様々なダイズ加工食品においてもSFC/MSを用いた脂質プロファイルを行うことにより最適なダイズ品種のより精密な選別が可能になると考えられる。また、当該SFC/MS分析系は簡便に高解像度のTAGのプロファイリングが可能であることから、様々な食品中TAGの分析だけでなく、体内動態解析への適用も可能な有用ツールとして期待できる。

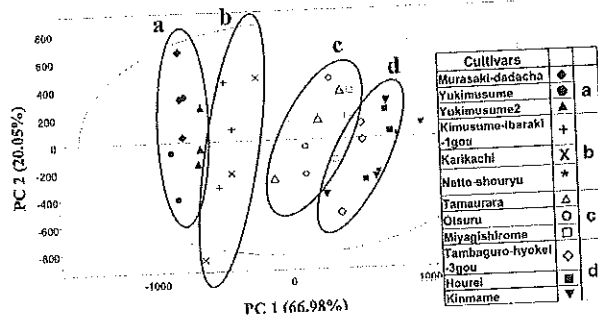


図3 ダイズ12品種のPCA(スコアプロット)

(a: edamame, b: natto, c: tofu and nimame, d: nimame and an unknown)
(文献16より引用)

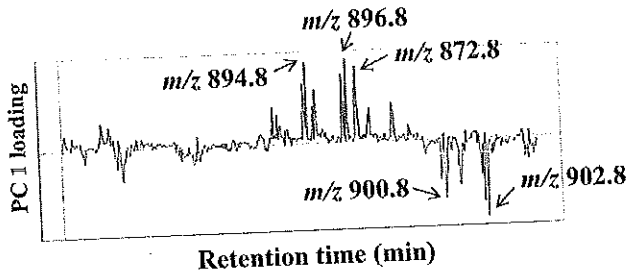


図4 図2ファクター1におけるローディングプロット
(文献16より引用)

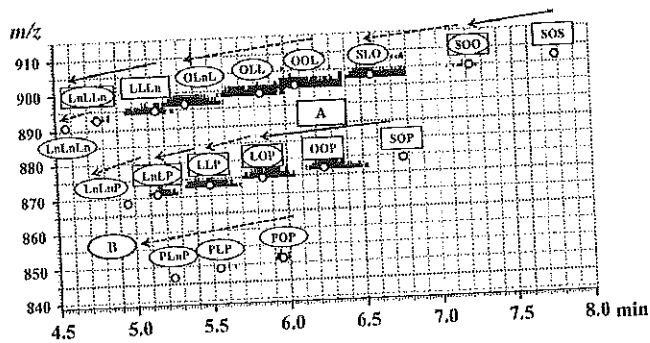


図5 ダイズTAG異性体分離 (karikachi)

(A)実線 : sn-1脂肪酸が異なるTAG、(B)点線 : sn-2脂肪酸が異なるTAG。
P: palmitic acid, C16, S: stearic acid, C18, O: oleic acid, C18:1, L: linoleic acid,
C18:2, Ln: linolenic acid, C18:3
(文献16より引用)

2-2 オンラインSFE-SFC/MS分析系の構築と応用

2-2-1 オンラインSFE-SFC/MS分析系の構築と乾燥血漿スポット中リン脂質のハイスルー プット分析への応用

SFEをSFC/MSとオンライン化することにより、抽出、分析を連続して行うことができることから光や酸素に触れることがないため、抽出操作時に変化を受けやすい化合物の分析に好適である。しかし、メタボロミクスのような多成分分析に対応したシステムは構築されておらず、これまでにオンラインSFE-SFC/MSの酸化リン脂質の分析への応用例の報告はない。そこで、酸化リン脂質の精密分析を行うためのオンラインSFE-SFC/MS/MSシステムの構築を目的とした。

まず、生体中に多く含まれるリン脂質を対象にして、SFEのオンライン化のための抽出容器、プレカラム、分離カラム、配管等種々のシステム構成要素の精査および抽出・分析条件について検討しオンラインSFE-SFC/MS/MSシステムの構築を試みた。さらに、乾燥血漿スポット (dried plasma spot; DPS) からリン脂質のプロファイリングをハイスループットで行えるシステムの開発を試みた。バルブ切り替えシステムを構築し抽出条件と分離条件の最適化を行った結果、PC HILIC (4.6 mm × 250 mm ID, 5 μm; Shiseido) カラムを用いた場合、抽出時にリン脂質が保持され、なおかつ、PCやリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine; LPC)、スフィンゴミエリン (sphingomyelin; SM) といった共通の極性基を有するリン脂質の分離を行うことができた¹⁷⁾。これまでLC/MSを用いた脂質分析において頻用されてきた液液抽出法であるBligh and Dyer法との比較を行った結果、SFEの方が有意に抽出効率が大きく(図6)、抽出と分析を合わせて20分以内に行うことが可能であった¹⁷⁾。この短時間の分析で、血漿中に含まれる134のリン脂質分子種を検出することができた。当該手法は、多検体のハイスループット分析において有用なツールとなることが期待される。

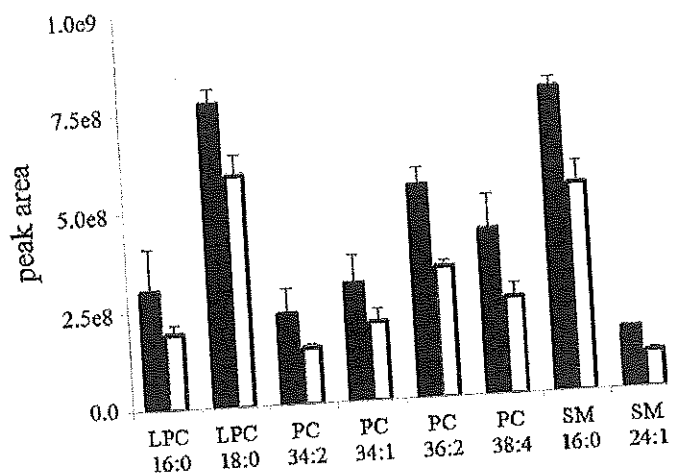


図6 SFE (黒)と液液抽出法 (白) のピークエリア値の比較。(文献17より許可を得て引用)

2-2-2 コエンザイムQ₁₀酸化体、還元体同時分析

さらに、オンラインSFE-SFC/MSシステムの種々の疾患での変動が報告されている酸化ストレスマーカーであるコエンザイムQ₁₀のレドックスステータス解析における応用を試みた。光合成細菌中の還元型コエンザイムQ₁₀の存在比をオンラインおよびオフライン (有機溶媒) 抽出の二つの方法を用いて求め比較を行ったところ、オンライン抽出の方が有意に高い還元型存在比を示した (図7)¹⁸⁾。このことから、オンラインSFE-SFC/MSのシステムは、インタクトの生体内代謝情報の獲得のための革新的な分析技術となりうることが示唆された。

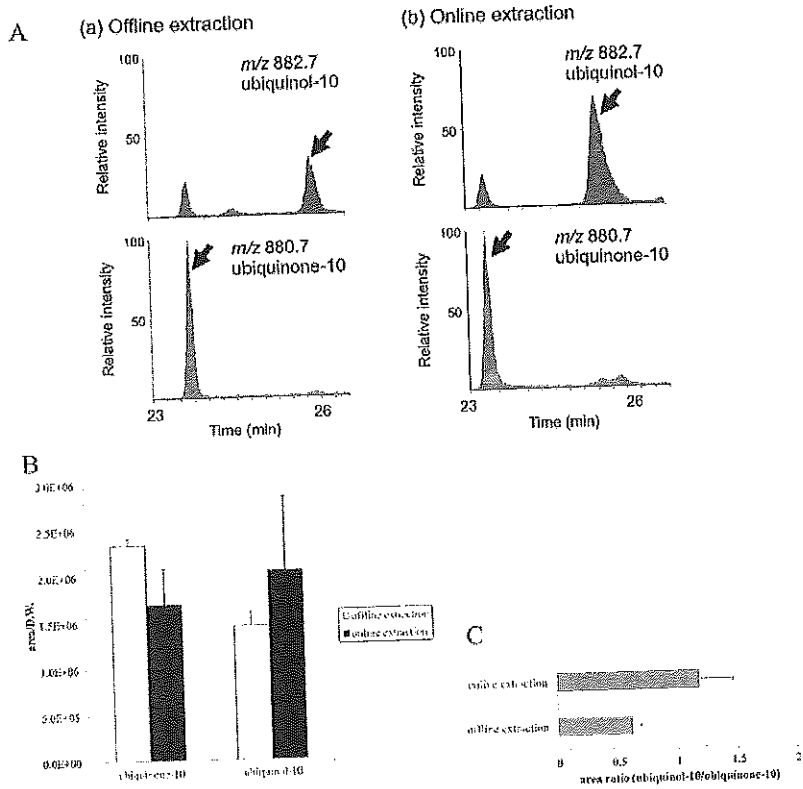


図7 光合成細菌中のコエンザイム Q_{10} 酸化体 (ubiquinone-10)、還元体 (ubiquinol-10) 同時分析。A: オフライン (ヘキササン) 抽出とオンライン抽出から得られた酸化体、還元体のマスクロマトグラム。B: オフライン抽出とオンライン抽出それぞれの酸化体、還元体のピーク面積値。C: オフライン抽出とオンライン抽出の酸化体と還元体の比 (文献18より引用)

3. 今後の展望

現在のところ、代謝物の同定および定量のための分離技術としてのSFCの応用例はGCやLC、キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis; CE) に比べて少ない。しかし、これらの技術では迅速な一斉分析が困難な化合物に対してSFCの高分離能が威力を発揮することが期待される。

未知代謝物の定性 (構造情報の取得) および定量が可能であることは、メタボロミクスの分析技術であるための必要条件である。今後、SFCのメタボロミクスへの応用を加速するため

には、目的に応じて精密質量が取得可能な飛行時間型質量分析計やオービトラップ型質量分析計と、高選択性の定量が可能な三連四重極型質量分析計との接続システムをそれぞれ構築することが不可欠であると考えられる。現在、SFCとオービトラップ型質量分析計を接続することにより、三連四重極型質量分析計との接続では困難であった代謝物の同定が可能なシステムの開発に取り組んでいる。また、脂質分析において最も時間と労力を要する作業であるデータ解析において脂質自動同定ソフトウェアを用いることにより、よりハイスループットに多数のサンプルを処理可能なシステムの構築にも取り組んでいる。

現在でもなお、SFCにはいくつかの課題が残されている。SFCでは HPLC用のカラムを代用することがほとんどであるが、SFCにおける分離挙動を解析し専用のカラムを開発することにより、SFCの特性をさらに生かすことができる分離系の構築が可能になると考えられる。また、質量分析計についてもLCに用いられているシステムに接続しているのが現状であるが、SFC専用のインターフェイス、イオン化プローブの開発や、SFCの高速分析に耐えうるスキュアンスピードを持った質量分析計の開発が今後のSFCの普及のための課題である。そのほか、より高い再現性、堅牢性を兼ね備えたSFEシステムの開発や低流速時にも安定した圧力制御を実現できる背圧制御装置 (back pressure regulator; BPR) の開発など装置面においても改良の余地はまだ多く残されており、SFCは今後さらなる変化を遂げる可能性を秘めた将来の発展が期待される分離技術である。超臨界流体のユニークな性質を利用した代謝解析手法はまだ発展途上ではあるが、実用的なシステムが開発されることによりこれまでにない知見を取得可能な強力なツールとなりうる可能性を秘めている。今後、さらに超臨界流体を利用した種々の技術開発が進むことにより、SFC/MSが代謝プロファイリングのキーテクノロジーになることを期待する。

謝辞

本研究の一部は、財団法人杉山産業化学研究所の平成23年度の研究助成を受けて行われたものである。

参考文献

- 1) メタボロミクスの先端技術と応用, シーエムシー出版(2008)
- 2) 遺伝子医学 MOOK16, メディカルドゥ(2010)
- 3) B. L. Peterson, B. S. Cummings, *Biomed. Chromatogr.*, **20**, 227 (2005)
- 4) X. Han *et al.*, *Mass Spectrometry Reviews*, **24**, 367 (2005)
- 5) X. Han *et al.*, *Mass Spectrometry Reviews*, **31**, 134 (2012)
- 6) T. Houjou *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 654 (2005)
- 7) H. Ogiso *et al.*, *Anal. Biochem.*, **375**, 124 (2008)
- 8) K. Ikeda *et al.*, *J. Chromatogra. B*, **877**, 2639 (2009)
- 9) K. Ikeda *et al.*, *Cancer Sci.*, **102**, 79 (2011)
- 10) R. Taguchi *et al.*, *Methods Enzymol.*, **432**, 185 (2007)
- 11) H. Nakanishi *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, **656**, 173 (2010)
- 12) T. Bamba *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **995**, 203 (2003)
- 13) T. Bamba *et al.*, *Lipids*, **36**, 727 (2001)
- 14) T. Bamba *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460 (2008).
- 15) T. Uchikata *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 205 (2012).
- 16) J. W. Lee *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 262 (2012).
- 17) T. Uchikata *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 69 (2012).
- 18) A. Matsubara *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 76 (2012).