

メタボロミクスにおけるHPLCの可能性

宮野 博*・吉田 寛郎

疾患や薬物・環境などの生体への影響を、内在性代謝物の変化で捉えて解析するメタボロミクス (metabolomics) は、医薬品の安全性や薬効予測、毒性マーカーの探索、疾患の診断指標、発酵や植物の改良因子の探索や評価などへの適用が期待される^{1,2)}。本稿は、薬物代謝解析やプロテオミクスのもっとも有力な分析手法のひとつである高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるメタボロミクスについて、まず、アミノ酸を対象とした特異的アプローチを食品とアミノ酸生産菌での代謝フラックス解析を例に紹介する。また、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) による非特異的手法を食品に応用した例についても解説する。

HPLCによる特異的メタボロミクス

HPLCによる食品中のアミノ酸分析 HPLCの特徴は、さまざまな性質を有するカラム固定相と官能基特異的誘導体化法が、長年研究されていることにある。アミノ基、カルボキシル基、チオール基などとそれぞれ選択的に反応する試薬で誘導体化することで、対象化合物検出の選択性や感度を、大幅に上昇することができる³⁻⁶⁾。また、同じ官能基を有する化合物は、物理化学的性質に共通性がある場合が多く、それぞれに適した前処理法を選択できることも官能基特異的誘導体化法のメリットのひとつである。特に内在性代謝物は、生体内や溶液中での安定性がそれぞれ大きく異なることが多く、代謝物ごとに適した前処理法を選択することは、定量的な評価にはきわめて重要である⁷⁾。

アミノ酸は、1806年フランスで、アスパラガスの芽から抽出された化合物アスパラギンから、その歴史が始まる⁸⁾。1908年に池田菊苗博士がグルタミン酸が昆布のうま味成分であることを発見して以来、食品の味にアミノ酸が大切な役割を担っていることが注目されてきた。事実、ほとんどのタンパク質は無味であるが、それを構成するL-アミノ酸は、一般に甘味、苦味、うま味などを中心とした複雑な呈味をもつ。

アミノ酸分析の代表的な装置は、陽イオン交換樹脂カラム固定相とニンヒドリン発色を利用したポストカラム誘導体化 HPLC 法であり⁹⁾、食品のみならず、臨床分析

などに幅広く使われている。ニンヒドリンのかわりに、オルトフタルアルデヒド (OPA) で蛍光検出する方法もある。OPA法はニンヒドリン法に比べ10倍程度の高い感度を有するが、二級アミンと反応できないため、プロリンなどは酸化剤で処理して一級アミンに変換する必要がある。一般に、食品中のアミノ酸を分析する場合、ニンヒドリン法の感度で問題はない。また、試薬の安定性もニンヒドリンのほうがすぐれている。

ニンヒドリンを試薬とするアミノ酸分析計では、アミノ酸の種類によっても異なるが、1~3 mg/dLが測定の至適濃度で、この濃度ではきわめてすぐれた精度 (CV約1%) を与える。一方、至適濃度の1/10や10倍では、CVが10%を超える場合がある。ダイナミックレンジが必ずしも広くないことが欠点の一つである。試料中にさまざまな濃度のアミノ酸が含まれる可能性のある場合、希釈倍率を変えたものを用意して、それぞれが適切なピークエリアとなるような調製が必要となる¹⁰⁾。

試料量などの問題で、アミノ酸の高感度分析を行う場合、アミノ基に発蛍光団を導入してから分離・検出するプレカラム誘導体化 HPLC 法を用いる。蛍光性誘導体化試薬として、OPAのほか、6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシニルイミド (AQC)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン (NBD-F) などが市販されており、pmol~fmolレベルのアミノ酸を定量できる^{5,10)}。

なお、食品中のアミノ酸を測定する場合、タンパク質や脂質などをあらかじめ除去しておくことが望ましい。除タンパクとして、ポストカラム誘導体化法では、スルホサリチル酸やトリクロロ酢酸などの酸を用い、プレカラム誘導体化法では、エタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒を用いる場合が多い¹⁰⁾。試料中のアミノ酸濃度によっては、単純に希釈して分析する場合もある。

食品中の他の代表的な成分である有機酸や糖についても、それぞれ特異的な HPLC 分析法が知られている。分析条件は、装置メーカーやカラムメーカーのホームページが詳しく参考になる。

LC-MS/MSによるアミノ酸生産菌の代謝フラックス解析 LC-MS/MSでのアミノ酸分析に適したアミノ基誘

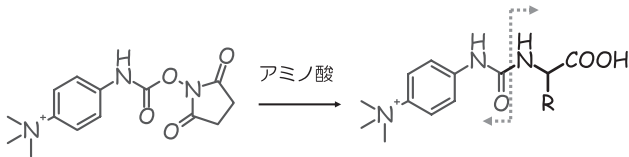


図1. LC-MS/MSに適したアミノ基誘導体化試薬4-(trimethylammonium)anil-N-hydroxysuccinimidyl carbamate とその誘導体。誘導体のウレア結合体は三連四重極質量分析計で、きわめて選択的に点線部で開裂する。

誘導体化試薬が、最近開発された¹¹⁾。代表的な試薬の構造と誘導体を図1に示した。この試薬は、イオン化効率を高める部分構造を有するため、誘導体化することでアミノ酸をMSで高感度に検出できるようになる。LC-MS/MSで測定した誘導体化アミノ酸の検出限界は、アトモレベル(10⁻¹⁸モル)である。また、この試薬とアミノ基が結合して生じるウレア結合は、MS/MSできわめて選択的に開裂し、規則的なプロダクトイオンが生成する¹¹⁾。そのため、三連四重極質量分析計のprecursor ion scanを用いれば、複雑な試料マトリックス中であっても、試薬と結合したアミノ基化合物だけを、マスキングマトグラム上に抽出(プロファイル)することが可能となる。

発酵分野では、目的成分(たとえばアミノ酸)をより効率的に生産する菌株(生産菌)の育種が、重要な研究課題のひとつである。炭素源であるグルコースなどを¹³Cでラベルして、¹³Cが菌内の代謝物にどのように取り込まれていくかを経時的に追跡する代謝フラックス解析が、この目的のために多用される(図2)。

従来は、測定感度の問題から、菌内のタンパク質に取り込まれた¹³Cだけを利用して代謝フラックスが計算されていた。しかし、本試薬を用いる高感度アミノ基誘導体化LC-MS/MS法により、菌内の微量遊離アミノ酸の¹³C分布を得ることが可能となった。さらに、誘導体のウレア結合の選択的な開裂を利用し、MS/MSの第1MSで誘導体を第2MSで¹²Cだけで構成された試薬由来のプロダクトイオンのみを検出(selected reaction monitoring)することで、試薬に含まれる天然由来の¹³Cを無視でき、複雑な補正計算をせずに、アミノ酸に取り込まれた¹³C分布を正確に求めることができる。大腸菌K-12株由来のリジン生産菌をモデルとした実験では、この方法を用いることで、菌体増殖期など、より代謝の変化の速い時期の細胞内動態を観測し、精度の高い解析に成功している¹²⁾。

LC-MSによる非特異的メタボロミクス

アミノ酸、有機酸、糖、核酸類など代表的な内在性代謝物は極性の高い化合物が多く、逆相系のカラム固定相

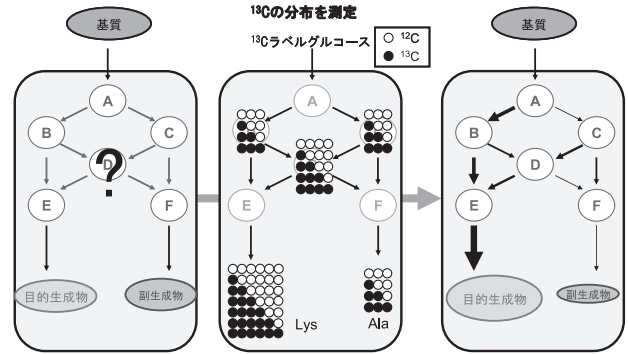


図2. 安定同位体を用いたフラックス解析の説明。アミノ酸発酵などでは、目的生成物の収率をあげるために、安定同位体でラベルされた基質を取り込ませ、代謝物(アミノ酸など)中の同位体分布と濃度を経時的に追跡することがある。これによって代謝経路の中の代謝物の流れを把握することができる。この情報から、基質から目的生成物に至るまでの流れをできるだけ詳しく、他の流れを細くする計画的な育種が可能となる。たとえばアラニンは炭素3つを有するので、¹³Cを含む基質から¹³Cが0個、1個、2個、3個取り込まれた4種類のアラニンが存在する可能性があり、その量比は、代謝の流れ方により変動する。それぞれが何%存在しているか求めることのできるLC-MS/MSは有効な測定手段となる。

を用いるLC-MSで、これらを保持・分離させることは容易でない。これは、メタボロミクスにおけるLC-MSの弱点であり、これまでLC-MSは比較的疎水性の高い代謝物^{13,14)}や脂質の解析¹⁵⁾に用いられるにとどまってきた。

逆相系の固定相に特徴的な極性基を導入し、高極性の化合物の保持を可能にするミックスモードといわれる固定相の開発は、最近のHPLCの進歩のひとつである。たとえば、固定相にペンタフルオロフェニルプロピル基を導入したフッ素含有逆相カラム¹⁶⁾では、アミノ酸、アミン、有機酸、核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドを保持することができ、誘導体化することなく、直接これらをLC-MSで測定できる¹⁷⁾(図3)。アミノ酸、アミン、核酸塩基、ヌクレオシドは正イオンモードで、有機酸とヌクレオチドは負イオンモードで検出する。

水で希釈し限外ろ過処理した醤油を、同カラムと四重極飛行時間型質量分析計(Q-TOF)で測定したところ、*m/z*と保持時間の組み合わせを1つのピークとして考えたとき、約300のピークが検出された。メーカーや製法の異なる十種類を測定し、多変量解析したところ、図4のように製法の違い(本醸造品と大豆加水分解物を添加した混合醸造品)を区別することができ、また、その寄与率の高い成分は、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニンであった。この方法は、発酵製品のみならず、さまざまな食材の解析にも有用である。

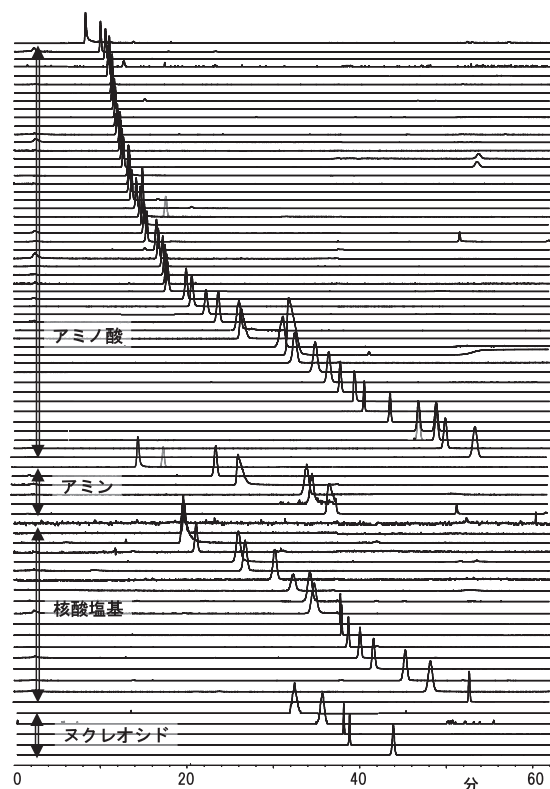


図3. イオン性代謝物のLC-MSクロマトグラム. カラム, Discovery HS-F5 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm); 移動相, 0.1%ギ酸-アセトニトリル系でグラジエント溶出; 流速, 0.3 ml/min; カラム温度, 40°C. 正イオンモードで検出されたものだけを記載.

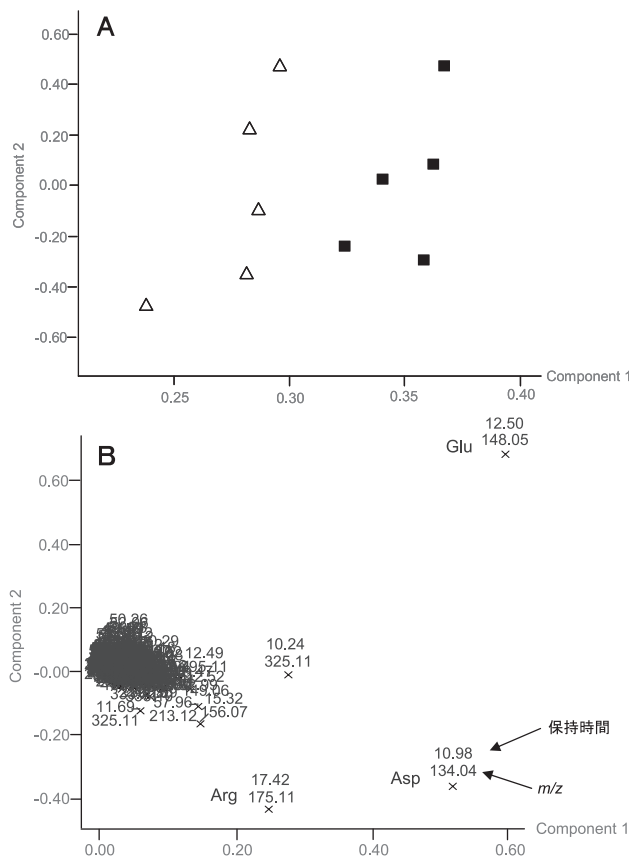


図4. (A) 10種類の醤油を図3の方法で測定した結果から得られるスコアプロット. △, 本醸造方式; ■, 混合醸造方式. (B) 同ローディングプロット.

おわりに

カラム技術の進歩により, HPLCにおいても非特異的代謝物解析が可能となってきたことを紹介した. しかし, このようなアプローチでは未知成分が数多く検出され, TOF-MSのような高精度・高分解能MSを使っても, その同定は容易ではない. 未同定化合物の構造解析が困難であるという状況は, 他の分析手法でもまったく同様である. 特に十分なデータベースをもたない一企業において, このアプローチだけで, すぐに利用可能な有益な情報を引き出すことは難しい. 解析の目的をはっきりさせ, 測定法を選択していくことが有用な知見を得る近道である.

文 献

- 1) 富田 勝, 西岡孝明編: メタボローム研究の最前線, シュプリンガー・フェアラーク東京 (2003).
- 2) Wilson, I. D. *et al.*: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **817**, 67 (2005).
- 3) 中村 洋監訳: 分離分析のための誘導体化ハンドブック,

ク, p.169, 丸善 (1996).

- 4) Uchiyama, S. *et al.*: *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 295 (2001).
- 5) Fukushima, T. *et al.*: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1655 (2003).
- 6) 宮野 博, 新保和高: *細胞工学*, **25**, 1410 (2006).
- 7) 宮野 博: *メタボローム研究の最前線*, p.35, シュプリンガー・フェアラーク東京 (2003).
- 8) 味の素株式会社編: *アミノ酸ハンドブック*, 工業調査会 (2003).
- 9) 鈴木忠直: *最新の分離・精製・抽出法, 原理から応用まで*, p.724, エヌ・ティー・エス (1997).
- 10) 宮野 博, 小澤真一: *先端の分析法, 理工学からナノ・バイオまで*, p.682, エヌ・ティー・エス (2004).
- 11) 新保和高: *第19回バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集*, p.5 (2006).
- 12) Iwatani, S. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **128**, 93 (2007).
- 13) Plumb, R. S. *et al.*: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2632 (2003).
- 14) Tolstikov, V. V. *et al.*: *Anal. Chem.*, **75**, 6737 (2003).
- 15) Taguchi, R. *et al.*: *J. Chromatogr., B*, **823**, 26 (2005).
- 16) Needham, S. *et al.*: *J. Chromatogr., A*, **869**, 159 (2000).
- 17) Yoshida, H. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 551 (2007).