

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

松原 惇起^{1,2}・福崎英一郎¹・馬場 健史^{1*}

ゲノム情報実行の結果として得られる代謝物総体（メタボローム）の解析技術であるメタボロミクスは、生命現象の解明だけでなく、医薬・農業・食品・工業など、幅広い分野への応用が期待されている。これまでに、ガスクロマトグラフィー（GC）、液体クロマトグラフィー（LC）やキャピラリー電気泳動（CE）を用いた技術構築により糖、有機酸、アミノ酸などの生体内親水性低分子代謝物の分析技術はほぼ確立され、これらの分子を対象としたメタボロミクスは盛んに行われるようになった。しかし一部の代謝物、特に高疎水性の代謝物については分析系の構築が十分とはいえない状況である。超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）はこの問題を解決することでメタボロミクスの解像度をさらに向上させ、生命現象をより鮮明に映し出すためのキラーテクノロジーとなりうる。本稿では、SFCを代謝物解析のツールという切り口で紹介するとともに、メタボロミクス技術としての可能性についても言及する。

SFCの特徴

超臨界流体（SF）は臨界温度、臨界圧力を超えた領域の物質であり、低粘性、高拡散性というクロマトグラフィーの移動相として好ましい性質を有している。この超臨界流体を移動相に用いるSFCは、GCやHPLCと比較して以下に挙げる5つの特徴がある¹⁾。

1) GCにおいては熱分解性や高沸点のために分析が困難な化合物にも適用可能である。

2) SFは拡散係数が高いため、液体クロマトグラフィーに比べてクロマトグラフィーにおける分離能が大幅に向上する。また、van deemeter curveにおいて高い流速においても理論段高さが保たれるため、分析時間を短縮することができる。

3) 温度と圧力を制御することで超臨界流体の溶質の溶解度を大幅に変化させることができるため、単一の流体で溶出力を調節することが可能である。また、modifierとしてメタノールなどの有機溶媒を少量添加することで溶出力の選択範囲はさらに広がる。

4) 常温で気体として存在する物質を移動相として用いた場合、分取クロマトグラフィーを行った後に得られたフラクションから移動相が自動的に揮散するため、溶

媒留去という時間とエネルギーを消費するプロセスを省くことができる。

5) 移動相には無毒性、取り扱いの簡便性から二酸化炭素がよく用いられる。超臨界流体二酸化炭素の極性はヘキサン程度とされるため、特に疎水性化合物の分析に有用であるとされる。

界面活性剤やポリマーの分析へも応用なされている²⁾が、現在のところSFCの応用は高効率なキラル化合物の分取が中心である³⁾。しかし、これらの性質を代謝物解析という面から評価すると、SFCはさらなる技術開発が求められている高疎水性代謝物の高速高分離の有用なツールとなりうる。以下にSFCのさまざまな疎水性代謝物への効果的な応用例について紹介する。

SFCによる疎水性代謝物分析

SFCには、用いられるカラムの種類によってオープンチューブカラムSFCとパックドカラムSFCに分類される。このうち前者は高理論段数の分析が可能であるが、理論段あたりの分析時間が極端に長いことから現在ほとんど用いられていない。また、用いることのできる固定相の種類が限定されており、多様な化合物群の分離が要求される代謝物解析にも不向きであると考えられる。一方、パックドカラムSFCでは通常、LCと同じように、さまざまな修飾を受けたシリカゲル粒子が充填されたカラムを用い分析を行う。しかし既述の通り、SFCでは分離能を損なうことなく流速を上げることができるため、LCに比べて高速分離が可能であるとされる。

パックドカラムSFCを用いたカロテノイド、トコフェロールやステロール、スクワレンなどの脂溶性代謝物の個々の分析が報告されている^{4,5)}に加え、Chooらによる報告⁶⁾では4%エタノールをモディファイヤーとして超臨界二酸化炭素に添加し、シリカカラムを用いたパームオイル中のそれらの代謝物の一斉分析が行われた。分析時間は12分程度と非常に短時間であり、さらに条件を変えることでトコフェロールの分子種 (α, γ, δ) についての詳細な情報を得ることも可能であった。これらの成分は高温条件下で行うGC分析では熱分解を起こすが、SFCのよりマイルドな条件下 (50°C) ではその影響を排除した結果を獲得することができたと考えられる。また、

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（准教授） E-mail: bamba@bio.eng.osaka-u.ac.jp

¹大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻、²日本学術振興会特別研究員DC

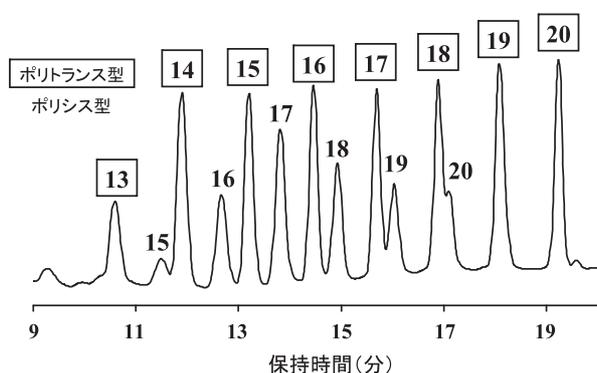


図1. SFC-UV 検出器を用いたトチュウ葉抽出物中のポリプレノールの分析例⁷⁾. クロマトグラム中の数字は重合度を示している. Copyright: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

著者らはトチュウに含まれる天然のポリマーであるポリイソプレンの分析を報告した⁷⁾. フェニルカラムを用い、モディファイヤーをTHFとすることで分子量6000以上の高分子成分を良好に分離することに成功している(図1). これらの報告例はSFCが疎水性化合物の分離に有用であることを示している.

質量分析計との接続システム(SFC/MS)の応用

生体サンプルには多種多様な代謝物が含まれることから、代謝物の共溶出は標的分子の正確な同定や定量に決定的な影響を与える. 以上の報告はいずれも一般的にSFCの検出器としてよく用いられるUV/Vis検出器を用いた報告であるが、水素炎イオン化検出器(flame ionization detector, FID)やUV/Vis検出器を用いた場合にはこれらの影響を排除することは難しい. また、生体には非常に微量の代謝物も存在し、これらの検出器では感度が十分でないため検出が難しい. 質量分析器(MS)は高感度、高選択性という特徴を持ち、さらに被験化合物の定性情報、すなわち構造情報を得ることができる. メタボロミクスにおいて質量分析計が頻用されるのは上記と同じ理由である⁸⁾. SFCにおいてもMSが接続されたシステムが構築されており、生体成分に応用されている.

著者らはSFC/MSのメタボロミクスへの適用例として脂質の一斉分析系について報告した⁹⁾. 脂質は細胞内に大量に存在し、細胞膜構成成分あるいはエネルギーリザーバーとして機能することが知られてきたが、加えて近年の研究においてシグナル伝達に関わることが明らかとなり、代謝解析の重要なターゲットになっている¹⁰⁾. しかし、脂質(リン脂質、中性脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質を含む)は幅広い極性を有する類似構造群であることから、その迅速な一斉分析系の構築においては高度な技術を要する. 従来、脂質の分析はGC/MSやLC/MS、あるいはダイレクトインフュージョン質量分析で行われ

てきた. GC/MSでは分析に誘導体化が必要であり、その際に脂質クラスに関する情報が失われる¹¹⁾. また、分析時に非常に高い温度をかけるため、高度不飽和脂肪酸は分解される可能性がある. 一方、LC/MSでは幅広い極性を持つ脂質を一斉に分析することは困難である. ダイレクトインフュージョン質量分析ではイオン化抑制による影響が大きいため、微量成分の同定および定量が困難である¹²⁾. SFCを分離手法として用いることでこれらの問題を解決することができ、シアノカラムを用いた分析では脂質クラスごとに良好な分離が得られた(図2A). また、ODSカラムを用いた分析では、シアノカラムと比べると脂質クラスごとの分離は十分でないものの、脂肪酸側鎖の違いによる分離が認められた(図2B). 目的に応じてカラムを使い分けることにより効果的に脂質の解析ができることが分かった.

また、モノリスカラムを用いたカロテノイドの一斉分析系を構築した¹³⁾. カロテノイドは多数の構造類似体(構造異性体、立体異性体、不飽和度のみ異なる分子)が存在するため、分析には非常に高度な技術を要する. 特に異性体は質量分析による分離ができないため、クロマトグラフィーによる分離が必須である. モノリスカラムとは三次元ネットワーク状の骨格およびその空隙から成るカラムで、高カラム効率および低カラム背圧という特徴を持つ¹⁴⁾. モノリスカラムであるChromolith Performance RP18e(4.6 × 100 mm i.d.)で構造異性体を含む7種のカロテノイドの標品の分離分析が可能であったが、生体サンプルではマスクロマトグラム上で異性体と思われる夾雑ピークが存在し、分離が不十分であった. しかし、モノリスカラムの低背圧という性質を利用し、3本のカラムを連結して分析したところ、それらのカロテノイドを分離よく検出することができた(図3). モノリスカラムはSFの低粘性と合わせることでカラム長を延長することでさらに分離を向上させることが可能であると考えられ、質量分析計の高選択性と合わせて生体サンプル分析における非常に有用なツールとなることが期待される.

今後の展望

本稿ではSFCを用いた生体分子の分析について概説した. 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、CEに比較して少ない. しかし、これらの技術では迅速な一斉分析の難しい高疎水性の化合物の分離にSFCの高分離能力が力を発揮できると考えられる.

未知代謝物の構造情報の獲得(定性)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

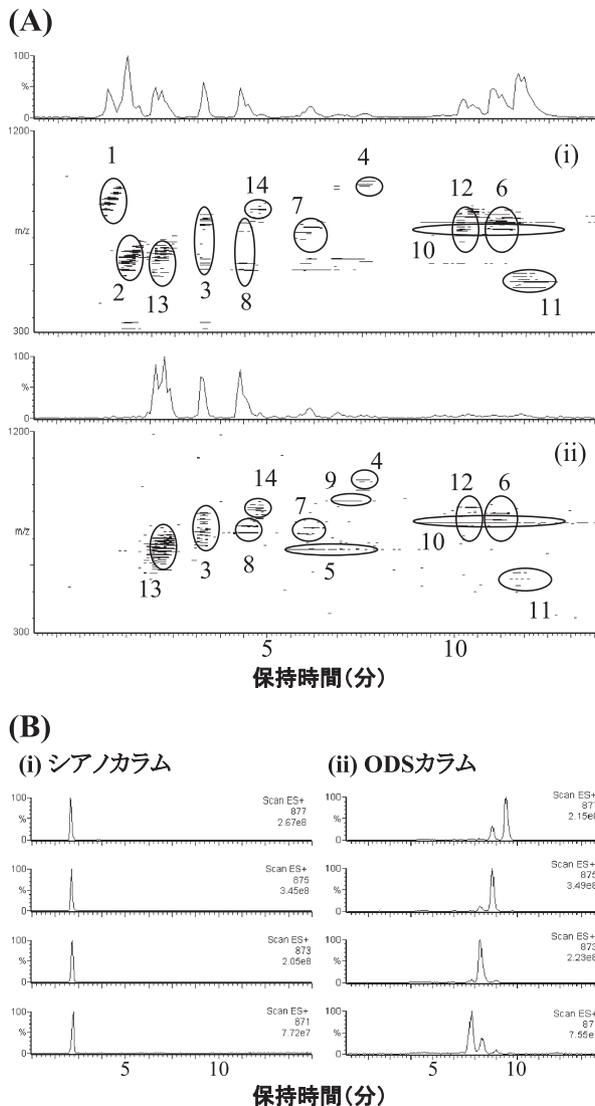


図2. SFC-MSを用いた脂質の分析⁹⁾. (A) シアノカラムを用い、(i) ポジティブモード、(ii) ネガティブモードで各種脂質の混合物を分析して得られたベースイオンクロマトグラムおよび二次元ディスプレイ. 1, Triacylglycerol; 2, diacylglycerol; 3, mono-galactosyldiacylglycerol; 4, digalactosyldiacylglycerol; 5, phosphatidic acid; 6, phosphatidylcholine; 7, phosphatidylethanolamine; 8, phosphatidylglycerol; 9, phosphatidylinositol; 10, phosphatidylserine; 11, lysophosphatidylcholine; 12, sphingomyelin; 13, ceramide; 14, cerebroside. (B) (i) シアノカラムおよび (ii) ODSカラムを用いてさまざまな鎖長の脂肪酸を含むトリアシルグリセロールを分析し得られたマスプロットグラム.

用を加速するには、目的に応じて精密質量が獲得可能な飛行時間型質量分析計や構造情報の獲得、高感度・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構築することが不可欠であると考えられる。

また、超臨界流体の抽出溶媒としての優秀さを利用したオンライン超臨界流体抽出 (SFE) -SFC システムの構築が報告されている¹⁵⁾。このシステムは多検体のハイスループットスクリーニングに有用であるだけでなく、抽

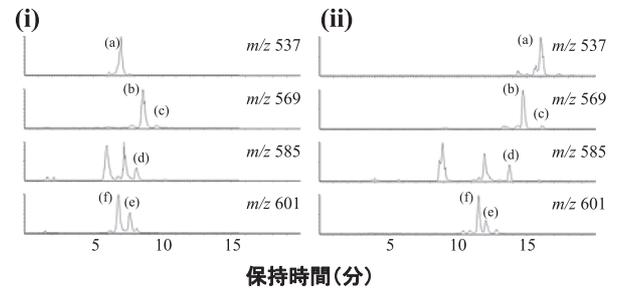


図3. SFC/MSによる緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中のカロテノイドの分析¹³⁾。ODS 修飾モノリスシリカカラム (Chromolith Performance RP18e 4.6 × 100 mm i.d.) (i) 1本, (ii) 3本により分析を行った. (a) β -carotene, (b) lutein, (c) zeaxanthin, (d) antheraxanthin, (e) neoxanthin, (f) violaxanthin.

出から検出まで酸素や光に触れることがないため、抽出操作中に容易に分解されてしまうような代謝物を安定に抽出、分析できると考えられる。著者らはこのシステムを、種々の疾病で変動すること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 Q_{10} のレドックスステータス解析へ応用することを試みた。光合成細菌中の還元型コエンザイム Q_{10} 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2つの方法を用いて求め、比較したところ、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 (未発表)。このことから、オンライン SFE 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。

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、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、メタボロミクスのキーテクノロジーになることを期待する。

文 献

- 1) Smith, R. M.: *J. Chromatogr. A*, **856**, 83 (1999).
- 2) White, C. M. *et al.*: *J. High Resolut. Chrom. Chrom. Comm.*, **9**, 4 (1986).
- 3) Yan, T. Q. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1156**, 220 (2007).
- 4) Aubert, M. C. *et al.*: *J. Chromatogr.*, **557**, 47 (1991).
- 5) Yarita, T. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **679**, 329 (1994).
- 6) Choo, Y. M. *et al.*: *Lipids*, **40**, 429 (2005).
- 7) Bamba, T. *et al.*: *Lipids*, **36**, 727 (2001).
- 8) Dunn, W. B. *et al.*: *Analyst*, **130**, 606 (2005).
- 9) Bamba, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460 (2008).
- 10) Albi, E. *et al.*: *Biol. Cell*, **96**, 657 (2004).
- 11) Roberts, L. D. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, **871**, 174 (2008).
- 12) Larger, P. J. *et al.*: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 206 (2005).
- 13) Matsubara, A. *et al.*: *J. Sep. Sci.*, **32**, 1459 (2009).
- 14) Cabrera, K. *et al.*: *J. High. Res. Chromatogr.*, **23**, 93 (2000).
- 15) Sato, K. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4665 (1999).