

## 2010年 生物工学奨励賞（斎藤賞）受賞



# メタボロミクスの技術開発と応用

馬場 健史



## Development of metabolomics technologies and applications

Takeshi Bamba (*Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871*) *Seibutsu-kogaku* **89**: 102-108, 2011.

### はじめに

近年のライフサイエンスおよび機器分析技術の驚異的な進歩により、生物の遺伝子や酵素、代謝物の相違、変化を包括的かつ網羅的に解析することが可能になった。DNA→mRNA→タンパク質→代謝物という生物のセントラルドグマに従ったゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどの「オームサイエンス」が盛んに進められている。これまでの表現型を特定の遺伝子やタンパク質、代謝物でとらえそれらの機能を解析する、いわゆる一対一の関係の解析ではなく、生体反応全体を網羅的にあらゆる方向からとらえる多次元解析を行うことにより、これまでわからなかった遺伝子やタンパク質、そして代謝物の相関関係を見いだすことが可能になった。

上述のオームサイエンスの中で、メタボロミクスはゲノム情報が転写、翻訳過程を経て実行された表現型の一部である「メタボローム（代謝物総体）」が解析対象であるため、上流のプロテオームおよびトランスクリプトームといったゲノム情報の媒体の流れの解析では解明できない生体反応を明らかにできるのではないかとの期待感から、ポストゲノムサイエンスの有望技術とみなされている。すなわちメタボロミクスは、表現型としては現れにくい生体内の変化を代謝物の変化として補足する高解像度の表現型解析システムといえる。また、当然のことながら遺伝子配列情報とは独立に運用可能であり、ゲノムプロジェクトが終了していない多くの生物にも適用が可能であることが他のオームサイエンスと異なる。また、メタボロミクスは分析化学、有機化学、生命科学、

情報科学などの多岐にわたる分野から構成される学際領域研究であるために、それぞれの技術を理解し、総合的に運用することが必要となる。メタボロミクスは、図1に示すストラテジで進められるが、その中でもサンプル調製、機器分析、データ解析の3つがキーテクノロジーである。それぞれの技術要素は多成分の一斉分析を目的とするメタボロミクスに特有のものであるため、メタボロミクスを実施するためにはそれぞれの技術を十分に理解し、解析対象、研究目的に応じて好適な技術を選択する必要がある<sup>1,2)</sup>。また、信頼性の高い解析を行うためには、それぞれの技術を効率的に組み合わせたシステム構成が重要になる。これが、当初メタボロミクスが一般的な技術として定着しなかった大きな要因の一つである。筆者らのグループがメタボロミクス研究を始めた10年ほど前には標準化された技術はほとんどなく、実用的なメタボロミクスシステムの構築が急務であった。また、メタボロミクスに関して本質的な理解がなされておらず、有効な運用方法についても十分な検討がなされていない状況であった。そこで、筆者らのグループではメタボロミクスを実施するための実用的な技術の開発、ノウハウの構築を行うとともに、それらを効果的に利用した応用研究に取り組んできた。サンプル調製法、分離分析法、データ解析法、代謝物の定性、定量法などさまざまな実用メタボロミクス技術の開発および新規メタボロミクス運用法の開拓を試みてきたが、本稿では、それらの中から「フィンガープリンティングによる迅速高精度メタボロミクスデータ解析法の開発」、「安定同位体希釈法を用いた高精度代謝プロファイリング法の開発」、「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

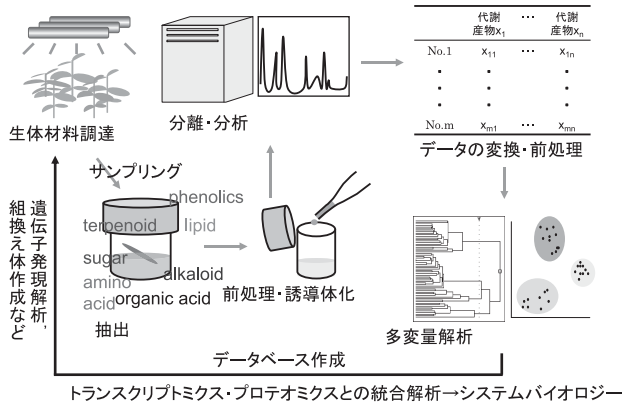


図1. メタボロミクスのスキーム

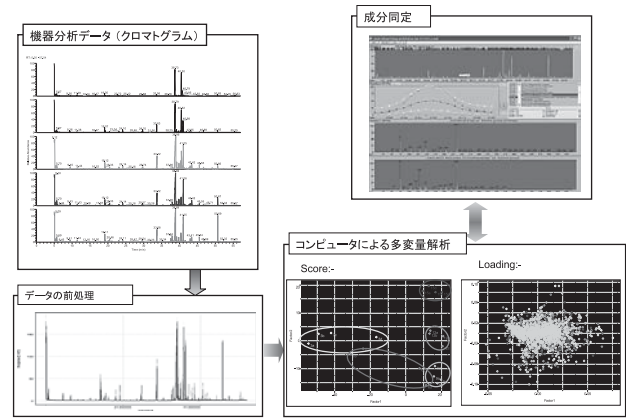


図2. クロマトフィッティング (パターン認識) によるデータ解析

質メタボロミクスシステムの開発」, 「メタボローム解析技術をベースとした代謝物マルチマーカープロファイリングの食品品質評価への応用」について紹介する。

### フィンガープリンティングによる迅速高精度メタボロミクスデータ解析法の開発

メタボロミクスのデータ解析は一般的に多変量解析を用いて行われ, データの変換も含めて独特の情報処理技術が必要とする。そのため, 複雑でわかりにくい部分が多く, また分析装置やサンプルの性質に合わせて好適な手法の選択が必要なことから, 解析を困難にしている。筆者らのグループにおいても, メタボロミクス研究に取り組み始めた当初, 分析装置から得られる生データをどのように変換し多変量解析に供するかについて試行錯誤を繰り返した。その際, データ解析の方法によって得られる結果が大きく異なることを認識し, メタボロミクスにおけるデータ解析の重要性を痛感した。そこで筆者らのグループでは, まずメタボロミクスのデータ解析に関する実用的な技術の構築に取り組んだ。

あまり認識されていないように思うが, 機器分析の生データ (クロマトグラムやスペクトラム) からどのように各変量の数値を抽出し多変量解析用のデータシート (行列データ) を作成するかが重要である。ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) を用いた手法では, 通常, 各代謝物のピークの面積値を用いてデータシートを作成しているが, ブロードニングやコエリューションしているピークについては面積値の算出が不正確になり, またピーク同定も困難であるため, 間違った解析を行ってしまう場合もあり危険である。そこで, 筆者らは, ジェルサイエンス社との共同研究により, 二次的にピークリストを作成するのではなく, クロマトグラムのパターンを直接解析する手法 (図2) の開発を行った。クロマトグラムを構成するすべてのデータポイントを使用する

ため, ピークリストを作成する手法に比べて圧倒的に変数が多く, 微小なピークやコエリューションにも対応でき, また, ピーク同定を必要としないためスループットも高いデータシステムの構築ができた。クロマトグラムのフィッティングの概念を適用することにより, 多大な労力と高度なスキルのもとに作成される代謝物リストを必要とせず, 未同定成分やピークして取り扱いにくい不十分な分離ピークの解析も可能な精度の高いメタボロミクスデータ解析法を開発した<sup>3)</sup>。すべてのピークを同定することなく変化のある成分だけを主成分分析をもとに同定することにより, 迅速な解析が可能になった。現在では, 各質量分析メーカーなどから解析ソフトが提供されるようになり, メタボロミクスを実施する上で最も大きなハードルとなっていたデータ解析における問題が改善されてきており, メタボロミクスをツールとして使いたい立場の方が気軽に取り組めるようになりつつある。筆者らのグループでも, さらにメタボロミクスを一般化させるための技術開発に積極的に取り組んでおり, GC/MSにおけるピーク同定がより簡便に行えるソフトウェアの開発に成功している<sup>4)</sup>。

### 安定同位体希釈法を用いた高精度代謝プロファイリング法の開発

質量分析は高感度, 高選択性という特徴を有することから, メタボロミクスにおいて最も頻繁に使用される検出法である。しかし, 質量分析は測定時に夾雑物が存在すると「イオンサプレッション」という致命的な現象により定量性が損なわれるという欠点を併せ持つ。イオンサプレッションとは, イオン化室にサンプルが導入されるときに, 同時に夾雑物が存在すると, サンプルのイオン化効率が低下する現象である<sup>5,6)</sup>。クロマトグラフィーなどによる各サンプルの完全時間分離がイオンサプレッションの問題を回避する唯一の解決策であるが, 現実的

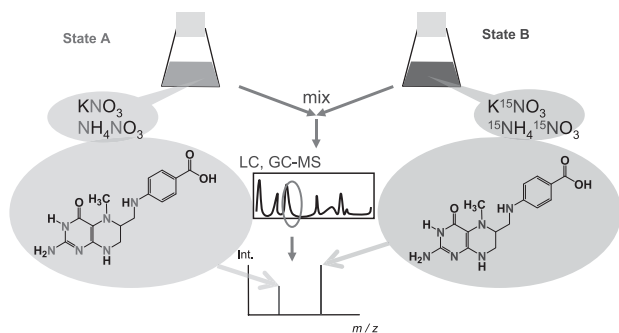


図3. 安定同位体を用いた *in vivo* ラベリング

に困難である。そこで、便宜的にイオンサプレッションの影響を回避する手法として、近年、安定同位体希釈法による相対定量分析を行う試みが検討されている。当該手法は、安定同位体標識化合物と非標識化合物とを質量分析計により分離しそれらのピーク面積比から相対的な定量を行おうとするものである。プロテオミクスにおいては isotope coded affinity tags (ICAT)<sup>7)</sup> がよく知られている。

筆者らはまずメタボロミクスにおけるイオンサプレッションの問題について調べるために各種フラボノイドをそれぞれ単体および混合物で分析し、それぞれのフラボノイドにおいてイオン化効率が大きく異なることを示した<sup>8)</sup>。さらに、<sup>13</sup>Cラベルジメチル硫酸を用いてフラボノイドを *in vitro* ラベルすることにより、イオン化サプレッションによる定量性の問題を解決できることを実証した<sup>8)</sup>。また、安定同位体を用いた *in vivo* ラベリング (図3) の技術開発についても取り組んだ。培地中に窒素源として <sup>15</sup>Nラベル化無機塩を加え植物細胞培養することにより、含窒素代謝物の *in vivo* <sup>15</sup>Nラベル化を行った。メチル基転移に関係する葉酸類や *S*-アデノシルメチオニン、*S*-アデノシルホモシステイン、そしてアミノ酸 (図4) の精密な定量解析が可能になった<sup>9,10)</sup>。さらに、当該手法を用いて通常よりも低い濃度での塩ストレスにおける代謝変動解析に成功した<sup>11)</sup>。最近では <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を用いて *in vivo* ラベルを行い、光合成関連の代謝物群の解析を行った例についても報告されている<sup>12)</sup>。当該安定同位体希釈法は精密定量を可能するだけでなく代謝の流れを追うことができるフラックス解析にも適用できることから、今後メタボロミクスにおいて頻用される手法になると思われる。

#### 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ロミクスシステムの開発

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

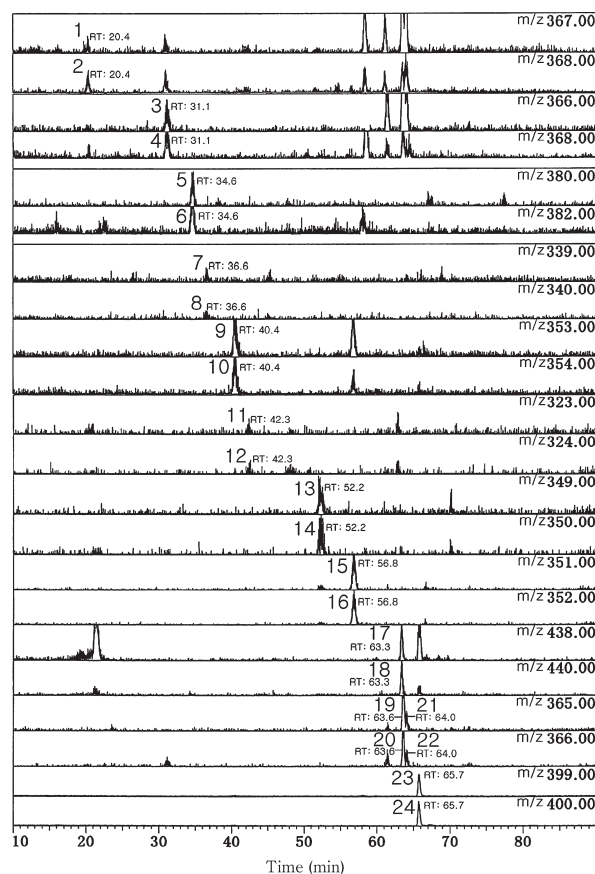


図4. <sup>15</sup>N *in vivo* ラベリングによるシロイヌナズナ培養細胞 T87 アミノ酸の解析 (文献9より引用)。1, Asp; 2, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Asp; 3, Asn; 4, (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>)-Asn; 5, Gln; 6, (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>)-Gln; 7, Ser; 8, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Ser; 9, Thr; 10, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Thr; 11, Ala; 12, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Ala; 13, Pro; 14, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Pro; 15, Val; 16, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Val; 17, Trp; 18, (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>)-Trp; 19, Ile; 20, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Ile; 21, Leu; 22, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Leu; 23, Phe; 24, (<sup>15</sup>N<sub>1</sub>)-Phe.

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<sup>13-16)</sup>。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し、あわせて関連する遺伝子の機能を明らかにすることで、親水性の代謝物の解析だけでは明らかにできなかった複雑な生体内の代謝・反応機構が理解できるようになると思われる。

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数千種類が存在する。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を必要とする。そこで筆者らは、新たな脂質の分離系として超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析 (SFC/MS) に注目しその適用を試みた。



SFCは、超臨界流体（物質固有の気液の臨界点を越えた非凝縮性の流体）を移動相として用いるGCと高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の両方の性質を持ち合わせた高解像度、ハイスループットの分離手段である<sup>17-21</sup>。SFCでは、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GCやHPLCにない幅広い分離モードを選択できる。さらに通常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°C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。

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。SFCから質量分析計へは、T型コネクター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、長さなどさまざまな要因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。イオン化には、SFC/MSにおいて一般的に用いられる大気化学イオン化法の代わりに、極性化合物にも対応可能な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、すべ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<sup>22</sup> (図5A, 5B)。また、分析時間が10分余りと短く、

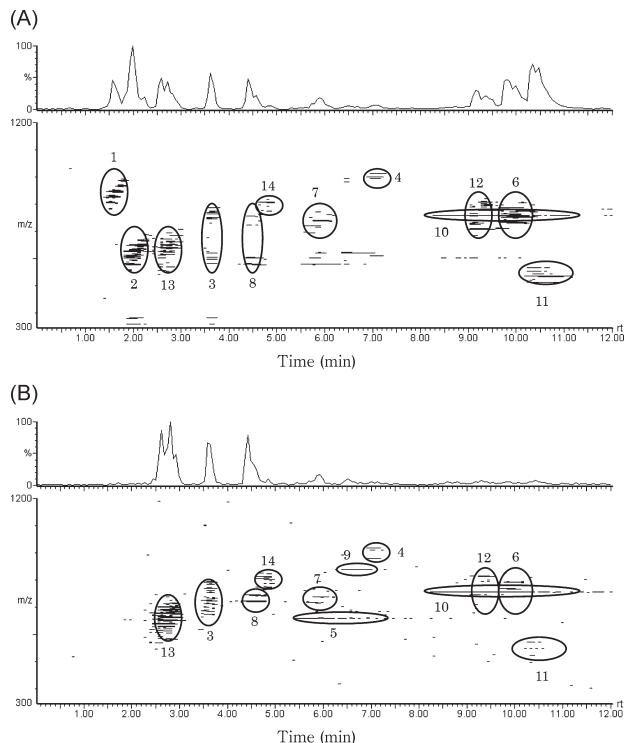


図5. SFC/MSによる脂質混合物の一斉分析（シアノカラム）（文献22より引用）。(A)ポジティブイオンモード、(B)ネガティブイオンモード。1, TG; 2, DG; 3, MGDG monogalactosyldiacylglycerol; 4, DGDG digalactosyldiacylglycerol; 5, PA; 6, PC; 7, PE phosphatidylethanolamine; 8, PG phosphatidylglycerol; 9, PI; 10, PS phosphatidylserin; 11, LPC lysophosphatidylcholine; 12, SM sphingomyelin; 13, Cer ceramide; 14, CB cerebroside.

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5A)。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5B)。また、ODS (octa decyl silyl) 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<sup>22</sup>。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。現在、当該SFC/MSシステムを用いた応用研究としてダイズ<sup>23</sup>をはじめとする各種サンプルにおける脂質プロファイリングを試みている。

## メタボローム解析技術をベースとした代謝物マルチマーカープロファイリングの食品品質評価への応用

最近ではGC/MS, CE/MS, LC/MS, NMRなどさまざまな分析機器を用いたメタボロミクスの手法が構築され、各主要代謝経路の構成化合物を対象とした代謝変動解析やノンターゲット分析にもとづくマーカー代謝物探索など各種生物においてメタボロミクスが積極的に進められている。筆者らのグループは、多数の代謝物の量比バランスによって性質の違いを詳細に表現できることがメタボロミクスの最大の利点であるとして、代謝物のノンターゲット分析をベースとするマルチマーカープロファイリング(図6)の有用性に着目した。見た目には現れない微細な生体内変動の解析やおいしさなどの複雑な成分の組み合わせにより表現される官能評価との相関解析において、マルチマーカープロファイリングは効果的に機能すると考えられる。そこで、メタボロミクスの新しい運用方法として、メタボローム解析技術をベースとした代謝物マルチマーカープロファイリングによる食品、生薬の品質評価を試みた。

食品の二次機能であるおいしさや官能評価によって定義される生薬の品質など多成分が複雑に関与するものについては、これまでの一般的な成分分析では実質的には対応が難しかった。多数の代謝物の量比バランスによって性質の違いを詳細に表現できることが代謝物マルチマーカープロファイリングの最大の利点である。そこで、まず緑茶の品質評価への適用を試みた。緑茶を選んだ理由としては、データ解析(予測モデル構築)の際に重要となる応答変数である官能評価が得られること、またその官能評価が熟練者により実施され再現性、精度が非常に高いことにあった。実際には、図7に示すように熟練試験者による官能評価によって滋味、香り、水色、外観のそれぞれが得点として算出される。

当該研究においては、まずメタボロミクスにおいて頻用されているGC/MSを用いて糖、アミノ酸、有機酸などの親水性低分子の一次代謝物を分析対象とした解析を行った。緑茶サンプルをメタノール/水/クロロホルム(2.5/1/1 by vol.)で抽出し、水添加により分離する水層画分(水-メタノール層)を濃縮乾固後誘導体化しGC/MSに供した。実際に得られるデータは300近い多数のピークが混在するクロマトグラムになり、見た目ではサンプルごとの違いを判別することは難しい。そこで、種々の前処理を行った後に、各サンプルにおいて溶出時間とその強度が示された二次元のデータマトリクスに変換し、種々の多変量解析に供した。

まず、高級茶と低級茶の比較を行い、当該システムの適用性を検討した。高級茶と低級茶のGC/MS分析データを主成分分析に供したところ、図8左側のスコアプロットにおいて、第一主成分においてクラスター分離が認められ、当該手法により品質の識別が可能であることがわかった。また、図8右側のローディングプロットでは、分離に寄与する成分が確認でき、高級茶に多く含ま

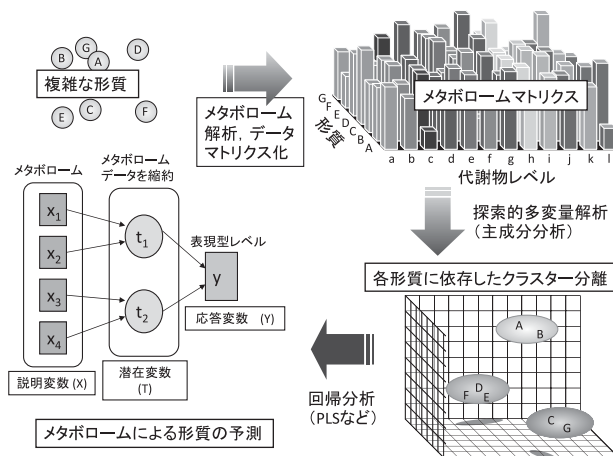


図6. メタボロミクス技術をベースとした代謝物マルチマーカープロファイリング



図7. 緑茶品評会における官能評価

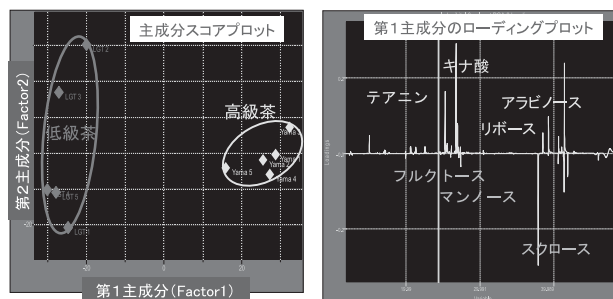


図8. 緑茶 GC/MS 分析データの主成分分析

れることがわかった。また、図8右側のローディングプロットでは、分離に寄与する成分が確認でき、高級茶に多く含ま

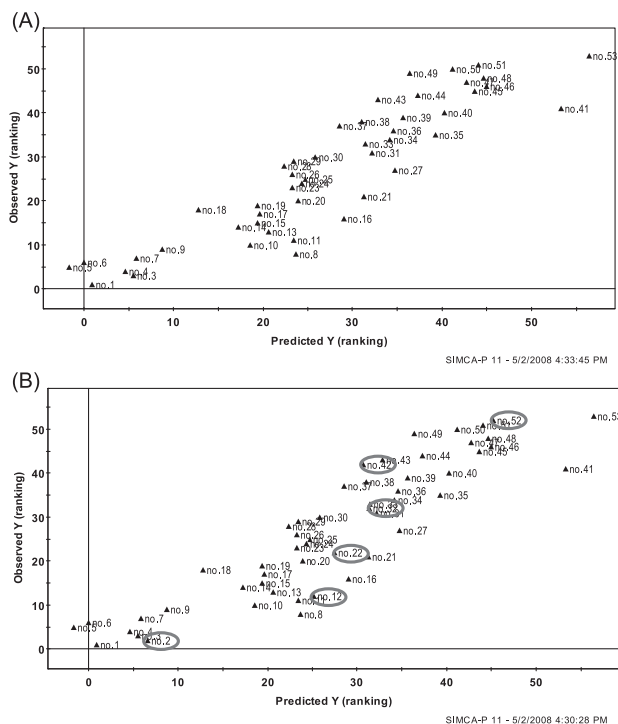


図9. 緑茶官能評価予測モデル. (A) トレーニングセット (46 サンプル) による PLS モデル, (B) テストサンプル (丸囲み) を含めた 53 ランキングサンプルによる PLS モデル.

れる成分 (上) としてテアニン, キナ酸, アラビノース, リボースなどが, 低級茶に多く含まれる成分 (下) としてフルクトース, マンノース, スクロースなどが明らかになった.

次に, 品評会において官能評価を受けた 53 種の緑茶製品サンプルを用いて同様に GC/MS 分析を行い, さらに回帰分析手法である partial least squares (PLS) を用いてランキング結果を基にした予測モデルの構築を試みた. その結果, 図 9A に示すように, 縦軸の実際のランキングに対して, 横軸の予測値が対角線上に並ぶランキング予測モデルが構築できた (モデルの精度を表す  $R^2$  値は 0.82)<sup>24</sup>. また, 図 9B においてテストサンプルを用いてモデルの予測精度を確認したところ, モデルの予測性能を表す  $Q^2$  値は 0.5 であった. さらに, このモデルの構築に寄与の高い成分を調べたところ, 図 10 に示す成分が明らかになった<sup>24</sup>. すなわち, これらの成分が緑茶のランキングを決める重要成分であるといえる.

本稿では, GC/MS を用いた結果のみ示したが, 二次代謝物をターゲットした LC/MS<sup>25</sup> や固体サンプルをそのまま熱分解して分析する熱分解抽出-GC/MS<sup>26</sup>, NMR<sup>27</sup> や近赤外分光法<sup>28</sup> を用いた場合にも, GC/MS と同様に成分とランキングの相関が得られ, 良好なランキング予測モデルが構築できた. ランキングと成分プロファイルとの理論的な意味づけはブラックボックスでは

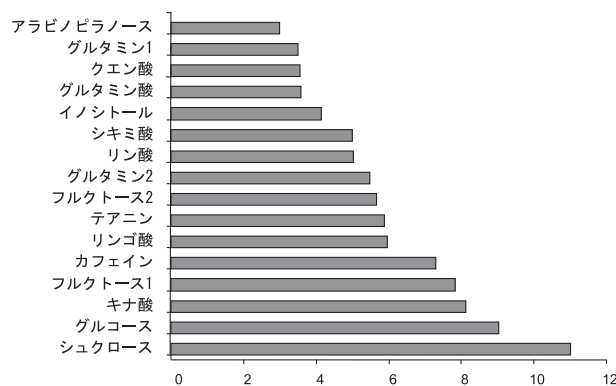


図 10. 緑茶官能評価予測モデルにおいて寄与の大きい代表的な化合物

あるが, どの分析方法を用いても再現性良く官能評価との相関を有することが明らかになった.

また, 同様の官能評価とメタボロームのプロファイルとの相関解析についてはスイカ<sup>29</sup> やダイズ<sup>23</sup>, その他多くの食品について利用可能であることを確認している. また食品と同様に評価が難しい生薬についても同様に用いることができ, トウキ<sup>30-33</sup> やシャクヤクなどの品質評価における当該手法の有用性が示されている. さらに, 当該マルチマーカープロファイリングは, 出芽酵母寿命予測 (寿命関連遺伝子の探索), ゼブラフィッシュ初期胚発生段階 (授精後時間)<sup>34</sup> 予測出芽酵母寿命予測 (寿命関連遺伝子の探索)<sup>35</sup>, 線虫のステージ予測などにも用いることができることが明らかになっており, 基礎科学の分野においても有用なツールとなることが示されている. さらにバイオエタノール生産酵母育種や創薬における毒性解析<sup>36,37</sup>, また医学分野における臨床診断, 病因解析など幅広い分野での実用的な利用が期待される.

### おわりに

最近では, 各種技術の構築が進み多くの研究者がメタボロミクスを用いて基礎研究, 製品開発などに取り組んでいる. しかし, データ解析を含めて技術の一般化が十分なされていないところがあり, ツールとして気軽に使えるようになるまでには引き続き技術開発が必要な状況である. 筆者らの研究室ではメタボロミクスのツール化を目指して, さらなる新技術の開発, 実用システムの構築, 新規運用方法の提案に取り組んでいる. 筆者は中でも特に, 本稿でも紹介した SFC/MS を用いた脂溶性代謝物のプロファイリング技術の開発と応用研究に精力的に取り組んでいる. 超臨界流体を効果的に用いてこれまでの分離分析技術では解析できなかった酸化脂質なども対象とした脂溶性代謝物の解析システムを構築することにより, 新しいメタボロミクスワールドの創成を目指し



ている。今後さらにメタボロミクスの技術開発，応用研究が進み，幅広い分野における代謝解析，化合物プロファイリングの有用ツールとしてもっと身近に利用できるようになることを期待する。

本研究は，大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻（旧応用生物学専攻）細胞生物学研究室および生物資源工学研究室，大阪大学大学院薬学研究科応用環境生物学研究室，日立造船株式会社技術研究所で行われたものであり，多大なるご指導，ご鞭撻を賜りました小林昭雄先生，平田收正先生，福崎英一郎先生，中澤慶久先生に心からお礼申し上げます。また，本研究を行うにあたりご助言，ご助力くださいました梶山慎一郎先生（現・近畿大学生物理工学部），岡澤敦司先生，山地武広氏（ジエールサイエンス株），米谷 力氏（奈良県茶業振興センター）に深く感謝致します。また，一緒に研究を行った原田和生先生（現・大阪大学大学院薬学研究科），Kanokwan Takenoさん，松原惇起さん，下西成人さん，Wipawee Pongsuwanさん，Sukanda Tianniamさん，Jae Kwang Kimさん，その他研究室の学生の皆様に感謝申し上げます。本研究の一部は，文部科学省，科学技術振興機構，新エネルギー・産業技術総合開発機構，（財）サントリー生物有機科学研究所からの助成を受けて行われました。

## 文 献

- 1) 福崎英一郎，馬場健史，小林昭雄：*Bioindustry*, **21**, 55–68 (2004).
- 2) 馬場健史，福崎英一郎：未来材料，**9**, 52–59 (2009).
- 3) Fukusaki, E., Jumtee, K., Bamba, T., Yamaji, T., and Kobayashi, A.: *Z. Naturforsch. [C]*, **61**, 267–272 (2006).
- 4) 津川裕司，辻本有輝，馬場健史，福崎英一郎：日本生物工学会大会講演要旨集，p.41 (2010).
- 5) King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., and Olah, T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 942–950 (2000).
- 6) Mueller, C., Schaefer, P., Stoertz, M., Vogt, S., and Weinmann, W.: *J. Chromatogr. B*, **773**, 47–52 (2002).
- 7) Han, D. K., Eng, J., Zhou, H., and Aebersold, R.: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 946–951 (2001).
- 8) Fukusaki, E., Harada, K., Bamba, T., and Kobayashi, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 75–77 (2005).
- 9) Kim, J. K., Harada, K., Bamba, T., Fukusaki, E., and Kobayashi, A.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1331–1340 (2005).
- 10) Harada, K., Fukusaki, E., Bamba, T., Sato, F., and Kobayashi, A.: *Biotechnol. Prog.*, **22**, 1003–1011 (2006).
- 11) Kim, J. K., Bamba, T., Harada, K., Fukusaki, E., and Kobayashi, A.: *J. Exp. Bot.*, **58**, 415–424 (2007).
- 12) Hasunuma, T., Harada, K., Miyazawa, S., Kondo, A., Fukusaki, E., and Miyake, C.: *J. Exp. Bot.*, **61**, 1041–1051 (2010).
- 13) Serhan, C. N.: *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **77**, 4–14 (2005).
- 14) Morris, M. and Watkins, S. M.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 407–412 (2005).
- 15) Han, X. and Gross, R. W.: *J. Lipid Res.*, **44**, 1071–1079 (2003).
- 16) Wenk, M. R.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 594–610 (2005).
- 17) Schmitz, F. P. and Klesper, E.: *J. Supercrit. Fluids*, **3**, 29–48 (1990).
- 18) Chester, T. L., Pinkston, J. D., and Raynie, D. E.: *Anal. Chem.*, **66**, 106R–130R (1994).
- 19) Smith, R. M.: *J. Chromatogr. A*, **856**, 83–115 (1999).
- 20) Ute, K.: Supercritical Fluid Chromatography of Polymers, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (Meyers, R. A.), p.8034, John Wiley & Sons, Inc., Chichester (2000).
- 21) Smith, R. M. (牧野圭祐監訳)：超臨界流体クロマトグラフィ，廣川書店，東京 (2001).
- 22) Bamba, T., Shimonishi, N., Matsubara, A., Hirata, H., Nakazawa, Y., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460–469 (2008).
- 23) Lee, J. W., Uchikata, T., Matsubara, A., Nakamura, T., Fukusaki, E., and Bamba, T.: 日本生物工学会大会講演要旨集，p.95 (2009).
- 24) Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., and Kobayashi, A.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231–236 (2007).
- 25) Pongsuwan, W., Bamba, T., Harada, K., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10705–10708 (2008).
- 26) Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., and Kobayashi, A.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 744–750 (2008).
- 27) Tarachiwin, L., Ute, K., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9330–9336 (2007).
- 28) Ikeda, T., Kanaya, S., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9908–9912 (2007).
- 29) Tarachiwin, L., Masako, O., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 5827–5835 (2008).
- 30) Tianniam, S., Tarachiwin, L., Bamba, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 655–659 (2008).
- 31) Tarachiwin, L., Masako, O., and Fukusaki, E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 42–48 (2008).
- 32) Tianniam, S., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Sep. Sci.*, **32**, 2233–2244 (2009).
- 33) Tianniam, S., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 89–93 (2010).
- 34) Hayashi, S., Akiyama, S., Tamaru, Y., Takeda, Y., Fujiwara, T., Inoue, K., Kobayashi, A., Maegawa, S., and Fukusaki, E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 268–272 (2009).
- 35) Yoshida, R., Tamura, T., Takaoka, C., Harada, K., Kobayashi, A., Mukai, Y., and Fukusaki, E.: *Aging Cell*, **9**, 616–625 (2010).
- 36) Bando, K., Kawahara, R., Kunimatsu, T., Sakai, J., Kimura, J., Funabashi, H., Seki, T., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 491–499 (2010).
- 37) Bando, K., Kunimatsu, T., Horii, K., Mikami, S., Aoki, M., Kimura, J., Funabashi, H., Seki, T., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Appl. Toxicol.*, doi: 10.1002/jat.1591