

**2Ca02 緑茶の製茶工程技術開発におけるメタボリックフィンガープリンティング**

○川原 類<sup>1</sup>, 馬場 健史<sup>1</sup>, ポングスワン ウィパウィー<sup>1</sup>,  
米谷 力<sup>2</sup>, 福崎 英一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪大院・工・生命先端, <sup>2</sup> 奈良茶業試験場)

製茶工程は、収穫した生茶葉を蒸熱、葉打ち、粗揉、揉柔、中揉、精揉、乾燥の工程に供し、荒茶を製造するプロセスからなる。このうち、蒸熱工程が茶の品質に最も大きく影響することが経験的にわかっている。現在、茶葉の品質を最大限に引き出すための蒸熱の設定は茶業工場で働く人の経験と勘に大きく依存している。一方、煎茶のGC-MSを用いたメタボリックフィンガープリンティングの技術はすでに確立されている。分析データを多変量解析することで、大和茶の色や味、においなどから総合的な品質を階級に分ける官能試験との相関関係を示すことができた。この大和茶の品質精密評価技術を製茶工程技術開発に応用することを目的として、本研究では蒸し時間のみにファクターを絞り茶葉成分に及ぼす影響を解析するとともに、蒸し時間の予測モデルの構築を試みた。

蒸し時間の異なる茶葉試料から親水性画分を抽出し、誘導体化後GC-MSに供した。得られたクロマトグラムを主成分分析に供した結果、蒸し時間によって分離が認められた。分離に寄与している化合物を調べたところ、蒸し時間が長いほど Glucose, Fructose が減少し、Quinic acid, Theanine, Sucroseが増加していることが明らかになった。また、同試料を近赤外分光分析に供し得られたスペクトルを主成分分析により解析したところ、GC-MS 分析と同様の傾向でクラスタリングされた。さらに、同スペクトルを Partial Least Squareによる回帰分析に供したところ、良好な予測モデルを構築することができた。

**Metabolic fingerprinting of green tea for development of manufacturing process**

○Rui KAWAHARA<sup>1</sup>, Takeshi BAMBA<sup>1</sup>, Wipawee PONGSUWAN<sup>1</sup>,  
Tsutomu YONETANI<sup>2</sup>, Eiichiro FUKUSAKI<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Tea branch., Nara Pref. Agri. Exp Sta.)

**Key words** metabolomics, metabolic fingerprinting, green tea

**2Ca04 LC-MSを用いた定量的microRNA解析手法の開発**

○瀧村 晋, 和泉 自泰, 馬場 健史, 福崎 英一郎  
(阪大院・工・生命先端)

【目的】microRNA (miRNA) は17~24塩基の一本鎖non-coding RNAであり、標的mRNAに配列特異的に作用することによってそのmRNAの分解、もしくはその翻訳を抑制するという機能を有している。現在では、遺伝子の発現調節から、発生や分化、細胞周期、細胞増殖、疾患といった高次生命現象にまで関わる重要な働きを担っていることが次第に明らかになっている。しかしながら、数千種類の配列の内、機能が確認されたのはごくわずかである。このことは、配列間の相同性が高く、また細胞内に極微量しか存在しないことが要因の一つであると考えられる。

miRNAの機能を解明するためには、網羅性、高選択性、高感度、定量性を伴った解析手法が必要である。しかし、従来法においてそのすべてを満たすものはない。そこで本研究では、LC-MS分析系を用いて、上記の条件を満たすmiRNAの新規解析手法を開発することを目的とした。本解析手法の最大の特徴は、標的miRNAを増幅せずに、多種のmiRNAを同時に分離・検出し、増幅なしに定量することである。

【方法と結果】まず、1種類の合成miRNAを用いてイオン化に影響する質量分析計のパラメータ、溶媒と添加剤の最適化を行った。その結果、多価イオンのマススペクトルパターンから定性解析が、また、安定なイオン化が認められた多価イオンにおいては定量解析が可能であることが示唆された。

次に、10種類の合成miRNA標準品混合物を用いて、分離カラムおよび移動相の検討を行った。全てのmiRNAの時間分離までには至ってはいないものの、分離・検出に好適な分析条件が構築できた。

**Development of a method for the quantitative microRNA analysis by LC-MS**

○Shin TAKIMURA, Yoshihiro IZUMI, Takeshi BAMBA,  
Eiichiro FUKUSAKI  
(Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

**Key words** microRNA, LC-MS, metabolomics

**2Ca03 GC/MS分析における代謝物同定のためのアルゴリズム開発**

○橋本 卓哉<sup>1</sup>, 大石 貴史<sup>2</sup>, 池田 達彦<sup>1</sup>, 林 俊介<sup>1</sup>, 馬場 健史<sup>1</sup>,  
金谷 重彦<sup>2</sup>, 福崎 英一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪大院・工・生命先端, <sup>2</sup> 奈良先端大・情報科学)

近年の分析技術の発達とデータ処理技術の進展は、生体内代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスの発展に大きく寄与している。GC/MSやLC/MSといった分析機器からは分析した生物サンプルの質量分析データ(クロマトグラム)を得ることができる。このデータは保持時間とマススペクトル、イオン強度といった膨大な情報を持つ。データ処理の最終的な目標はこのデータから化合物を同定、定量を行うことである。現在までに多くの解析ツールが開発され、複数工程からなるデータ前処理に供された後、同定処理が行われている。しかしながら現状では、(1)分析機器の状態による、保持時間の不規則なズレ、(2)生物サンプルの高い複雑性、といった要因から解析ツールによるデータ解析だけで代謝物を同定することは困難であり、人の手を介した非常に煩雑な検証作業が必要となる。

そこで、本研究ではより簡便に代謝物の同定を可能にするアルゴリズムを検討した。アルゴリズムの基本原理は以下に示すとおりである。

- 生データの情報を、相関係数を用いたクラスタでマッピングする
- 標品の分析情報をデータベースとして同様にマッピングする
- データベースのマップと総合合わせすることで、サンプルと相関の高いピークを代謝物として同定する

現在はin-houseのデータベースにより相関係数を基にしたマッピングを試みており、今後実サンプルにおける当該アルゴリズムを用いた代謝物同定の有用性について評価する予定である。

**Development of algorithm for identifying metabolites in GC/MS analysis**

○Takuya HASHIMOTO<sup>1</sup>, Takashi OISHI<sup>2</sup>, Tatsuhiko IKEDA<sup>1</sup>,  
Shunsuke HAYASHI<sup>1</sup>, Takeshi BAMBA<sup>1</sup>, Shigehiko KANAYA<sup>2</sup>,  
Eiichiro FUKUSAKI<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Info. Sci., NAIIST)

**Key words** metabolomics, bioinformatics, datamining

**2Ca05 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた脂溶性代謝物の高速・精密分析**

○松原 惇起<sup>1</sup>, 石田 洋基<sup>1</sup>, 原田 和生<sup>1</sup>, 平田 收正<sup>1</sup>,  
福崎 英一郎<sup>2</sup>, 馬場 健史<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup> 阪大院・薬, <sup>2</sup> 阪大院・工・生命先端)

【目的】超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)は高分離高速分析が可能であるという特徴を持ち、特に脂溶性代謝物の分離分析において有用であることが示されている。我々は、これまでに検出器として質量分析計(MS)を接続した高感度の分析系を構築し、リン脂質、糖脂質、中性脂質などの14種の脂質混合物の高速一斉分析に成功した。本研究では、さらに他の脂溶性代謝物についてもSFC/MSの適用を試みたので報告する。

【方法・結果・考察】カロテノイド類、脂溶性ビタミン類などの各種脂溶性代謝物の標準品を用いて分析条件を検討した。カロテノイドの分析においてモノリス型シリカカラムの適用を試みたところ、粒子充填型のカラムを用いたときに比べ分離が向上し、分析時間も短縮することができた。また、脂溶性ビタミン類の分析においては、酸化されやすい脂溶性代謝物を安定に抽出するためオンライン超臨界流体抽出(SFE)-SFC/MSシステムの構築を試み、有機溶媒による抽出物の分析では検出されなかった光合成細菌中の還元型コエンザイムQ<sub>10</sub>の検出に成功した。これらの結果は脂溶性代謝物の分離分析におけるSFCの有用性を改めて示すものであり、今後SFC/MSが脂溶性代謝物のメタボロミクスにおける新たな分析手法として効果的な適用が期待される。

**High-throughput, high-resolution analysis of hydrophobic metabolites by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry**

○Atsuki MATSUBARA<sup>1</sup>, Hiroki ISHIDA<sup>1</sup>, Kazuo HARADA<sup>1</sup>,  
Kazumasa HIRATA<sup>1</sup>, Ei-ichiro FUKUSAKI<sup>2</sup>, Takeshi BAMBA<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** supercritical fluid chromatography/mass spectrometry (SFC/MS), carotenoids, fat-soluble vitamins, metabolomics