

# ライフサーベイヤにおける超臨界流体 クロマトグラフィーの可能性

馬場 健史

現在、科研費特定領域研究「ライフサーベイヤ」においては、DNA、RNA、タンパク質、代謝物などの生体分子群のデジタル精密計測に基づいた細胞機能解析が進められている。代謝物はゲノム情報の実行の結果であり、また生物の状態を表す表現型そのものであることから、遺伝子情報に基づく解析では得られない知見を取得できる重要分子群である。したがって、高感度で高精度の代謝物解析技術はライフサーベイヤ構築に必要不可欠である。著者らは、代謝解析のためのさまざまな技術開発に取り組んでいるが、その中でも新しい分析手法として超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) に注目し、その適用を試みている。これまでにSFCを利用して、植物に存在する複雑な幾何異性類縁体の解析や分子量 7000 を超えるポリマーの分離に成功している<sup>1-3)</sup>。また、質量分析計 (MS) の接続を試み、SFC/MSによる脂質混合物の一斉分析系を構築した<sup>4)</sup>。本稿では、特に疎水性代謝物の分離分析におけるSFCの有用性について紹介するとともに示すとともに、SFCのさらなる可能性について述べたい。

## 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) とは

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ガスクロマトグラフィー (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>5-9)</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°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 (SCCO<sub>2</sub>) 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によるポリプレノール分析系の構築と 植物ポリプレノール解析への応用

ポリプレノールは、高分子イソプレンの生合成中間体由来する物質としてポリイソプレノイド研究における重要代謝物である。トランス型、シス型など4種類の異性体が存在するが、従来法のHPLCでは、鎖長による分離のみで異性体の分離は困難であった<sup>10)</sup>。そこで、新たな分析系として種々の疎水性ポリマーの分析において優れた分離能を示す<sup>8)</sup> SFCに着目し、ポリプレノールの分離分析への適用を試みた。まず、イソプレン単位が16~22個のシス型ポリプレノールの混合物である Prenol C<sub>80</sub>-C<sub>110</sub> をモデル試料として用いSFCの分離条件を検討した。固定相にODSカラム、移動相にエタノールを添加したSCCO<sub>2</sub>を用いた系で、逆相HPLC分析系に比べて2倍以上の分離度が得られた<sup>1)</sup>。

次に、上記のSFC分析系を用いて、トランス型のイソプレングムを産生するトチュウ (*Eucommia ulmoides*) の葉から抽出したポリプレノールの分析を行った。逆相HPLCでは部分的に分離するのみであった2種のピーク群がSFCでは明瞭に分離した<sup>2)</sup> (図1)。SFCで分離された個々のポリプレノールの化学構造を明らかにするために、分取SFCによる単離を試みた。各フラクションについてNMRおよび電解脱離質量分析を用いて構造解析を行った。その結果、トチュウ葉ポリプレノールのSFC溶出ピークは図1に示すように帰属され、シス型、トランス型がそれぞれ重合度により等間隔に溶出していることが明らかになった<sup>2)</sup>。また、当該分析系では逆相HPLC

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

## 特集

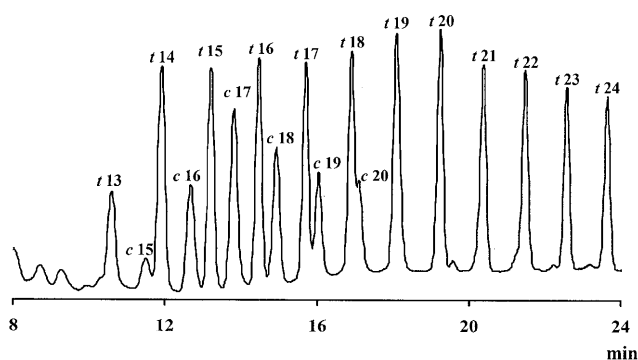


図1. トチュウ葉由来ポリプレノール画分のSFC分析 (文献2より引用改変). *t*, トランス型; *c*, シス型.

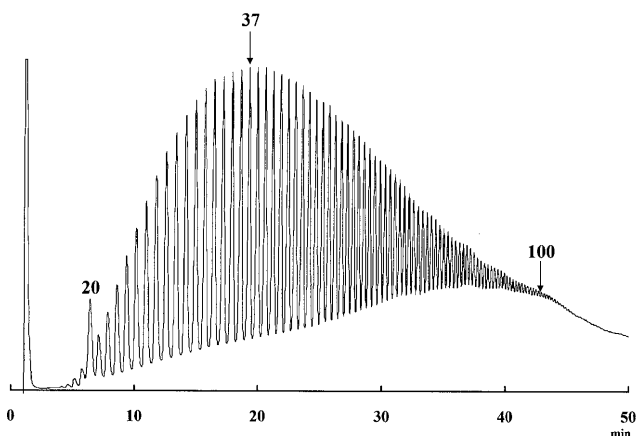


図2. トチュウ葉由来長鎖ポリプレノール画分のSFC分析 (文献3より引用改変)

とは異なり、試料中に植物由来の不純物が含まれる場合でもポリプレノールの分離は低下せず、試料負荷の増大ともなうクロマトグラムの変化も小さかった。

前述のSFCの分離条件は、10量体から30量体までのいわゆるポリプレノール画分に焦点を合わせたものである。しかし、ポリイソプレンを産生する植物中にはさらに高分子量のポリプレノールが存在すると考えられる。そこで、より長鎖のポリプレノールの分析が可能な分離条件について検討した。低分子量ポリプレノールのSFC分離の際にモディファイヤーとして有効であったエタノールに代えてテトラヒドロフランを用いることにより、長鎖ポリプレノール〔トチュウ葉由来、数平均分子量 $4.0 \times 10^3$  (シス-1,4-ポリイソプレン換算)]の良好な分離が認められ、100量体(分子量6818)以上の高分子精密分離に成功した<sup>3)</sup>(図2)。

#### SFC/MS分析系の構築と脂質メタボロミクスへの応用

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<sup>11-14)</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10の3乗オーダーの種類が存在する。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が必要とする。そこで、著者らは、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/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因子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>4)</sup>(図3A, 3B)。また、分析時間が10分余りと短く、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

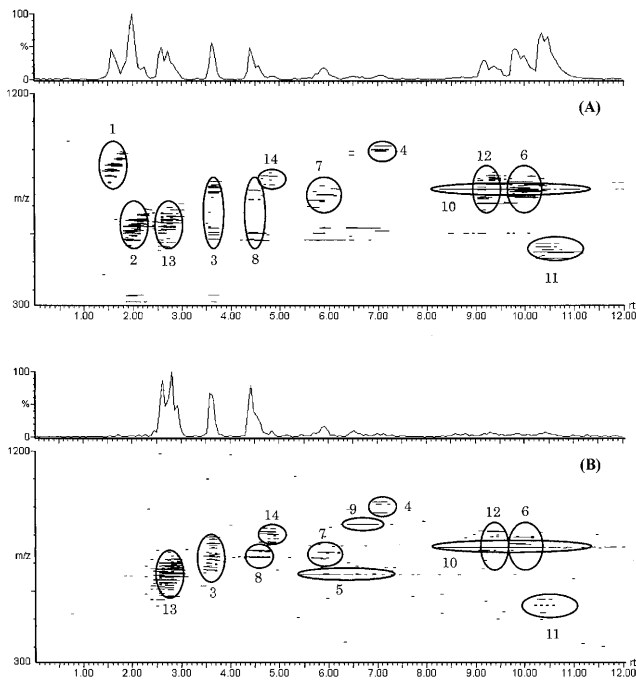


図3. SFC/MSによる脂質混合物の一斉分析(シアノカラム)(文献4より引用)。(A) ポジティブイオンモード, (B) ネガティブイオンモード: 1, TG; 2, DG; 3, MGDG monogalactosyldiacylglycerol; 4, DGDG digalactosyldiacylglycerol; 5, PA; 6, PC; 7, PE phosphatidylethanolamine; 8, PG phosphatidylglycerol; 9, PI; 10, PS phosphatidylserin; 11, LPC lysophosphatidylcholine;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

は、アンモニウムイオン付加分子として検出された(図3A)。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3B)。また、ODS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>4)</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。

### SFCの可能性

SFCは、超臨界流体抽出(supercritical fluid extraction, SFE)や各種検出器との接続により、さらにメタボロミクスなどの代謝プロファイリングに有用な技術となる。HPLCでは現実的には難しいオンラインの抽出・分析系を構築することにより、溶媒抽出法では分解され易い代

謝物の解析や多検体のハイスループットスクリーニングが可能になる。また、前処理や誘導体化もオンラインで行うことができる。検出に用いる質量分析計についても、目的に応じて三連四重極型や飛行時間型、また、各種ハイブリッド型の装置を用いることにより、高感度分析や代謝物の構造情報を得ることが可能になる。また、超臨界流体の特徴を最大限に生かすことのできるカラムを開発することにより、多くの化合物の分離分析にSFCが適用できる。さらに、キャピラリーカラムを用いた微量分析系を構築することにより、高感度化が可能になる。

現在、SFC/MSを用いたカロテノイド類や脂溶性ビタミン類の分析にも取り組んでいる。カロテノイド類の分析においては、一般的に用いられている粒子充填型のカラムの代わりにモノリス型のカラムを用いることにより分離の向上と分析時間の短縮が可能になった。また、光合成細菌中のコエンザイムQ<sub>10</sub>の分析において、オンラインSFE-SFC/MSを用いることにより、溶媒抽出法で確認できなかった還元体が検出できた。今後、さらに超臨界流体を効果的に利用した技術の開発を進め、ライフサイエンス構築に向けた研究に積極的に取り組んでいきたい。

SFCに関して多くのご助言を賜りました右手浩一教授、ならびに、研究を遂行するにあたりご指導いただきました小林昭雄教授、福崎英一郎教授、平田收正教授に深く感謝申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「ライフサイエンス」および新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)委託事業「植物の物質生産プロセス制御基盤技術開発」の資金によるものである。

### 文 献

- 1) Bamba, T. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **911**, 113 (2001).
- 2) Bamba, T. *et al.*: *Lipids*, **36**, 727 (2001).
- 3) Bamba, T. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **995**, 203 (2003).
- 4) Bamba, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460 (2008).
- 5) Schmitz, F. P. *et al.*: *J. Supercritical Fluids*, **3**, 29 (1990).
- 6) Chester, T. L. *et al.*: *Anal. Chem.*, **66**, 106R (1994).
- 7) Smith, R. M. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **856**, 83 (1999).
- 8) Ute, K.: *Supercritical Fluid Chromatography of Polymers in: Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (Meyers, R. A.), p.8034, John Wiley & Sons, Inc., Chichester (2000).
- 9) Smith, R. M. (牧野圭祐監訳): *超臨界流体クロマトグラフィー*, 廣川書店(2001).
- 10) Chojnaki, T. *et al.*: *Acta Biochim. Pol.*, **31**, 115 (1984).
- 11) Serhan, C. N.: *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **77**, 4 (2005).
- 12) Morris, M. *et al.*: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 407 (2005).
- 13) Han, X. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **44**, 1071 (2003).
- 14) Wenk, M. R.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 594 (2005).