HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CE/MSを用いた陰イオン性代謝産物の定量
Author(s)	原田, 和生; 福崎, 英一郎
Description	3章 単離・精製・活性測定 1. 代謝産物量の定量 a
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 163-168
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39115
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-026.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

1．代謝産物量の定量
a．CE/MS を用いた陰イオン性代謝産物の定量

原田　和生[1)]，福崎英一郎[2)]

光合成によって固定化された炭素フラックスを議論する上で，糖リン酸，有機酸，糖ヌクレオチドなどの陰イオン性代謝産物を定量する方法は非常に重要である．当該陰イオン性代謝産物を分離，同定，定量する方法としてイオンクロマトグラフィーやイオンペアークロマトグラフィーなどの方法が提唱されてきたが，これらの手法にはいくつか問題があった．本章ではキャピラリー電気泳動／質量分析法（CE/MS）法を用いた陰イオン性代謝産物測定法について紹介する．

Metabolic profiling of anionic compounds by capillary electrophoresis / mass spectrometry

Kazuo Harada, Eiichiro Fukusaki

Metabolic profiling of anionic compounds, such as sugar phosphates, organic acids and nucleotides, provides us the knowledge of photosynthetic carbon-fixing metabolism.　Capillary electrophoresis / mass spectrometry (CE/MS) is very useful method for metabolic profiling of anionic compounds.

1.a.1　はじめに

光合成によって固定化された炭素のフラックスを議論する上で，カルビン・ベンソン回路，光呼吸，解糖系，トリカルボン酸回路（TCA 回路）等の代謝情報は必要不可欠である．当該代謝経路の中間体は全て糖リン酸，糖ヌクレオチド，有機酸，コエンザイムA誘導体(CoA 体)のいずれかの化合物である．さらに ATP，GTP，NAD，NADP，FMN などのヌクレオチド類が補酵素として数多くの代謝反応に関わっている．したがって，光合成暗反応の代謝変動を議論するためには糖リン酸，有機酸，ヌクレオチド，CoA 体を測定する代謝産物プロファイリング手法が必須である．糖リン酸，有機酸，ヌクレオチド，CoA 体を含む化合物群は酸性極性基であるカルボキシル基，あるいはリン酸基を有する．そこで，本稿においては当該化合物群を陰イオン性代謝産物と標記する．

近年，ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)[1)]，液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS)[2)] などの代謝産物プロファイリング手法が発達し，一度に数十～数百もの低分子代謝産物を一斉に検出，定量することが可能となってきた．しかし，GC/MS や汎用されているオクタデシルシリル（ODS）カラムを用いた LC/MS では陰イオン性代謝産物を分離，検出することが極めて困難である．陰イオン性代謝産物に特化した分析手法としては，LC/MS 法の一種であるアニオンイオン交換クロマトグラフィー/質量分析（anion exchange ion chromatography/mass spectrometry, AEC/MS)[3),4)] やイオンペアー液体クロマトグラフィー/質量分析（ion-pair　liquid chromatography/mass spectrometry, IP-LC/MS)[5)] が挙げられる．AEC は溶離液に高濃度の不揮発性塩を使用するが，これがエレクトロスプレーイオン化（electrospray ionization, ESI）室に流入すると，塩が析出し，イオン化が阻害される．したがって，質量分析計に導入される前に溶離液中の塩を取り除くためにクロマトグラフ装置と質量分析計の間にイオンサプレッサーを設置することが必須であるが，塩を完全に取り除くことは極めて困難である．IP-LC/MS は揮発性の塩をイオンペアー試薬として用いるが，MS でのイオン化の際にイオンペアー試薬が陰イオン性化合物とイオンペアーを形成し，結果，分析対象化合物のイオン化効率が変動し，再現性に劣ることが問題となる．

1.a.2　CE/MS の原理

前項で述べた方法の他にイオン性化合物を分析する強力な手法としてキャピラリー電気泳動/質量分析（capillary electrophoresis/mass spectrometry, CE/MS)[6),7),8),9),10)] が挙げられる．図 1 に CE/MS システムの模式図を示した．

CE は内径 50～100 μm 程度のキャピラリーの中を電解質で満たし両端に数十 kV の電圧を印加することによ

1）大阪大学大学院薬学研究科
2）大阪大学大学院工学研究科

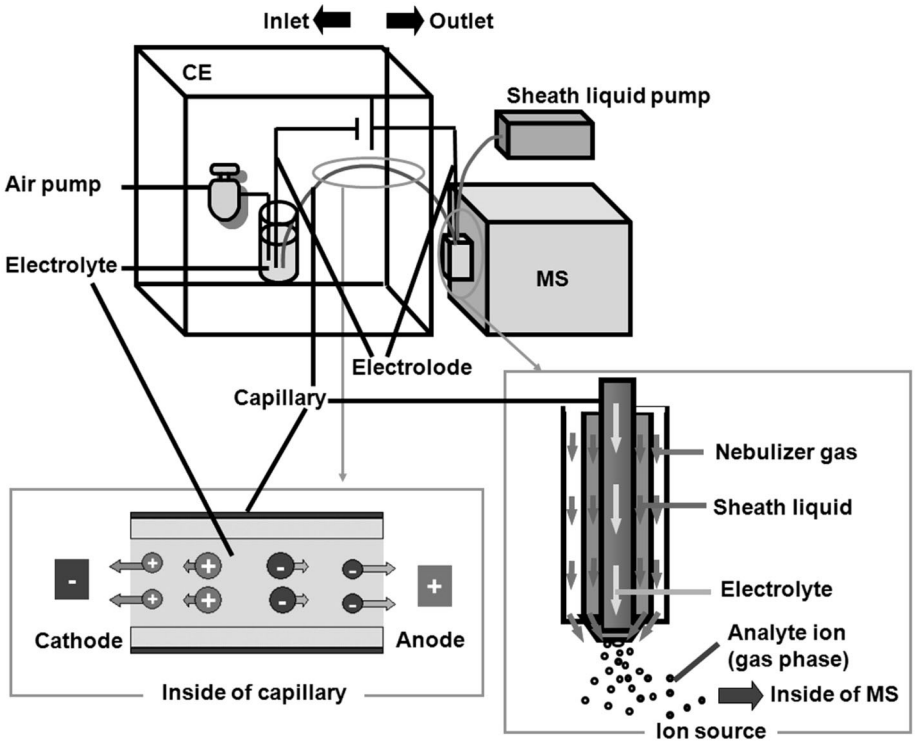

図1：CE/MS システムの模式図

り，対象化合物を電荷と分子の大きさの違いにより分離する．異性体も電荷分布と分子の大きさが異なるのでCE により分離が可能である．また，内径が非常に小さいキャピラリーを使用するため，分析対象化合物の熱拡散を抑制でき，高い分離能を達成することが可能となる．

キャピラリー出口は質量分析計に接続されており，ESI 法により対象化合物の気相イオンが形成される．通常，メタノール等の極性有機溶媒と酢酸アンモニウム等のイオン化補助剤を含むシース液（sheath liquid）をイオン化室内で電解質と混合する手法が用いられる．これは，ESI イオン化室に流入する液体が電解質のみの場合では気相イオンが形成される際に必要な脱溶媒の効率が非常に低く，脱溶媒および気相イオン化を促進する必要があるためである．気相試料イオンは質量分析装置内の質量分離部に導入され，質量電荷比（m/z）の値に従って分離，検出される．ESI 法ではプロトン化分子や脱プロトン化分子などのような分子内結合が開裂していない分子量関連イオンが検出されるので，化合物の同定に有用である．

このようにCE はイオン性化合物に対して高い分離能を，MS は高い選択性と感度を有するので，CE/MS 法はイオン性化合物を誘導体化することなく精度良く測定することが可能である．したがって，当該手法は陰イオン性代謝産物をプロファイリングする非常に強力な手法となる．

1.a.3　CE/MS 測定手法

CE/MS の大まかな測定条件について以下に記述する．具体的な操作手法はどのメーカーの機種においてもほぼ同様であるが，細かい部分で若干異なる点が多数存在する．実際に運用する際は各メーカーの説明を参照して頂きたい．

1.a.3.1　CE 条件

CE 分析条件を決定するためには，まず電気浸透流（electroosmotic flow, EOF）が質量分析計側に向かうように，用いるキャピラリーの種類と CE の極性（キャピラリー入口側を陽極とするか，陰極とするか）を決定することが必要である．EOF の発生原理は次の通りである．キャピラリー内壁表面が帯電していると電解質中に存在するカウンターイオンがキャピラリー内壁との界面に集まり電気二重層が形成される．この状態でキャピラリー両端に電圧が印加されると，電解質の流れが発生する．これが EOF である．EOF の方向はキャピラリー内壁の電荷によって決まり，正電荷の場合は陰極から陽極，負電荷の場合は陽極から陰極となる．また EOF の大きさはキャピラリー内壁表面の電荷密度が高ければ大きくなり，低いと小さくなる．電荷が無ければ 0 となる．この

EOF が質量分析計の方向に向かなければ，質量分析計側のキャピラリー内部に空気の層が生じ，電気泳動が成立しない．

陰イオン性代謝産物プロファイリングに用いられるキャピラリーは（i）未修飾フューズドシリカキャピラリー[9]（内壁にシラノール基が露出），(ii)化学修飾によりスルホン基が内壁表面に提示されたキャピラリー（例，GL sciences 社製 FunCap Type S）[10),11)]，（iii）カチオン性ポリマーで物理的にコーティングされたキャピラリー（例，Nacalai Tesque 社製 SMILE(+)）[6),12)]，（iv）ポリジメチルシロキサンによりコーティングされたキャピラリー（例，Agilent Technologies 社製 DB-1）[7)] の 4 種である．上述の EOF の発生原理に基づくと (i)，(ii) を用いる場合，CE の極性はキャピラリー入口を陽極，出口を陰極とし，(iii) を用いる場合は入口を陰極，出口を陽極とする．また，(iv) の場合は通常（iii）と同じ極性を用いるが，ほぼ完全に EOF が抑制されるため，CE 付属のエアーポンプを用いて電解質バイアルを加圧することにより，電解質の流れを発生させる必要がある．尚，(i)，(ii) を用いた場合は陰イオン性化合物が静電引力により陽極である入口側に引き寄せられるため，それ以上の大きさの電解質の流れを発生させる必要がある．EOF の大きさがそれに達しない場合は (iv) と同様にエアーポンプによる送液を用いる必要がある．また，同じく (i)，(ii) を用いた場合，分離の途中からエアーポンプで送液を行い，キャピラリー中に残った化合物を質量分析計側に送り込む手法も非常に有用である[9]．ただし，電解質の流れの速度分布が，EOF は均一な栓流に近いのに対し，エアーポンプによる送液は放物面を持つ層流となるため，分離度が低くなるというデメリットもある．

キャピラリーの使い分けに明確な指針はないが，(iii) は ATP や GTP などの多価イオンが内壁に吸着されやすい[6]，(iv) は電解質の pH を 7 以上にすることができない，といった問題点がある．また，(ii)～(iv) は (i) に比べ約 10 倍もの価格になることも考慮しなければならない．なぜなら，キャピラリーは GC や LC のカラムに比べ圧倒的に寿命が短く，ランニングコストを無視することができない．CE におけるキャピラリーの寿命とは両端に電圧を印加しても電流が流れなくなり，電気泳動が成立しなくなる状態の事を指している．この点を鑑みると (i) は他の 3 者に比べ，移動時間の再現性や寿命の点でやや劣るが，ランニングコストが抑えられることから，ファーストチョイスとして適していると著者らは考える．

続いて電解質の pH と組成について言及する．これらは化合物の分離と EOF の大きさに影響を及ぼす．pH が 8 以上でないとリボース 5-リン酸やリブロース 5-リン酸のような構造異性体の分離は難しい．しかし，pH を上げ過ぎると，キャピラリー内壁の修飾基あるいはシリカに含まれるシロキサン結合が開裂しやすくなり，キャピラリーの寿命が短くなる．通常は pH 8～9 程度に調整する．また，電解質は質量分析計においてイオン化を阻害しないよう揮発性のものを使用しなければならない．従って CE/MS において利用できる電解質は非常に制限され，酸として蟻酸，酢酸，塩基としてアンモニウム，トリメチルアミン，トリエチルアミンが用いられる．濃度は 50 mM 程度が適している．これ以上高くするとキャピラリーに過電流が流れ，安定しにくくなる．これらの電解質の種類は EOF や分離にも影響を与える．著者らの経験では，酢酸やトリエチルアミンを用いると EOF は小さくなり，分析時間が長くなるが異性体の分離が向上しやすくなり，蟻酸やアンモニウムを用いると EOF が大きくなり，分析時間が短縮されるが，異性体の分離がやや劣るという傾向が見られた．

次に重要なのは試料注入量である．注入量が大きいと当然感度が上昇するが，エレクトロフェログラムのピーク幅が広くなり，分離が難しくなる．通常は 10 nl 程度にするのがよいと思われる．試料注入はエアーポンプを用いて試料バイアルに非常に低い圧力で加圧することにより行う．

1.a.3.2 MS 条件

第 2 項で述べたように CE キャピラリーの出口側は MS の ESI イオン化室に接続される．CE/MS の成否のカギを握るのはこの接続部分といっても過言ではない．通常，スプレーニードルの構造は図 1 に示すように，二重構造となっている．すなわち内側の SUS ニードル中を CE キャピラリーが通り，キャピラリーとニードルの間をシース液，内側と外側の SUS ニードルの間をネブライザーガスが通過し，先端部で電解質，シース液，ネブライザーガスが混合され，イオン化室内部に噴霧される仕組みになっている．MS の機種によって CE キャピラリーが内側の SUS ニードルの先端から突出する場合と，内側の SUS ニードルの先端がテーパー状になり，CE キャピラリー先端はニードルの中に収まっている場合の二種類が存在する．前者の場合，二つの SUS ニードルと CE キャピラリーの先端の位置のバランスがスプレーの安定性，感度に大きく影響を与える．後者の場合も二つの SUS ニードルの先端の位置バランスが重要であるが，CE キャピラリー先端は内側のニードルの先端直前まで押し込めばよく，この点に関して後者のほうが，操

作がやや簡便であるかもしれない．

さらにESIの構造の違いとして，スプレーニードルに電圧が印加される構造か，接地されているか，という点が挙げられる．前者の場合は，分析開始時CEの電圧を印加する最中にスプレーニードルに電圧を印加せず，CEの電流値が安定した後にニードルに電圧を印加し，イオンの検出を行うという工夫が必要である．

ネブライザーガス圧もスプレー形状を安定化させるのに非常に重要である．特に，ガス圧を高く上げ過ぎるとアスピレーション作用が働き，イオンの移動度が大きくなり，十分に分離される前に質量分析計に到達することになるので注意が必要である．

シース液の組成，流量は感度に直接影響を及ぼす．シース液の組成は前述のように極性有機溶媒にイオン化補助剤を添加する．有機溶媒にはメタノール，2-プロパノール，アセトニトリルが良く用いられる．陰イオン性化合物の場合は非プロトン性のアセトニトリルを50%程度の割合で用いるのが適していると思われる．イオン化補助剤には5 mM程度の蟻酸アンモニウム，酢酸アンモニウムが用いられる．流速は低いほうが分析対象化合物の希釈も抑えられ，検出感度が高まるが，CEの電流値が安定しない，ピーク面積がばらつきやすい等，システムが安定化しにくい場合がある．シース液の流速を上げると，感度は落ちるが，安定化しやすい．機種によって最適な値を探索すべきであるが，著者らは10 μl/minが目安と考えている．

現在，質量分離部の構造が異なる様々な質量分析計が市販されているが，カルビン・ベンソン回路，解糖系，TCA回路の既知の中間体を感度良く定量するためには，タンデム四重極型質量分析計が有用である[10]．当該装置はmultiple reaction monitoring（MRM）法と呼ばれる手法によりバックグラウンドを除去し，高感度分析を達成することができる．ただし，MRM法は標準物質溶液を用いてcollision energyなど質量分析に必要な各種パラメータを最適化する必要があり従って，標準物質が入手可能な化合物でなければ分析対象にすることが難しい．また，未知化合物のスクリーニングにはあまり適していない．

飛行時間型質量分析計（TOF-MS）は精密質量情報が得られる為，未知化合物のスクリーニングに有用である[13]．また，従来はダイナミックレンジが狭く定量には不向きとされていたが，近年では計算処理により，四重極型質量分析計と同等のダイナミックレンジが達成できるようになってきた．さらにスキャン速度が四重極型に比べ圧倒的に早く，同時に多くの化合物を定量する場合は，TOF型のほうが適している．

参考までに，著者らが植物の葉に含まれるカルビン・ベンソン回路，中間体を測定する際に用いている分析条件の例を表1に記す．

表1：CE/MS陰イオン性代謝産物測定条件の例

	CE
装置	P/ACE MDQ（Beckman Coulter）
キャピラリー	FunCap-CE type S（GL sciences）
キャピラリーサイズ	50 mm i.d.×80 cm
キャピラリー温度	20°C
試料室温度	4°C
電解質	50 mM 酢酸アンモニウム pH 9.0
印加電圧	0-12分：30 kV，12-16分：0 kV
ランプ時間	0.30分
エアーポンプ圧	0-12分：0 psi，12-16分：3.5 psi
極性	陽極：入口（vial側），陰極：出口（MS側）
リンス条件	初めて使用するキャピラリーの場合：30 psi(2.1 bar)，60分間 分析間：30 psi，5分間
試料注入	2.0 psi（0.14 bar），5秒間，（約6 nl）
	MS
装置	4000 QTRAP（Applied Biosystems）
イオン化室	Turbo V ion source（Applied Biosystems）
イオン化法	ESI
極性	ネガティブ
イオンスプレー電圧	0-1分：0 kV，1-16分：−4.5 kV
ネブライザーガス圧	20 psi
モニタリング法	MRM
Dwell time	100 msec/1 MRM
シース液	10.0 mM蟻酸アンモニウム/アセトニトリル（50/50）
シース液流量	10 μl/min

1.a.4　サンプル調製法

本稿で分析対象とした糖リン酸，ヌクレオチド類はターンオーバーが非常に速く，サンプリング時に瞬時にクエンチングを行わなければ，代謝が進んでしまい本来の代謝プロファイルを得ることができない．特に液体培地で培養した光合成微生物や培養細胞は，培地と細胞の分離，細胞の洗浄に時間がかかり正確な代謝プロファイリングを困難にする．細胞懸濁液を－20°C程度に冷却したメタノール水溶液に直接入れて，クエンチングと洗浄を同時に行う方法も提唱されているが，菌体からのアミノ酸や有機酸の漏れが大きいことが報告されている[14]．また，サンプル抽出にはメタノールなどの極性溶媒が用いられるが，水分を大量に含むサンプルであると酵素が十分失活せず代謝が進んでしまう．そのような場合は凍結乾燥などで代謝をクエンチしながら乾燥させる等の工夫も必要である．

サンプル前処理としては，タンパク質，脂質の除去が重要である．当該化合物群はCEにおける分離を著しく阻害する．特に，光合成が盛んな植物の葉の組織においてはクロロフィルや光合成関連タンパク質が大量に含まれており，これらを徹底的に除去しなければならない．これらの除去には下記に示す通り，液々分配および限外濾過が有効である．固相抽出による精製も考えられるが，回収率の低下が回避できず，加えて汎用されているシリカベースの固相担体ではリン酸エステル結合が開裂しやすいなどの問題も生じる．

植物の葉の組織において，糖リン酸は比較的低濃度であり，場合によっては濃縮が必要である．しかしながら，必要以上に濃縮するとCEの電流値が安定しない，ピーク形状が悪くなる，分離が不十分でイオンサプレッションによりイオンがより検出し難くなるなどの不具合が生じるので注意が必要である．また，CEの分離能を十分引き出すためには，試料溶液は伝導度の低い超純水で溶解させておく必要がある．

以下に，植物組織を用いた場合のサンプル調製法を記す．

[実験方法]

1．植物組織（湿重量，約100 mg）を2.0 mlサンプルチューブに移し，液体窒素で凍結させ，ボールミルで20/秒の速度で破砕．
2．破砕した細胞に500 μlのメタノールと20 μlの内部標準物質溶液（100 μM　piperazine　1,4-bis（2-ethanesulfonic acid（PIPES））を添加し，37°C，5分，1,200 rpmの条件で振盪し，抽出．
3．500 μlのクロロホルム，180 μlの蒸留水を添加し，振盪後，遠心分離．
4．上相（水相）を回収し，新しい1.5 mlサンプルチューブに移し，さらに200 μlの蒸留水を添加し，遠心分離．
5．上相をUltrafree MC（分画分子量5 kDa，Millipore社）に移し，10,000×g，60分間遠心し，限外ろ過．
6．得られたろ液を遠心濃縮に供し，溶媒を除去．
7．蒸留水で再溶解し，CE/MS分析に供す．

1.a.5　おわりに

現状ではCE/MSはGC/MSやLC/MSほど普及していない．その要因として，移動時間再現性の低さ，イオン化サプレッションの影響などの課題が挙げられる．しかし，現在のところ，カルビン・ベンソン回路，解糖系，TCA回路など光合成の炭素固定に直接関与する代謝経路の中間体を網羅できるのはCE/MSのみである．今後，技術的課題の克服が進み，バイオサイエンスに大きく貢献していくものと考えられる．

参考文献

1）O. Fiehn, J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, & L. Willmitzer, *Nat. Biotechnol*., **18** (2000) P.1157.
2）V. V. Tolstikov, & O. Fiehn, *Anal. Chem*., **75** (2003) P. 6737.
3）J. C. van Dam, M. R. Eman, J. Frank, H. C. Lange, G. W. K. van Dedem, & S. J. Heijnen, *Analytica Chimica Acta*, **460** (2002) P.209.
4）Y. Sekiguchi, N. Mitsuhashi, T. Kokaji, H. Miyakoda, & T. Mimura, *J. Chromatogr. A*, **1085** (2005) P.131.
5）B. Luo, K. Groenke, R. Takors, C. Wandrey, & M. Oldiges, *J. Chromatogr. A*, **1147** (2007) P.153.
6）T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, & T. Nishioka, *Anal. Chem*., **74** (2002), P.2233.
7）T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, & T. Nishioka, *Anal. Chem*., **74** (2002) P.6224.
8）T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, & T. Nishioka, *J. Proteome Res*., **2** (2003) P.488.
9）K. Harada, E. Fukusaki, & A. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng*., **101** (2006) P.403.
10）K. Harada, Y. Ohyama, T. Tabushi, A. Kobayashi, & E. Fukusaki, *J. Biosci. Bioeng*., **105** (2008) P.249.
11）S. Kodama, A. Yamamoto, H. Terashima, Y. Honda, A. Taga, & S. Honda, *Electrophoresis*, **26** (2005) P.4070.

12) H. Katayama, Y. Ishihama, & N. Asakawa, *Anal. Chem*., **70** (1998) P.5272.
13) T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert., T. Nishioka, & M. Tomita, *J. Biol. Chem*., **281** (2006) P. 16768.
14) C. J. Bolten, P. Kiefer, F. Letisse, J. C. Portais, & C. Wittmann, *Anal. Chem*., **79** (2007) P.3843.