



Title	安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法—2 : ガスクロマトグラフ-質量分析計とMassWorks
Author(s)	力石, 嘉人; 滝沢, 侑子; 布浦, 拓郎
Citation	低温科学, 79, 23-29
Issue Date	2021-03-20
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.79.23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81347
Type	departmental bulletin paper
File Information	06_p023-029_LT79.pdf



安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の 検出法— 2 : ガスクロマトグラフ-質量分析計と MassWorks

力石 嘉人^{1)*}, 滝沢 侑子¹⁾, 布浦 拓郎²⁾

2020 年 11 月 25 日受付, 2021 年 1 月 11 日受理

分子内 Stable Isotope Probing 法とは, 特定の部位を人工的に同位体標識した基質 (ブドウ糖など) を用いて, その同位体標識の移動を, 単一の生物体内, 生物群集内, または海底の堆積場で追跡することで, 試料中で起きている代謝合成経路の可視化や, 生化学反応の特定を行う手法である. この手法は, 近年, ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) と質量のキャリブレーション用のソフトウェア MassWorks の組み合わせにより, 大きく発展した. 本稿では, この手法の原理について解説する.

Stable isotope analysis -1: MassWorks on conventional gas chromatograph-mass spectrometer

Yoshito Chikaraishi, Yuko Takiawa and Takuro Nunoura

MassWorks is an acquisition software that works on the mass spectra of conventional gas chromatograph-mass spectrometer, to determine stable isotope labels in organic compounds. The analysis of the isotope labels at the level of individual positions in organic compounds is potentially highly useful as a novel 'Position-Specific Stable Isotope Probing' to trace metabolic flow and associated function in diverse samples including single organisms and biotic community as well as sedimentary site. We review a brief outline of MassWorks and its application.

キーワード : SIP 法, 安定同位体, アミノ酸, 代謝
SIP, Stable isotope, Amino acid, Metabolism

1. はじめに

水素・炭素・窒素などの有機化合物を構成する元素には, 安定同位体が存在するが, 重い同位体の平均存在量は, それぞれ, 約 0.0115% (D), 1.07% (¹³C), 0.364% (¹⁵N) と, 非常に僅かである. そこで, 基質 (ブドウ糖, ピルビン酸, 酢酸など) の特定の部位を人工的に重い安定同位体 (D, ¹³C, ¹⁵N など) で標識し, 培養や飼育後の代謝物に含まれる重い同位体を追跡することで, 単一の

生物体内, 生物群集内, または海底の堆積場などにおいて, 試料中で起きている代謝合成経路の可視化や, 生化学反応の特定を行うことができる. これを Stable Isotope Probing 法 (SIP 法) といい, とくに, 代謝物 (有機化合物) の個々の部位 (例えば, 1 位の炭素, 2 位の炭素) ごとの同位体標識を追跡する手法を, 分子内 Stable Isotope Probing 法 (分子内 SIP 法, 図 1) という.

従来の SIP 法は, (1) 高速液体クロマトグラフ (HPLC : High Performance Liquid Chromatograph) 等

*連絡先
力石 嘉人
北海道大学 低温科学研究所
〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel. 011-706-5472
e-mail : ychikaraishi@lowtem.hokudai.ac.jp

1) 北海道大学 低温科学研究所
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan
2) 国立研究開発法人海洋研究開発機構
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), Yokosuka, Japan

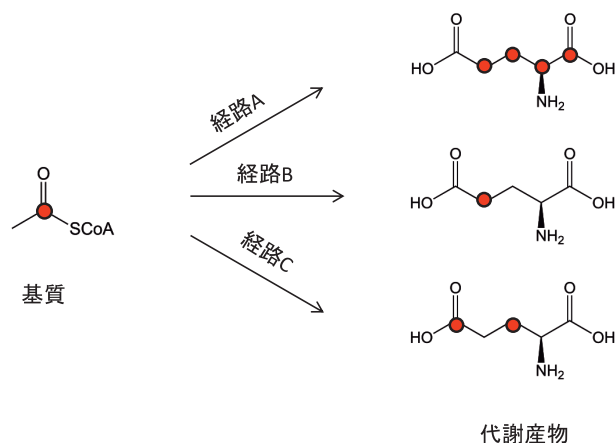


図1：分子内 Stable isotope Probing 法（分子内 SIP 法）の概念図。赤丸が安定同位体（ ^{13}C ）で標識した部位を示す。

を用いて目的の化合物を単離・精製した後に、核磁気共鳴スペクトル（NMR：Nuclear Magnetic Resonance）装置で標識された部位を特定する、もしくは（2）抽出・精製等の前処理を施した後に、元素分析-同位体比質量分析計（EA-IRMS：Elemental Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometer）やガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計（GC-IRMS：Gas Chromatograph-Isotope Ratio Mass Spectrometer）を用いて化合物ごとの標識率を調べる、のどちらかが一般的であった（図2）。しかしこれらの手法には一長一短があり、（1）NMR は、部位ごとの標識を簡単に評価できるが、一般的に感度が悪く、測定には、高標識率の（例えば、測定したい部位の炭素の50%以上が ^{13}C に置換されている）数 mg の有機化合物を必要とする。一方で、（2）IRMS は、同位体の天然存在度を測定するために設計されている機器であるために、極々低濃度の同位体標識（0.数%）は正確に測定できるが、数%を超える濃度の標識の分析はできない。また、有機化合物全体の同位体標識率は測定できるが、部位ごとの標識を測定することは非常に難しい。さらに、これ

らの（1）、（2）の双方において、研究対象（目的）の代謝物（有機化合物）を単離・精製すること自体が困難な場合が多く、これらの理由から、SIP 法の活用・利用はなかなか広がっていないのが現状である。

このような背景を受けて、近年では、従来の方法（HPLC, NMR, EA-IRMS, GC-IRMS）を用いるのではなく、一般的なガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS：Gas Chromatograph-Mass Spectrometer）で得られたデータに対して、質量キャリブレーション用のソフトウェア「MassWorks（Cerno Bioscience 社製、国内では Gerstel 社が販売）」を用いて、有機化合物の部位ごとの同位体含有量を正確に（同位体の濃度で、1~2%の誤差で）解析する「分子内 SIP 法」の研究が積極的に行われるようになった。この手法の利点は、煩雑な単離・精製プロセスを経ずに、研究対象の試料中に含まれている数 ng の有機化合物について、その「分子内の同位体標識位置」を正確に特定し、またその濃度を、2~99%の同位体存在量の範囲であれば、1~2%の誤差で定量することができる。すなわち MassWorks を使うことで、高濃度標識が必要な NMR 法と極低濃度標識しか分析できない IRMS 法のちょうど中間（低~高濃度標識の）領域で、分子内 SIP 法が利用できるようになり、様々な研究への応用が期待されている。そして実際に、始原的系統群に属する水素酸化好熱細菌における可逆的な TCA 回路の発見などに貢献している（Nunoura et al., 2018）。本稿では、この MassWorks を使った解析法の原理を紹介する。

2. SIP 法に使用されてきた分析装置の例

2.1. ガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）

一般的なガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）では、試料（様々な有機化合物の混合物）はまず、ガスクロマトグラフ（GC）で、1つ1つの有機化合物に分離

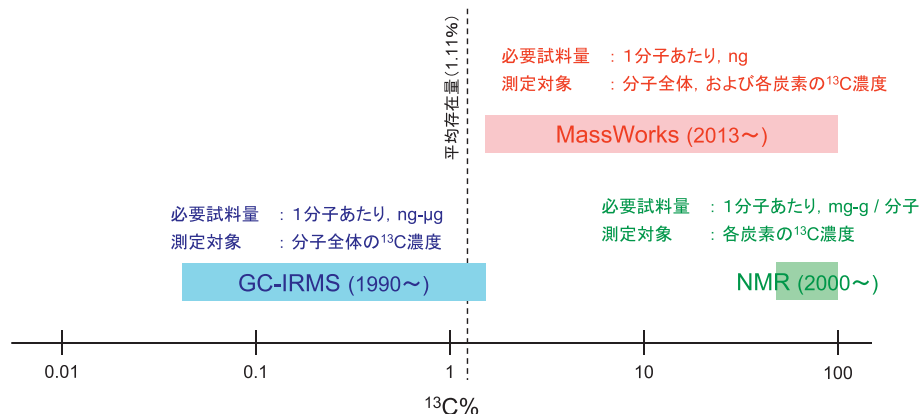


図2：SIP 法に用いる3つの手法と、それらに対応している分析対象の有機化合物の ^{13}C の濃度

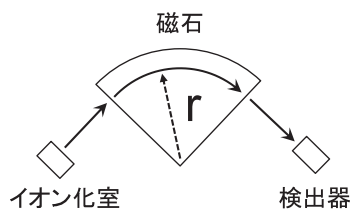


図3：質量分析計の基本概念図

される。そして、その後、質量分析計 (MS) のイオン化室に導入されてイオン化され、磁場 (電極) によって異なる質量のイオンが分離される (図3)。質量分離の基本式 (式1) は、

$$m/z = B^2 r^2 e / (2V) \quad (\text{式1})$$

質量 (m)、電荷数 (z)、磁場強度 (B)、軌道の半径 (r)、電子の電荷 (e)、加速電圧 (V) を用いて示され、 m/z 値の異なるイオンの軌道の半径 (r) は、磁場強度 (B) または加速電圧 (V) の関数になる。 m/z 値は、電荷数 (z) が1の場合には、そのまま質量 (m) ということになる。すなわち、磁場強度 (B) または加速電圧 (V) をコントロールし、軌道の半径 (r) を連続的に変化させることで、1つの検出器で一定の範囲の m/z 値 (例えば50~500) のイオンを検出する (スキャン) ことができる (詳細は、質量分析に関する様々な書籍があるので参照して頂きたい、例えば、質量分析学—基礎編—など)。実際の MS では、様々なタイプの磁場 (電極) が用いられており、例えば一般的な GC-MS で使用されている四重極型の質量分析計では、4本の電極を用いることで特定の質量 (m/z 値) のイオンが、連続的に検出器へ送られる。質量分析

において、有機化合物は、相対分子質量ではなく、モノアイソトピック質量に基づいて分離されるので、同じ化学組成式で示される有機化合物であっても、同位体組成の異なる分子イオン (例えば、 $^{12}\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ 、 $^{12}\text{C}_{12}[^{13}\text{C}]\text{H}_{22}\text{NO}_4$ と $^{12}\text{C}_{11}[^{13}\text{C}_2]\text{H}_{22}\text{NO}_4$) は分離され、それぞれの分子イオンピークがマススペクトル上に観測される (図4)。また、イオン化された有機化合物は化学的に非常に不安定であるため、壊れた際に化合物構造に特異的なフラグメントイオンを生じる。その際に生じたフラグメントイオンも、分子イオンと同様に、同位体組成の異なるイオンピークが観測される (図4)。

このように、原理的には、同位体組成の異なる「分子イオン」と「フラグメントイオン」のピーク強度を比較することで、有機化合物の、どの元素に、どれくらい同位体標識が入っているのかを推定することが可能である。一般的に、測定に必要な試料量は化合物あたり ng オーダーである。しかし GC-MS を用いた SIP 法は、GC の条件 (GC カラムのブリードや、汚れなど) により、観測されるフラグメントイオンの強度が変化しやすいことに加えて、異なる元素の同位体 (^2H , ^{13}C , ^{15}N) を区別することが困難である (例えば、 $^{12}\text{C}_{13}\text{H}_{21}[^2\text{H}]\text{NO}_4$ と $^{12}\text{C}_{12}[^{13}\text{C}]\text{H}_{22}\text{NO}_4$ は、少数点1桁の質量分解能では区別できない) ために、低濃度 (20~30%以下) の同位体標識の検出は難しい。

2.2. 核磁気共鳴 (NMR) 装置

核磁気共鳴 (NMR : nuclear magnetic resonance) 装置では、有機化合物中の1つ1つ部位の炭素、あるいは窒

グルタミン酸誘導体化合物の質量スペクトル

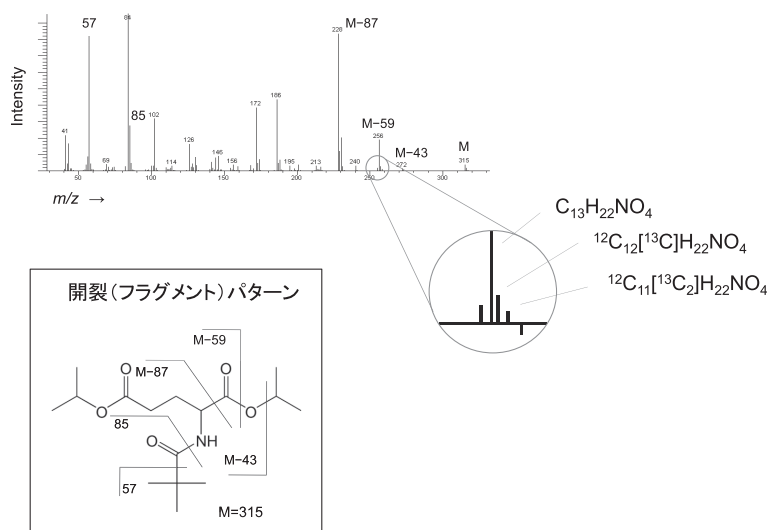
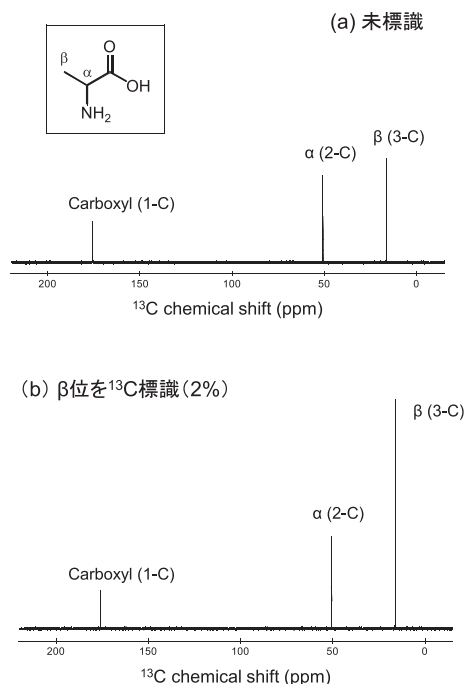


図4：グルタミン酸誘導体化合物を GC-MS で分析した際の質量スペクトル

図5：アラニンの ^{13}C -NMR スペクトル

素の原子核の歳差運動の回転周期に共鳴するラジオ波を外部から加えることによって共鳴させ、その時に生じるエネルギーの吸収量を「NMR スペクトル」として測定する。この時、与えられた周波数に対して検出されたピークが出現する領域を化学シフト（単位は ppm）と呼ぶ。共鳴周波数は、対象とする原子周辺の物理・化学的な構造、例えば、有機化合物の構造がどのような形か、みている元素が化合物の中でどこに位置するか、周囲にどのような官能基があるか、などで決定されるため、有機化合物の1つ1つの部位の炭素あるいは窒素は、異なる化学シフトを示し、また各々のスペクトルの強度から ^{13}C や ^{15}N の含有量を推定することができる（詳細は、NMR 装置に関する様々な書籍があるので参照して頂きたい、例えば、NMR 入門：必須ツール 基礎の基礎など）。例えば、アラニンの ^{13}C -NMR スペクトルを測定すると、カルボキシル炭素、 α 炭素、 β 炭素は、それぞれ175~180 ppm, 50~55 ppm, 15~20 ppmの化学シフトで検出される（図5a）。また、このアラニンの β 炭素を2%の ^{13}C で標識化すると、 β 炭素のシグナル強度が ^{13}C の含有量に比例して高くなる（図5b）。

このように NMR 装置を用いることで、同位体標識が有機化合物のどの元素にどれくらい入っているのかを推定することが可能である。ただし、SIP 法として利用するには、 ^{13}C -NMR および ^{15}N -NMR は感度が十分でないため、特定の部位に、高濃度（50%以上）の同位体標識が導入された有機化合物が mg オーダーで必要になる。

例えば、一般的な共鳴周波数（磁場強度）が 400 MHz の NMR 装置では、1 mg のアラニンの ^{13}C -NMR スペクトルを測定するために約 1 時間必要である。NMR 装置の感度は、共鳴周波数（磁場強度）の $3/2$ 乗に比例し、また測定時間の $1/2$ 乗に比例するため、磁場強度 900 MHz の NMR 装置を約 1 ヶ月間用いることができれば、10 μg のアラニンでも同位体標識の測定が可能であるが、膨大な時間と費用がかかる上、それでも GC-MS に比べると検出感度が 3~4 桁も低い。

2.3. ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS)

ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS) は、試料（混合物）をガスクロマトグラフ (GC) で分離した後、GC に直結している反応炉で有機化合物を H_2 , CO_2 , N_2 等のガスに変換し、同位体比質量分析計 (IRMS) でガス中の同位体組成を測定する（詳細は、本誌の第一章「安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法—1: ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計」を参照して頂きたい）。上記 2.1.1 で示したように、一般的な GC-MS では、磁場強度 (B) または加速電圧 (V) を連続的に変化させ、1 の検出器を用いて、広い範囲の m/z をスクリーニング的に検出する。一方で GC-IRMS では、磁場強度 (B) または加速電圧 (V) を一定に設定し、複数の検出器を用いて、イオン化されたガスに含まれる主要な同位体分子種（例えば二酸化炭素では、 m/z 44 = $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, m/z 45 = $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, m/z 46 = $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ）を定量的に検出する。さらに、同位体分子種の存在量に合わせて、検出されるシグナルを電氣的に増幅させており（例えば、 m/z 45 で約 100 倍、 m/z 46 で約 10,000 倍）、存在量の少ない重い同位体を持つ分子種の測定感度が高い。そして、この複数の m/z の同時検出により、GC-IRMS は、安定同位体組成の自然界での僅かな変動でも正確に測定することができる。

このように、GC-IRMS を用いることで「有機化合物全体」として同位体標識がどれくらい入っているのかを測定することができる。測定に必要な試料量は、一般的に、化合物あたり ng から μg オーダーである。ただし、GC-IRMS を使った SIP 法は、GC-IRMS が安定同位体組成の自然界での変動の測定用に作られていることもあり、極めて低い濃度（ ^{13}C で約 2% 以下）に標識化された試料を用いる必要がある。また、同位体標識された位置が有機化合物のどの元素に入っているかを推定するも困難である。

アラニン誘導体化物の質量スペクトル

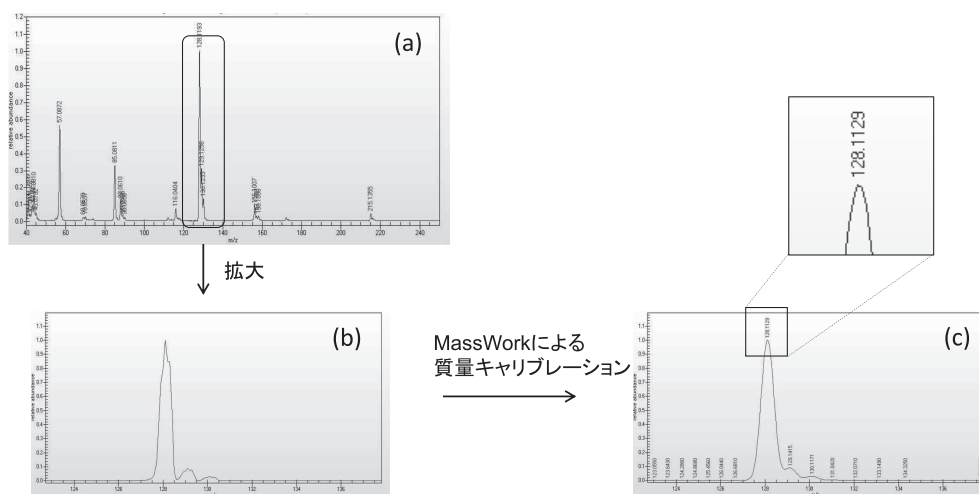


図6：アラニン誘導体化物の質量スペクトル：(a) 全体，(b) m/z 128 付近，(c) MassWork による質量キャリブレーション後の m/z 128 付近

3. MassWorks を用いた SIP 法

3.1. MassWorks の原理

MassWorks (Cerno Bioscience 社 製, 国内では Gerstel 社が販売) は, 一般的な GC-MS で得られたデータ (質量スペクトル) を, (1) 独自の補正関数でガウス分布に変換し, また (2) 安定同位体の天然存在度の補正を行うことで, 精密質量を得ることができる「質量キャリブレーション」用のソフトウェアである (図6)。一般的には, 未知の有機化合物の精密質量の測定に用いられているため, 質量スペクトル, 安定同位体の天然存在度との関係性は, 以下のように示される:

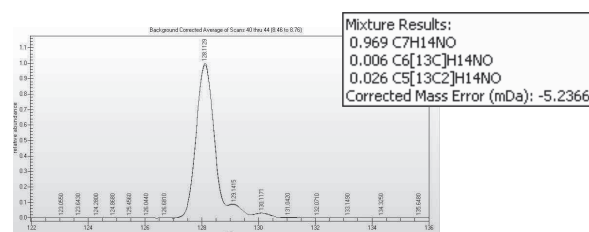
$$[\text{質量スペクトル}] + [\text{安定同位体の天然存在度}] \\ \Rightarrow [\text{未知化合物の精密質量}]$$

一方で SIP 法では, 知りたい情報が「代謝産物 (有機化合物) の, どの部位に, どの程度の同位体標識が含まれているか」であるため, 研究対象の有機化合物の化学構造は既知であることが多い。そこで,

$$[\text{質量スペクトル}] - [\text{化合物の既知の精密質量}] \\ \Rightarrow [\text{同位体標識の存在量}]$$

に示すように, MassWorks の解析において, ガウス分布に変換した質量スペクトルに, 既知の精密質量の情報を与えることで, 分子イオンおよびフラグメントイオン中の同位体標識の存在量を求めることができる。例えば, アミノ酸の1種であるアラニン (誘導体化物) のイ

(a) 非標識



(b) ^{13}C 標識

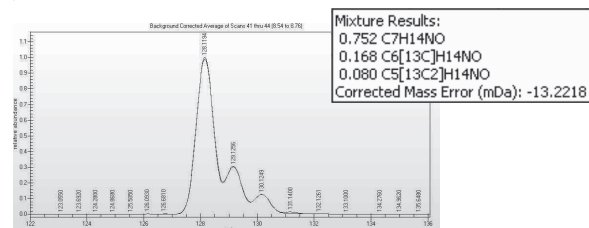
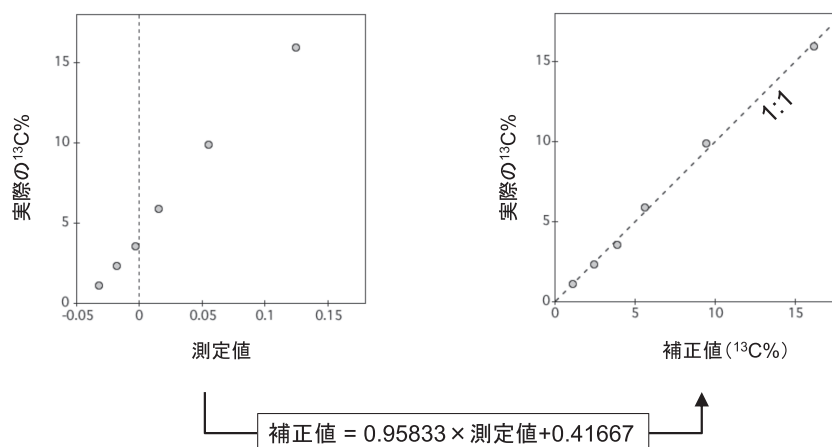


図7：アラニン誘導体化物の質量スペクトル (m/z 128 付近を拡大) と, MassWorks で求めた同位体分子種の割合

オンフラグメント ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}$) について, 質量スペクトルを MassWorks で解析すると, 含まれている主な同位体分子種: $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}$: $\text{C}_6[^{13}\text{C}]\text{H}_{14}\text{NO}$: $\text{C}_5[^{13}\text{C}_2]\text{H}_{14}\text{NO}$ の存在割合が, それぞれ 0.969 : 0.006 : 0.026 と計算される (図7a)。これに対し, 同じ化合物の1つの炭素を数%の ^{13}C で標識したものは, それぞれ, 0.752 : 0.168 : 0.080 と計算され, ^{13}C の標識率に対応して $\text{C}_6[^{13}\text{C}]\text{H}_{14}\text{NO}$ の存在量が増加する (図7b)。

このように, MassWorks を用いることで, 上記 (2.1 章) の GC-MS の欠点 (観測されるフラグメントイオンの強度が変化しやすいことや, 異なる元素の同位体を区別することが困難なこと, など) を克服することができ,

図 8: $^{13}\text{C}\%$ の補正の例

理論的には、同位体組成の異なる分子及びフラグメントイオンのピーク強度を比較することで、有機化合物の部位ごとの同位体標識率を 2~99% の範囲であれば、正確に特定することができる。また、GC-MS の分析感度で測定が行えるため、研究対象の試料中に数 ng オーダーで含まれている有機化合物について、同位体標識率を測定することができる。

3.2. キャリブレーション

上述のように、MassWorks では、例えば、アラニン（誘導体化物）のフラグメントイオン ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}$) の 3 つの同位体分子種: $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}$: $\text{C}_6[^{13}\text{C}]\text{H}_{14}\text{NO}$: $\text{C}_6[^{13}\text{C}_2]\text{H}_{14}\text{NO}$ の存在割合は、それぞれ 0.752 : 0.168 : 0.080 と計算され、合計すると 1.0 になる。しかし、標識される元素の数が多い場合や、質量スペクトル上で同じ（あるいは近い） m/z 値を持つフラグメントが重なるなどの原因によって、得られた同位体分子種の存在割合の合計値が 1.0 にならなかったり、マイナス値（例えば、-0.03 など）になったりすることがある。従って、MassWorks を用いて解析をおこなうためには、あらかじめ標品（非標識体）を用いて、得られた値（測定値）が適切なスケールになるようにキャリブレーションする必要がある。

実際に、アラニンの誘導体化物に関して、非標識のものと、 β 位に ^{13}C を 16% 導入した標識のものと分析結果を MassWorks で解析すると、分子種 $\text{C}_6[^{13}\text{C}]\text{H}_{14}\text{NO}$ の存在割合は、非標識のもので -0.032、16% 標識のもので 0.125 と計算される（図 7a）。このような場合には、-0.032 から 1.0 の計算値が、1.1%（天然存在度）から 100% の ^{13}C 濃度に対応するように補正を行うことで、 $\text{C}_6[^{13}\text{C}]\text{H}_{14}\text{NO}$ の正確な存在量を求めることができる（図 8）。

4. おわりに

NMR 装置を用いた SIP 法は、同位体標識が有機化合物の「どの部位にどれくらい入っているのか」を推定することができる強力な手法であるが、試料として、高濃度 (50% 以上) で同位体標識された有機化合物が mg オーダーで必要である。GC-IRMS を用いた SIP 法は、測定に必要な試料量が、化合物あたり ng から μg オーダーである。しかし、同位体標識が有機化合物に「化合物全体としてどれくらい入っているのか」を推定することができるが、1 つ 1 つの元素の標識率にはアクセスできない。また、極めて低い濃度 (^{13}C で約 2% 以下) で同位体標識を使用する必要がある。従って、NMR や GC-IRMS を用いた SIP 法は、残念ながら多くの研究にとって、実用的ではなかった。

一方で、MassWorks を用いることは、高濃度標識が必要な NMR 法と極低濃度標識しか分析できない GC-IRMS 法のちょうど中間（低~高濃度標識の）領域で、SIP 法が利用できることを意味する。また、数 ng オーダーの有機化合物について、その「分子内の標識位」を特定することが可能である。従って、試料量が限られている、試料量は十分にあるが目的の有機化合物の含有量が少ない、高濃度標識が入手できない、などの研究でも、SIP 法の利用が現実的になる。本誌 4 章（マルチオミクス解析による好熱性水素酸化細菌からの可逆的 TCA 回路の発見）に、この手法を用いて明らかにした最新の研究成果を紹介する。

謝辞

本稿の内容は、日本学術振興会科学研究費（基盤研究 A：研究代表者 布浦拓郎）(19H00988) 及び、シリコー

ン工業会（Silicon Industry Association of Japan）からの寄付金で実施した研究成果の一部を取りまとめたものである。

引用文献

Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T.,

Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yanagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H. and Takai, K. (2017) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile, *Science* 359, 559-563.

Hore, P.J. (著)., 岩下孝, 大井高, 楠見武徳 (翻訳) (2017) NMR 入門：必須ツール 基礎の基礎. 化学同人

豊田岐聡 (2016) 質量分析学—基礎編—, 日本質量分析学会