

LC-MS を駆使した高感度、高分解能しかも高速での代謝物分析技術の確立と 浜田市の地域ブランドの創出への応用

古田 賢次郎, 秋廣 高志

目 的

本研究の目的は、1) LC-MS を駆使した高感度、高分解能しかも高速での代謝物分析技術を確立すること、2) 確立した測定技術を学部内へ周知することおよび、3) 地域連携関係にある浜田市の地域ブランドの創出へ応用することである。平成21年度に本学部に導入された二台の LC-MS (Xevo TQ および Synapt G2 HDMS) は、世界トップクラスの分析性能を持つ測定機器であり、特定の物質の定性・定量・構造解析 (ターゲット分析) や網羅的な代謝物解析 (ノンターゲット分析) が行うことができる。さらに、多変量解析ソフト MarkerLynx を利用すれば、興味のある現象に特徴的な代謝物の探索 (マーカー探索) を行うことが可能である。筆者らは、これら二台の LC-MS の基本的な操作方法をすでに習熟し、これまでに学内外の複数の研究室から測定依頼を受けて測定を行っている。しかし、基本的な操作を習熟しただけでは、必要とするデータを取得するには不十分であった。

そこで本研究では、ターゲット分析およびノンターゲット分析に関する知識や経験を蓄積し、最終的に様々な成分の定性、定量および構造解析が行える測定技術の確立を目指した。

方 法

ターゲット分析として、豆腐に含まれる遊離アミノ酸量の定量分析を行った。500 mg の豆腐に 8% トリクロロ酢酸 5 ml を加えて、オートミルを用いて破碎した後、13000 rpm, 4 °C, 10 分間遠心して上清 300 μ l を回収した。上清にジエチルエーテルを加えてよく攪拌したのち、有機層を除去してから遠心エバポレーターで完全に乾固させた。これを水 30 μ l に再溶解し、そのうち 5 μ l を用いて AccQ Tag 試薬 (Waters 社) による誘導体化反応を行った。その後、反応液 1 μ l を Xevo TQ を用いて LC-MS/MS 分析を行った。分析条件は以下に示す条件で行った。

カラム: KINETEX C18 100 x 2.1 mm I.D., 2.6 μ m, 流速: 0.35 ml/min, 溶出溶媒: 移動相 A アセトニトリル (2% ギ酸), 移動相 B 水, キャピラリー電圧: 500 V, コーン電圧: 20-35 V, コリジョンエネルギー: 15-40 V.

また、ノンターゲット分析として、カレイに含まれる

成分の一斉分析を行った。カレイは浜田産のエテガレイ、ミズガレイ、ササガレイおよび、オランダ産のアイガレイを用いた。サンプルは内蔵や皮を取り除いたのち、測定まで -20 °C で保存した。分析には背側の身の部位を用いた。カレイ肉片に 10 mg/ml となるようにメタノールを加え、粉碎機 (オートミル) にて、3000 rpm, 5 分間粉碎した。これを 15000 rpm, 4 °C, 10 分間遠心したのち、上清を回収し、これを 0.4 μ m のフィルターでろ過した後、5 μ l を Synapt G2 HDMS を用いて LC-MS/MS 分析を行った。分析条件は、以下に示す条件で行った。

カラム: Acquity UPLC BEH 100 x 2.1 mm I.D., 1.7 μ m, 流速: 0.3 ml/min, 溶出溶媒: 移動相 A アセトニトリル (0.1% ギ酸), 移動相 B 水 (0.1% ギ酸), 0% B (0 min) \rightarrow 100% B (20 min), スキャン範囲: m/z 100-1500, キャピラリー電圧: 4000 V, コーン電圧: 50 V, Lock spray: Leucine Enkephaline (和光純薬)。

結 果

Xevo TQ によるアミノ酸定量は、分析に要する時間が 17 分と短時間であり、アミノ酸分析機による定量に比べて大幅に短縮された (図1)。また、それぞれのアミノ酸を高感度かつ高選択的に検出することが可能であり、各アミノ酸量を正確に定量することができた。

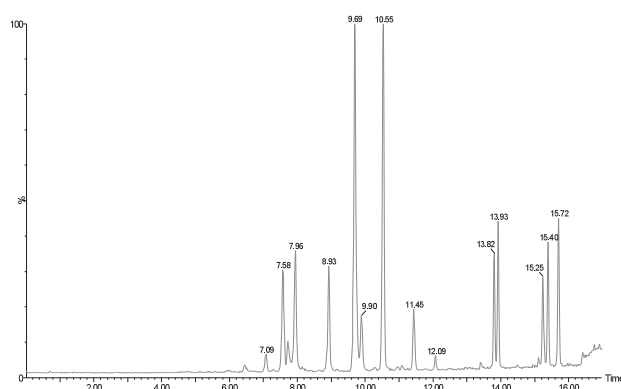


図1 Xevo TQ による豆腐中のアミノ酸分析

また、Synapt G2 HDMS によるカレイに含まれる成分の一斉分析では、代謝物を網羅的に検出することに成功した (図2)。

考 察

今回確立したアミノ酸分析法では、AccQTag 試薬および、超高速液体クロマトグラフィーを用いることで、サンプル調整および分析時間を大幅に短縮することができた。また、定量解析用ソフトウェアである TargetLynx により、各アミノ酸の検出・定量も簡便かつ迅速に行うことができたことから、今後は多検体の分析も可能となった。1サンプルあたりのコストも約 200 円と安価なため、今後はスクリーニングといった大規模な研究や商品開発にも応用可能であると考えられる。

一方、ノンターゲット分析法では、カレイ中に含まれる多くの成分を網羅的に検出し、MarkerLynx を用いることで、サンプル間の特徴や類似度に基づいてグループに分類することができた。また、サンプルに含まれる成分の中から、特定のサンプルにのみ含まれる成分（マーカー）を簡便かつ迅速に見つけることも可能であった。本手法はカレイのみならず、他の食品や微生物、植物の抽出物などの分析にも応用できることも確認できた。しかし、今回はマーカーの構造決定までには至らなかった。今後は、前駆イオンと娘イオンを同時に取得する手法である MSE を用いて、マーカーの構造を決定できるスキルの向上が不可欠であると考えられる。

本研究における共同研究を通して、学部内に測定技術が周知され、LC-MS による分析も活発に行われるようになっていく。今回確立した測定技術は、今後の浜田市産ブランド食品の開発に大きく寄与するものと考えられ、これは我が学部が推進する地域連携に大きく貢献できるものと考えられる。

謝 辞

分析試料であるカレイは、はまだ産業振興機構の竹中博文氏から提供していただいた。この場を借りて御礼申し上げます。

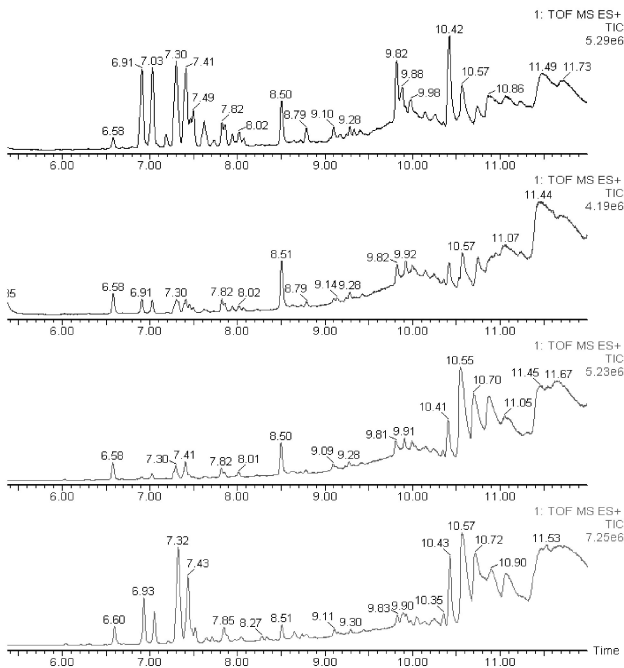


図 2 Synapt G2 HDMS によるカレイに含まれる成分のクロマトグラフ (上からアイガレイ, クサガレイ, エテガレイ, ミズガレイ)

得られた分析結果を MarkerLynx を用いて、主成分分析 (PCA 解析) を行い、サンプル間の特徴や類似度を調べたところ、それぞれのカレイごとのグループに分類することができた (図 3)。

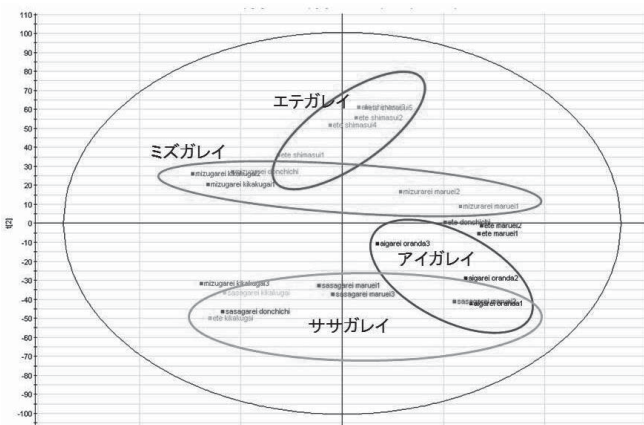


図 3 主成分分析によるカレイの分類