

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760637

研究課題名 (和文) オンライン超臨界流体抽出・分離・質量分析システムによる酸化脂質メタボロミクス

研究課題名 (英文) Oxidized lipid metabomics by online-supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry

研究代表者

馬場 健史 (BAMBA TAKESHI)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10432444

研究成果の概要 (和文)：

当該研究では、抽出媒体としてマイルドかつ迅速に高効率で抽出が可能な超臨界流体を用い、さらにそのままオンラインで分析可能な酸化脂質のプロファイリングシステム、オンライン超臨界流体抽出 (SFE) -超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析 (SFC/MS) システムを開発した。併せて、生体内に存在する脂質の標準品をインビトロにおいて酸化処理しその生成物の解析を行うことにより、酸化脂質の代謝解析に有用なライブラリーを構築した。さらに、当該システムを用いて各種疾患のモデル実験動物や臨床サンプルのメタボロミクスに取り組み、特異的に増加する酸化リン脂質の存在を確認した。

研究成果の概要 (英文)：

A supercritical fluid (SCF) possesses features such as low viscosity and high diffusivity. Therefore, it has suitable properties for use as a mobile phase in chromatography and a media in extraction. Supercritical fluid chromatography (SFC) would be possible to perform rapid and high-resolution separation of complicate metabolites which is difficult to separate by GC and HPLC. Supercritical fluid extraction (SFE) is mild and high-efficient, and it is suitable for unstable metabolites by solvent extraction. Therefore, to apply them to biometrics analysis, it would be necessary to establish analytical system using unique character of SCF. In this study, we have developed the technology toward application of online SFE-SFC/MS system to oxidized lipid profiling and applied the analysis system to lipidomics in various diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：超臨界流体, 超臨界流体クロマトグラフィー, 超臨界流体抽出, 質量分析, メタボロミクス, リピドミクス, 脂質, 酸化脂質

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究で脂質がシグナル伝達などの重要な役割を果たすことが明らかになり代謝解析の重要なターゲットとなったことから、網羅的な解析を目的とした脂質メタボロミクスが積極的に進められている [Watso AD, (2006) *J. Lipid Res.*]. また、酸化ストレスが多く生活習慣病、加齢に伴って増える疾患の発症と深く関わることは広く認められており、その詳細なメカニズムを目的として酸化脂質の解析が势力的に進められている [酸化ストレスマーカー, 二木ら編, 学会出版センター]. 一方で、脂質は幅広い極性、類似した構造を有するため、その解析には高度な分離分析技術を必要とする。また、脂質の中には抽出・精製段階で容易に酸化されるなど不安定な化合物が多く存在し、従来の試料調製法や分析方法では、得られたデータが生体内の状態を正確に反映しているとはいえないのが現実である。そこで、当該研究では、高解像度・高感度で、かつ不安定な代謝物の解析が可能な分離・分析技術の構築とそのメタボロミクス研究への応用を目的として、オンライン SFE-SFC/MS システム構築のための技術開発に取り組むとともに、構築したシステムを効果的に用いた各種生物の酸化脂質の解析を試みる。

超臨界流体は臨界温度、臨界圧力を越えた状態の物質であり、低粘性、高拡散性というクロマトグラフィーの移動相として好ましい性質を有している。SFC は高速かつ高分離の分析が可能であり、極性有機溶媒 (モディファイヤー) の添加や温度、背圧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 [Smith R. M, et al., (1999) *J. Chromatogr. A*]. 超臨界流体を移動相に用いた SFC では、メタボロミクスに一般的に用いられているガスクロマトグラフィーや (GC) や液体クロマトグラフィー (LC)、キャピラリー電気泳動 (CE) などでは分離が困難であった代謝物の解析が可能であり、これまで解析の対象とならなかった代謝物に関する情報を得ることができる。申請者は、これまでに SFC を用いた疎水性代謝物解析技術の開発およびその応用研究に取り組んできており、HPLC では分離困難な異性体や分子量 7000 を越えるポリマーの分離に成功している [Bamba et al., (2001) *J. Chromatogr. A*, Bamba et al., (2001) *Lipids*, Bamba et al., (2008) *J. Chromatogr. A*]. また、高感度で高選択性の質量分析計 (MS) を検出器として SFC に接続するための技術を開発し、リン脂質、糖脂質、中性脂質などの 14 種類の脂質混合物のハイスループット・分析にも成功した [Bamba et al., (2008) *J. Biosci. Bioeng.*]. 当該手法はスクリーニングなど幅広い代謝物を対象とした解析や多検体の解析に有用であるだけでなく、個々の成分の詳細なプロファイリングも可能であるため、メタボロミクスの新たな分析手法として期待されている。

## 2. 研究の目的

当該研究では、これまでに蓄積した SFC/MS による脂溶性代謝物のプロファイリング技術をもとに、さらなる超臨界流体の効果的な利用を目的として SFE との技術の融合を図ることにより、不安定な酸化脂質の解析を可能にする新規メタボロミクスシステムの創製に取り組む。さらに、開発した技術を用いて各種生物におけるメタボロミクス研究に取り組み、従来法では得られなかった新知見の取得を目指す。近年の研究により一部の脂質がシグナル伝達に重要な役割を果たすことが明らかにされているが、そのシグナル伝達は多数の代謝物が関わり非常に複雑な経路であると考えられる。オンライン SFE-SFC/MS を用いてエイコサノイドおよびその前駆体複合脂質、ステロイドホルモン類などの脂溶性生理活性物質などを網羅的に分析し関連生体分子群の動態を統合的に解析することにより、脂質シグナル伝達系の全容解明が可能になる。また、易酸化物質など溶媒抽出法では解析が困難な代謝物に関してもオンライン SFE-SFC/MS を用いることによりインタクトの代謝変動を捉えることが可能になり、従来技術では困難であった酸化ストレスのバイオマーカーや脂質の酸化メカニズムなどにおける新知見の取得が可能になる。当該研究は、医療、創薬、食品などの幅広い分野の実用研究開発に大きく寄与することからも、重要な研究として位置づけられるべきものである。

## 3. 研究の方法

### (1) オンライン SFE-SFC/MS システムの開発と酸化脂質ライブラリーの構築

まず、溶媒抽出等のサンプル調製を必要とせず代謝物をインタクトの状態でも抽出でき、また、高精度で高解像度の分離が可能なオンライン SFE-SFC/MS システムの構築に取り組む。まず、SFE のオンライン化のためのバルブシステム、カラム、配管などの各部位のアセンブリについて検討する。また、低背圧、高分離でキャピラリーカラムへのダウンサイジングや各種修飾が可能でモノリス型カラムの適用技術の開発にも取り組む。次に、各種生物試料を用いて抽出効率、再現性を指標に SFE-SFC/MS 分析における抽出、分離、検出等の条件を検討し、実用的な脂質メタボロミクスのシステムを構築する。また、各種モデル易酸化脂質標準品を酸化剤で処理することにより酸化脂質を調製し、それらの同定を試みる。生体サンプル内の酸化脂質の同定に有用な酸化脂質のライブラリーを作成する。

### (2) SFC/MS を用いた脂質メタボロミクス

上記で構築した SFE-SFC/MS システムを用いて各種生物における脂質メタボロミクスを実施する。オンライン SFE-SFC/MS システムを用いて酸化脂質や抗酸化物、酸化体/還元体比などの

酸化ストレスマーカーを精密に測定することにより、酸化ストレス応答の分子機構の解析を試みる。具体的には、血漿を試料として酸化脂質の網羅的な解析を行い、各種病態における酸化ストレスマーカーの検索を行うとともに、脂質の生体内酸化メカニズムの解析を試みる。また、シグナル伝達経路に関与すると考えられているエイコサノイドおよびその前駆体複合脂質、ステロイドホルモン類などの脂溶性生理活性物質を網羅的に分析し、関連生体分子群の動態を統合的に解析することにより、脂質シグナル伝達系の全容解明を試みる。具体的には、炎症をキーワードに各種疾患における脂質の網羅的なプロファイリングを試み、脂質メディエーターの産生機構や疾患との関わりについて詳細に解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1)オンライン SFC-SFC/MS システムの開発と酸化脂質ライブラリーの構築

まず、生体サンプル内の酸化脂質の同定に利用可能な酸化脂質のライブラリーの構築にも取り組んだ。モデルリン脂質として

1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycerophosphatidylcholine (PLPC)を用い、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩(AAPH)、過酸化水素、リポキシゲナーゼを用いて酸化リン脂質をインビトロ合成し、生成した酸化リン脂質をSFC/MSにより分析を試みた。PLPCの酸化物としてジヒドロキシ、エポキシ・ヒドロキシ、オキシ・エポキシといった既存のLC/MSでは分離が困難な各生成物の解析に成功し、それぞれの酸化脂質の分析条件を構築できた(論文投稿準備中)。さらに、モデルリン脂質として1,2-ジアシルグリセロール-3-ホスホコリン(PC)として2位の脂肪酸にリノール酸を含むPC(16:0/18:2 PC, PLPC)に加えて、アラキドン酸を含むPC(16:0/20:4 PC, PAPC)、ドコサヘキサエン酸を含むPC(16:0/22:6 PC, PDPC)について、酸化リン脂質を同様にインビトロ合成し、生成した酸化リン脂質をSFC/MSにより分析した。各種の酸化物としてジヒドロキシ、エポキシ・ヒドロキシ、オキシ・エポキシといった既存のLC/MSでは分離が困難な各生成物の分析に成功し、各種酸化PCの解析が可能なSFC/MS分析系を構築した(論文投稿準備中)。

次に、SFEのオンライン化のための抽出容器、プレカラム、分離カラム、配管等種々のシステム構成要素の精査および抽出・分析条件について検討した。試料として、上記インビトロ合成した酸化脂質を用いた。さらに、揮発性酸化脂質分析への適用技術の開発にも取り組み、カロテノイド生合成系遺伝子およびカロテノイド酸化開裂遺伝子を導入した大腸菌を用い、菌体中に含まれ

るカロテノイド酸化開裂の分析を試みた。各種条件の検討を行った結果、 $\beta$ -カロテンとともにその開裂産物である $\beta$ -イオンを感度よく検出することができ、通常、液体クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーで別々に分析が必要な両代謝物を同時に精度良く分析できた(論文投稿準備中)。

##### (2)SFC/MSを用いた脂質メタボロミクス

次に、構築したSFC/MS分析系を用いて、各種疾患のモデル実験動物サンプルや臨床サンプルの酸化脂質について解析を行った。高脂肪・高ショ糖食マウス、APCmin/+マウス、糖尿病ラット、マウスなど各種疾患モデル実験動物の比較解析において、特異的に増加する酸化リン脂質の存在が認められた(論文投稿、特許申請準備中)。これらの酸化リン脂質は酸化ストレスに起因する各種疾患のバイオマーカーとしての可能性を有しており、現在、さらに他の疾患サンプルにおける挙動を調べるとともに、生理学的な実験による検証を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

①Yonamine I., Bamba, T., Nirala, N., Jesmin, N., Kosakowska-Cholody, T., Nagashima, K., Fukusaki, E., Acharya, J.K., Acharya, U., Sphingosine Kinases and their metabolites modulate endolysosomal trafficking in photoreceptors. *J. Cell Biol.*, 査読有, **192**(4), 557-567 (2011).

②Yuan, C., Rao, R.P., Jesmin, N., Bamba, T., Nagashima, K., Pascual, A., Preat, T., Fukusaki, E., Acharya, U., Acharya, J.K., CDase is a pan-ceramidase in Drosophila. *Mol. Biol. Cell.*, 査読有, **22**(1), 33-43 (2010).

③松原惇起, 福崎英一郎, 馬場健史, メタボロミクスにおける超臨界流体クロマトグラフィーの可能性. *生物工学会誌*, 査読無, **88**(10), 527-531 (2010).

④馬場健史, メタボロミクスにおける超臨界流体クロマトグラフィーの可能性. *生産と技術*, 査読無, **62**(2), 65-68 (2010).

⑤Dasgupta, U., Bamba, T., Chiantia, S., Karim, P., Tayoun, A. A., Yonamine, I., Rawat, S., Rao, R. P., Nagashima, K., Fukusaki, E., Puri, V., Dolph, P., Schwille, P., Acharya, J., Acharya, U., Ceramide Kinase Regulates PLC and PIP2 in Phototransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, **106**(47), 20063-20068 (2009).

⑥Matsubara, A., Fukusaki, E., Bamba, T., Metabolite analysis by supercritical fluid chromatography. *Bioanalysis*, 査読有, **2**, 27-34 (2010).

⑦Bamba, T., Fukusaki, E., Separation of hydrophobic metabolites using monolithic silica

column in high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 査読有, **32**, 2699-2706 (2009).

⑧ Matsubara, Q., Bamba, T., Ishida, H., Fukusaki, E., Hirata, K., Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 査読有, **32**, 1459-1464 (2009).

[学会発表] (計 30 件)

① Takeshi Bamba, Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, Development of oxidized phosphatidylcholines profiling method by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2011.3.4-5, 東京大学

② 馬場健史, 脂質メタボロミクスにおける超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析 (SFC/MS) の可能性, 第11回健康工学研究部門講演会, 2011.2.18, 産業技術総合研究所関西センター (招待講演)

③ 馬場健史, 脂質メタボロミクスに資する超臨界流体利用技術の開発, 第1回学際的脂質創生研究部会講演会, 2011.1.28, 京都大学 (招待講演)

④ Takeshi Bamba, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, Development of new lipid metabolomics system using supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), 2010.12.18, Hawaii Convention Center

⑤ 馬場健史, フードメタボロミクスにおける超臨界流体テクノロジーの可能性, 第6回バイオ計測プロジェクト/第4回バイオ計測・試薬研究会, 2010.11.19, 神戸商工会議所会館 (招待講演)

⑥ 馬場健史, メタボロミクスにおける超臨界流体クロマトグラフィーの可能性, 近畿化学協会合成部会平成22年度第2回合成フォーラム, 2010.11.5, 大阪大学 (招待講演)

⑦ 馬場健史, 超臨界流体利用技術のフードメタボロミクスへの応用, 第62回日本生物工学会大会シンポジウム「食の機能・安全を科学するーおいしさから生理活性, 安全性の評価まで」, 2010.10.28, フェニックスリゾート・シーガイア (招待講演)

⑧ 松原惇起, 和田雄介, 表正克, 栗山尚浩, 福崎英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィーにおける分離特性の解析-カラム修飾が分子認識能に与える影響について, 第62回日本生物工学会大会, 2010.10.28, フェニックスリゾート・シーガイア

⑨ 和田雄介, 松原惇起, 岩崎雄吾, 森本聡, 菅剋太, 大倉哲也, 福崎英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィーを用いたベータクリプト

キサンチンエステル分析技術の開発, 第62回日本生物工学会大会, 2010.10.28, フェニックスリゾート・シーガイア

⑩ 馬場健史, メタボロミクスの技術開発と応用, 第62回日本生物工学会大会 生物工学奨励賞 (斎藤賞) 受賞講演, 2010.10.27, フェニックスリゾート・シーガイア (招待講演)

⑪ Taeshi Bamba, Development of metabolomics technology for lipid profiling using supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, 2010 KSB Fall Meeting & International Symposium, 2010.10.8, Songdo Convention center, Incheon (招待講演)

⑫ Atsuki Matsubara, Yusuke Wada, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, Metabolite profiling of carotenoids and their derivatives by supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, SFC2010, 2010.9.15-16, Radisson Blu Royal Viking Hotel, Stockholm

⑬ Takeshi Bamba, Jae Won Lee, Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Takuji Nakamura, Eiichiro Fukusaki, Metabolic profiling of soybean lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, SFC2010, 2010.9.15-16, Radisson Blu Royal Viking Hotel, Stockholm

⑭ 馬場健史, 松原惇起, 和田雄介, 福崎英一郎, 超臨界流体利用技術のカロテノイドプロファイリングへの応用, 第5回メタボロームシンポジウム, 2010.9.10, グランドエル・サン

⑮ 馬場健史, メタボローム解析技術をベースとしたマルチマーカープロファイリングの高解像度形質解析への応用, 第123回質量分析関西談話会, 2010.7.31, 島津製作所関西支社マルチホール (招待講演)

⑯ 馬場健史, メタボリックフィンガープリンティングの高解像度形質解析への応用, 第37回BMSコンファレンス, 2010.7.8, 沖縄残波岬ロイヤルホテル (招待講演)

⑰ 松原惇起, 和田雄介, 岩崎雄吾, 森本聡, 大倉哲也, 菅剋太, 福崎英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィー-タンデム質量分析を用いたカロテノイドエステル類の代謝プロファイリング, 第58回質量分析総合討論会, 2010.6.17, つくば国際会議場

⑱ Takeshi Bamba, Jae Won Lee, Takato Uchikata, Atsuki Matsubara, Takuji Nakamura, Eiichiro Fukusaki, Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2010.5.27, Salt Palace Convention Center

⑲ Atsuki Matsubara, Yusuke Wada, Hiroki Ishida, Kazuo Harada, Kazumasa Hirata, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, Profiling system for carotenoids and their oxidized products using

supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry, 58<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2010.5.25, Salt Palace Convention Center

⑩馬場健史, 李載元, 内方崇人, 松原惇起, 中村卓司, 福崎 英一郎, 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析による脂質プロファイリング, 2010.3.29, 2010 年度農芸化学会大会, 東京大学

⑪馬場健史, 超臨界流体利用技術のメタボロミクスへの応用, グローバル COE 学術講演会, 2010.3.16, 神戸大学(招待講演)

⑫馬場健史, メタボロミクスにおける超臨界流体クロマトグラフィーの可能性, 第1回SFCテクノロジーシンポジウム, 2009.11.27, 大阪大学(招待講演)

⑬馬場健史, 超臨界流体テクノロジーのメタボロミクスへの応用, 第4回メタボロームシンポジウム, 2009.11.18, 横浜サイエンスフロンティア高等学校(招待講演)

⑭馬場健史, 超臨界流体テクノロジーのメタボロミクスへの応用, 第61回日本生物工学会大会, 2009.9.25, 名古屋大学(招待講演)

⑮Jae Won Lee, Takato Uchikata, Atuki Matubara, Takuji Nakamura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry (SFC/MS) to lipid profiling of soybean, 第61回日本生物工学会大会, 2009.9.24, 名古屋大学

⑯山本 隆士, 内方 崇人, 福崎 英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析を用いた脂質プロファイリングにおける誘導体化法の検討, 第61回日本生物工学会大会, 2009.9.24, 名古屋大学

⑰馬場健史, 超臨界流体利用技術の代謝プロファイリングへの応用, 第34回日本医用マスペクトル学会年会, 2009.9.11, 近畿大学(招待講演)

⑱Takeshi Bamba, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, Application of supercritical fluid technologies to lipophilic metabolite profiling, SFC2009, 2009.7.22-23, Radisson Plaza Warwick Hotel, PA, USA

⑲Takeshi Bamba, Atsuki Matsubara, Eiichiro Fukusaki, Application of supercritical fluid technologies to profiling of various lipophilic metabolites, 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2009.6.2, Pennsylvania Convention Center Philadelphia, PA, USA

⑳松原惇起, 石田洋基, 平田收正, 福崎英一郎, 馬場健史, 超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析によるカロテノイド類代謝プロファイリング, 第57回質量分析総合討論会, 2009.5.15, 大阪国際交流センター

[図書](計1件)

馬場健史, 福崎英一郎(分担執筆), シーエムシー出版, シングルセル解析の最前線(第3章5項 代謝物情報のデータマイニング)(2010), 286

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/biobr/biobrsfc/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 健史 (BAMBA TAKESHI)  
大阪大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 10432444

### (2) 連携研究者

福崎 英一郎 (FUKUSAKI EIICHIRO)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 40273594

### (3) 研究協力者

吉田 優 (YOSHIDA MASARU)  
神戸大学・医学研究科・准教授

篠原 正和 (SHINOHARA MASAKAZU)  
神戸大学・医学研究科・グローバルCOE  
研究員

Usha Acharya  
University of Massachusetts Medical  
School (USA)・Assistant Professor

松原 惇起 (MATSUBARA ATSUSKI)  
大阪大学・工学研究科・博士後期課程

内方 (UCHIKATA TAKATO)  
大阪大学・工学研究科・博士後期課程

Jae Won Lee  
大阪大学・工学研究科・博士後期課程

山本 隆士 (YAMAMOTO TAKASHI)  
大阪大学・工学研究科・博士前期課程

和田雄介 (WADA YUUSUKE)  
大阪大学・工学研究科・博士前期課程

三田穂高 (SANDA HOTAKA)  
大阪大学・工学研究科・博士前期課程