

2025 年度杉山産業化学研究所研究助成成果報告書

超網羅的な親水性メタボローム分析法の開発

九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野 高橋政友

背景・目的

解糖系，クエン酸回路，アミノ酸代謝，核酸代謝といった生命活動を担う主幹代謝経路の代謝物中間体は，エネルギー産生，細胞の維持，および修復プロセスに関与している．これまでの研究で，主幹代謝経路の障害は，糖尿病，肥満，心臓病，癌など様々な疾患と深く関係していることが知られてきている．これら疾患における病因のメカニズムの解明や，より効果的な治療法を開発するためには，主幹代謝経路の変動を詳細かつ正確に捉えることが必要不可欠であるものの，現状の技術を用いても主幹代謝経路上の代謝物中間体を包括的かつ高感度に測定することは困難とされている．イオンクロマトグラフィー (IC) は，溶離液を移動相，イオン交換体を固定相とした分離カラム内で試料溶液中のイオン種成分を展開溶離させるという原理に基づいたクロマトグラフィーであり，① 高極性のイオン種成分を高分離かつ高感度に分析することが可能，② 保持時間およびピークエリア値の再現性が高いなどといった特徴を有した分析法である．本研究では，IC と質量分析計を接続した IC/MS 分析系を確立することで，超網羅的な親水性メタボローム分析法の開発を目指す．

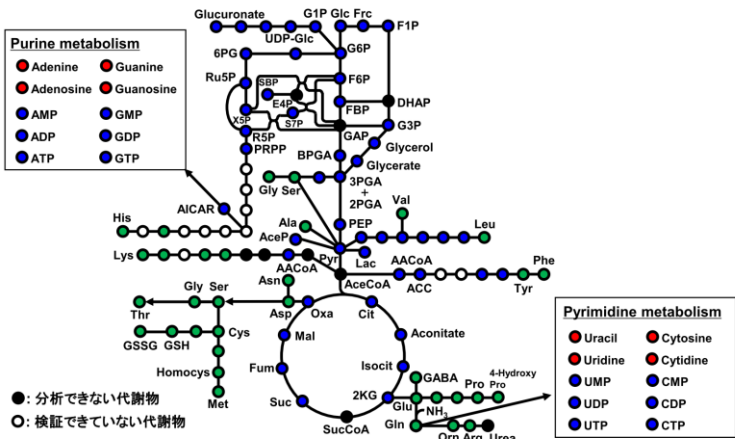
結果と考察

本研究では，IC の分離条件，および MS の分析条件の最適化を行い，超網羅的な親水性メタボローム分析法の構築を目的とした．最適化した分析条件を用いて，600 種類の親水性代謝物標準品（陽イオン性，陰イオン性，両性イオン）を測定した結果，359 種類の代謝物について良好な分離および検出を達成した．特に，ヌクレオチドや糖リン酸など，従来の分析手法（IP/MS や HILIC/MS）では検出が困難であった高極性の陰イオン性代謝物の分離・分析に成功した．これらの化合物はリン酸基を有し，強い金属配位性を示すため，従来法ではステンレス製配管やバルブなどの接液部への金属吸着が生じやすく，ピークテーリングや感度低下，再現性の悪化を引き起こすことが課題となっている．IC/MS では，イオン交換機構に基づく分離特性に加え，接液部に PEEK 樹脂などの非金属材料を使用していることから金属吸着が抑制され，良好なピーク形状を維持した高感度かつ高い再現性を有する分析が可能であることを明らかにした．

また，生体内に存在する構造異性体の分離・分析について検証を行った．ヘキソースーリン酸（グルコース，フルクトース，マンノース由来）に代表される複数の構造異性体について，標準品および細胞抽出試料のいずれにおいても，IC/MS を用いることで分離・分析が可能であることを確認した．これは，MS 単独では識別が困難な異性体解析において，クロマトグラフィー分離の有効性を示す結果である．さらに，糖，有機酸，糖リン酸，ヌクレオチドなどの陰イオン性代

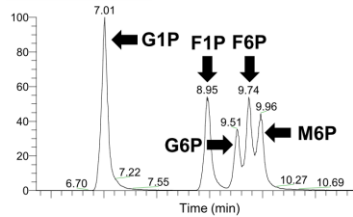
代謝物を対象として、従来法である HILIC-MS との感度比較を行った。その結果、ほとんどの代謝物において IC/MS は HILIC/MS に比べて 100 倍程度高い検出感度を示した。以上の結果より、本研究で構築した IC/MS 分析法は、高極性イオン性代謝物に対して優れた分離能と検出感度を有し、網羅的メタボローム解析において極めて有用な手法であることが示された。

- : 陰イオン性代謝物 (陰イオン交換クロマトグラフィー)
- : 陽イオン性代謝物 (陽イオン交換クロマトグラフィー)
- : 両性イオン (陽/陰イオン交換クロマトグラフィー)



左図 分離・分析が可能な主幹代謝経路上の代表的な中間代謝物 (左)
右図 ヘキソースリン酸の分離・分析結果 (右)

標準品mixture



HeLa細胞抽出液

