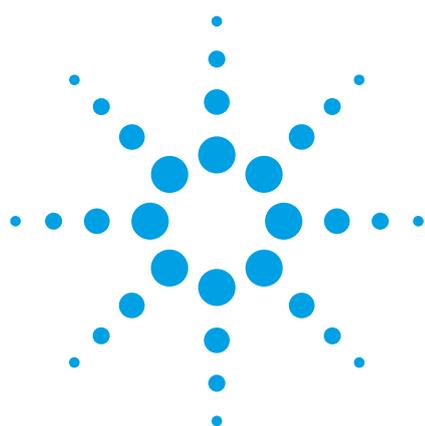


**METABOLOMICS** GENOMICS INFORMATICS PROTEOMICS  
 ONCHNSCOHP CNSHCOPHSNCPONHSONPHSCO  
 HSNPOCHNCOSH PNOHCPNOSCPCNPOCNHOS



## 網羅的メタボロミクス研究における 赤血球の代謝物抽出法の検討

### 著者

Theodore Sana、Steve Fischer  
 Agilent Technologies, Inc.,  
 Santa Clara, CA, USA

### 要旨

メタボロミクス研究では、類似の生体サンプル間代謝物を比較検討する網羅的分析を行います。代謝物は生命活動において極めて重要な役割を果たすため、バイオマーカーの探索や同定、あるいは既知と未知、両方の生物内代謝経路における薬剤または疾病の影響を十分に理解するために、メタボロミクス研究は重要な位置を占めます。

メタボロミクス研究の成功には、効率的な代謝物抽出が必須です。網羅的メタボロミクス研究の場合、抽出メソッドでは、分析対象ではないタンパク質などの成分を除外し、広範囲の細胞と生体流動物の代謝物を抽出する必要があります。代謝物の多様な物理化学的性質や、大きなオーダーで異なる可能性がある代謝物の存在量により、抽出はより困難になります。

代謝物の抽出に、二相の液液抽出が使用される場合があります。しかし、有機と水性溶媒の性質、それらの容量、溶媒比率、pH を注意深く検討する必要があります。これらの条件は、抽出される代謝物の総数や再現性に大きな影響を及ぼす可能性があります。

このアプリケーションノートでは、赤血球から代謝物の液液抽出を行うためのメソッドを紹介します。ここでは、二相分離における水性/有機の比率調整の重要性を実証します。また、抽出される代謝物の数への pH の影響についても実証し、できるだけ多くの代謝物を得るために複数の pH で抽出を行う必要があることを示します。

### 背景

抽出は、代謝物などの目的の化合物 (必要のない化合物の場合が多い) を、他の化合物から選択的に分離するプロセスです。最も一般的な抽出法の1つが、溶媒溶解度と溶媒非混和性の差を活用する液液抽出です。化合物がより溶解しやすい非混和溶媒を有機溶液に添加することで、化合物を一方の液相から他方の液相に移動させます。

極性水溶液は、クロロホルム (揮発性、非反応性、非混和性で、液液抽出用の二相系を形成する水よりも高密度) などの非極性有機溶媒と組み合わせることがよくあります (図 1)。これにより、クロマトグラフィー分離分析のための、極性と非極性代謝物の分離が可能になります。「Folch」<sup>1</sup> 法とその改良型である「Bligh & Dyer」<sup>2</sup> 法は伝統的に、組織からの脂質の抽出とより極性の高い代謝物からの二次的な分離に使用されてきました。

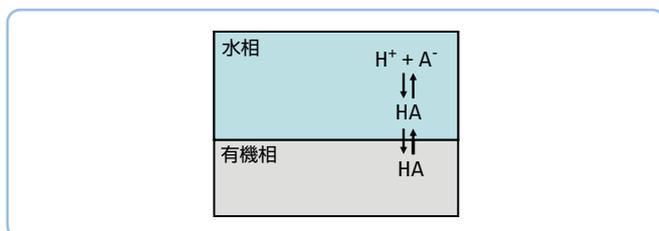


図 1. 2つの混ざらない液体の溶液に化合物を添加すると、2つの液体の相対溶解度に従って、2つの相に分配されます。

メタノール、エタノール、イソプロパノールなどのアルコールは水と混和し、抽出プロセス中の低極性代謝物の溶解度を強化する水相共溶媒として使用されることがあります。

通常、中性 pH で代謝物の液液抽出を行います。代謝物の酸塩基化学的性質の差を活用し、水性抽出溶媒の pH を変更することで、複雑な生体流動物または細胞からの代謝物の抽出を大幅に向上できます。

たとえば、酸性官能基を含む多くの化合物 (カルボン酸など) は水に不溶であったり、わずかししか溶けません。そこで、2% 水酸化アンモニウム (NH<sub>4</sub>OH, pH = 9) などの希塩基を添加することで、水溶解度の高いカルボン酸陰イオンが得られます (図 2)。細胞に希水酸化アンモニウム/メタノールとクロロホルムのアルカリ溶液を添加することで、中性 pH でクロロホルムに不溶なすべての有機酸を、塩基性極性相に抽出できます。



図 2. プロトン化されたカルボン酸に 2% 水酸化アンモニウム (NH<sub>4</sub>OH, pH = 9) などの希塩基を添加することで、水溶解度の高いカルボン酸陰イオンが得られます。R- は、官能基 COOH に結合した原子の基になります。

同様に、弱酸の存在下では、塩基性基を含む化合物は塩を形成し、より水に溶けやすくなります (図 3)。水相に希ギ酸 (HCOOH) などの希酸を添加することで、有機塩基性基を持つ化合物の抽出を改善できます。ギ酸は、水や水相共溶媒として使用される多くの極性有機溶媒と混合できるため、このアプリケーションに最適です。

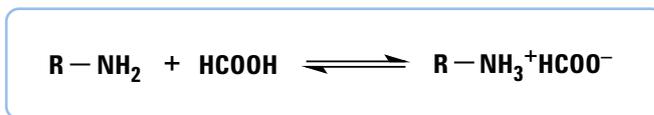


図 3. プロトン化されたアミンに 1% ギ酸 (HCOOH, pH = 2) を添加すると、水溶解度の高いカルボン酸陰イオンが得られます。R- は、官能基 NH<sub>2</sub> に結合した原子の基になります。

ギ酸と水酸化アンモニウムは揮発性で、LC/MS アプリケーションに適合するため、水相の pH 調整に最適です。

## 実験

最初の実験は、二相分離に最適化した、赤血球代謝物の液液抽出の他の要件を満たし、水性溶媒と有機溶媒の容量と比率を決定するために設計されました。2番目の実験では、有効性と実用性を確認するため、実際の赤血球サンプルで1番目の実験で決定された水性/有機比率をテストします。3番目の実験では、赤血球からの代謝物を実際に抽出を行い、pHの変動が抽出される代謝物の数と分類にどの程度影響を及ぼすかをLC/MS分析によって測定する必要があります。

### 相分離の最適化

最適な相分離が得られる有機溶媒/水性溶媒の比率を見つけるために、1番目の実験を行いました。等量 (0.75 mL) の80:20 メタノール/水を、容量 1.7 mL の微小遠心管 6 本に入れました。低い比率では、抽出プロセス中に溶液が凍結するリスクがあるため、今回のメタノール/水の比率を使用しました。クロロホルムの容量を 0.1 mL から 0.6 mL に、0.1 mL 刻みで増加させ、各管に添加しました (図 4)。

非極性溶媒に選択的に溶解し、クロロホルムを鮮やかな黄色/オレンジ色にする脂溶性ジアゾ染料であるスダン I<sup>3</sup> を添加し、クロロホルム相の視覚化を可能にし、極性相と非極性相の混和性の指標に示しました。この時点で、どの管も二相分離を示しませんでした。さらに 0.20 mL の水を各管に添加して相分離を促進し、各管を遠心分離にかけて相分離をさらに促進しました。

遠心分離後でも、最低容量のクロロホルム (0.1 と 0.2 mL) では明らかな相分離は生じませんでした。分離を示さなかった管の場合、クロロホルム相を回収し、測定したところ、0.4 mL を超える容量のクロロホルムを加えた管では、同様の回収率でした。クロロホルムとメタノールの部分的な混和性により、まだ染料の一部を水相で確認できました。同様に、この相でのメタノール混和性により、クロロホルム相の容量は約 10% 増加しました。従って、一部の非極性化合物が水相でも検出できることが予想されます。

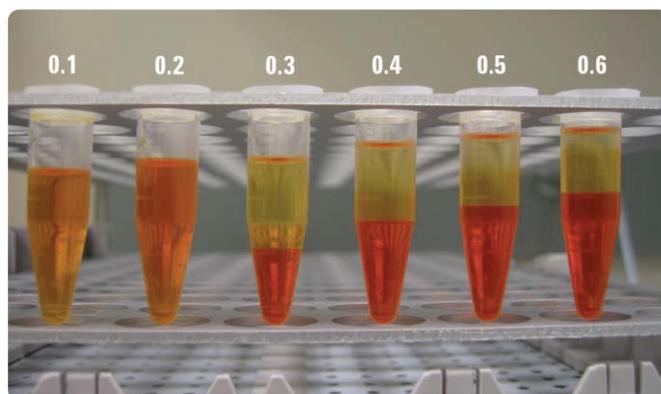


図 4. クロロホルムの量を増やし、80:20 メタノール/水の 0.75 mL を混合することで、抽出段階のシミュレーションを行いました。追加の 0.20 mL の水を二次的に添加し、相分離の促進に役立てました。脂溶性染料であるスダン I の添加は、相分離の視覚化に役立ちました。水相の (上) 半分の色が付いた横縞は、水相中へのクロロホルムの再拡散によるものです。

### テスト抽出

次の実験は、赤血球代謝物の抽出に、前述の実験で決定した水性溶媒/有機溶媒の比率を適用しました。この実験は、図 5 に示したワークフローに従いました。

クエン酸ナトリウム抗凝固剤で前処理した供血者の赤血球 (スタンフォード大学血液センター) の 0.5 mL を、1.7 mL の微小遠心管 6 本に入れました。これらを 1,000 G、4 °C で、2 分間、遠心分離にかけて後、氷上で上澄みを吸引しました。

今回は行いませんでしたが、この時点で、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) での細胞の再懸濁、遠心分離、上澄みの吸引を伴う洗浄サイクルを含めることができます。洗浄サイクルにより、赤血球以外の代謝物や細胞外にまだ存在するその他の化合物を除去できますが、急冷や溶血を遅らせ、残留した微量リン酸塩を残す恐れがあります。

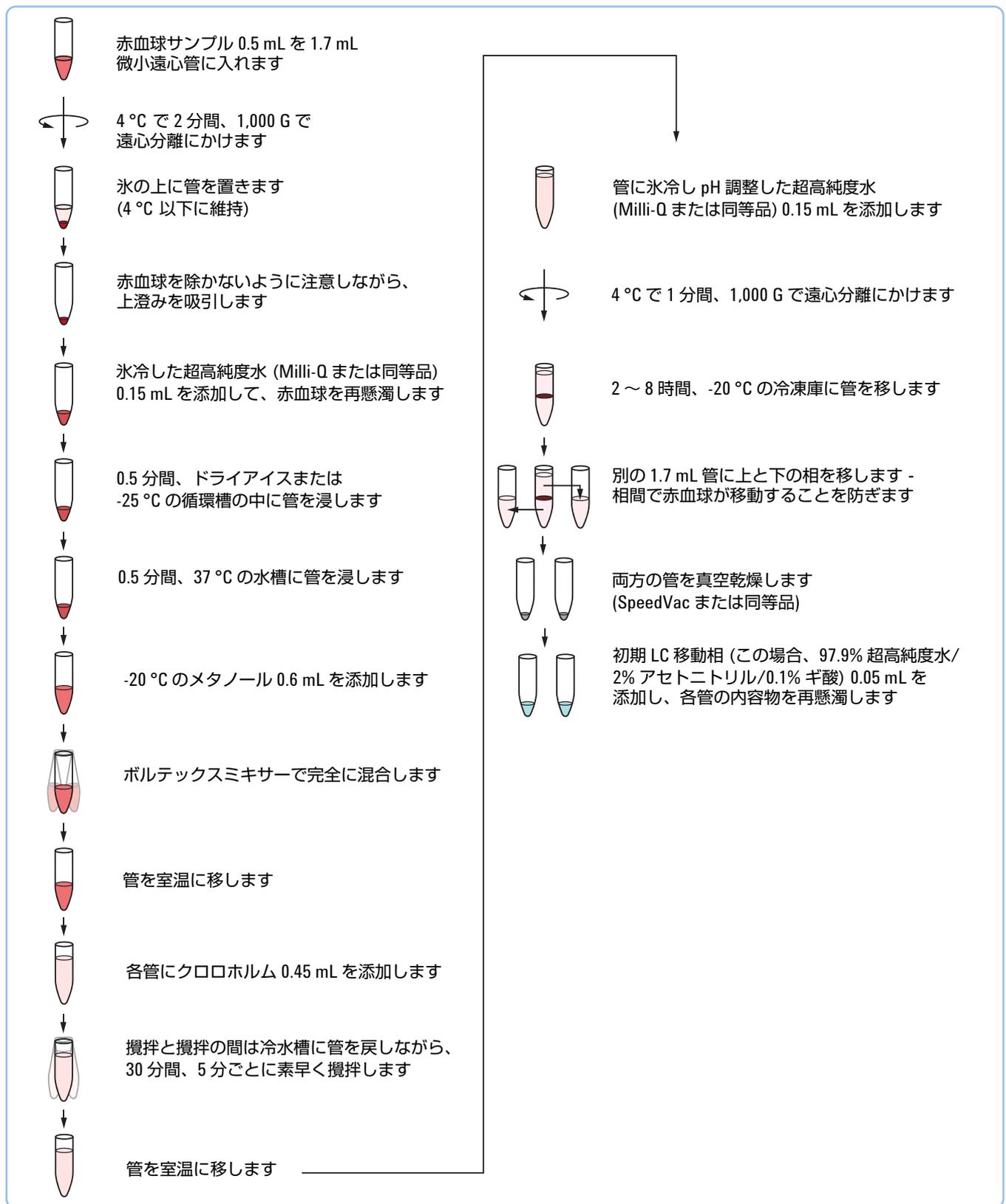


図 5. 1 つの 1.7 mL 微小遠心管を用いた、赤血球からの代謝物の液液抽出のワークフロー。

各管に氷冷した超高純度水 (Milli-Q) 15 mL を添加し、赤血球を再懸濁しました。この管を -25 °C の循環槽に 0.5 分間放置した後、37 °C の水槽に 0.5 分間入れ、代謝物を急冷し、細胞を溶解しました。

各管に -20 °C のメタノール 0.6 mL を添加し、この管をホルテックスミキサーで完全に混ぜ、-25 °C の循環槽に移しました。0.35 mL ~ 0.60 mL の間で、0.05 mL 刻みの異なる量のクロロホルムを各管に添加しました (表 1)。攪拌と攪拌の間は冷水槽に管を戻しながら、30 分間、5 分ごとにこの管を素早く混ぜました。管を室温に移し、各管に氷冷した超高純度水 0.15 mL 添加し、相分離を促進しました。赤血球は管の容量を占めるため、最初の実験で指定された 0.2 mL の代わりに 0.15 mL を使用しました。ぎっしり詰まった円盤状の赤血球の上下に、2 つの相の明確な分離が観察できるように、管を 4 °C で 1 分間、1,000 G の遠心分離にかけました。管を -20 °C の冷凍庫に移し、そこで一晩保管し、残留クロロホルムを水性メタノール相の外で沈殿させました。

図 6 に代謝物抽出の結果を示します。水相の容量は実際にすべての管で同じですが、クロロホルムとのメタノールの溶媒混和性のために、違うように見えます。

6 本の管それぞれに、数粒のスダン I を添加しました (図 7)。実際の LC/MS 分析に供するサンプルを用いては行いませんが、この実験の目的のために、最終クロロホルム容量を評価し、クロロホルム/メタノールの混和性により水相に残されるクロロホルムの量を染料によって簡単に推定することができました。

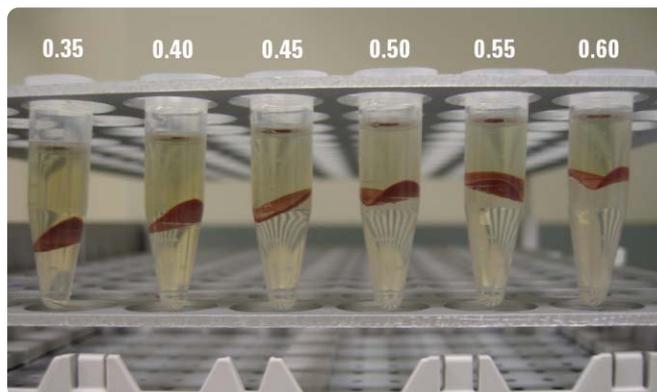


図 6. 表 1 の溶媒量を用いた赤血球の抽出。同じ総水相量 (上の相) が各管に存在しましたが、メタノールとクロロホルム溶媒の混和性により、混合後に差があるように見えます。

別の 1.7 mL 管に、各管の 2 つの液相を移しました。この時、円盤状の赤血球を乱さないようにするか、新しい管にすべての赤血球を移すように注意しました。回収したクロロホルムの元の容量に基づき、最も完全な相分離は管 No.3 で生じ (表 1 参照)、クロロホルム 0.45 mL に相当しました。そのため、次の実験に管 No.3 の溶媒容量を使用しました。抽出と相分離のために、これらの容量は 4:2:3 の最終メタノール/水/クロロホルム比に移しました。この比率での水相と有機相の混和性は最小で、確認分析で優れた相分離が得られました。

表 1. 各管に添加された水性成分と有機成分の量。

管 (mL)	細胞溶解のために添加された水 (mL)	添加されたメタノール (mL)	添加されたクロロホルム (mL)	相分離のために添加された水 (mL)	総容量
1	0.15	0.60	0.35	0.15	1.25
2	0.15	0.60	0.40	0.15	1.30
3	0.15	0.60	0.45	0.15	1.35
4	0.15	0.60	0.50	0.15	1.40
5	0.15	0.60	0.55	0.15	1.45
6	0.15	0.60	0.60	0.15	1.50

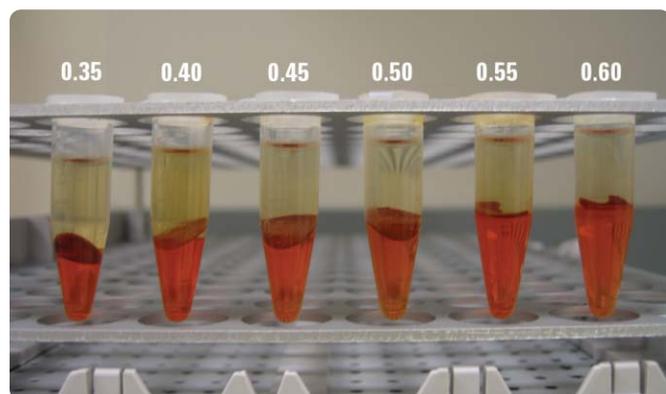


図 7. 管にスタン I を添加し、クロロホルム相の視覚化と、メタノール/水を用いた混合範囲の推定を確認しました。

実験 2 のテストサンプルは LC/MS による分析を行いませんでしたが、実際のサンプルの場合、この時点で、2 本のサンプル管を真空乾燥し、初期 LC 移動相で再懸濁しました。

### 複数の pH での抽出

3 番目の実験では、pH が標的外代謝物の抽出に影響を及ぼす範囲を検討し、pH レベルを変えて抽出を行い、抽出可能な代謝物範囲が向上するか検討しました。

3 本の 50 mL 三角フラスコを超高純度水 (Milli-Q) で満たし、1 本目のフラスコを濃ギ酸で酸性にし、最終濃度の 1% ギ酸で pH 2 に調製しました。

同様に、2 番目のフラスコは、最終濃度の 2% 水酸化アンモニウム水溶液 (超高純度水で濃度 30% に調製した水酸化アンモニウム溶液で希釈した) pH 9 にしました。3 番目のフラスコは、未調整の pH 7 にしました。図 5 で概要を示したワークフローを用いて、3 つの赤血球サンプルを前処理しました。最適な分離を行うために先に決定した溶媒量と比率を使用しました。初期再懸濁中 (ステップ 4)、pH 2 で 0.15 mL の水とギ酸で 1 つのサンプルを再懸濁しました。中性 pH で、1 つのサンプルを 0.15 mL の超高純度水で再懸濁しました。pH 9 で、1 つのサンプルを 0.15 mL の水と水酸化アンモニウムで再懸濁しました。

抽出と相分離プロセスの終了時に、各サンプルの水相を真空乾燥させた後、分析のために初期 LC 移動相で再溶解しました。

### データ取り込みと解析

エレクトロスプレーイオン源を搭載した Agilent 6210 Time-of-Flight LC/MS に連結された Agilent 1100 シリーズ液体クロマトグラフから構成される LC/MS システムを用いて、3 つのサンプルすべてを分析しました。TOF システムは、 $m/z$  121.050873 と  $m/z$  922.009798 のイオンを用いた外部リファレンスマス補正を使用し、高い質量精度を確保しました。

Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアの分子モレキュラーフィーチャー抽出 (MFE) アルゴリズムを使用し、3 つのデータファイルそれぞれで (未同定で、標的以外の化合物の) 分子関連除法を検出しました。MFE アルゴリズムにより、同一時間 (リテンションタイム) で存在する質量シグナル (イオン) を探し、化学的関連性の可能性 (同位体、付加、二量体、多価荷電状態) を検討し、抽出した化合物クロマトグラムと各分子関連情報に対する化合物マススペクトルを作成します。この手法により、クロマトグラフ分離されていない化合物を検出し、検出される化合物の総数を増やすことが可能です。結果は、関連クロマトグラムとすべての構造に対するマススペクトルとともに、各サンプル中の特徴 (化合物) のリストとして表示可能です。

#### LC 条件

カラム:	ZORBAX SB-Aq, 2.1 x 150 mm, 3.5 $\mu$ m
流量:	0.4 mL/min
カラム温度:	20 $^{\circ}$ C
注入量:	2.0 $\mu$ L
移動相:	A: 0.1% ギ酸水溶液 B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント:	0.0 分 2% B 28.0 分 100% B 30.0 分 分析中止

#### MS 条件

イオン化モード:	ポジティブエレクトロスプレー
乾燥ガス流量:	10 L/min
乾燥ガス温度:	250 $^{\circ}$ C
ネブライザ:	40 psig
Vcap:	4,000 V
最大質量:	1700
リファレンスマス流量:	10 $\mu$ L/min
スキャン範囲:	$m/z$ 50 ~ 1,000
取り込み速度:	2 Hz

各サンプル中の溶媒抽出した化合物を同定するには、アジレントの METLIN パーソナル代謝物データベースを用いて 3 つの条件のデータで検索を行いました。スクリップス研究所のマスペクトルセンターがまとめた METLIN データベースには、15,000 種類を超える内因性と外因性代謝物の他、Di および Tri ペプチドに対するマスペクトルデータ、化学式、構造が含まれます。METLIN データベースで一致した (10 ppm 以内の質量一致) 化合物を Microsoft Excel スプレッドシートにインポートしました。

図 8 に、各 pH で抽出された化合物総数の棒グラフを示します。特に pH 7 と pH 9 の間に、抽出された化合物の数に大きな差があり、検出された化合物数で 2 倍の増加を示しました。図 8 の未処理の数は、特徴が METLIN データベースの同一質量を持つ複数の化合物と一致した場合を含み、一部の冗長性に反映します。3 つの化合物 (質量) リストそれぞれを Microsoft Excel で個別にフィルタをかけ、そのような冗長性を除去しました。結果は、特定の化合物 (質量) が pH リストあたり 1 度だけ表示される 3 つの化合物リストにしました。これにより、1 つ以上の pH で抽出された化合物の直接的 1:1 比較が可能になりました。

次に、3 つの化合物リストをマージし、1 つの非冗長化合物ライブラリを作成しました。各 pH で抽出された化合物を含む 3 つのリストとともに、このライブラリをアジレントの GeneSpring MS データ解析ソフトウェアにインポートしました。3 つのリストとライブラリからベン図 (図 9) を作成し、

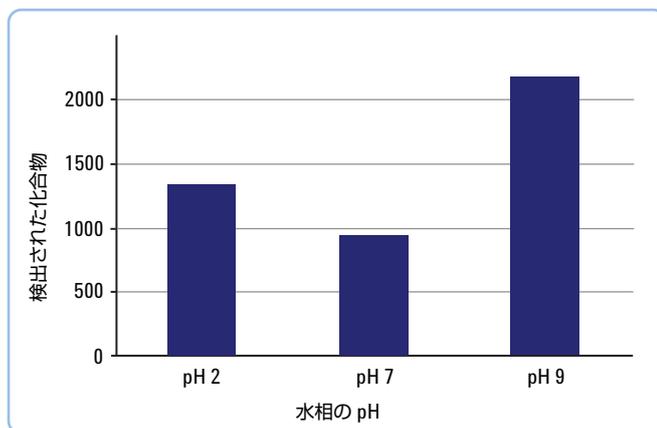


図 8. 各 pH で、MassHunter で抽出された化合物の (未処理の) 総数。

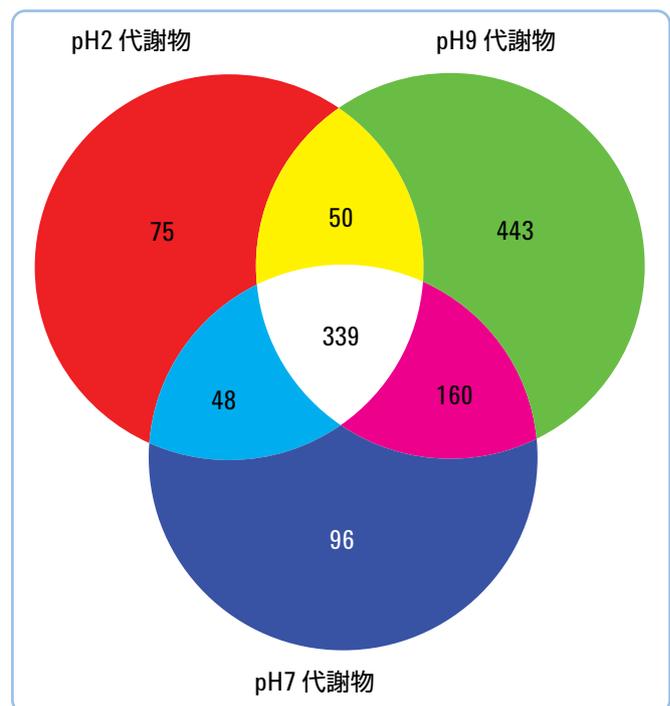


図 9. GeneSpring MS からのベン図は、3 つの pH の内の 1 つ以上で抽出された固有の化合物 (代謝物) の数を示します。

1 つだけの pH で抽出された化合物、または 3 つの pH の内の 2 つ以上で抽出できる化合物の数を明らかにしました。

ライブラリ中の合計 1,211 セットの非冗長化合物から 3 つの pH すべてで多数の化合物 (339) を抽出し、抽出 pH の変動に反応しにくいことを示しました。pH 7 などの 1 つの pH だけで抽出を行うと、このセットの化合物を再現性高く抽出できると予想することは理にかなっていません。しかし、合計 443 の抽出した化合物の 1/3 以上を pH 9 だけで抽出しています。これは、カルボン酸基を持つ化合物を抽出することが予想される pH です。pH 9 で抽出された代謝物の多くを、アラキドン酸代謝、ロイコトリエン代謝、脂質合成に関与する脂肪酸と同定しました。中性 pH では多くの化合物が安定し、pH 7 で抽出できますが、一般的な方法である中性 pH だけで抽出を行った場合、これらの化合物は検出されませんでした。pH 7 だけで抽出された 96 種類の化合物と、pH 2 だけで抽出された 75 種類の化合物に対して、同様の結論を下すことができます。

## 結論

この研究では、赤血球からの代謝物抽出の1つの手法として微小遠心管での液液抽出プロトコルを実証しました。高い有機溶媒比率でのクエンチング代謝と追加の水添加後の二相溶媒分離の間で最適なバランスを取るためには、水性溶媒と有機溶媒の正確な比率が不可欠で、二相分離により、極性と非極性代謝物を個別に回収することが可能でした。最終的に、複数の pH (pH 2、7、9 など) で代謝物を抽出すると、検出される固有の代謝物の数は劇的に増加します。この特定サンプルの場合、1つの中性 pH だけで抽出を行うと (現在の現場では一般的な方法)、抽出される固有の代謝物の 45% 以上は回収されませんでした。

## 参考文献

1. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, 226, 497–509 (1957).
2. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911–917 (1959).
3. Green, Floyd J., *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes, and Indicators*, c1990, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wisconsin.

## アジレント・テクノロジーについて

アジレント・テクノロジーは、複雑な生物学的過程の理解、病気のメカニズムの特定、および創薬の高速化を可能にするライフサイエンス検索システムを提供するサプライヤとして業界をリードしています。アジレントのライフサイエンスソリューションは、感度、再現性、およびワークフローの生産性を高めるように設計されており、装置、マイクロフルイディクス、ソフトウェア、マイクロアレイ、消耗品、さらには、ゲノミクス、プロテオミクス、およびメタボロミクスアプリケーション用のサービスを提供します。

**ホームページ:**  
[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

**コールセンター:**  
0120-477-111

この商品は研究専用です。診断用ではありません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2008  
Printed in Japan, September 30, 2008  
5989-7407JAJP

