〔講演：キャピラリー電気泳動と生命解析科学〕

細胞内代謝中間産物分析のためのオンライン試料濃縮キャピラリー電気泳動

寺部 茂*・Joselito P. Quirino*・Michal J. Markuszewski*・井上直子*

佐伯知香*・大塚浩二*・西岡孝明**

SUMMARY

About 300 small molecules to be found in the cell as metabolic intermediates are listed and classified according to the chemical characteristics. To develop a comprehensive analytical technique of these metabolic intermediates, capillary electrophoresis (CE) is considered to be a promising technique. A mixture of 22 phenylthiohydantoin (PTH) amino acids and that of 6 aromatic carboxylic acids were employed as standard samples to evaluate the CE method from a viewpoint of detection sensitivity. PTH amino acids were concentrated and separated by sweeping micellar electrokinetic chromatography (MEKC) under acidic conditions and only 5-fold increases in sensitivity were obtained for a single run separation of 22 PTH amino acids. The aromatic carboxylic acids were concentrated and separated either under alkaline conditions by capillary zone electrophoresis or under acidic conditions by MEKC. Detection limits of these carboxylic acids were 0.05–0.6 ppm.

Key words: metabolome analysis, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, on-line sample concentration, PTH amino acids.

はじめに

ゲノム解析は、コードされている遺伝子の全容を明らかにしたのみならず、DNA マイクロアレーを用いた遺伝子発現の網羅的かつ経時的解析を行う実験手段を実現した。この結果、分子生物学的な観測と細胞レベルの生命現象との橋渡しをするものとして、細胞内の代謝中間産物の動的側面を網羅的に化学分析を行うことの重要性が急速に認識されるようになってきた。これまで代謝活動に関する知識は、代謝中間産物の種類や代謝経路など代謝活動の静的側面に限られていた。それに対して、生物の細胞増殖サイクルや生育環境の変化、あるいは、遺伝子の発現やその抑制によって、細胞内でどの代謝中間産物の濃度がどのように増減するのか、という代謝経路ネットワーク全体のレベル

で代謝産物を網羅的・同時に化学分析した実測データは全くない。これは、これまで代謝産物の化学分析法が特定の物質の分析を目的として個別に開発されたものであり、網羅的に分析を行う分析法は未だ開発されていないことによる。

このような背景で、キャピラリー電気泳動 (CE) を利用して細胞内代謝中間産物の網羅的分析法を開発することを目的に研究に取りかかることにした。CE は高い分離性能を持ち、試料量が微量でよく、分析時間も短く機器分析法として開発された優れた分離分析法である。問題点の一つは、試料注入量が nl 程度と少なく、紫外吸光検出器の光路長が 50 μm と短いために濃度検出感度が μM 以上と比較的低いことである。この問題点を解決するために、われわれはオンライン試料濃縮法を利用した高感度 CE の開

On-line sample concentration capillary electrophoresis for the analysis of metabolic intermediates in the cell.

* Shigeru Terabe, Joselito P. Quirino, Michal J. Markuszewski, Naoko Inoue, Chika Saeki, Koji Otsuka; 姫路工業大学理学部

** Takaaki Nishioka; 京都大学大学院農学研究科

Correspondence address: Shigeru Terabe, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, 3-2-1, Kouto, Kamigori, Hyogo 678-1297, Japan.

略号一覧: CE, キャピラリー電気泳動; MEKC, ミセル動電クロマトグラフィー; CZE, キャピラリーゾーン電気泳動; PTH, フェニルチオヒダントイン; EOF, 電気浸透流; SDS, 硫酸ドデシルナトリウム; SRMM, 逆方向移動ミセルを用いるスタッキング。

第 51 回日本電気泳動学会総会・特別講演

発を行ってきた。CE におけるオンライン試料濃縮に関してはスタッキング法と呼ばれる、不連続電解質溶液間での電場強度の違いを利用した方法が有用であり、広く利用されている⁹⁾。スタッキング法は試料溶液を分離溶液よりも伝導率の低い溶液として調製することにより、試料溶液中での目的成分の電気泳動速度が、分離溶液中でのそれより遅くなる現象を利用しており、イオン性試料の濃縮にしか適用できない。われわれの開発したミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)では、中性成分の分離も可能であるので、中性成分についても同様にオンライン試料濃縮を可能とするために種々の方法を開発した²⁻⁷⁾。

本研究の最終目標は一細胞中のメタボローム分析法の開発にあるが、当面は細胞からの抽出液を用いて、代謝中間産物を網羅的に分析する方法の開発から検討する。大腸菌細胞中には 3000~6000 種の化合物が数百万分子存在すると言われている。そのうち、代謝産物である小分子は約 1000 種存在すると考えられている。代謝中間産物として出現頻度の高い化合物約 300 種⁸⁾を見ると、種々の化合物が含まれている。水、水素イオン、タンパク質等を除き、小分子を種類ごとに分けて Table 1 に示す。

ここに示した 262 種でも一度に分析するのはほとんど不可能である。したがって、同一種類に属する化合物を網羅的に分析する方法か、あるいは特定の代謝経路に含まれる代謝中間産物を網羅的に分析する方法の開発が当面の目標として適当と考えられる。

代謝中間産物の細胞中での濃度に関する情報は非常に少ないが、細胞内では mM 程度と比較的高いと予想される。しかし、細胞液を直接試料として分析することは、試料量の点でも、組成の点でも困難であるので、細胞液から核酸やタンパク質等を除いた小分子のみを分析対象とする必要がある。そのために細胞から代謝中間産物のみを抽出し、抽出液を試料として用いることが必要となる。その場合は抽出操作のために目的成分の濃度はかなり低くなると予想される。また、代謝中間産物は比較的簡単な構造の分子が多く、検出に有効な紫外吸収が弱い化合物が多い。このよ

うな点を考慮して分析法の開発をすることが重要である。本報告では、代謝中間産物の網羅的分析法にわれわれの開発してきたオンライン試料濃縮法を適用し高感度検出キャピラリー電気泳動を適用する可能性を検討するために、フェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸および代謝中間産物に認められる芳香族カルボン酸を例にとり、検討した結果を報告する。

PTH アミノ酸分析へのオンライン試料濃縮法の適用

アミノ酸は代謝中間産物に多種含まれているが、紫外吸収の強い化合物は少なく、一般に誘導体化して分離検出されている。PTH アミノ酸はエドマン法によるタンパク質やペプチドの N 末端分析に生成する化合物であり、遊離アミノ酸分析のための誘導体としては用いられないが、ここでは多種類化合物の濃縮分離の可能性を検討する目的で本研究を行った。PTH アミノ酸は一般に中性であるので、分離には MEKC が用いられる。われわれは以前に MEKC による PTH アミノ酸の分離について報告している^{9,10)}。その中で中性条件で 100 mM 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を用いて 23 種の PTH アミノ酸の分離に成功している¹⁰⁾。MEKC におけるオンライン試料濃縮では、酸性条件にして電気浸透流 (EOF) を抑制した条件のほうが高い濃縮倍率が得られるので、今回は酸性条件での PTH アミノ酸の分離を検討した。EOF を抑制した MEKC においては SDS ミセルは中性条件とは異なり陽極方向に移動する。この場合、疎水性の強い、または SDS ミセルとの相互作用の強い化合物が速く移動し、中性条件での MEKC とは移動順が逆となる。この条件での MEKC を逆方向移動(RM)-MEKC と呼ぶことにする。22 種の PTH アミノ酸全部を完全に分離することには成功していないが、分離の一例を Fig. 1 A に示す。親水性の強い化合物の場合には移動時間が長くなるので、Fig. 1 の例では電気泳動を始めて 9 分後から陰極側に 0.5 psi (3.4 kPa) の圧力を加え速く移動させた。同じ 22 種の PTH アミノ酸混合物をスウィーピング^{5,6)}により濃縮した例を

Table 1. Classification of metabolic intermediates in the cell according to the chemical structure.

Chemical class	No. of compd.	Typical example
Amino acids, amines and derivatives	54	L-glutamate, L-aspartate
Carboxylic acids	35	pyruvate, 2-oxoglutarate
Alcohols	3	glycerol
Aldehydes	10	acetaldehyde, formaldehyde
Phosphate esters (excludes nucleotides)	33	D-glucose 1-phosphate
Nucleic acids and related compd.	37	ATP, ADP
Carbohydrates and related compd.	16	D-glucose, D-fructose
Lipids, steroids, fatty acids	19	estrone, cholesterol
Vitamins and coenzymes	45	NAD ⁺ , NADH
Inorganic ions	10	phosphate, nitrite

Fig. 1 B に示す。ここでは Fig. 1 A で用いた試料溶液を 5 倍に希釈し、5 倍量注入している。したがって、試料注入量は絶対量で等しくしてある。図から明らかなように、ほぼ同じピーク高さが得られているので、5 倍の濃縮が達成されていることがわかる。スウィーピングでは、疎水性の強い化合物または SDS ミセルと強く相互作用する化合物ほど効率よく濃縮されることが知られている⁵⁾。Fig. 1 の例ではアルギニンやヒスチジン、リジンのような塩基性アミノ酸、フェニルアラニン、ノルロイシンのような疎水性の高いアミノ酸は効率よく濃縮される。一方、セリンやトレオニンのような親水性のアミノ酸はあまり濃縮されな

い。したがって、より多量の試料を注入すると移動時間の早いアミノ酸はさらにピークが高くなるが、移動時間の遅いアミノ酸はピーク高さは増加せず、幅が広がる。アミノ酸のように疎水性の強い化合物から親水性の強い化合物まで多数の化合物の混合物を一斉に高効率で濃縮するにはさらに工夫が必要である。

細胞中に含まれる芳香族カルボン酸の濃縮・分離

細胞中に含まれる代謝中間産物の中から、誘導体化することなく検出の容易な芳香族カルボン酸 6 種を選び出し、オンライン試料濃縮・分離の予備実験を行った結果につい

Fig. 1. Separation of 22 PTH-amino acids by conventional MEKC (A) and sweeping-MEKC (B) under acidic conditions.

Conditions: capillary, 50 μ m i.d. $\times$ 57 cm (50 cm to detector); separation solution, 50 mM SDS in 50 mM phosphate buffer (pH 2.15); sample matrix, separation solution (A), phosphoric acid containing 10% acetonitrile having similar conductivity to that of separation solution (B); sample concentration, 10.2 ppm (Trp), 18.2–27.3 ppm (others) (A), 5-fold diluted of (A) (B); sample injection, 3 s at 0.5 psi (A), 15 s at 0.5 psi (B); applied voltage, –20 kV; detection wavelength, 214 nm. A nitrogen pressure of 0.5 psi was applied at the inlet vial after 9.0 min from the start of run.

Fig. 2. Structures of aromatic carboxylic acids selected from the metabolic intermediates.

て報告する。使用した化合物の名称と構造式を Fig. 2 に示す。カルボン酸は弱酸性であるので、中性条件でカルボン酸イオンをキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) により分離する方法と、酸性条件でイオン化を抑え MEKC により分離する方法が考えられる。CZE ではスタッキング法¹⁾を、MEKC ではスタッキングおよびスウィーピングの両濃縮法の適用が可能である。

Fig. 3 に CZE による分離結果およびスタッキングによる濃縮結果を示す。CZE では泳動液の pH を試料の pK_a 付近に設定し、解離度の違いにより分離する方法が一般的であるが、ここでは 6 種のみ分離であるので、スタッキングの効率を考え、試料が完全に解離しているアルカリ性条件を利用した。Fig. 3 A は通常の CZE 分離を示す。ホウ酸塩緩衝液を用いたので、カテコール構造を持つ化合物 (5) と (6) はホウ酸イオンと錯体を生成し、陰イオン性が強くなり遅く移動したと解釈できる。化合物 (1) 以外はフェノール性水酸基が一部イオン化して、(1) より遅く移動したと考えられる。化合物 (4) のほうが (3) より、(6) のほうが (5) より速く移動しているのは、それぞれフェノール性水酸基の解離が安息香酸誘導体 (3) および (5) のほうがフェニル酢酸誘導体 (4) および (6) よりも大きいためであると解釈できる。このことはフェノール性水酸基の pK_a の値とも一致している。Fig. 3 B は試料を純水に溶解し、試料溶液の伝導率を泳動液のそれよりも低く調整することに

Fig. 3. Separation of metabolic aromatic carboxylic acids by CZE (A) and sample stacking CZE (B).

See Fig. 2 for peak identifications and the migration order in (B) was the same as in (A).

Conditions: capillary, 50 μm i.d. $\times$ 64.5 cm (56 cm to detector); separation solution, 200 mM borate buffer (pH 9.47); sample matrix, separation solution (A), water (B); sample concentration, 100 ppm (1), 200 ppm (2), 30 ppm (3), 90 ppm (4), 20 ppm (5), 30 ppm (6) (A), 10-fold diluted of (A) (B); sample injection, 1.2 s at 50 mbar (A), 40 s at 50 mbar (B); applied voltage, 20 kV; detection wavelength, 210 nm.

Fig. 4. Separation of metabolic aromatic carboxylic acids by MEKC (A), sweeping MEKC (B) and SRMM-MEKC (C).

See Fig. 2 for peak identifications. The migration orders were the same among the (A), (B) and (C). Conditions: separation solution, 50 mM SDS in 50 mM phosphoric acid (pH 2.1); sample matrix, separation solution (A), phosphoric acid (7.35 ms/cm) (B), water (C); sample concentration, the same as given in Fig. 3 A(A), 10-fold diluted of (A) (B, C); sample injection, 1.2 s at 50 mbar (A), 10 s at 50 mbar (B), 40 s at 50 mbar (C); applied voltage, -20 kV. Other conditions are the same as in Fig. 3.

より、スタッキング効果を利用して濃縮分離した例を示す。分離パターンはほとんど変化せず、濃縮倍率は25~30倍であった。この場合の検出限界は0.06~0.31 ppmであった。

Fig. 4 A には泳動液のpHを酸性にし、カルボン酸のイオン化を抑制し、SDSを用いるMEKCにより分離した例を示す。この場合にはSDSミセルと強く結合する化合物ほど速く移動すると考えられる。フェノール性水酸基の数が多いほど遅く移動しているのはこの予想と一致する。安息香酸誘導体のほうがフェニル酢酸誘導体よりもミセルと強く相互作用しているのは興味深い。中性化合物の試料濃縮法としては種々の方法があるが、ここでは2種の濃縮法の結果のみ示す。スウィーピングによる結果をFig. 4 Bに示す。この場合には、試料溶液の伝導率をリン酸を添加することにより泳動液のそれにほぼ等しく調整して行った。スウィーピングでは一般にミセルと強く相互作用する化合物ほど効率よく濃縮されるが、本実験では濃縮倍率は低く、よい結果は得られなかった。試料を純水に溶解して行う、逆方向移動ミセルを用いるスタッキング(SRMM)による結果をFig. 4 Cに示す。この場合には、化合物(2)を除き約20倍の濃縮が得られた。SRMMによる検出限界は、化合物(2)を除き0.05~0.6 ppmであり、CZEの場合とほとんど同じであった。これらカルボン酸は解離を抑制した条件でも疎水性はあまり強くなり、MEKCによる濃縮は期待したほど高倍率にはならなかった。

おわりに

細胞内の代謝中間産物の網羅的分析法の開発のための予備実験結果の一部のみを紹介したが、対象とした化合物の数が少なく、また実際の細胞抽出液についての実験を行っていないので、本報告のみではCEの有用性についての判断はできないが、われわれの研究室ではCEによるメタボローム分析について精力的に研究をすすめており、近いうちにより多くのデータを提供できる予定である。

本研究は文部省科学研究費特定領域研究(C)ゲノム生物学による援助を得て行った。

文 献

- 1) Chien RL, Burgi DS. On-column sample concentration using field amplification in CZE. *Anal Chem* 1992; 64: 489 A-96 A.

- 2) Quirino JP, Terabe S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. 3. stacking with reverse migrating micelles. *Anal Chem* 1998; 70: 149-57.
- 3) Quirino JP, Terabe S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. 5. field enhanced sample injection with reverse migrating micelles. *Anal Chem* 1998; 70: 1893-901.
- 4) Quirino JP, Otsuka K, Terabe S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography VI. stacking using reverse migrating micelles and a water plug. *J Chromatogr B* 1998; 714: 29-38.
- 5) Quirino JP, Terabe S. Exceeding 5000-fold concentration of dilute analytes in micellar electrokinetic chromatography. *Science* 1998; 282: 465-8.
- 6) Quirino JP, Terabe S. Sweeping of analyte zone in electrokinetic chromatography. *Anal Chem* 1999; 71: 1638-44.
- 7) Quirino JP, Terabe S. Approaching a million-fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: Cation-selective exhaustive injection and sweeping. *Anal Chem* 2000; 72: 1023-30.
- 8) Goto S, Bono H, Ogata H, Fujibuchi W, Nishioka T, Sato K, Kanehisa M. Organization and computing metabolic pathway data in terms of binary relations. In: Altman RB et al, editors, *Pacific Symposium on Biocomputing '97*. New Jersey: World Scientific, 1997: 175-86.
- 9) Otsuka K, Terabe S, Ando T. Electrokinetic chromatography with micellar solutions: Separation of phenylthiohydantoin-amino acids. *J Chromatogr* 1985; 332: 219-26.
- 10) Terabe S, Ishihama Y, Nishi H, Fukuyama T, Otsuka K. Effect of urea addition in micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr* 1991; 545: 359-68.

要 旨

細胞内代謝中間産物の網羅的分析法開発にキャピラリー電気泳動の利用の可能性を評価するために行った予備実験結果の一部を報告する。PTHアミノ酸22種の一斉濃縮分離を酸性条件下MEKCにより行い、スウィーピング法により約5倍の試料濃縮ができた。細胞内に代謝中間産物として含まれると考えられる芳香族カルボン酸6種についても濃縮分離を試みた。アルカリ性条件下スタッキングCZEにより25~30倍の濃縮が可能であった。酸性条件下MEKCによる分離濃縮においてもほぼ同様の濃縮結果が得られた。