

Technical Report

GC/MSを用いたヒトES細胞の 総脂質中脂肪酸組成の分析

Determination of Fatty-acid Composition of Lipids in Human ES Cells Using GC-MS

鈴木 崇¹、三善 雅広²、中川 勝博¹、末盛 博文³、中馬 新一郎³、中辻 憲夫^{3,4}

Abstract:

ヒトES細胞の凍結ペレットから、細胞全脂質を抽出した後、脂肪酸のメチルエステル化を行いました。メチル化脂肪酸をGC/MSに供した結果、19種の脂肪酸を同定することができました。本レポートでは、細胞からの前処理(脂質の抽出)のプロトコールと分析可能な脂肪酸を紹介しします。

Keywords: ヒトES細胞、脂肪酸、ガスクロマトグラフィー、四重極型質量分析計、GC/MS

1. はじめに

脂質は生体を構成する主要な成分のひとつです。脂質はエネルギーの貯蔵や細胞膜の脂質二重層の構成要素としての機能のみならず、膜輸送や情報伝達に関わる極めて重要な生体分子です。

代表的な脂質はグリセロール、スフィンゴシン、コレステロールなどの骨格部分に種々の脂肪酸が結合した状態で存在します。質量分析装置に代表される、近年の目覚ましい分析手法の発展により、脂質の分子種を含めた同定が実現可能となってきていますが、全脂質成分を同定することは依然として困難です。

脂肪酸は前述のように、脂質の主要な構成成分であり、生体試料中に含まれる全脂質の脂肪酸組成の情報を得ることは、脂質の包括的分析において極めて重要なステップです。脂肪酸を分析する手法としては、メチルエステル誘導体化した脂肪酸をガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いて分析する手法が有効です。

上記手法がヒトES細胞中の脂肪酸分析に適応可能か検討を行いました。

2. 実験

2-1. 試薬

メチル化脂肪酸の標準品は、スペルコ37種FAMEミックスと Methyl all-*cis*-7,10,13,16,19-docosapentaenoate (シグマ アルドリッチ ジャパン) を用いました。内部標準物質として Heptadecanoic-17,17,17-d3 Acid (CDN Isotopes Inc.) をメタノールに溶解し0.2 mg/mLの濃度で調製しました。

2-2. ヒトES細胞サンプルの調製

ヒトES細胞株(KhES-1)の培養は、京都大学再生医科学研究所内にて行いました。培養後トリプシン-EDTA法により細胞をエッペンンドルフチューブに回収しました(2×10⁶ cells/ tube)。細胞は使用するまで-80℃で保存しました。

2-3. 細胞からの抽出

細胞凍結ペレットからの抽出は、参考文献の方法にて行いました。細胞のペレットに冷アセトン600 μL添加しました。ボルテックスミキサーで懸濁後、液体窒素で細胞を凍結しました。サンプルを溶解後、超音波洗浄器で5分間処理しました。上述の操作を計3回繰り返した後、細胞懸濁液を-20℃で1時間インキュベートしました。遠心分離(15,000 rpm、15分間)後の上清をオートサンプリャーバイアルに回収しました。細胞のペレットに400 μLの抽出溶液(メタノール:MilliQ水:蟻酸 = 86.5:12.5:1.0)を添加しました。ボルテックスミキサーで1分間攪拌した後、超音波洗浄器で10分間処理しました。細胞懸濁液を-20℃で1時間インキュベートしました。遠心分離(15,000 rpm、15分間)後の上清を、上述のバイアルに回収しました。抽出溶液は窒素ガス吹き付けにより有機溶媒を除去した後、凍結乾燥しました。

上記の抽出操作フローをFig. 1に示します。

2-4. 脂肪酸のメチルエステル化

乾燥したサンプルに、0.2 mg/mL Heptadecanoic-17,17,17-d3 acid (メタノール溶液)を25 μL添加しました。脂肪酸のメチルエステル化およびメチル化脂肪酸の精製はナカライテスク社製脂肪酸メチル化キット(製品番号:06482-04)およびメチル化脂肪酸精製キット(製品番号:06483-94)を用いました。メチル誘導体化後の脂肪酸サンプルは窒素ガス吹き付けにより、約0.5 mLとなるよう濃縮し、これをGC/MSのサンプルとしました。

1 島津製作所 分析計測事業部
2 株式会社島津テクノリサーチ
3 京都大学再生医科学研究所
4 京都大学物質-細胞統合システム拠点

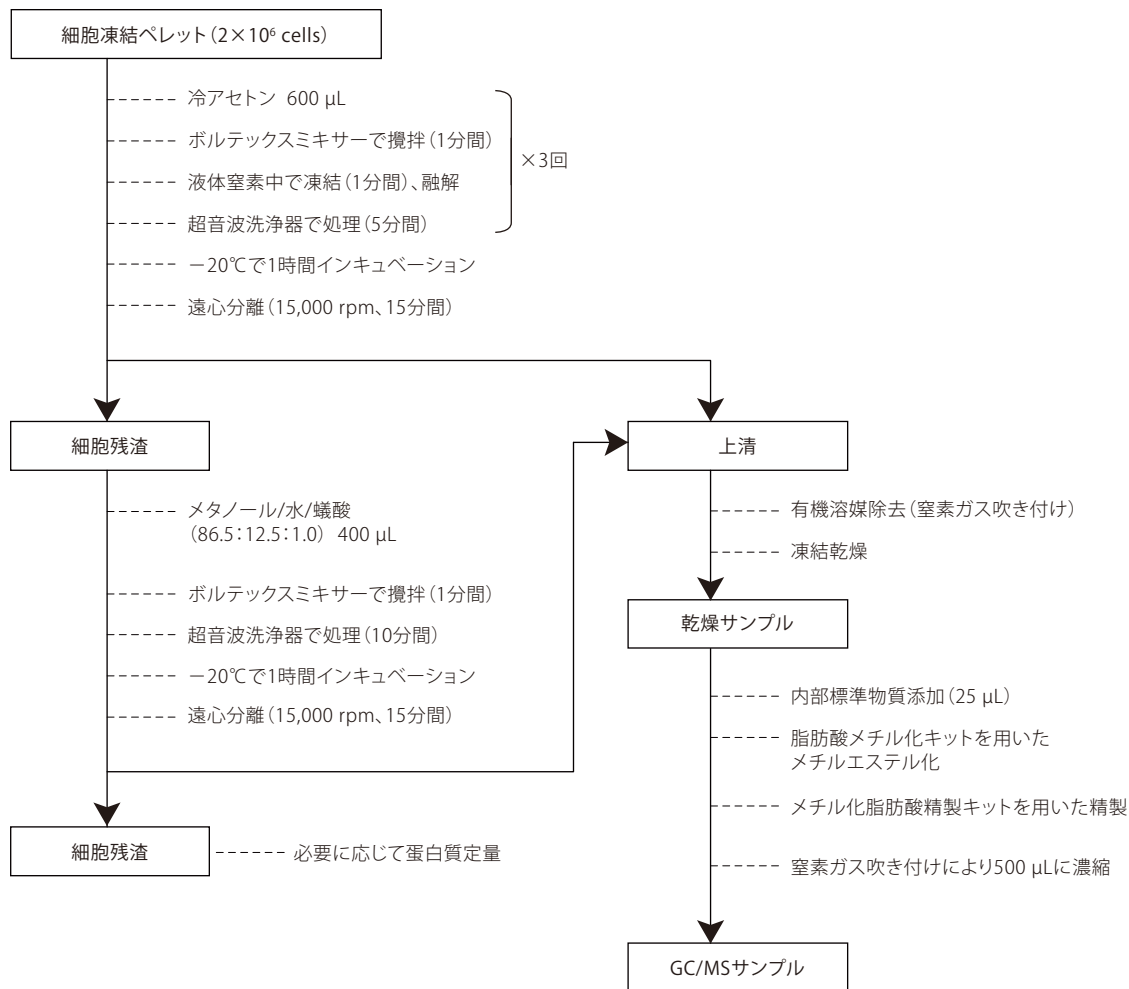


Fig. 1 GC/MS分析用試料前処理手順

2-5. 分析条件

GC/MSの分析条件をTable 1に示します。

Table 1 GC/MS分析条件

装置	GCMS-QP2010 Ultra, AOC-20i + s (オートインジェクタ)
[GC条件]	
カラム:	SP™-2560 シグマ アルドリッチ ジャパン (長さ100 m、内径0.25 mm、膜厚0.20 μm)
注入温度:	250℃
カラム温度:	40℃ (2 min) – (4℃/min) – 240℃ (15 min)
注入モード:	スプリットレス
キャリアガス:	He (Constant Linear Velocity)
線速度:	20.0 cm/sec
注入量:	1 μL
[MS条件]	
イオン源温度:	200℃
インターフェース温度:	250℃
測定範囲:	<i>m/z</i> 40–500
イベント時間:	0.3 sec
スキャンスピード:	1666 u/sec

3. 結果

Fig. 2に、ヒトES細胞株 (KhES-1) 試料のメチルエステル誘導体化サンプルのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示しました。また、Table 2に検出された脂肪酸メチルエステルのリストを示

しました。ヒトES細胞試料のメチルエステル誘導体化物をGC/MSで分析した結果、19種類の脂肪酸を同定することができました。

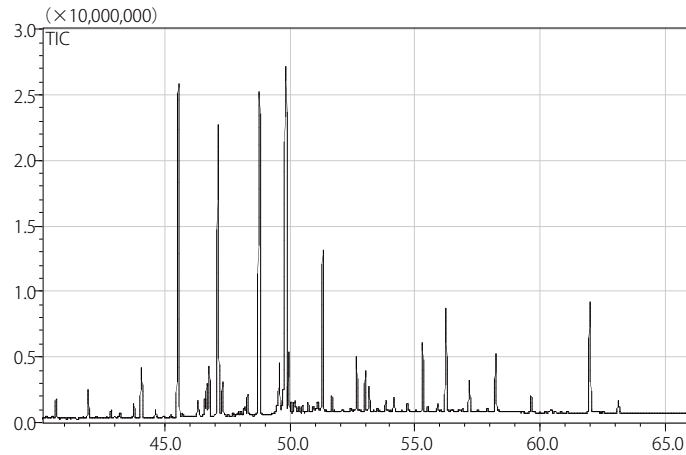


Fig. 2 ヒトES細胞抽出試料メチルエステル誘導体化物のTIC

Table 2 検出された脂肪酸メチルエステルリスト

化合物名	保持時間 (min)	保持指標	類似度*	S/N
Methyl myristate	41.925	2204	98	380
Methyl pentadecanoate	43.755	2309	99	372
Methyl palmitate	45.505	2413	98	12739
Methyl palmitoleate	46.760	2490	95	143
Methyl margarate	47.150	2515	98	606
Methyl stearate	48.735	2619	98	29218
Methyl oleate	49.790	2689	96	96
Methyl linoleate	51.300	2793	99	1101
Methyl arachisate	51.690	2821	98	811
Methyl <i>cis</i> -11-icosenoate	52.675	2891	99	1602
Methyl linolenate	53.005	2913	98	122
Methyl <i>cis</i> -11,14-lcosadienoate	54.165	2991	98	124
Methyl eicosa-8,11,14-trienoate	55.315	3069	99	632
Methyl erucate	55.535	3083	98	93
Methyl <i>cis</i> -11,14,14-lcosatrienoate	55.910	3108	97	24
Methyl arachidonate	56.240	3130	99	457
Methyl <i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoate	58.230	3254	99	243
Methyl <i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoate	61.995	3478	98	617
Methyl <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoate	63.150	3547	99	62
Methyl margarate-d3	47.085	2511	97	19864

*類似度はNISTマススペクトルライブラリーを用いて検索した結果を示します。

4. まとめ

本法を用いることにより、ヒトES細胞中の脂肪酸を19種同定することができ、GC/MSを用いた脂肪酸分析の有効性を確認することができました。今回紹介した方法は、種々の培養細胞中の脂肪酸組成分析への適用が期待できます。

[参考文献]

Yanes, O., Clark, J., Wong, D. W., Patti, G. J., Sanchez-Ruiz, A., Benton, H. P., Trauger, S. A., Despons, C., Ding, S., Siuzdak, G. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat. Chem. Biol.* 2010, **6**, 411-417.

[謝辞]

この成果は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託事業「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ヒト幹細胞実用化に向けた評価基盤技術の開発」に係る業務の結果得られたものです。

島津GC/MSを用いた総脂質中脂肪酸分析

総脂質中脂肪酸分析にGC-MSが用いられます。脂質を構成する脂肪酸をメチルエステル化し、GC-MSで測定します。

MSのイオン化には電子イオン化法(EI法)の他に、妨害成分が存在する場合には正イオン化学イオン化法(PCI法)が用いられます。GC-MSを用いた脂肪酸メチルエステル類の分析では、MSのイオン化としてEI法が一般的に用いられます。しかし、EI法は生成するフラグメントイオンが多いため、妨害成分の影響を受けないイオ

ンの強度が低いことがあります。そのような場合、PCI法は主に分子関連イオンしか生成しないため、そのイオンを用いることによって目的とする脂肪酸メチルと妨害物とを分離し、高感度で分析することができます。

また、妨害物の分離にはMSにトリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS/MS)を用いることも有効です。

弊社のGCMS-QP2010 Ultraは総脂質中脂肪酸分析に最適な機能と性能を有します。

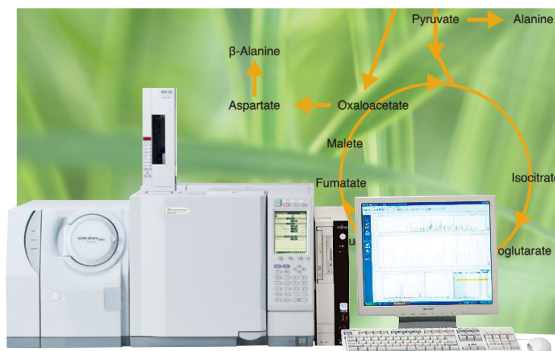
1. 幅広い濃度範囲で存在する脂肪酸類を高濃度から低濃度まで測定できる幅広いダイナミックレンジを有します
2. きょう雑物を多く含む実試料で有効なPCI(オプション)での測定も可能です。
3. GCMS-QP2010シリーズ用GC/MS用代謝成分データベースには、総脂質中脂肪酸を分析するのに最適な条件と定量のためのパラメータを含んだメソッドファイルが含まれています。
4. 脂肪酸の異性体の同定に有効な保持指標に関する機能を備えています。

ガスクロマトグラフ/質量分析計 GCMS-QP2010 Ultra

GCMS-QP2010 Ultra の特長

1. 幅広いダイナミックレンジ
2. 多彩なイオン化 (EI・PCI*・NCI*)
3. 保持指標を用いた化合物同定が可能

*オプション



GC/MS代謝成分データベース(アミノ酸・脂肪酸・有機酸)

「GC/MS代謝成分データベース」は、ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP2010シリーズワークステーション GCMSsolution向けライブラリです。保持指標付きマススペクトルライブラリを用いることによって、候補化合物を大幅に減らし、検索結果の信頼性を向上します。

本データベースには、分析条件、マススペクトル、保持指標などを登録した4種類のメソッドファイルと、CAS番号などを含む化合物情報、マススペクトル、保持指標を含む4種類のライブラリ、ハンドブック(ライブラリ情報の印刷物)から構成されています。メソッド/

ライブラリには脂肪酸、アミノ酸、有機酸の代謝関連成分について、電子イオン化法スペクトル:261スペクトル、正イオン化学イオン化法スペクトル:50スペクトルが登録されています。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2013年6月
© Shimadzu Corporation, 2013