

シングルセルメタボロミクスに資する液体クロマト グラフィー質量分析基盤技術の開発

中谷, 航太

<https://doi.org/10.15017/4060015>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (工学) , 課程博士
バージョン :
権利関係 :



博士論文

シングルセルメタボロミクスに資する
液体クロマトグラフィー質量分析
基盤技術の開発

2020 年 3 月

九州大学大学院 システム生命科学府
システム生命科学専攻 生命科学講座
メタボロミクス分野

中谷航太

目次

略称.....	1
第一章 緒論.....	4
1-1. シングルセル解析の意義.....	4
1-2. 各階層オミクスの重要性.....	4
1-3. シングルセルメタボロミクスの課題.....	5
1-4. シングルセルメタボロミクスの現状.....	7
1-5. シングルセルメタボロミクスにおける LC/MS.....	8
1-6. 本博士論文の目的.....	10
第二章 LC/MS の高感度化とシングルセルメタボロミクスへの応用.....	11
2-1. 緒言.....	11
2-2. 実験材料および実験方法.....	11
2-2-1. 化学薬品と試薬.....	11
2-2-2. 細胞培養と試料調製.....	12
2-2-3. Semimicro-LC/MS/MS 分析条件と nano-LC/MS/MS 分析条件.....	12
2-2-4. 単一 HeLa 細胞サンプリング法と PFPP-nano-LC/MS/MS システムへの注入法.....	14
2-2-5. データ解析.....	14
2-3. 結果と考察.....	14
2-3-1. MRM 条件の最適化とターゲット化合物の物性情報の取得.....	14
2-3-2. PFPP-nano-LC/MS/MS の構築と高感度化の検証.....	15
2-3-3. 単一 HeLa 細胞の単離と nano-LC/MS システムへの注入法の考案.....	18
2-3-4. PFPP-nano-LC/MS/MS による単一 HeLa 細胞メタボローム分析.....	20
2-4. 小括.....	24
第三章 単一分析による網羅的メタボローム分析手法の開発.....	26
3-1. 緒言.....	26
3-2. 実験材料と実験方法.....	29
3-2-1. 化学薬品と試薬.....	29
3-2-2. 細胞培養と細胞回収.....	29
3-2-3. 代謝物抽出.....	30
3-2-4. Semimicro-LC/MS による LC カラムの比較実験.....	30
3-2-5. ターゲット LC/MS/MS 解析.....	32
3-2-6. ノンターゲット LC/MS/MS 解析.....	33
3-3. 結果と考察.....	34
3-3-1. MRM の最適化と化合物情報の取得.....	34
3-3-2. 親水性メタボローム解析に最適なカラムおよび分離条件の選定.....	36
3-3-3. アミノ基混合ポリマーカラムの LC 条件の最適化.....	40

3-3-4. 分離メカニズムに関する考察.....	44
3-3-5. アミノ基混合ポリマーカラムの比較考察.....	49
3-3-6. Unified HILIC/AEX 法のターゲットメタボローム解析への適用.....	51
3-3-7. Unified HILIC/AEX 法のノンターゲットメタボローム解析への適用.....	53
3-4. 小括.....	54
第四章 総括と今後の展望.....	56
謝辞.....	58
引用文献.....	60
論文目録.....	66
学会発表.....	67
書籍.....	69
特許.....	69
付録.....	70

略称

略号	名称	和名
ABC	ammonium bicarbonate	重炭酸アンモニウム
Ace-CoA	acetyl-coenzyme A	アセチル補酵素 A
AmmAce or AA	ammonium acetate	酢酸アンモニウム
ADP	adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
Ala	alanine	アラニン
AMP	adenosine monophosphate	アデノシン一リン酸
Arg	arginine	アルギニン
Asn	asparagine	アスパラギン
Asp	aspartic acid	アスパラギン酸
ATCC	American Type Culture Collection	アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
CCFD	centrifugal concentration freeze dry	遠心濃縮凍結乾燥
CDP	cytidine diphosphate	シチジン二リン酸
CE/MS	capillary electrophoresis mass spectrometry	キャピラリー電気泳動質量分析
Cit	citric acid	クエン酸
CMP	cytidine monophosphate	シチジン一リン酸
CO ₂	carbon dioxide	二酸化炭素
CoA	coenzyme A	補酵素 A
CTP	cytidine triphosphate	シチジン三リン酸
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	ダルベッコ改変イーグル培地
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
dTDP	thymidine diphosphate	チミジン二リン酸
dTMP	thymidine monophosphate	チミジン一リン酸
dTTP	thymidine triphosphate	チミジン三リン酸
ESI	electrospray ionization	エレクトロスプレーイオン化
ESI-MS	electrospray ionization-mass spectrometer	エレクトロスプレーイオン化質量分析計
FAD	flavin adenine dinucleotide	フラビンアデニンジヌクレオチド
FMN	flavin mononucleotide	フラビンモノヌクレオチド
Fucci	Fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator	フーチ
Fum	fumaric acid	フマル酸
GDP	guanosine diphosphate	グアノシン二リン酸
Gln	glutamine	グルタミン
Glu	glutamic acid	グルタミン酸
GMP	guanosine monophosphate	グアノシン一リン酸
GSH	glutathione (reduced)	還元型グルタチオン
GSSG	glutathione disulfide or glutathione (oxidized)	酸化型グルタチオン
GTP	guanosine triphosphate	グアノシン三リン酸
HCA	hierarchical cluster analysis	階層クラスター解析

HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography	親水性相互作用液体クロマトグラフィー
His	histidine	ヒスチジン
HPLC	high performance liquid chromatograph(y)	高速液体クロマトグラフ(イー)
IC/MS	ion chromatography mass spectrometry	イオンクロマトグラフィー
Ile	isoleucine	イソロイシン
IsoCit	isocitric acid	イソクエン酸
LC	liquid chromatography	液体クロマトグラフィー
LC/MS	liquid chromatography mass spectrometry	液体クロマトグラフィー質量分析
LC/MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
Leu	leucine	ロイシン
LOD	limit of detection	検出限界
LSCMS	live single-cell mass spectrometry	一細胞ダイレクト質量分析
Lys	lysine	リシン
Mal	malic acid	リンゴ酸
MALDI/MS	matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry	マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析
Met	methionine	メチオニン
MRM	multiple reaction monitoring	多重反応モニタリング
MS	mass spectrometry (or mass spectrometer)	質量分析 (or 質量分析計)
MSI	Metabolomics Standards Initiative	メタボロミクススタンダードイニシアチブ
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
<i>n.d.</i>	not detected	不検出
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PFPP	pentafluorophenylpropyl	ペンタフルオロフェニルプロピル
Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
Pro	proline	プロリン
QqQMS	triple-quadrupole mass spectrometer	三連四重極型質量分析計
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RPLC	reversed phase liquid chromatography	逆相液体クロマトグラフィー
RSD	relative standard deviation	相対標準偏差
RT	retention time	保持時間
SAH	<i>S</i> -adenosylhomocysteine	<i>S</i> -アデノシルホモシステイン
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionine	<i>S</i> -アデノシルメチオニン
Ser	serine	セリン
Suc	succinic acid	コハク酸
Thr	threonine	スレオニン
Trp	tryptophan	トリプトファン
Tyr	tyrosine	チロシン

UDP	uridine diphosphate		ウリジン二リン酸
UMP	uridine monophosphate		ウリジン一リン酸
unified HILIC/AEX	unified hydrophilic-interaction exchange liquid chromatography	anion-	ユニファイド親水性相互作用陰イオン交換液体クロマトグラフィー
unified HILIC/AEX/MS	unified hydrophilic-interaction exchange liquid chromatography spectrometry	anion-mass	ユニファイド親水性相互作用陰イオン交換液体クロマトグラフィー質量分析
unified HILIC/AEX/MS/MS	unified hydrophilic-interaction exchange liquid chromatography mass spectrometry	anion-tandem	ユニファイド親水性相互作用陰イオン交換液体クロマトグラフィータンデム質量分析
UTP	uridine triphosphate		ウリジン三リン酸
Val	valine		バリン

第一章 緒論

1-1. シングルセル解析の意義

近年の次世代シーケンサー技術の急速な発展により，シングルセルレベルでのゲノム，トランスクリプトーム解析が可能となった．その結果，生命システムには，細胞周期，細胞老化，確率論的分布などの違いから，多種多様な個性を持つ細胞がヘテロに存在していることが明らかになってきた¹．そして，特定の細胞が持つ個性が生命現象に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある．例えば，がんの転移は，血中循環腫瘍細胞が引き起こす現象である²．また，肺では老化の影響を受ける特定の細胞型の肺細胞の存在が明らかになり，老化肺細胞によるコレステロール生合成の増加とエピジェネティックな調節衰弱による転写ノイズの増加が示唆されている³．急性骨髄白血病では，骨髄液中の細胞型の不均一性が悪性度と相関することが示唆されている⁴．こうした生命システムに内在するヘテロな細胞集団を，シングルセルの解像度で理解することにより，アンチエイジングやがん治療などの医療戦略に有意義な洞察が得られることが期待されている．

1-2. 各階層オミクスの重要性

セントラルドグマの概念に基づき，遺伝子情報は転写過程を経て，タンパク質に翻訳される．そして酵素タンパク質が触媒する代謝反応によって生命活動に必須の低分子代謝物が生合成される．また，これらの各階層を包括的に解析する学問は，それぞれゲノミクス，トランスクリプトミクス，プロテオミクス，メタボロミクスと呼ばれている．一方，近年，終止コドンとは無関係に新生ペプチド鎖の翻訳が停止する現象が報告されており⁵⁻⁶，また，翻訳後修飾により活性化するタンパク質も数多く存在するため⁷，現時点では，遺伝子発現における上流の情報だけでは下流のプロテオーム，メタボロームの変化を予測することはできない．また，代謝物が酵素タンパク質活性を制御するアロステリック効果に加えて⁸⁻⁹，tryptophan, glutamic acid, dihydroxyacetone

phosphate などの代謝物は転写産物と結合して翻訳を制御することが報告されており¹⁰, 分子階層を跨いだ生命システムの制御機構の重要性が近年認識されつつある. したがって, 生命システムのより良い理解のためには各階層の情報を包括的かつ1細胞レベルで取得することが望ましいと考えられる. しかしながら, 1細胞メタボロミクスの解析法は未だ発展途上の段階である¹¹.

1-3. シングルセルメタボロミクスの課題

代謝物はDNAやRNA解析時のPCRのような増幅操作ができないため, 細胞内に存在する分子をそのまま検出する必要がある. 他の分子階層と比べると, 代謝物は比較的高濃度 (μM – mM) で存在するものも多い¹². しかし, 生物種の細胞サイズは大きく異なることから, 分析の難易度は大きく異なる. 表1に, 細胞種, 細胞サイズ, および細胞内に1mMで存在すると仮定したときの代謝物の分子数の関係をまとめた¹³. HeLa細胞のような典型的な動物細胞を例に挙げると, 細胞直径が20 μm , 体積が4 pLであり, 1mMの代謝物でも1細胞あたりの分子の絶対量としては4 fmolしか存在しない. すなわち, こうした典型的な動物細胞についてシングルセルメタボロミクスを行うには分析系の感度向上が1つの課題に挙げられる.

表1 細胞種, 細胞サイズ, および分子数の関係

細胞種	細胞直径	体積 ^a	絶対量 ^b	
			モル数	分子数
<i>Xenopus laevis</i> egg	~1000 μm	523 nL	523 pmol	3.2×10^{14}
<i>Aplysia californica</i> neuron	~150 μm	2 nL	2 pmol	1.2×10^{12}
Typical mammalian cells	~20 μm	4 pL	4 fmol	2.4×10^9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5 μm	65 fL	65 amol	3.9×10^7
<i>Escherichia coli</i>	1 μm	523 aL	523 zmol	3.2×10^5

^a 細胞は理想的な球体であると仮定して計算.

^b 細胞内濃度が1mMの代謝物を基準に算出.

また、メタボロームは物理化学的特性が多様であり、例えば、高極性から低極性までの幅広い極性範囲を持ち、陽イオン性、両イオン性、陰イオン性、非荷電化合物といった多様な電荷特性を持つ。そしてこれら全ての化合物は、分子量としては~2,000までの範囲に存在すると言われている¹⁴。一例に過ぎないが、図1に当研究室で所有している合計 532 種類の化合物標準品の分子量とオクタノール/水 分配係数 (*n*-octanol/water partition coefficient, $\log P_{ow}$) の値をプロットした。図1の分子量からは構造的な多様性が、 $\log P_{ow}$ からは化学的性質の多様性が伺える。これに加えてさらに電荷特性や立体構造の違いなども存在するため、メタボロームの物理化学的性質はさらに複雑である。そのため、現時点での分析技術では単一手法でこれら全ての代謝物を測定することは困難である¹¹。特に1細胞メタボロミクス解析では、一度しか分析することができないため、単一分析における網羅性を向上させることが2つ目の課題として挙げられる。

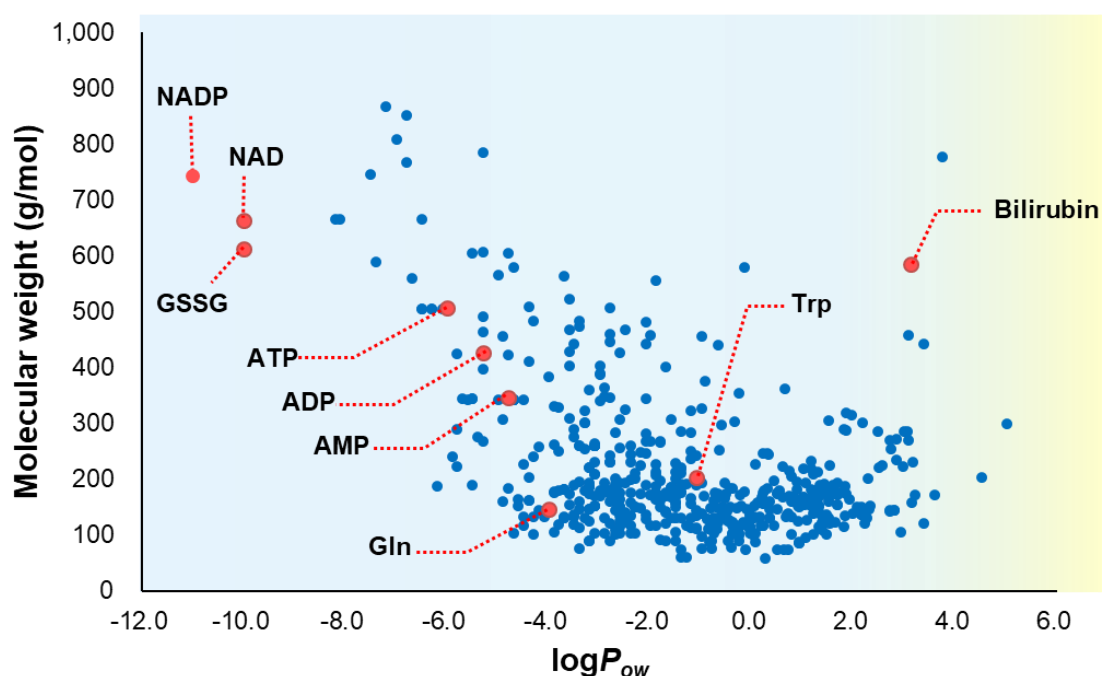


図1 分子量と $\log P_{ow}$ で表現される代謝物の物理化学的性質の多様性

$\log P_{ow}$ は ChemAxon, MarvinSketch による予測値を用いた。

略号：NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; GSSG, glutathione disulfide; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP,

adenosine monophosphate; Gln, glutamine; Trp, tryptophan.

1-4. シングルセルメタボロミクスの現状

高感度かつ網羅的に化合物を検出するという点において、質量分析 (mass spectrometry, MS) は非常に強力な解析手段である。そのため、質量分析計はメタボローム解析における第一選択の検出器として利用されている¹⁵。近年、組織切片や1細胞から親水性代謝物データを取得するための様々な分析技術が開発されてきた^{11, 16}。マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI/MS) や単一細胞ダイレクト質量分析法 (live single-cell mass spectrometry, LSCMS) といった方法が1細胞メタボロミクスに応用されている¹⁷⁻¹⁹。しかしながら、例えば、9-aminoacridin をマトリックスとして用いた MALDI/MS による代謝物分析では、陰イオン性の一部の代謝物しかイオン化することができない²⁰。また、生体成分由来の夾雑物質やマトリックス自体によるイオン化サプレッションも懸念され、定量情報の取得は慎重に行う必要がある。そのため、MALDI/MS では網羅的なメタボローム解析は現状難しい。また、LSCMS でイオン化に用いるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法は、比較的ソフトなイオン化法に分類されているものの、化合物によってはインソースフラグメンテーションが起こることが知られている。例えば、ATP, ADP, AMP はイオン化して $[\text{ATP-H}]^-$, $[\text{ADP-H}]^-$, $[\text{AMP-H}]^-$ となるが、 $[\text{ATP-H}]^-$ は、ESI のインソースフラグメントとして $[\text{AMP-H}]^-$, $[\text{ADP-H}]^-$ を生じることが報告されており、インソースフラグメントと内因性の ADP, AMP を識別することができない²¹。さらに、MS で観測される分子イオンピークの大半が構造未知の代謝物であるため、インソースフラグメントの生成頻度を算出することは難しい。そのため、LSCMS では、取得した定量結果が内因性代謝物のみの結果でないことが懸念される。以上の問題を踏まえて、Metabolomics Standards Initiative (MSI) では、代謝物を同定するためには、実験者の研究室内で少なくとも2つ以上の化合物の直交的な性質を標準品と実験データで比較する必要があると定めている²²。

個々の内因性代謝物を識別するためには、MS の前部にクロマトグラフィーのような分離手段が必要である。また、LSCMS においても、MALDI/MS と同様に、夾雑成分によるイオン化サプレッションには注意が必要である。以上の理由から、MALDI/MS や LSCMS は、定性・定量能力において課題を抱えていると言える¹⁷⁻¹⁹。

シングルセルから代謝物を同定・定量するために、キャピラリー電気泳動質量分析 (capillary electrophoresis mass spectrometry, CE/MS) を利用する方法がある。CE/MS では、キャピラリー電気泳動における泳動時間と、質量分析における m/z という 2 つの化合物情報を化合物同定に利用することができる。そのため、化合物同定の精度は MALDI/MS や LSCMS よりも高い²³。また、測定対象代謝物を夾雑成分から分離することで、イオン化サプレッションの影響を低減することができるため、分析系の感度や定量性の向上が期待できる²⁴。CE/MS によるシングルセルメタボロミックスの成功例として、R. M. Onjiko らはアフリカツメガエルの初期胚 (表 1 の *Xenopus laevis* egg, 細胞径 500–1000 μm) の細胞分裂における代謝ダイナミクスを 1 細胞レベルで観測した²⁵⁻²⁶。しかしながら、このような成功例はサンプル量が十分確保できるアフリカツメガエルの初期胚のような比較的大きな細胞に限られている。典型的な動物細胞 (細胞径 10–20 μm) は、アフリカツメガエルの初期胚と比べ、その体積が約 10,000 倍小さい。こうした典型的な動物細胞の細胞集団内の代謝の不均一性については、これまで示されていない。Nature 誌は、シングルセルメタボロミックスを 2016 年のテクノロジー特集に選定したが、同記事の冒頭で「この分野は未だ幼児期にある」と述べ、こうしたシングルセルメタボロミックスの現状を端的に表現している¹¹。

1-5. シングルセルメタボロミックスにおける LC/MS

液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS) は、クロマト分離モードや固定相担体のバリエーションが豊富であり、幅広い物性のメタボロームを同時に分離分析できる可能性のある分離検出法である^{24, 27-28}。CE/MS と同じように LC/MS は代謝物の同定・定量に優れている。CE/MS を用いて陽イオン

性代謝物²⁹と陰イオン性代謝物³⁰を測定するためには、キャピラリー両端への電圧の印可を逆転させ、異なる電解質を使用する必要がある。そのため、陽イオン性代謝物と陰イオン性代謝物の同時計測は CE/MS の原理上難しい。CE/MS と比較した LC/MS の利点として、代謝物をカラムに強く保持することで大量注入による先端濃縮が可能であること、現時点では網羅性は高くないが広い物性を持つ化合物（陽イオン、陰イオンなど）を同時に分離分析できることが挙げられる。LC/MS は感度向上と単一分析における代謝物の網羅性の観点で改善の余地がある。

現在、LC/MS が 1 細胞メタボロミクスに利用されていない理由は以下の 2 つが考えられる。1 つ目は、汎用的な semimicro-LC/MS では感度が不足していることである。LC 技術の呼称には統一された基準はないが、意味を明瞭にするため、本博士論文を通して、LC で使用するカラム内径と流量に応じて表 2 のような呼称を用いる³¹⁻³²。従来のメタボロミクス研究の大半が 1×10^5 ~ 10^7 個程度の細胞を用いたバルクサンプルであるため、取り扱いが容易であり分析の安定性の高い semimicro-LC/MS が汎用的な方法となっている。汎用的な semimicro-LC/MS では内径 2.1 mm の LC カラムが使用されるのに対し、CE/MS では内径 50–100 μm のフューズドシリカキャピラリー等が分離に使用される。CE/MS と比較すると、汎用的な semimicro-LC/MS では 21–42 倍大きな内径の LC カラムが使用されている。そのため、カラム内で移動相溶媒による分析物の拡散が生じ (補足図 1)、1 細胞メタボロミクスに必要な感度が達成できない。微量試料分析に特化した高感度なメタボローム分析手法の構築が課題である。また、LC/MS が 1 細胞メタボロミクスに利用されていない 2 つ目の理由は、単一手法での親水性代謝物の包括的な測定が可能な LC/MS 分離法が見出されていないことが考えられる。現在も、様々な LC カラムが精力的に開発されており、各種分離法の比較によってメタボローム分析に最も適した網羅性の高い分離法が模索されている状況である³³⁻³⁵。

表 2 LC 命名法

Name	Flow rate	Column diameter	Cross-section
Semimicro-LC	100-999 $\mu\text{L}/\text{min}$	2.0-4.6 mm	3.5-17 mm^2
Micro-LC	1-100 $\mu\text{L}/\text{min}$	0.3-2.0 mm	0.07-3.5 mm^2
Nano-LC	< 1 $\mu\text{L}/\text{min}$	< 0.15 mm	< 0.02 mm^2

1-6. 本博士論文の目的

そこで本博士論文では、典型的な動物細胞（細胞直径 10–20 μm ）のシングルセルメタボローム分析法を構築することを目指して、高感度かつ網羅的な LC/MS 分析法を開発することを目的とした。第二章では、汎用的な semimicro-LC/MS よりも高感度な nano-LC/MS を構築し、これを用いて高感度メタボローム解析手法を開発した。さらに当該手法を HeLa 細胞（細胞直径 10–20 μm ）の 1 細胞メタボロミクスに適用することで、高感度 LC/MS が典型的な動物細胞の 1 細胞メタボロミクスにおいて利用可能であることを実証した。第三章では、単一分析でより包括的な親水性メタボローム分析を実現可能にするための新たな LC/MS 分析法の開発に取り組んだ。本博士論文では、LC/MS によるシングルセルメタボロミクスが直面する感度と網羅性という 2 つの課題を解決するための要素技術開発を行った。

第二章

LC/MS の高感度化とシングルセルメタボロミクスへの応用

2-1. 緒言

一般的な LC/MS の高感度化の方法として、カラム内径の微小化がある。エレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS) は濃度依存的な検出器であるため、得られるシグナルは、最大ピーク濃度 (C_{max}) に依存する³⁶。ここで C_{max} とはキャリアフローにおける化合物の最大濃度を示す。理論的には C_{max} に影響を与える最も重要なパラメーターはカラム内径であるため、流速を下げた内径の小さなカラムを用いることにより、LC/MS の感度を高めることができる (補足図 1)。さらに、流量が減少すると、ESI からより微細な液滴が放出され、気化効率が向上することでイオン化が促進される。また、ESI ニードルをイオン取り込み口であるオリフィスへ近づけることによりイオン導入効率が向上し、結果として感度向上が見込める。しかしながら、メタボロミクスでは、カラム内径を微小化した nano-LC/MS の代謝解析への適用例は少なく³⁷⁻⁴⁰、さらに、HeLa 細胞のような典型的な動物細胞の 1 細胞メタボロミクスへの適用事例はない。

そこで本章では、カラム内径のダウンサイジングにより高感度な nano-LC/MS システムを構築し、HeLa 細胞のシングルセルメタボロミクスを nano-LC/MS により実行可能であるかを検証することを目的とした。

2-2. 実験材料および実験方法

2-2-1. 化学薬品と試薬

LC-MS 用蒸留水、アセトニトリル、メタノール (MeOH) は関東化学株式会社 (東京) から購入した。HPLC 用クロロホルム (CHCl_3)、28%アンモニア水はナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。LC-MS 用ギ酸、酢酸は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。標準品はナカライテスク、富士フィルム和光純薬、Merck

(Darmstadt, Germany), Honeywell International, Inc. (Morristown, NJ, USA) から入手した。

2-2-2. 細胞培養と試料調製

HeLa 細胞 (American Type Culture Collection, ATCC) は 6 ウェルプレート (Corning Inc., NY, USA) で 10% (v/v) のウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), 1% (v/v) のペニシリン (富士フィルム和光純薬) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) で CO₂ 濃度 5%, 37°C の条件で培養した。6 ウェルプレートで培養した HeLa 細胞がおよそ 80%コンフルエントの状態になったとき、回収処理を実施した。培地上清を吸引除去した後、ウェルに 1 mL のトリプシン (Thermo Fisher Scientific) を添加し、37°C で約 3 分間静置した。トリプシン処理した細胞懸濁液は 15 mL のファルコンチューブに全量移し、20°C, 250 ×g で 1 分間遠心分離した。上清のトリプシン溶液を吸引除去した後、細胞は 10 mL の phosphate-buffered saline, PBS (Thermo Fisher Scientific) を加えて遠心分離と上清除去を繰り返し行い、4 回洗浄した。単一 HeLa 細胞のサンプリングのために、洗浄後の細胞に約 1 mL の PBS を加えて細胞懸濁液とした。用意した細胞懸濁液を続いて直ちに単一 HeLa 細胞サンプリングのために使用した。

2-2-3. Semimicro-LC/MS/MS 分析条件と nano-LC/MS/MS 分析条件

Semimicro-液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) は Prominence-i LC-2030 HPLC system (株式会社島津製作所, 京都) とヒーティング ESI ユニットと LCMS-8060 (島津製作所) を接続したシステムを用いて実施した。LC システムにはバイナリーポンプ, カラムオーブン, オートサンプラーを装備した。LC 分離には Discovery HSF5, 3 μm, 2.1 mm × 150 mm (Merck) を使用した。移動相は, 0.1% (v/v) ギ酸水溶液 (A) と 0.1% (v/v) ギ酸添加アセトニトリル (B) を使用した。グラジエント条件は次のように設定した: $t = 0-5$ min, 0% (B); $t = 5-15$ min, 0-40% (B); $t = 15-16$ min, 40-100% (B); $t = 16-20$ min, 100% (B); t

= 20–20.1 min, 100–0% (B); $t = 20.1$ –25 min, 0% (B). 流速は 0.25 mL/min, カラム温度は 25°C に設定した. 注入量は 1 μ L とした. マルチプルリアクションモニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) 条件は, 標準品のフローインジェクション分析により最適化した (補足表 1). MS 条件は次のように設定した: ネブライザーガス流量, 2 L/min; ヒーティングガス流量, 10 L/min; ドライガス流量, 10 L/min; ヒートブロック温度, 400°C; DL 温度, 250°C; スプレー電圧, 4.0 kV.

Nano-LC/MS/MS 分析は Thermo Scientific UltiMate 3000 RSLCnano system (Thermo Fisher Scientific) と nano-LC interface (AMR 株式会社, 東京) と LCMS-8060 (島津製作所) と HTC-PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) を接続したシステムを用いて実施した. P-2000 キャピラリーレーザープラー (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) を用いて, nano-LC 用のフューズドシリカキャピラリースプレーヤーチップ (180 mm in length, 100 μ m i.d., 360 μ m o.d.) を作製した. P-2000 の条件は, 1–4 ステップ目の間は HEAT, 225; VEL, 15; DEL, 138 と設定し, 5 ステップ目は HEAT, 180; VEL, 15; DEL, 138 に設定した. 粒子径 3 μ m の Discovery HSF5 (pentafluorophenylpropyl, PFPP) 粒子 (Merck) を, 準備した nano-LC スプレーヤーチップ内にキャピラリーカラムパッカー Nanobaume (Western Fluids Engineering, Wildomar, CA, USA) を用いて充填した (Discovery HSF5, 3 μ m, 0.1 mm \times 180 mm). 移動相は, 0.1% (v/v) ギ酸水溶液 (A) と 0.1% (v/v) ギ酸添加アセトニトリル (B) を使用した. グラジエント条件は次のように設定した: $t = 0$ –9 min, 1% (B); $t = 9$ –19 min, 1–40% (B); $t = 19$ –20 min, 40–99% (B); $t = 20$ –30 min, 99% (B); $t = 30$ –31 min, 99–1% (B); $t = 31$ –45 min, 1% (B). 流速は 600 nL/min, カラム温度は 25°C に設定した. 注入量は 0.1 μ L とした. MS 条件は次のように設定した: ネブライザーガス流量, 0 L/min; ヒーティングガス流量, 0 L/min; ドライガス流量, 0 L/min; ヒートブロック温度, 400°C; DL 温度, 250°C; スプレー電圧, 2.5 kV. MRM モードの測定条件は, semimicro-LC/MS/MS 分析時と同一のものを使用した.

2-2-4. 単一 HeLa 細胞サンプリング法と nano-LC/MS/MS システムへの注入法

まず、フューズドシリカキャピラリー (75 mm in length, 100 μ m i.d., 360 μ m o.d.) をガスタイトシリンジポンプに接続し、キャピラリーを水で満たした。その後、空気を吸引し、水とサンプルを分離するためのエアギャップ (<50 nL, <5 mm in length) を作った。次に、細胞懸濁液を約 100 nL 吸引し、その後さらに空気を吸引してエアギャップを作った。キャピラリーをガスタイトシリンジポンプから取り外し、キャピラリーに吸引した細胞懸濁中に 1 細胞が単離できたかどうかを顕微鏡で観察した。次に、単一 HeLa 細胞が単離されたキャピラリーを LC の流路に接続した。その後、バルブ切り替えにより、単一 HeLa 細胞を nano-LC/MS/MS システムに注入した。

2-2-5. データ解析

データ解析は LabSolutions version 5.91 (島津製作所) を用いて行った。ボックスプロットは Microsoft Excel 2016 で作成した。階層的クラスター解析 (hierarchical cluster analysis, HCA) はオートスケーリングしたピークエリア値を用いて MetaboAnalyst 4.0⁴¹ により行った。

2-3. 結果と考察

2-3-1. MRM 条件の最適化とターゲット化合物の物性情報の取得

本章では、細胞内で比較的豊富なアミノ酸、核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドの合計 35 種類の化合物を測定対象とした。測定対象とした 35 種の代謝物の化学的性質を把握するために、ChemAxon が提供する MarvinSketch により、 $\log P_{ow}$ 、最も強い酸性 pK_a 、2 番目に強い pK_a 、最も強い塩基性 pK_b 、2 番目に強い pK_b を予測した。化合物の pH 7.0 での分子/イオン分布とその電荷特性に基づいて、化合物を陽イオン

性，両イオン性，非荷電化合物，陰イオン性に分類した (補足表 1). 本研究で測定対象とした 35 種の代謝物は， $\log P_{ow}$ が-4.88 から-0.57 の範囲にあり，かつ多様な電荷特性を持つ化合物であった.

三連四重極型質量分析計 (triple-quadrupole mass spectrometer, QqQMS) による MRM 測定とは，QqQMS の 1 つ目の MS (Q1) で ESI によってイオン化した目的物の分子イオン (プリカーサイオン) を選択し，続くコリジョンセル (Q2) において衝突誘起解離を用いて選択したイオンを不活性ガスに衝突させることでプリカーサイオンの開裂を起こし，2 つ目の MS (Q3) で開裂したイオン (プロダクトイオン) 中の特定イオンを検出する方法のことであり，Q1 と Q3 の設定値の組み合わせのことを MRM transition という. MRM 測定では，MS 内部で特定の標的イオンのみを選択的に単離し，共溶出する夾雑イオンを除去することができるため，結果としてバックグラウンドを低下させることができる. そのため， S/N が向上し，高感度かつ選択性の高い検出が可能となる. 35 種の親水性代謝物の MRM transition はそれらの標準品のフローインジェクション分析によって最適化し，定量 MRM transition および確認 MRM transition の 2 つの MRM 条件を設定した (補足表 1). 最適化した MRM 条件での LC/MS/MS により，高感度なターゲット分析が可能である.

2-3-2. PFPP-nano-LC/MS/MS の構築と高感度化の検証

PFPP カラムは親水性代謝物に良好な分離性能を示す逆相カラムとして利用されている⁴². まず，キャピラリーレーザープレーを用いて，フューズドシリカキャピラリーを加熱切断してナノスプレイヤーチップ (内径 100 μm ，先端径 8-10 μm) を作製した. これに市販 PFPP カラムで使用されている PFPP 粒子を充填し，内径 100 μm の PFPP-nano-LC カラムを自作した. 作製したナノスプレイヤー一体型ナノカラムを装置に接続することで，PFPP-nano-LC/MS/MS システムを構築した. 検出限界 (limit of detection, LOD)，ダイナミックレンジ，直線性 (correlation coefficient, R^2)，再現性 (relative standard deviations, RSDs) を算出するため，35 種の代謝物標準品の希釈系列

をオートサンプラーにより分析した。

表 3. PFPP-nano-LC/MS/MS の分析性能

Name	RT (min)	Range (fmol)	Correlation factors	RSD of peak area ^a	LOD ^b (fmol)	Sensitivity improvement ^c	Injected amount ^d (pmol)
UMP	3.0	1-1000	0.996	4.2	0.34	58	1
GMP	3.1	1-1000	0.980	6.0	0.51	26	1
dTMP	3.2	1-1000	0.993	9.1	1.0	45	1
Asp	3.3	10-1000	0.997	3.8	7.3	11	1
Gln	3.5	1-1000	0.998	2.0	1.3	35	1
Ser	3.5	10-1000	0.997	4.6	4.8	7.5	1
Glu	3.5	1-1000	1.000	6.5	0.95	21	1
Asn	3.5	100-1000	1.000	3.7	22	13	1
Cys	3.6	100-1000	1.000	3.7	3.6	15	1
Thr	3.6	1-1000	0.997	2.3	1.3	17	1
Ala	3.6	100-1000	1.000	15	14	7.5	1
Gly	3.6	100-1000	1.000	4.9	38	8.6	1
Pro	3.7	1-1000	1.000	5.9	0.43	27	1
CMP	3.7	0.1-1000	0.992	15	0.56	45	1
His	4.6	1-1000	0.998	12	0.45	68	1
Lys	4.6	10-1000	0.999	15	10	30	1
AMP	4.6	10-1000	1.000	11	1.3	36	1
Arg	5.1	10-1000	1.000	5.4	2.5	10	1
Cytosine	5.1	10-1000	1.000	5.6	4.9	3.1	1
Uridine	5.6	10-1000	1.000	16	3.7	55	1
Guanine	6.2	100-1000	1.000	16	32	3.0	1
GSH	6.2	100-1000	1.000	7.8	15	16	1
Val	6.4	0.1-100	1.000	4.8	0.043	8.3	0.1
Met	7.1	10-1000	0.999	7.3	8.7	7.3	1
Adenine	7.6	10-1000	1.000	6.4	9.2	3.0	1
Cytidine	8.2	0.1-1000	1.000	16	1.5	34	1
Guanosine	10.2	1-1000	1.000	7.5	5.7	9.3	1
GSSG	11.1	10-1000	0.999	7.8	1.1	132	1
Ile	12.0	1-1000	1.000	4.2	1.1	14	1
Thymidine	13.4	10-1000	1.000	2.7	2.3	23	1
Leu	13.4	1-1000	1.000	4.4	0.75	7.3	1
Adenosine	15.1	0.1-1000	1.000	2.4	1.6	13	0.1
Tyr	18.2	10-1000	1.000	7.1	25	10	1
Phe	18.3	1-1000	1.000	2.6	0.020	61	0.1
Trp	22.5	1-1000	0.999	2.1	0.49	35	0.1

^a 分析 ($n = 3$) の再現性。分析した各化合物のモル数は表右列の Injected amount を使用した。

^b LOD, Limit of Detection ($S/N = 3$).

^c (nano-LC/MS で得られた Intensity) \div (semimicro-LC/MS で得られた Intensity).

^d Nano-LC/MS と semimicro-LC/MS の感度比較及び RSD 算出に用いた注入量。

略号 : RT, retention time; UMP, uridine monophosphate; GMP, guanosine monophosphate; dTMP, thymidine monophosphate; Asp, aspartic acid; Ser, serine; Glu, glutamic acid; Asn, asparagine; Cys, cysteine; Thr, threonine; Ala, alanine; Gly, glycine; Pro, proline; CMP, cytidine monophosphate; His, histidine; Lys, lysine; Arg, arginine; Val, valine; Met, methionine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Tyr, tyrosine; Phe, phenylalanine.

構築した PFPP-nano-LC/MS/MS 法で得られた分析性能を表 3 にまとめた。構築したシステムでは、全ての代謝物で良好なピークエリア値の再現性 (RSDs, <16%; average RSDs, 7.2%), 直線性 (R^2 , > 0.980) が得られた。また、構築した PFPP-nano-LC/MS/MS では、10 種の代謝物 (phenylalanine, valine, UMP, proline, histidine, tryptophan, GMP, CMP, leucine, and glutamic acid) において、fmol 以下 (20–950 amol) の検出感度を達成した。さらに、leucine, isoleucine の構造異性体もクロマトグラフィーにおけるベースライン分離により検出可能であった。

次にカラム内径のダウンサイジングによる高感度化の効果を検証するために、内径 2.1 mm カラムによる PFPP-semimicro-LC/MS/MS と内径 0.1 mm のカラムを用いた PFPP-nano-LC/MS/MS で同物質量を注入したときの感度比較を実施した。各分析系の試料の導入量は表 3 のように設定し、カラム長、流速および ESI でのイオン化のパラメーター以外の各種 LC 条件および MRM 条件は同一の条件で実施した。両者の分析系は良好な保持時間およびピークエリア再現性を示したにも関わらず、semimicro-LC/MS/MS においてはノイズレベルがゼロになる場合があり、正確な S/N 値を取得できなかった。そのため、感度比較は同物質量の化合物を分析した時のピーク強度比を用いた。感度比較の結果を表 3 に示した。PFPP-semimicro-LC/MS/MS (2.1 mm i.d.) と比較すると、PFPP-nano-LC/MS/MS (100 μ m i.d.) では、最大で 132 倍、平均 26 倍の感度向上が得られた。以上の結果から、カラム内径のダウンサイジングによる高感度化の効果が実証された。

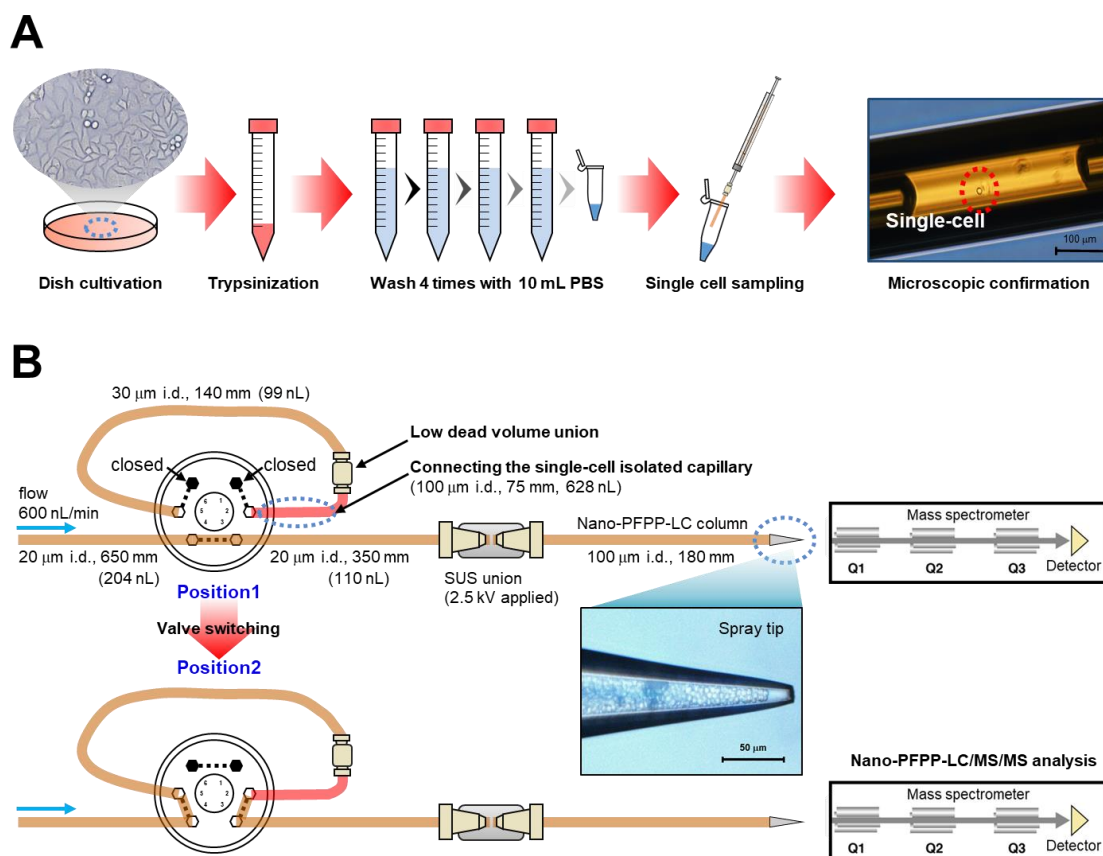


図 2. 単一 HeLa 細胞の単離方法，及び分析システムへの注入方法の概要

(A) 単一 HeLa 細胞の単離方法.

(B) 単一 HeLa 細胞の分析システムへの注入方法.

2-3-3. 単一 HeLa 細胞の単離と nano-LC/MS システムへの注入法の考案

次に構築した PFPP-nano-LC/MS/MS 法をシングルセルメタボロミクスに適用するために，単一 HeLa 細胞の単離方法，及び分析システムへの注入方法を考案した (図 2). フューズドシリカキャピラリー (75 mm in length, 100 µm i.d., 360 µm o.d.) をガスタイトシリンジに接続したナノピペットデバイスを設計し⁴³⁻⁴⁴，キャピラリー内を水で満たした．その後，空気を吸引し，キャリアーとサンプルを分割するエアギャップを作った．その後， 1.0×10^4 cells/mL，すなわち 100 nL 当たり 1 個の HeLa 細胞が存在する細胞濃度の HeLa 細胞-PBS 懸濁液を 100 nL 程度吸引した．吸引したサンプルの漏れ出しを防ぐために空気を吸引し，エアギャップを作った．この方法では任意の細胞を選ぶことはできないが，吸引したサンプルには確率的に 1 個の細胞が含ま

れる．吸引したサンプルを顕微鏡で観察し，1 個の HeLa 細胞がキャピラリー内に単離された場合のみをシングルセル解析用のサンプルと設定した (図 2-A)．

1 細胞を単離した後，直ちに細胞が入ったキャピラリー (75 mm in length, 100 μm i.d., 360 μm o.d.) を PFPP-nano-LC/MS/MS システムのサンプルループに低デッドボリュームユニオンを介して接続した．その後，バルブをポジション 1 からポジション 2 に切り替えることで 1 細胞を PFPP-nano-LC/MS/MS システムに導入した (図 2-B)．バルブ切り替え後に，細胞は酸性移動相 (pH 2.8) に晒され，nano-LC 分析のカラム背圧 (40 MPa) が掛かり，SUS ユニオンにて ESI の電圧 (2.5 kV) が印加される．したがって，システムへの注入操作の直後に，細胞は，細胞膜が破損し，細胞内代謝物抽出物が nano-LC カラムに導入されていると考えられる．さらに，細胞注入操作が完了する 9 分間は水系初期溶媒で送液しているため，保持の強い親水性代謝物はカラム先端での濃縮操作が可能である．また，トリプシン処理からシステムへの注入までのトータルの処理の時間は約 25 分であり，1 細胞サンプリングからシステム注入までの時間は 5 分程度であった．以上の一連のシングルセル単離・注入・破碎・nano-LC カラム先端の濃縮法を基盤とした PFPP-nano-LC/MS/MS 分析法を用いて単一 HeLa 細胞 ($n = 22$) のシングルセルメタボローム解析を実施した．

PFPP-nano-LC/MS/MS により 1 細胞メタボローム解析を実施した結果，単一 HeLa 細胞 ($n = 22$) から合計 18 種の代謝物を同定することに成功した (図 3)．化合物の同定は，標準品と単一 HeLa 細胞でのクロマトグラフィーにおける保持時間と 2 種の MRM transition が一致することに基づいて行った．したがって，PFPP-nano-LC/MS/MS によるシングルセルメタボロミクスでは，標準品化合物と実サンプル間の 2 つの直交的な性質の一致に基づき化合物を同定することが可能であり，これは MSI が定める “level 1 -identified metabolites” の基準を満たしている²²．PFPP-nano-LC/MS は，クロマトグラフィーによる保持時間を代謝物同定の指標として利用できるため同定精度は高い．さらに，PFPP-nano-LC/MS は nano-LC 分離により共雑イオンによるイオン化サプレッション等のマトリックス効果の低減が示唆されることから定量性においても

優れていると考えられる。また、本実験においては、陽イオン性 (例 GSH), 両イオン性 (例 tryptophan), 非荷電代謝物 (例 adenosine), 陰イオン性 (例 dTMP) の全てを同時検出することができた (図 3)。1 細胞メタボロミクスにおいて nano-LC/MS が様々な物性を持つ代謝物の分析に潜在的に優れた方法であることが示唆された。

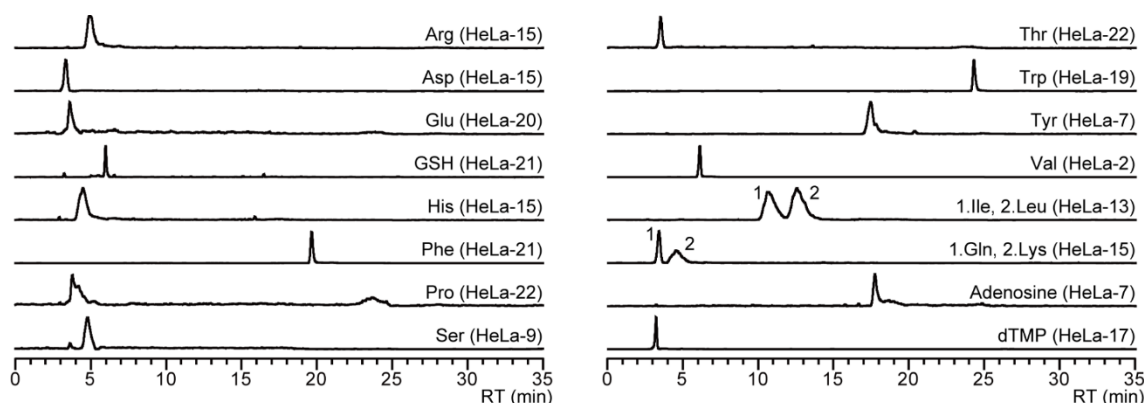


図 3. 単一 HeLa 細胞から検出された代謝物の nano-LC/MS/MS クロマトグラム

単一 HeLa 細胞で得られた MRM クロマトグラム. Ile, Leu 及び Gln, Lys は MRM トランジションが同じであるため、同一 MRM クロマトグラムで表示されている。

2-3-4. PFPP-nano-LC/MS/MS による単一 HeLa 細胞メタボローム分析

単一 HeLa 細胞から検出された代謝物、検出されなかった代謝物について、その理由を考察した。本研究でターゲットにした代謝物を PFPP-nano-LC/MS/MS で得られた LOD の順番に並べ、単一 HeLa 細胞から検出された代謝物と検出されなかった代謝物を図 4 に示した。アミノ酸については、単一 HeLa 細胞から 22 種のうち 16 種を検出することができた。検出されたアミノ酸は、検出感度の高い (LOD の低い) 化合物である傾向がみられた。また、一方で、検出された核酸関連代謝物 (ヌクレオチド, ヌクレオシド, 核酸塩基) は、13 種のうち 2 種のみであった。PFPP-nano-LC/MS/MS で代謝物が検出可能であるかどうかは、細胞内に存在する代謝物量が PFPP-nano-LC/MS/MS の検出限界以上であるかどうかにより決定される。アミノ酸の多くが検出可能であったのに対して、核酸関連代謝物は、アミノ酸と同等感度の代謝物であっても、一部しか検出することができなかった。その理由は、アミノ酸よりも核酸関連代

代謝物の方が細胞内の代謝物量が少ないためであったと考えられる．本研究で構築したカラム内径 100 μm の PFPP-nano-LC/MS/MS 法では，細胞内に比較的高濃度で存在する代謝物を計測できるようになった．細胞内に低濃度で存在する代謝物については，カラム内径をさらに微小化した分析システムにより，計測できるようになる可能性がある．

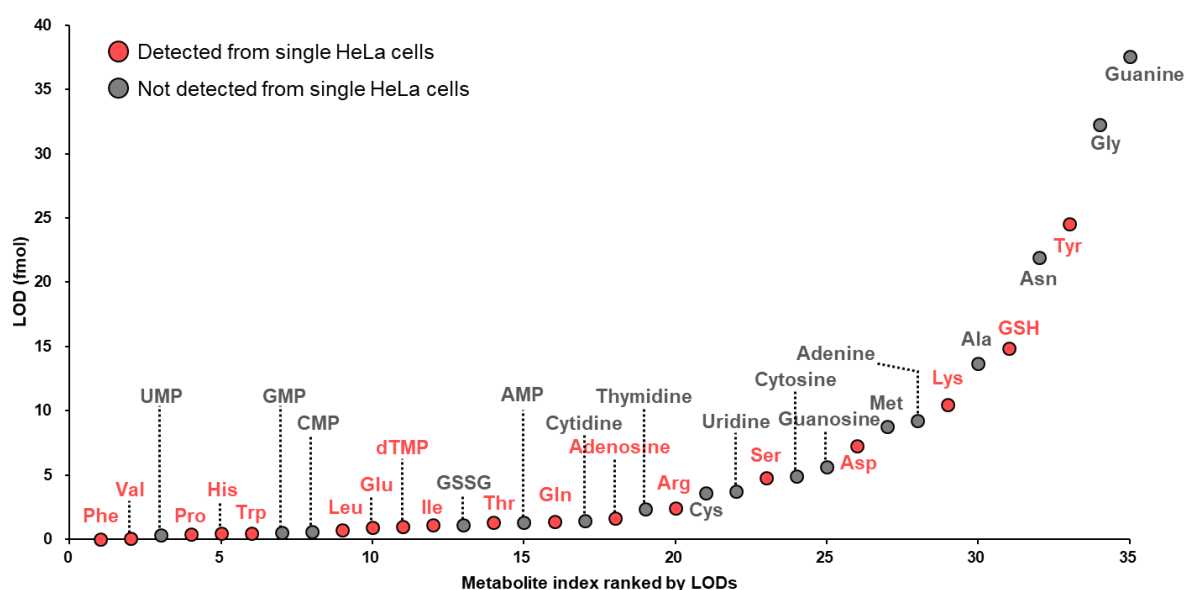


図 4. PFPP-nano-LC/MS/MS の分析感度と検出・不検出代謝物一覧

縦軸には PFPP-nano-LC/MS/MS の LOD，横軸にはターゲットとした代謝物を LOD の順番に並べた時の通し番号を示した．赤色で単一 HeLa 細胞から検出された代謝物，灰色で検出されなかった代謝物を示した．

次に，検出された代謝物が 22 個の単一 HeLa 細胞間でどれくらい異なるかを解析した．まず，22 個の単一 HeLa 細胞について得られた tryptophan のクロマトグラムを図 5 に示した．全ての単一 HeLa 細胞 ($n=22$) で tryptophan を検出することができた．また，tryptophane の細胞あたりの蓄積量は大きく異なっており，細胞の代謝の不均一性が示唆された．また，得られた結果が細胞懸濁液のコンタミネーションではないことを確認するため，ネガティブコントロールとして，HeLa 細胞洗浄後の HeLa 細胞-PBS 懸濁液の上清 (PBS) の分析を行った．また，シングルセル分析間のシステム内

のキャリーオーバーを確認するために、細胞分析直後のブランク (PBS) の分析結果をキャリーオーバー確認用として設定した。その結果、HeLa 細胞-PBS 懸濁液の上清 (PBS) およびブランク (PBS) の両サンプルともに 18 種の代謝物ピークは検出されなかった (図 5)。以上の結果から、得られた親水性代謝物ピークはコンタミネーション等によるアーティファクトではなく、1 細胞由来の代謝物であることが示された。

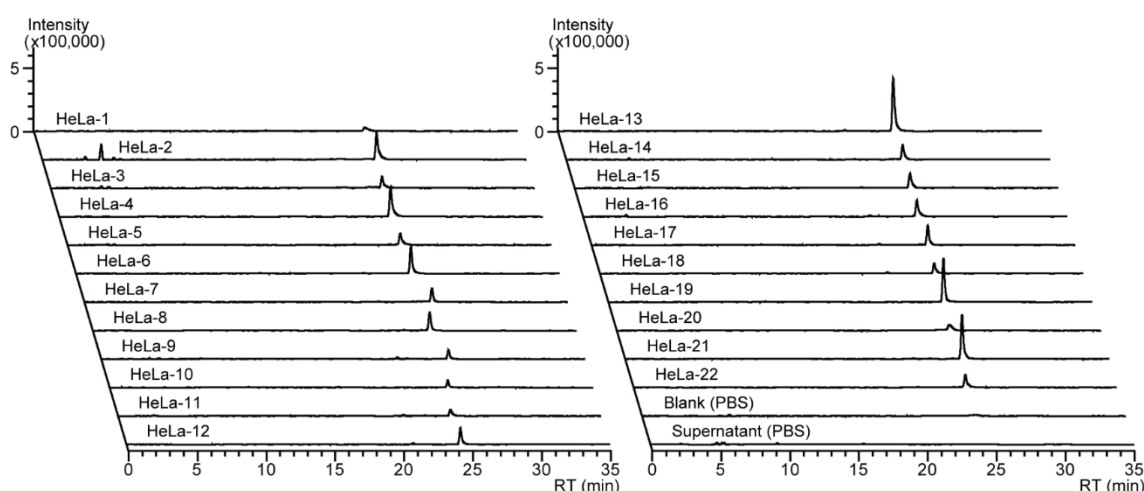


図 5. 22 個の単一 HeLa 細胞の間のトリプトファン不均一性

次に、1 細胞間の各代謝物のばらつきを調査するため、22 個の単一 HeLa 細胞の代謝物データの箱ひげ図を作成した (図 6)。箱ひげ図の作成に使用したデータは補足表 2 に示した。検出された親水性代謝物の中で、最も変動幅が大きかった代謝物は tyrosine であり、平均値から最大で 5.2 倍、最小で 0.15 倍の変動幅が観測された。最も変動幅が小さかった代謝物は proline であり、平均値から最大で 2.0 倍、最小で 0.32 倍の変動幅であった。PFPP-nano-LC/MS/MS 分析システムの精度として、標準品のピークエリア値の再現性は 16%以内であることが分かっている。また、1 細胞が単離できていることを顕微鏡で確認していること、サンプリングは同様に実施していること、ネガティブコントロールでは代謝物が検出されていないことから、分析誤差は最小限に抑えられていると考えられる。本実験で得られた各代謝物のばらつきは、分析誤差よりも大きな細胞状態の違いを捉えたものと考えられる。これらの結果が

ら、培養した HeLa 細胞集団には、1 細胞の代謝物レベルでもヘテロ性が存在していることが示唆された。

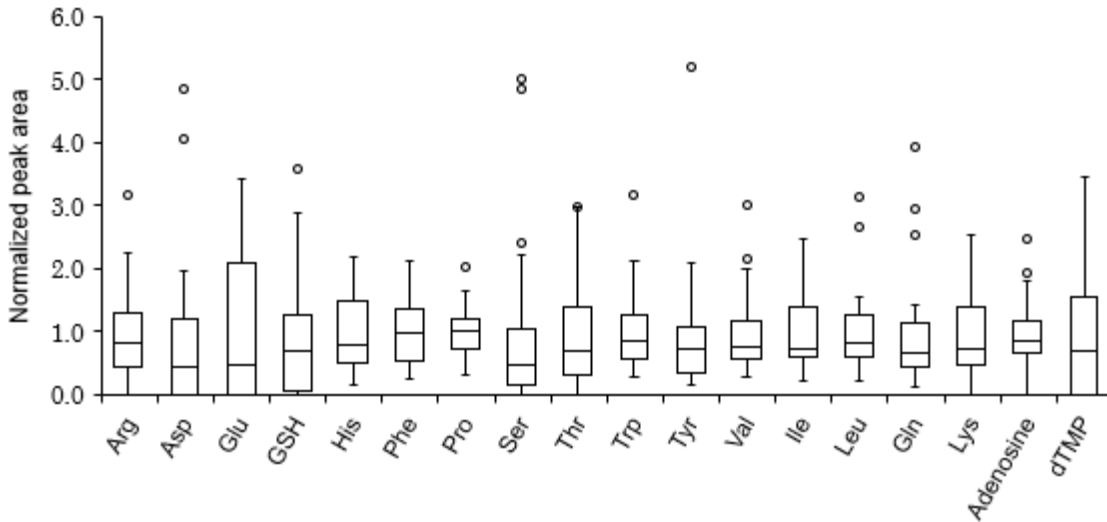


図 6. 22 個の単一 HeLa 細胞で検出された 18 種の代謝物のばらつき

検出されなかった代謝物のピークエリア値は便宜上 0 とした。各代謝物のデータは、平均値で割って補正した。箱ひげ図の作成に使用したデータは補足表 2 に示した。箱ひげ図には特異点のみプロットした。

次に、代謝物ピークエリア値を用いて、HCA を行った (図 7)。分析した 22 個の単一 HeLa 細胞は、特徴的な 3 つのクラスターを形成した (A, B, C)。例えば、クラスター B の HeLa-15 と HeLa-22 のように、類似した代謝物パターンを示す細胞が確認された。この結果から、培養した HeLa 細胞においても、いくつかのサブクラスが存在していることが示唆された。今回の培養細胞を用いた 1 細胞メタボローム結果により観測されたサブクラスは細胞状態の違い、例えば細胞周期の違いあるいはその他のこれまでに知られていない代謝機能の違いを捉えている可能性が示唆された。細胞周期の違いであるかどうかを明らかにするためには、DNA 複製や細胞分裂の様子をリアルタイムで観察可能な Fucci (Fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator) 発現 HeLa 細胞⁴⁵を用いて細胞周期ごとの 1 細胞メタボローム解析を実施する必要がある。

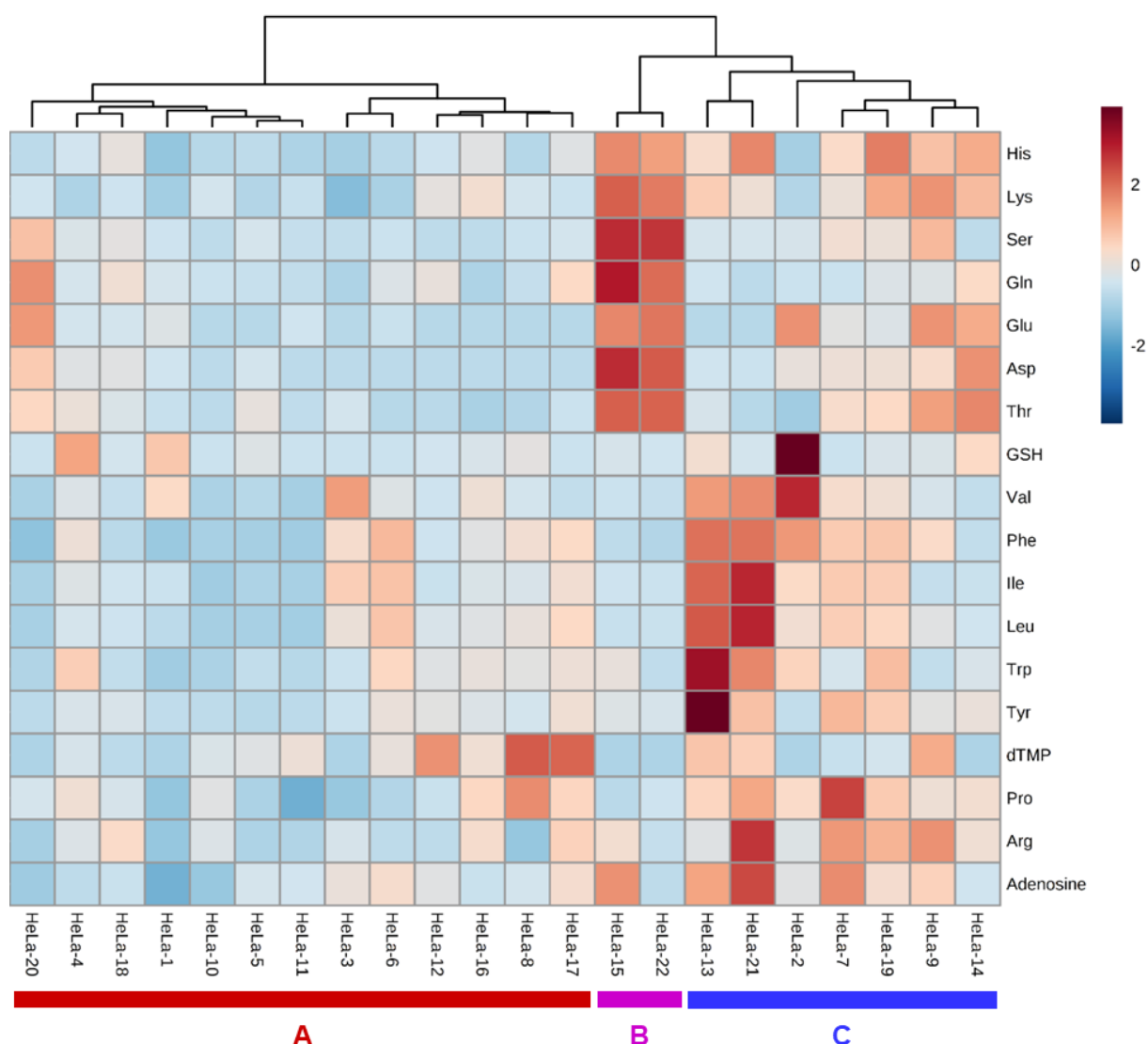


図 7. 代謝物分析結果による 22 個の単一 HeLa 細胞の HCA

単一 HeLa 細胞 ($n = 22$) の代謝物ピークエリア値のデータを使用した。代謝物のピークエリア値は、欠損値を便宜上 0 とした後、それぞれ標準偏差で割ることで分散を 1 とし、さらにそれぞれ平均値を差分することで中心化して補正した。ユークリッド距離・ウォード法でクラスタリングした。縦軸は代謝物、横軸は細胞名 (HeLa-1~HeLa-22) とした。

2-4. 小括

本章では、HeLa 細胞のような典型的な動物細胞のシングルセルメタボロミクスのための高感度 PFPP-nano-LC/MS/MS システムを開発した。PFPP-semimicro-LC/MS/MS と感度を比較することで、開発した PFPP-nano-LC/MS/MS が高感度な分析系であるこ

とを確認した．そして，単一 HeLa 細胞の分析を行うために，単一 HeLa 細胞の単離方法と分析システムへの注入方法を新しく考案した．これにより，合計 22 個の単一 HeLa 細胞を分析することで，合計 18 種の代謝物を同定することに成功した．さらに，正規化した代謝物ピークエリア値で HCA を行うことで，培養した HeLa 細胞集団から取り出した 22 個の単一 HeLa 細胞の間に，代謝レベルで一定の類似度を示すサブクラスが存在することを示した．したがって，典型的な動物細胞（細胞径 10–20 μm ）のような比較的小さな細胞のシングルセルメタボロミクスに nano-LC/MS が利用可能であることを実証した．以上の結果から，開発した PFPP-nano-LC/MS 法は 1 細胞メタボロミクスにおいて有効なツールとして利用できるものと考えられる．

しかし，PFPP-nano-LC/MS/MS 法で検出された親水性代謝物は，限定的であった．例えば，ATP や guanosine triphosphate (GTP) などのリン酸基を複数持つ化合物は本分析法では分離・溶出できないため，そもそも検出が不可能である．また，全般的に，PFPP-LC の親水性代謝物の保持は小さく（カラム担体への保持が弱く，早い時間帯で溶出），結果的にカラム先端での濃縮が困難となり，検出された代謝物数がわずかであったと考えられる．また，PFPP カラムは逆相カラムの一種であり，分析開始時の移動相が水系溶媒である．単離した細胞を MeOH などの有機溶媒と混合するなどして調製したシングルセルサンプル（例えば，溶媒組成 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH} = 1:1$ ）を PFPP-nano-LC/MS/MS システムへ注入すると，ピーク形状が大きく損なわれてしまうため（補足図 2），単離した細胞に有機溶媒を用いて前処理（代謝クエンチ，抽出など）することができなかった．そのため，一度のシングルセル分析毎に生細胞を手動で迅速に単離して分析システムへ注入する必要があるため，連続分析には限界があった．シングルセルメタボロミクスのデータを大量に取得するためには，有機溶媒を含む前処理サンプルを注入可能な LC 手法であることが望ましい．したがって，LC における分離法を再検討する必要があると考えられた．

第三章

単一分析による網羅的メタボローム分析手法の開発

3-1. 緒言

複雑な生体低分子成分の混合物を測定対象とするメタボロミクスでは、クロマトグラフィー質量分析が強力な分析システムとして一般的に用いられている^{24, 28}。第二章では、PFPP-LC/MSを高感度化することでHeLa細胞のシングルセルメタボロミクスを実施できることを実証した。しかしながら、第一章(1-5)と第二章(2-4)で述べたように親水性代謝物のカバレッジはLCの性能に依存する。汎用的なメタボロミクスでは、CE/MS、イオンペア逆相液体クロマトグラフィー質量分析 (ion-pair reversed phase liquid chromatography mass spectrometry, ion-pair RPLC/MS)、逆相液体クロマトグラフィー質量分析 (reversed phase liquid chromatography, RPLC/MS)、親水性相互作用液体クロマトグラフィー質量分析 (hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry, HILIC/MS)、イオンクロマトグラフィー質量分析 (ion chromatography mass spectrometry, IC/MS) などが利用されている。表4に各種分析システムの特徴をまとめた⁴⁶⁻⁵¹。

表4. メタボロミクスで一般的に使用される分析方法の特徴

	CE/MS	Ion-pair RPLC/MS	RPLC/MS (e.g., PFPP)	HILIC/MS	IC/MS
必要な分析回数 ^a (スループット)	+	+	+++	+++	+
移動相の 添加剤 (電解質) ^b	+++ (揮発性)	+	+++ (揮発性)	+++ (揮発性)	+++ (サプレッサー使用可)
試料溶媒 ^c	水	水	水	水/有機溶媒	水
保持 (泳動) 時間の 再現性	++	+++	+	+	+++
保持の強さ ^d	+++	+++	+	++	+++
異性体分離能	+++	++	++	++	+++
網羅性	++	++	++	++	++

それぞれの分析手法を+, ++, +++の三段階で評価した。

^a 陽イオン, 陰イオンの同時分析可能な方法を+++, 2度分析必要な方法を+とした。

^b 質量分析と相性の良い揮発性添加剤を使用する方法を+++, それ以外を+とした。また, IC/MS はサプレッサーで塩を取り除けるため+++とした。

^c 試料を溶解させる溶媒のこと。

^d 親水性代謝物の保持の強さ。

例えば, RPLC では, 疎水性相互作用により化合物を保持分離するため親水性代謝物はほとんど保持されない。そのため, イオンペア試薬と呼ばれる添加剤を移動相に添加し, 分析対象物の電荷を中性化させ, さらに疎水性を上げることで逆相固定相への保持を強くする ion-pair RPLC が考案された。例えば, 陰イオン性代謝物を測定対象物とした場合, 対イオンであるトリブチルアミンをイオンペア試薬として使用することで, 上記の原理に基づき分離分析が達成される^{51,52}。また, アルキル官能基の固定相にイオン交換リガンドを混ぜ埋め込むことで, 化合物の保持に疎水性相互作用に加えてイオン性相互作用を混合的にデザインしたミックスモード RPLC なども開発されている⁵³。逆相モードにおいて, 二次的にイオン性相互作用を取り入れることが高極性化合物を保持・分離するための一つの鍵と考えられる。しかしながら, ion-pair RPLC では高濃度に移動相に添加したイオンペア試薬による装置の汚染が問題となり, ミックスモード RPLC では, イオン性相互作用により吸着した化合物を溶出させるために必要な塩濃度を有機溶媒に溶かすことができないといった問題がある²⁸。

HILIC は, 低極性移動相と極性固定相表面の水和層との間で生じる分析物の親水性分配相互作用によって極性化合物を分離する極性化合物の分析法として考案された分離モードである。近年, 様々な固定相が開発され, 親水性相互作用に加えてイオン性相互作用が混合的に作用することで高極性化合物の保持・分離が改善されてきた^{54,55}。例えば, Christopherson らは正電荷を持ったアミノシリカカラムでは, HILIC モードと陰イオン交換 (anion exchange, AEX) モードが同時にかつ混合的に作用することを提示し, これを高極性の陰イオン性代謝物の分析に利用した⁵⁶。ここで, イオン交換モードとは, イオン性相互作用により固定相 (+/-) に強く保持され

た分析物 (-/+) を，移動相中の塩 (-/+) を固定相に競合的に相互作用させることにより溶出させる方法である．また，Idborg らは，親水性分配相互作用に加えて，陽イオン性，および陰イオン性代謝物の両方に対してイオン性相互作用が働くようにデザインされた，ZIC-HILIC で知られる双性イオン修飾シリカカラムを用いて，ラット尿中のメタボローム分析を行った⁵⁷．HILIC モードにおいても，二次的にイオン性相互作用を取り入れることが高極性化合物の保持・分離性能を向上させるための鍵と考えられる．しかしながら，代謝物のピーク形状に影響する親水性分配および，イオン性吸着の移行に影響を与える要因（分離メカニズム）については，数種類の極性化合物を対象とした検討に留まっており，広くメタボロームを対象とした検討はほとんど為されていない^{58,59}．未だ複雑な化合物の混合物であるメタボロームを効率よく分離分析するための戦略は提示されていないと言える．すなわち，従来の LC/MS を基盤とした単一分析法では，網羅的な親水性代謝物の測定を達成するには至っていない^{60,61}．この最大の要因は，物理化学的性質が多様な親水性代謝物を包括的に保持・分離することが可能なクロマトグラフィーの手法が存在しないことにある⁶²．

一方で，親水性代謝物と固定相の間のイオン性相互作用の強さを決定する要素として，分析物の電荷状態と固定相極性官能基の電荷状態が挙げられる．分子の電荷状態はこれら 2 つを取り巻く移動相中のプロトン濃度 (pH) に依存して決定されるため，移動相 pH はイオン性相互作用の強さを決定する重要な要素である．また，イオン性相互作用により吸着した化合物は，移動相中の塩によるイオン交換作用によって溶出するため，塩の種類と濃度も吸着した化合物の溶出に重要な要素である．現在，Human Metabolome Database⁶³ や PubChem⁶⁴ といった大規模化合物データベースや，ChemAxon⁶⁵ などの物性予測ソフトウェアが利用可能になったおかげで，第二章 (2-3-1) で実施したように測定対象とするメタボロームの物性 (pK_a, pK_b, logP_{ow}, etc.) にアクセスできるようになった．これらの物性と照らし合わせて，物性範囲の幅広いメタボロームの分離系を再評価する価値がある．

そこで第三章では、分離系の再評価を通して、親水性メタボロームを単一手法で包括的かつ効率よく分離することのできる新たな分析法を開発することを目的とした。

3-2. 実験材料と実験方法

3-2-1. 化学薬品と試薬

LC/MS 用蒸留水, LC/MS 用アセトニトリル, LC/MS 用メタノールは関東化学から購入した。高速液体クロマトグラフ用特製試薬クロロホルム, アンモニア水 (28%) はナカライテスクから購入した。LC/MS 用酢酸, LC/MS 用重炭酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬から購入した。LC-MS 用酢酸アンモニウムは Merck から購入した。標準物質として用いた非同位体標識化合物は Merck, ナカライテスク, Honeywell International から購入した。同位体標識化合物は大陽日酸株式会社 (東京) が合成したものを入手した。

3-2-2. 細胞培養と細胞回収

HeLa 細胞 (ATCC) は 100 mm 細胞培養ディッシュ (Corning) で 10% (v/v) のウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific), 1% (v/v) のペニシリン (富士フィルム和光純薬) を添加した DMEM で CO₂ 濃度 5%, 37°C の条件で培養した ($n = 6$)。培養した HeLa 細胞はおよそ 80%コンフルエントの状態になったとき, 回収処理を実施した ($n = 5$)。回収時の DMEM 組成を揃えるために, 回収前に DMEM を交換し, 約 1 時間培養した。培地上清を吸引除去後, 氷上で, 4°C に冷やした 10 mL の PBS (Thermo Fisher Scientific) で 3 回洗浄した。その後, -30°C に冷やした 1 mL の MeOH をディッシュに加え, スクレーピング処理により添加した MeOH を 2 mL のエッペンチューブに全量回収した。回収したサンプルは抽出操作まで -80°C で保管した。また, 回収した細胞数は同バッチ, 同条件で培養した複製ディッシュの細胞数を全自動セルカウンター (アズワン株式会社, 大阪) を用いてカウントした ($n = 1, 3.91 \times 10^6$ cells)。

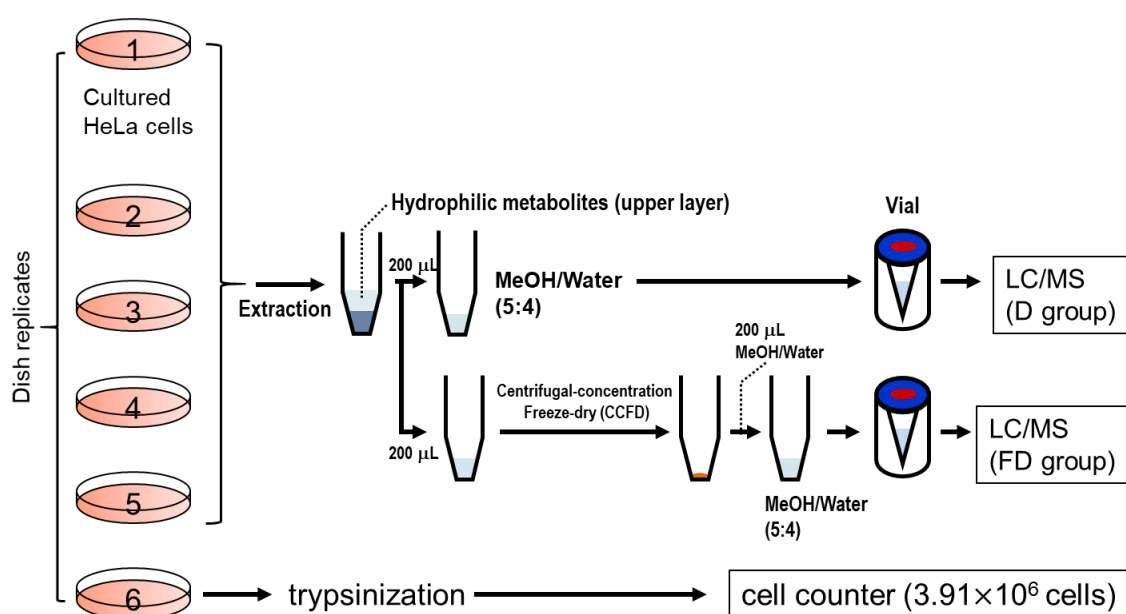


図 7. 調製した HeLa 細胞サンプルの概要

3-2-3. 代謝物抽出

1 mL の MeOH クエンチサンプルの入った 2 mL エッペンチューブに 400 μL の CHCl_3 を添加し、1 分間のボルテックス処理と 5 分間の超音波処理を行った。その後、4°C、16,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した。上清 700 μL を新しい 2.0 mL エッペンチューブに移し、300 μL の CHCl_3 および 400 μL の H_2O を添加し、ボルテックスにより攪拌した。その後、4°C、16,000 $\times g$ で 3 分間遠心分離した。上相 500 μL を新しいエッペンチューブに移し、Direct 群 (D)、Freeze Dry 群 (FD) の 2 つに分割した (D 群は 200 μL 、FD 群は 200 μL)。FD 群は、遠心エバポレーターで MeOH を除去し (約 20 分)、液体窒素にて凍結させた後、一晩凍結乾燥により乾固させた。FD 群は 200 μL の $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (4:5 v/v) で再溶解させた。D 群、FD 群はそれぞれ HPLC バイアルに移し、LC/MS 分析まで -80°C で保管した。以上の操作の概略図は図 7 に示した。

3-2-4. Semimicro-LC/MS による LC カラムの比較実験

Semimicro-LC/MS 分析 (本章では全て semimicro-LC を使用しており、以下

semimicro-は省略する) は Prominence-i LC-2030 HPLC system (島津製作所) とヒーティング ESI ユニットと LCMS-8060 (島津製作所) を接続したシステムを用いて実施した. LC システムにはバイナリーポンプ, カラムオーブン, オートサンプラーを装備した. 逆相カラムとして, Inertsil ODS-4, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (ジーエルサイエンス株式会社, 東京), InertSustain AQ-C18, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (ジーエルサイエンス), Inertsil ODS-EP, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (ジーエルサイエンス), CAPCEL PAK ADME, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (株式会社資生堂, 東京), COSMOSIL 5PBr, 5 μm , 2.1 mm \times 150 mm (ナカライテスク), Discovery HSF5, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (Merck), Wakopak Fluofix, 3 μm , 2.0 mm \times 150 mm (富士フイルム和光純薬), Scherzo SS-C18, 3 μm , 2.0 mm \times 150 mm (インタクト株式会社, 京都), Scherzo SM-C18, 3 μm , 2.0 mm \times 150 mm (インタクト), Scherzo SW-C18, 3 μm , 2.0 mm \times 150 mm (インタクト) の合計 10 種類を使用した. 逆相モードでは, (i) A: 0.1% (v/v) ギ酸水溶液, B: 0.1% (v/v) ギ酸添加アセトニトリル, (ii) A: 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液, B: 95%アセトニトリル-5%5 mM 酢酸アンモニウム水溶液の 2 つの条件を使用した. 10 種のカラムと 2 種の移動相の組み合わせで合計 20 条件の検討を実施した. グラジエント条件は次のように設定した: $t = 0\text{--}5$ min, 0% (B); $t = 5\text{--}20$ min, 0–100% (B); $t = 20\text{--}25$ min, 100% (B); $t = 25\text{--}25.1$ min, 100–0% (B); $t = 25.1\text{--}30$ min, 0% (B). 流速は 25 分の間は 0.25 mL/min, 25–30 分の間は 0.4 mL/min で分析した. カラム温度は 40°C, 注入量は 1 μL に設定した. HILIC カラムでは, Inertsil SIL-100A, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (ジーエルサイエンス), Inertsil DIOL, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (ジーエルサイエンス), iHILIC-Fusion (P), 5 μm , 2.1 mm \times 150 mm (Hilicon, Umea, Sweden), ZIC-pHILIC, 5 μm , 2.1 mm \times 150 mm (Merck), DAICEL DCpak PTZ, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (株式会社ダイセル, 大阪), DAICEL DCpak P4VP, 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (ダイセル), 試作アミノ基混合ポリマーカラム (GL-HilicAex と命名), 3 μm , 2.1 mm \times 150 mm (日立化成テクノサービス株式会社, 茨城) の 7 種類を使用した. HILIC モードでは, A: 95% 5 mM 炭酸アンモニウム-5%アセトニトリル, B: 95%アセトニトリル-5%5 mM 炭酸アンモニウム水溶液とした. 28%アンモニア水と酢酸を pH 調整剤と

して使用し、移動相の pH は 3.6, 7.0, 9.8 の 3 条件を使用可能な範囲で検討した。3 種のカラムと 3 種の移動相 pH 条件の組み合わせで合計 7 条件の検討を行った。グラジエント条件は次のように設定した: $t = 0-5$ min, 100% (B); $t = 5-20$ min, 100-60% (B); $t = 20-21$ min, 60-0% (B); $t = 21-27.5$ min, 0% (B); $t = 27.5-28$ min, 0-100% (B); $t = 28-35$ min, 100% (B)。流速は 25 分の間は 0.25 mL/min, 25-35 分の間は 0.4 mL/min で分析した。カラム温度は 40°C, 注入量は 1 μ L に設定した。試料濃度は, Valine と Adenosine は 0.1 μ M, それ以外は 1 μ M とした。

3-2-5. ターゲット LC/MS/MS 解析

Nexera X2 (島津製作所) および ESI が接続された三連四重極型質量分析計 LCMS-8060 (島津製作所) からなる分析システムにより, MRM を用いたターゲット LC/MS/MS 解析を実施した。オートサンプラーのニードルシールは耐塩基性用に変更した。ESI は正負イオン化切替を適用し, スプレー電圧はポジティブモードのとき 4.0 kV, ネガティブモードのとき -3.0 kV とした。その他の質量分析条件として, ネブライザーガス流量は 2 L/min, ヒーティングガス流量は 10 L/min, ドライガス流量は 10 L/min, ヒートブロック温度は 400°C, DL 温度は 250°C とした。測定は MRM モードを使用した。MRM 条件は標準化合物のフローインジェクション分析により, それぞれ最適化した (補足表 3)。

まず, LC 条件の検討・最適化のために, 標準品化合物を測定した。測定した標準品化合物とその濃度は Valine, Adenosine は 0.1 μ M, その他は 1 μ M とした。注入量は 1 μ L とした。移動相として, 水 (A), アセトニトリル (B), を使用した。水系移動相 A には, 添加剤を加えた。添加剤としては, 酢酸アンモニウムあるいは重炭酸アンモニウムを使用した。添加濃度として, 酢酸アンモニウムは 10 mM, 20 mM, 40 mM の 3 条件, 重炭酸アンモニウムは 10 mM, 20 mM, 40 mM の 3 条件, また, 酢酸アンモニウムおよび重炭酸アンモニウムの両方を 20 mM ずつ加える条件を検討した。移動相の pH は 28%アンモニア水, あるいは酢酸で調整し, 特別記載がない限りは pH 9.8

となるように調整した。LC カラムとして、Inertsil SIL-100A, 3 μ m, 2.1 mm \times 150 mm (ジーエルサイエンス), Inertsil NH2, 3 μ m, 2.1 mm \times 150 mm (ジーエルサイエンス), iHLIC-Fusion (P), 5 μ m, 2.1 mm \times 150 mm (HILICON), ZIC-pHILIC, 5 μ m, 2.1 mm \times 150 mm (Merck), GL-HilicAex, 3.6 μ m, 2.1 mm \times 150 mm (日立化成テクノサービス) を使用した。また、固定相アミノ基が代謝物ピークに及ぼす効果を評価するため、非修飾ポリマーカラムとして GL-HilicAex bare polymer, 3.6 μ m, 2.1 mm \times 150 mm (日立化成テクノサービス), スペーサ修飾ポリマーカラムとして GL-HilicAex Polymer ep-OH, 3.6 μ m, 2.1 mm \times 150 mm (日立化成テクノサービス) を試作して使用した。グラジエント条件は次のように設定した: $t=0-0.5$ min, 95% (B); $t=0.5-15.5$ min, 95-40% (B); $t=15.5-16.5$ min, 40-0% (B); $t=16.5-26.5$ min, 0% (B); $t=26.5-27.5$ min, 0-95% (B); $t=27.5-35$ min, 95% (B)。流速は 0.40 mL/min, カラム温度は 40°C に設定した。

次に、HeLa 細胞抽出物を測定した。移動相は 40 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 pH 9.8 (A), アセトニトリル (B) を使用した。注入量は 5 μ L とした。カラムは GL-HilicAex を使用し、グラジエント条件、流速、カラム温度は前述と同条件とした。データ解析は全て LabSolutions version 5.91 (島津製作所) を用いて実施した。

3-2-6. ノンターゲット LC/MS/MS 解析

Nexera X2 (島津製作所) および ESI 室が接続された高分解能四重極オービトラップ型質量分析計 Q Exactive plus (Thermo Fisher Scientific) からなる分析システムにより、HeLa 細胞抽出物のノンターゲット LC/MS/MS 解析を実施した。ESI は正負イオン化切替を適用し、ESI スプレー電圧はポジティブモードのとき 2.5 kV, ネガティブモードのとき -2.5 kV とした。その他の質量分析条件として、シースガス流量は 40 arb, Aux ガス流量は 10 arb, キャピラリー温度は 275°C, S-レンズレベルは 50, ヒーター温度は 425°C, 質量分解能は 70,000, Automatic gain control ターゲット (C トラップを満たすイオンの数) は 1,000,000, 最大イオン溜め込み時間は 200 ms, スキャンレンジは 100-700 (m/z) とした。

3-3. 結果と考察

3-3-1. MRM の最適化と化合物情報の取得

第二章と同様に，全てのターゲット分析は，感度と選択性の高い QqQMS による MRM 法を用いた．合計 397 種の MRM 条件は，標準品化合物のフローインジェクション分析によって最適化し，最大 2 つのトランジションを設定した (補足表 3)．

LC 条件の比較評価実験では，アミノ酸，アミン，核酸塩基，ヌクレオシド，ヌクレオチド (ヌクレオシドリン酸)，有機酸を含む 44 種の親水性代謝物を指標とした．GL-HilicAex カラムを用いたメタボローム分離条件の検討では，ターゲットにヌクレオシド二リン酸，ヌクレオシド三リン酸，補酵素などを加えて合計 52 種類の代謝物についてターゲット分析を行った．分析した化合物の物性情報 ($\log P_{ow}$, 最も強い酸性 pK_a , 2 番目に強い pK_a , 最も強い塩基性 pK_b , 2 番目に強い pK_b 等) として，PubChem⁶⁴ 化合物データベースで利用可能であった実験値，あるいは，ChemAxon 物性予測ソフトウェアで計算した予測値を表 5 にまとめた．ただし， $\log P_{ow}$ は，予測値よりも実験値の方が正確に物性を反映していると考えられるため，実験値がデータベースに登録されている場合は実験値を優先して記載した．さらに，これらの化合物を，pH 7.0 における電荷特性により，非荷電化合物 (uncharged)，陽イオン性 (cationic)，両イオン性化合物 (zwitterionic)，陰イオン性化合物 (anionic) に分類した (表 5)．これらの化合物情報は，3-3-3.以降のクロマトグラフィー条件の考察に利用した．

表 5. 化合物の物性情報と電荷特性の分類

Name	$\log P_{ow}$	pK_{a-1}	pK_{a-2}	pK_{b-1}	pK_{b-2}	Group
Adenine	-0.09	10.01		3.51		Uncharged
Adenosine	-1.05	12.06	13.43	3.79	-0.96	Uncharged
Cytidine	-2.51	12.16	13.47			Uncharged
Cytosine	-1.73	9.71				Uncharged
Guanine	-0.91	8.11	11.06	1.46		Uncharged
Guanosine	-1.90	11.49	12.18	2.86	-0.03	Uncharged
Thymidine	-1.12	9.69	13.45			Uncharged
Uracil	-1.07	8.59	13.30			Uncharged
Uridine	-1.98	9.44	12.22			Uncharged
Arg	-4.20	2.50		11.86	8.73	Cationic

Lys	-3.05	2.81		9.84	9.03	Cationic
Propylamine	0.48			9.77		Cationic
Ala	-2.85	2.56		9.07		Zwitterionic
Asn	-3.82	2.11		8.07		Zwitterionic
Gln	-3.64	2.25		8.91	-1.51	Zwitterionic
His	-3.32	1.97	12.53	9.03	6.34	Zwitterionic
Ile	-1.70	2.86		9.17		Zwitterionic
Leu	-1.05	2.86		9.11		Zwitterionic
Met	-1.87	2.62		9.09		Zwitterionic
Phe	-1.38	2.56		9.04		Zwitterionic
Pro	-2.54	2.05		10.83		Zwitterionic
Ser	-3.07	2.14	14.65	8.55		Zwitterionic
Thr	-2.94	2.31	14.44	8.61		Zwitterionic
Trp	-1.06	2.63		8.99		Zwitterionic
Tyr	-2.26	2.11	9.53	8.79		Zwitterionic
Val	-2.26	2.79		9.18		Zwitterionic
Ace-CoA	-6.07	0.82	1.86	4.84		Anionic
ADP	-4.83	1.89	2.32	4.74	-0.96	Anionic
AMP	-3.10	1.37	6.18	3.78	-0.96	Anionic
Asp	-3.89	1.83	5.07	9.2		Anionic
ATP	-5.50	0.90	2.56	4.92		Anionic
CDP	2.44	1.89	3.26			Anionic
Cit	-1.32	3.11	4.66			Anionic
CMP	-2.92	1.37	6.16			Anionic
CoA	-5.91	0.82	1.86	4.84		Anionic
CTP	-3.76	1.06	2.62			Anionic
dTDP	-1.66	1.89	3.26			Anionic
dTMP	-1.24	1.38	6.16			Anionic
dTTP	-2.09	1.06	2.62			Anionic
FAD	4.78	1.86	2.97	4.88	0.72	Anionic
FMN	-1.20	1.70	5.79	0.69		Anionic
Fum	-0.04	3.40	4.22			Anionic
GDP	-3.22	1.77	2.91	1.83	1.06	Anionic
Glu	-3.69	1.99	4.27	9.12		Anionic
GMP	-2.71	1.37	6.16	2.75	-0.14	Anionic
GTP	-3.36	0.71	2.57	2.39	1.14	Anionic
Mal	-1.26	3.25	5.09			Anionic
NAD	-9.96	1.86	2.97	4.92	-1.71	Anionic
NADP	-10.61	0.66	1.86	4.80	1.71	Anionic
UDP	-2.96	1.89	3.26			Anionic
UMP	-2.54	1.37	6.16			Anionic
UTP	-3.36	1.06	2.62			Anionic

pK_{a-1} は最も酸性度の強い, pK_{a-2} は 2 番目に酸性度の強い, pK_{b-1} は最も塩基性度の強い, pK_{b-2} は 2 番目に塩基性度の強いプロトンドナーあるいはアクセプターの解離定数. 化合物は, 非荷電 (uncharged), 陽イオン性 (cationic), 両イオン性 (zwitterionic), 陰イオン性 (anionic) に分類した.

略号 : Ace-CoA, acetyl-coenzyme A; CDP, cytidine diphosphate; Cit, citric acid; CoA, coenzyme A;

CTP, cytidine triphosphate; dTDP, thymidine diphosphate; dTTP, thymidine triphosphate; FAD, flavin adenine dinucleotide; FMN, flavin mononucleotide; Fum, fumaric acid; GDP, guanosine diphosphate; Mal, Malic acid; UDP, uridine diphosphate; UTP, uridine triphosphate.

3-3-2. 親水性メタボローム解析に最適なカラムおよび分離条件の選定

まず、選定した LC カラムの性能を評価するために、アミノ酸、アミン、核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド (ヌクレオシドーリン酸)、有機酸を含む 44 種の重要代謝物を分析した。LC 性能の比較法として、それぞれの LC 条件で得られた代謝物のクロマトグラムをスコア化して比較する方法がある⁶⁶⁻⁶⁷。本博士論文では、スコアの基準は以下のように設定し、各 LC 条件の比較を行った。①ボイドボリューム域よりも長くカラムに保持される場合に 1 点加点する。ただしボイドボリューム域は、最密充填カラム (充填率 74%) と中空カラムを溶質が通過する時間とした (流速 0.25 mL/min のとき、内径 2.0 mm のカラムでは $1.39 < t_0 < 1.88$, 内径 2.1 mm のカラムでは $1.54 < t_0 < 2.08$)。②5 min よりも長くカラムに保持されている場合に 1 点加点する。③ピーク幅が 1 min 以下である場合に 1 点加点する。④ピーク幅が 3 min 以上である場合に 1 点減点する。⑤ピーク幅が 5 min 以上である場合にさらに 1 点減点する。これらの 5 つの基準を満たすかどうかの組み合わせにより、9 つのクロマトグラムのパターンが 3 点満点でスコア化される。9 つのクロマトグラムのパターンとその時のスコアの典型例を図 9 に示した。ここでは、3 点のものを “good”, 2 点のものを “fair”, 1 点のものを “acceptable”, 0 点のものを “not detected or poor” と分類した。全ての条件と代謝物のスコアを、3 点を黄色、2 点を緑色、1 点を青色、0 点を灰色として、図 10 に示した。

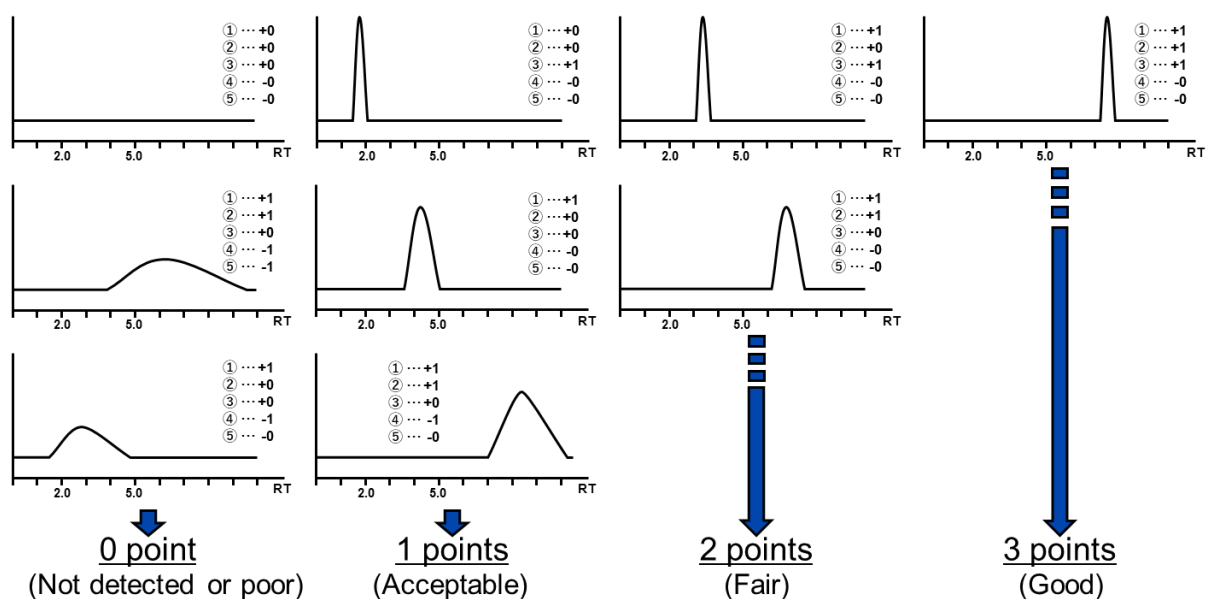


図 9. クロマトグラムのスコア化の例

基準は以下の通り．①ボイドボリューム域よりも長くカラムに保持される場合に 1 点加点．ボイドボリューム域は、最密充填カラム（充填率 74%）と中空カラムを溶質が通過する時間．②5 min よりも長くカラムに保持されている場合に 1 点加点．③ピーク幅が 1 min 以下である場合に 1 点加点．④ピーク幅が 3 min 以上である場合に 1 点減点．⑤ピーク幅が 5 min 以上である場合にさらに 1 点減点．

RPLC カラムに対してはイオン交換マルチモードカラムである SS-C18 を除いてギ酸添加条件の方が全体的に高いスコアが得られた．逆相カラムの多くでギ酸添加が有効であるが，SS-C18 のような強い静電相互作用を持つカラムについては酢酸アンモニウム添加が有効であることが示唆された．また，HILIC カラムでは，3 点になった化合物が多かった．一方で 0 点となった化合物も多かった．例えば，アミン類では RPLC カラムで検出された濃度であっても HILIC カラムでは検出されなかったため 0 点となり，ヌクレオチドと有機酸ではピークがブロードになってしまったため 0 点となることがあった．iHILIC, ZIC-pHILIC の結果から pH の影響を見ると，ピーク形状が塩基性移動相条件で比較的シャープになったため，全体的に点数が高くなる傾向が見られた．しかしながら，特筆すべきは，アミノ基混合ポリマーカラム (GL-HilicAex) を塩基性移動相条件で使用した時に，44 種の全ての代謝物について強い保持と良好なピーク形状が得られたことであった．そこで，このアミノ基混合ポリマーカラムに

着目し，さらに LC 条件を最適化することでヌクレオシド三リン酸などの強い陰イオン性化合物の分析にも測定対象を拡張可能かどうか調査することにした．

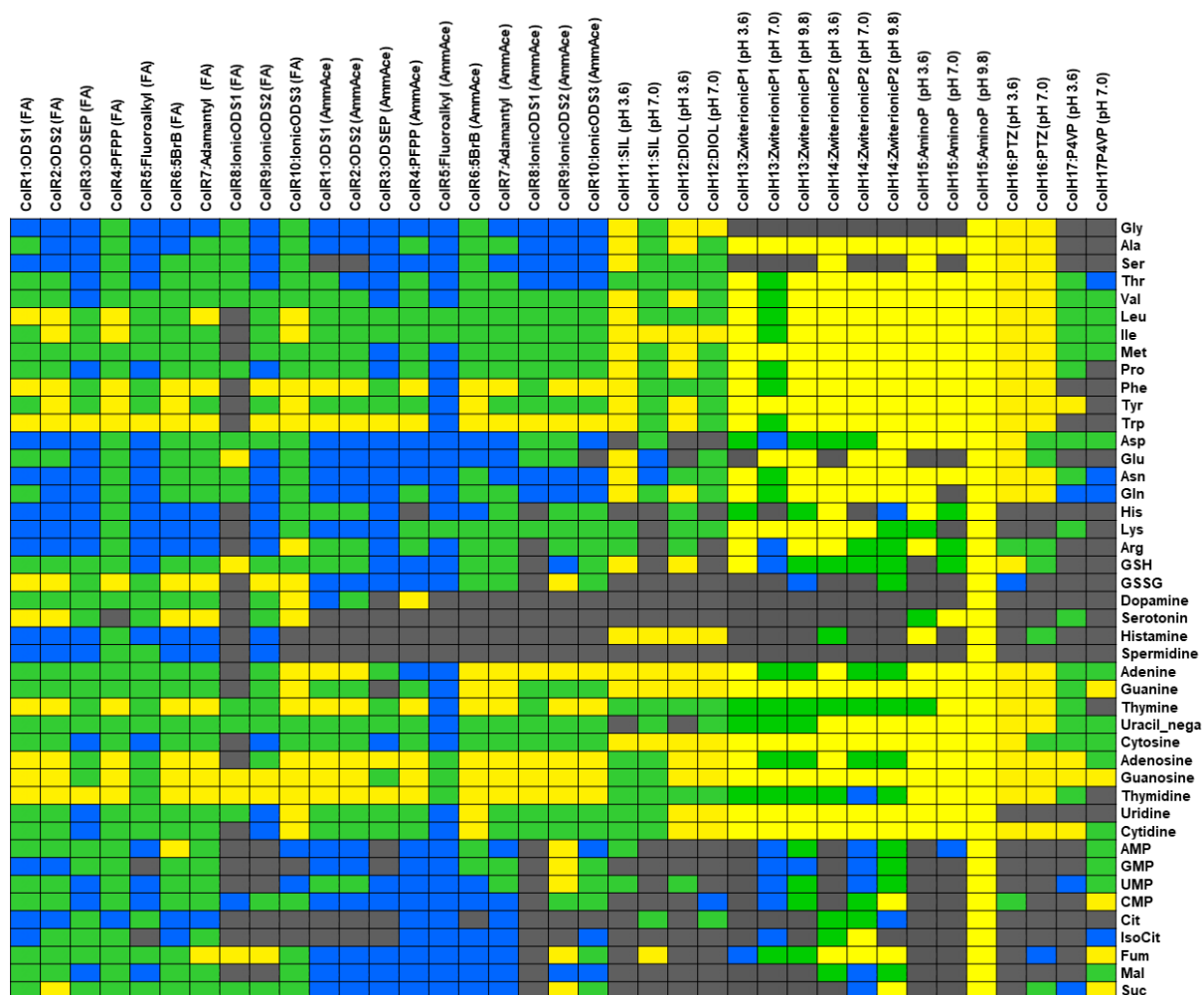


図 10. LC 条件のスコア化によるスクリーニング結果

縦軸には化合物、横軸には LC 条件を示した。ColR は逆相カラムに分類されるカラムに、ColH は HILIC カラムに分類されるカラムの接頭字として用いた。ColR1:ODS1 は Inertsil ODS-4, ColR2:ODS2 は InertSustain AQ-C18, ColR3:ODSEP は Inertsil ODS-EP, ColR4:PFPP は Discovery HSF5, ColR5:Fluoroalkyl は Wakopak Fluofix, ColR6:5BrB は COSMOSIL 5PBr, ColR7:Adamantyl は CAPCEL PAK ADME, ColR8:IonicODS1 は Scherzo SS-C18, ColR9:IonicODS2 は Scherzo SM-C18, ColR10:IonicODS3 は Scherzo SW-C18, ColH11:SIL は Inertsil SIL-100A, ColH12:DIOL は Inertsil DIOL, ColH13:ZwitterionicP1 は iHILIC, ColH14:ZwitterionicP2 は ZIC-pHILIC, ColH15:AminoP は GL-HilicAex, ColH16:PTZ は DAICEL DCpak PTZ, ColH17:P4VP は DAICEL DCpak P4VP を指す。括弧内は移動相条件を指し、FA は 0.1%ギ酸添加条件、AmmAce は 5 mM 酢酸アンモニウム添加条件を指す。HILIC 条件は全て 5 mM の重炭酸アンモニウムを添加条件であり、調製した水系移動相の pH は括弧に示した。黄色は 3 点、緑色は 2 点、青色は 1 点、灰色は 0 点を表す。

略号：IsoCit, isocitric acid; Suc, succinic acid.

3-3-3. アミノ基混合ポリマーカラムの LC 条件の最適化

アミノ基混合ポリマーカラムを用いて、表 5 にある 52 種類の化合物に測定対象を拡張し、水系移動相に混合する添加剤の条件を検討した。10 mM の酢酸アンモニウム添加条件 (pH 9.8) では、非荷電・陽イオン性化合物と両イオン性化合物の全ての化合物についてシャープなピークでの溶出が確認された。一方で、この条件では、ほとんどの陰イオン性化合物が溶出しなかった。そこで添加剤種として酢酸アンモニウムと重炭酸アンモニウム、および、それぞれの添加濃度条件を検討して、陰イオン性化合物を溶出させることができる条件を調査した。その結果、各条件で得られたそれぞれの化合物の保持時間を補足表 4 に示し、代表的な化合物のクロマトグラムを図 11 に示した。

添加剤の検討実験では、2 つの結果が読み取れた。1 つ目は、塩濃度を上げると両イオン性・陰イオン性化合物の溶出が早まったことである。両イオン性・陰イオン性化合物はカルボキシ基やリン酸基を有するため、1 つ目の結果は、イオン性相互作用により両イオン性化合物/陰イオン性化合物と相互作用/吸着した固定相に対して、移動相中の陰イオンが競合的に結合することで溶出力を高める陰イオン交換作用が働いたためであると推察された。本実験結果から、分析物と固定相の間のイオン性相互作用と、添加剤と固定相の間の陰イオン交換作用の存在が示唆された。

特徴的な分離特性を示した 2 つ目の結果は、酢酸アンモニウムよりも重炭酸アンモニウムが陰イオン性化合物の溶出に効果的であったことである。この理由を考察するため、ChemAxon を用いて、酢酸関連分子/イオンと炭酸関連分子/イオンの移動相中の pH による分子状態のシミュレーションを行った。溶液中における分子/イオンの分布を図 12 (A) に示した。その結果、pH 9.8 の条件では、酢酸関連イオンについては全てが 1 価の陰イオンとして存在する一方で、炭酸関連イオンについては、全体の 87%が 1 価、13%が 2 価の陰イオンとして存在することが予測された。重炭酸アンモニウムが強い陰イオン交換作用を示した理由として、pH 9.8 の条件で生じた 2 価の陰イオンである炭酸イオンが効果的に作用したためであると考えられた。また、分析物

の例として AMP の解離状態を図 12 (C) に示した. AMP は塩基性条件において, 2 価の陰イオンとして存在することが予測された. イオンクロマトグラフィーにおいて, イオンの価数が大きくなる程, 陰イオン交換能が高くなることが知られているが, 炭酸イオンが分析物である陰イオンの溶出力を高めたことはイオンクロマトグラフィーの原理に矛盾しないといえる.

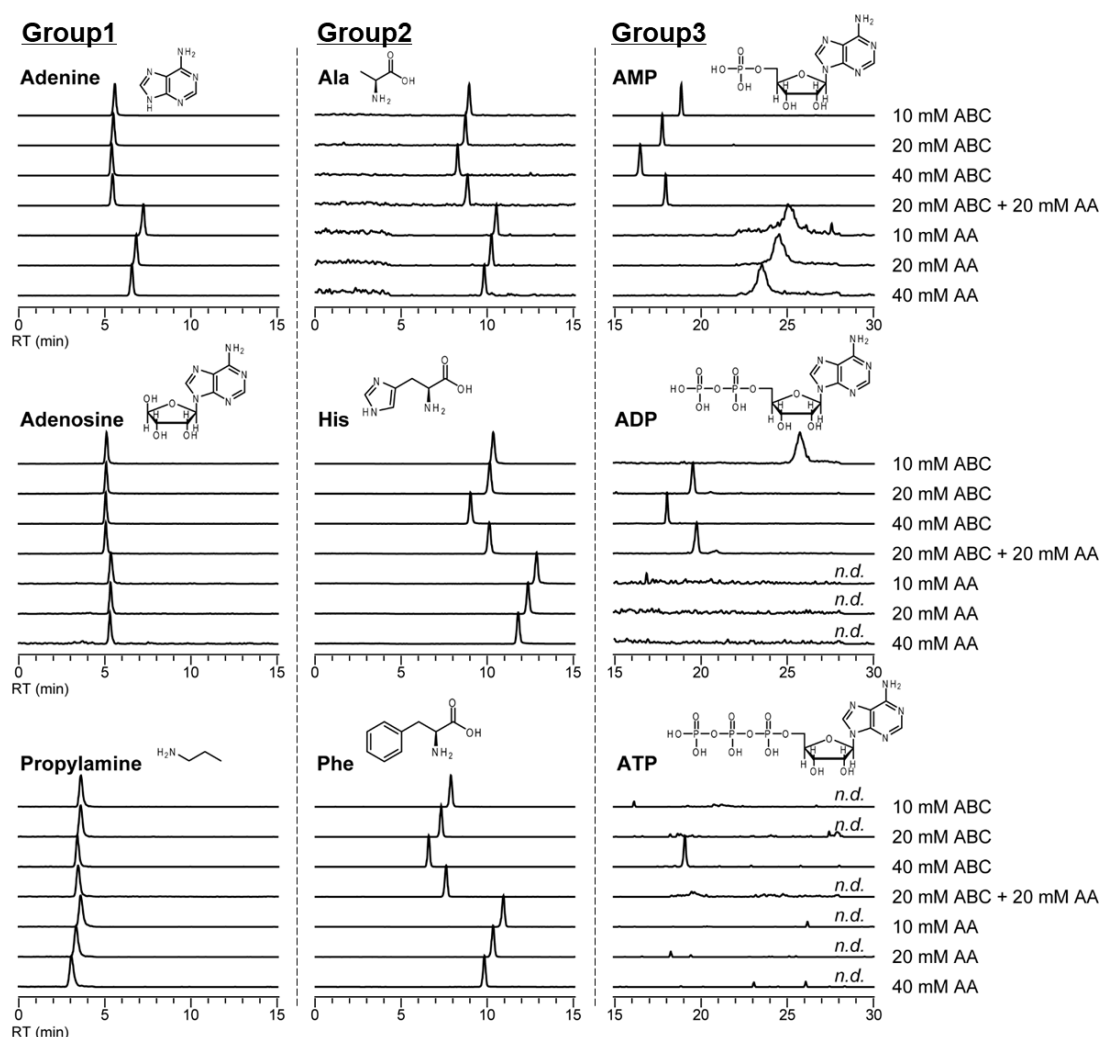


図 11. 添加剤条件の違いによる代謝物の保持挙動変化の例

図中の AA は酢酸アンモニウム, ABC は重炭酸アンモニウムを指す.

Group1 は非荷電・陽イオン性化合物, Group2 は両イオン性化合物, Group3 は陰イオン性化合物を指し, それぞれ代表化合物の保持挙動の変化を示した.

また, 移動相中の添加剤の電荷状態に加えて, 固定相の電荷状態もイオン性相互作用

用の強さを決める要素として重要である。固定相の分子/イオン状態の分布を図 12 (B) に示した。4 級アンモニウム基は pH に関わらず陽イオン状態として存在する一方で、pH 9.8 条件において 1, 2, 3 級アミノ基はそれぞれの全体の 34%, 16%, 63% が非イオン状態 (分子状態) で存在することが予測された。pH 9.8 の条件では、固定相における全体的な正電荷量が減少することでイオン性相互作用が相対的に弱まることが示唆された。

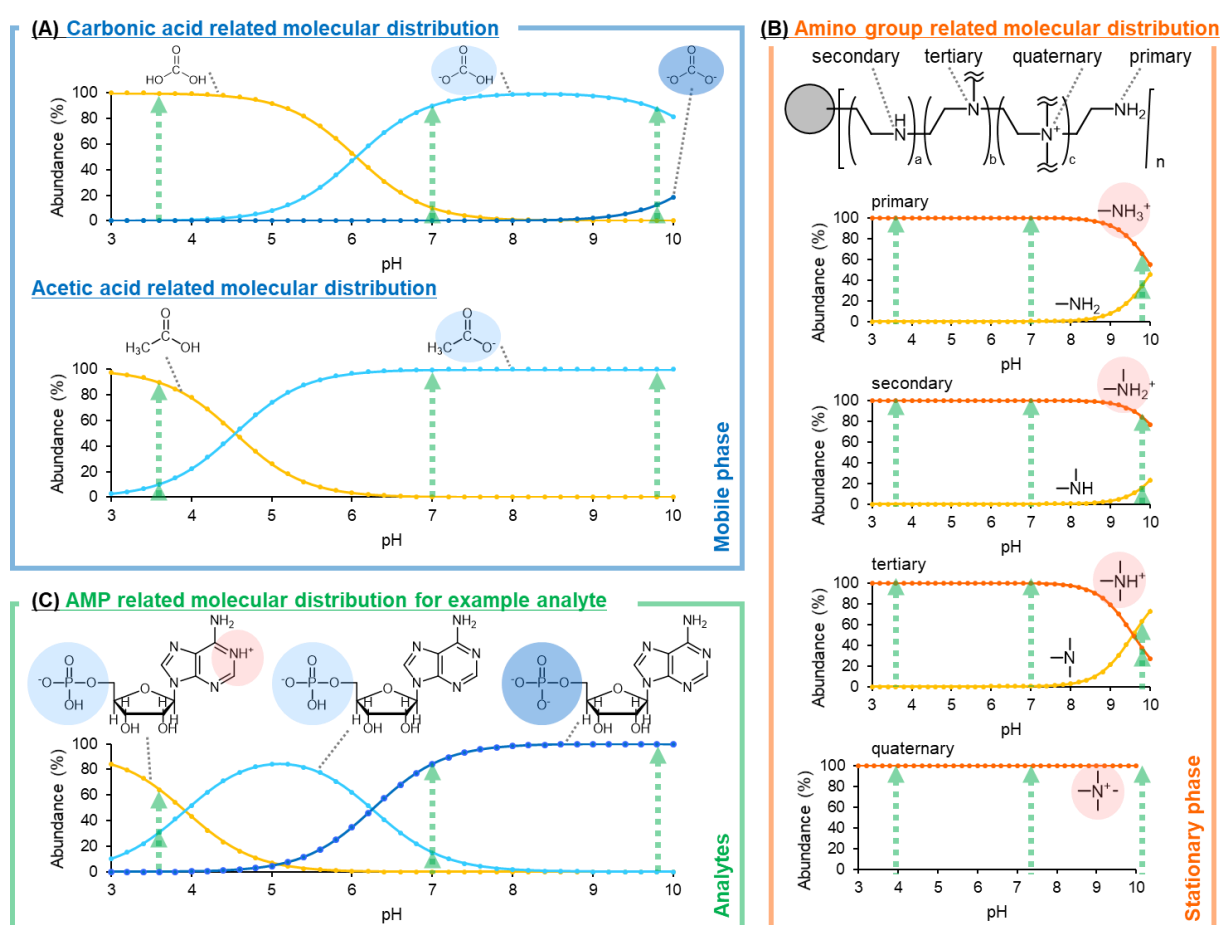


図 12. pH 条件と分子解離状態のシミュレーション

(A) 添加剤の解離状態。

(B) 固定相アミノ基の解離状態。

(C) 分析物 (AMP) の解離状態。

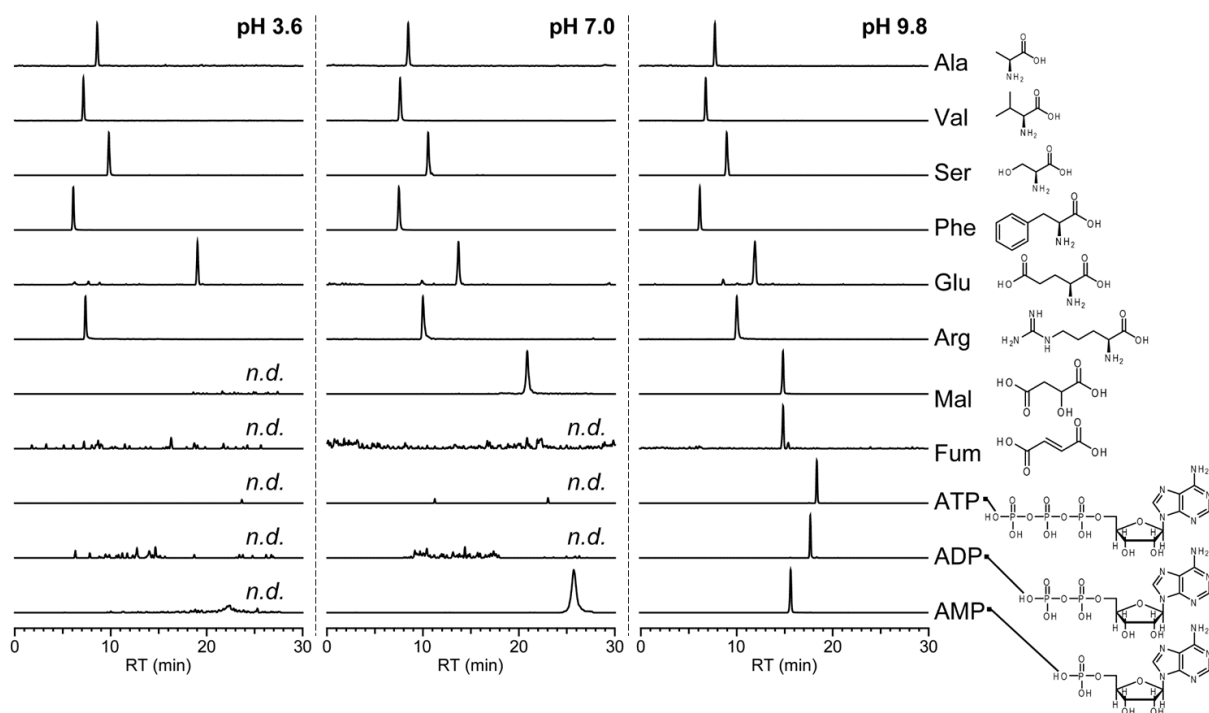


図 13. 移動相 pH 条件の違いによる代謝物ピーク形状変化の例

以上のシミュレーション結果から、中性条件および酸性条件では陰イオン交換作用が弱くなることが予想された。そこで移動相 pH が 3.6, 7.0, 9.8 の各条件において、両イオン性化合物、陰イオン性化合物の合計 11 種の化合物の保持時間の変化を調査した (図 13)。その結果、酸性条件、中性条件では化合物の保持は強くなる様子が観測され、したがって、陰イオン交換作用が弱くなった様子が確認された。特に陰イオン性化合物については、pH 条件は大きく影響し、塩基性条件でのみシャープなピークで溶出した。分子解離状態のシミュレーション結果は、アミノ基混合ポリマーカラムに対する各種親水性代謝物の保持挙動の特性への理解につながった。

作製したアミノ基混合ポリマーカラムにおいて、移動相中の添加剤種とその濃度、移動相中 pH 条件を最適化した結果、様々な物理化学的特性を有するすべての代表的な親水性代謝物において良好なピーク形状が得られた (図 14)。特に陰イオン性化合物について、AEX モードが効果的に作用していることが示唆された。

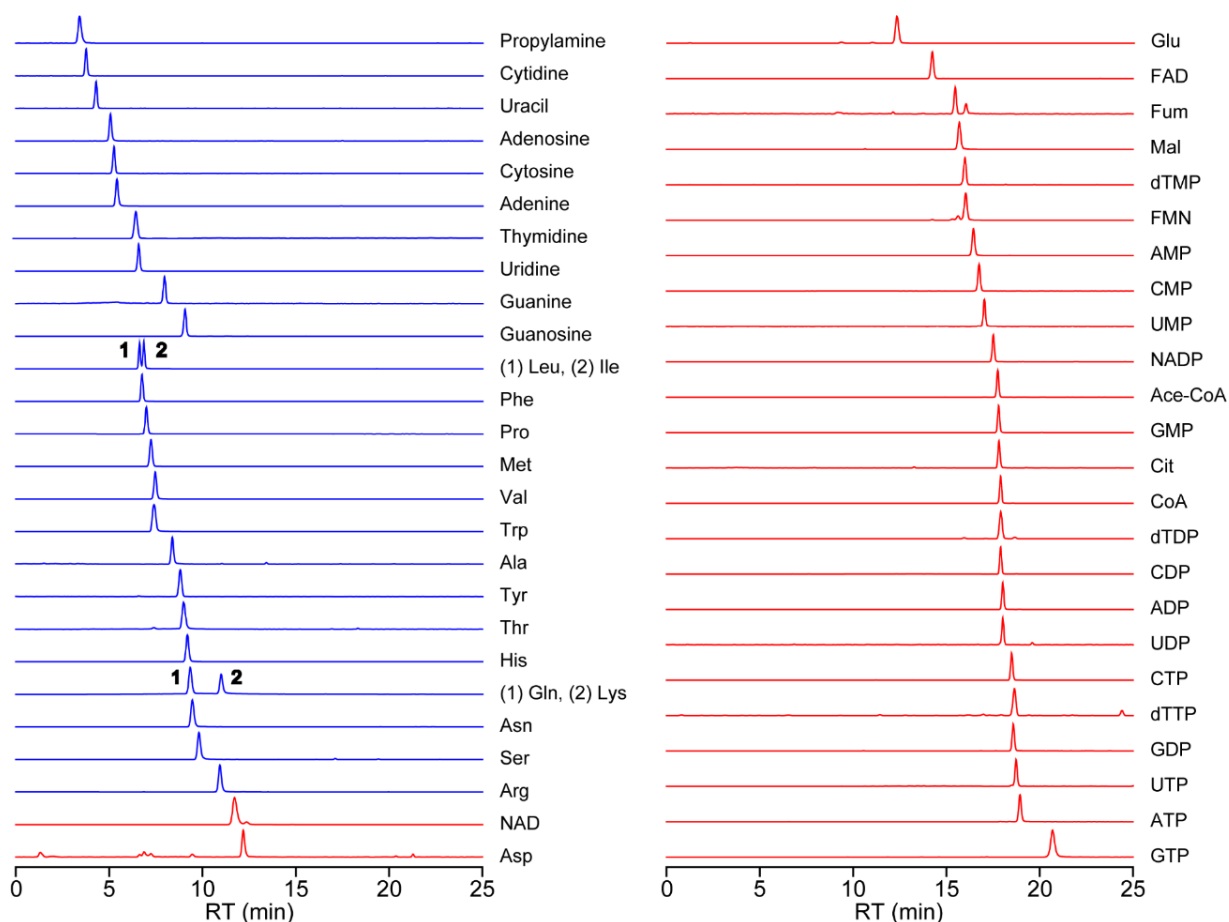


図 14. 最適化した移動相条件での代謝物クロマトグラム

青では非荷電・陽イオン性化合物 (propylamine から guanosine まで) と両イオン性化合物 (Leu, Ile から Arg まで) のクロマトグラムを示した. 赤では陰イオン性化合物 (Asp から GTP まで) のクロマトグラムを示した.

3-3-4. 分離メカニズムに関する考察

さらに分離メカニズムに関する考察を深めるため, アミノ基混合ポリマーカラムのクロマトグラフィー性能が固定相修飾過程でどう変化するかを調査した. 固定相構造の対比を明確にするため, 本実験では比較に使用したカラムをポリマー粒子充填カラム (P column), ジオール (スぺーサ) 修飾ポリマー粒子充填カラム (P-S column), アミノ基混合修飾ポリマー粒子充填カラム (P-S-A column = GL-HilicAex) と呼ぶことにする. これらのカラムを用いて, 合計 52 種の非荷電・陽イオン性・両イオン性・陰イオン性化合物を分析した. 保持時間と 10%ピーク幅を図 15 に示した. また, 例として, それぞれのカラムを用いたときに得られた histidine と ATP のクロマトグラムを

示した。全体的な傾向として、代謝物の保持は P-S-A カラム, P-S カラム, P カラムの順に強かった。そのうち例外的な挙動を示した代謝物としては, propylamine と histidine があった。また、保持の小さい化合物では P, P-S, P-S-A カラムとも 10%ピーク幅が 1 分以下のシャープなピークで溶出する傾向があったが, P, P-S カラムにおいては、化合物の保持が大きくなるにつれて 10%ピーク幅が大きくなる傾向があり、ブロードなピークで溶出する様子が見られた。histidine は例外的な挙動を示し、保持がそれほど大きくないにも関わらず, P, P-S カラムではブロードなピークで溶出した。

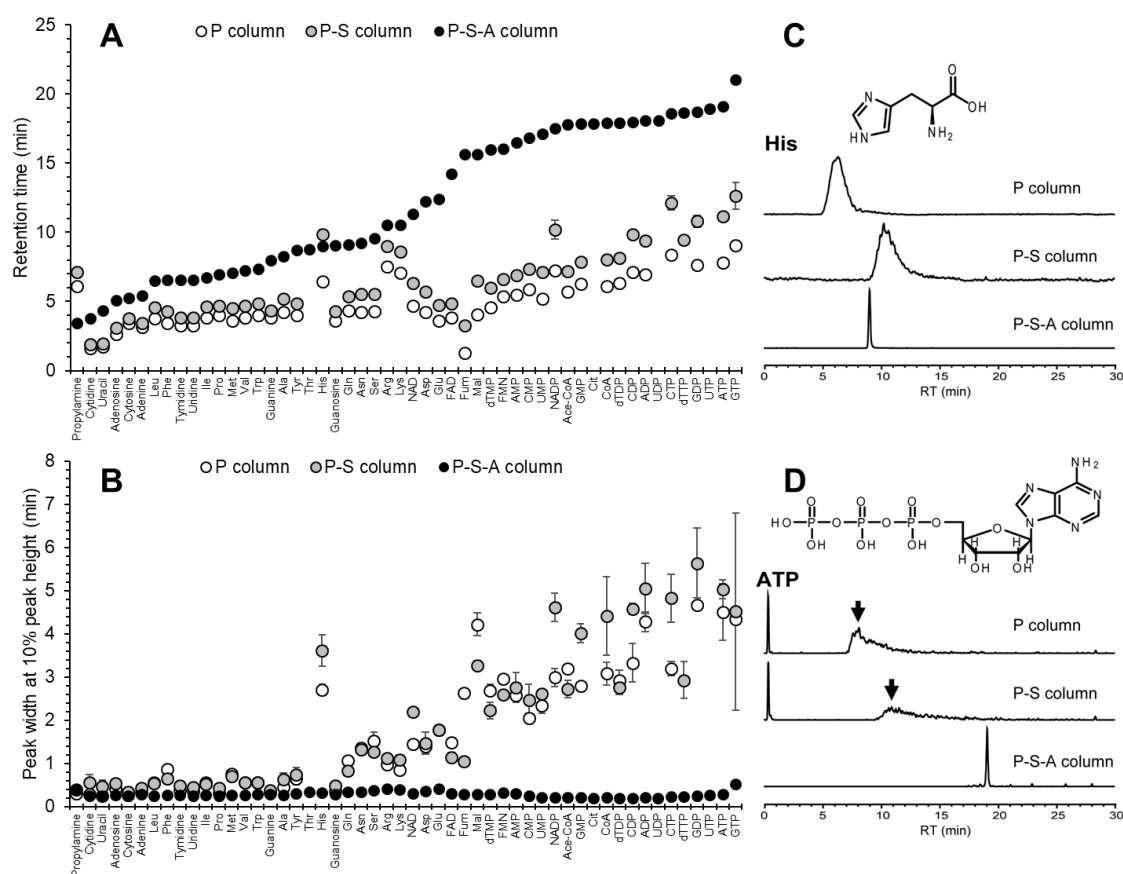


図 15. 固定相修飾過程におけるピーク形状の変化

(A) 各代謝物ピークの保持時間。

(B) 各代謝物ピークの 10%ピーク幅。

(C) 保持時間と 10%ピーク幅で特徴的な挙動を示した histidine の例。

(D) 保持時間と 10%ピーク幅で特徴的な挙動を示した ATP の例。

ポリマー粒子充填カラムは P column, ジオール修飾ポリマー粒子充填カラムは P-S column,

アミノ基混合修飾ポリマー粒子充填カラムは P-S-A column (=GL-HilicAex) と表記。

全体的な保持の強さが $P < P-S < P-S-A$ カラムの順番になった理由としては、固定相の修飾過程において、水和層を形成することができる極性官能基の数が増加したことが考えられる。メタクリル酸ポリマー粒子にプロパンジオールを修飾することにより 2 つの極性ヒドロキシ基が固定相表面に露出する。さらにプロパンジオールにポリエチレンイミンを修飾することにより、少なくとも 1 つの修飾に対して 2 つ以上の極性アミノ基が表面に露出することになる。ほとんどの親水性代謝物の保持の強さが $P < P-S < P-S-A$ カラムの順番になることは、極性官能基に水和する分子数 (“水和層の厚み”) の多さが $P < P-S < P-S-A$ カラムの順番になることにより解釈できる。したがって、GL-HilicAex カラムでは、HILIC モードが作用していることが示唆された。例外的な挙動を示した propylamine について、pH 9.8 における分子状態のシミュレーションを行うと、全体の 72%が正味の電荷量が 1 価の正電荷を持つ分子状態であると予測された。一方、その他の化合物では、pH 9.8 において正味の正電荷を持つ分子状態になりうるものとして lysine と arginine があつたが、それぞれ 25%, 17%が陽イオンとして存在していることが予測された (表 5 の pK_a , pK_b 参照)。したがって、pH 9.8 において大部分が正味の正電荷を持つ propylamine については、正電荷を持つ固定相アミノ基を修飾することにより、イオン排除効果が働いたため保持が小さくなり、保持の強さが $P-S-A < P < P-S$ カラムの順番になったものと考えられる。

また、保持の強さの変化において、もう一つの例外であつた histidine は、10%ピーク幅においても例外的に P-S-A カラム以外でブロードなピークを示した。Histidine が溶出し始める時間を、ピークの対象性を考慮せずに保持時間と 10%ピーク幅から求めると、P, P-S, P-S-A カラムでは、それぞれ、5.1, 8.1, 8.7 min であつた。Histidine は P, P-S カラムにおいて、ブロードなピークとして溶出したために、ピークトップの保持時間の例外的な挙動に一因しているものと考えられる。また、P, P-S カラムでは比較的保持の強かつた化合物ピークについて 10%ピーク幅は大きくなる傾向が

あった。P-S-A カラムでは、P、P-S カラムでブロードであった全ての代謝物ピークがシャープになったことから、固定相アミノ基が特に保持の強かった化合物のピーク性能の向上に効果的な作用、すなわちイオン性相互作用、を持つことが考えられる。

GL-HilicAex カラムの最適条件 (40 mM 重炭酸アンモニウム, pH 9.8) における保持・分離メカニズムを調査するため、非荷電・陽イオン性・両イオン性化合物および、陰イオン性化合物の保持時間、 $\log P_{ow}$ とグラジエント条件における水系溶媒 (40 mM 重炭酸アンモニウム, pH 9.8) の組成を図 16 に示した。また、保持時間と $\log P_{ow}$ に対して Spearman の相関解析を行ったところ、非荷電・陽イオン性・両イオン性化合物については $r_s = -0.750$ 、グループ 3 については $r_s = -0.119$ の相関係数を示した。

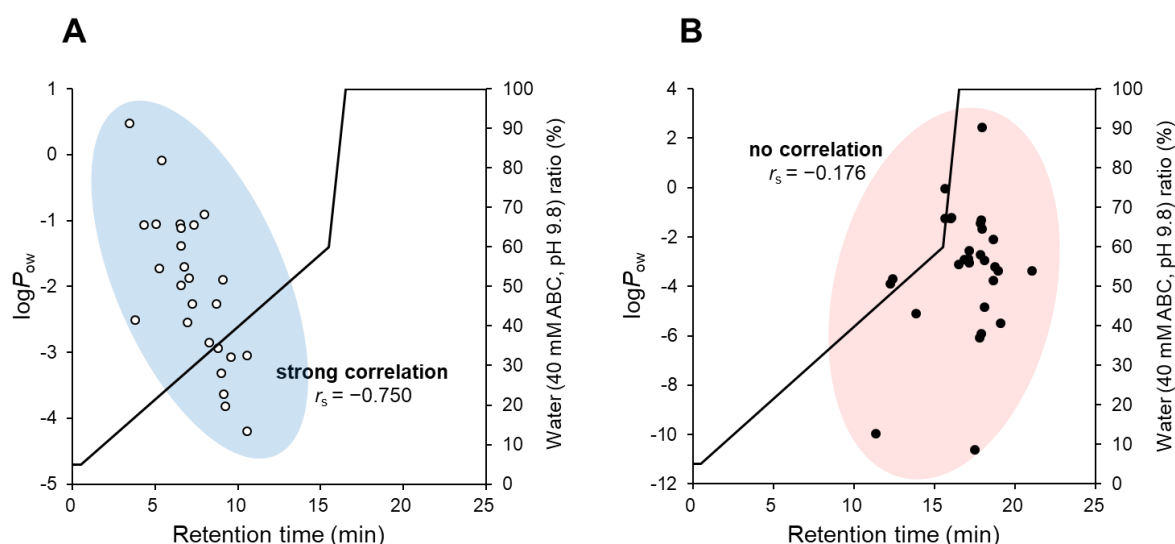


図 16. 保持時間と $\log P_{ow}$ の関係

(A) 非荷電・陽イオン性・両イオン性化合物の保持時間と $\log P_{ow}$ の関係。

(B) 陰イオン性化合物の保持時間と $\log P_{ow}$ の関係。

左縦軸では $\log P_{ow}$ 、横軸では保持時間、右縦軸では移動相の水系溶媒の組成を示した。実線は保持時間と移動相の水系溶媒の組成 (グラジエント条件) を示した。

HILIC は、極性固定相において 50%以上の有機溶媒を移動相として用いる分離手法である⁶⁸。全ての非荷電・陽イオン性・両イオン性化合物は水系溶媒の割合が 0-50% の移動相組成 ($t = 0-12.8$ min), すなわち HILIC モードが働く溶媒条件で溶出してい

ることが確認できた。さらに、保持時間と $\log P_{ow}$ は強い負の相関関係 ($|r_s| > 0.70$) を示したことを併せて考えると、非荷電・陽イオン性・両イオン性化合物については、HILIC モード支配的な分離モードが作用していると考えることができる。一方で、陰イオン性化合物は aspartic acid, glutamic acid, NAD を除く全ての化合物が炭酸イオンを含んだ水系溶媒の割合が 50%以上の移動相組成で溶出 ($t > 12.8$ min) しており、非荷電・陽イオン性・両イオン性化合物よりも強い保持を示した。そのため、陰イオン性化合物には、親水性相互作用ではない他の相互作用が支配的に作用していることが示唆された。さらに、(i) Spearman の相関係数が保持時間と $\log P_{ow}$ との間の相関関係を支持していないこと、(ii) 保持の強さが AMP < ADP < ATP のように陰イオン強度の順になっていること (図 11), (iii) 移動相中の炭酸・重炭酸イオン濃度を上げることでこれらの陰イオン性化合物の溶出が早まること (図 11) を考慮すると、陰イオン性化合物は、イオン性相互作用により固定相に保持されており、炭酸イオンによる陰イオン交換作用により溶出しているものと考えられる。すなわち、陰イオン性化合物については、AEX モード支配的な分離モードが作用していると考えることができる。aspartic acid, glutamic acid, NAD が他の陰イオン性化合物よりもやや保持が弱かった理由は、これらの代謝物は正味の電荷として負電荷を持つが、pH 9.8 の条件においても部分的な正電荷を有するため、イオン排除効果が作用したためと考えられる。

以上の結果をまとめると、本分離手法では、まず陰イオン性化合物を固定相に吸着させながら、非荷電・陽イオン性・両イオン性化合物を HILIC モード支配的な分離モードによって分離し ($0 \text{ min} < t < 12.8 \text{ min}$)、その後、固定相に吸着させた陰イオン性化合物を AEX モード支配的な分離モードで分離する ($12.8 \text{ min} \leq t < 26.5 \text{ min}$) という 2 種の分離モードが連続的かつ段階的に作用する新しいクロマトグラフィーを提唱できたとと言える。HILIC モードと AEX モードを 1 つのメソッドに統合することに成功したことから、本手法を unified hydrophilic-interaction anion-exchange liquid chromatography (unified HILIC/AEX) と呼ぶこととした。このユニークな分離モードが、広い物性範囲を持つ親水性メタボロームに対して高いクロマトグラフィー性能を有

する可能性が示唆された。

3-3-5. アミノ基混合ポリマーカラムの比較評価

次に、アミノ基混合ポリマーカラムのクロマトグラフィー性能を他のカラムと比較した。固定相構造の対比を明確にするため、本実験では比較に使用したカラムをシリカカラム、アミノシリカカラム、両性イオン修飾ポリマーカラム、アミノ基混合ポリマーカラムと呼ぶことにする。これらのカラムを用いて、合計 52 種の非荷電・陽イオン性・両イオン性・陰イオン性化合物を pH 7.0 の中性移動相条件、あるいは pH 9.8 の塩基性移動相条件で分析した。各条件で得られた代謝物ピークの保持時間と 10%ピーク幅を図 17 に示した。また、例として、ピーク形状に特徴的な違いが見られた Histidine と ATP のクロマトグラムを示した。シリカカラム (pH 7.0) では 48 種が、アミノシリカカラム (pH 7.0) では 40 種が、両性イオン修飾ポリマーカラム (pH 7.0) では 50 種が、両性イオン修飾ポリマーカラム (pH 9.8) とアミノ基混合ポリマーカラム (pH 9.8) では 52 種全ての代謝物が検出された。また、両性イオン修飾ポリマーカラム (pH 9.8) では全ての代謝物を検出できたものの、10%ピーク幅が 1 min 以上のものが 14 種あり (最大 10%ピーク幅は 3.6 min)、ブロードなピークも多く見られた。一方で、両性イオン修飾ポリマーカラム (pH 9.8) では全ての代謝物において 10%ピーク幅が 1 min 以下のシャープなピークが得られた (最大 10%ピーク幅は 0.5 min)。

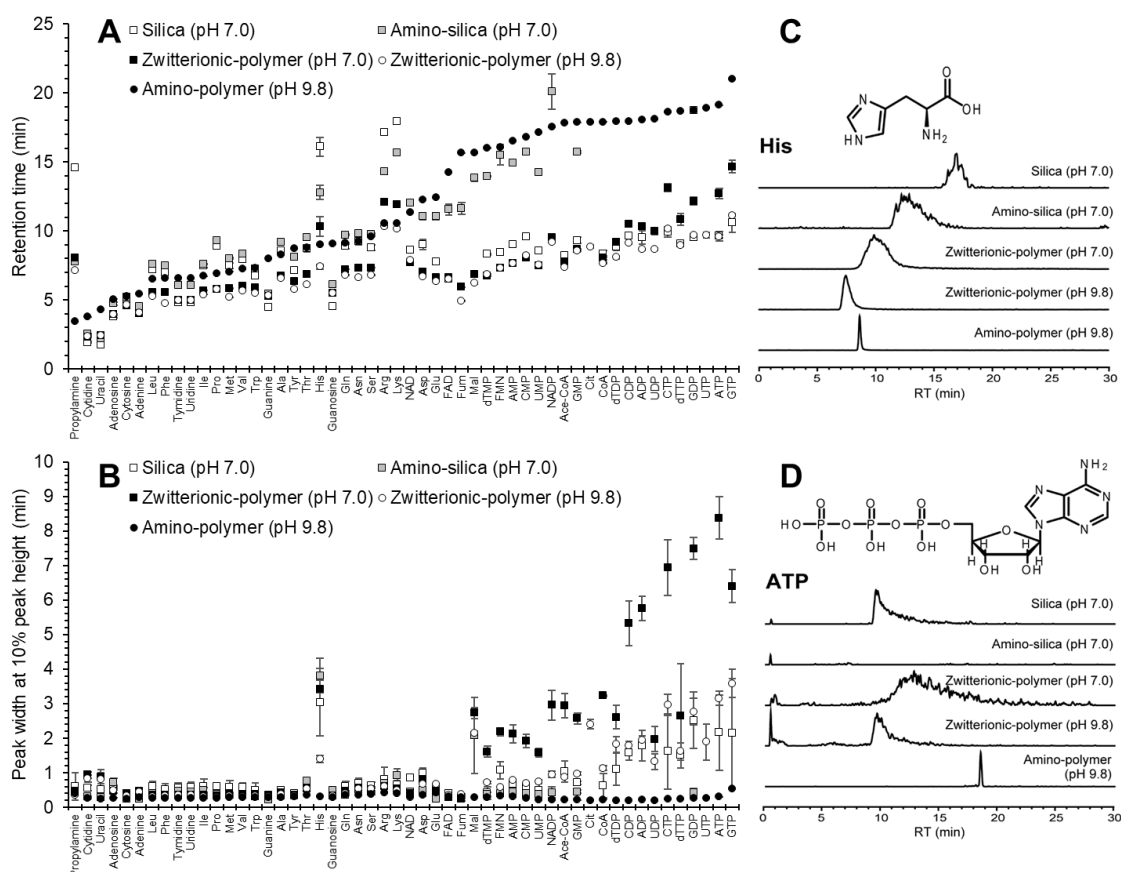


図 17. Unified HILIC/AEX 法と代表的な HILIC 法で得られるピーク形状の違い

(A) 各代謝物ピークの保持時間.

(B) 各代謝物ピークの 10%ピーク幅.

(C) 保持時間と 10%ピーク幅で特徴的な挙動を示した Histidine の例.

(D) 保持時間と 10%ピーク幅で特徴的な挙動を示した ATP の例.

シリカカラムは Silica column, アミノシリカカラムは Amino-silica column, 両性イオン修飾ポリマーカラムは Zwitterionic-polymer column, アミノ基混合ポリマーカラムは Amino-polymer column (=GL-HilicAex)と表記. 括弧は調製した移動相の pH 条件.

シリカタイプのカラムは塩基性条件でシリカ基材が溶解するため、塩基性移動相での分析ができない. 図 12 (A) に示したように、2 価の陰イオンである炭酸イオンは塩基性条件でしか存在しないため、シリカタイプのカラムでは炭酸イオン由来の陰イオン交換作用を十分に利用できていない可能性が考えられる. アミノシリカカラム (pH 7.0) で溶出されなかった代謝物は全てグループ 3 の陰イオン性化合物であることから、ポリマー基材により利用可能な pH 範囲を塩基性まで拡張することは、陰イオン性化合物の溶出力を大きくするのに効果的である. また、ZIC-pHILIC は両性イオン

修飾ポリマーカラムとして一般的に極性化合物分析に用いられるカラムであるが⁶⁹, GL-HilicAex カラムで最適化した条件では, 今回の実験で準備したカラムは 2 本とも 10 分析以内にカラム背圧が上昇し, データを取得できなかった. この理由は, 移動相中の水の比率が急激に増加・減少することで, 充填されている樹脂粒子の収縮・膨潤が起こり, 本カラムでは粒子の充填状態を維持できなかったためと考えられる. そのため, 同様に親水性代謝物分析に用いられ³⁴, 安定に使用が可能であった iHILIC を両性イオン修飾ポリマーカラムとして使用した. 図 17 に示した保持時間および 10% ピーク幅の結果は, 包括的なメタボローム解析における GL-HilicAex カラムの優位性を十分に示す結果であった.

3-3-6. Unified HILIC/AEX 法のターゲットメタボローム解析への適用

次に, 開発した unified HILIC/AEX/MS/MS 法のメタボローム解析への適用性を調べるために, 本手法を HeLa 細胞のメタボローム解析に適用した. 遠心濃縮・凍結乾燥操作 (centrifugal concentration freeze dry, CCFD) は試料を乾固させる手法であり, Bligh-Dyer 法に続く操作として親水性代謝物抽出液の濃縮, あるいは溶媒組成を変えるために一般的に用いられている⁷⁰. 一方で, Unified HILIC/AEX 法では, 抽出溶媒の組成 (Water/MeOH (4:5)) が初期溶媒の組成と類似しているため, 親水性代謝物抽出液の直接分析と相性がよい. そこで, これまで一般的に行われてきた CCFD が代謝物に及ぼす影響を調査するため, unified HILIC/AEX/MS/MS による親水性代謝物抽出液の直接分析結果と, CCFD 後に同溶媒組成で再溶解した親水性代謝物抽出液の分析結果を比較した.

まず, 安定同位体で標識した $^{18}\text{O}_9\text{-ATP}$ について, HeLa 細胞なしで抽出操作を行い, CCFD 操作の影響を調査した. CCFD 操作により $^{18}\text{O}_9\text{-ATP}$ は有意に減少し, その分解物と予想される $^{18}\text{O}_6\text{-ADP}$, $^{18}\text{O}_3\text{-AMP}$ は有意に増加していた (図 18-A). したがって, CCFD 操作により, 一部の代謝物は加水分解のような分解反応の影響を受けていることが示唆された.

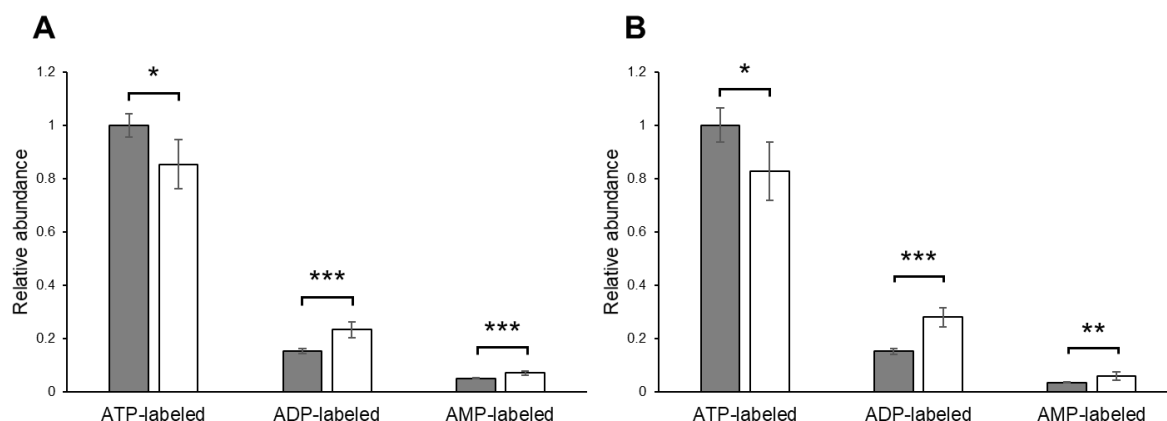


図 18. $^{18}\text{O}_9$ -ATP が CCFD 操作により受ける分解の影響

(A) MeOH に $^{18}\text{O}_9$ -ATP を添加し、CCFD 前後での各化合物の相対量の変化を示した。

(B) HeLa 細胞回収試料に $^{18}\text{O}_9$ -ATP を添加し、CCFD 前後での各化合物の相対量の変化を示した。それぞれ、有意水準は、* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ とした。

次に、内標を添加した HeLa 細胞回収サンプルについて合計 397 種を測定対象とし、ワイドターゲットメタボローム分析を実施し、CCFD 操作がメタボロームに及ぼす影響を同様に調査した。HeLa 細胞抽出液の unified HILIC/AEX/MS/MS 分析を行った結果、合計 167 化合物を同定することに成功した。また、図 18-B には HeLa 細胞抽出時に添加した際の $^{18}\text{O}_9$ -ATP, $^{18}\text{O}_6$ -ADP, $^{18}\text{O}_3$ -AMP のピークエリア値を示した。図 19 に CCFD 前後で同定された代謝物のボルカノプロットを示した。 $^{18}\text{O}_9$ -ATP 内標は、細胞マトリックスなしの結果と同様の増加減少傾向を示し、CCFD 操作による分解現象を再現した。CCFD 操作に安定な代謝物も多くみられたが、増加減少傾向を示した代謝物もいくつか存在した。ヌクレオシド三リン酸類とヌクレオシド二リン酸類、*S*-adenosylmethionine (SAM) と *S*-adenosylhomocysteine (SAH) のように、分解により生じると考えられる代謝物の組み合わせがいくつかみられた。したがって、従来のメタボローム解析の前処理操作で必須であった CCFD 操作は、いくつかの不安定な代謝物の定量性の低下を引き起こすことが明らかとなった。したがって、抽出液を直接分析できる unified HILIC/AEX 法は、細胞内の精確な代謝物情報を取得するのに有効なツール

ルであると考えられる。

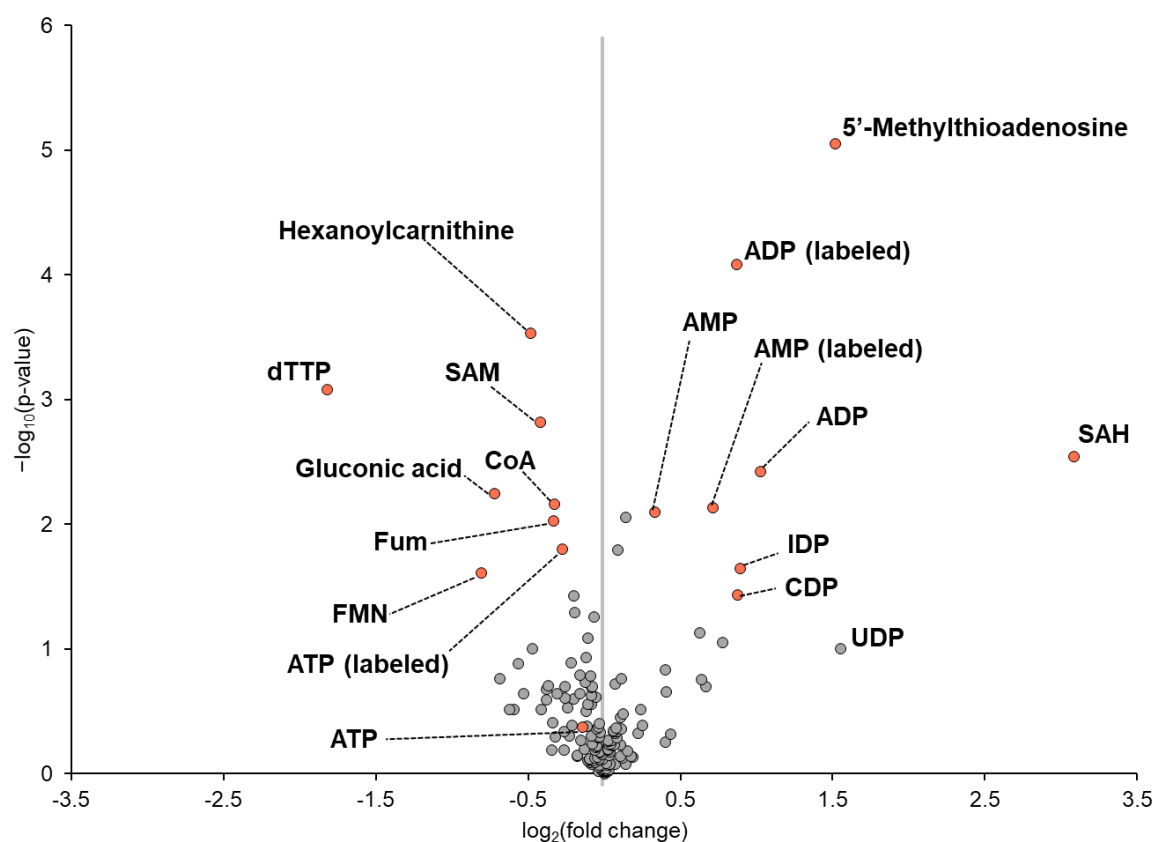


図 19. CCFD 前後で変動した代謝物のボルカノプロット

略号：inosine diphosphate, IDP.

3-3-7. Unified HILIC/AEX 法のノンターゲットメタボローム解析への適用

高分解能質量分析による Full-Scan モードで測定対象を限定せずに代謝物を測定する方法論はノンターゲット分析と呼ばれている。ノンターゲットメタボローム分析は、検出された成分 (compound feature) の数により、分析カバレッジの客観的な評価にも活用されている⁷¹。Unified HILIC/AEX 法の包括的な親水性メタボローム解析への利用可能性を評価するため、unified HILIC/AEX/MS と従来の第一選択であった両性イオン修飾カラムを用いた HILIC/MS において、HeLa 細胞のノンターゲットメタボローム解析を実施した。バックグラウンド減算処理後、従来型 HILIC/MS では 2068 compound features を検出した。一方で、unified HILIC/AEX/MS では 3242 compound

features を検出し、単一分析で検出可能な化合物ピーク数は従来型 HILIC 法と比較して約 1.6 倍増加した。

グループ 1, 2, 3 の 52 種の特徴的な代謝物を基準として、Unified HILIC/AEX 法では、従来型 HILIC 法に比べて、陽イオン性化合物、両イオン性化合物、非荷電化合物、陰イオン性化合物の全ての化合物のピークがシャープであることが **3-3-5.**で確認されている。こうしたクロマトグラフィー性能の向上により、ノンターゲット分析においても検出ピーク数が増加したと考えられる。したがって、unified HILIC/AEX/MS/MS はノンターゲットメタボローム解析においても、従来法よりも優れた分析カバレッジを持つことが示された。

3-4. 小括

本章では、単一分析で網羅的なメタボローム分析を実施するための新しい分析手法の開発に取り組んだ。まず、利用可能な LC カラムの比較評価を行い、アミノ基混合ポリマーカラムが単一分析による網羅的なメタボローム解析に利用できる可能性を見出した。さらに、アミノ基混合ポリマーカラムを用いて、各種移動相条件が代謝物ピーク形状に及ぼす影響を調査した。そして、アミノ基混合ポリマーカラムにおいて移動相 pH を塩基性に調整し、固定相の電荷、分析物の解離状態を考慮しながら添加剤の種類と濃度を最適化したことで各条件が協調的に作用し、HILIC モードと AEX モードが連続段階的に作用する特殊な分離手法を見出すことに成功した (図 20)。開発した手法を unified HILIC/AEX 法と命名し、当該手法の性能をターゲットメタボローム解析、およびノンターゲットメタボローム解析の両方で評価した。そして、当該手法が単一分析のメタボローム解析において最も広い分析カバレッジを持つことを示した。したがって、unified HILIC/AEX/MS/MS は単一分析でのメタボローム解析のための強力なツールとして利用できることが示された。今後、本手法はシングルセル解析や組織切片などの一度しか分析できない試料の分析への応用が期待できるだけでなく、コホート研究やメタボロミクスのルーチン分析など様々な場面での活用が期

待できる。

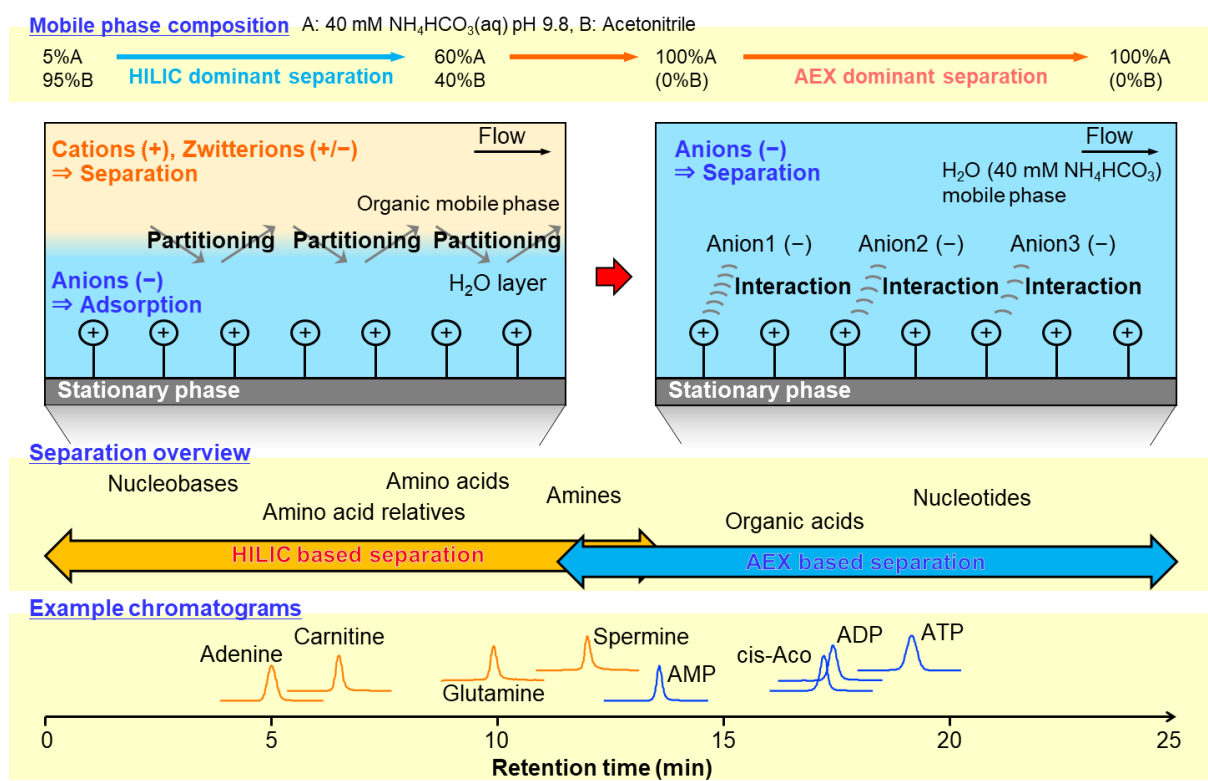


図 20. 第三章で開発した unified HILIC/AEX/MS/MS の概要図

第四章 総括と今後の展望

メタボロミクスにおいて、LC/MS は比較的幅広い物性の親水性メタボロームを同時に分離分析できるため、広く使用されている。しかしながら、典型的な動物細胞のシングルセルメタボロミクスを実施するためには、感度と網羅性という 2 つの課題が存在することを第一章で説明した。

第二章では、カラム内径のダウンサイジングにより LC/MS の高感度化に取り組み、高感度 PFPP-nano-LC/MS/MS を基盤としたメタボローム分析手法を開発した。そして、開発した手法を HeLa 細胞の 1 細胞メタボロミクスに適用し、高感度 PFPP-nano-LC/MS/MS システムが HeLa 細胞のような典型的な動物細胞のシングルセルメタボロミクスに利用できることを実証した。すなわち、感度という課題に対して、分離系のダウンサイジングによる高感度化が有効な手段であることを示した。しかしながら、全般的に、PFPP-LC では親水性代謝物の保持は弱く、結果的にカラム先端での濃縮が困難であったこと、PFPP-LC では分離・溶出できない化合物が存在することから、開発した PFPP-nano-LC/MS/MS の単一分析では、検出された親水性代謝物は限定的であった。

第三章では、単一分析による網羅的なメタボローム分析手法の開発に取り組んだ。LC カラムのスクリーニングにより、アミノ基混合ポリマーカラムの可能性を見出し、これを用いて詳細に LC 条件の最適化を行った。その結果、各 LC 条件が有機的に作用し、HILIC モードと AEX モードが連続段階的に作用する特殊な分離手法を見出すことに成功した (unified HILIC/AEX/MS/MS と命名)。そして、unified HILIC/AEX/MS/MS 法が、単一分析において最も網羅性の高いメタボローム分析手法であることを検証した。すなわち、シングルセルメタボロミクスが抱える単一分析における網羅性という課題に対して、unified HILIC/AEX/MS/MS 法という解決策を提案した。

本博士論文では、シングルセルメタボロミクスが抱える感度と網羅性という 2 つの

課題に対して、それぞれ個別に解決策を提案した。今後、提案した 2 つの解決策を統合、すなわち、unified HILIC/AEX/MS/MS 法の分離系のダウンサイジングにより、高感度 nano-unified HILIC/AEX/MS/MS 法を構築することでより網羅的なシングルセルメタボロミクスが実施できるものと期待される。また、当該手法は、分析開始時の移動相が有機溶媒 (95%アセトニトリル) である。そのため、単離したシングルセルに対して有機溶媒を用いた前処理を行った試料を注入しても、ピーク形状を損なうことなく分析が可能である。有機溶媒を用いて 1 細胞試料を調製することができるため、代謝クエンチ・抽出・タンパク質除去など前処理した分析サンプルを予め準備できる。そのため、オートサンプラーが利用でき、大規模なデータ採取も可能になると考えられる。また、本博士論文ではカラム内径を 100 μm に微小化したが、さらなるカラム内径のダウンサイジングにより高感度化が達成できる見込みである。さらに、第二章と第三章で要素技術として開発した nano-LC/MS/MS 法 (高感度分析系)、及び unified HILIC/AEX/MS/MS 法 (高網羅性分析系) は、シングルセルに適用範囲を限定しなければ、それ自体でもメタボロミクス研究を推し進める強力な基盤技術である。希少サンプルや超微量サンプルの分析、あるいは、コホート研究やメタボロミクスのルーチン分析として今後活用されることが期待される。

見えるものを見るのではなく、見たいものを見る。既存装置をただ単に使うだけの研究者ではなく、見たいものを見るために自分で新しく技術を開発していけるような研究者でありたいと思う。

謝辞

本博士論文は、九州大学大学院システム生命科学府システム生命科学専攻生命医科学講座で実施した研究内容をまとめたものです。

本研究を遂行するに当たり、多数のご指導、ご助言を頂き、常に激励し、様々なものに挑戦する機会を頂いた九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野 馬場健史教授に厚く御礼申し上げます。実験の技術や知識等、数多くのご指導、ご助言を頂いた同 和泉自泰准教授に厚く御礼申し上げます。博士論文の主査を快諾してくださり、ご指導、ご助言、およびご校閲を賜りました生体防御医学研究所統合オミクス分野 久保田浩行教授に厚く御礼申し上げます。副査を快諾してくださり、ご指導、ご助言、およびご校閲を賜りました生体防御医学研究所情報生物学分野 須山幹太教授、九州大学大学院薬学研究院 山田健一教授に厚く感謝申し上げます。細胞培養方法および分析技術について数多くご教示頂きました新潟大学分子遺伝学分野 松本雅紀教授に厚く御礼申し上げます。分析装置全般の運用および様々な学生生活を通して激励頂いた当研究室 高橋政友博士に厚く御礼申し上げます。常に叱咤激励し、懇切丁寧なご指導を頂きました同 原健士特任准教授に心からの感謝を申し上げます。多数のご助言を頂き、学生生活を通して激励頂いた同 中尾素直博士に厚く御礼申し上げます。研究者としての理想像を熱く語ってくださった同 油屋 駿介博士に心より御礼申し上げます。細胞サンプリング装置のメンテナンスでご支援頂いた同 秦康祐様に厚く御礼申し上げます。多くの激励を頂きました同 相馬悠希助教に深く感謝いたします。また、サイエンスを楽しむ姿勢を教えてくださった九州大学生体防御医学研究所分子医科分野の中山敬一教授に厚く御礼申し上げます。本研究を、博士課程を通して常に支援して頂いた一般財団法人杉山報公会 徳田正弘様に厚く御礼申し上げます。カラム開発に際して様々な要望を聞き入れてくださいました日立化成テクノサービス株式会社 佛願道男様、櫻井恵太様に厚く御礼申し上げます。カラム充填剤を提供して下さった Merck 榊原風太様に厚く御礼申し上げます。質量分析計の高感度化の

相談など様々なご支援を賜りました株式会社島津製作所 向紀雄様，木下英治様に厚く御礼申し上げます．質量分析計に不具合が生じた際に常にご助言頂き，迅速かつ適切な修理対応を頂きました立石慶輔様に厚く御礼申し上げます．そして，大阪大学時代から常に激励し，信頼し，支援し続けてくださった親友 中野洋介博士に心より御礼申し上げます．また，研究発表をご拝聴賜り，ディスカッションを通して研究を深める機会を設けてくださった生体防御医学研究所の教授，准教授，助教，および全ての研究者の皆様に厚く御礼申し上げます．最後に，本研究を支援し常に激励していただきました馬場研究室の皆様，卒業生の皆様，友人，そして家族に深く心より感謝申し上げます．

引用文献

1. Saliba, A.-E.; Westermann, A. J.; Gorski, S. A.; Vogel, J., Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic acids research* **2014**, *42* (14), 8845-8860.
2. Micalizzi, D. S.; Maheswaran, S.; Haber, D. A., A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes & development* **2017**, *31* (18), 1827-1840.
3. Angelidis, I.; Simon, L. M.; Fernandez, I. E.; Strunz, M.; Mayr, C. H.; Greiffo, F. R.; Tsitsiridis, G.; Ansari, M.; Graf, E.; Strom, T.-M., An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nature communications* **2019**, *10* (1), 963.
4. van Galen, P.; Hovestadt, V.; Wadsworth II, M. H.; Hughes, T. K.; Griffin, G. K.; Battaglia, S.; Verga, J. A.; Stephansky, J.; Pastika, T. J.; Story, J. L., Single-cell RNA-seq reveals AML hierarchies relevant to disease progression and immunity. *Cell* **2019**, *176* (6), 1265-1281. e24.
5. Chadani, Y.; Niwa, T.; Izumi, T.; Sugata, N.; Nagao, A.; Suzuki, T.; Chiba, S.; Ito, K.; Taguchi, H., Intrinsic ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing. *Molecular cell* **2017**, *68* (3), 528-539. e5.
6. Heurgué - Hamard, V.; Karimi, R.; Mora, L.; MacDougall, J.; Leboeuf, C.; Grentzmann, G.; Ehrenberg, M.; Buckingham, R. H., Ribosome release factor RF4 and termination factor RF3 are involved in dissociation of peptidyl - tRNA from the ribosome. *The EMBO Journal* **1998**, *17* (3), 808-816.
7. Ivry, S. L.; Meyer, N. O.; Winter, M. B.; Bohn, M. F.; Knudsen, G. M.; O'Donoghue, A. J.; Craik, C. S., Global substrate specificity profiling of post - translational modifying enzymes. *Protein Science* **2018**, *27* (3), 584-594.
8. Monod, J.; Changeux, J.-P.; Jacob, F., Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of molecular biology* **1963**, *6* (4), 306-329.
9. Link, H.; Kochanowski, K.; Sauer, U., Systematic identification of allosteric protein-metabolite interactions that control enzyme activity in vivo. *Nature biotechnology* **2013**, *31* (4), 357.
10. Lempp, M.; Farke, N.; Kuntz, M.; Freibert, S. A.; Lill, R.; Link, H., Systematic identification of metabolites controlling gene expression in E. coli. *Nature communications* **2019**, *10* (1), 1-9.
11. Fessenden, M., Metabolomics: Small molecules, single cells. *Nature* **2016**, *540* (7631), 153-156.
12. Yugi, K.; Kubota, H.; Toyoshima, Y.; Noguchi, R.; Kawata, K.; Komori, Y.; Uda, S.; Kunida, K.; Tomizawa, Y.; Funato, Y., Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell reports* **2014**, *8* (4), 1171-1183.
13. Emara, S.; Amer, S.; Ali, A.; Abouleila, Y.; Oga, A.; Masujima, T., Single-cell metabolomics. In *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*, Springer: 2017; pp 323-343.
14. German, J. B.; Hammock, B. D.; Watkins, S. M., Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics* **2005**, *1* (1), 3-9.
15. Comi, T. J.; Do, T. D.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V., Categorizing cells on the basis of

their chemical profiles: progress in single-cell mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*(11), 3920-3929.

16. Ali, A.; Abouleila, Y.; Shimizu, Y.; Hiyaama, E.; Emara, S.; Mashaghi, A.; Hankemeier, T., Single-cell metabolomics by mass spectrometry: advances, challenges, and future applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**.

17. Amantonico, A.; Urban, P. L.; Fagerer, S. R.; Balabin, R. M.; Zenobi, R., Single-cell MALDI-MS as an analytical tool for studying intrapopulation metabolic heterogeneity of unicellular organisms. *Analytical chemistry* **2010**, *82*(17), 7394-7400.

18. Gong, X.; Zhao, Y.; Cai, S.; Fu, S.; Yang, C.; Zhang, S.; Zhang, X., Single cell analysis with probe ESI-mass spectrometry: detection of metabolites at cellular and subcellular levels. *Analytical chemistry* **2014**, *86*(8), 3809-3816.

19. Date, S.; Mizuno, H.; Tsuyama, N.; Harada, T.; Masujima, T., Direct drug metabolism monitoring in a live single hepatic cell by video mass spectrometry. *Analytical Sciences* **2012**, *28*(3), 201-201.

20. Morikawa-Ichinose, T.; Fujimura, Y.; Murayama, F.; Yamazaki, Y.; Yamamoto, T.; Wariishi, H.; Miura, D., Improvement of Sensitivity and Reproducibility for Imaging of Endogenous Metabolites by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2019**, 1-9.

21. Asakawa, D.; Mizuno, H.; Toyo'oka, T., Gas-Phase Stability of Negatively Charged Organophosphate Metabolites Produced by Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2017**, *28*(12), 2561-2568.

22. Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L., Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* **2007**, *3*(3), 211-221.

23. Salek, R. M.; Steinbeck, C.; Viant, M. R.; Goodacre, R.; Dunn, W. B., The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience* **2013**, *2*(1), 13.

24. Lu, W.; Bennett, B. D.; Rabinowitz, J. D., Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of chromatography B* **2008**, *871*(2), 236-242.

25. Onjiko, R. M.; Moody, S. A.; Nemes, P., Single-cell mass spectrometry reveals small molecules that affect cell fates in the 16-cell embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*(21), 6545-6550.

26. Onjiko, R. M.; Portero, E. P.; Moody, S. A.; Nemes, P., In situ microprobe single-cell capillary electrophoresis mass spectrometry: metabolic reorganization in single differentiating cells in the live vertebrate (*Xenopus laevis*) embryo. *Analytical chemistry* **2017**, *89*(13), 7069-7076.

27. Chaleckis, R.; Meister, I.; Zhang, P.; Wheelock, C. E., Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC-MS-based metabolomics. *Current opinion in biotechnology* **2019**, *55*, 44-50.

28. Patti, G. J., Separation strategies for untargeted metabolomics. *Journal of separation science* **2011**, *34* (24), 3460-3469.
29. Soga, T.; Heiger, D. N., Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2000**, *72* (6), 1236-1241.
30. Soga, T.; Igarashi, K.; Ito, C.; Mizobuchi, K.; Zimmermann, H.-P.; Tomita, M., Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2009**, *81* (15), 6165-6174.
31. Fanali, C.; Dugo, L.; Dugo, P.; Mondello, L., Capillary-liquid chromatography (CLC) and nano-LC in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *52*, 226-238.
32. Rapp, E.; Tallarek, U., Liquid flow in capillary (electro) chromatography: Generation and control of micro - and nanoliter volumes. *Journal of separation science* **2003**, *26* (6 - 7), 453-470.
33. Sonnenberg, R. A.; Naz, S.; Cougnaud, L.; Vuckovic, D., Comparison of underivatized silica and zwitterionic sulfobetaine hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases for global metabolomics of human plasma. *Journal of Chromatography A* **2019**, *1608*, 460419.
34. Sillner, N.; Walker, A.; Harrieder, E.-M.; Schmitt-Kopplin, P.; Witting, M., Development and application of a HILIC UHPLC-MS method for polar fecal metabolome profiling. *Journal of Chromatography B* **2019**, *1109*, 142-148.
35. Wernisch, S.; Pennathur, S., Evaluation of coverage, retention patterns, and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2016**, *408* (22), 6079-6091.
36. Hopfgartner, G.; Bean, K.; Henion, J.; Henry, R., Ion spray mass spectrometric detection for liquid chromatography: a concentration-or a mass-flow-sensitive device? *Journal of Chromatography A* **1993**, *647* (1), 51-61.
37. Izumi, Y.; Kajiyama, S. i.; Nakamura, R.; Ishihara, A.; Okazawa, A.; Fukusaki, E.; Kanematsu, Y.; Kobayashi, A., High-resolution spatial and temporal analysis of phytoalexin production in oats. *Planta* **2009**, *229* (4), 931.
38. Izumi, Y.; Okazawa, A.; Bamba, T.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E., Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *648* (2), 215-225.
39. Myint, K. T.; Aoshima, K.; Tanaka, S.; Nakamura, T.; Oda, Y., Quantitative profiling of polar cationic metabolites in human cerebrospinal fluid by reversed-phase nanoliquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2009**, *81* (3), 1121-1129.
40. Myint, K. T.; Uehara, T.; Aoshima, K.; Oda, Y., Polar anionic metabolome analysis by nano-LC/MS with a metal chelating agent. *Analytical chemistry* **2009**, *81* (18), 7766-7772.
41. Chong, J.; Soufan, O.; Li, C.; Caraus, I.; Li, S.; Bourque, G.; Wishart, D. S.; Xia, J., MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic acids research* **2018**, *46* (W1), W486-W494.
42. Yong, Y. S.; Chong, E. T. J.; Chen, H. C.; Lee, P. C.; Ling, Y. S., A Comparative Study of

Pentafluorophenyl and Octadecylsilane Columns in High - throughput Profiling of Biological Fluids. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2017**, *64* (6), 699-710.

43. Lorieau, J.; Shoemaker, G. K.; Palcic, M. M., Quantitative nanopipettor for miniaturized chemical and biochemical reaction sampling. *Analytical chemistry* **2003**, *75* (22), 6351-6354.

44. Shoemaker, G. K.; Lorieau, J.; Lau, L. H.; Gillmor, C. S.; Palcic, M. M., Multiple sampling in single-cell enzyme assays using CE-laser-induced fluorescence to monitor reaction progress. *Analytical chemistry* **2005**, *77*(10), 3132-3137.

45. Sakaue-Sawano, A.; Kurokawa, H.; Morimura, T.; Hanyu, A.; Hama, H.; Osawa, H.; Kashiwagi, S.; Fukami, K.; Miyata, T.; Miyoshi, H., Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* **2008**, *132* (3), 487-498.

46. Yoshida, H.; Mizukoshi, T.; Hirayama, K.; Miyano, H., Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, *55* (3), 551-560.

47. Lu, W.; Kimball, E.; Rabinowitz, J. D., A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*(1), 37-50.

48. Preinerstorfer, B.; Schiesel, S.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W., Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from β -lactam antibiotics production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Journal of chromatography A* **2010**, *1217*(3), 312-328.

49. Wang, J.; Christison, T. T.; Misuno, K.; Lopez, L.; Huhmer, A. F.; Huang, Y.; Hu, S., Metabolomic profiling of anionic metabolites in head and neck cancer cells by capillary ion chromatography with Orbitrap mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2014**, *86*(10), 5116-5124.

50. Soga, T.; Ohashi, Y.; Ueno, Y.; Naraoka, H.; Tomita, M.; Nishioka, T., Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *Journal of proteome research* **2003**, *2*(5), 488-494.

51. Buescher, J. M.; Moco, S.; Sauer, U.; Zamboni, N., Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Analytical chemistry* **2010**, *82*(11), 4403-4412.

52. Luo, B.; Groenke, K.; Takors, R.; Wandrey, C.; Oldiges, M., Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **2007**, *1147* (2), 153-164.

53. Yanes, O.; Tautenhahn, R.; Patti, G. J.; Siuzdak, G., Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Analytical chemistry* **2011**, *83*(6), 2152-2161.

54. Jandera, P.; Janás, P., Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Analytica chimica acta* **2017**, *967*, 12-32.

55. Jandera, P., Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a

review. *Analytica chimica acta* **2011**, 692(1-2), 1-25.

56. Christopherson, M. J.; Yoder, K. J.; Hill, J. T., Hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC)/ion exchange separation of picolinic and nicotinic acids. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **2006**, 29(17), 2545-2558.

57. Idborg, H.; Zamani, L.; Edlund, P.-O.; Schuppe-Koistinen, I.; Jacobsson, S. P., Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2005**, 828(1-2), 9-13.

58. Karatapanis, A. E.; Fiamegos, Y. C.; Stalikas, C. D., A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218(20), 2871-2879.

59. Bacalum, E.; Tanase, M.; Cheregi, M.; Aboul-Enein, H. Y.; David, V., Retention mechanism in zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography (ZIC-HILIC) studied for highly polar compounds under different elution conditions. *Rev. Roum. Chim* **2016**, 61(6-7), 531-539.

60. Spalding, J. L.; Naser, F. J.; Mahieu, N. G.; Johnson, S. L.; Patti, G. J., Trace phosphate improves ZIC-pHILIC peak shape, sensitivity, and coverage for untargeted metabolomics. *Journal of proteome research* **2018**, 17(10), 3537-3546.

61. Li, K.; Naviaux, J. C.; Bright, A. T.; Wang, L.; Naviaux, R. K., A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. *Metabolomics* **2017**, 13(10), 122.

62. Gika, H. G.; Wilson, I. D.; Theodoridis, G. A., LC–MS-based holistic metabolic profiling. Problems, limitations, advantages, and future perspectives. *Journal of Chromatography B* **2014**, 966, 1-6.

63. Wishart, D. S.; Jewison, T.; Guo, A. C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E., HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic acids research* **2012**, 41(D1), D801-D807.

64. Kim, S.; Thiessen, P. A.; Bolton, E. E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B. A., PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research* **2015**, 44(D1), D1202-D1213.

65. Csizmadia, P. In *MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the World Wide Web*, Proceedings of ECSOC-3, the third international electronic conference on synthetic organic chemistry, September 1a30, 1999; p 367a369.

66. Contrepois, K.; Jiang, L.; Snyder, M., Optimized analytical procedures for the untargeted metabolomic profiling of human urine and plasma by combining hydrophilic interaction (HILIC) and reverse-phase liquid chromatography (RPLC)—mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **2015**, 14(6), 1684-1695.

67. Zhang, R.; Watson, D. G.; Wang, L.; Westrop, G. D.; Coombs, G. H.; Zhang, T., Evaluation of mobile phase characteristics on three zwitterionic columns in hydrophilic interaction liquid chromatography mode for liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based untargeted metabolite profiling of Leishmania parasites. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1362,

168-179.

68. Alpert, A. J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of chromatography A* **1990**, *499*, 177-196.

69. Gallart-Ayala, H.; Konz, I.; Mehl, F.; Teav, T.; Oikonomidi, A.; Peyratout, G.; van der Velpen, V.; Popp, J.; Ivanisevic, J., A global HILIC-MS approach to measure polar human cerebrospinal fluid metabolome: Exploring gender-associated variation in a cohort of elderly cognitively healthy subjects. *Analytica chimica acta* **2018**, *1037*, 327-337.

70. Wu, H.; Southam, A. D.; Hines, A.; Viant, M. R., High-throughput tissue extraction protocol for NMR-and MS-based metabolomics. *Analytical biochemistry* **2008**, *372* (2), 204-212.

71. Xie, B.; Wang, Y.; Jones, D. R.; Dey, K. K.; Wang, X.; Li, Y.; Cho, J.-H.; Shaw, T. I.; Tan, H.; Peng, J., Isotope Labeling-Assisted Evaluation of Hydrophilic and Hydrophobic Liquid Chromatograph–Mass Spectrometry for Metabolomics Profiling. *Analytical chemistry* **2018**, *90* (14), 8538-8545.

論文目録

K. Nakatani, Y. Izumi, K. Hata, T. Bamba, An analytical system for single-cell metabolomics of typical mammalian cells based on highly sensitive nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Mass Spectrometry*, in press

学会発表

国際学会

(口頭発表)

1. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Keita Sakurai, Michio Butsugan, Takeshi Bamba, Single-run comprehensive hydrophilic metabolome analysis by unified hydrophilic-interaction/anion-exchange liquid chromatography mass spectrometry, 8th Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference, Macau, China, January, 2020
※本発表は **Young Scientist Forum Best Presenter 2nd place** を受賞した.
※本発表は日本質量分析学会 AOMSC トラベルグラントによる支援を得た.

(ポスター発表)

2. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Keita Sakurai, Michio Butsugan, Takeshi Bamba, Single-run comprehensive hydrophilic metabolome analysis by unified hydrophilic-interaction/anion-exchange liquid chromatography mass spectrometry, 8th Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference, Macau, China, January, 2020
※本発表は日本質量分析学会 AOMSC トラベルグラント (同上) による支援を得た.
3. Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Keita Sakurai, Michio Butsugan, ○Takeshi Bamba, Novel analytical method for global metabolomic analysis by hydrophilic interaction/anion-exchange liquid chromatography tandem mass spectrometry, Metabolomics 2019, The Hague, Netherlands, June, 2019
4. Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Keita Sakurai, Michio Butsugan, ○Takeshi Bamba, Large-scale metabolomic analysis of hydrophilic metabolites using hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry with a novel polymer-based amino column, 67th American Society for Mass Spectrometry, Atlanta, USA, June, 2019
5. ○Yoshihiro Izumi, Kosuke Hata, Kohta Nakatani, Takeshi Hara, Shohei Yamamura, Masaki Matsumoto, Takeshi Bamba, A novel mass spectrometry-based analytical system for single-cell proteomics and metabolomics in mammalian cells, 67th American Society for Mass Spectrometry, Atlanta, USA, June, 2019
6. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Kousuke Hata, Takeshi Hara, Takeshi Bamba, Development of an analytical system for single-cell metabolomics based on high-sensitive nano-LC/MS/MS, 28th Hot Spring Harbor International Symposium 2018, Fukuoka, Japan, October, 2018
※本発表は **Early Career Investigator Award** を受賞した.
7. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Development of a highly sensitive analytical system using nano LC/MS/MS toward single cell metabolomics, International Conference on Single Cell Research 2016, Tokyo, Japan, November, 2016

国内学会

(口頭発表)

8. ○和泉 自泰, 中谷 航太, 高橋 政友, 櫻井 恵太, 佛願 道男, 馬場 健史, Unified HILIC/AEX/MS/MS による次世代メタボローム分析法の開発, 第 30 回クロマトグラフィー科学会議, 京都, 12 月, 2019 年
9. 中谷 航太, 和泉 自泰, 高橋 政友, 櫻井 恵太, 佛願 道男, ○馬場 健史, 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析による親水性代謝物の一斉分析法の開発, 第 71 回日本生物工学会, 岡山, 9 月, 2019 年

10. ○中谷 航太, 和泉 自泰, 高橋 政友, 桜井 恵太, 佛願 道男, 馬場 健史, 次世代メタボローム分析法: 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析の開発, 日本プロテオーム学会 2019 年大会 (JHUPO 第 17 回大会) /第 70 回 日本電気泳動学会総会, 宮崎, 7 月, 2019 年
11. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Takeshi Bamba, Novel analytical method for global metabolic analysis by unified hydrophilic interaction/anion exchange liquid chromatography tandem mass spectrometry, The 22nd RETREAT 2019, Kumamoto, July, 2019
12. 中谷 航太, ○和泉 自泰, 高橋 政友, 桜井 恵太, 佛願 道男, 馬場 健史, 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析による次世代メタボローム分析法の開発, 第 67 回質量分析総合討論会, つくば, 5 月, 2019 年
13. ○和泉 自泰, 原 健士, 中谷 航太, 秦 康祐, 山村 昌平, 向 紀雄, 松本 雅記, 馬場 健史, シングルセル分子フェノタイプ解析に向けた基盤技術開発, 第 12 回メタボロームシンポジウム, 鶴岡, 10 月, 2018 年
14. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Kousuke Hata, Takeshi Hara, Takeshi Bamba, Single-cell metabolomics based on single-cell sample preparation techniques and highly sensitive nano-LC/MS/MS, The 21st RETREAT 2018, Kumamoto, August, 2018
※本発表は Excellent Oral Presentation Award を受賞した.
15. ○中谷航太, 和泉自泰, 秦康祐, 馬場健史, Nano-LC/MS/MS による 1 細胞メタボローム分析システムの開発, 第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 11 月, 2017 年
 (ポスター発表)
16. ○中谷 航太, 和泉 自泰, 高橋 政友, 桜井 恵太, 佛願 道男, 馬場 健史, 次世代メタボローム分析法: 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析の開発, 日本プロテオーム学会 2019 年大会 (JHUPO 第 17 回大会) /第 70 回 日本電気泳動学会総会, 宮崎, 7 月, 2019 年
17. ○中谷航太, 和泉自泰, 秦康祐, 馬場健史, 高感度 nano-LC/MS/MS を基盤とした 1 細胞メタボローム分析システムの開発, 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会, 大阪, 5 月, 2018 年
※本発表は Best Presentation Award First Prize を受賞した.
18. ○和泉 自泰, 鈴木 隆弘, 高橋 政友, 中谷 航太, 押川 清孝, 木村 元一, 高原 健太郎, 松本 雅記, 馬場 健史, 分離モード並列化による親水性代謝物の包括的メタボローム分析, 第 65 回質量分析総合討論会, つくば, 5 月, 2017 年
19. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Development of highly sensitive nano LC/MS method for metabolome analysis of small cell population, The 20th RETREAT 2017, Kumamoto, July, 2017
※本発表は Excellent Poster Presentation Award を受賞した.
20. ○Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Nitnipa Soontornngun, Yukio Mukai, Eiichiro Fukusaki, Functional genomics of yeast putative biosynthetic genes in cysteine metabolism using widely targeted metabolome analysis, The 19th RETREAT 2016, Kumamoto, July, 2016

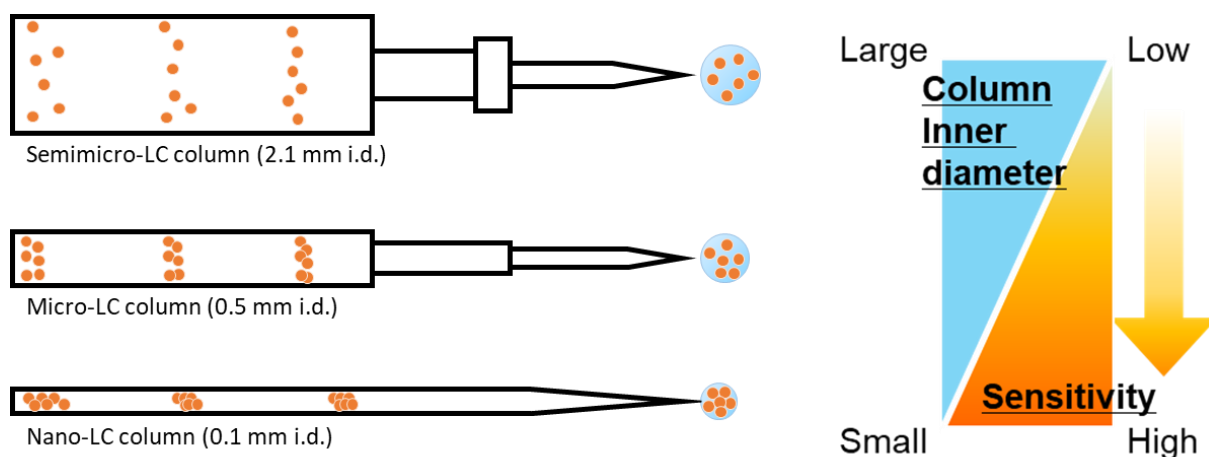
書籍

1. 中谷航太, 和泉自泰, 福崎英一郎, 馬場健史, メタボローム解析の現状と新規分析技術の開発, G.I.Research, 先端医学社, vol. 24, no. 4, pp 4-9, 2016 年

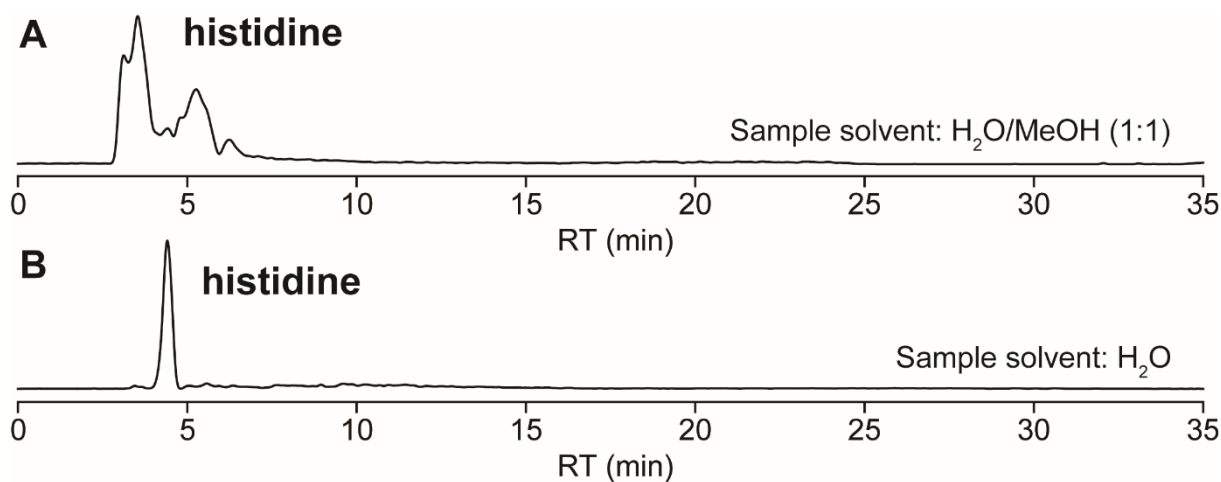
特許

1. 発明の名称：質量分析用標識組成物, 代謝物の定量分析法, 及び代謝物の動態解析法
発明者：脇村明夏里, 寺内勉, 馬場健史, 和泉自泰, 相馬悠希, 高橋政友, 中谷航太, 秦康祐
出願番号：特願 2019-090121
出願日：2019 年 (R1 年) 5 月 10 日
出願人：大陽日酸株式会社, 国立大学法人九州大学
2. 発明の名称：メタボロームの分離方法
発明者：櫻井恵太, 佛願道男, 馬場健史, 和泉自泰, 中谷航太
出願番号：特願 2018-210645
出願日：2018 年 (H30 年) 11 月 8 日
出願人：日立化成テクノサービス株式会社, 国立大学法人九州大学
3. 発明の名称：メタボローム分析用分離材及びメタボローム分析用カラム
発明者：櫻井恵太, 佛願道男, 馬場健史, 和泉自泰, 中谷航太
出願番号：特願 2018-210643
出願日：2018 年 (H30 年) 11 月 8 日
出願人：日立化成テクノサービス株式会社, 国立大学法人九州大学

付録



補足図 1. LC カラム内径と LC/MS の感度の関係の概要図



補足図 2. 試料溶媒が histidine のピーク形状に及ぼす影響

(A) Histidine を H₂O/MeOH (1:1) に溶解させたサンプルを分析した時のクロマトグラム.

(B) Histidine を H₂O に溶解させたサンプルを分析した時のクロマトグラム.

注入量は 100 nL.

補足表 1. 第二章で使した化合物情報及び MRM 条件

Name	pK _a -1	pK _a -2	pK _b -1	pK _b -2	Defined group	logP _{ow}	Precursor-1	Product-1	Q1 Pre Bias-1 (V)	CE-1 (V)	Q3 Pre Bias-1 (V)	Precursor-2	Product-2	Q1 Pre Bias-2 (V)	CE-2 (V)	Q3 Pre Bias-2 (V)
Ala	2.56		9.07		Zwitterionic	-2.84	90.05	44.05	-15	-14	-17	90.05	45.05	-15	-40	-17
Arg	2.5		11.86	8.73	Cationic	-3.16	174.90	70.20	-12	-24	-28	174.90	60.15	-13	-15	-23
Asn	2.11		8.07		Zwitterionic	-4.29	133.00	74.10	-12	-17	-16	133.00	88.10	-13	-13	-19
Asp	1.83	5.07	9.2		Anionic	-3.50	134.00	74.00	-12	-16	-26	134.00	88.15	-12	-12	-20
Cys	2.35	10.17	9.05		Zwitterionic	-2.79	122.20	59.10	-25	-24	-19	122.20	105.00	-17	-10	-24
Glu	1.99	4.27	9.12		Anionic	-3.24	147.80	84.10	-10	-17	-20	147.80	130.10	-14	-13	-13
Gly	2.31		9.24		Zwitterionic	-3.41	76.00	30.10	-12	-15	-28	76.00	30.90	-13	-40	-26
GSH	1.94	3.74	9.22		Cationic	-4.88	307.80	76.10	-14	-27	-28	307.80	179.05	-11	-13	-18
GSSG	1.44	2.03	9.61	9.01	Cationic	-2.08	612.90	355.15	-22	-24	-24	612.90	231.05	-22	-38	-22
His	1.97	12.53	9.03	6.34	Zwitterionic	-3.62	155.85	110.05	-11	-16	-11	155.85	83.15	-11	-26	-18
Met	2.62		9.09		Zwitterionic	-2.19	149.80	56.15	-12	-18	-22	149.80	104.10	-11	-14	-10
Phe	2.56		9.04		Zwitterionic	-1.18	166.10	120.10	-40	-15	-12	166.10	77.05	-40	-39	-30
Pro	2.05		10.83		Zwitterionic	-2.57	116.20	70.20	-15	-17	-28	116.20	28.05	-15	-38	-30
Ser	2.14	14.65	8.55		Zwitterionic	-3.89	105.80	60.15	-10	-13	-23	105.80	42.10	-11	-24	-17
Thr	2.31	14.44	8.61		Zwitterionic	-3.47	120.20	74.15	-15	-13	-12	120.20	56.15	-14	-18	-21
Trp	2.63		8.99		Zwitterionic	-1.09	205.20	146.10	-10	-18	-14	205.20	188.05	-10	-11	-19
Tyr	2.11	9.53	8.79		Zwitterionic	-1.49	182.20	136.10	-11	-13	-13	182.20	165.10	-10	-12	-17
Val	2.79		9.18		Zwitterionic	-1.95	117.90	72.20	-11	-13	-19	117.90	55.15	-10	-23	-22
Ile	2.86		9.17		Zwitterionic	-1.51	132.05	86.20	-12	-13	-18	132.05	69.20	-10	-21	-12
Leu	2.86		9.11		Zwitterionic	-1.59	131.85	86.20	-11	-13	-18	131.85	30.10	-10	-19	-30
Gln	2.25		8.91	-1.51	Zwitterionic	-4.00	147.00	84.10	-14	-19	-17	147.00	101.10	-14	-14	-21
Lys	2.81		9.84	9.03	Cationic	-3.21	146.85	84.15	-11	-19	-18	146.85	130.10	-11	-15	-12
Adenine	10.01		3.51		Uncharged	-0.57	136.20	119.00	-10	-26	-19	136.20	92.10	-18	-31	-19
Cytosine	9.71				Uncharged	-1.24	111.85	95.10	-10	-21	-20	111.85	52.05	-11	-33	-20
Guanine	8.11	11.06	1.46		Uncharged	-1.15	151.95	135.00	-13	-22	-20	151.95	110.10	-13	-22	-11
Adenosine	12.06	13.43	3.79	-0.96	Uncharged	-2.09	268.00	136.00	-13	-19	-23	268.00	119.05	-13	-47	-20
Cytidine	12.16	13.47			Uncharged	-2.80	243.80	112.10	-12	-12	-11	243.80	95.05	-12	-43	-18
Guanosine	11.49	12.18	2.86	-0.03	Uncharged	-2.71	283.90	151.95	-20	-15	-20	283.90	135.05	-13	-38	-20
Thymidine	9.69	13.45			Uncharged	-1.12	243.05	127.15	-12	-11	-13	243.05	117.05	-12	-14	-11
Uridine	9.44	12.22			Uncharged	-2.42	245.00	113.05	-12	-11	-11	245.00	70.10	-11	-37	-11
AMP	1.37	6.18	3.78	-0.96	Anionic	-4.75	348.00	136.05	-10	-21	-13	348.00	69.10	-10	-41	-25
CMP	1.37	6.16			Anionic	-2.92	324.00	112.10	-12	-14	-11	324.00	95.05	-15	-59	-20
dTMP	1.38	6.16			Anionic	-1.24	322.80	80.95	-12	-17	-18	322.80	207.15	-12	-9	-21
GMP	1.37	6.16	2.75	-0.14	Anionic	-2.71	363.80	152.10	-10	-17	-14	363.80	135.05	-10	-48	-23
UMP	1.37	6.16			Anionic	-2.54	325.10	97.15	-12	-17	-21	325.10	213.00	-10	-9	-23

注 1. pK_a , pK_b , $\log P_{ow}$ は ChemAxon を用いて取得した.

注 2. pK_{a-1} は最も酸性度の強い, pK_{a-2} は 2 番目に酸性度の強い, pK_{b-1} は最も塩基性度の強い, pK_{b-2} は 2 番目に塩基性度の強いプロトンドナーあるいはアクセプターの解離定数.

補足表 2. 単一 HeLa 細胞で検出された代謝物の相対ピークエリア値

	Single HeLa cells																						分散
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12	No.13	No.14	No.15	No.16	No.17	No.18	No.19	No.20	No.21	No.22	
Arg	<i>n.d.</i>	0.84	0.73	0.83	0.26	0.44	2.18	<i>n.d.</i>	2.24	0.82	0.31	0.43	0.87	1.14	1.19	1.24	1.45	1.32	1.86	0.17	3.17	0.52	0.65
Asp	0.40	1.01	<i>n.d.</i>	0.77	0.46	<i>n.d.</i>	1.17	<i>n.d.</i>	1.46	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.37	3.16	4.86	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.82	1.20	1.95	0.30	4.06	1.89
Glu	0.76	2.98	<i>n.d.</i>	0.50	<i>n.d.</i>	0.32	0.87	<i>n.d.</i>	2.96	<i>n.d.</i>	0.44	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2.51	3.16	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.51	0.72	2.86	<i>n.d.</i>	3.41	1.64
GSH	1.34	2.89	1.03	2.45	0.96	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.02	0.71	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.17	2.35	2.55	0.60	3.57	<i>n.d.</i>	0.68	0.24	<i>n.d.</i>	1.08	0.35	1.17
His	0.16	0.31	0.32	0.73	0.54	0.49	1.26	0.45	1.57	0.49	0.39	0.69	1.21	1.79	2.10	0.90	0.88	0.99	2.20	0.53	2.10	1.91	0.44
Phe	0.34	1.84	1.16	1.06	0.41	1.54	1.40	1.11	1.22	0.44	0.38	0.73	2.11	0.64	0.62	0.92	1.23	0.57	1.42	0.24	2.09	0.52	0.32
Pro	0.48	1.15	0.51	1.07	0.62	0.65	2.04	1.65	1.06	0.95	0.32	0.78	1.20	1.10	0.69	1.19	1.21	0.87	1.28	0.86	1.51	0.81	0.16
Ser	0.32	0.55	0.11	0.64	0.47	0.28	1.30	0.29	2.40	<i>n.d.</i>	0.12	<i>n.d.</i>	0.48	<i>n.d.</i>	5.01	<i>n.d.</i>	0.45	0.91	1.10	2.21	0.51	4.85	2.04
Thr	0.47	<i>n.d.</i>	0.66	1.07	0.98	0.28	1.28	0.22	2.25	0.34	0.40	0.30	0.70	2.54	2.99	0.11	0.53	0.76	1.42	1.44	0.29	2.97	0.84
Trp	0.27	1.35	0.66	1.42	0.58	1.31	0.77	0.94	0.58	0.38	0.49	0.90	3.17	0.81	1.01	1.02	1.07	0.59	1.60	0.42	2.11	0.57	0.44
Tyr	0.27	0.31	0.44	0.67	0.15	1.06	2.08	0.60	0.88	0.26	0.23	0.87	5.19	1.06	0.78	0.74	1.19	0.70	1.70	0.22	1.91	0.67	1.17
Val	1.29	3.01	1.99	0.83	0.44	0.85	1.20	0.72	0.76	0.35	0.28	0.67	2.00	0.56	0.65	1.11	0.55	0.58	1.12	0.32	2.15	0.58	0.49
Ile	0.64	1.29	1.44	0.86	0.37	1.58	1.49	0.79	0.58	0.22	0.30	0.62	2.48	0.61	0.66	0.81	1.14	0.68	1.45	0.32	3.03	0.65	0.49
Leu	0.48	1.15	1.06	0.74	0.26	1.57	1.46	1.01	0.90	0.24	0.23	0.80	2.66	0.67	0.59	0.87	1.32	0.64	1.36	0.27	3.12	0.61	0.54
Gln	0.66	0.50	0.13	0.66	0.44	0.77	0.52	0.41	0.80	0.50	0.40	1.02	0.58	1.41	3.95	0.11	1.43	1.18	0.76	2.54	0.30	2.94	0.93
Lys	0.26	0.40	<i>n.d.</i>	0.37	0.40	0.33	1.05	0.73	2.06	0.72	0.61	0.97	1.47	1.66	2.53	1.16	0.65	0.67	1.86	0.69	1.10	2.29	0.49
Adenosine	<i>n.d.</i>	0.91	1.02	0.58	0.79	1.17	1.96	0.78	1.34	0.27	0.76	0.92	1.79	0.73	1.93	0.67	1.17	0.69	1.16	0.32	2.48	0.59	0.36
dTMP	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.65	0.83	1.02	0.36	3.46	2.32	0.71	1.13	2.71	1.86	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.20	3.33	0.19	0.56	<i>n.d.</i>	1.66	<i>n.d.</i>	1.23

検出されなかった代謝物は *n.d.* (not detected) と表記した。検出されなかった代謝物のピークエリア値は便宜上 0 とした。各代謝物のデータは、平均値で割って補正した。

補足表 2. 第三章で測定対象とした化合物の MRM 条件と unified HILIC/AEX/MS/MS の分析性能

Name	Molecular fomula	Ion name	Transition1					Transition2					RT (min)	LLOQ (fmol)	ULOQ (fmol)	Linerity (R^2)
			Precursor	Product	Q1	CE	Q3	Precursor	Product	Q1	CE	Q3				
					Pre Bias (V)	(V)	Pre Bias (V)			Pre Bias (V)	(V)	Pre Bias (V)				
(1R,3R,4R,5R)-(-)-Quinic acid	C7H12O6	(M-H)-	191.25	85.05	12	22	10	191.25	93.05	13	22	17	6.8	100	100000	0.983
(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid	C20H23N7O7	(M+H)+	474.15	327.00	-40	-22	-22	474.15	299.00	-22	-34	-14	13.1	10	100000	0.999
(R)-4-Hydroxymandelate	C8H8O4	(M-H)-	167.10	123.00	16	12	11	167.10	121.00	21	22	21	5.6	4000	100000	0.980
10-Camphorsulfonic acid (IS)	C10H16O4S	(M-H)-	231.25	79.90	13	31	18						1.9	40	100000	1.000
1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid	C4H7NO2	(M+H)+	101.80	56.15	-10	-14	-22	101.80	28.05	-10	-24	-30	5.1	1000	100000	0.970
1-Butylamine	C4H11N	(M+H)+	74.10	57.15	-13	-16	-22	74.10	29.05	-14	-22	-29	1.8	40	100000	0.964
1-Methyladenosine	C11H15N5O4	(M+H)+	281.90	149.90	-20	-20	-20	281.90	133.10	-13	-43	-13	2.5	10	40000	0.970
1-Methylhistamine	C6H11N3	(M+H)+	125.90	109.05	-12	-19	-22	125.90	68.10	-12	-23	-11	2.1	4000	100000	0.944
1-Methylhistidine	C7H11N3O2	(M+H)+	170.00	124.10	-15	-16	-12	170.00	83.15	-16	-24	-18	4.7	40	100000	0.966
2,3-Bisphosphoglycerate	C3H8O10P2	(M+H)+	266.90	168.95	-13	-14	-17	266.90	123.05	-13	-26	-12	18.4	10000	100000	0.993
2,3-Pyridinedicarboxylic acid	C7H5NO4	(M+H)+	168.00	78.05	-14	-24	-16	168.00	150.05	-17	-13	-14	13.5	10000	100000	0.987
2,6-Diaminopurine	C5H6N6	(M+H)+	150.90	134.05	-14	-22	-13	150.90	107.05	-14	-28	-20	2.8	10	40000	0.971
2,6-Pyridinedicarboxylic acid	C7H5NO4	(M+H)+	167.80	122.00	-12	-19	-20	167.80	150.05	-13	-15	-14	15.1	1000	100000	0.994
2-Aminobenzoic acid	C7H7NO2	(M+H)+	138.20	120.05	-10	-14	-20	138.20	92.15	-10	-24	-18	3.7	4000	100000	0.999
2-Aminobutanoic acid	C4H9NO2	(M+H)+	104.20	58.15	-10	-14	-23	104.20	41.10	-12	-23	-16	4.8	400	100000	0.987
2-aminoisobutyrate	C4H9NO2	(M+H)+	104.20	58.10	-10	-15	-22	104.20	59.10	-13	-22	-22	4.6	100	100000	0.988
2-Aminopimelic acid	C7H13NO4	(M+H)+	175.90	112.10	-16	-17	-11	175.90	158.10	-16	-14	-15	10	400	100000	1.000
2-Bromohypoxanthine (IS)	C5H3BrN4O	(M+H)+	214.75	135.10	-10	-23	-13	214.75	108.05	-10	-34	-17	5.8	10	100000	0.996
2-C-methyl D-erythritol 4-phosphate	C5H13O7P	(M+H)+	216.80	99.05	-10	-13	-10	216.80	101.15	-10	-13	-10	13.9	1000	100000	1.000
2-Dehydro-D-gluconate	C6H10O7	(M-H)-	193.10	103.00	13	11	21	193.10	58.95	12	23	20	9	40	100000	0.998
2'-Deoxyadenosine 5'-monophosphate	C10H14N5O6P	(M+H)+	332.05	136.05	-16	-17	-14	332.05	81.00	-38	-31	-14	13.2	10	100000	0.997
2'-Deoxycytidine 5'-monophosphate	C9H14N3O7P	(M+H)+	307.80	112.10	-14	-12	-11	307.80	95.05	-14	-56	-21	13.5	400	100000	0.997
2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	C10H14N5O7P	(M+H)+	348.00	152.15	-10	-14	-15	348.00	135.10	-10	-45	-28	15.9	100	100000	1.000
2'-Deoxyuridine	C9H12N2O5	(M+H)+	229.00	113.05	-11	-11	-18	229.00	117.15	-12	-9	-25	2.3	4000	100000	0.997
2'-Deoxyuridine 5'-phosphate	C9H13N2O8P	(M+H)+	309.10	81.10	-15	-16	-17	309.10	193.20	-16	-8	-19	13.7	1000	100000	0.997
2'-Deoxyuridine 5'-triphosphate	C9H15N2O14P3	(M+NH4)+	485.90	469.00	-13	-11	-22	485.90	81.10	-13	-25	-17	17.8	1000	100000	0.984
2-Diethylaminoethanol	C6H15NO	(M+H)+	118.25	100.20	-11	-18	-10	118.25	44.10	-14	-24	-17	1.2	40	100000	0.958
2-Hydroxy glutaric acid	C5H8O5	(M-H)-	147.20	129.05	14	13	24	147.20	61.95	22	14	11	12.5	1000	100000	0.997
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	C5H10O3	(M-H)-	117.25	71.00	11	11	15	117.25	44.85	11	12	15	2.9	400	100000	1.000
2-Hydroxyphenylacetic acid	C8H8O3	(M-H)-	151.10	107.00	14	12	22						2.4	40	100000	1.000
2-Isopropylmalic acid	C7H12O5	(M-H)-	175.25	115.05	20	15	10	175.25	113.10	21	15	10	12.4	10	100000	0.969

2-Ketoadipic acid	C6H8O5	(M-H)-	159.25	59.00	13	13	13	159.25	115.10	13	11	22	14.5	1000	100000	1.000
2-Ketoglutaric acid	C5H6O5	(M-H)-	145.10	101.00	13	10	17	145.10	57.05	14	12	13	14.5	40000	100000	1.000
2-Methyl-3-Hydroxybutyric acid	C5H10O3	(M-H)-	117.30	73.00	11	11	17	117.30	55.10	11	23	13	3.8	100	100000	0.998
2-Methylhippuric acid	C10H11NO3	(M+H)+	194.00	119.05	-10	-12	-12	194.00	91.10	-10	-31	-19	2.8	10	40000	0.994
2-Phenylpropionate (Hydratropic acid)	C9H10O2	(M-H)-	149.30	105.05	20	9	19						2.7	4000	100000	0.999
2-Phospho-D-glyceric acid or 3-Phospho-D-glyceric acid	C3H7O7P	(M+H)+	187.10	99.00	-11	-22	-16	187.10	81.00	-10	-39	-29	17.1	4000	100000	0.999
3,4-Dihydroxybenzoate	C7H6O4	(M-H)-	153.10	109.00	14	15	22	153.10	108.00	14	25	20	2.4	40000	100000	1.000
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	C8H8O4	(M-H)-	167.10	123.05	16	9	10	167.10	95.05	15	20	21	6.7	10000	100000	0.990
3-Amino-2,3-dihydrobenzoic acid	C7H9NO2	(M+H)+	140.20	39.10	-15	-47	-15	140.20	122.05	-26	-18	-14	2.6	10000	100000	0.883
3-Cyano-L-alanine	C4H6N2O2	(M-H)-	113.20	96.00	11	12	22						4.5	400	100000	0.950
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	C6H10O5	(M-H)-	161.25	99.00	13	11	20	161.25	57.05	19	18	10	11.9	10	100000	0.982
3-Hydroxybenzoic acid	C7H6O3	(M-H)-	137.25	93.00	13	12	12						5.6	1000	100000	0.997
3-Hydroxyisovaleric acid	C5H10O3	(M-H)-	117.25	59.00	11	12	12	117.25	40.95	11	25	10	3	400	100000	0.999
3-Hydroxykynurenine	C10H12N2O4	(M+H)+	225.00	208.10	-11	-10	-20	225.00	110.15	-11	-17	-11	6.4	400	100000	0.999
3-Hydroxyphenylacetic acid	C8H8O3	(M-H)-	151.30	107.10	15	10	11						5	1000	100000	0.993
3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetate	C9H10O4	(M-H)-	181.10	137.10	16	10	24	181.10	121.95	22	13	10	4.6	4000	100000	1.000
3-Methyladenine	C6H7N5	(M+H)+	149.90	108.05	-14	-31	-18	149.90	123.15	-14	-25	-12	1.7	10	40000	0.979
3-Methylamino-L-alanine	C4H10N2O2	(M+H)+	119.20	44.15	-16	-17	-17	119.20	102.05	-15	-15	-21	6.1	1000	100000	0.997
3-Methylglutaric acid	C6H10O4	(M-H)-	145.25	101.05	13	13	10	145.25	83.00	13	14	19	11.8	4000	100000	0.998
3-Pyridylacetic acid	C7H7NO2	(M+H)+	138.00	93.15	-13	-26	-19	138.00	120.00	-14	-21	-12	3.8	10	10000	1.000
4-Guanidinobutanoate	C5H11N3O2	(M+H)+	145.90	87.15	-13	-17	-18	145.90	86.40	-13	-20	-16	5.8	40	100000	0.972
4-Hydroxybenzoic acid	C7H6O3	(M-H)-	137.25	93.00	13	13	11	137.25	64.95	17	29	13	6.8	1000	100000	1.000
4-Hydroxybenzyl alcohol	C7H8O2	(M-H)-	123.30	105.00	17	13	20	123.30	77.00	17	16	17	1.3	1000	100000	0.999
4-Hydroxyphenylacetic acid	C8H8O3	(M-H)-	151.25	107.10	18	10	10						5.2	4000	100000	0.998
4-Hydroxyphenylethanol	C8H10O2	(M-H)-	137.10	106.00	13	17	21	137.10	119.05	13	18	26	1.2	1000	100000	0.999
4-Hydroxypyridine	C5H5NO	(M+H)+	95.80	39.10	-10	-37	-14	95.80	41.05	-10	-27	-16	2.2	400	100000	0.988
4-Methyl-2-oxovaleric acid	C6H10O3	(M-H)-	129.30	85.00	18	10	17	129.30	57.05	18	10	10	16.9	1000	100000	0.986
4-Toluenesulfonic acid	C7H8O3S	(M-H)-	171.20	79.95	22	26	10	171.20	107.05	17	21	22	1.9	40	100000	0.998
5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate	C9H15N4O8P	(M-H)-	337.00	78.90	15	29	17	337.00	96.95	15	21	13	14.2	400	100000	1.000
5-Aminopentanoate	C5H11NO2	(M+H)+	118.20	101.15	-15	-14	-10	118.20	55.00	-15	-22	-22	6.2	100	100000	0.995
5-Dehydroquinic acid	C7H10O6	(M-H)-	189.10	171.15	12	10	16	189.10	127.05	20	15	10	7.4	1000	100000	0.998
5-Hydroxyanthranilic acid	C7H7NO3	(M+H)+	154.00	136.05	-14	-15	-13	154.00	108.05	-14	-23	-23	6.1	100	100000	0.995
5-Hydroxyindoleacetate	C10H9NO3	(M+H)+	191.80	146.05	-14	-15	-14	191.80	118.15	-14	-30	-24	6.8	1000	100000	0.997
5-Hydroxy-L-lysine	C6H14N2O3	(M+H)+	162.90	128.10	-14	-14	-13	162.90	82.15	-14	-19	-17	9.1	1000	100000	0.999
5-Hydroxy-L-tryptophan	C11H12N2O3	(M+H)+	221.10	204.05	-20	-11	-20	221.10	162.05	-18	-19	-16	6.4	100	100000	0.999
5-Hydroxymethyluracil	C5H6N2O3	(M-H)-	141.10	59.00	14	11	12	141.10	41.90	13	15	13	3.3	1000	100000	0.992
5-Methoxytryptamine	C11H14N2O	(M+H)+	191.05	173.95	-20	-10	-20	191.05	130.10	-10	-39	-12	1.5	10	40000	0.984
5-Methylcytosine	C5H7N3O	(M+H)+	126.20	109.10	-11	-22	-21	126.20	54.10	-11	-30	-20	2.3	100	100000	0.969

5'-Methylthioadenosine	C11H15N5O3S	(M+H)+	298.00	136.00	-20	-20	-20	298.00	119.10	-14	-54	-19	1.6	10	10000	1.000
5-Sulfosalicylate	C7H6O6S	(M-H)-	217.00	199.00	22	13	19	217.00	170.95	13	23	16	13	100	100000	0.998
6-Hydroxynicotinic acid	C6H5NO3	(M+H)+	140.00	122.00	-10	-22	-21	140.00	51.15	-13	-36	-20	5.8	1000	100000	0.999
6-Phosphogluconic acid	C6H13O10P	(M+H)+	277.10	259.05	-10	-8	-17	277.10	56.95	-13	-33	-22	16.9	40000	100000	1.000
Acetaminophen	C8H9NO2	(M+H)+	151.85	110.10	-13	-18	-11	151.85	65.10	-13	-33	-25	1.3	40	100000	0.933
Acetoacetyl-Coenzyme A	C25H40N7O18P3S	(M+H)+	852.00	345.10	-24	-33	-24	852.00	136.15	-24	-52	-24	17.1	1000	100000	1.000
Acetyl-Coenzyme A	C23H38N7O17P3S	(M+H)+	810.05	124.20	-28	-50	-20	810.05	303.20	-22	-35	-20	16.1	40	100000	1.000
Acetylglycine	C4H7NO3	(M+H)+	117.85	76.05	-10	-11	-12	117.85	43.10	-10	-25	-16	4.4	4000	100000	0.990
Adenine	C5H5N5	(M+H)+	136.20	119.00	-10	-26	-19	136.20	92.10	-18	-31	-19	2.8	10	100000	0.975
Adenosine	C10H13N5O4	(M+H)+	268.00	136.00	-13	-19	-23	268.00	119.05	-13	-47	-20	2.5	10	40000	0.992
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	C10H12N5O6P	(M+H)+	329.80	136.10	-15	-26	-13	329.80	312.05	-15	-18	-14	5	40	100000	1.000
Adenosine 5'-diphosphate	C10H15N5O10P2	(M+H)+	428.00	136.10	-12	-25	-25	428.00	119.05	-19	-63	-25	17.1	100	100000	0.999
Adenosine 5'-diphosphate glucose	C16H25N5O15P2	(M+H)+	590.00	428.05	-26	-15	-29	590.00	136.10	-28	-51	-27	12.9	40	100000	0.999
Adenosine 5'-diphosphate ribose	C15H23N5O14P2	(M+H)+	559.95	136.10	-26	-41	-27	559.95	348.10	-26	-21	-23	17.5	10000	100000	1.000
Adenosine 5'-monophosphate	C10H14N5O7P	(M+H)+	348.00	136.05	-10	-21	-13	348.00	69.10	-10	-41	-25	13.9	40	100000	1.000
Adenosine 5'-triphosphate	C10H16N5O13P3	(M+H)+	507.95	136.05	-24	-34	-30	507.95	410.00	-22	-19	-27	17.9	400	100000	0.999
Adenylosuccinic acid	C14H18N5O11P	(M+H)+	463.80	252.10	-13	-22	-26	463.80	162.10	-10	-46	-15	17.2	400	100000	0.995
Agmatine	C5H14N4	(M+H)+	130.90	72.20	-12	-17	-16	130.90	60.15	-12	-14	-24	10.3	4000	100000	1.000
Alanyllalanin	C6H12N2O3	(M+H)+	161.20	44.10	-10	-15	-17	161.20	90.15	-10	-12	-21	4.8	100	100000	0.997
Albiflorin	C23H28O11	(M+H)+	480.90	197.10	-11	-14	-20	480.90	105.10	-11	-25	-10	1.4	400	100000	0.995
Allantoic acid	C4H8N4O4	(M-H)-	175.25	89.00	17	14	11	175.25	132.10	22	11	26	7.2	400	100000	0.996
Alpha-D-Glucosamine 1-phosphate	C6H14NO8P	(M-H)-	258.00	78.95	12	21	16	258.00	96.75	25	14	11	14.5	1000	100000	0.999
Alpha-Hydroxyisobutyric acid	C4H8O3	(M-H)-	103.10	57.00	15	14	15	103.10	44.90	15	13	10	3.5	1000	100000	0.999
alpha-Methylbenzylamine	C8H11N	(M+H)+	122.20	105.10	-12	-13	-21	122.20	77.10	-14	-30	-30	1.1	40	100000	0.979
Amino adipic acid	C6H11NO4	(M+H)+	162.05	98.10	-17	-17	-16	162.05	55.05	-16	-30	-22	10.3	100	100000	1.000
Ascorbic acid	C6H8O6	(M-H)-	175.10	115.00	19	13	22	175.10	87.00	19	18	10	16.3	10000	100000	0.999
Azelaic acid	C9H16O4	(M-H)-	187.10	125.05	17	13	12	187.10	97.05	17	18	12	10.7	400	100000	0.996
Benzoic acid	C7H6O2	(M-H)-	121.25	77.00	11	12	15						3.2	400	100000	1.000
Beta-Alanine	C3H7NO2	(M+H)+	90.05	30.05	-10	-16	-30	90.05	72.20	-10	-13	-15	6.1	400	100000	0.989
Beta-glutamic acid	C5H9NO4	(M+H)+	148.05	88.15	-10	-15	-18	148.05	70.10	-10	-23	-26	8.7	100	100000	1.000
Betaine	C5H11NO2	(M+H)+	117.90	58.15	-11	-29	-22	117.90	59.15	-11	-22	-23	2.2	40	100000	0.949
Beta-Lactose	C12H22O11	(M+NH4)+	360.20	163.15	-10	-17	-16	360.20	343.25	-10	-8	-24	7	4000	100000	0.999
Bicine	C6H13NO4	(M+H)+	164.20	118.10	-11	-16	-11	164.20	56.15	-10	-27	-21	4.6	10	40000	0.991
Bilirubin	C33H36N4O6	(M-H)-	583.00	285.05	26	27	18	583.00	213.25	32	42	12	5.3	40000	100000	1.000
Biopterin	C9H11N5O3	(M+H)+	238.20	220.15	-12	-15	-22	238.20	178.15	-11	-21	-18	6.5	400	100000	1.000
Biotin	C10H16N2O3S	(M+H)+	244.80	227.15	-10	-15	-22	244.80	97.10	-12	-33	-21	4.4	40	100000	0.995
Cadaverine	C5H14N2	(M+H)+	103.25	86.10	-14	-13	-19	103.25	41.15	-11	-25	-17	8.3	40000	100000	1.000
Caffeine	C8H10N4O2	(M+H)+	194.90	138.10	-10	-20	-13	194.90	42.10	-10	-38	-16	1.1	40	100000	0.984
Camptothecin	C20H16N2O4	(M+H)+	349.00	305.15	-10	-24	-21	349.00	219.05	-10	-52	-21	1.1	400	100000	0.922
Carnitine	C7H15NO3	(M+H)+	162.00	103.05	-14	-18	-10	162.00	60.20	-14	-18	-23	3.6	10	40000	0.996

Carnosine	C9H14N4O3	(M+H)+	227.05	110.15	-10	-25	-22	227.05	210.15	-11	-12	-20	7	100	100000	1.000
Choline	C5H13NO	(M+H)+	104.25	60.10	-14	-22	-23	104.25	45.10	-15	-23	-17	2.3	10	100000	0.992
Ciliatine	C2H8NO3P	(M+H)+	126.00	109.05	-12	-18	-11	126.00	80.90	-12	-23	-30	11.7	4000	100000	0.999
cis-Aconitic acid	C6H6O6	(M-H)-	173.20	85.00	19	12	20	173.20	129.05	18	11	12	17	400	100000	0.989
Citraconic acid	C5H6O4	(M-H)-	129.20	85.00	12	10	10	129.20	41.05	12	15	14	13.1	10	100000	0.958
Citramalic acid	C5H8O5	(M-H)-	147.10	87.00	14	14	10	147.10	85.00	14	15	17	12.8	1000	100000	0.991
Citric acid	C6H8O7	(M-H)-	191.20	111.00	12	11	19	191.20	86.95	22	17	27	17	1000	100000	0.983
Coenzyme A	C21H36N7O16P3S	(M+H)+	768.00	261.10	-20	-32	-17	768.00	428.05	-20	-30	-28	16.7	400	100000	0.999
Coniferyl alcohol	C10H12O3	(M-H)-	179.30	146.10	21	16	29	179.30	164.05	26	15	28	1.2	400	100000	1.000
Creatine	C4H9N3O2	(M+H)+	132.00	90.10	-12	-15	-19	132.00	44.05	-12	-22	-17	4.9	10	100000	0.978
Creatinine	C4H7N3O	(M+H)+	113.85	44.05	-11	-21	-16	113.85	43.05	-11	-42	-16	1.9	40	100000	0.925
Cyclic adenosine diphosphate-ribose	C15H21N5O13P2	(M+H)+	541.80	136.10	-20	-42	-21	541.80	428.00	-20	-21	-19	12.9	4000	100000	0.999
Cystamine	C4H12N2S2	(M+H)+	152.80	108.10	-13	-14	-22	152.80	76.05	-14	-22	-28	2.6	4000	100000	0.998
Cytidine	C9H13N3O5	(M+H)+	243.80	112.10	-12	-12	-11	243.80	95.05	-12	-43	-18	3.7	100	100000	0.997
Cytidine 5'-diphosphate	C9H15N3O11P2	(M+H)+	403.95	112.10	-11	-22	-24	403.95	387.10	-11	-10	-25	17.1	100	100000	0.998
Cytidine 5'-triphosphate	C9H16N3O14P3	(M+H)+	484.05	112.10	-11	-24	-23	484.05	208.05	-11	-17	-21	17.7	400	100000	0.999
Cytidine-5'-monophosphate	C9H14N3O8P	(M+H)+	324.00	112.10	-12	-14	-11	324.00	95.05	-15	-59	-20	14.3	100	100000	0.999
Cytosine	C4H5N3O	(M+H)+	111.85	95.10	-10	-21	-20	111.85	52.05	-11	-33	-20	2.7	40	10000	0.999
Deoxyadenosine	C10H13N5O3	(M+H)+	251.90	136.00	-20	-15	-20	251.90	119.10	-12	-44	-18	1.8	10	10000	1.000
Deoxyadenosine 5'-triphosphate	C10H16N5O12P3	(M+H)+	491.90	136.05	-13	-20	-13	491.90	81.00	-23	-39	-13	17.9	400	100000	1.000
Deoxycytidine	C9H13N3O4	(M+H)+	227.85	112.05	-11	-10	-11	227.85	95.10	-11	-39	-20	2.8	10	10000	0.983
Deoxycytidine 5'-triphosphate	C9H16N3O13P3	(M+H)+	467.90	112.10	-13	-19	-11	467.90	81.00	-13	-32	-18	17.6	400	100000	1.000
Deoxyguanosine	C10H13N5O4	(M+H)+	267.85	152.10	-10	-11	-15	267.85	135.00	-12	-35	-21	4.6	40	100000	0.995
Deoxyinosine	C10H12N4O4	(M+H)+	253.00	137.10	-12	-9	-13	253.00	110.05	-11	-41	-11	4.4	40	100000	0.989
Deoxythymidine 5'-diphosphate	C10H16N2O11P2	(M-H)-	400.90	79.05	18	44	19	400.90	275.10	13	19	28	16.8	400	100000	0.999
Deoxythymidine 5'-monophosphate	C10H15N2O8P	(M+H)+	322.80	80.95	-12	-17	-18	322.80	207.15	-12	-9	-21	13.3	400	100000	0.993
Deoxythymidine 5'-triphosphate	C10H17N2O14P3	(M+H)+	483.00	80.95	-22	-38	-34	483.00	53.00	-30	-54	-18	17.7	10000	100000	0.990
D-Erythrose	C4H8O4	(M+H)+	121.30	77.15	-14	-9	-17	121.30	92.90	-23	-16	-21	12.2	4000	100000	0.998
Dethiobiotin	C10H18N2O3	(M+H)+	215.15	197.05	-26	-14	-20	215.15	179.10	-24	-19	-18	3.8	40	40000	0.994
D-Fructose 1,6-bisphosphate	C6H14O12P2	(M+H)+	340.90	323.05	-16	-11	-22	340.90	127.15	-10	-22	-11	17.3	40000	100000	1.000
D-Glucarate	C6H10O8	(M-H)-	209.20	85.00	13	13	11	209.20	191.20	11	8	24	13.6	400	100000	0.991
D-Gluconic acid	C6H12O7	(M-H)-	195.20	74.95	12	18	16	195.20	129.00	12	10	12	8.7	400	100000	1.000
D-Glucosamine or D-Galactosamine	C6H13NO5	(M+H)+	180.20	162.10	-10	-11	-16	180.20	72.20	-10	-17	-27	5	1000	100000	0.999
D-Glyceric acid	C3H6O4	(M-H)-	105.10	74.95	10	13	18	105.10	57.00	10	16	11	6	4000	100000	0.990
Dimethylbenzimidazole	C9H10N2	(M+H)+	146.90	131.05	-13	-35	-13	146.90	132.05	-13	-28	-21	1.2	10	40000	0.998
Dimethylglycine	C4H9NO2	(M+H)+	104.05	58.10	-10	-16	-22	104.05	44.05	-10	-42	-15	3.4	10	100000	0.944
DL-2-Hydroxybutyric acid	C4H8O3	(M-H)-	103.25	57.00	10	12	13	103.25	45.00	10	13	15	3.6	10000	100000	1.000
DL-3-Aminoisobutyric acid	C4H9NO2	(M+H)+	104.20	86.10	-13	-12	-17	104.20	30.10	-13	-17	-30	5.4	4000	100000	0.987
DL-4-Hydroxyphenyllactic acid	C9H10O4	(M-H)-	181.25	163.05	20	13	15	181.25	135.10	22	15	12	5	100	100000	0.988
DL-Beta-Phenyllactic acid	C9H10O3	(M-H)-	165.25	147.10	16	14	13	165.25	103.05	15	16	20	2.8	400	100000	1.000

DL-Ethionine	C6H13NO2S	(M+H)+	163.85	56.15	-14	-18	-21	163.85	75.05	-15	-22	-28	3.6	400	100000	0.999
DL-Hexanoylcarnitine	C13H25NO4	(M+H)+	260.00	84.85	-20	-25	-20	260.00	201.15	-12	-14	-20	1.5	10	10000	1.000
DL-Homocysteine	C4H9NO2S	(M+H)+	136.15	90.15	-10	-13	-18	136.15	56.05	-17	-21	-20	5.3	4000	100000	0.998
DL-Homocysteine thiolactone	C4H7NOS	(M+H)+	118.00	90.10	-12	-12	-20	118.00	56.10	-13	-18	-22	1.2	400	100000	0.998
DL-Homocystine	C8H16N2O4S2	(M+H)+	269.00	136.10	-13	-11	-13	269.00	134.10	-13	-15	-13	10.5	100	100000	1.000
DL-methionine sulfoxide	C5H11NO3S	(M+H)+	166.00	74.10	-12	-15	-28	166.00	56.15	-11	-26	-22	5.7	40	100000	0.996
D-Mannitol	C6H14O6	(M+NH4)+	199.90	183.10	-14	-9	-18	199.90	69.05	-10	-18	-25	6.7	40000	100000	1.000
Dodecanedioic acid	C12H22O4	(M-H)-	229.15	211.20	14	15	21	229.15	167.15	15	15	10	8.6	40	100000	0.999
Dopamine	C8H11NO2	(M+H)+	154.20	137.15	-10	-14	-13	154.20	91.15	-11	-25	-19	4.9	100	100000	0.999
D-Prephenyllactate	C13H14O8	(M+H)+	299.05	281.00	-34	-18	-18	299.05	283.05	-22	-15	-18	11.1	4000	100000	0.998
D-Ribulose 1,5-bisphosphate	C5H12O11P2	(M-H)-	309.10	96.90	13	18	21	309.10	78.80	15	44	20	17.4	40000	100000	1.000
D-Ribulose 5-phosphate	C5H11O8P	(M-H)-	229.20	96.90	13	9	20	229.20	78.95	15	35	19	14.3	4000	100000	0.997
D-Sedoheptulose 7-phosphate	C7H15O10P	(M-H)-	288.95	97.00	13	18	19	288.95	78.95	13	40	15	14.9	4000	100000	0.998
D-Turanose	C12H22O11	(M+NH4)+	360.05	163.15	-10	-16	-16	360.05	325.15	-10	-10	-21	6.5	100	100000	0.997
D-Xylose	C5H10O5	(M+NH4)+	168.10	151.10	-14	-12	-15	168.10	89.10	-12	-14	-20	5.8	40000	100000	1.000
Ethanolamine	C2H7NO	(M+H)+	61.80	44.05	-26	-15	-17	61.80	45.15	-11	-20	-17	3.1	4000	100000	0.950
Ethylmalonic acid	C5H8O4	(M-H)-	131.10	87.00	12	10	11	131.10	69.00	12	24	18	12.9	100	100000	0.998
Flavanone	C15H12O2	(M+H)+	224.90	121.00	-19	-20	-25	224.90	77.05	-11	-43	-29	1	40000	100000	1.000
Flavin adenine dinucleotide	C27H33N9O15P2	(M-H)-	783.95	437.10	22	28	19	783.95	346.00	22	33	21	11.9	40	100000	0.999
Flavin mononucleotide	C17H21N4O9P	(M+H)+	456.85	439.10	-12	-18	-20	456.85	359.15	-12	-23	-16	13.2	100	100000	1.000
Flavone	C15H10O2	(M+H)+	222.90	77.10	-10	-42	-29	222.90	121.10	-10	-28	-12	1	100	100000	1.000
Folic acid	C19H19N7O6	(M+H)+	442.05	295.05	-12	-17	-19	442.05	176.10	-12	-43	-17	15.6	40	100000	0.983
Fumaric acid	C4H4O4	(M-H)-	115.20	71.05	11	10	16	115.20	27.00	11	12	10	12.9	4000	100000	0.997
Gabaculine	C7H9NO2	(M-H)-	138.30	121.10	18	12	10	138.30	76.95	14	16	16	5.4	4000	100000	0.999
Galactitol	C6H14O6	(M+NH4)+	199.90	183.10	-10	-9	-18	199.90	129.10	-14	-14	-22	6.8	10000	100000	0.991
Gamma-Aminobutyric acid	C4H9NO2	(M+H)+	104.00	87.10	-10	-14	-20	104.00	45.15	-10	-23	-18	6.2	4000	100000	0.992
Gamma-L-Glutamylcysteine	C8H14N2O5S1	(M+H)+	250.80	122.10	-12	-12	-12	250.80	84.10	-12	-26	-14	10.9	10000	100000	0.994
GDP-D-mannose	C16H25N5O16P2	(M+H)+	606.00	152.05	-22	-32	-15	606.00	444.00	-28	-15	-30	15.8	40	100000	1.000
Gentiobiose	C12H22O11	(M+NH4)+	359.90	163.10	-10	-16	-16	359.90	325.10	-10	-11	-15	7.7	4000	100000	0.998
Gentisic acid	C7H6O4	(M-H)-	153.10	108.00	14	21	19	153.10	109.05	14	15	20	4.4	40	100000	1.000
Glutaric acid or Methylsuccinic acid	C5H8O4	(M-H)-	131.25	87.00	12	12	11	131.25	113.10	12	14	19	12.2	1000	100000	0.997
Glycerolphosphate	C3H9O6P	(M+H)+	172.80	99.00	-12	-13	-10	172.80	81.05	-16	-36	-13	13.6	4000	100000	0.999
Glycerophosphocholine	C8H20NO6P	(M+H)+	258.00	104.20	-12	-17	-19	258.00	125.05	-12	-27	-22	4.5	10	40000	0.999
Glycine	C2H5NO2	(M+H)+	76.00	30.10	-12	-15	-28	76.00	30.90	-13	-40	-26	6.6	1000	100000	0.992
Glycylglycine	C4H8N2O3	(M+H)+	132.90	76.05	-13	-12	-29	132.90	30.05	-12	-23	-29	7.6	1000	100000	0.999
Guanine	C5H5N5O	(M+H)+	151.95	135.00	-13	-22	-20	151.95	110.10	-13	-22	-11	5	40	100000	0.999
Guanosine	C10H13N5O5	(M+H)+	283.90	151.95	-20	-15	-20	283.90	135.05	-13	-38	-20	6.2	10	100000	1.000
Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate	C10H12N5O7P	(M+H)+	345.80	152.05	-16	-20	-15	345.80	135.10	-10	-47	-24	8.6	40	100000	1.000
Guanosine 5'-diphosphate	C10H15N5O11P2	(M+H)+	444.00	152.00	-20	-20	-10	444.00	135.00	-38	-52	-24	17.7	40	100000	0.999
Guanosine 5'-diphosphate glucose	C16H25N5O16P2	(M+H)+	605.85	152.10	-22	-32	-14	605.85	443.95	-22	-15	-21	15.4	10000	100000	0.973

Guanosine 5'-monophosphate	C10H14N5O8P	(M+H)+	363.80	152.10	-10	-17	-14	363.80	135.05	-10	-48	-23	16.7	400	100000	0.999
Guanosine 5'-triphosphate	C10H16N5O14P3	(M+H)+	524.00	152.00	-24	-31	-26	524.00	135.05	-24	-55	-14	19.3	400	100000	0.999
Hexose monophosphate	C6H13O9P	(M-H)-	259.00	78.95	12	22	16	259.00	96.95	17	16	19	14.5	1000	100000	1.000
Hippuric acid	C9H9NO3	(M+H)+	179.85	105.05	-15	-14	-10	179.85	77.10	-15	-32	-30	3.1	100	100000	0.986
Histamine	C5H9N3	(M+H)+	112.20	95.10	-13	-17	-19	112.20	68.10	-13	-24	-27	3.3	400	100000	0.984
Homogentisate	C8H8O4	(M-H)-	167.10	123.05	18	12	24	167.10	122.10	17	22	23	4.6	10000	100000	0.997
Hydrocinnamate	C9H10O2	(M-H)-	149.30	105.10	20	13	10						2.7	4000	100000	1.000
Hydroxyproline or 5-Aminolevulinic acid	C5H9NO3	(M+H)+	132.20	86.15	-10	-17	-18	132.20	68.10	-12	-22	-26	6.6	40	100000	0.995
Hypotaaurine	C2H7NO2S	(M+H)+	110.00	92.10	-12	-14	-19	110.00	30.10	-13	-15	-30	6.2	1000	100000	1.000
Hypoxanthine	C5H4N4O	(M+H)+	136.95	110.10	-12	-24	-22	136.95	119.05	-12	-24	-18	4.9	40	100000	0.998
Imidazole lactate	C6H8N2O3	(M+H)+	156.80	111.05	-11	-17	-11	156.80	82.15	-11	-30	-30	5.6	40	100000	0.943
Iminodiacetate	C4H7NO4	(M+H)+	133.80	88.15	-13	-12	-18	133.80	42.15	-14	-25	-16	9.7	4000	100000	0.998
Indol-3-acetic acid	C10H9NO2	(M+H)+	175.85	130.10	-16	-16	-12	175.85	77.05	-16	-46	-29	4.3	400	100000	0.993
Indoxyl sulfate	C8H7NO4S	(M-H)-	212.00	132.05	13	18	21	212.00	79.95	20	22	10	1.9	40	100000	0.999
Inosine	C10H12N4O5	(M+H)+	268.90	137.05	-13	-11	-13	268.90	110.05	-13	-40	-17	6	40	100000	0.999
inosine 3',5'-cyclic monophosphate	C10H11N4O7P	(M+H)+	331.10	137.10	-10	-17	-13	331.10	119.05	-10	-52	-18	9.8	40	100000	1.000
Inosine 5'-diphosphate	C10H14N4O11P2	(M+H)+	428.80	137.05	-12	-20	-13	428.80	97.10	-12	-26	-17	17.6	100	100000	0.995
Inosine 5'-monophosphate	C10H13N4O8P	(M+H)+	349.10	137.05	-10	-15	-13						16.3	400	100000	0.999
Inosine 5'-triphosphate	C10H15N4O14P3	(M+H)+	508.90	137.10	-24	-20	-13	508.90	97.10	-20	-28	-20	18.6	400	100000	1.000
Inositol	C6H12O6	(M-H)-	179.40	161.10	11	11	27	179.40	87.00	30	16	10	7	4000	100000	0.999
Isobutylamine	C4H11N	(M+H)+	74.10	57.15	-15	-15	-23	74.10	29.05	-12	-22	-30	1.6	40	100000	0.950
Isocitric acid	C6H8O7	(M-H)-	191.20	111.05	19	13	10	191.20	73.05	22	23	26	16.8	400	100000	0.991
Isophthalic acid	C8H6O4	(M-H)-	165.20	121.10	13	13	22						13.4	1000	100000	1.000
Isovalerylglycine	C7H13NO3	(M+H)+	160.20	76.05	-11	-10	-13	160.20	57.10	-10	-19	-21	2.8	400	100000	0.970
Kaempferol	C15H10O6	(M+H)+	286.80	153.05	-11	-35	-15	286.80	121.00	-13	-34	-19	15.1	10000	100000	0.947
Ketoisoleucine	C6H10O3	(M-H)-	129.10	85.10	12	10	10						8.3	10000	100000	1.000
Kojic acid	C6H6O4	(M+H)+	142.80	69.10	-13	-19	-26	142.80	41.05	-13	-23	-16	5.9	4000	100000	0.998
Kynurenate	C10H7NO3	(M+H)+	189.80	144.10	-13	-20	-14	189.80	116.05	-14	-34	-19	3.7	10	100000	0.993
Lactitol	C12H24O11	(M-H)-	343.10	179.15	15	13	16	343.10	89.05	15	21	10	6.8	400	100000	0.991
L-Alanine	C3H7NO2	(M+H)+	90.05	44.05	-15	-14	-17	90.05	45.05	-15	-40	-17	5.4	100	100000	1.000
L-Allothreonine	C4H9NO3	(M+H)+	119.80	56.05	-11	-18	-21	119.80	74.05	-11	-13	-13	5.9	4000	100000	0.997
L-Anserine (beta-alanyl-N-methylhistidine) (nitrate salt)	C10H16N4O3	(M+H)+	240.90	109.10	-11	-25	-17	240.90	170.15	-11	-18	-17	5.8	100	100000	1.000
L-Arginine	C6H14N4O2	(M+H)+	174.90	70.20	-12	-24	-28	174.90	60.15	-13	-15	-23	8.3	100	100000	0.996
L-Argininosuccinate	C10H18N4O6	(M+H)+	290.90	70.20	-14	-37	-14	290.90	116.15	-14	-21	-11	11.9	1000	100000	0.999
L-Asparagine	C4H8N2O3	(M+H)+	133.00	88.10	-13	-13	-19	133.00	74.10	-12	-17	-16	6.5	100	100000	0.999
L-Asparate	C4H7NO4	(M+H)+	134.00	74.00	-12	-16	-26	134.00	88.15	-12	-12	-20	9.9	1000	100000	1.000
L-Citrulline	C6H13N3O3	(M+H)+	175.90	70.20	-12	-24	-15	175.90	159.15	-12	-12	-15	6.6	100	100000	0.995
L-Cystathionine	C7H14N2O4S	(M+H)+	223.05	134.10	-11	-15	-21	223.05	88.10	-11	-28	-19	11.1	400	100000	1.000
L-Cysteic acid	C3H7NO5S	(M+NH4)+	186.80	170.10	-16	-9	-16	186.80	124.00	-15	-19	-24	11.3	10000	100000	0.967

L-Cysteinesulfinic acid	C3H7NO4S	(M+H)+	154.10	74.10	-10	-15	-27	154.10	44.20	-11	-14	-17	10.6	10000	100000	1.000
L-Cystine	C6H12N2O4S2	(M+H)+	240.80	152.05	-17	-14	-15	240.80	74.05	-11	-30	-11	11.9	4000	100000	0.999
L-Dihydroorotate	C5H6N2O4	(M-H)-	157.20	113.05	13	10	10	157.20	42.00	17	25	10	4.8	40	100000	0.975
Leucinic acid	C6H12O3	(M-H)-	131.15	85.15	12	12	11	131.15	69.00	20	21	10	2.6	400	100000	1.000
L-Glutamic acid	C5H9NO4	(M+H)+	147.80	84.10	-10	-17	-20	147.80	130.10	-14	-13	-13	10.1	4000	100000	0.987
L-Glutamine	C5H10N2O3	(M+H)+	147.00	84.10	-14	-19	-17	147.00	130.10	-14	-15	-12	6.4	400	100000	0.999
L-Gulono-1,4-lactone	C6H10O6	(M-H)-	177.10	89.05	19	13	11	177.10	59.05	18	22	14	3.6	10000	100000	1.000
L-Histidine	C6H9N3O2	(M+H)+	155.85	110.05	-11	-16	-11	155.85	83.15	-11	-26	-18	6.3	40	100000	0.994
L-Histidinol	C6H11N3O	(M+H)+	142.10	81.10	-13	-22	-17	142.10	124.10	-10	-16	-12	2.8	1000	100000	0.950
L-Homoarginine	C7H16N4O2	(M+H)+	188.90	84.10	-13	-24	-18	188.90	144.15	-14	-16	-14	8	40	100000	0.997
L-Homocitrulline	C7H15N3O3	(M+H)+	189.90	173.10	-17	-12	-17	189.90	127.10	-17	-17	-12	6.1	400	100000	0.989
L-Homocysteic acid	C4H9NO5S	(M+NH4)+	201.00	184.05	-10	-10	-18						11.3	4000	100000	1.000
L-Homoserine	C4H9NO3	(M+H)+	120.00	74.15	-11	-14	-16	120.00	56.00	-11	-22	-21	6.2	100	100000	0.991
Lidocaine (IS)	C14H22N2O	(M+H)+	235.05	85.95	-20	-25	-20	235.05	58.10	-11	-38	-23	1	10	4000	1.000
L-Isoleucine	C6H13NO2	(M+H)+	132.05	86.20	-12	-13	-18	132.05	69.20	-10	-21	-12	3.8	10	100000	1.000
L-Kynurenine	C10H12N2O3	(M+H)+	208.85	192.10	-10	-10	-19	208.85	146.05	-10	-21	-14	4	40	100000	0.978
LL-2,6-Diaminopimelate	C7H14N2O4	(M+H)+	190.90	128.10	-16	-15	-12	190.90	82.15	-13	-25	-18	10.5	400	100000	1.000
L-Leucine	C6H13NO2	(M+H)+	131.85	86.20	-11	-13	-18	131.85	30.10	-10	-19	-30	3.6	100	100000	1.000
L-Lysine	C6H14N2O2	(M+H)+	146.85	84.15	-11	-19	-18	146.85	130.10	-11	-15	-12	8.3	4000	100000	0.990
L-Methionine	C5H11NO2S	(M+H)+	149.80	56.15	-12	-18	-22	149.80	104.10	-11	-14	-10	4.2	400	100000	1.000
L-Methionine sulfone (IS)	C5H11NO4S	(M+H)+	181.85	56.15	-13	-23	-22	181.85	136.05	-15	-14	-13	4.6	400	100000	0.996
L-Normetanephine	C9H13NO3	(M+H)+	183.90	166.10	-17	-9	-16	183.90	134.00	-15	-20	-13	2.2	400	100000	0.971
L-Norvaline	C5H11NO2	(M+H)+	118.20	72.10	-15	-12	-20	118.20	30.10	-12	-23	-29	4.1	100	100000	0.996
L-Ornithine	C5H12N2O2	(M+H)+	133.10	70.10	-34	-22	-28	133.10	116.10	-32	-14	-20	8.1	400	100000	1.000
L-Phenylalanine	C9H11NO2	(M+H)+	166.10	120.10	-40	-15	-12	166.10	77.05	-40	-39	-30	3.6	10	100000	1.000
L-Prolinamide	C5H10N2O	(M+H)+	115.20	70.10	-11	-18	-28	115.20	28.05	-12	-43	-29	2.5	40	100000	0.968
L-Proline	C5H9NO2	(M+H)+	116.20	70.20	-15	-17	-28	116.20	28.05	-15	-38	-30	4.1	10	100000	0.979
L-Pyroglutamic acid	C5H7NO3	(M+H)+	130.00	84.15	-12	-14	-17	130.00	55.95	-14	-28	-23	6.1	10000	100000	0.978
L-Saccharopine	C11H20N2O6	(M+H)+	276.95	84.15	-13	-26	-18	276.95	213.15	-13	-15	-22	11.1	40	100000	1.000
L-Serine	C3H7NO3	(M+H)+	105.80	60.15	-10	-13	-23	105.80	42.10	-11	-24	-17	6.9	1000	100000	1.000
L-Theanine	C7H14N2O3	(M+H)+	174.90	84.05	-15	-22	-18	174.90	158.10	-15	-14	-15	4.6	10	100000	0.991
L-threo-3-Hydroxyaspartate	C4H7NO5	(M+H)+	150.00	104.05	-12	-13	-10	150.00	60.15	-13	-18	-23	12.5	4000	100000	0.998
L-Threonic acid	C4H8O5	(M-H)-	135.20	74.95	12	13	17	135.20	89.00	12	11	17	6.8	100	100000	0.955
L-Threonine	C4H9NO3	(M+H)+	120.20	74.15	-15	-13	-12	120.20	56.15	-14	-18	-21	6	100	100000	1.000
L-Thyroxine	C15H11I4NO4	(M+H)+	777.40	731.65	-22	-27	-32	777.40	323.90	-22	-60	-29	14.6	10000	100000	0.996
L-Tryptophan	C11H12N2O2	(M+H)+	205.20	188.05	-10	-11	-19	205.20	146.10	-10	-18	-14	4.4	40	100000	1.000
L-Tyrosine	C9H11NO3	(M+H)+	182.20	136.10	-11	-13	-13	182.20	165.10	-10	-12	-17	5.8	1000	100000	1.000
L-Valine	C5H11NO2	(M+H)+	117.90	72.20	-11	-13	-19	117.90	55.15	-10	-23	-22	4.3	10	100000	0.997
Maleamic acid	C4H5NO3	(M+H)+	116.00	99.10	-12	-15	-21	116.00	44.05	-12	-38	-17	4.7	40000	100000	1.000
Maleic acid	C4H4O4	(M-H)-	115.10	70.95	11	10	16	115.10	27.00	11	16	25	13.2	10	100000	0.956

Malic acid	C4H6O5	(M-H)-	133.20	115.00	13	15	22	133.20	71.00	13	14	16	13	40	100000	0.985
Malonic acid or 3-Hydroxypyruvate	C3H4O4	(M-H)-	103.25	59.05	11	10	13	103.25	40.90	12	29	15	13.3	100	100000	0.993
Maltitol	C12H24O11	(M-H)-	343.10	179.15	15	14	16	343.10	89.05	15	22	10	6.7	400	100000	1.000
Maltose	C12H22O11	(M+NH4)+	360.10	163.15	-10	-16	-16	360.10	325.10	-10	-10	-15	7.2	1000	100000	1.000
Maltotetraose	C24H42O21	(M-H)-	665.10	161.10	30	22	14	665.10	341.20	22	16	22	9.6	400	100000	0.999
Maltotriose	C18H32O16	(M-H)-	503.10	161.15	22	14	15	503.10	341.15	22	8	22	8.5	400	100000	0.999
Mandelic acid	C8H8O3	(M-H)-	151.10	107.05	14	11	21						2.9	1000	100000	1.000
Melatonin	C13H16N2O2	(M+H)+	233.00	173.90	-20	-15	-20	233.00	159.10	-11	-27	-15	1.1	10	40000	0.983
Melezitose or 1-Kestose	C18H32O16	(M-H)-	503.10	323.15	22	21	20	503.10	89.10	24	31	18	7.9	40	100000	0.999
Melibiose	C12H22O11	(M+NH4)+	360.10	163.15	-10	-16	-16	360.10	325.20	-10	-11	-15	7.6	1000	100000	1.000
Mesaconic acid	C5H6O4	(M-H)-	129.20	85.00	12	8	11	129.20	41.00	12	12	13	12.6	10000	100000	0.995
Methyl jasmonate	C13H20O3	(M+H)+	225.10	151.15	-11	-13	-14	225.10	133.10	-11	-16	-13	1	400	100000	0.974
Methylbenzoic acid	C8H8O2	(M-H)-	135.10	91.00	12	11	20						2.9	400	100000	1.000
Methylmalonic acid	C4H6O4	(M-H)-	117.10	73.05	11	10	16	117.10	55.05	11	25	10	13.1	400	100000	0.987
N,N-Dimethylarginine	C8H18N4O2	(M+H)+	203.00	70.20	-10	-26	-27	203.00	116.10	-10	-16	-11	5.3	10	100000	0.986
N ¹ -Acetyl-L-asparagine	C6H10N2O4	(M+H)+	175.15	158.05	-10	-13	-15	175.15	88.15	-11	-18	-18	5.2	100	100000	0.993
N ² -Acetyl- L-lysine	C8H16N2O3	(M+H)+	188.90	84.10	-10	-25	-18	188.90	129.15	-16	-14	-12	5.9	40	100000	0.986
N ² -Acetyl-L-ornithine	C7H14N2O3	(M+H)+	174.90	70.15	-15	-26	-27	174.90	115.15	-16	-14	-11	6.1	40	100000	0.981
N ⁶ ,N ⁶ ,N ⁶ -Trimethyl-L-lysine	C9H20N2O2	(M+H)+	188.95	84.10	-17	-23	-19	188.95	130.10	-17	-14	-13	5.5	40	100000	0.990
N-Acetyl-D-galactosamine	C8H15NO6	(M+H)+	222.20	204.05	-11	-9	-21	222.20	126.15	-11	-15	-12	3.7	400	100000	0.996
N-Acetyl-D-glucosamine	C8H15NO6	(M+H)+	222.20	204.15	-12	-8	-20	222.20	138.05	-11	-17	-13	4	40	100000	0.985
N-Acetyl-D-glucosamine 1-phosphate	C8H16NO9P	(M-H)-	299.85	78.90	13	25	18	299.85	97.00	19	14	11	13.3	1000	100000	0.989
N-Acetyl-D-glucosamine 6-phosphate	C8H16NO9P	(M+H)+	301.85	284.10	-14	-9	-13	301.85	126.10	-15	-21	-12	14.2	1000	100000	1.000
N-Acetyl-DL-alanine	C5H9NO3	(M+H)+	132.20	90.15	-11	-10	-18	132.20	44.10	-14	-22	-17	3.9	1000	100000	0.972
N-Acetyl-L-aspartic acid	C6H9NO5	(M+H)+	176.15	134.10	-10	-13	-13	176.15	88.10	-12	-18	-17	12.1	1000	100000	0.999
N-Acetyl-L-glutamate	C7H11NO5	(M+H)+	189.85	130.10	-15	-13	-12	189.85	84.15	-14	-25	-17	11.6	400	100000	0.992
N-Acetyl-L-glutamine	C7H12N2O4	(M+H)+	189.20	130.15	-10	-14	-12	189.20	84.15	-11	-25	-18	4.8	10	40000	0.994
N-Acetyl-L-leucine	C8H15NO3	(M+H)+	173.90	86.10	-15	-17	-17	173.90	128.10	-14	-13	-12	2.7	400	100000	0.985
N-Acetyl-L-tyrosine	C11H13NO4	(M+H)+	223.85	136.05	-10	-18	-13	223.85	178.15	-10	-10	-17	4.2	100	100000	0.993
N-Acetylneuraminic acid	C11H19NO9	(M+H)+	310.00	274.10	-15	-12	-18	310.00	292.10	-14	-9	-20	7.6	400	100000	0.999
N-Acetylserotonin	C12H14N2O2	(M+H)+	218.90	160.05	-19	-16	-24	218.90	115.05	-10	-35	-19	1.2	40	100000	0.946
Naringenin	C15H12O5	(M-H)-	270.85	151.05	12	17	13	270.85	119.10	12	24	10	3.2	40	100000	0.956
Naringin	C27H32O14	(M-H)-	579.05	271.15	26	35	26	579.05	151.05	26	44	13	3.2	10	100000	0.998
N-Carbamoyl-L-aspartate	C5H8N2O5	(M+H)+	176.85	134.10	-17	-11	-13	176.85	74.05	-15	-21	-28	12.9	400	100000	1.000
N-formylglycine	C3H5NO3	(M-H)-	102.10	58.10	15	12	12						4.8	4000	100000	0.997
N-Formyl-L-methionine	C6H11NO3S	(M+H)+	177.85	150.10	-15	-11	-15	177.85	104.10	-15	-13	-10	3	40000	100000	1.000
Nicotinamide	C6H6N2O	(M+H)+	123.15	80.10	-11	-23	-30	123.15	53.05	-11	-32	-19	1.3	10	100000	0.983
Nicotinamide adenine dinucleotide	C21H27N7O14P2	(M+H)+	664.00	136.10	-24	-52	-22	664.00	427.95	-32	-27	-27	9.4	10	100000	0.992
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	C21H28N7O17P3	(M-H)-	741.90	619.95	36	18	28	741.90	159.05	24	45	30	16.3	400	100000	1.000

Nicotinamide mononucleotide	C11H15N2O8P	(M+H)+	335.15	123.10	-10	-16	-12	335.15	97.10	-12	-28	-20	10.4	40	100000	1.000
Nicotinic acid	C6H5NO2	(M+H)+	124.15	80.10	-11	-22	-29	124.15	78.10	-15	-24	-29	3.7	40	100000	0.940
N-methylethanolamine	C3H9NO	(M+H)+	76.20	58.15	-13	-15	-22	76.20	45.00	-12	-21	-16	2.5	100	100000	0.984
Norepinephrine	C8H11NO3	(M+H)+	170.05	152.10	-38	-11	-16	170.05	107.10	-16	-21	-18	3.1	40000	100000	1.000
O-Acetylcarnitine	C9H17NO4	(M+H)+	204.00	84.90	-20	-20	-20	204.00	145.10	-10	-13	-14	2.4	10	10000	0.999
Ofloxacin	C18H20FN3O4	(M+H)+	362.15	318.05	-20	-20	-22	362.15	261.10	-10	-27	-25	3.3	40	4000	0.971
O-Phosphoethanolamine	C2H8NO4P	(M+H)+	142.15	44.15	-10	-14	-18	142.15	27.00	-14	-57	-30	12.3	10000	100000	0.998
O-Phospho-L-serine	C3H8NO6P	(M+H)+	185.80	88.10	-16	-13	-18	185.80	70.05	-13	-22	-26	15.2	4000	100000	0.998
Oxalic acid	C2H2O4	(M-H)-	89.20	60.95	14	11	12	89.20	44.85	14	12	10	14.4	4000	100000	0.997
Oxidized glutathione	C20H32N6O12S2	(M+H)+	612.90	355.15	-22	-24	-24	612.90	231.05	-22	-38	-22	14.7	100	100000	1.000
p-Acetamidophenyl-beta-D-glucuronide (acetaminophen glucuronide) (sodium salt)	C14H17NO8	(M+NH4)+	345.00	152.15	-10	-16	-15	345.00	328.10	-16	-9	-15	6.2	10	100000	0.986
p-Aminohippuric acid	C9H10N2O3	(M+H)+	194.85	120.10	-16	-11	-12	194.85	92.10	-15	-32	-19	4.5	10	100000	0.971
Panose	C18H32O16	(M+NH4)+	522.00	325.20	-20	-15	-15	522.00	163.10	-24	-23	-16	8.8	100	100000	0.999
Pantothenate	C9H17NO5	(M+H)+	219.90	90.15	-10	-16	-20	219.90	202.15	-10	-12	-20	4.4	40	100000	0.997
Paraxanthine	C7H8N4O2	(M+H)+	180.85	124.05	-16	-22	-12	180.85	42.10	-17	-42	-16	2.1	40	100000	0.999
Phenylglycine	C8H9NO2	(M+H)+	152.05	135.05	-15	-15	-23	152.05	79.15	-15	-24	-15	4.2	40	100000	0.999
Phosphocholine	C5H14NO4P	(M+H)+	183.85	86.10	-14	-19	-20	183.85	125.00	-14	-20	-12	9.4	400	100000	1.000
Phosphoenolpyruvic acid	C3H5O6P	(M-H)-	167.00	78.90	15	11	18						17.3	1000	100000	0.979
Phosphoric acid	H3O4P	(M-H)-	97.20	78.90	18	18	18	97.20	35.05	18	11	11	4.7	1000	100000	0.991
P-Hydroxybenzaldehyde	C7H6O2	(M-H)-	121.25	92.05	11	25	11	121.25	93.05	11	21	11	2.1	4000	100000	1.000
Picolinic acid	C6H5NO2	(M+H)+	124.15	78.05	-11	-22	-12	124.15	106.10	-11	-16	-17	4.9	100	100000	0.993
Pimelic acid or 3-Methyladipic acid	C7H12O4	(M-H)-	159.10	97.05	15	13	21	159.10	94.95	16	17	12	11.6	1000	100000	0.999
Pipecolic acid	C6H11NO2	(M+H)+	129.90	84.15	-12	-17	-17	129.90	56.05	-12	-31	-21	3.6	40	100000	0.961
Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (IS)	C8H18N2O6S2	(M+H)+	302.80	152.10	-14	-28	-29	302.80	195.10	-13	-24	-21	8.9	10000	100000	1.000
Propionylglycine	C5H9NO3	(M+H)+	132.20	76.05	-10	-11	-13	132.20	57.15	-10	-16	-21	3.7	1000	100000	0.986
Propylamine	C3H9N	(M+H)+	60.20	43.10	-27	-17	-16	60.20	41.10	-27	-22	-15	2	1000	100000	0.907
Putrescine	C4H12N2	(M+H)+	89.10	72.10	-22	-14	-12	89.10	30.10	-22	-22	-34	7.8	10000	100000	0.998
Pyridoxal	C8H9NO3	(M+H)+	168.05	150.10	-12	-14	-14	168.05	94.10	-13	-26	-19	2.3	4000	100000	0.973
Pyridoxamine	C8H12N2O2	(M+H)+	169.00	152.05	-15	-15	-15	169.00	134.05	-16	-22	-13	2.8	40	40000	0.985
Pyridoxamine 5'-phosphate	C8H13N2O5P	(M+H)+	248.85	232.10	-12	-14	-23	248.85	134.05	-11	-23	-13	14.6	400	100000	0.990
Pyridoxine	C8H11NO3	(M+H)+	170.00	152.15	-11	-16	-15	170.00	134.10	-16	-23	-13	4.1	10	40000	1.000
rac 3-Hydroxyisobutyric acid	C4H8O3	(M-H)-	103.25	73.10	10	11	14						4.6	4000	100000	1.000
Raffinose	C18H32O16	(M-H)-	503.05	179.15	24	22	10	503.05	221.20	22	29	20	8.1	40	100000	0.997
Reduced glutathione	C10H17N3O6S	(M+H)+	307.80	179.05	-11	-13	-18	307.80	76.10	-14	-27	-28	11.6	1000	100000	0.995
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide	C21H29N7O14P2	(M+H)+	665.90	649.10	-24	-19	-30	665.90	514.00	-24	-29	-36	11.6	1000	100000	0.991
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	C21H30N7O17P3	(M+H)+	746.00	729.05	-20	-19	-26	746.00	136.10	-20	-55	-22	17.1	40	100000	0.999

Retinoic acid	C20H28O2	(M+H)+	301.10	159.15	-14	-22	-10	301.10	123.25	-14	-18	-23	1.7	40000	100000	1.000
S-Adenosyl-L-homocysteine	C14H20N6O5S	(M+H)+	384.85	136.10	-10	-21	-13	384.85	134.10	-10	-21	-13	6.9	10	100000	0.995
S-Adenosylmethionine	C15H22N6O5S	(M+H)+	399.20	250.15	-11	-17	-26	399.20	136.10	-11	-29	-13	7	100	100000	1.000
Salicylic acid	C7H6O3	(M-H)-	137.20	93.00	12	15	11	137.20	65.00	12	27	14	2.3	40	100000	1.000
Salicyluric acid	C9H9NO4	(M+H)+	195.85	121.05	-15	-14	-12	195.85	65.10	-14	-39	-25	7.8	1000	100000	1.000
Sarcosine	C3H7NO2	(M+H)+	90.05	44.10	-10	-16	-16	90.05	30.05	-10	-50	-29	4.8	40	100000	0.971
S-benzyl-L-cysteine	C10H13NO2S	(M+H)+	211.85	91.15	-10	-17	-18	211.85	195.10	-10	-9	-19	3.1	100	100000	0.999
Sebacic acid	C10H18O4	(M-H)-	201.30	139.20	12	14	12	201.30	183.30	12	14	17	10.2	100	100000	0.999
Serotonin	C10H12N2O	(M+H)+	176.90	160.10	-15	-12	-15	176.90	115.10	-14	-29	-11	2.7	400	100000	1.000
Shikimic acid	C7H10O5	(M-H)-	173.20	93.00	17	12	11	173.20	111.00	18	12	10	7.9	1000	100000	0.982
Sinapic acid	C11H12O5	(M-H)-	223.10	208.10	13	12	20	223.10	164.15	13	15	15	5.3	400	100000	1.000
Sinigrin	C10H17NO9S2	(M-H)-	358.15	96.95	12	18	20	358.15	74.95	12	31	16	4.8	40	100000	0.992
S-Methyl-L-cysteine	C4H9NO2S	(M+H)+	135.80	119.10	-10	-13	-24	135.80	73.10	-11	-17	-15	4.4	1000	100000	0.959
Spermidine	C7H19N3	(M+H)+	145.90	72.15	-13	-17	-28	145.90	112.15	-11	-18	-11	8.9	10000	100000	0.994
Spermine	C10H26N4	(M+H)+	203.00	112.15	-10	-21	-11	203.00	129.20	-10	-14	-13	9.7	10000	100000	0.998
S-Sulfo-L-cysteine	C3H7NO5S2	(M+NH4)+	219.10	202.05	-11	-10	-20	219.10	120.00	-11	-19	-11	12.1	1000	100000	0.999
Suberic acid	C8H14O4	(M-H)-	173.30	111.10	20	13	10	173.30	83.00	18	18	18	11.2	1000	100000	0.999
Succinic acid	C4H6O4	(M-H)-	117.35	73.00	11	11	15	117.35	98.95	11	11	12	12.6	100	100000	0.999
Sucrose	C12H22O11	(M-H)-	341.10	179.15	16	14	10	341.10	89.00	15	22	19	6.5	40	100000	0.994
Tartaric acid	C4H6O6	(M-H)-	149.20	87.05	14	13	11	149.20	73.05	14	17	11	13.5	1000	100000	0.998
Taurine	C2H7NO3S	(M-H)-	124.25	80.00	12	22	17						5.4	100	100000	0.992
Terephthalic acid	C8H6O4	(M-H)-	165.20	121.05	18	13	10	165.20	77.05	17	19	16	13.3	1000	100000	0.998
Thiamine	C12H16N4OS	(M+H)+	265.00	121.90	-20	-15	-20	265.00	144.10	-13	-14	-14	2.6	40	40000	0.999
Thiamine monophosphate	C12H18N4O4PS	(M+H)+	345.90	122.15	-10	-20	-12	345.90	123.15	-10	-20	-12	9.2	400	100000	0.999
Thiamine pyrophosphate	C12H18N4O7P2S	(M+H)+	425.10	122.10	-12	-25	-23	425.10	303.95	-12	-19	-30	13.8	400	100000	0.997
Thiodiacetic acid	C4H6O4S	(M-H)-	149.20	105.00	14	11	21	149.20	61.10	16	11	11	12.6	100	100000	0.984
Thymidine	C10H14N2O5	(M+H)+	243.05	127.15	-12	-11	-13	243.05	117.05	-12	-14	-11	1.7	100	100000	1.000
Thymidine 3',5'-cyclic monophosphate	C10H13N2O7P	(M+NH4)+	322.00	305.05	-15	-11	-14	322.00	81.10	-15	-22	-17	3.8	100	100000	1.000
Thymidine 5'-diphospho (TDP)-alpha-D-glucose	C16H26N2O16P2	(M-H)-	562.95	321.10	26	22	14	562.95	241.00	26	28	23	12.3	400	100000	0.978
Thymine	C5H6N2O2	(M+H)+	127.15	110.05	-18	-21	-17	127.15	54.05	-16	-25	-23	1.7	40000	100000	1.000
Tiglylglycine	C7H11NO3	(M+H)+	157.85	83.15	-13	-12	-18	157.85	55.10	-13	-22	-22	3	400	100000	0.984
trans-Cinnamic acid	C9H8O2	(M-H)-	147.10	103.10	14	13	12	147.10	77.00	15	23	25	2.9	400	100000	1.000
trans-Ferulic acid	C10H10O4	(M-H)-	193.10	134.10	12	17	25	193.10	178.20	12	14	17	5.5	100	100000	1.000
Trehalose	C12H22O11	(M-H)-	341.10	88.85	12	21	26	341.10	119.10	18	19	25	7.2	400	100000	0.991
Trehalose 6-phosphate	C12H23O14P	(M+H)+	422.95	261.00	-12	-9	-18	422.95	243.00	-12	-15	-24	15.1	10000	100000	0.997
Tricarballic acid	C6H8O6	(M-H)-	175.05	157.20	16	12	14	175.05	69.10	15	18	13	16.4	40	100000	0.985
Trigonelline	C7H7NO2	(M+H)+	137.90	92.15	-13	-23	-19	137.90	94.15	-13	-23	-19	2.5	10	100000	0.954
Tryptamine	C10H12N2	(M+H)+	160.90	144.10	-15	-13	-23	160.90	117.15	-14	-27	-11	1.7	40	100000	0.989
Tyramine	C8H11NO	(M+H)+	138.05	121.15	-15	-14	-12	138.05	77.05	-13	-30	-13	1.9	40	100000	0.989

UDP- <i>N</i> -acetyl- α -D-glucosamine	C17H27N3O17P2	(M+H)+	608.00	204.15	-22	-17	-21	608.00	138.10	-22	-45	-23	13	100	100000	1.000
Uracil	C4H4N2O2	(M-H)-	111.25	42.05	14	15	15						2.3	1000	100000	0.998
Uric acid	C5H4N4O3	(M-H)-	167.20	123.95	15	15	23	167.20	95.90	14	18	21	8.4	100	100000	0.974
Uridine	C9H12N2O6	(M+H)+	245.00	113.05	-12	-11	-11	245.00	70.10	-11	-37	-11	3.7	400	100000	0.995
Uridine 3',5'-cyclic monophosphate	C9H11N2O8P	(M+NH4)+	323.80	307.05	-12	-11	-14	323.80	97.10	-12	-22	-10	6.9	4000	100000	1.000
Uridine 5'-diphosphate (UDP)-D-glucuronate	C15H22N2O18P2	(M+NH4)+	597.95	405.00	-22	-15	-28	597.95	97.05	-22	-40	-16	16.6	40000	100000	1.000
Uridine 5'-diphosphate	C9H14N2O12P2	(M+H)+	404.95	97.15	-11	-21	-21	404.95	388.05	-12	-10	-26	17.3	1000	100000	0.994
Uridine 5'-diphosphate glucose or UDP- α -D-galactose	C15H24N2O17P2	(M-H)-	564.95	323.05	26	24	19	564.95	78.90	26	55	16	13.8	40	100000	0.992
Uridine 5'-monophosphate	C9H13N2O9P	(M+H)+	325.10	97.15	-12	-17	-21	325.10	213.00	-10	-9	-23	14.6	400	100000	1.000
Uridine 5'-triphosphate	C9H15N2O15P3	(M+H)+	484.85	97.05	-13	-28	-21	484.85	227.15	-11	-19	-21	17.8	1000	100000	0.997
Urocanic acid	C6H6N2O2	(M+H)+	138.85	121.10	-13	-20	-12	138.85	93.15	-13	-23	-20	6.1	40	100000	0.987
Vanillylmandelic acid	C9H10O5	(M-H)-	197.10	137.05	12	20	23	197.10	138.10	12	12	27	4.8	100	100000	0.998
Xanthine	C5H4N4O2	(M-H)-	151.25	108.00	14	17	21	151.25	42.00	14	21	15	6.7	40	100000	0.978
Xanthosine	C10H12N4O6	(M+H)+	285.00	153.10	-14	-11	-15	285.00	136.00	-14	-31	-13	7.5	10	100000	1.000
Xanthurenic acid	C10H7NO4	(M+H)+	206.15	160.10	-10	-20	-30	206.15	132.05	-10	-30	-26	14.5	40	100000	1.000

補足表 3. 移動相の添加剤濃度を変えたときの各化合物の保持時間

Abbreviation	40 mM ABC RT (min)	20 mM ABC RT (min)	10 mM ABC RT (min)	40 mM AmmAce RT (min)	20 mM AmmAce RT (min)	10 mM AmmAce RT (min)	20 mM ABC/20 mM AmmAce RT (min)
Propylamine	3.4	3.6	3.6	3.1	3.4	3.6	3.5
Cytidine	3.8	3.8	3.8	4.5	4.6	4.7	3.8
Uracil	4.3	4.4	4.5	5.5	5.8	6.2	4.4
Adenosine	5.1	5.1	5.1	5.3	5.4	5.4	5.1
Cytosine	5.3	5.3	5.3	5.1	5.0	4.9	5.3
Adenine	5.4	5.5	5.6	6.5	6.8	7.2	5.5
Leu	6.5	6.9	7.2	8.3	8.7	9.1	7.0
Phe	6.6	7.3	7.9	9.8	10.3	10.9	7.6
Thymidine	6.6	6.6	6.6	6.6	6.5	6.5	6.6
Uridine	6.6	6.6	6.6	6.6	6.5	6.5	6.6
Ile	6.7	7.1	7.5	8.6	9.0	9.4	7.3
Pro	6.9	7.0	7.0	7.1	7.1	7.2	7.0
Met	7.1	7.8	8.3	10.1	10.6	11.2	8.0
Val	7.2	7.7	8.1	9.4	9.7	10.2	7.9
Trp	7.3	7.9	8.3	10.0	10.4	11.0	8.1
Guanine	8.0	8.1	8.2	9.0	9.2	9.6	8.1
Ala	8.3	8.7	8.9	9.9	10.2	10.6	8.8
Tyr	8.7	9.9	10.2	12.6	13.2	14.0	9.9
Thr	8.8	10.2	10.4	12.1	12.6	13.2	10.1
His	9.0	10.1	10.3	11.9	12.3	12.9	10.1
Guanosine	9.1	9.4	9.6	11.0	11.5	12.0	9.3
Gln	9.1	10.3	10.4	11.9	12.4	12.9	10.2
Asn	9.2	10.9	11.1	12.7	13.2	13.7	10.8
Ser	9.6	11.0	11.2	12.6	13.1	13.6	10.9
Arg	10.6	10.0	9.6	8.3	8.3	8.2	9.7
Lys	10.6	10.1	9.9	8.9	9.0	9.1	10.0
NAD	11.3	12.4	15.5	16.7	17.3	17.7	14.0
Asp	12.3	13.5	16.3	19.4	20.7	22.0	14.5
Glu	12.4	13.7	16.3	19.5	20.9	22.1	14.6
FAD	14.2	16.5	19.3	ND	ND	ND	17.1
Fum	15.6	17.4	18.9	ND	ND	ND	17.7
Mal	15.7	17.4	18.6	26.2	ND	ND	17.6
dTMP	16.0	17.6	18.9	ND	ND	ND	17.8
FMN	16.0	18.3	20.7	ND	ND	ND	18.5
AMP	16.5	17.8	18.9	24.1	25.7	25.7	18.0
CMP	16.8	17.7	18.7	25.1	26.3	26.9	17.9

UMP	17.1	18.2	19.0	ND	ND	ND	18.3
NADP	17.5	18.3	19.3	ND	ND	ND	18.3
Ace-CoA	17.8	19.1	ND	ND	ND	ND	19.2
GMP	17.9	18.7	21.1	ND	ND	ND	18.8
Cit	17.9	18.5	21.2	ND	ND	ND	18.8
CoA	17.9	19.4	ND	ND	ND	ND	19.6
dTDP	17.9	19.0	24.0	ND	ND	ND	19.2
CDP	17.9	18.8	22.2	ND	ND	ND	18.9
ADP	18.1	19.6	25.8	ND	ND	ND	19.8
UDP	18.1	19.6	ND	ND	ND	ND	19.8
CTP	18.6	24.0	ND	ND	ND	ND	24.4
dTTP	18.6	25.7	ND	ND	ND	ND	26.0
GDP	18.7	23.3	ND	ND	ND	ND	23.7
UTP	18.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ATP	19.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GTP	21.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND

AmmAce は酢酸アンモニウム，ABC は重炭酸アンモニウムを指す．