

## LC-QTOFMSとLC-TQMSを組み合わせた メタボロミクスの新しいワークフロー

飯田 哲生、村山 茜、服部 考成

### ユーザーベネフィット

- ◆ 二種類の測定法の長所を組み合わせた新しいワークフローをシームレスな形で実現できます。
- ◆ 複雑で網羅的なメタボロミクス解析において、シンプルに解釈できる信頼性の高い結果が得られます。

### ■はじめに

近年、臨床研究や食品開発分野で質量分析計 (MS) を使用したメタボロミクスに注目が集まっています。メタボロミクスでは、細胞の活動によって生じるアミノ酸や有機酸などの低分子の代謝物を網羅的に測定し、複数の試料群における差異や関係性等を明らかにします。一般的なワークフローでは、四重極飛行時間型 (QTOF: Quadrupole-Time of Flight) MS等の高分解能質量分析計により包括的に代謝物を測定し、得られたデータからデータセットを作成後、多変量解析を行います。通常、数千~数万の膨大なピーク情報が得られますが、その中には再現性や定量性の低いデータも含まれるため、それらを取り除きより信頼性の高いデータセットを作成 (データの事前処理) する必要があります。

本稿では、LC-QTOFMSとLC-トリプル四重極 (TQ: Triple Quadrupole) MS を組み合わせたメタボロミクスの新しいワークフローをご紹介します。ノンターゲット測定で得られた情報を利用し、信頼性の高いワイドターゲットメタボロミクスを実施することで、質の高いデータセット作成、多変量解析や機械学習によるモデル構築が可能となります。

### ■メタボロミクスの新しいワークフロー

LC-TQMSによるターゲットメタボロミクスは、高感度で信頼性の高い測定が可能です。しかし、分析メソッドに含まれない代謝物以外は測定しないため網羅性に欠けます。サンプル中に含まれる代謝物をLC-TQMSで網羅的に測定するためには、サンプルに応じたメソッドで網羅的に測定する必要があります。

そこで、図1のようなワークフローを考えました。まず、サンプル中に含まれる代謝物のMRMを網羅的に取得するために、サンプルをLC-QTOFMSのDDA (Data Dependent Acquisition) モードでノンターゲット測定します。測定にあたり、複数群のサンプルがある場合、効率の観点から、混合したサンプルを用います。次に、取得したすべてのMS/MSデータからMRMトランジションを生成させLC-TQMS用メソッドを作成します。その後、そのメソッドを用いてLC-TQMSで個々のサンプルを測定します。これにより、サンプル中の代謝物を高感度で網羅的にワイドターゲット測定することが可能となります。また、得られたデータを用いて多変量解析や機械学習をさせ注目すべきピークが見つかった場合は、LC-QTOFMSのデータに戻ることで、未知代謝物の成分同定や構造推定も可能となります。

### ■MRMトランジションの自動生成

LC-QTOFMSからLC-TQMSへのメソッド移管を容易にするために、LC-QTOFMSのDDAモードで取得されたすべてのMS/MSデータからLC-TQMS用のMRMトランジションを自動生成するツールを開発しました (LabSolutions LCMS Ver. 5.97以上で対応)。図2に示したように、このツールを使うことでLC-QTOFMSのDDAモードで得られた各ピーク由来のMS/MSスペクトルから、最も強度の高いフラグメントイオンが選択され、LC-TQMS用のMRMトランジションを生成することができます。

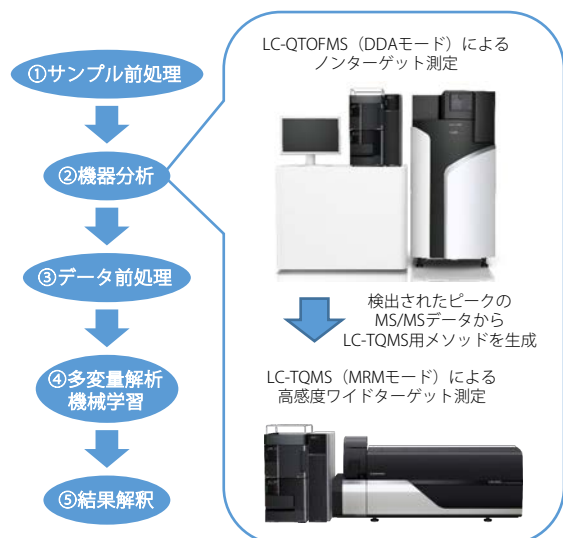


図1 LC-QTOFMSとLC-TQMSを組み合わせたワークフロー

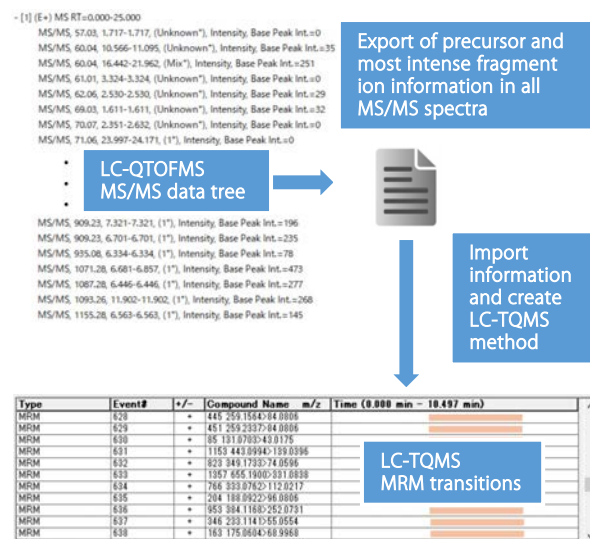


図2 LC-TQMS用MRMトランジションの自動生成

## ■ LC-QTOFMS (LCMS-9030) による代謝物の網羅的MRMの取得

サンプルとして3種類の市販赤ワイン（ボトルワイン、パックワイン、ノンアルコールワイン）を使用しました。各ワインに含まれる親水性代謝物のMRMを効率的に網羅取得するため、これら赤ワインを混合したものを分析サンプルとしました。分析サンプルを12,000 rpmで5分間遠心分離し、その上清を超純水で10倍希釈した後、LC/MS分析に供しました。LC-QTOFMS用の代謝物精密質量データベースの条件をベースに表1, 2の分析条件でLC-QTOFMS（DDAモード）により測定しました。図3に、赤ワイン混合サンプルのMSクロマトグラムを示します。ポジティブモードで1,443、ネガティブモードで759のピークにおいて、十分なピーク強度でMS/MSデータが取得できました。

表 1 HPLC分析条件 (Nexera™ X3 system)

Column	: Reversed-phase column
Mobile Phase A	: 0.1% Formic acid in water
Mobile Phase B	: 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow Rate	: 0.25 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 3 µL

表 2 MS分析条件 (LCMS-9030)

Ionization	: ESI (Positive or negative, DDA MS/MS mode)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

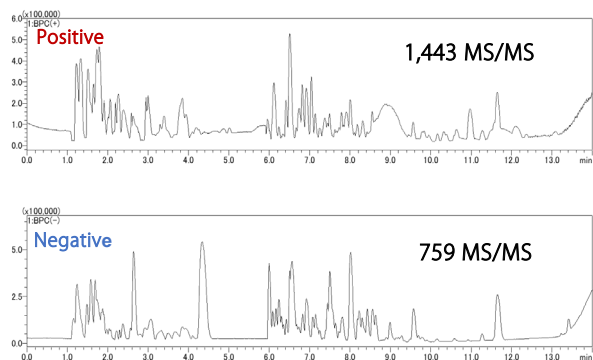
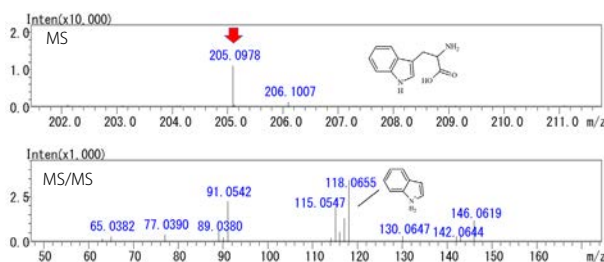


図3 赤ワイン混合サンプルのMSクロマトグラム (LC-QTOFMS)

LCMS-9030では、MSおよびMS/MSでも非常に高い質量精度が得られるため、メタボロミクスにおいて検出された未知化合物を同定するのに有用です。図4に代表的な代謝物であるトリプトファンのMS、MS/MSスペクトルおよび質量精度を示します。MSとMS/MSにおける分子関連イオンは、高い質量精度で帰属されました。



Compound	RT (min)	Ion type		Theoretical mass	Observed mass	Accuracy (mDa)
		MS	[M+H] <sup>+</sup>	m/z	m/z	
Tryptophan C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.43	MS	[M+H] <sup>+</sup>	205.0972	205.0978	0.6
		MS/MS	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sup>(+)</sup>	118.0651	118.0655	0.4

図4 トリプトファンのLC-QTOFMSデータにおける質量精度

## ■ LC-TQMS (LCMS-8060NX) による代謝物の高感度分析

得られたLC-QTOFMSのMS/MSデータから、図2の手順でLC-TQMS用のMRMメソッド（ポジティブモード、1,443 MRMトランジション）を作成し、LCMS-8060NXを使って3種類の赤ワインを個別にLC-TQMS分析しました。高速分析が可能なLCMS-8060NXでは、1分析で1,000以上のMRMイベントを設定でき、超高感度なワイドターゲットメタボロミクスが可能です。各ワインは12,000 rpmで5分間遠心分離し、その上清を超純水で100倍希釈したものをLC/MS分析に供しました。得られたデータは、ライフイクス株式会社のTraverse MS ソフトウェアにより主成分分析（Principal Component Analysis: PCA）および一元配置分散分析（one-way analysis of variance: oneway ANOVA）を行いました。図5で示すように、PCAでは3種の赤ワインが明確に分類されました。図6に、それぞれの3種類の赤ワインにおいて、有意差ありと判定された代謝物（p値 < 0.05）におけるピーク高さの比較例を示します。

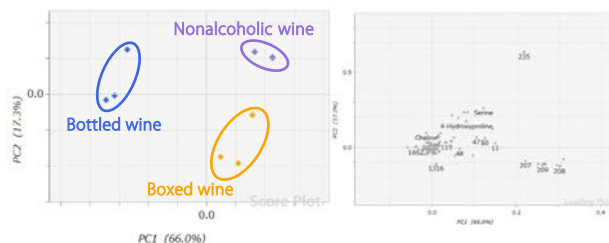


図5 PCAにおけるスコアプロットとローディングプロット

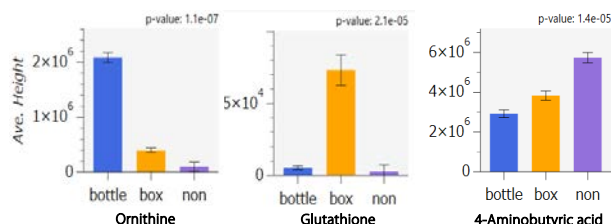


図6 3種赤ワインにおける代謝物のANOVA検定結果

## ■ まとめ

LC-QTOFMSとLC-TQMSを組み合わせることで、網羅的かつ高い信頼性のメタボロミクスが可能となります。今後、AIや機械学習の発展により、信頼性の高いデータでメタボロミクスをする必要性が一層増すため、本ワークフローはそのための有効な手法の一つと考えられます。

LCMSおよびNexeraは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

01-00240-JP 初版発行：2021年 9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Clubにご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021