

Technical Report

GC-MSを用いた¹³C代謝フラックス解析法の紹介

¹³C-metabolic flux analysis of central carbon metabolism using GC-MS

岡橋 伸幸¹、川名 修一²、松田 史生¹、清水 浩¹

Abstract:

本レポートでは、¹³C代謝フラックス解析法の原理や実験のワークフローを解説し、大腸菌の中枢炭素代謝経路のフラックス分布をGC-MSを用いて推定した研究例を紹介し、フラックス解析の結果、解糖系とペントースリン酸経路の分岐比や、TCA サイクルの反応の向き、グリオキシル酸経路やエントナードウドロフ経路といった不活性化している反応を特定することができました。本法は物質生産細胞の生産性評価や疾患細胞に特異的な代謝の解明に有効であることが期待されます。

Keywords: ¹³C 代謝フラックス解析、アミノ酸、GC-MS、大腸菌

1. はじめに

近年、細胞内代謝反応のフラックス（細胞あたり、時間あたりの化学反応量）を定量する¹³C代謝フラックス解析法が、がん細胞に特異的な代謝の解明や、創薬スクリーニング、物質生産細胞の生産性評価など、医学、薬学、工学など幅広い分野で注目を集めています[1,2,3]。細胞内代謝状態を理解する手法として、これまで代謝物量の計測（メタボローム）に加えて、酵素遺伝子の発現（トランスクリプトーム）、酵素タンパク量（プロテオーム）の測定などが盛んに行なわれています。これらの結果から細胞内代謝の流れ（フラックス）の推定が試みられてきましたが、代謝物の蓄積量は必ずしも代謝フラックスとは相関しないため、その推定は困難です。また、細胞内代謝の流れはタンパク質の翻訳後修飾やアロステリック制御など定量の難しい要因の影響を受けるため、酵素遺伝子発現量や酵素タンパク量からの *in vivo* 代謝状態の推定には限界があります。この問題を解決するには、細胞内の代謝フラックス分布を計測する¹³C代謝フラックス解析法が有効です。本解析法を適用することで、細胞内代謝反応の向きや、分岐比、反応速度といった代謝の直接的な理解が可能であり、活性化・抑制されている反応の発見が期待できます。本稿では、HPLCでの培地成分の分析、GC-MSによるタンパク由来アミノ酸の¹³C標識割合の計測を通して、モデル微生物の大腸菌野生株における中枢炭素代謝経路のフラックス分布を推定する方法を解説します。

2. ¹³C代謝フラックス解析法の原理

¹³C代謝フラックス解析法では、炭素の安定同位体¹³Cで標識を施した炭素源を含む培地で細胞を培養します（Fig. 1、Step 1）。例えば、グルコースの1位の炭素が¹³Cで置換された[1-¹³C]グルコースを含む培地中で細胞を培養し、細胞内のピルビン酸（もしくはピルビン酸から合成され、同一の炭素骨格を持つアラニン）の¹³C標識割合を質量分析器で計測すると、解糖系とペントースリン酸経路の分岐比を推定することができます。解糖系で資化された[1-¹³C]グルコースからは、非標識のピルビン酸と1つ¹³Cを含むピルビン酸が1:1の割合で生じます。一方、[1-¹³C]グルコースがペントースリン酸経路で代謝された場合、1位の¹³Cは脱炭酸で失われるため、非標識のピルビン酸のみを生じます。このように炭素源が変換される代謝経路の違いに依存して、代謝物質中に蓄積する¹³Cのパターンが変化することを利用して、細胞内分岐点でのフラックスの分岐比を推定できます。¹³C標識割合の分析とともに、細胞を培養した培地の成分変化を継続的に分析し、細胞が取り込む物質や排出する物質の収支を算出します（Fig. 1、Step 2）。最後にStep 1、Step 2で取得したデータを合わせて、計算機上でデータを解釈します（Fig. 1、Step 3）。これまでに我々が構築した¹³C代謝フラックス解析ソフトウェア“OpenMebius”[4]を使って、¹³C標識情報と比速度の情報を統合して解析することで、細胞内の代謝フラックス分布を推定できます。

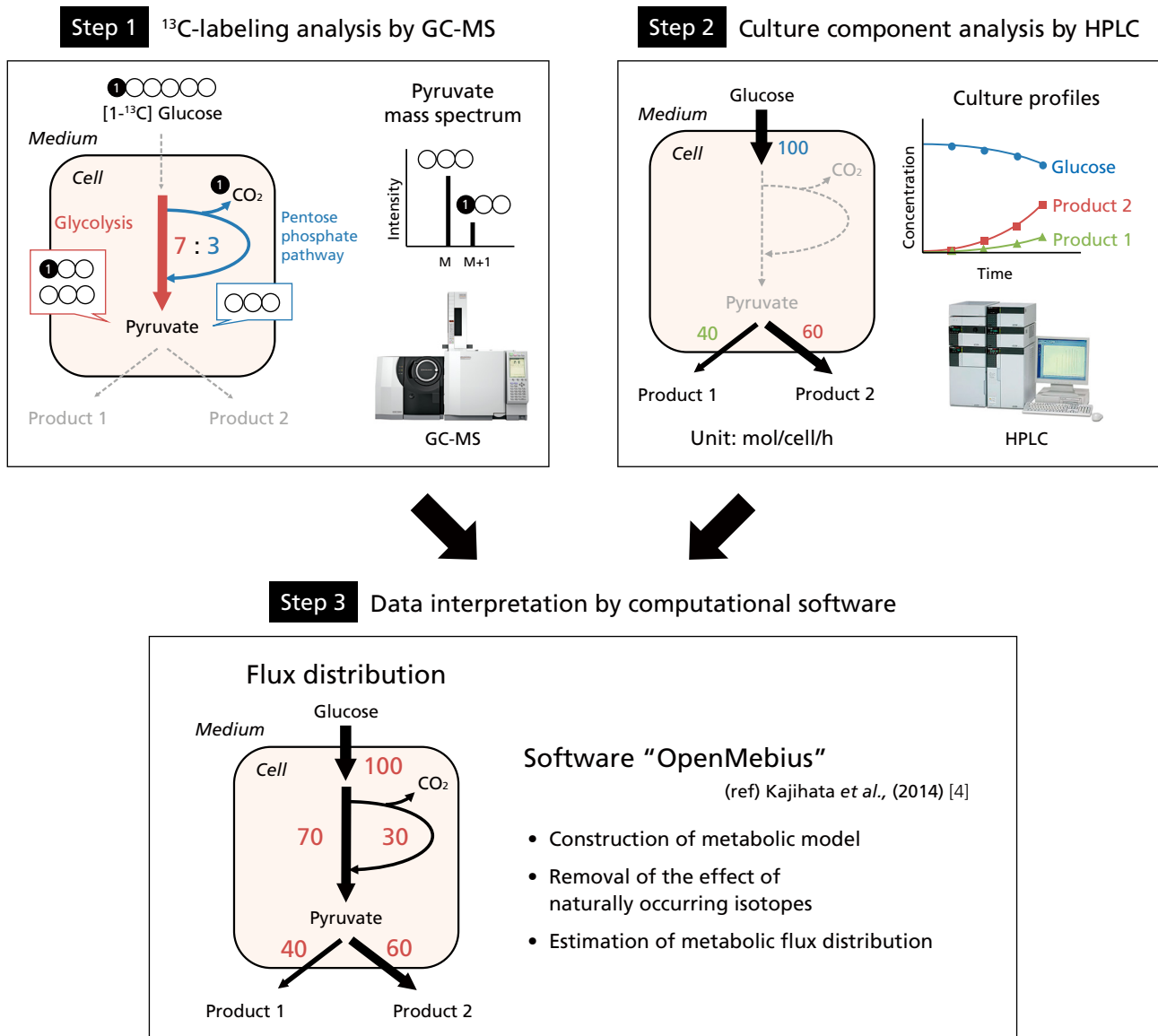


Fig. 1 ^{13}C 代謝フラックス解析法の概要

3. 大腸菌の ^{13}C 標識培養

フラックス解析法は参考文献5の方法を参考にしました。大腸菌野生株 (*Escherichia coli* MG1655) をM9最少培地に5 g/Lの ^{13}C 標識グルコース ([1- ^{13}C]glucose : [U- ^{13}C]glucose = 1 : 1) を添加した培地100 mLを用いて、坂口フラスコで好気的に培養しました。細胞濃度 (OD₆₀₀) と培地成分の測定のため、継時的に培養液をサンプリングしました。細胞濃度は分光光度計 (UVmini-1240、島津製作所) で波長600 nmでの濁度 (OD₆₀₀) を測定しました。タンパク由来アミノ酸の ^{13}C 標識割合の計測のため、対数増殖中期 (OD₆₀₀ ~ 1) の培養液3 mLをファルコンチューブに回収し、遠心分離 (10000 rpm、10 min、4°C) して菌体ペレットを作りました。サンプルは使用するまで-80°Cで保存しました。

4. タンパク由来アミノ酸の ^{13}C 標識割合の分析

4-1. 菌体の洗浄

菌体の洗浄から ^{13}C 標識割合のGC-MS分析までのサンプル調製のワークフローをFig. 2に示しました。まず、菌体を洗浄するため菌体ペレットに10 mLの生理食塩水を加え、ボルテックスミキサーで懸濁後、遠心分離 (10000 rpm、10 min、4°C) し、上清を捨てました。上述の操作を計3回繰り返しました。

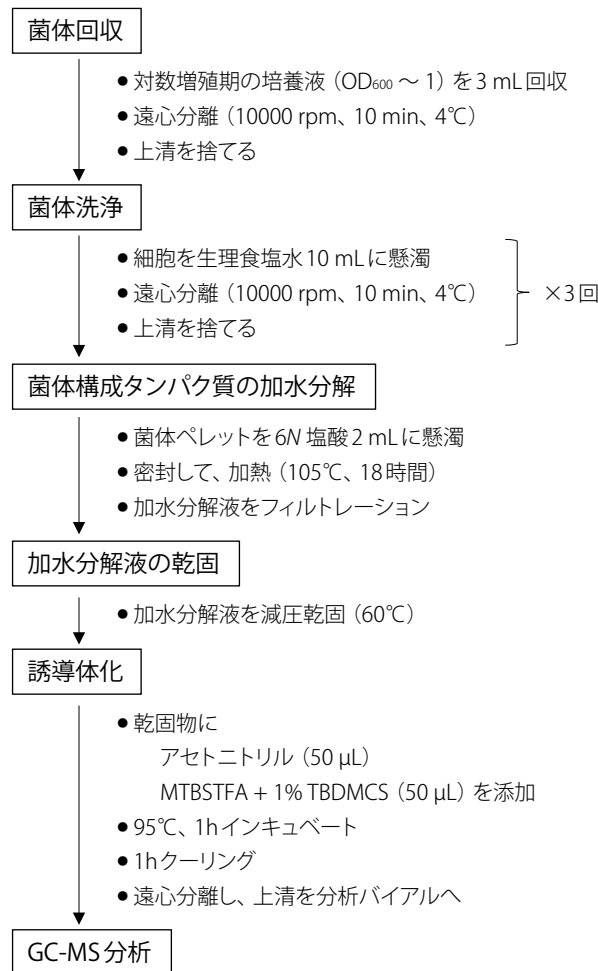


Fig. 2 サンプル前処理のワークフロー

4-2. 菌体構成タンパク質の加水分解

菌体ペレットに 6N の塩酸 2 mL を加えて懸濁し、凍結サンプル瓶に移し替え、真空封した後、ヒートブロック恒温槽 (Dry Thermo Unit TU-1C、タイテック) で 105°C、18時間菌体構成タンパク質を加水分解しました。その後、加水分解液をフィルトレーションすることで不溶物を取り除きました。加水分解液を 100 μL エッペンドルフチューブに取り、減圧乾燥機にて 60°C で減圧乾固しました。

4-3. タンパク由来アミノ酸のtBDMCS誘導体化

タンパク質由来アミノ酸の誘導体化には *N*-Methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide + 1% *tert*-butyldimethylchlorosilane (MTBSTFA + 1% TBDMCS) による *tert*-ブチルジメチルシリル (tBDMCS) 化を用いました。乾固させたサンプルに 50 μL アセトニトリル (TS-20062、Thermo Scientific)、50 μL MTBSTFA + 1% TBDMCS (TS-48927、Thermo Scientific) を加え、105°C で加熱しました。1時間クーリングしたあと遠心分離 (15000 rpm、5 min) し、上清を分析バイアルに移し、GC-MS 分析に供しました。

4-4. 分析条件

GC-MS の分析条件を Table 1 に示します。フラックス解析では、代謝物の骨格炭素中の ¹³C 位置情報を取得するため EI で生じるフラグメントを計測対象とします。Fig. 3 には tBDMCS 誘導体化アスパラギン酸のマスペクトルを示しました。[M-57]⁺ や [M-85]⁺ などのスペクトル群は骨格炭素の一部がイオン化の際に開裂したフラグメントを表しており、それぞれのフラグメントを測定することでフラックス解析の精度が向上します。さらに、これらのフラグメント中にいくつ ¹³C が含まれているかを計測するため同位体 (M、M+1、M+2、M+3…) 測定が必要になります。そのため、Selected Ion Monitoring (SIM) の測定チャンネル数が測定対象成分と比較し、多くなります。本測定では、自動メソッド作成機能である Smart SIM を用いて、Dwell time の最適化を行い、SIM メソッドを作成しました。

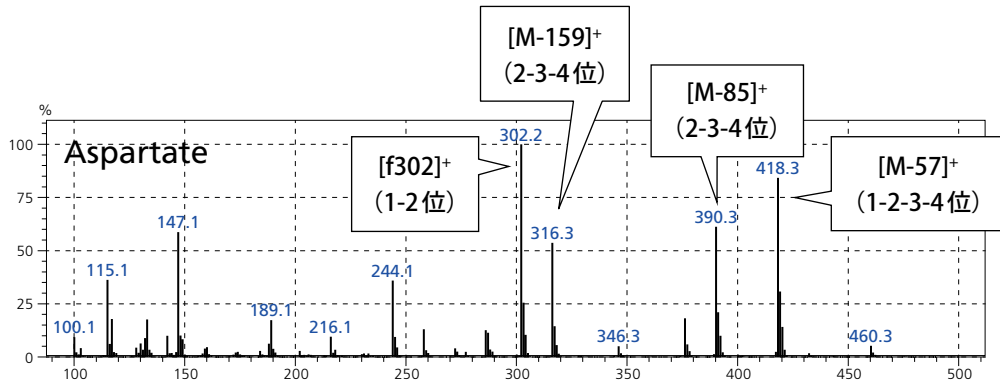


Fig. 3 tBDMS誘導体化アスパラギン酸のマススペクトルと特定の骨格炭素を保持したフラグメント

Table 1 タンパク由来アミノ酸 ^{13}C 濃縮度のGC-MS分析条件

装置	: GCMS-TQ8040、AOC-20i (オートインジェクタ)		
GC条件	MS条件		
カラム	: DB-5MS+DG (Agilent Technologies) (長さ: 30 m、内径: 0.25 mm、膜厚: 0.25 μm)	イオン源温度	: 200°C
注入温度	: 250°C	インターフェース温度	: 250°C
カラム温度	: 150°C (2 min) \sim 3°C/min \sim 270°C \sim 10°C/min \sim 300°C (5 min)	イベントタイム	: 0.3 sec
注入モード	: スプリット (1:10)	測定モード	: Selected Ion Monitoring (アミノ酸 15種 471チャンネル)
キャリアガス	: He		
線速度	: 38.1 cm/sec		
注入量	: 1 μL		

5. 培地成分の分析

回収した培養液は遠心分離 (15000 rpm、5 min、4°C) し、上清をポアサイズ0.45 μm のフィルターカートリッジに通して、菌体を除きました。培養液 100 μL とピメリン酸溶液 100 μL (内部標準物質)を混合し、Table 2に示した条件でHPLC分析しました。

Table 2 培地上清のHPLC分析条件

装置	: HPLC Prominence
検出器	: RID-20A (35°C)
カラム	: Aminex HPX-87H Column (BIO-RAD)
温度	: 65°C
溶離液	: 1.5 mM H_2SO_4
流速	: 0.5 mL/min
注入量	: 20 μL

6. 代謝フラックスの計算

タンパク由来アミノ酸の ^{13}C 標識割合の解釈には、 ^{13}C 代謝フラックス解析ソフトウェア“OpenMebius” (<http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/hp/software.html>にて公開中) を利用しました[4]。本ソフトウェアは解析に必要となる代謝モデルの生成や安定同位体の影響の除去、代謝フラックス分布の推定を行う機能を有しています。

7. 結果

大腸菌野生株 (*Escherichia coli* MG1655) の中枢炭素代謝経路のフラックス分布を推定するため、GC-MSでタンパク由来アミノ酸の ^{13}C 標識割合を分析しました。Fig. 4にはtBDMS化したタンパク由来アミノ酸の分析のトータルイオンクロマトグラムを示しました。15種類の標準アミノ酸の ^{13}C 標識割合を得ることができました。Fig. 5に示したアラニンのマススペクトルに注目すると、 ^{13}C 標識前のアラニンは ^{13}C を一つも含まないアラニン (M) の割合が最も多いのに対し、 ^{13}C 標識後はM+1、M+2、M+3など ^{13}C 原子を含むアラニンの割合が増加しており ^{13}C 標識割合が変化していることが分かります。

このスペクトルの強度値を ^{13}C 代謝フラックス解析ソフトウェア“OpenMebius”の所定のエクセルシートに入力します (Fig. 6)。

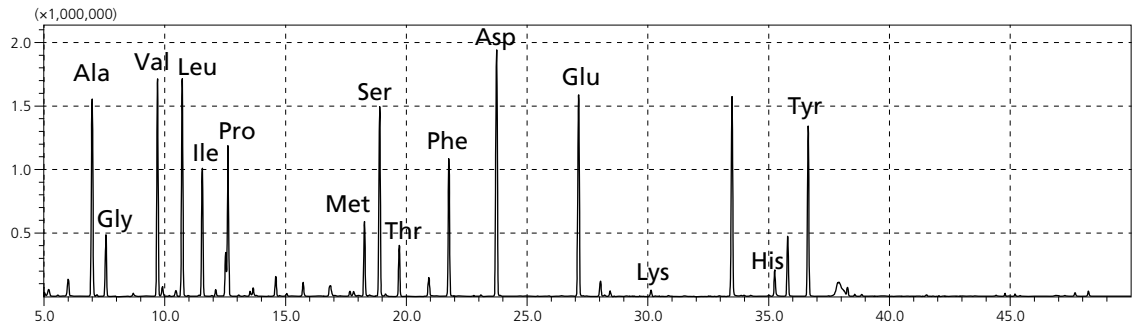


Fig. 4 tBDMs 化タンパク由来アミノ酸のGC-MS分析 (トータルイオンクロマトグラム)

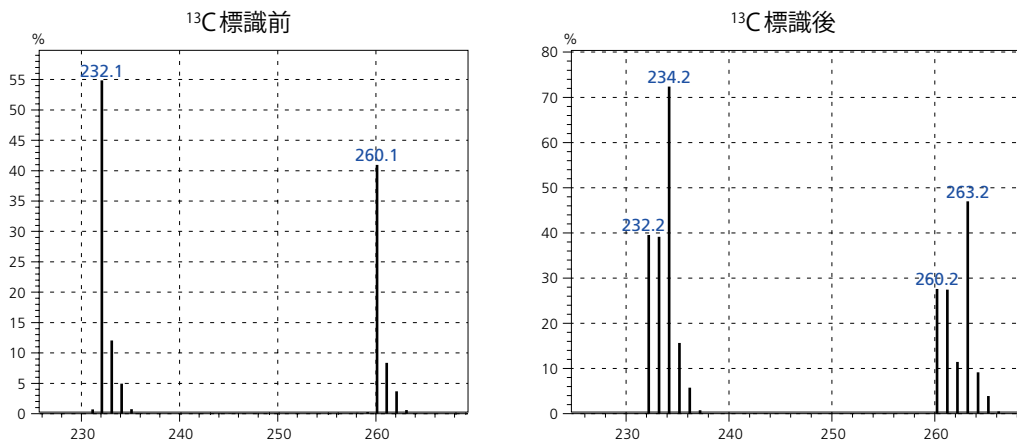


Fig. 5 ^{13}C 標識前後のアラニンのマススペクトル

tBDMs 誘導体化したアラニンを GC-MS で計測した際に観測されるフラグメント $[\text{M}-57]^+$ ($m/z=260$)、 $[\text{M}-85]^+$ ($m/z=232$) のスペクトルを示しました。 ^{13}C 標識前は、 ^{13}C を一つも含まないアラニンが最も大きい割合を占めています (左図)。一方、 ^{13}C 標識後は ^{13}C 原子がアラニン中に取り込まれた数だけ質量数が大きいアラニンが観測されました (右図)。

フラグメントの名前		A	B	C	D		
入力したスペクトル数	1	Ala_57	Ala_85	Asp_57	Asp_85	...	
	2	7	6	8	7	...	
分析の結果得られた同位体ピークの面積値を上から順に M, M+1, ... と入力	M	3	349908	519610	235390	233119	
	M+1	4	349415	515574	449382	403483	
	M+2	5	144005	960851	494934	506681	
	M+3	6	600341	210249	632532	561052	...
	M+4	7	117453	77344	568444	190945	
	M+5	8	49844	10611	197138	73778	
	M+6	9	6506		73774	15928	
	⋮	10			15984		
		11					

Fig. 6 同位体強度値の "OpenMebius" への入力

次に、培地成分をHPLCで分析した結果、酢酸のピークが観測され、対数増殖中期の大腸菌は培地中へ酢酸を排出していることが分かりました (Fig. 7、8)。培地成分の濃度変化を継続的に観測し、そのデータから計算した炭素源の比消費速度や生産物の比排

出速度をOpenMebiusの所定のエクセルシートに入力します (Fig. 9)。細胞増殖に使われる成分 (BIOMASS) は比増殖速度 (0.70 h^{-1}) と細胞構成成分の文献値 [6] より算出しました。

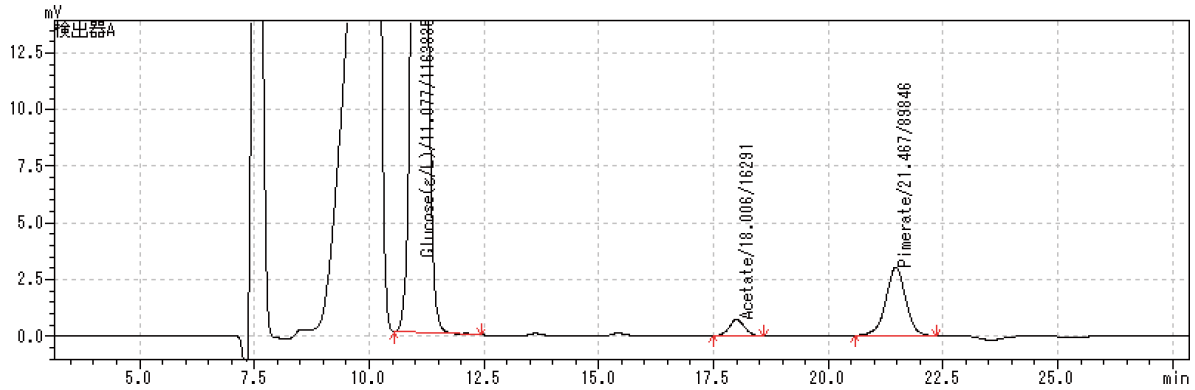


Fig. 7 培地成分のHPLC分析結果

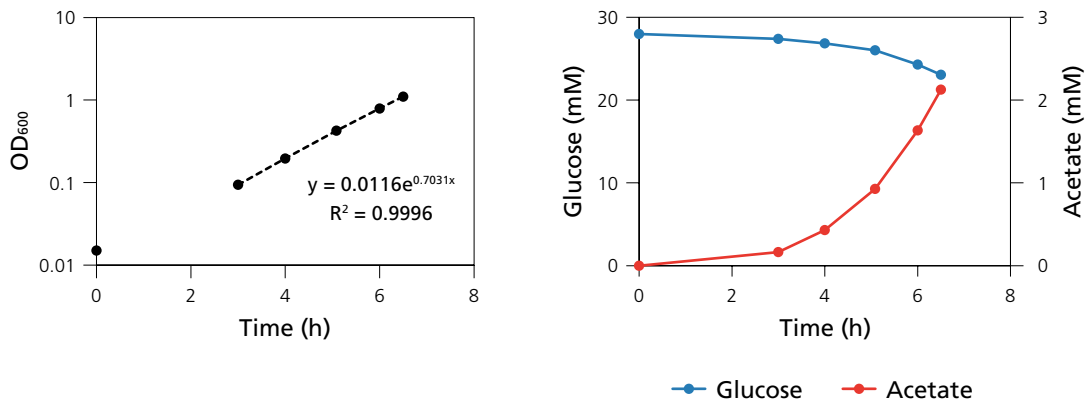


Fig. 8 細胞増殖の挙動 (左) と培地中グルコースと酢酸の濃度変化 (右)

フラックス値
ここではグルコース取り込みを100としたときの
相対値を入力している。(絶対値でもよい)

	A	B
1	FluxID	Flux
2	r1_in_gluc	100
3	r59_ex_ace	40.55173
4	r44_BIOMASS_g6p	1.685339
5	r45_BIOMASS_f6p	0.582881
	⋮	⋮

Fig. 9 比消費速度や比生産速度の入力

GC-MSで計測したタンパク由来アミノ酸の¹³C標識割合情報とHPLCで計測した比速度の情報を統合し、OpenMebius[4]によって解釈した結果、大腸菌野生株の中核炭素代謝経路のフラックス分布を求めることができました (Fig. 10)。取り込まれたグルコースの75%が解糖系、23%がペントースリン酸経路で代謝されており、

代謝経路の分岐点における分岐比を測定することができました。また、TCAサイクルは酸化的に働いていることが分かり、反応の向きに関する情報を得ることができました。最後に、グリオキシル酸経路やエントナードウドロフ経路のフラックスはゼロと推定され、本培養条件で活性がない反応を特定することができました。

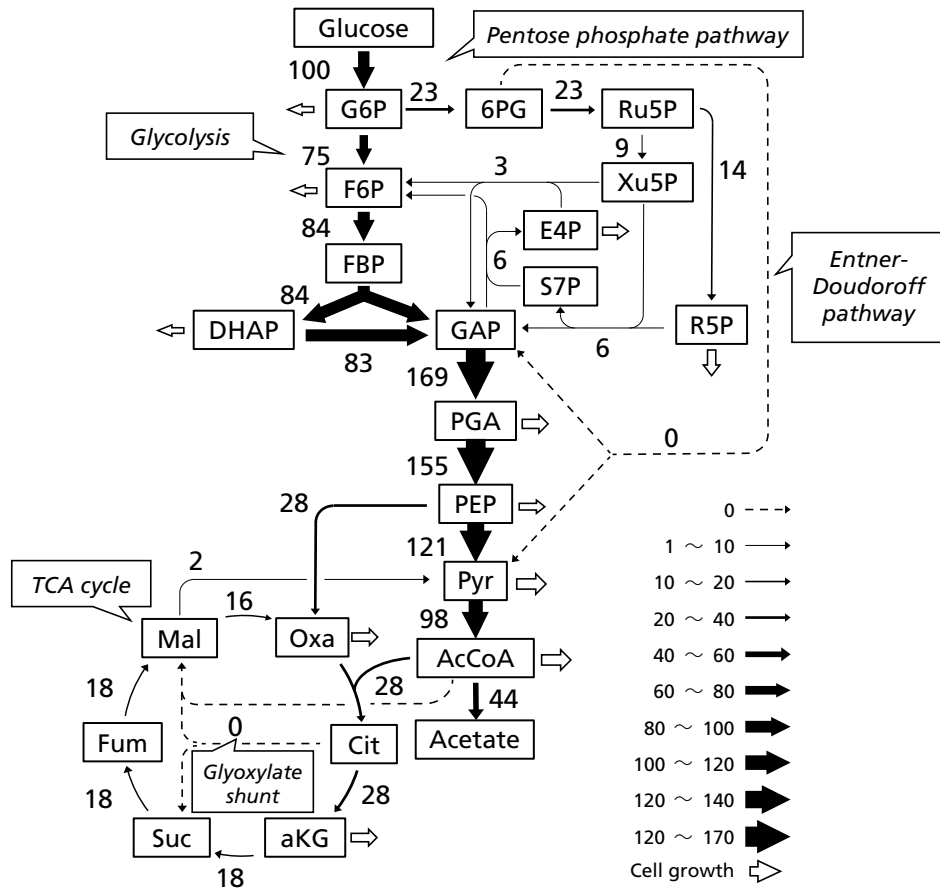


Fig. 10 増殖期大腸菌の代謝フラックス分布

数字が各反応のフラックス (時間当たり、菌体乾燥重量当たりの反応量) を表しています。グルコース取り込み速度 (8.76 mmol/g-DCW/h) を100に規格化した際の相対値で表示しています。

8. まとめ

¹³C代謝フラックス解析を行うことで、大腸菌中核炭素代謝経路のフラックス分布を求めることができました。今回紹介した方法は、有用物質を生産する微生物や癌などの疾患細胞の代謝評価に応用可能であると期待されます [1,2,3]。

参考文献

- [1] Metallo, C. M. *et al.*, Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481, 7381, 380–384 (2012).
- [2] Okahashi, N. *et al.*, Metabolic characterization of cultured mammalian cells by mass balance analysis, tracer labeling experiments and computer-aided simulations. *J. Biosci. Bioeng.*, 120, 6, 725–731 (2015).
- [3] Toya, Y. & Shimizu, H., Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms. *Biotechnol. Adv.*, 31, 6, 818–826 (2013).
- [4] Kajihata, S. *et al.*, OpenMebius: An Open Source Software for Isotopically Nonstationary ¹³C-Based Metabolic Flux Analysis. *BioMed Res. Int.*, 2014, 627014, 1–10, (2014).
- [5] Zamboni, N. *et al.*, ¹³C-based metabolic flux analysis. *Nat. Protoc.*, 4, 6, 878–892 (2009).
- [6] Ingraham, J. L. *et al.*, Growth of the Bacterial Cell. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA, p. 128 (1983).

トリプル四重極型 ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040

日常の分析を飛躍させるSmart性能

多種多様な試料に含まれるさまざまな化学物質を微量まで測定する場合、GC-MS/MSによる測定が有効ですが、多くのパラメータ設定や適切なメソッドの作成が必要になります。GCMS-TQ8040では、煩雑なメソッドの作成作業を自動化し、高感度な多成分一斉分析を可能にしたことで、生産性を飛躍的に向上させます。

Smart Productivity

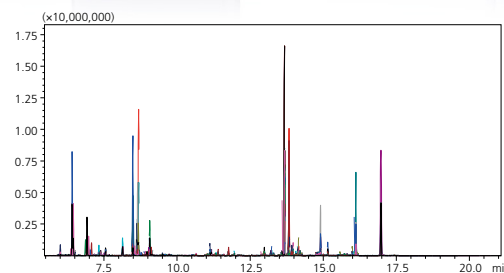
- 新しいファームウェア・プロトコルを搭載
- より多くの化合物を高感度・高精度に一斉分析
- Twin Line MSシステムによりカラム交換作業を軽減

Smart Operation

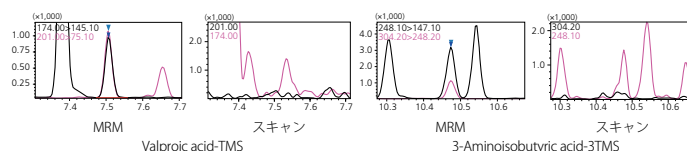
- Smart MRMによる最適なメソッドを自動作成
- 最適なトランジションを自動探索
- AART機能による保持時間自動修正

Smart Performance

- 特許技術の高感度イオン源により、更なる高感度化を実現
- OFF-AXISイオン光学系によりノイズを低減
- シングルGC-MSとしても高感度分析可能



ヒト標準血漿中代謝成分のMRM分析で得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC)



ヒト標準血漿に含まれる代謝物のマスクロマトグラム比較

詳細カタログ C146-0315

高速液体クロマトグラフ

Prominence

HPLCの真のあるべき姿が、ここに。

医学や医薬、生化学をはじめ、化学、環境、食品などあらゆる分野で活躍するHPLC。ライフサイエンス分野では、アミノ酸、有機酸、糖などのアプリケーションシステムを高度なレベルで実現するために、島津製作所が提供するHPLC、それがProminenceです。

Prominenceは、超高速LCをはじめとして、分取LCやGPC、イオンクロマトグラフ、そしてLC/MSといったさまざまな用途において、高い信頼性と拡張性を発揮します。



詳細カタログ C196-0081

本レポートに掲載の製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器の登録を行っておりません。

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

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

初版発行：2016年1月
© Shimadzu Corporation, 2016