SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

GC-MS　GCMS-TQ™シリーズ、Smart Metabolites Database™

Smart Metabolites Databaseを用いたトマト品種間の多変量解析

坂本 雄紀　川北 祥人

ユーザーベネフィット

- ◆ メタボロミクスにおける代謝物一斉分析から多変量解析までを簡単に行えます。
- ◆ サンプル分類フィルター機能は、検出の可能性が高い成分だけを絞りこみ、データ解析を効率化します。
- ◆ 糖類定量用メソッドにより、サンプル中の24成分の糖類のおおよその濃度が算出できます。

■はじめに

メタボロミクスとは、生体内に含まれる代謝物を網羅的に解析する技術です。医学分野において、疾患の生理的な変化を探し出すバイオマーカー探索の有効な手段として利用されています。近年、メタボロミクスは、食品分野でも応用されており、食品中の構成成分の比率の違いから、機能性成分の探索、品質評価法の確立、経時劣化の予測などさまざまな用途で利用されています。

GC-MS(/MS)を用いたメタボロミクスでは、アミノ酸、脂肪酸、有機酸および糖類などの低分子の親水性代謝物が対象となりますが、GC-MSはこれらの成分を一斉分析できることに利点があります。その一方で、これらの成分を微量まで検出させるには、SIMやMRMが有効ですが、化合物ごとにMSパラメータを最適化する必要があります。

Smart Metabolites Databaseは、代謝成分に特化したGC-MS(/MS)用データベースです。このたび、食品分野でのメタボロミクスへの適応拡大するため、バージョンアップしたVer.2をリリースしました。

本稿では、Smart Metabolites Databaseを用いたトマトの品種間による構成成分の多変量解析とサンプル間で差異のあった糖類の含有濃度の比較結果について紹介します。

■Smart Metabolites Database Ver.2

Smart Metabolites Database Ver.2は、メタボロミクスに必要な分析条件、代謝成分のSIMおよびMRMトランジションがあらかじめ最適化されたデータベースです。マーカー探索用途の代謝成分一斉分析メソッドは、SIMで627成分、MRMで540成分に登録成分を拡充しました。また、化合物種別の定量用メソッドとして、脂肪酸メチルエステル(FAMEs)、アミノ酸の他に糖類の分析用メソッドを追加しました。

また、新たにサンプル分類フィルター機能を搭載しました。測定するサンプルに該当するフィルターを選択することによって、サンプルに含有すると予測される代謝成分を絞り込んで測定を行うことにより、データ解析にかかる時間を大幅に減らすことが可能です。

さらに多検体定量解析ソフトウェア「LabSolutions Insight」を利用することにより、多検体のデータ解析と多変量解析を行うためのリスト作成を簡単に行えます。出力したリストは、「マルチオミクス解析パッケージ」に取り込むことができ、主成分分析(PCA)や階層クラスタ分析(HCA)を行うことができます(図1)。

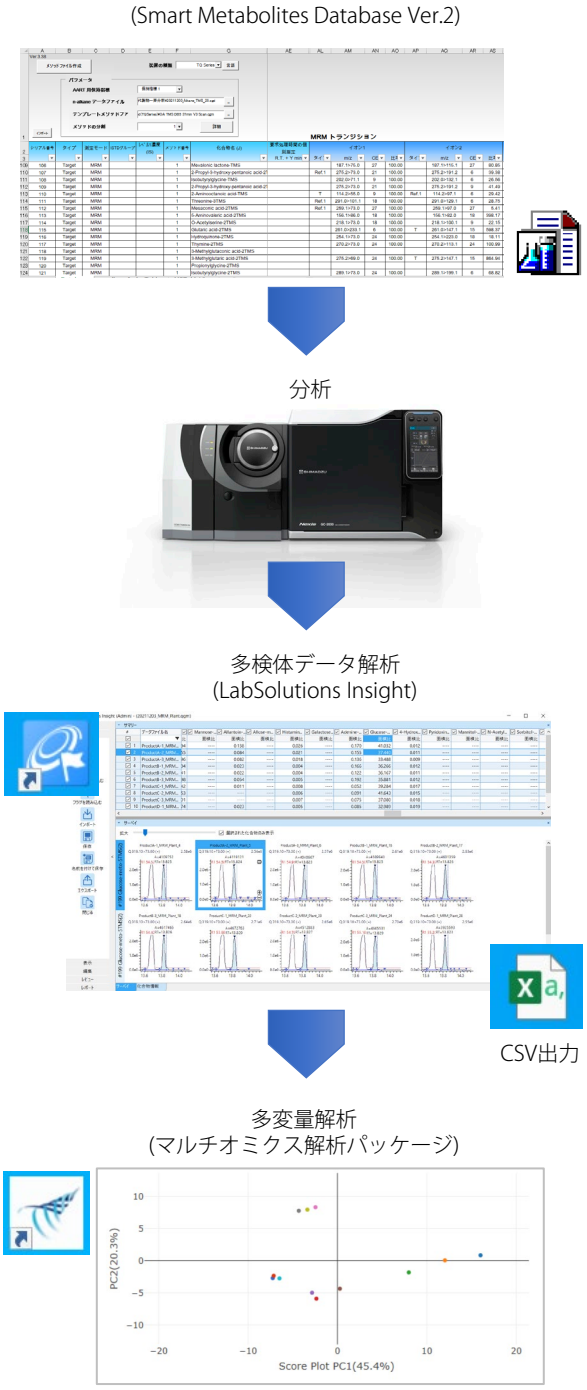

図1　Smart Metabolites Database Ver.2を用いた多変量解析のフロー

■実験

市販されているトマト4種類をサンプルとして用意し、それぞれn=3で前処理を行いました。適切な大きさにカットしたトマトを凍結乾燥させました。得られた乾燥試料10 mgをBligh & Dyerの方法をベースとした前処理プロトコルにて抽出し、メトキシム-TMS誘導体化しました。なお、内部標準にはリビトールを用いました。GC-MS/MSの測定は、Smart Metabolites Database Ver.2を使用し、サンプル分類フィルターは"植物"に設定しました。測定条件を表1に示します。

表1 装置構成および分析条件

GC-MS	: GCMS-TQ8040 NX
オートインジェクタ	: AOC-30i / 20s U
データベース	Smart Metabolites Database Ver.2
カラム	: BPX-5 (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 µm)
[GC]	
気化室温度	: 250℃
カラムオーブン温度	: 60℃ (2 min) → (15℃/min) → 330℃(3 min)
注入モード	: スプリット
スプリット比	: 30
キャリアガス	: He
キャリアガス制御	: 線速度 (39.0 cm/sec)
注入量	: 1 µL
[MS]	
イオン源温度	: 200℃
インターフェイス温度	: 280℃
データ採取モード	: MRM

■多変量解析結果

トマト4種類(n=3)から得られたデータを「マルチオミクス解析パッケージ」を用いて主成分分析（Principal Component Analysis: PCA）および階層クラスタ解析(Hierarchical Cluster Analysis: HCA)を行った結果をそれぞれ図2～図4にそれぞれ示します。

PCAのスコアプロットとHCAによる樹形図から、各サンプルを明確に区別できました。また、階層クラスタ解析のHeat Mapにより、Product Aは他の3品種のトマトと比較して多数の成分が相対的に多く含まれる傾向があり、特にアミノ酸の含有量が多いことがわかりました。Product Cは、イノシトール、グルコースやフルクトースなど糖類が他の品種に比べて含有量が多い結果となりました。

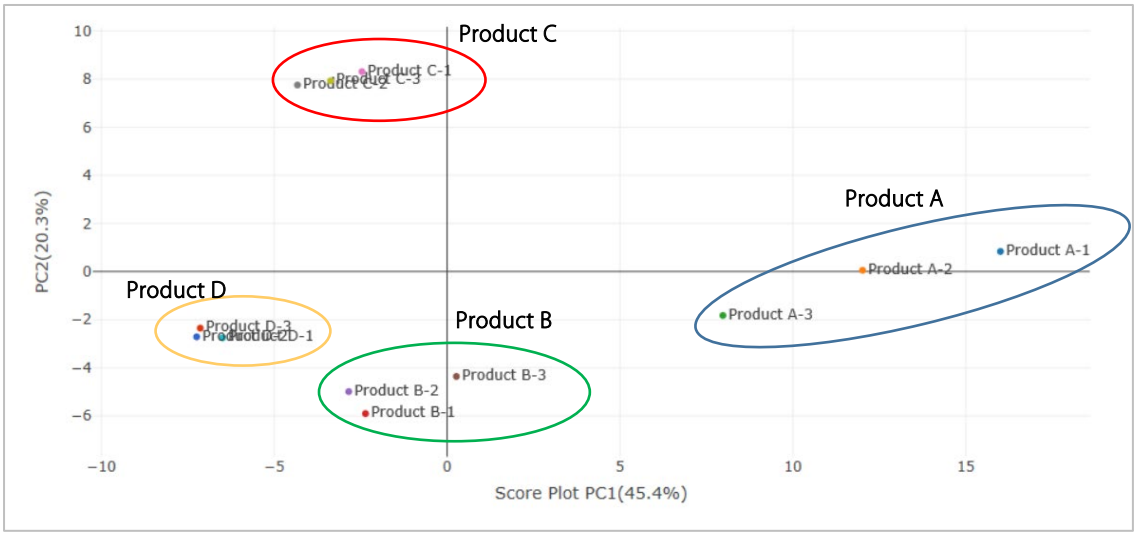

図2　トマト4種類における検出された代謝成分のスコアプロット

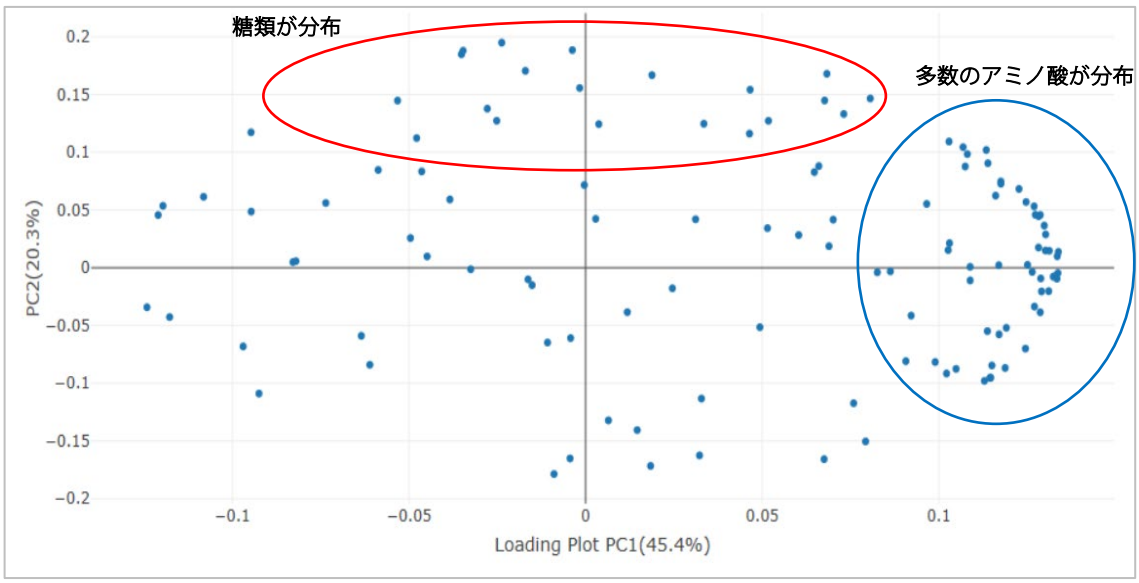

図3　トマト4種類における検出された代謝成分のローディングプロット

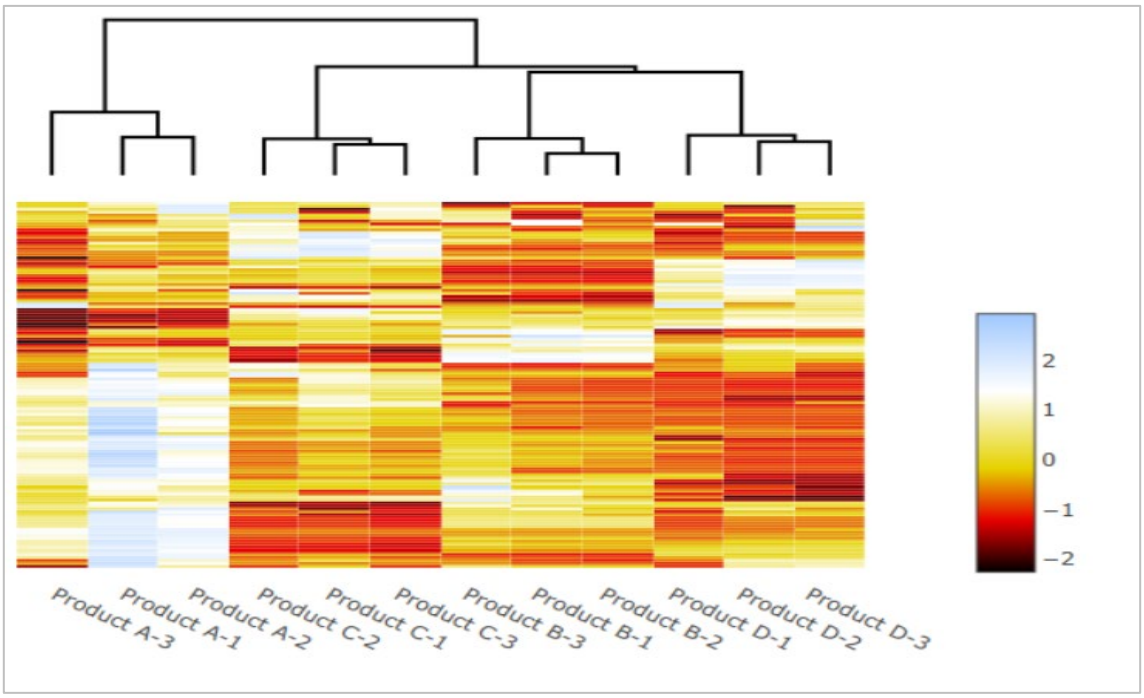

図4　トマト4種類における検出された階層クラスタ解析 (HCA Heatmap)

■糖類定量用メソッド

メトキシム-TMS誘導体化法は、代謝物一斉分析法として一般的に使用されていますが、特に還元性を持つ糖類では、メトキシム化による鎖状構造化により、2種類の幾何異性体が作られます。鎖状構造による物性の変化と2種類の幾何異性体により、ソルボースとフルクトース、マンノースとグルコースといった糖類異性体同士をクロマトグラム分離できないことから定量分析は困難になります。

Smart Metabolites Database Ver.2に新たに搭載した糖類定量用メソッドは、誘導体化法を最適化することにより、糖類を選択的に検出することができます。24種類の主要な糖類の分析に必要な化合物情報と検量線情報が登録されています。決められたサンプル量で代謝物一斉分析用の前処理を行い、抽出した試料の一部を糖類用の誘導体化することにより、サンプル量、抽出効率および誘導体化効率を考慮した糖類の半定量値を算出することができます。

図2~4の結果からProduct Cにおいて糖類に差がみられたため、糖類定量用メソッドを用いて品種間の違いを評価しました。多変量解析に供した試料のうちBligh & Dyerの方法で抽出した試料を100 μL採取して、誘導体化処理を行いました。また、内部標準にはリビトールを用いました。表2に糖類分析の分析条件および図5にProduct CのMRMクロマトグラムをそれぞれ示します。この誘導体化法は、糖類に選択性が高く、他の種類の代謝物はほとんど誘導体化されずに検出されないことがわかりました。

表2 装置構成および分析条件

GC-MS	: GCMS-TQ8040 NX
オートインジェクタ	: AOC-30i / 20s U
データベース	Smart Metabolites Database Ver.2
カラム	: BPX-5 (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm)
[GC]	
気化室温度	: 280℃
カラムオーブン温度	: 150℃ (5 min) → (3℃/min) → 220℃ → (10℃/min) → 320℃(3 min)
注入モード	: スプリット
スプリット比	: 15
キャリアガス	: He
キャリアガス制御	: 線速度 (34.0 cm/sec)
注入量	: 1 μL
[MS]	
イオン源温度	: 230℃
インターフェイス温度	: 280℃
データ採取モード	: MRM

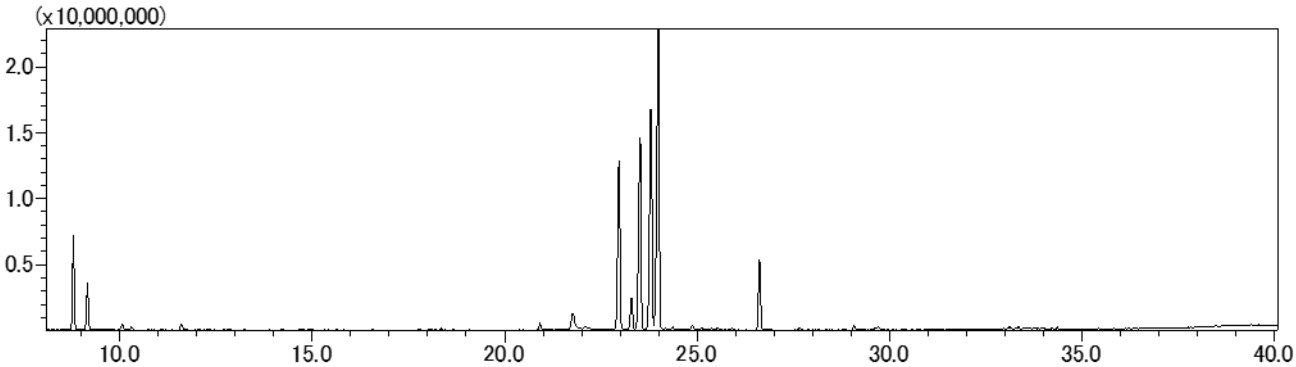

図5　トマトProduct CのMRMクロマトグラム

■糖類分析結果

Product Cで検出された代表的な成分のMRMクロマトグラムを図6に、各トマトで検出された糖類のデータベースから算出された半定量結果(作物中濃度)を表3および図7に示します。

Product Cの品種は、他の品種よりもグルコース、マンノース、フルクトース、*myo*-イノシトールが1.2~1.4倍ほど多く含まれていることがわかりました、Product Bは、他の品種では検出されないマンニトールが含まれていました。また、Product Dは他の品種よりもスクロースを約2倍多く含んでいることがわかりました。

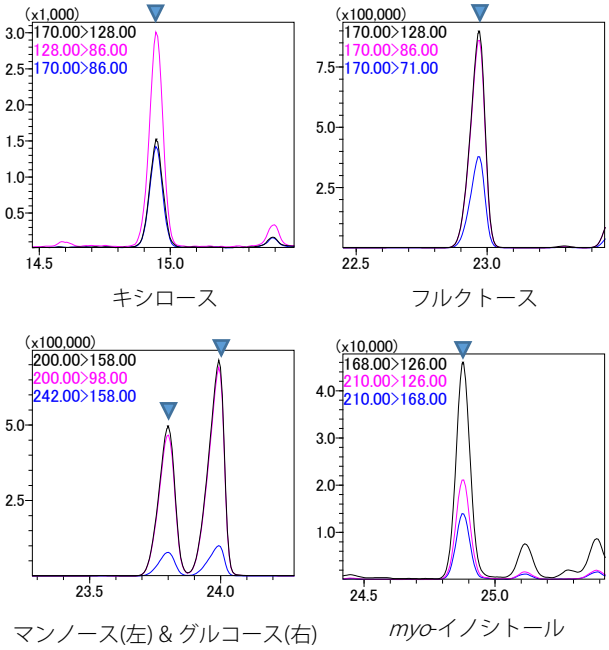

図6　トマト Product Cで検出された代表的な糖類のMRMクロマトグラム

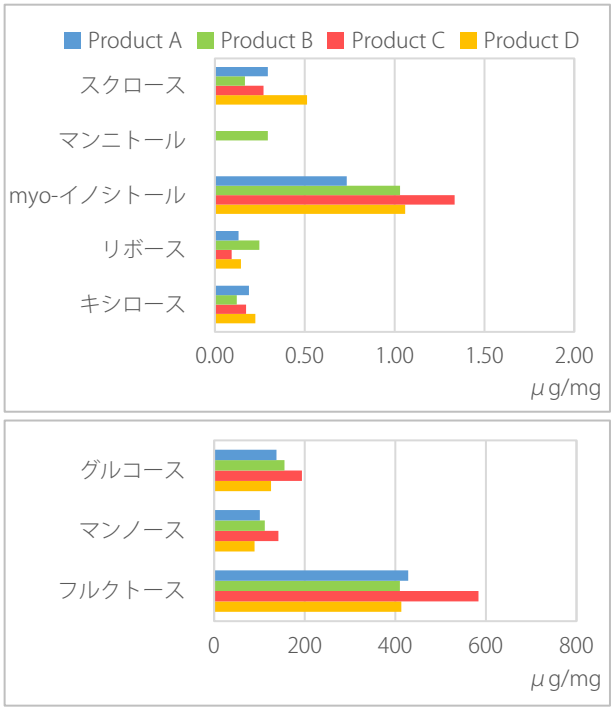

図7　トマト 4品種で検出された糖類の半定量結果比較
上段: 低濃度、下段：高濃度

表3　トマト 4品種で検出された糖類の半定量結果

単位: μg/mg

化合物名	Product A	Product B	Product C	Product D
キシロース	0.19	0.12	0.17	0.22
リボース	0.13	0.25	0.09	0.15
myo-イノシトール	0.73	1.03	1.33	1.06
マンニトール	N.D.	0.29	N.D.	N.D.
スクロース	0.29	0.17	0.27	0.51
フルクトース	428	410	584	413
マンノース	101	112	142	89
グルコース	138	155	194	125

■まとめ

Smart Metabolites Database Ver.2とマルチオミクス解析パッケージを用いて、代謝成分を多変量解析することにより、トマトの品種間による差異を区別することが可能でした。また、糖類に着目した個別分析を行うことにより、多変量解析で示唆された差異を詳細に解析することができました。

新たに開発したSmart Metabolites Database Ver.2はフードメタボロミクスにおいて有効なツールです。

＊半定量結果は、試料の種類や前処理法により真値から大きくずれる可能性があります。正確な定量結果を必要とする場合には標準試料を用いた定量試験を実施してください。

GCMS-TQおよびSmart Metabolites Database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

01-00336-JP　初版発行：2022年 5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」、「®」を明記していない場合があります。

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
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、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, 2022