SHIMADZU
Excellence in Science

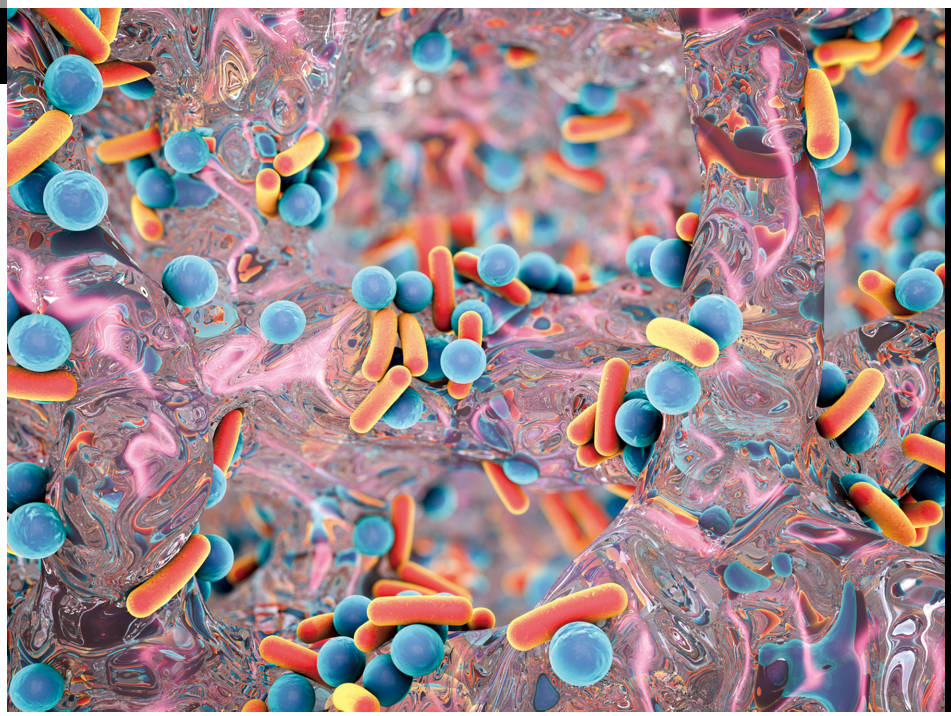
Application Note

No. 48

ライフサイエンス

GC-MS/MS、LC-MS/MSによる代謝物の網羅的分析 －腸内環境研究への応用－

服部考成[*1,*2]，國澤研大[*1,*2]，川名修一[*1]，河野慎一[*1,*2]，早川禎宏[*1]，飯田順子[*1,*2]，福崎英一郎[*2,*3]，松本光晴[*4]



Life Science

1. はじめに

ヒト腸内には、およそ 100 兆個もの腸内細菌が生息し、個体あたり 100 種を超える腸内細菌が共生する複雑な腸内細菌叢を形成しています。近年、これら腸内細菌が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになりつつあり、腸内細菌叢に関する研究が注目されています。医学研究では、腸内細菌叢と大腸がん等疾患との関係、薬効や免疫系へ及ぼす影響等、また食品分野では機能性食品に含まれる乳酸菌等の保健効果の検証等が行われています。腸内細菌叢による宿主への影響を解明する手段として、菌の種類やその分布を解析する次世代シーケンサーを用いた菌叢解析とともに、近年、腸内細菌叢が産生する代謝物を網羅的に解析する質量分析計を用いたメタボローム解析に注目が集まっています。これは、腸内細菌叢により産生された代謝物の一部が腸管から吸収され血中に移行し、全身を巡ると考えられているためです。

質量分析計を用いたメタボローム解析では、一般的にガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）や高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を使用し、サンプル中に含まれる代謝物（メタボローム）を網羅的に分析します。また図 1 のように、分析対象成分や分析目的に応じて、GC-MS、LC-MS を使い分ける必要があります。GC-MS では、アミノ酸、有機酸、糖等の親水性代謝物を分析する場合、誘導体化の処理が必要になりますが、頑健性に優れ、一回の分析で数百成分を網羅的に分析できます。一方、LC-MS は、誘導体化することなく、特定の代謝物（～100 成分）を効率的に分析することができ、特定成分のルーティン分析に適した手法です。

本アプリケーションノートでは、GC-MS/MS および LC-MS/MS により、マウス糞便中の一次代謝物を網羅的に分析しました事例をご紹介します。

*1 株式会社 島津製作所 分析計測事業部
*2 大阪大学・島津分析イノベーション共同研究講座
*3 大阪大学大学院 工学研究科
*4 協同乳業株式会社 研究所

2. 前処理 [1)]

図 2 にマウス糞便から代謝物を抽出するための前処理手順を示します。通常環境下で飼育した雄性 C57BL/6J マウスの新鮮糞便を回収し、糞便 50 mg に生理的リン酸緩衝液 450 μL を添加後、撹拌し、その上清を遠心分離、限外濾過しました。GC-MS/MS による一次代謝物分析では、この濾液に誘導体化処理を行い、GC-MS/MS 用の分析サンプルとしました。誘導体化の詳細は、メタボロミクス前処理ハンドブック（C146-2181）をご参照下さい。一方、LC-MS/MS による一次代謝物分析では、濾液を超純水で 10 倍に希釈し、LC-MS/MS 用の分析サンプルとしました。

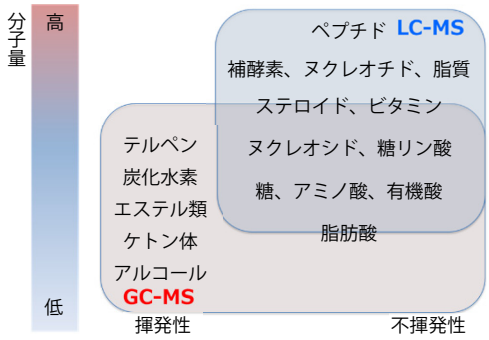


図 1　GC-MS、LC-MS の分析対象成分

3. 分析条件

GC-MS/MS 分析は、Smart Metabolites Database™ に含まれる MRM メソッドを用い、GCMS-TQ™ 8040 で分析しました。 Smart Metabolites Database は生体サンプルに含まれる代謝物を中心に 475 成分の MRM 情報が登録されており、475 成分の代謝物の一斉分析が可能です。詳細は Application Data Sheet No.104 をご参照下さい。一方、LC-MS/MS 分析は、一次代謝物 LC/MS/MS メソッドパッケージ Ver. 2 に含まれるイオンペア LC-MS/MS 法とイオンペアフリー LC-MS/MS 法を用い、LCMS™-8040 および LCMS™-8050 で分析しました。イオンペア LC-MS/MS 法は、解糖系、TCA 回路、ペントース・リン酸回路およびアミノ酸・ヌクレオチドといったライフサイエンス分野のメタボローム解析において重要となる代謝物 55 成分の一斉分析が可能です。イオンペアフリーLC-MS/MS 法は、イオンペア LC-MS/MS 法で対応できない有機酸やその他代謝物 97 成分の一斉分析が可能です。詳細は Application Data Sheet No. 42、49 をご参照下さい。

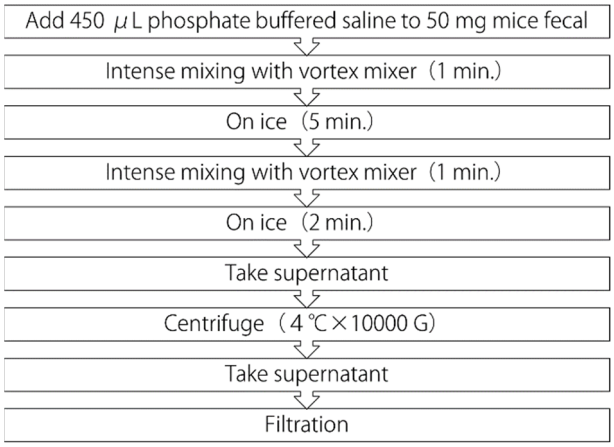


図 2　マウス糞便の前処理

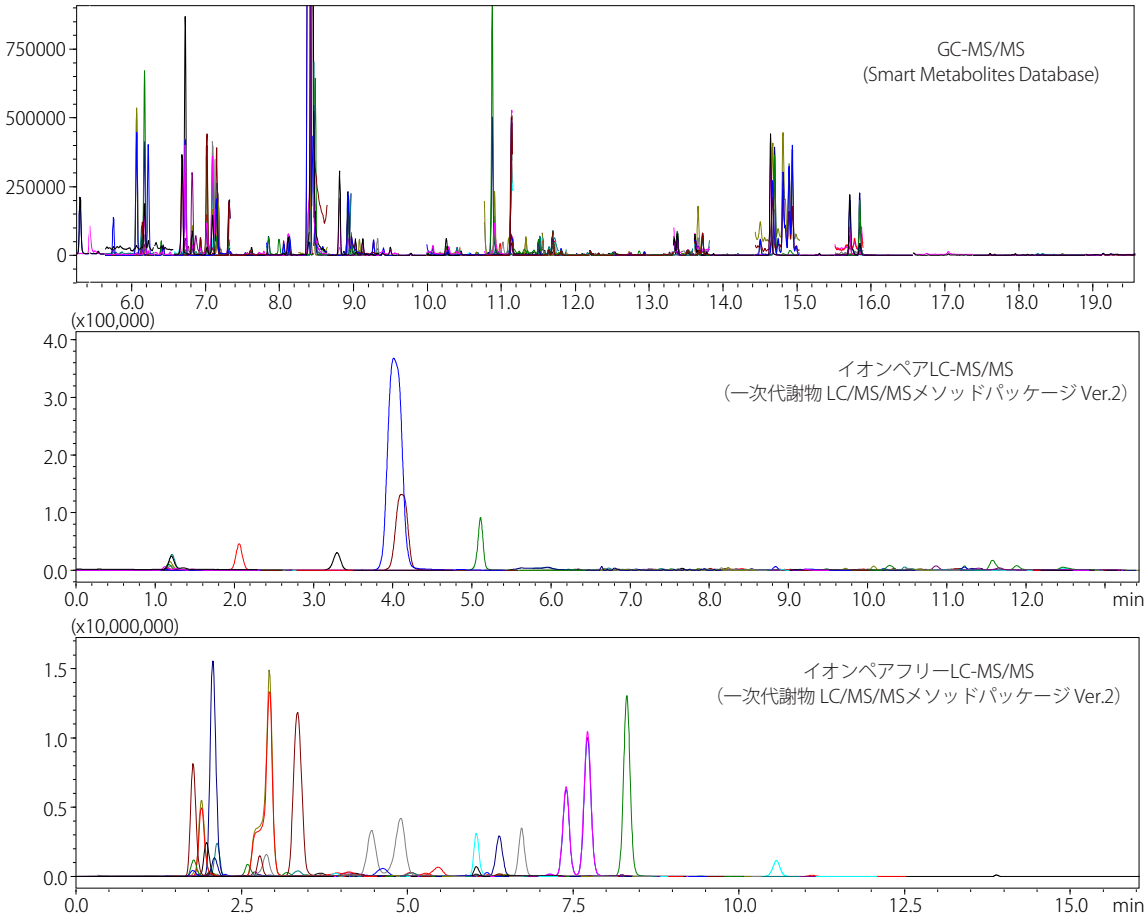


図 3　マウス糞便抽出液の MRM クロマトグラム

4. 分析結果

図 3 に、GC-MS/MS、LC-MS/MS を用いてマウス糞便抽出液を分析した際に得られた MRM クロマトグラムを示します。表 1 に、検出された成分および内部標準物質に対するピーク面積比の再現性を示します。GC-MS/MS では、短鎖脂肪酸や有機酸、糖等を中心に 100 成分検出されました。LC や LC-MS/MS では分析することが難しい糖類も、GC-MS/MS では 17 成分検出することができました。イオンペア LC-MS/MS 法では、アミノ酸を中心に 17 成分検出されました。一方、イオンペアフリーLC-MS/MS 法では、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、TCA サイクルに関わる有機酸等が 75 成分検出されました。図 4 に示すように、糞便中から網羅的に代謝物を分析するには、GC-MS/MS と LC-MS/MS を両方使用することが非常に有効です。

表 1　マウス糞便抽出液から検出された代謝物および再現性

Category	Compounds	Repetability (%RSD, n=6)		
		GC-MS/MS	LC-MS/MS (Ion pair)	LC-MS/MS (Non ion-pair)
Amino acids	Alanine	40.4	3.0	3.0
	Asparagine	-	9.7	1.4
	Aspartic acid	-	1.1	1.7
	Asymmetric dimethylarginine	-	-	1.5
	Cystine	-	-	7.2
	Glutamic acid	-	0.5	1.6
	Glutamine	-	3.1	1.0
	Glycine	1.0	5.9	4.0
	Histidine	-	18.0	4.7
	Isoleucine	-	-	1.7
	Leucine	16.6	-	2.4
	Lysine	-	5.0	0.7
	Methionine sulfoxide	-	-	2.1
	Phenylalanine	10.0	0.6	1.0
	Proline	-	-	2.3
	Serine	-	9.3	1.9
	Symmetric dimethylarginine	-	-	4.3
	Threonine	-	3.5	2.4
	Tryptophan	-	-	1.2
	Tyrosine	-	2.4	0.9
	Valine	-	-	4.8
Amino acid related metabolites	3-Methyl-2-oxovaleric acid	17.2	-	-
	4-Aminobenzoic acid	8.7	-	-
	4-Aminobutyric acid	-	-	3.9
	4-Hydroxyproline	-	-	3.8
	5-Oxoproline	1.4	-	-
	Dimethylglycine	-	-	5.5
	N-Acetylserine	5.3	-	-
	Pantothenic acid	7.4	-	2.6
	Sarcosine	2.2	-	-
Nucleic acid related metabolites	Adenine	-	-	2.1
	Adenosine	-	-	9.6
	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	-	-	14.8
	Adenosine monophosphate	-	-	3.6
	Allantoin	-	-	4.2
	Cytidine	-	-	1.2
	Cytidine monophosphate	-	-	1.3
	Cytosine	-	-	9.2
	Guanine	-	-	5.8
	Guanosine	-	-	2.1
	Guanosine monophosphate	-	-	6.4
	Hypoxanthine	-	-	1.4
	Inosine	-	-	1.5
	Thymidine	-	-	10.1
	Thymidine monophosphate	-	6.6	13.1
	Thymine	-	-	6.9
	Uracil	-	-	3.1
	Uric acid	-	-	7.0
	Uridine	11.9	-	3.7
	Uridine diphosphate	-	8.1	-
	Xanthine	-	-	7.6
Sugars	Arabinose	3.9	-	-
	Fructose	3.2	-	-
	Fucose	3.9	-	-
	Galactose	3.3	-	-
	Glucose	3.0	-	-
	Lactose	9.4	-	-
	Lyxose	3.4	-	-
	Maltose	19.2	-	-
	Mannose	5.7	-	-
	Psicose	5.0	-	-
	Rhamnose	4.2	-	-
	Ribulose	4.5	-	-
	Sorbose	6.1	-	-
	Sucrose	7.0	-	-
	Tagatose	11.1	-	-
	Xylose	6.0	-	-
	Xylulose	5.2	-	-
TCA cycle	2-Ketoglutaric acid	-	-	2.9
	Aconitic acid	-	-	2.4
	Citric acid	4.0	-	6.4
	Fumaric acid	3.0	-	-
	Isocitric acid	-	-	5.0
	Malic acid	-	-	2.8
	Malic acid	3.2	-	-
	Pyruvic acid	8.8	-	-
	Succinic acid	1.0	-	2.2
Glycolysis	Dihydroxyacetone phosphate	7.3	-	-
	Glycerol 3-phosphate	11.4	-	-
	Lactic acid	1.9	-	5.0
Pentose phosphate pathway	6-Phosphogluconic acid	-	5.6	-
	Glyceric acid	0.9	-	-
	Ribose	3.5	-	-
Methylation and Transsulfuration cycle	Cystathionine	-	-	5.1
	Cysteine	-	-	7.1
	Methionine	-	1.6	2.5
	S-Adenosylhomocysteine	-	-	8.9
Urea cycle	Arginine	-	5.0	2.6
	Citrulline	-	-	2.1
	Ornitine	-	-	2.8

Category	Compounds	Repetability (%RSD, n=6)		
		GC-MS/MS	LC-MS/MS (Ion pair)	LC-MS/MS (Non ion-pair)
Others	1,6-Anhydroglucose	8.0	-	-
	1-Hexadecanol	2.6	-	-
	2-Aminobutyric acid	-	-	4.8
	2-Aminoisobutyric acid	7.2	-	-
	2-Hydroxybutyric acid	4.1	-	-
	2-Hydroxyglutaric acid	1.9	-	-
	2-Hydroxyisocaproic acid	8.1	-	-
	2-Hydroxyisovaleric acid	7.2	-	-
	3-Hydroxybutyric acid	2.0	-	-
	3-Hydroxyglutaric acid	0.6	-	-
	3-Hydroxyisobutyric acid	12.4	-	-
	3-Hydroxyisovaleric acid	4.2	-	-
	3-Hydroxyphenylacetic acid	4.7	-	-
	3-Hydroxypropionic acid	1.6	-	-
	3-Methoxy-4-hydroxybenzoic acid	6.7	-	-
	3-Phenyllactic acid	4.4	-	-
	4-Hydroxybenzoic acid	4.9	-	-
	4-Hydroxyphenylacetic acid	5.8	-	-
	4-Hydroxyphenyllactic acid	7.6	-	-
	Acetoacetic acid	4.0	-	-
	Acetylcarnitine	-	-	3.0
	Adipic acid	7.2	-	-
	Arabitol	5.7	-	-
	Argininosuccinic acid	-	-	14.1
	Azelaic acid	5.0	-	-
	Benzoic acid	17.4	-	-
	Caproic acid	2.8	-	-
	Carnitine	-	-	6.9
	Carnosine	-	-	2.0
	Catechol	13.1	-	-
	Cholesterol	14.7	-	-
	Cholic acid	-	-	2.6
	Choline	-	-	1.6
	Creatine	-	-	2.5
	Creatinine	-	-	3.0
	Decanoic acid	8.5	-	-
	Dopamine	-	-	6.4
	Elaidic acid	8.8	-	-
	FMN	-	-	8.0
	Galacturonic acid	5.6	-	-
	Glucuronic acid	7.1	-	-
	Glutaric acid	2.7	-	-
	Glycolic acid	2.5	-	-
	Glyoxylic acid	5.7	-	-
	Histamine	-	-	2.6
	Hydroquinone	3.7	-	-
	Inositol	1.1	-	-
	Lauric acid	16.7	-	-
	Malonic acid	3.8	-	-
	Mannitol	3.8	-	-
	Margaric acid	6.0	-	-
	meso-Erythritol	2.6	-	-
	Methylsuccinic acid	5.7	-	-
	Monostearin	38.8	-	-
	Myristic acid	3.9	-	-
	N-Acetylmannosamine	8.9	-	-
	Nicotinic acid	2.2	-	3.4
	Nonanoic acid	5.6	-	-
	Norepinephrine	-	-	1.7
	Octadecanol	4.1	-	-
	Octanoic acid	4.2	-	-
	Oleic acid	7.4	-	-
	Palmitic acid	1.4	-	-
	Phenylacetic acid	1.4	-	-
	Phosphoric acid	1.1	-	-
	Protocatechuic acid	9.9	-	-
	Pyridoxine	10.6	-	-
	Ribitol	11.5	-	-
	Sebacic acid	7.0	-	-
	Serotonin	-	-	2.4
	Stearic acid	1.4	-	-
	Suberic acid	4.2	-	-
	Taurocholic acid	-	-	4.1
	Threitol	3.3	-	-
	Threonic acid	8.1	-	-
	Triethanolamine	5.2	-	-
	Xylitol	7.0	-	-

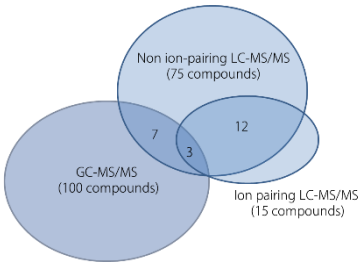


図 4　マウス糞便抽出液からの代謝物の検出数

5. 若齢マウスと高齢マウスの比較

応用例として、通常環境下で飼育した週齢の異なる雄性 C57BL/6J マウス（10 週齢および 70 週齢）由来の糞便をイオンペアフリーLC-MS/MS 法によって分析し、比較を行いました。分析の結果、合計 66 の代謝物が検出されました。両マウス糞便中に含まれる代謝物量の結果を比較するために、島津マルチオミックス解析パッケージを用いて、検出された 66 代謝物の内部標準物質に対するピーク面積比をグラフ化しました。図 5 のように、アルギニンやアスパラギン酸、リジン等のアミノ酸や、アデニンやアデノシン等の核酸関連代謝物、コール酸等において、差があることが示唆されました。コール酸は若齢マウス糞便よりも高齢マウス糞便の方が少ない傾向が見られました。コール酸はタウロコール酸の脱抱合により生じます。高齢マウス糞便中においてコール酸が少なかったのは、老化により胆汁酸の分泌が減少した可能性、または胆汁酸の脱抱合に関わる細菌が減少した可能性が考えられます。また、アルギニンは高齢マウス糞便よりも若齢マウス糞便の方が少ない傾向が見られました。腸管腔内のアルギニンは吸収され生体内で細胞増殖に必須のポリアミン合成系に利用されることから、若齢マウスは盛んに腸管腔内アルギニンを吸収し細胞内でポリアミン合成しているため、腸管内濃度が低い可能性が示唆されました。以上のように、本分析手法は糞便中の老化関連因子の探索等にも有効と考えられます。

図 5　若齢・高齢マウス糞便抽出液からの代謝物量の比較

6. おわりに

GC-MS/MS と LC-MS/MS を用いたマウス糞便中の代謝物の網羅的分析事例をご紹介しました。分析対象成分が GC-MS/MS と LC-MS/MS では異なるため、両手法を用いることでマウス糞便中の代謝物を網羅的に分析することができます。また、GC-MS/MS 用の MRM データベースや LC-MS/MS 用のメソッドパッケージを使用することで、分析初心者でも代謝物の網羅的分析が簡便にできます。大量に得られたデータは、島津マルチオミックス解析パッケージを用いることで簡便に可視化することが可能で、また可視化により結果の解釈が容易になります。本分析・解析手法は、腸内細菌叢研究におけるメタボローム解析において、非常に有効と考えられます。

参考文献
1)　M. Matsumoto, et al., Scientific Reports 2, 223 (2012).

Smart Metabolites Database、GCMS-TQ、および LCMS は、株式会社 島津製作所の商標です。

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

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著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：2018 年 5 月

© Shimadzu Corporation, 2018