

液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8060NX  
ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ™8040 NX

## LC/MSとGC/MSを用いた遺伝子変異ショウジョウバエのメタボロミクス差異解析

三浦 正幸\*1、櫻尾 宗志朗\*1、真保 恵美子\*2、山田 洋介\*2、中川 裕貴\*2

\*1 東京大学薬学系研究科 遺伝学教室 \*2 島津製作所

### ユーザーベネフィット

- ◆ マルチオミクス解析パッケージを用いることで、LC/MSやGC/MSにより得られた測定結果を簡便に可視化できます。
- ◆ LC/MSとGC/MSの測定結果を統合して代謝マップに出力することで、より多くの代謝物を網羅的に表示することができます。

### ■はじめに

遺伝子変異とは、DNA塩基配列に起こる変化のことで、置換、挿入、欠失など様々な種類があります。親から受け継がれる先天的なもの、環境要因（放射線、化学物質、食習慣、微生物など）や細胞分裂におけるDNAの複製エラーによる後天的なものに分かれます<sup>1)</sup>。

遺伝子変異が生じると、タンパク質が正しく合成されなくなったり、機能しなくなったりする可能性があります。1つまたは複数の遺伝子変異によって引き起こされる病気を遺伝性疾患と呼び、ライソゾーム病、筋ジストロフィー、フェニルケトン尿症などがあります。遺伝性疾患は狭義に遺伝病とも称されますが、現在では次世代に遺伝しない場合も含めた概念となっています。

また、生命維持のために必須である代謝物の種類や濃度は、個人の健康状態や体質などに影響されるため、様々な病気の兆候を示すバイオマーカーとして注目されています。代謝物は生活習慣に加えて、遺伝子にも由来することから、代謝物とゲノム情報の統合解析は、疾患の治療薬開発や個別化医療につながる可能性のある重要な基礎研究とされています<sup>2)</sup>。そこで、遺伝子変異が代謝物に及ぼす影響を調べる手法が重要になります。

本アプリケーションでは、黄色ショウジョウバエに長寿命となるような遺伝子変異を起こし、野生型および変異型ショウジョウバエの代謝物を液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）LCMS-8060NXとガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）GCMS-TQ8040 NXで測定しました。GC-MSによる測定結果の詳細につきましては、アプリケーションニュース01-00410をご参照下さい。

測定結果から野生型と変異型の差異を見つけるため、「マルチオミクス解析パッケージ」を用いて解析しました。マルチオミクス解析パッケージは多変量解析（主成分分析や階級クラスター分析など）やボルケーノプロット、代謝マップなどのデータ可視化機能を備えた解析ソフトウェアです。これらの統計手法を用いて、野生型と遺伝子変異型のショウジョウバエを比較し、代謝物に関する違いを解析した例をご紹介します。



図1 LC-40とLCMS-8060NX

### ■実験

本アプリケーションでは、100匹の黄色ショウジョウバエを分析に用いました。100匹のうち50匹は野生型、残りの50匹は遺伝子変異型のハエでした。5匹で1つのサンプルを形成することとし、野生型10サンプル、遺伝子変異型10サンプルの合計20サンプルを用意しました。ハエ試料はすり潰した後、「メタボロミクス前処理ハンドブック」にしたがって前処理を施し、一次代謝物メソッドパッケージとLCMS-8060NXを用いて測定を行いました<sup>3)</sup>。

### ■LC/MSによる測定結果

野生型および遺伝子変異型の代謝物による差異を可視化するために、マルチオミクス解析パッケージを用いて主成分分析を行いました。検出された89成分を用いた主成分分析ではPC1が29.3%、PC2が18.0%となり、双方の累積寄与率は47.3%となりました。野生型10サンプルと遺伝子変異型10サンプルは可視的にクラスターを形成し2群に分かれました（図2）。

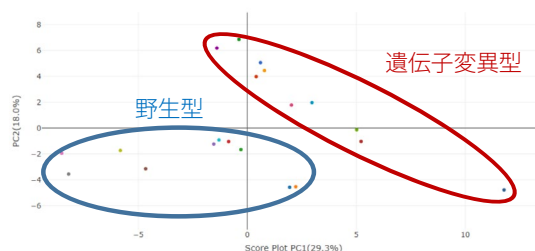


図2 主成分分析によるスコアプロット

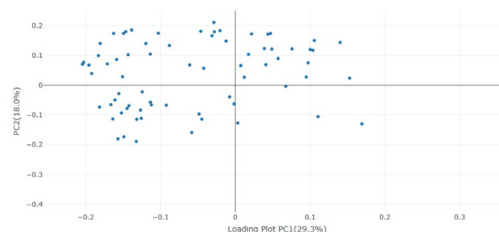


図3 主成分分析によるローディングプロット

また主成分分析のローディングプロットにより、Kynurenic acid、Vitamin B12、Methionine sulfoxideが野生型で特異的に存在し、Citrulline、Proline、Carnitineなどが遺伝子変異型で特徴的に存在することが分かりました（図3）。また、遺伝子変異型のうち、プロットの右下に表示されたサンプルに関しては、Malic acidやAspartic acidの含有量が影響していることが示されました。

また、LC/MSの測定結果をボルケーノプロットで可視化しました(図4)。ボルケーノプロットの左上は野生型で特徴的に多く検出された化合物で、Kynurenic acid、Kynurenine、Vitamin B12などがみられます。反対に、ボルケーノプロットの右上は遺伝子変異型に多い化合物で、Citrullineが唯一表示されています。これらのことから、野生型と遺伝子変異型で代謝物に大きな差が出る化合物は稀で、大半の化合物は同等に検出されることが分かりました。

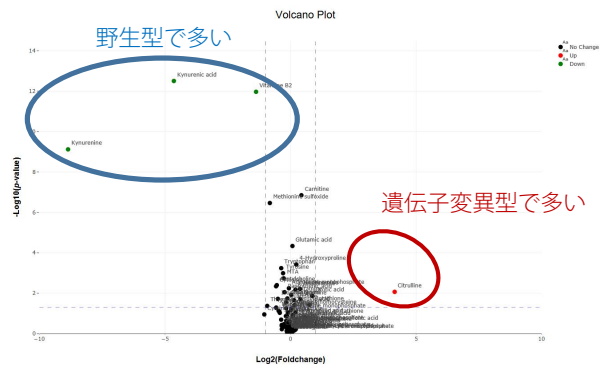


図4 ボルケーノプロット

マルチオミクス解析パッケージでは、検出された化合物をボックスプロットで表示することができます。例えば、図4で野生型に特徴的に検出されたKynurenineをボックスプロットで表示すると図5のようになります。左側の10サンプルが野生型10匹、右側の10サンプルが遺伝子変異型10匹ですが、野生型のみでKynurenineが検出されていることが分かります。

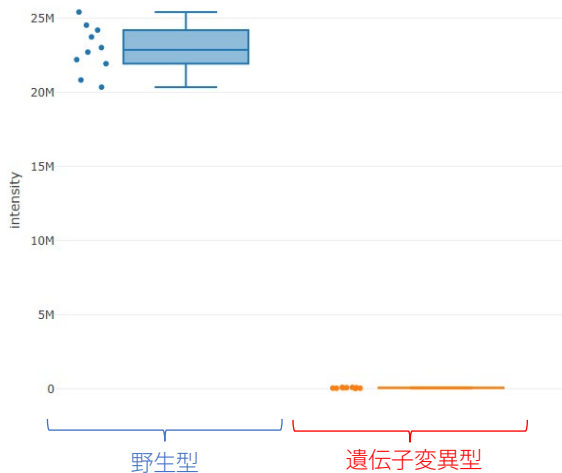


図5 Kynurenineに関するボックスプロット

### ■ LC/MSとGC/MSの統合解析による結果

主成分分析やボルケーノプロットにより、野生型と遺伝子変異型で特徴的な化合物を明確にした後、その結果を代謝マップに移行しました。代謝マップには、代謝経路が地図のように示されており、それぞれの化合物の面積値を棒グラフで比較することができます。

各分析に使用したサンプル数は、GC/MSでは野生型2サンプル、遺伝子変異型3サンプル、LC/MSでは野生型10サンプル、遺伝子変異型10サンプルでした。サンプル数を揃えるため、LC/MSの測定結果のうち、代表的な検体を野生型から2検体、遺伝子変異型から3検体選択し、代謝マップに表示しました(図6)。ボルケーノプロットで野生型に特徴的に検出されたKynurenic acidの代謝経路を拡大して図7に示します。GC/MSで検出された化合物(3-Hydroxy-kynurenine、Kynurenine、Tryptophan、5-Hydroxy-tryptophan)に加え、LC/MSで検出されたKynurenic acidを代謝マップに追加しました。この特定の代謝経路のすべての化合物について、野生型でのみ含有量が多いことが分かりました。

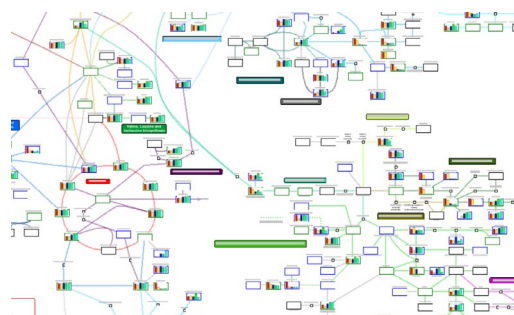


図6 代謝経路マップ(LC/MSとGC/MSの測定結果の統合)

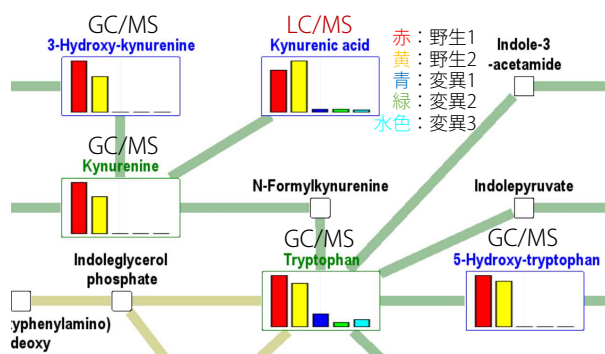


図7 代謝経路マップの拡大図

### ■ 結論

野生型および遺伝子変異型の黄色ショウジョウバエの代謝物を、LC/MSで分析しました。代謝物を網羅的に検出した結果を、マルチオミクス解析パッケージを用いて解析しました。主成分分析やボルケーノプロットなどの統計解析手法により、遺伝子変異により差異が生じた代謝物を可視化することができました。また、GC/MSによる測定結果と併せて代謝マップに投影し、代謝経路を表示しました。マルチオミクス解析パッケージを利用することで、LC/MSを用いて得られた結果を客観的に判断することができます。

#### <参考文献>

- 1) 遺伝性疾患プラス、遺伝子変異とは何ですか?どのように起こりますか?, accessed 20th Nov 2022 <<https://genetics.qlife.jp/tutorials/Variants-and-Health/What-is-a-gene-mutation-and-how-do-mutations-occur>>
- 2) 日本医療研究開発機構、プレスリリース ゲノムの違いが代謝物に与える影響の一端を解明, accessed 20th June 2022 <[https://www.amed.go.jp/news/release\\_20160818-02.html](https://www.amed.go.jp/news/release_20160818-02.html)>
- 3) 島津製作所、メタボロミクス前処理ハンドブック, accessed 9th June 2022 <<https://www.an.shimadzu.co.jp/pdf/c146-2181.pdf>>

GCMS-TQは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。  
LCMSおよびNexeraは、株式会社島津製作所またはその関係会社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  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行: 2023年3月  
A改訂版発行: 2023年4月  
01-00491B-IP B改訂版発行: 2023年7月  
島津コーポレーション ☎ 0120-131691

本書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文中に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続上で使用することはできません。

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。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。

▶ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ **マルチオミクス解析  
パッケージ**

LC/MS, GC/MSデータ解析用ソフトウェア



▶ **GCMS-TQ™8040  
NX**

トリプル四重極型 ガスクロマトグラフ質量分析計



▶ **LCMS-8060NX**  
トリプル四重極質量分析計



▶ **LCMS-TQ RX シリーズ**

トリプル四重極質量分析計

**関連分野**

▶ **ライフサイエンス**

▶ **価格お問い合わせ**

▶ **製品お問い合わせ**

▶ **技術お問い合わせ**

▶ **その他お問い合わせ**