

Application News

ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ™8050 NX
高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-8060NX

GC/MSとLC/MSを用いた 肝炎モデルマウス血清中の代謝物分析

馬越 泰

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GC/MS、LC/MSにより得られたデータを解析できます。
- ◆ マルチオミクス解析パッケージにより、主成分分析などの多変量解析が可能です。
- ◆ 代謝マップのテンプレートを使用することで、得られたデータを簡便に可視化可能です。

はじめに

メタボロミクスとは生体中の代謝物（メタボローム）を網羅的に測定する技術です。メタボロミクスは様々な分野で利用されており、医学分野ではバイオマーカー探索や病因解明などに活用されています。代謝物の測定には様々な分析装置が用いられますが、中でもクロマトグラフと質量分析装置を組み合わせた手法は、多様な代謝物を高感度に測定可能なことからよく使用されます。液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）とガスクロマトグラフィー/質量分析法（GC/MS）では検出可能な化合物が異なり、両手法を用いることで、それぞれのデータを補完することができます。

本稿ではマルチオミクス解析パッケージ¹⁾を用いたGC/MSとLC/MSのデータ解析手法についてご紹介します。サンプルとして、非アルコール性脂肪肝（NAFL）および非アルコール性脂肪肝炎（NASH）モデルマウスとして知られる、コリン欠乏食（CD）およびメチオニン・コリン欠乏食（MCD）負荷マウスの血清を測定しました（図1）。マルチオミクス解析パッケージを用いることで、GC/MSとLC/MSのデータを統合して代謝マップ上に結果を可視化することができました。

■ サンプルおよび前処理

メチオニン・コリン欠乏食負荷マウス（MCD、n = 6）、コリン欠乏食負荷マウス（CD、n = 6）およびメチオニン・コリン添加食負荷マウス（MCS、n = 5）の血清をサンプルとしました。メチオニン・コリン欠乏食を与えたマウスは、代表的なNASHモデルとして知られています²⁾。血清サンプルの前処理は図2の通り行いました。内部標準物質（IS）には超純水に溶解した2-Isopropylmalic acidを用いました。GC/MSの誘導体化処理は“メタボロミクス 前処理ハンドブック³⁾”に従いました。

・血清	50 µL
・IS (2-Isopropylmalic acid, 0.5 mg/mL)	10 µL
・メタノール:クロロホルム:超純水 (10:5:3)	1000 µL

↓ 攪拌 (5 min)
↓ 遠心分離 (10 min, 15000 rpm, 4°C)

・上清	700 µL
・超純水	200 µL
・クロロホルム	200 µL

↓ 攪拌 (5min)
↓ 遠心分離 (10 min, 15000 rpm, 4°C)

上層500 µLをGC/MS分析、上層 100 µLをLC/MS分析に使用

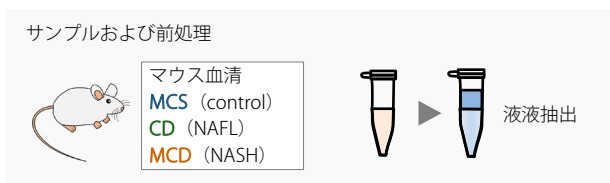


図1 全体ワークフロー

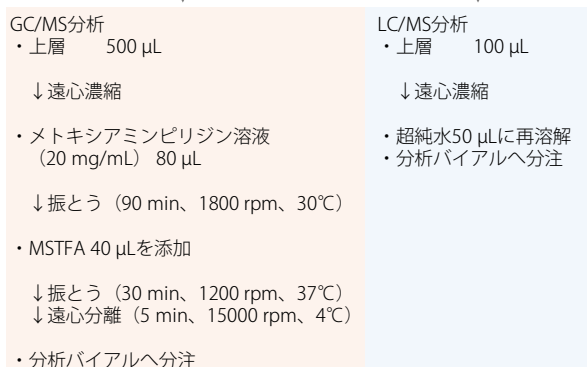


図2 前処理ワークフロー

■ 分析条件

GC/MSでは“Smart Metabolites Database Ver. 2”を用いました。LC/MSでは“LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver.3”を用い、内部標準物質として添加した2-Isopropylmalic acidのMRMを追加しました。GC/MSとLC/MSによる分析条件を表1に示します。

表1 分析条件

GC-MS	: GCMS-TQ8050 NX
Auto-injector	: AOC20i Plus / 20s Plus
GC	
Column	: BPX-5 (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm)
Injection temp.	: 250°C
Column oven	: 60°C (2 min) → 15°C/min → 330°C (3 min)
Injection mode	: Split
Split ratio	: 30
Carrier gas	: He
Carrier gas control	: Linear Velocity (39.0 cm/sec)
Injection volume	: 2 μL
MS	
Mode	: MRM
Ion source temp.	: 200°C
Interface temp.	: 280°C
HPLC	
: Nexera™ X3	
Column	: Shim-pack™ GIST PFPP (2.1 mm I.D. x 150 mm, 3 μm) P/N: 227-30858-07
Column oven	: 40°C
Solvent A	: 0.1% Formic acid in water
Solvent B	: 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 1 μL
MS	
: LCMS-8060NX	
Ionization	: ESI positive/negative (IonFocus™)
Mode	: MRM
Nebulizing gas	: 3.0 L/min
Drying gas	: 10.0 L/min
Heating gas	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250°C
Heat block temp.	: 400°C
Interface temp.	: 270°C

■ データ解析

GC/MSとLC/MSにより得られたデータはLabSolutions Insightを用いて波形処理をしました。LabSolutions Insightは、GC/MSとLC/MSの波形処理を同様の操作で効率的に行うことができます。GC/MSとLC/MSのデータをそれぞれ内部標準物質で補正し、得られた面積比を以降の解析に用いました。

補正後の面積値を“マルチオミクス解析パッケージ”により解析しました。本ソフトウェアでは質量分析により得られた膨大なデータを、多変量解析、ボルケーノプロット表示および代謝マップ表示など様々な手法により解析することができます。またGC/MSとLC/MSの各種メソッドパッケージに対応した可視化テンプレートも付属しており、得られたデータをスムーズに可視化することができます。

本解析では、GC/MSとLC/MSを統合して解析する代謝マップを使用しましたが、“Smart Metabolites Database Ver. 2”用や“LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver.3”用の代謝マップも用意しており、目的に合わせて代謝マップを選択することができます(図3)。

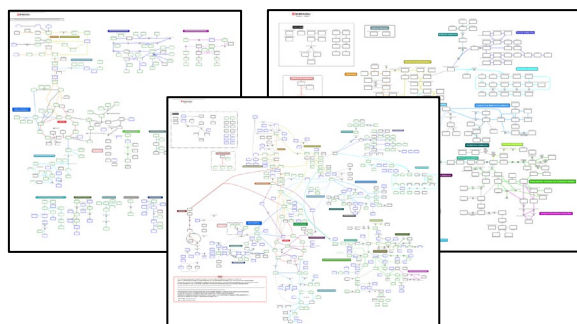


図3 代謝マップのテンプレート

(左からSmart Metabolites Database用、GC/MSとLC/MS統合解析用、LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物用の代謝マップ)

■ 検出された代謝物

図4に示した通り、GC/MSとLC/MSを用いた測定により合計122成分が検出されました。GC/MSでの測定ではアミノ酸、有機酸および糖などを中心に93成分が検出されました。LC/MSでの測定では、アミノ酸、有機酸および核酸塩基を中心に58成分が検出されました。アミノ酸や有機酸など29成分は両分析法で検出されました。両方で検出された代謝物については、感度の高かったLC/MSのデータを以降の解析に用いました。

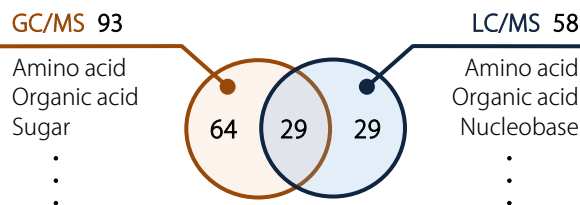


図4 GC/MSとLC/MSにより検出された代謝物数

■ 主成分分析結果

GC/MSとLC/MSのデータを用いて主成分分析を実施しました(図5)。Score Plot上で、三群が分離されました。第一主成分軸上でMCD群が分離され、第二主成分軸上でCD群が分離されました。

Loading PlotからGlycine、Alanine、Serineおよび2-Aminobutyric acidといった低分子のアミノ酸がMCD群で多いことが分かりました。一方でGlucoseやその関連代謝物はMCD群で少ないことが分かりました。MethionineおよびMethionine sulfoxideといった硫黄関連代謝物はCD群で多いことも分かりました。

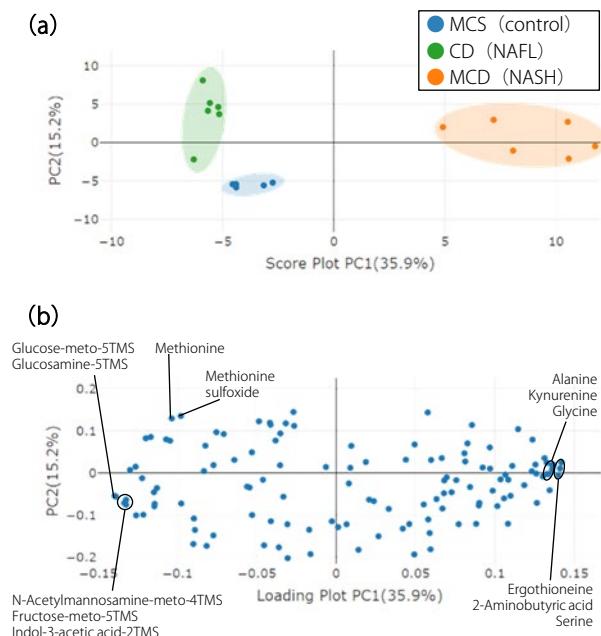


図5 EasyStatsによる多変量解析結果

(a) Score plot、(b) Loading plot

■ 代謝マップ表示

得られたデータをVANTEDを用いて代謝マップ上に可視化しました(図6)。GC/MS、LC/MSおよび両方の分析方法で分析対象としている代謝物名は、それぞれ青、黒、緑で表示されています。この代謝マップには、解糖系、アミノ酸代謝、TCA サイクル、尿素サイクルなどの主要な代謝経路が含まれています。

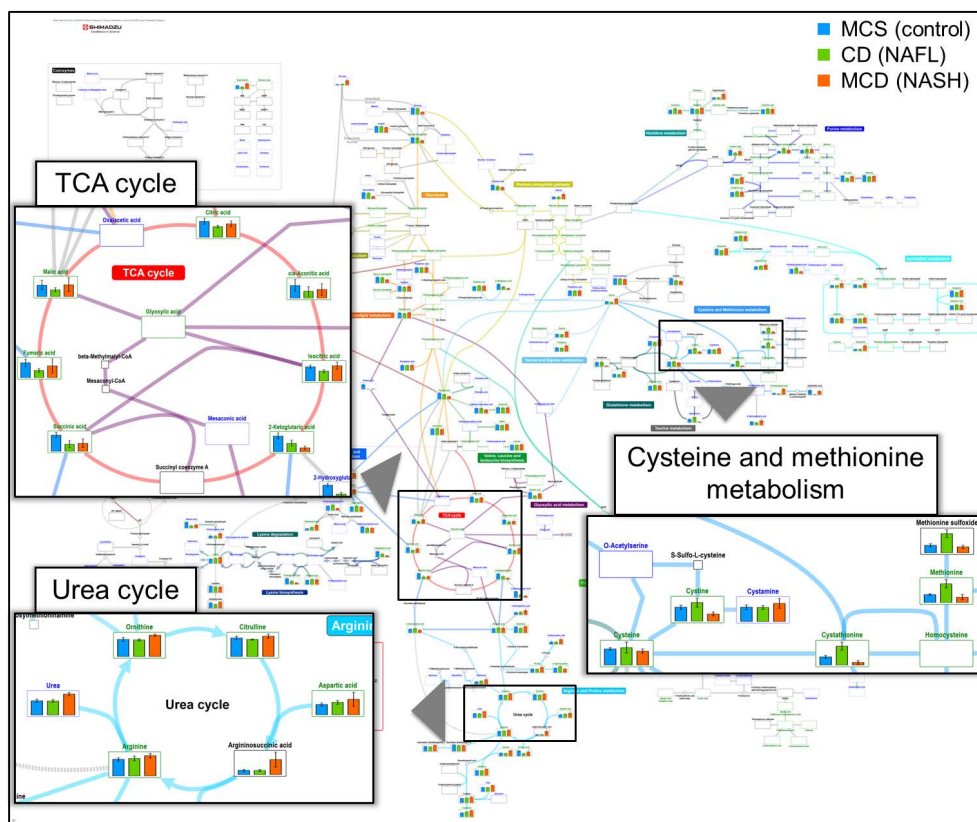


図6 VANTEDによる代謝マップ表示 (全体)

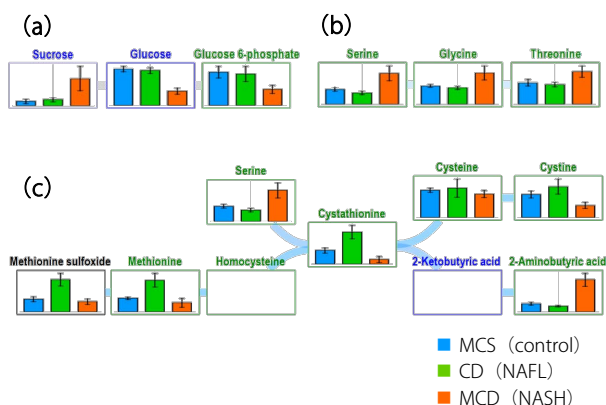


図7 VANTEDによる代謝マップ表示 (抜粋)

(a) 糖関連代謝物、(b) アミノ酸、(c) 硫黄関連代謝物

三群間で変化した代謝物の一部を抜粋して表示しました(図7)。図で示したように、代謝マップは目的に応じて編集することも可能です。

Glucoseなどの糖は、先行研究⁴⁾と同様にMCD群で減少していました。一方でSerine、Glycine、およびThreonineといったアミノ酸は、MCD群で増加していました。またCD群では硫黄関連代謝物が増加していました。

■ まとめ

GC/MSとLC/MSを用いた分析により、122成分がマウス血清中から検出されました。両方の面積値データを統合して、代謝マップ上に可視化しました。代謝マップ表示の結果、糖、アミノ酸および硫黄関連代謝物がCDおよびMCD群で変化していることが分かりました。

代謝マップのテンプレートを使用することで、得られたデータを簡便に可視化することができます。マルチオミクス解析パッケージはメタボロームデータの結果解釈を強力にサポートします。

■ 謝辞

本アプリケーションの作成にあたり、大阪公立大学・松原 勤先生、門野 千穂先生には試料のご提供を頂きました。心より感謝申し上げます。

<参考>

- 1) マルチオミクス解析パッケージ
<https://www.an.shimadzu.co.jp/products/liquid-chromatograph-mass-spectrometry/lc-ms-software/multi-omics-analysis-package/index.html>
- 2) HEPATOLOGY (2012) Jul;56 (1) :118-29.
- 3) メタボロミクス前処理ハンドブック
https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/brochures/20288/c146-2181.pdf
- 4) Biochimica et Biophysica Acta (2014) 1841, 1596–1607.

GCMS-TQ、LCMS、Smart Metabolites Database、LabSolutions Insight、Nexera、Shim-packおよびIonFocus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/>

01-00630-JP 初版発行：2023年9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本文書に記載されている分析手法を診断目的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、製品名、サービスマークおよびロゴは、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。