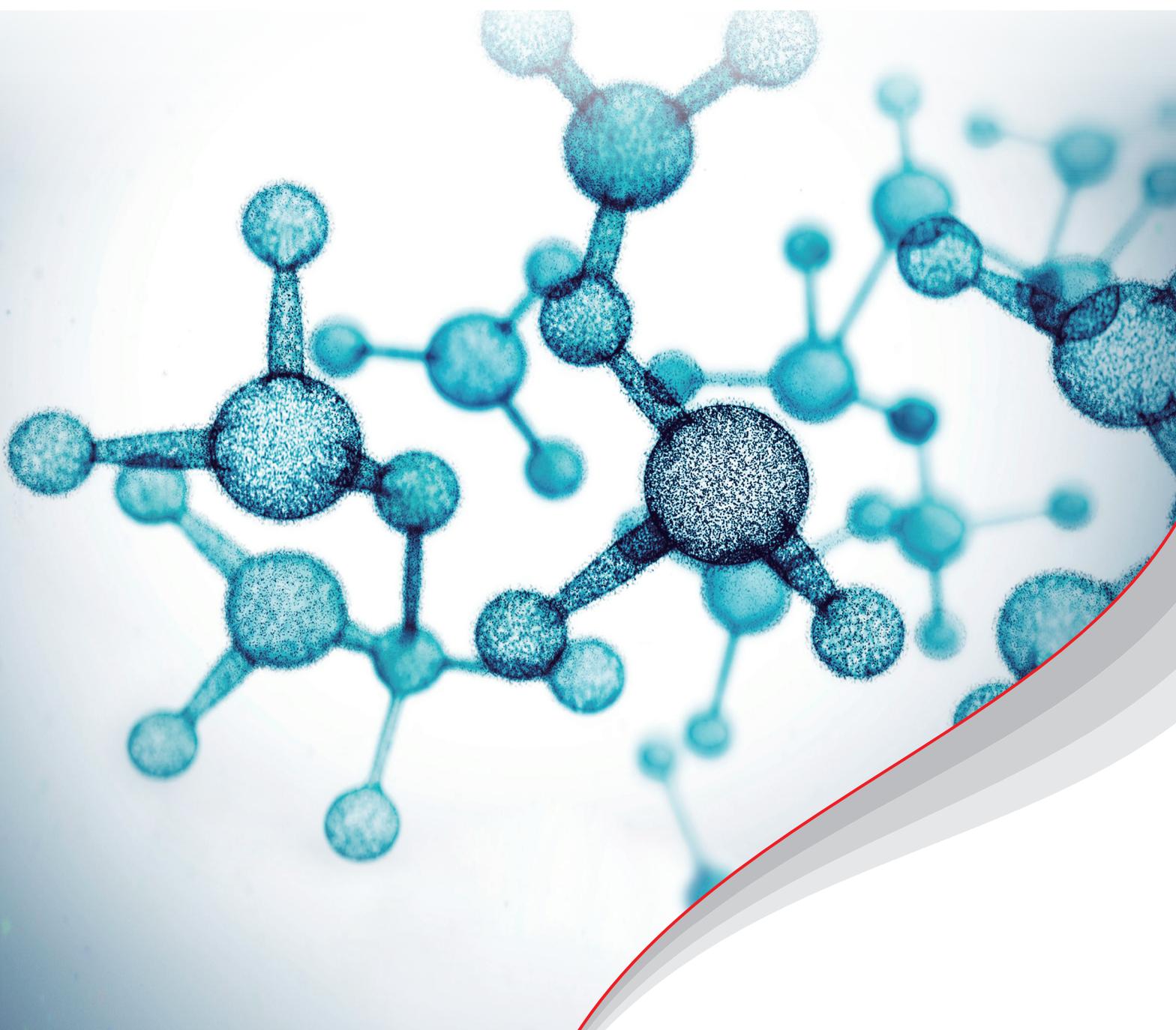


代謝経路解析ソリューション



代謝経路

代謝経路とは生化学において細胞内で起きる生命維持のための連鎖的な化学・酵素反応のことで、反応物から生成物まで中間体を含めた一連の反応経路を称します。中間体には可逆的な反応もありますが、代謝経路の最初に不可逆的な反応があり経路全体の方向が決まるとされています。主要代謝経路である解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路などが統制されることで細胞の恒常性が維持されています（表 1、図 1）。

表 1 主要代謝経路の場所と概要

| 主要な代謝経路 | 場所 | 概要 |
|---------------|--------------------------|---|
| 解糖系 | 細胞質 | グルコースをピルビン酸などの有機酸に分解します。 |
| クエン酸回路 | ミトコンドリア | アセチルCoAが酸化されていくことでエネルギーを生産します。 |
| ペントースリン酸回路 | 細胞質 | グルコース-6-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸を生成する過程で核酸合成に不可欠な糖を産生します。 |
| 糖新生 | 肝臓、腎臓 | ピルビン酸、グリセロールなど糖質以外の物質からグルコースを生産します。 |
| グリコーゲン合成・分解反応 | 肝臓、骨格筋 | グルコースの貯蔵体であるグリコーゲンを合成・分解します。 |
| 脂肪酸の合成・分解反応 | 合成は細胞質ゾル、 分解はミトコンドリア内 | アシルCoAやマロニルCoAなどを含む同一の代謝経路が逆方向に進行することで合成・分解が行われます。 |

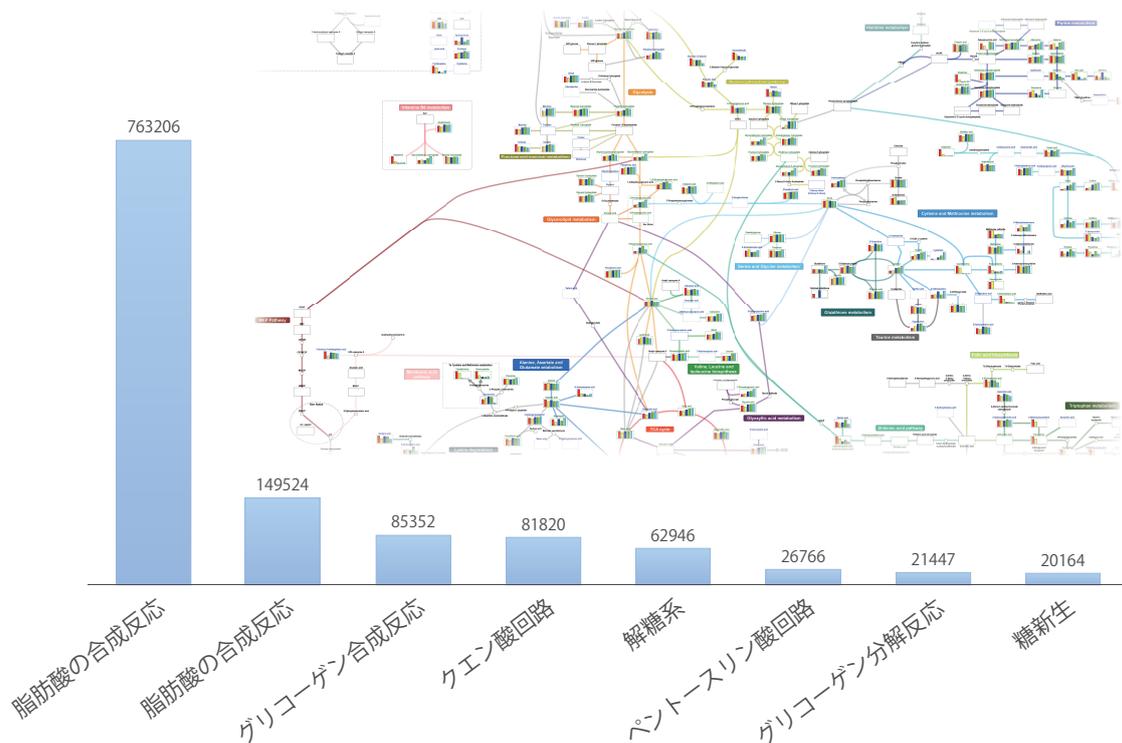


図 1 代謝経路ごとの関連資料数 (特許数と文献数の総数)

代謝経路図

ガスクロマトグラフ質量分析計や液体クロマトグラフ質量分析計より得られた代謝物のピーク面積値を、棒グラフにして表します。

各代謝物において試料ごとの相対定量値が棒グラフで示されることで、代謝物の変化量を確認することができます。

活用方法

1. 複数実験間の変化量比により代謝経路の変化の違いを発見する

育成環境や遺伝子に変化を加えた試料での代謝変化を確認することができます。

2. 代謝酵素の反応を確認する

酵素に変化を加え、代謝物量の差異を発見することができます。

3. 未知試料を判別する

代謝物量の特徴により、試料群を判別することができます。

例) 種別や産地別の違いなど

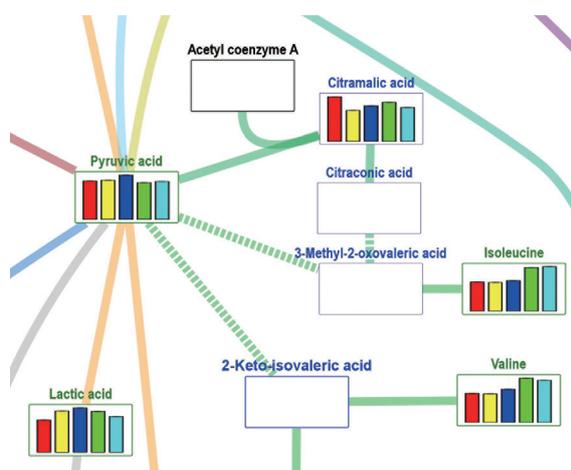


図2 代謝経路例(拡大図)

マルチオミクス解析パッケージ

マルチオミクス解析パッケージは、メタボロミクス、プロテオミクス、フラックス解析などで得られた膨大な質量分析データを自動で代謝マップに表示し、さまざまな解析を行える代謝工学向けのソフトウェアです。特に、当社が提供する代謝物分析用の各種メソッドパッケージ・データベースと連携し、メタボロミクスデータ解析作業を効率化します。直感的に捉えることができる可視化されたデータは、創薬や機能性食品、バイオ工学などライフサイエンス研究を強力にサポートします。



Product >

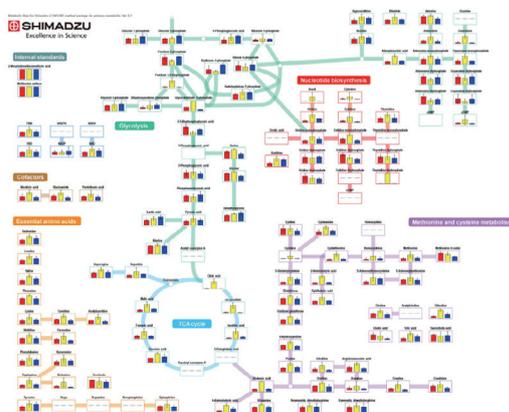
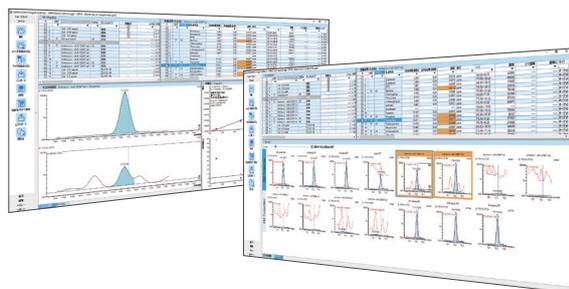


図3 LabSolutions Insight™ による分析結果を代謝マップへ投影

微生物中の代謝物一斉分析



Application >

近年の合成生物学研究の興隆に伴い、微生物に他生物由来の化合物を高生産させる技術が広まっています。生物の代謝を利用する合成生物学研究分野において、代謝物を網羅的に分析するメタボロミクスの手法は、欠かせない手法です。「マルチオミクス解析パッケージ」に搭載されている代謝マップを利用することで、定量的な変動が代謝マップ上のどこで生じているかを容易に解析することが可能です。



研究対象として利用頻度の高い大腸菌・酵母由来の細胞実試料でも安定して分析可能です。

■ 分析

液体培地で培養した大腸菌の細胞懸濁液を、-20℃に冷やした40%エタノール/0.8% NaCl水溶液に加えてクエンチし、遠心分離によって菌体を回収しました。回収した菌体は、0.75 mLのエタノールで懸濁後、70℃で15分間熱処理を行い、2分間氷上に静置しました。続いて0.75 mLの水を加えて混和、3,900 g、4℃で5分間遠心分離し、上清を回収しました。上清は乾固し、分析する際は等量の水で再溶解し、サンプルとしました。必要に応じて水で希釈しました。

また、液体培地で培養した酵母の細胞懸濁液を、-40℃に冷やしたメタノールに加えてクエンチし、遠心分離によって菌体を回収しました。回収した菌体は、95℃に加温した75%エタノール1 mLに懸濁し、95℃、3分間熱処理を行いました。続いて遠心分離し、上清を回収、乾固しました。分析する際は等量の水で再溶解し、サンプルとしました。必要に応じて水で希釈しました。

表2 各サンプルで検出された成分数

| | 大腸菌 | 酵母 |
|-------|--------|--------|
| 検出成分数 | 95/141 | 92/141 |

■ 試料

大腸菌と酵母

■ 分析条件

LC-MS System : LCMS-8060
Column : Shim-pack™ GIST PFPP (2.1 mm I.D. × 150 mm, 3 μm)

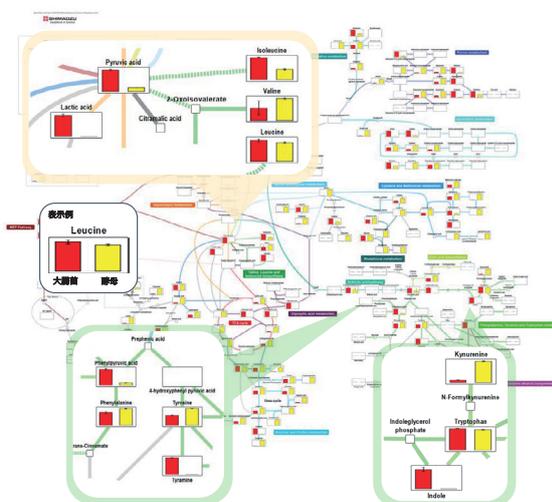


図5 マルチオミクス解析パッケージを利用した代謝経路図への可視化の例

■ まとめ

本稿では、LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 Ver. 3を用い、微生物の生産する一次代謝物を安定して検出可能であることを示しました。さらに、分析結果を代謝経路図へ投影し可視化解析を行うマルチオミクス解析パッケージも活用可能です。一斉分析によるデータ取得と分析結果の可視化解析ツールの連携は、代謝経路に基づく考察をサポートし、作業の効率化を図ることができます。本方法は、微生物を使用する様々な分野での研究を加速させる、有効な手段となることが期待されます。

マルチオミクス解析パッケージ

当社が提供する代謝物分析用の各種メソッドパッケージ・データベースと連携し、メタボロミクスデータ解析作業を効率化します。直感的に捉えることができる可視化されたデータは、創薬や機能性食品、バイオ工学などライフサイエンス研究を強力にサポートします。



Product >

遺伝子変異ハエの代謝物差異解析 Part 1


[Application >](#)

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。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。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。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。



- マルチオミクス解析パッケージを用いることで、GC/MSにより得られた測定結果を簡便に可視化できます。
- 主成分分析、階級的クラスタリング、ボルケーノプロットおよび代謝マップなどの統計手法が利用でき、サンプル間の差異を見つけることができます。

■ 分析

50匹の黄色ショウジョウバエを分析に用いました。50匹のうち20匹は野生型、残りの30匹は遺伝子変異型のハエでした。10匹で1つのサンプルを形成することとし、野生型2サンプル、遺伝子変異型3サンプルの合計5サンプルを用意しました。ハエ試料はすり潰して均一化しました。

均一化した試料にメタノール：水：クロロホルム（2.5:1:1）の抽出液を添加して振とうすることで、代謝物を抽出しました。水相を分取後、遠心濃縮してメタノールを除去し、残った水相を凍結乾燥器で乾燥させました。乾固した試料は、メトキシアミンを用いたメトキシ誘導体化、およびN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）を用いたトリメチルシリル（TMS）誘導体化により処理しました。

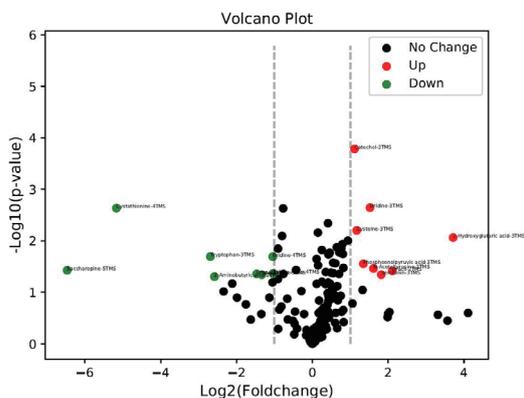


図6 野生型と遺伝子変異型の黄色ショウジョウバエのボルケーノプロット

■ 試料

黄色ショウジョウバエ（野生型と遺伝子変異型）

■ 分析条件

GC-MS System : GCMS-TQ™8040 NX
 Column : DB5 (0.25 mm I.D. × 30 m, 1 μm)
 Carrier Gas : Helium
 Carrier Gas Control : Linear Velocity

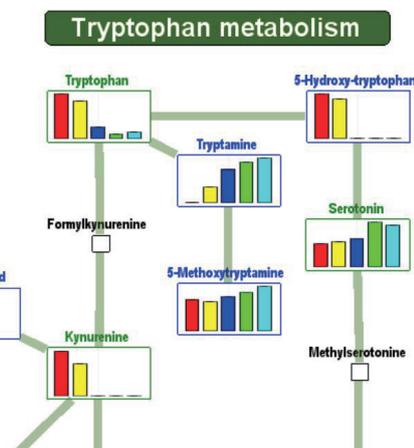


図7 代謝物マップ

■ まとめ

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、ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-TQ8040 NX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主成分分析、階級クラスタ分析、ボルケーノプロット、代謝マップで解析しました。その結果、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。

GC-MS(/MS) 代謝物分析用データベース Smart Metabolites Database™ Ver. 2

本データベースには約600成分の一次代謝物が分析対象化合物として登録されており、メソッドを最適化する必要がなく、代謝物分析の大幅な効率化が図れます。


[Product >](#)

遺伝子変異ハエの代謝物差異解析 Part 2



Application >

前項でご紹介した「遺伝子変異ハエの代謝差異解析 Part 1」では、GC-MSとSmart Metabolites Database Ver. 2を利用して遺伝子変異ショウジョウバエの代謝物を測定しました。本稿では、同じショウジョウバエの試料をLC-MSとLC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 Ver. 3を用いて測定し、LC-MSとGC-MS両方の結果を代謝マップへ投影し解析しました。



- 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。

■ 分析

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、LCMS-8060NXとLC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物を用いて測定を行いました。

■ 試料

黄色ショウジョウバエ（野生型と遺伝子変異型）

■ 分析条件

LC-MS System : LCMS-8060NX
Column : Shim-pack GIST PFPP (2.1 mm I.D. × 150 mm, 3 μm)

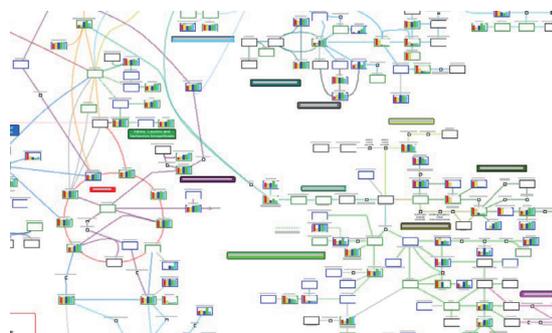


図8 代謝経路マップ (LC/MSとGC/MSの測定結果の統合)

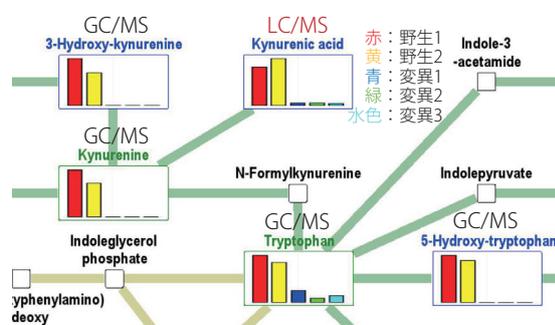


図9 代謝経路マップの拡大図

■ まとめ

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。

LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 3

本メソッドパッケージでは、LC/MS/MS分析において必要となる分離条件の検討や、各化合物に対するMSパラメータの最適化などの煩雑な作業をユーザーが実施することなく分析をはじめることができるため、多成分一斉分析業務を効率よく進めることができます。



Product >

血しょう中のホモシステイン測定



Application >

メチオニン、抗酸化ミネラルであるセレンを運搬する役割を担っており、体内の抗酸化作用を高める働きを持ちます。メチオニンに関わる代謝経路においてメチオニン合成酵素、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素などの活性を測定する場合、ホモシステインが指標となりえることから、ホモシステインの測定手法を確立することが重要と考えられます。



実際に病院ラボ (Meyer Children's Hospital, Mass Spectrometry, Clinical Chemistry and Pharmacology Lab) で使用され、実績のある分析メソッドをトレースすることが可能です。

■ 分析

100 μLの血しょうに10 μLの内部標準液 (d8-Homocysteine) と 20 μLのDTTを添加し攪拌しました。20分静置させた後、300 μLの0.2%のギ酸を含むアセトニトリルを添加しました。遠心後、LCMS-8040でMRMモードにより測定しました。

■ 試料

血しょう

■ 分析条件

LC-MS System : LCMS-8040
 Column : SUPELCO SIL LC-CN (3 mm I.D. × 33 mm, 3 μm)

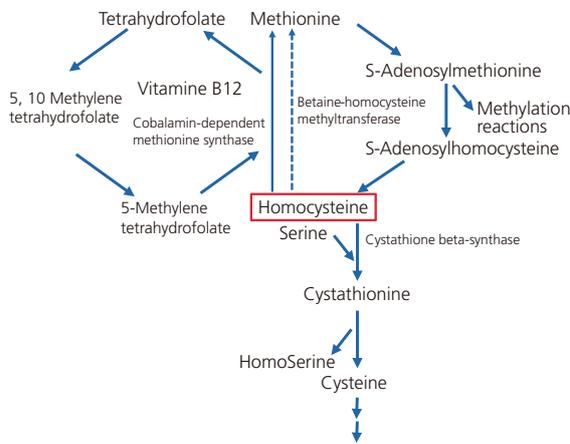


図 10 代謝経路

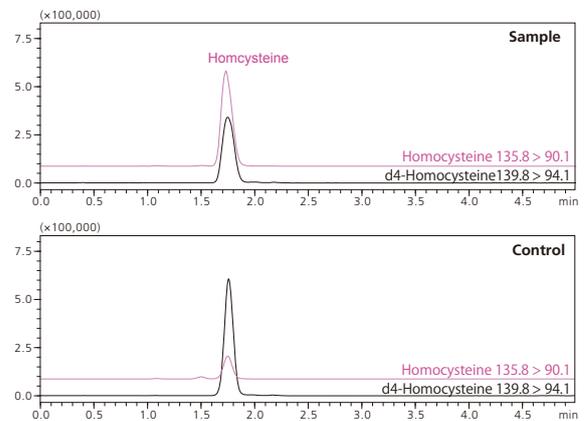


図 11 各対象化合物の抽出イオンクロマトグラム

■ まとめ

測定の結果、血しょう試料中のホモシステインのピークが特異的に検出されました。本システムは研究用途に限られるため、臨床診断目的での使用はできませんが、この分析系により酵素活性の確認を行うことが可能となります。

高速液体クロマトグラフ トリプル四重極質量分析計 LCMS-8040

汎用機を超えた高感度を持ち、従来機の操作性も継承したミドルクラス装置です。UHPLCをフロントとした際の高速性と高感度な装置により代謝経路の研究を実現します。



Product >

培地分析による抗体生産細胞の代謝解析



Application >

近年の研究では、培養液中の有機/無機成分の変動による抗体生産量や品質への影響について多くの報告があります。さらに、有機/無機成分は培養液中で相互作用しながら、その動態に影響することも知られているため、代謝の理解には培養液中の有機/無機成分両方の分析が必要と考えられます。



- 有機/無機成分を組み合わせた代謝解析が可能です。
- 簡便な前処理により培地や培養上清中の有機/無機成分をそれぞれ一斉分析可能です。

■ 分析

培養液中の有機成分の分析には、Nexera™ X3 システムおよび LCMS-8060NXを用いました。分析メソッドとしては、LC/MS/MS メソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング Ver. 3 を使用しました。本メソッドにより培地成分や分泌代謝物など細胞代謝に関わる計144成分の一斉分析を行いました。

無機成分の分析には、ICPMS-2030を用いました。ICPMS-2030での分析は、培地を1 v/v % 硝酸で20倍希釈し調製しました。抗体生産に影響する報告のある元素を中心に Co、Cu、Fe、Mg、Mn、Mo、Ni、Se、Zn を分析しました。

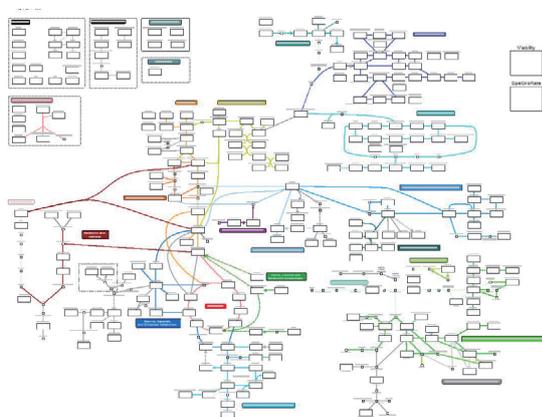


図 12 白地図例 (CHO 細胞の代謝経路に最適化した白地図)

■ 試料

CHL-YN細胞抗体生産株の培地/培養上清

■ 分析条件

LC-MS System : LCMS-8060NX
 Column : Shim-pack GIST PFPP (2.1 mm I.D. × 150 mm, 3 μm)
 ICP-MS System : ICPMS-2030

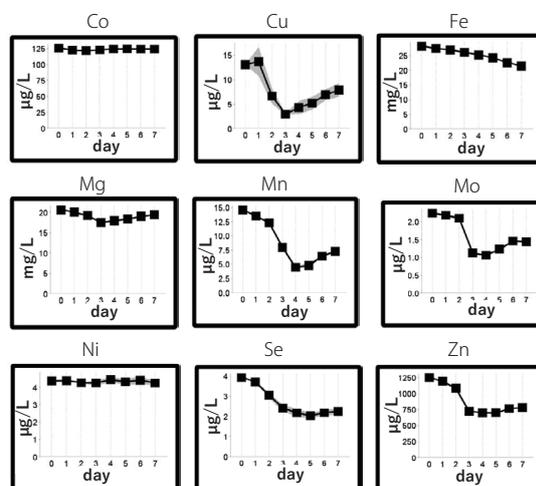


図 13 ICP-MS を用いた培養上清分析結果

■ まとめ

LC-MS/MSとICP-MSを用いて培養上清中の成分を分析し、結果を解析することにより、抗体生産に関わる成分や代謝経路の検出が可能になるものと考えられます。多成分の測定結果を用いて、抗体比生産速度を目的変数とした解析を実施することにより、抗体生産に相関する成分や特徴的な代謝経路を検出することができました。

高速液体クロマトグラフ トリプル四重極質量分析計 LCMS-8060NX

新開発のフォーカス電極によりイオンのみを効率よく質量分析計内部に導入できます。夾雑成分は除去されるので、汚れによる影響が少なく、生体試料でも安定した分析が可能です。



Product >

細胞培養上清中の金属元素モニタリング


[Application >](#)

抗体医薬品は、主にCHO細胞を培養することにより産生されます。培養中の細胞代謝や産生される抗体の一次構造は、培養液中の金属元素濃度変化に影響を受けることが、近年報告されています。例えば、培養液中のCu濃度に応じてCHO細胞の乳酸代謝の経路が変化することや、抗体の糖鎖構造が培地中のMn/Zn比に応じて変化することが挙げられます。そのため、抗体医薬品の品質を一定に保つうえでは、培養液中の金属元素濃度の経時変化をモニタリングすることが重要と考えられます。



- 原子吸光分光光度計を用いることにより、希釈のみの前処理で細胞培養上清を分析できます。
- フレーム法と電気加熱法の切り換えが容易なオートアトマイザチェンザ（AAC）を用いることで、微量（ppb）～高濃度（ppm）まで幅広い濃度の金属元素を簡単に分析できます。

■ 分析

125 mLの培養フラスコを用いて、CHO細胞を4日間振とう培養しました（120 rpm）。培養開始直後の培養液を1 mL回収後、24時間ごとに1 mL採取しました。採取した各培養液を遠心分離（5 min、4℃）した後、培養上清を別チューブへ分注することで、培養上清試料を準備しました。

測定には、原子吸光分光光度計AA-7000とグラフィートファーンエスアトマイザ（フレーム法と電気加熱法の自動切換えが可能）、およびオートサンプラを用いました。原子化法に関して、高濃度に培養液に含まれることが既知の元素（Mg、Zn）はフレーム法、それ以外の微量元素（Cu、Mn、Co、Fe）は電気加熱法を用いました。

■ 試料

細胞培養中に経時的に採取した培地

■ 分析条件

AA System : AA-7000F/AAC
Autosampler : ASC-7000

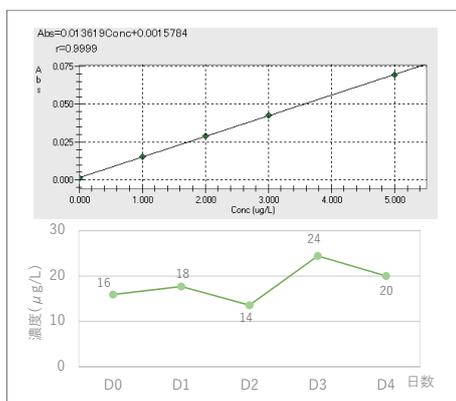


図14 乳酸の代謝経路に影響を与えるとされるCu濃度の経時変化

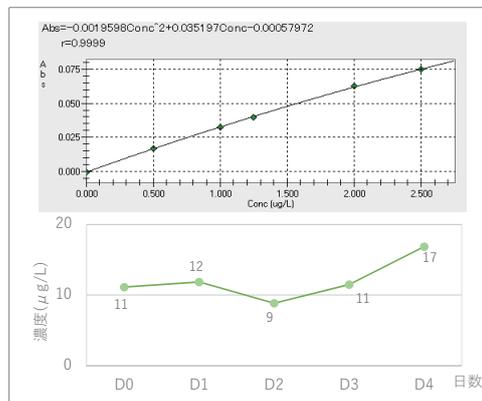


図15 タンパク質の糖鎖構造に影響を与えるとされるMn濃度の経時変化

■ まとめ

原子吸光法（フレーム法・電気加熱法）により、培養上清中の金属元素濃度を測定しました。その結果、培養上清を希釈するだけの簡便な前処理で、数ppb～数10ppmの広い濃度範囲の分析が可能であることが分かりました。これにより、原子吸光法は培地だけでなく培養上清の分析にも適用可能であることが示されました。微量から高濃度までの広い範囲で、金属元素濃度のモニタリングに活用できます。

原子吸光分光光度計

AA-7800シリーズ

分析用途に合わせて、フレーム法でppm、電気加熱法でppbオーダーの測定が可能です。両方を併用することで微量分析から高濃度分析まで広範囲のターゲットを測定することができます。


[Product >](#)

微生物育種へのメタボロミクス応用


[Application >](#)

メタボロミクスは微生物育種における代謝変動を評価するうえで、目的物質はもちろんのこと、その前駆体・中間体を含めた代謝変動を理解するために有効な技術であり、物質生産に関連した代謝経路をより深く理解することで、生産効率の高い物質生産への応用が期待されます。本稿ではシステイン産生大腸菌を試料として、システイン合成に使われる硫黄源にチオ硫酸あるいは硫酸を添加した場合に、関連する含硫代謝物が培養経過に依ってどのように変動するかをLC/MSで分析した例をご紹介します。



LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物のイオンペアメソッド (LCMS-8040) および非イオンペアメソッド (LCMS-8050) による分析条件にて一斉分析を行うことで、イオンペアメソッドではアミノ酸、補酵素、核酸関連化合物を中心として、また非イオンペアメソッドではアミノ酸、有機酸、核酸関連化合物に由来するピークを検出することが可能です。

■ 分析

回収した大腸菌はOD値を測定した後、フィルター濾過により培地成分と菌体を急速に分離しました。その後、分離した菌体をメタノール中に破砕することで、大腸菌抽出液を調製しました。濃縮遠心機でメタノールをとばした後、超純水で溶かしたものを適宜希釈して、LC/MS分析を行いました。

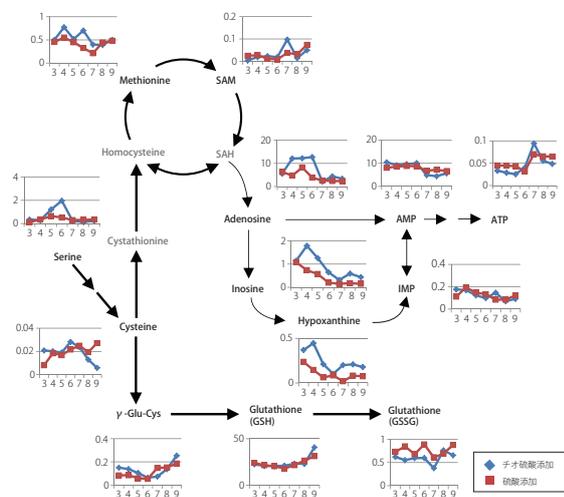


図16 チオ硫酸および硫酸添加培地にて培養した大腸菌における含硫代謝物の変動

■ まとめ

図16に示すように、硫黄源の違いにより培養時における代謝物の変動が確認されました。特にグルコースが枯渇する6時間前後において、チオ硫酸添加培地におけるCysteineの減少、また代謝経路の上流にあたるSerineにおいて、増加が認められました。これ以外にもチオ硫酸添加培地において、ヌクレオシド(Adenosine、Inosine)の上昇が確認されました。このように、培地に添加する硫黄源の違いがCysteineをはじめとする含硫代謝物の産生能に影響することが、メタボロミクスによるアプローチから分かりました。

■ 試料

硫黄源としてチオ硫酸もしくは硫酸を添加した最小培地を用いて大腸菌の培養し、3、4、5、6、7、8、9時間経過後の培養懸濁液

■ 分析条件

LC-MS Systems : LCMS-8040、LCMS-8050
Columns : RP columns

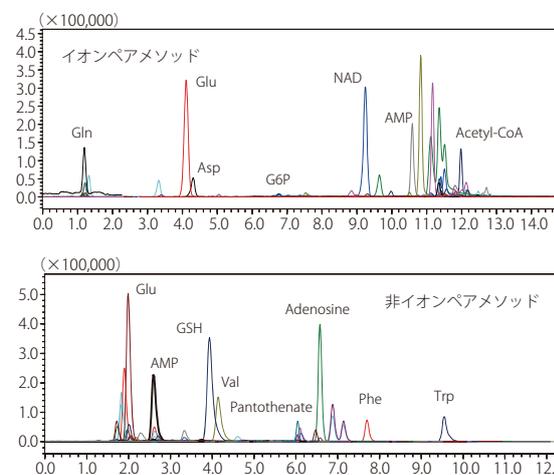


図17 チオ硫酸添加培地にて培養した大腸菌抽出物のMRMクロマトグラム

LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 3

本メソッドパッケージでは、LC/MS/MS分析において必要となる分離条件の検討や、各化合物に対するMSパラメータの最適化などの煩雑な作業をユーザーが実施することなく分析をはじめることができるため、多成分一斉分析業務を効率よく進めることができます。


[Product >](#)

GC-MS を用いた ^{13}C 代謝フラックス解析法

Application >

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 ^{13}C 代謝フラックス解析法が有効です。



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、活性化・抑制されている反応の発見が期待できます。

■ 分析

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 ($[1-^{13}\text{C}]\text{glucose} : [\text{U-}^{13}\text{C}]\text{glucose} = 1 : 1$) 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 (OD_{600}) 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 (OD_{600}) 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 ($\text{OD}_{600} \sim 1$) 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。

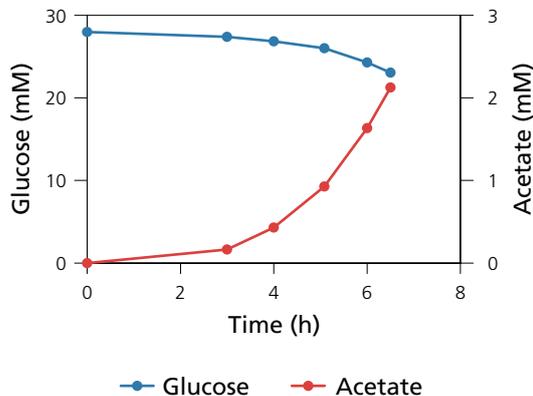


図 18 培地中グルコースと酢酸の濃度変化

■ 試料

大腸菌野生株

■ 分析条件

GC-MS System : GCMS-TQ8040
Auto injector : AOC-20i

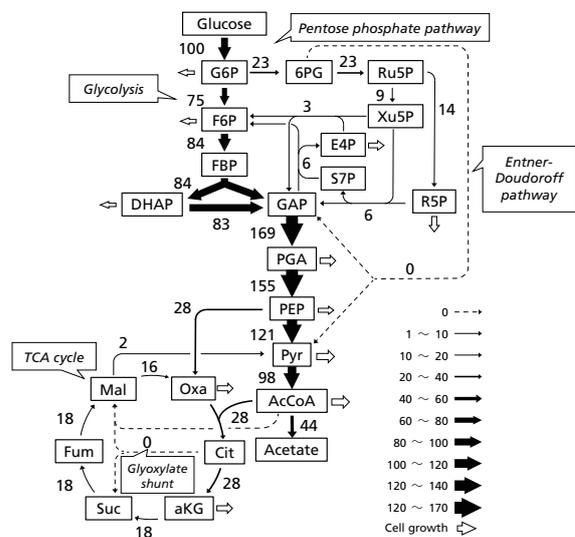


図 19 増殖期大腸菌の代謝フラックス分布

■ まとめ

^{13}C 代謝フラックス解析を行うことで、大腸菌中枢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。

トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計
GCMS-TQ8040 NX

高感度・長期安定性イオン源や高効率率リジョンセルの搭載により、高感度かつ長期にわたり安定した代謝物分析を実現します。



Product >

代謝物精密質量データベースによる メタボロミクスのトータルソリューション



Application >

メタボロミクスでは、低分子の代謝物を網羅的に解析するために質量分析計が使用されます。分析対象の代謝物が決まっているターゲットメタボロミクスでは、トリプル四重極型のLC-MSやGC-MSが使用されます。一方、未知代謝物の探索などのノンターゲットメタボロミクスでは、Q-TOFなどの高分解能の質量分析計が使用されます。



代謝物精密質量データベースには、幅広い物性の代謝物（470成分）を網羅的に解析するためのLC/Q-TOF用の「Ready to Use」メソッドが複数含まれており、LCやMSの分析条件を検討する必要がありません。

■ 分析

iPS細胞を播種後、24時間ごとにその培養上清をサンプリングし、6日間培養しました。サンプリングした培養上清は、アセトニトリルを添加し除蛋白を行い、有機溶媒沈殿後、遠心上清を超純水で10倍希釈したものを試料として、本データベースの培地成分メソッドで分析しました。

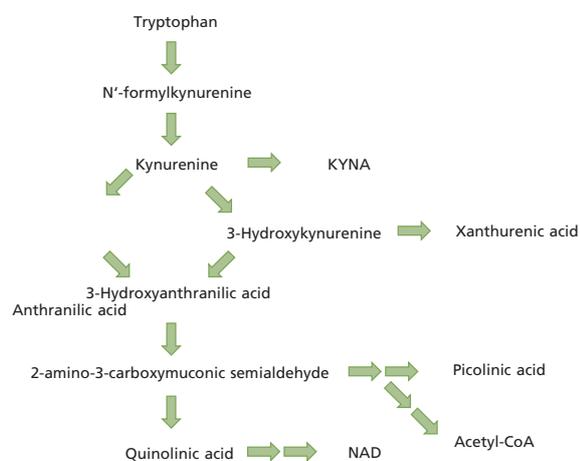


図 20 キヌレニン代謝経路

■ 試料

iPS細胞の培養液

■ 分析条件

LC-MS System : LCMS-9030

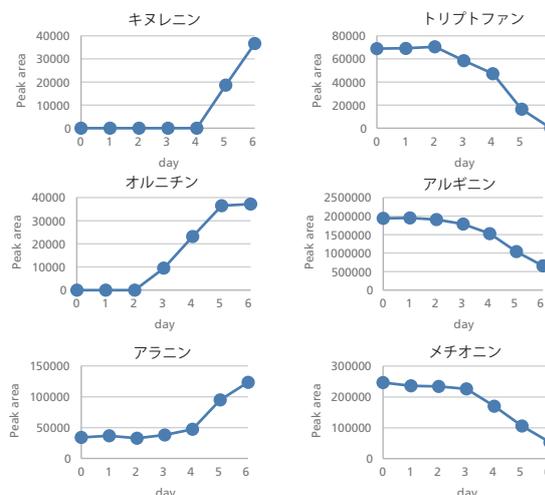


図 21 培養経過に伴う培養上清成分の変動

■ まとめ

代謝物精密質量データベースには、幅広い物性の代謝物を網羅的に解析するためのLC/Q-TOF用の複数のメソッドが含まれます。延べ470成分（内部標準物質を含む）の代謝物の保持時間、精密質量情報が含まれ、簡単にメタボロミクスをはじめられます。N'-ホルミルキヌレニンの例のように、データベースに含まれない代謝物の探索も、データベースを利用したターゲットメタボロミクスで得た情報を上手く活用することで容易に行えます。また、新規に発見された代謝物をトリプル四重極LC-MSで高感度分析するためのメソッド移管も容易にでき、ノンターゲットメタボロミクスから高感度ワイドターゲットメタボロミクスまでのトータルソリューションを実現できます。

四重極飛行時間型 高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-9030

優れた質量精度および高感度と高分解能の両立を実現するために、UFgrating™、iRefTOF™といった島津独自の特許技術が使われています。代謝物に関するアプリケーションの開発や分析の効率化に貢献します。



Product >

LC/MSおよびGC/MSデータの統合解析



Application >

メタボロミクスは、生体内の代謝産物を網羅的に解析する技術です。メタボロミクスでは、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) とガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) が一般的に使用されます。測定対象となる代謝物が異なるため、LC/MSとGC/MSを同時に使用することで、互いのデータを補完することができます。



マルチオミクス解析パッケージを用いることで、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) とガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 両方の測定データを同時に読み込み、代謝物をより網羅的に解析することが可能です。

■ 分析

各血清は、改良されたBligh and Dyer法を用いた液液抽出によって除蛋白され、脂肪化されました。

LC/MS分析では、水層を遠心濃縮した後に残留物を水中に再懸濁し、LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 3 を分析方法として使用しました。GC/MS分析では、遠心濃縮後にメトキシアミンとMSTFAによって試料を誘導体化し、分析法としてSmart Metabolites Database Ver. 2を用いました。どちらの方法でもMRMモードを使用しました。データ解析にはマルチオミクス解析パッケージを使用しました。

■ 試料

NASH、NAFLD およびコントロールマウスの血清 (n=5 ~ 6/群)

■ 分析条件

GC-MS System : GCMS-TQ8050 NX
LC-MS System : LCMS-8060NX

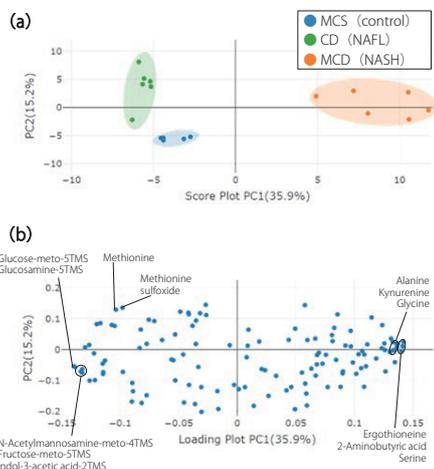


図 22 主成分分析の (a) スコアプロット、(b) ローディングプロット

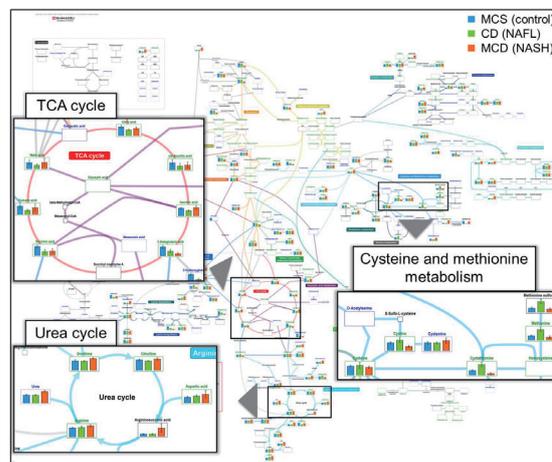


図 23 LC/MS と GC/MS データを統合した代謝マップ

■ まとめ

LC/MSおよびGC/MSを用いて、マウス血清から122の成分が検出されました。両データは新たに開発された代謝マップを用いて可視化され、2つの方法を同時に使用することで互いのデータを補完することができました。

代謝マップ表示では、糖、アミノ酸、硫黄関連代謝物などの一部の化合物がCD群とMCD群で変化していることが示されました。

マルチオミクス解析パッケージ

当社が提供する代謝物分析用の各種メソッドパッケージ・データベースと連携し、メタボロミクスデータ解析作業を効率化します。直感的に捉えることができる可視化されたデータは、創薬や機能性食品、バイオ工学などライフサイエンス研究を強力にサポートします。



Product >

LabSolutions Insight、LCMS、Shim-pack、GCMS-TQ、Smart Metabolites Database、Nexera、UFgratingおよびiRefTOF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。Kinetexは、Phenomenex Inc.の商標または登録商標です。

本文書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。なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

製品情報



価格お問合せ



東京支社 (官公庁担当) (03) 3219-5631
(大学担当) (03) 3219-5616
(会社担当) (03) 3219-5622

関西支社 (06) 4797-7230
札幌支店 (011) 700-6605
東北支店 (022) 221-6231
郡山営業所 (024) 939-3790

つくば支店 (官公庁・大学担当) (029) 851-8511
(会社担当) (029) 851-8515
北関東支店 (官公庁・大学担当) (048) 646-0095
(会社担当) (048) 646-0081

横浜支店 (官公庁・大学担当) (045) 311-4106
(会社担当) (045) 311-4615
静岡支店 (054) 285-0124

名古屋支店 (官公庁・大学担当) (052) 565-7521
(会社担当) (052) 565-7531
京都支店 (官公庁・大学担当) (075) 823-1604
(会社担当) (075) 823-1603

神戸支店 (078) 331-9665
岡山営業所 (086) 221-2511
四国支店 (087) 823-6623

広島支店 (082) 236-9652
九州支店 (官公庁・大学担当) (092) 283-3332
(会社担当) (092) 283-3334

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(操作・分析に関する相談窓口) IP電話等:(075) 813-1691