SHIMADZU
Excellence in Science

Technical Report

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

Total solution of metabolomics by exact mass database for endogenous metabolites

服部 考成[1]、中西 豪[1]、松原 稔哉[1]、渡辺 淳[1]

Abstract:

メタボロミクスで対象となる代謝物は幅広い物性を持ちます。そのため、代謝物を網羅的に測定するためには、対象代謝物に合った分析メソッドやデータベースが必要となります。本テクニカルレポートでは、LC/Q-TOF用の代謝物精密質量データベースをご紹介します。また、その応用例としてiPS細胞培地中の代謝物を対象にQ-TOF型LC-MSを用いたノンターゲットメタボロミクスからトリプル四重極LC-MSを用いた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ご紹介します。

Keywords: Q-TOF、代謝物、データベース、メタボロミクス

1. はじめに

メタボロミクスとは、生体機能を維持することで生じるアミノ酸や有機酸などの低分子の代謝物を網羅的に解析し、複数の試料群における差異を明らかにする学術分野であり、ゲノミクスやプロテオミクスなどの他のオミクスと比較して分析対象となる代謝物数が少ないことから、網羅的分析を行いやすいとされています。疾患などの表現型に対して、よりダイナミックに代謝物が作用していることから、元々は臨床試料を用いた診断マーカー探索やモデル動物を用いた病因解析など、医療分野における成果を期待されて発展してきた技術ですが、同様の解析手法が食品分野や工業分野などでのメーカー間の製品比較や原材料の産地比較などにも応用されるようになり、ますます注目が集まっています。

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（Fig. 1）が使用されます。

Fig. 1　Q-TOF型高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-9030

2. 代謝物精密質量データベース

メタボロミクスで対象となる代謝物は幅広い物性を持ちます。そのため、代謝物を網羅的に測定するためには、対象代謝物に合った分析メソッドが必要となります。

代謝物精密質量データベースには、幅広い物性の代謝物を網羅的解析するための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。また、それぞれの代謝物・サンプルに合った前処理例も収載されているため、煩雑な条件検討を行うことなくメタボロミクスを始めていただけます。本データベースは、LC/MS/MSメソッドパッケージシリーズで実績のある一次代謝物、細胞培養プロファイリング、脂質メディエーター、短鎖脂肪酸、胆汁酸をベースに開発された精密質量データベースです。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ます。

Table 1　登録化合物数

メソッド名	登録化合物数
一次代謝物	99
培地成分	96
脂質メディエーター	214
短鎖脂肪酸	23
胆汁酸	38

本データベースは、マルチオミクス解析パッケージ（別売）に対応しています。ターゲット分析した結果（Fig. 2）をマルチオミクス解析パッケージで解析することで、「代謝マッピング（Fig. 3）」、「ネットワーク解析」、「2群間比較の可視化」が簡単にできます。

Fig. 2　LabSolutions Insight™による分析結果

1　分析計測事業部

Fig. 3　代謝マッピング

本データベースはノンターゲットメタボロミクスにも対応しています。ターゲットメタボロミクスとは異なりノンターゲットメタボロミクスから得られるデータは膨大であるため、データ解析が非常に大変です。Signpost MS™（ライフィクス株式会社）を使うことで、ピークピッキング・アライメントから統計解析まで簡単に行うことができます（Fig. 4）。統計解析は、メタボロミクスでよく用いられる主成分分析、階層クラスタリング解析、スキャッタープロット（2群比較）に対応しており、本データベースと本ソフトウェアを使用することで一連のノンターゲットメタボロミクスが可能です。

Fig. 4　多変量解析ソフト Signpost MS

3. メタボロミクスのトータルソリューション

一般的にメタボロミクスでは、ノンターゲット分析によりバイオマーカー候補や新規化合物を発見後、バリデーションのためにルーチンでターゲット分析したり、発見した化合物も含めたワイドターゲット分析を行います。ノンターゲット分析では高分解能質量分析計が、ルーチンでのターゲット分析やワイドターゲット分析では高感度で定量性の高いトリプル四重極質量分析計がよく使用されます。そのため、ノンターゲット分析からターゲット分析に移行するにあたり、メソッド移行が必要です。

本データベースに含まれる各メソッドの LC 条件は、トリプル四重極 LC-MS 用のメソッドパッケージシリーズと同じであるため、スムーズなメソッド移行が可能です。具体的には、ノンターゲットメタボロミクスにより発見された代謝物の MRM トランジションを、対応するメソッドパッケージのメソッドに追加するだけです（Fig. 5）。

Fig. 5　メタボロミクスのトータルソリューション

4. iPS細胞培養時の培地分析例

発酵による有用物質の生産や抗体医薬品の製造において、培養工程の最適化や管理のために、培地のpH、溶存ガス、炭素源（グルコース）、窒素源（グルタミン）などのモニターが実施されています。細胞培養中の培地成分は、グルコースやグルタミン以外にもビタミンや核酸関連化合物、さらには細胞から分泌される代謝物など様々な化合物から構成されます。そのため、培地に含まれる化合物の網羅的分析は、バイオプロセスを考察する上で有用な情報を与えることが期待されます。本データベースの応用例として、iPS細胞の培養経過に伴う培養上清成分の変化をモニターした事例をご紹介します。

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。培養条件をTable 2に示します。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。

Table 2　培養条件

Cell line	: Feeder-free iPS cells 1231A3
Passage number	: 0P30
Seeding number	: 1.3×10^4 cells/well
Period	: 6 days
Medium	: AK02N
Cell substrate	: iMatrix (0.5 μg/cm^2)

培養上清を分析した結果、培地成分メソッドのデータベースに含まれるアミノ酸やビタミンなど27成分が検出されました。各サンプリング時間におけるピーク面積をプロットした結果の一部をFig. 6に示します。キヌレニンやオルニチン、アラニンなどが培養時間経過に伴い増加し、トリプトファンやアルギニン、メチオニンなどが減少する傾向が見られました。トリプトファンおよびキヌレニンが変動していることから、培養時iPS細胞内ではキヌレニン経路（Fig. 7）に変化が起こっていることが推測されました。

Fig. 6　培養経過に伴う培養上清成分の変動

Fig. 7　キヌレニン経路

次に、データベースに含まれない成分で量的変動が見られる化合物を探索するために、ノンターゲット解析を実施しました。データ解析には、Signpost MSを使用し、量的変動が見られた未知化合物を探索しました（Fig. 4）。解析の結果、データベースに含まれない化合物で量的変動があった成分が複数確認されました。

データベースを使った解析結果から、培養時iPS細胞内ではキヌレニン経路に変化が起きていると推測されたため、キヌレニン経路の代謝物でトリプトファン、キヌレニン以外も変動している可能性が考えられます。そこで、Signpost MSの結果からキヌレニン経路の代謝物において量的変動しているものがないか探索しました。その結果、保持時間5.25分、*m/z* 237.0870の未知代謝物がN'-ホルミルキヌレニンではないかと推定されました。Fig. 8にそのマスクロマトグラムおよびピーク面積の変動を示します。

Fig. 8　培養経過に伴って量的変動した未知代謝物

この未知代謝物がN'-ホルミルキヌレニンであることを確認するために、MS/MSスペクトルを取得し、経験則に基づいて得られたMS/MSスペクトルと比較しました。比較にはACD/LabsのMS Workbook Suiteを用いました。その結果、Fig. 9で示すように、主要なフラグメントピークが経験則に基づいて得られたフラグメントピークと一致し（赤色のピークが一致したフラグメントピーク）、またその理論値との誤差も1 mDa以下でした。以上の結果、この未知代謝物がN'-ホルミルキヌレニンであると推定されました。

Fig. 9　理論MS/MSスペクトルとの一致確認

N'-ホルミルキヌレニンはキヌレニン経路におけるトリプトファンとキヌレニンの中間代謝物です。以上の結果から、培養経過に伴ってトリプトファンが培地から細胞内に取り込まれることで培地中濃度は減少し、その代謝物であるN'-ホルミルキヌレニンやキヌレニンは細胞外へ分泌されることで培地中濃度が増加したと考えられます（Fig. 10）。6日目でN'-ホルミルキヌレニンが減少したのは、培地中のトリプトファンが枯渇したためと考えられます。

Fig. 10　キヌレニン経路における代謝変動

次に、培地中の主要成分と新たに発見したN′-ホルミルキヌレニンを高感度分析するために、トリプル四重極LC-MSのメソッドを構築しました。培地中の主要成分は、トリプル四重極LC-MSのLCMS-8000シリーズとLC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリングを用いることで高感度測定できます。メソッドパッケージに入っていないN′-ホルミルキヌレニンは、新たにそのMRMトランジションをメソッドに追加する必要があります。MRMトランジションは、LCMS-9030で取得したMS/MSスペクトルデータから容易に生成することが可能です（Fig. 11）。N′-ホルミルキヌレニンと同定するために取得したMS/MSスペクトルデータからMRMトランジションを生成させ、そのMRMトランジションを細胞培養プロファイリングのメソッドに追加しました（Fig. 12）。

Fig. 11　MRMトランジションの生成

Fig. 12　MRMトランジションを既存メソッドに追加

作成したメソッドとLCMS-8060を用い、N′-ホルミルキヌレニンも含めた培地中成分96成分を対象にiPS細胞の培養上清を分析しました。その結果、Fig 13, 14のようにN′-ホルミルキヌレニンを含めた培地中の主要成分を分析できました。

Fig. 13　iPS細胞培養上清のMRMクロマトグラム

Fig. 14　N′-ホルミルキヌレニンのMRMクロマトグラム

5. 結論

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。

＊iPS細胞の培養は、株式会社iPSポータルで実施しました。

LCMSおよびLabSolutions Insightは、株式会社島津製作所の商標です。
Signpost MSは、ライフィクス株式会社の商標です。

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

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：2021 年 2 月
© Shimadzu Corporation, 2021

3218-01108-ODPIT