

包括的なターゲットメタボロミクス ワークフロー

著者

Karen E. Yannell, PhD
Cate Simmermaker
Genevieve Van de Bittner, PhD
Daniel Cuthbertson, PhD,
Agilent Technologies, Inc.

概要

メタボロームとは、代謝の間に細胞または生物によって生成されるあらゆる低分子です。そのため、細胞代謝活性と生理学的状態の直接的な機能性情報として、メタボロミクスデータを使用できます。ターゲットメタボロミクスは、調査対象の生物学的プロセスに含まれる可能性が高い、事前定義された代謝物グループのルーチン検出とルーチン定量を目的としています。このアプリケーションノートでは、ターゲットメタボロミクス用のサンプル前処理ソリューションと機器分析ソリューションを組み合わせ、血漿と哺乳類細胞のサンプルタイプに利用できる、堅牢なワークフローについて説明します。Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform と Agilent Captiva EMR-Lipid プレート を組み合わせ、自動サンプル前処理を実行しました。代謝物の分離には、Agilent 1290 Infinity II Bio LC 超高性能液体クロマトグラフィーシステムと Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを組み合わせ使用しました。代謝物の検出には、Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムと、Agilent MassHunter Optimizer ソフトウェアを用いて作成した 500 種類の代謝物のカスタムデータベースを組み合わせ使用しました。ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) メソッドをさまざまなイオンランジション数で使用しましたが、500 種類の代謝物ごとに 1 つのランジションを保持し、1 ms のドウェルタイムで、高い再現性で操作できます。また、データ解析には Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10 ソフトウェアと Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアを使用しました。この実験の結果から、このメソッドを使用することで、複数の化合物クラスから代謝物を効率的かつ高い再現性で分離できることがわかります。さらに、6495 トリプル四重極 LC/MS を使用することで、ドウェルタイムが短くても代謝物を高い感度で検出できます。つまりこれは、特定のニーズに合わせてカスタマイズできる再現性が高く使いやすいメソッドであり、さまざまなメタボロミクスの専門知識を持つ研究者に適しています。

概要

細胞は、(1500 Da 未満の) 低分子を生成、変換、消費します。このような低分子は代謝物と呼ばれ、その総体的な呼称がメタボロームです。このような代謝物は、生物の表現型を反映するため、非常に重要です。代謝物には、代謝の間に合成される分子もあります。例えばグルコース、コレステロール、ATP、脂質、アミン神経伝達物質、アミノ酸、有機酸、ステロイドなどです。¹ メタボロミクスの研究は、このような低分子を測定し、さまざまな生理学的状態との相関を見つけることを目指しています。² メタボロミクスの手法は、大きくはノンターゲット分析とターゲット分析という

2つのカテゴリに分かれています。ノンターゲットメタボロミクスは、サンプル中のすべての測定可能成分（未知化合物を含む）の包括的な分析を網羅しています。これに対し、ターゲットメタボロミクスは、所定のアンテーション済み代謝物グループを測定します。² このため、一般的にノンターゲット分析は代謝物の検出に使用され、ターゲットメタボロミクスは特定の分析対象代謝物の相対/絶対定量およびバリデーションの提供に使用されます。

包括的なターゲットメタボロミクスワークフローには、サンプルの前処理、分離、代謝物の検出、統計解析が含まれます。このため、さまざまな



図 1：アジレントのターゲットメタボロミクス用ソリューション

分析技法を組み合わせることが必要です。アジレントは、ワークフローの全ステップ用のハードウェア、消耗品、ソフトウェアをご用意しています (図 1)。さらに、すべてのプロトコル、メソッド、データベースがパッケージ化されており、あらゆるラボに迅速に導入できるようになっています。

ここで紹介するワークフローでは、自動サンプル前処理、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC)、トリプル四重極質量分析計 (LC/TQ) を組み合わせて、代謝物のターゲット検出を実行しています。このため、研究者たちのメタボロミクスに関する専門知識レベルにばらつきがあっても、さまざまな種類のサンプルから高感度で再現性の高い結果を得ることができます。

メソッド

サンプル前処理

サンプル前処理には、[Bravo Metabolomics Sample Prep Platform](#) と [Agilent Captiva EMR-Lipid 固相抽出プレート](#) を組み合わせて使用しました (図 2A および B)。細胞サンプルの前処理には、追加で代謝物 + 脂質細胞のデュアルサンプル前処理 Vworks プロトコルも必要です。³ Bravo プラットフォームでサンプル前処理プロセスを自動化することで、使いやすさが向上し、手作業の時間が減り、再現性が向上します。その理由の一部は、ユーザーエラーの減少によるものです。Captiva EMR-

Lipid は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせることで、脂質を除去します。長鎖炭化水素を含む脂質の効果的な除去により、分析対象の極性代謝物のイオン化抑制が最小限に抑えられ、メソッドの信頼性と堅牢性が向上します。⁴ またこのステップは、極性代謝物を再現可能な方法で溶出させ、クロマトグラフィーの堅牢性を上げるためにも非常に重要です。

過去のアプリケーションノートに記載されているプロトコルに従い、代謝物を 20 μ L のプールウシ血漿 (BioIVT) と 100 万個の K562 慢性骨髄性白血病由来細胞から抽出しました。^{3,5} 細胞はまずその培地から分離し、PBS で洗浄し、溶解させ、その代謝物をクエンチしてから、細胞溶解液を 96 ウェルプレートに添加しました。どちらの種類のサンプルでも、極性代謝物の抽出は、図 2C の一般的なプロトコルを用いて Bravo プラットフォームで自動的に実行しました。このワークフローでは、極性代謝物の抽出物のプレートが、LC/MS 分析用に乾燥および再溶解できる状態で提供されます。

分離

前のステップで抽出した代謝物を、[1290 Infinity II Bio LC](#) システム (図 3A) を用いて分離しました。超高性能液体クロマトグラフィー (UHPLC) システムは MP35N 不活性合金でコーティングされているため、金属と反応しやすい成分でも再現性の高いピークと低い検出下限を実現できます。



図 2 : ターゲットメタボロミクス研究の自動サンプル前処理用のアジレントソリューション。A. Bravo Metabolomics Sample Prep Platform B. Captiva EMR-Lipid 固相抽出プレート C. 一般的な極性代謝物抽出プロトコル

A



B

LC 条件		
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 x 150 mm 2.7 μm, PN 683775-92	
カラム温度	15 °C	
注入量	3 μL	
オートサンブラ温度	5 °C	
ニードル洗浄	Standard Wash, 10 sec, IPA:ACN:H ₂ O 1:1:1	
移動相	A = 20 mM ammonium acetate, pH 9.3 + 5 μM medronic acid in water B = pure ACN	
流量	0.400 mL/min	
グラジエントプログラム	Time	%B
	0.00	90
	1.00	90
	8.00	78
	12.00	60
	15.00	10
	18.00	10
	19.00*	90
	23	90
トータルランタイム	24 min	

図 3 : A. Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム。B. 極性代謝物の分離に使用するプロトコル * 再平衡化の間は 0.5 mL/min の流量を使用

このシステムと [InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z](#) カラムを組み合わせることで、ポジティブモードとネガティブモードの両方でイオン化しながら極性対象化合物を良好に保持できました。

使用条件の詳細を図 3B に示します。Poroshell 120 HILIC-Z カラム (2.1 x 150 mm、2.7 μm) は、標準化されたリン酸化手順で洗浄し、分析用バッファ (30:70 A:B) で 1 時間平衡化しました。バッファシステムの中身は、20 mM 酢酸アンモニウム、pH 9.3 + 5 μM メドロン酸水溶液 (移動相 A)、高純度アセトニトリル (移動相 B) です。分析には、非直線グラジエントを使用しました (グラジエント全体の溶出時間は 0.5 ~ 16 分)。各注入時間は、再平衡化時間を含めて 24 分間でした。このメソッ

ドと関連プロトコルを、さまざまなラボのスキルレベルが異なるユーザーが、複数のカラムロットでテストしました。このような最適化とテストにより、リテンションタイムの再現性と別のラボへの移管のしやすさを確保しています。

検出と分析

機器：代謝物の検出には、[6495 トリプル四重極 LC/MS](#) (LC/TQ) システムを使用しました (図 4A)。これは、短いドウェルタイム (0.5 ms) で再現性の高い高感度なデータを生成できる、強力で信頼性の高い質量分析システムです。第 3 世代のイオンファンネルが、浮遊イオンを回収して

A



B

AJS 条件	
イオンモード	Positive/Negative
ガス温度	200 °C
乾燥ガス流量	14 L/min
ネブライザガス	50 psi
ソースガス温度	375 °C
ソースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	(+)3000/(-)2500 V
ノズル電圧	0 V

図 4 : A. Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS。B. AJS. iFunnel 高陽圧 RF 150 V、低陽圧 RF 60、高陰圧 RF 90 V、低陰圧 RF 60 用のパラメータ

集め、中性物質を排出します。Agilent Jet Stream (AJS) には、サーマルフォーカシングおよび熱伝達技術が搭載されているため、標準的なエレクトロスプレー技術の 5 倍ものイオンを効率的に脱溶媒して生成できます。AJS で使用したイオン源の条件を、図 4B に示します。

データベースの精査：さまざまなイオントランジションで、ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) メソッドを使用しました。⁶ ドウェルタイムは最小テスト値 (1 ms) で再現可能でした。MassHunter Optimizer ソフトウェアを使用して、500 種類以上の成分のイオントランジションのデータベースを自動的に構築しました。適切な標準試料を使用して、各成分の MRM トランジションを最適化しました。これらのトランジションを検証、精査してリテンションタイムに割り当てました。可能な場合は、ポジティブイオンモードとネガティブイオンモードでのイオントランジションを追加し、各イオンモードの少なくとも 2 つのトランジションを含めました。

メソッドのカスタマイズ：各実験のデータベース導入をカスタマイズして、研究者が柔軟に代謝物のプロファイリングや定量メソッドの構築を実行できるようにします。実行する可能性があるワークフローは次の 4 つです：1) すべての成分のプロファイリング、2) サンプル内に存在することがわかっている特定の成分のプロファイリング、3) パスウェイのプロファイリング、4) Cambridge Isotope Laboratories の安定した同位体プロダクトを用いた定量または半定量メソッド。⁷ このアプリケーションノートでは、2 番目のワークフローを使用しました (図 5)。

ソフトウェア：MassHunter 10 Acquisition ソフトウェアを使用して、LC/TQ 機器を制御しました。すべての成分の定量と積分には MassHunter Quantitative Analysis 10 ソフトウェアを使用しました。データの統計には Mass Profiler Professional (MPP) を使用しました。このソフトウェアでは、自動化とウィザードによって解析を簡素化しています。

結果と考察

このワークフローによって、血漿では 266 種類、細胞サンプルでは 274 種類の代謝物をそれぞれ同定できました。精査されたデータベースには 500 種類以上の成分が含まれており、アミノ酸、コエンザイム、トリカルボン酸 (TCA) サイクル、解糖パスウェイの成分を十分に網羅しています。このため研究者は、エネルギー代謝の基礎的なパスウェイを自信をもって調査できます。

さまざまな成分クラスの再現性の高いピーク

1290 Infinity II Bio LC システムと HILIC-Z カラムを組み合わせて使用することで、さまざまなケミストリの代謝物を効率的に高い再現性で分離できました (図 6)。HILIC メソッドでは、イオンペア試薬を使用しなくても、いくつかの極性異性体化合物 (ロイシンやイソロイシンなど) を高い再現性で分離できます (図 6B)。従来の C18 メソッドではイオン性代謝物の保持に使用されていたイオンペア試薬は、正電荷イオンのバック

グラウンド上昇を LC/MS システムにもたらし、ポジティブイオンモードの分析ができなくなる問題がありました。HILIC メソッドでは、イオンペア試薬なしで代謝物やその他の低分子を保持できます。このため研究者は、両方のイオンモードで代謝物を検出することでメタボロームの範囲を広げることができます。

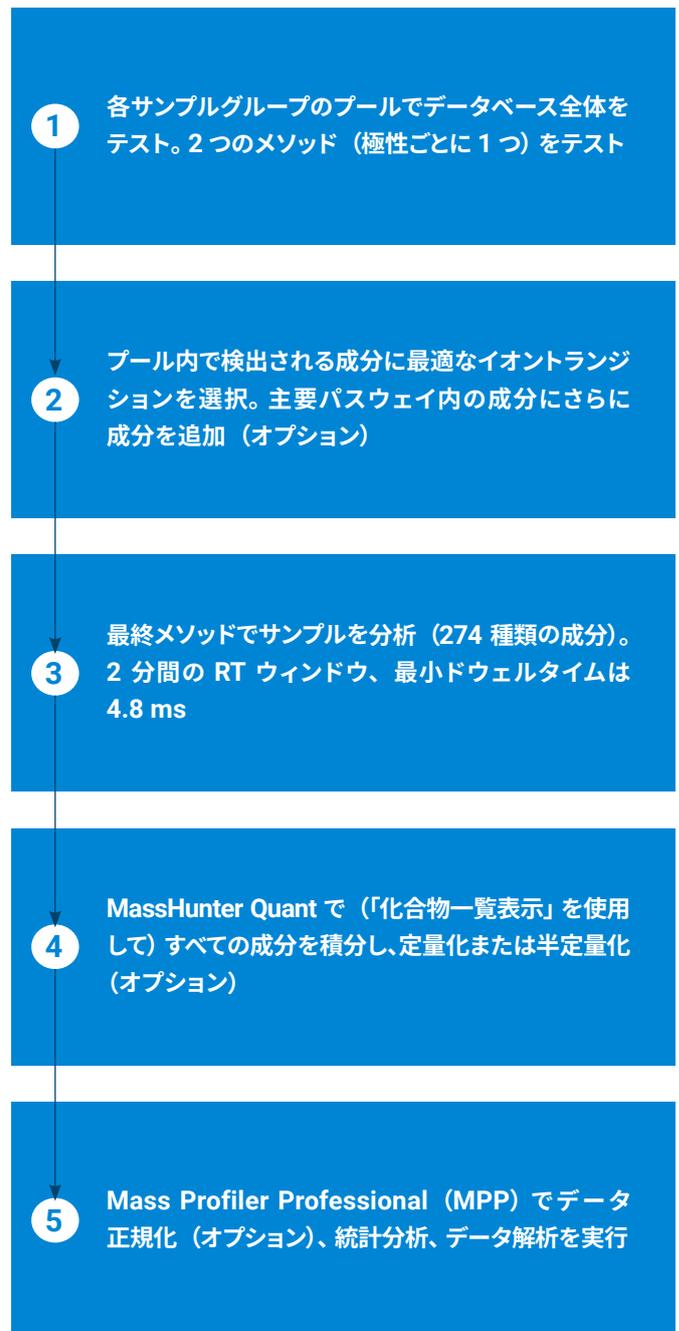


図 5: サンプル中に存在する特定の成分のプロファイリングに使用するワークフロー

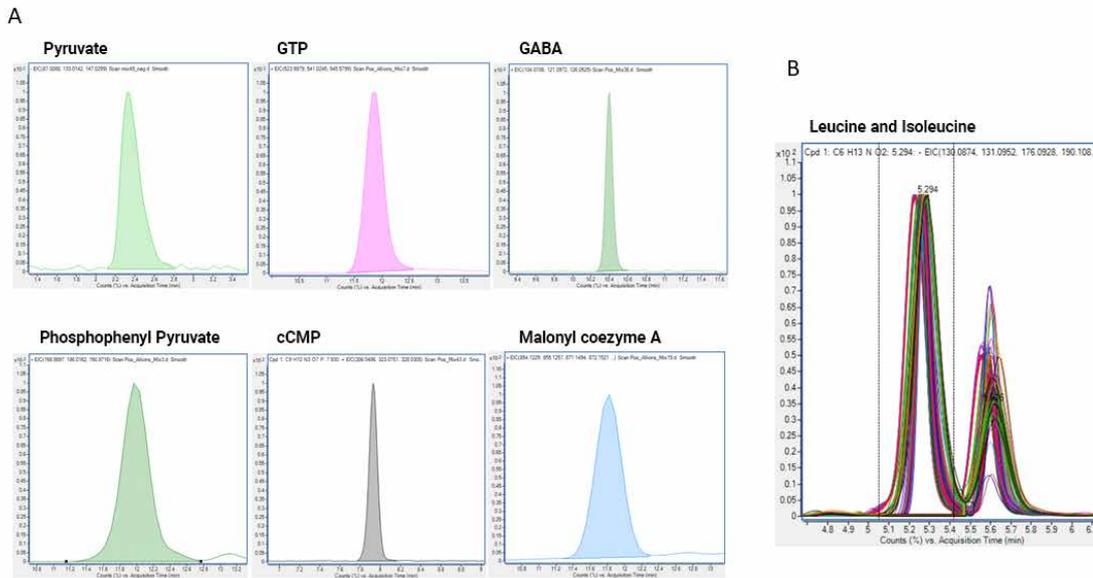


図 6 : A. HILIC-Z カラムと標準化されたカラムおよびバッファ前処理ワークフローを用いて取得したクロマトグラムの例。B. 160 のクロマトグラムのオーバーラップ（160 種類の血漿抽出物から取得）。同重体成分であるロイシン（左）とイソロイシン（右）の再現性の高い分離を示しています。

再現性の高いリテンションタイム

これまで、HILIC は再現性が低く、成功には高度な技術的スキルが必要であると思われてきました。ただし、ここで説明する堅牢なワークフローと標準化されたプロトコルを使用すれば、複数のエンドユーザー間で再現性を確保できます。図 7 に、さまざまなカラムロットを使用し、異なる日に異なるユーザーが前処理した異なる溶媒バッチを用いた各種成分の

リテンションタイム（RT）を示します。テストした 400 回以上の注入のうち、推奨 dMRM ウィンドウ外でリテンションタイムエラーが発生した代謝物はありませんでした。これらの結果は、さまざまなラボがターゲットメタボロミクスの HILIC dMRM メソッドを常に導入でき、ユーザーが生物学的課題に日々取り組めることを示しています。

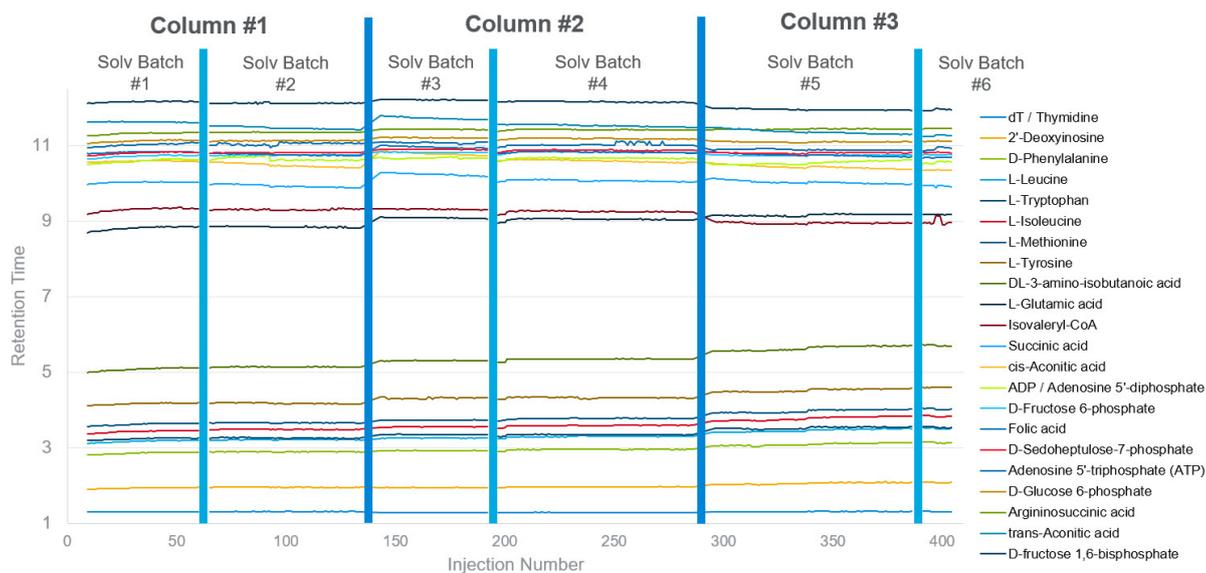


図 7 : 3 つのカラムロットと、2 人のユーザーが前処理した 6 つの溶媒バッチを用いた各種成分のリテンションタイム⁸

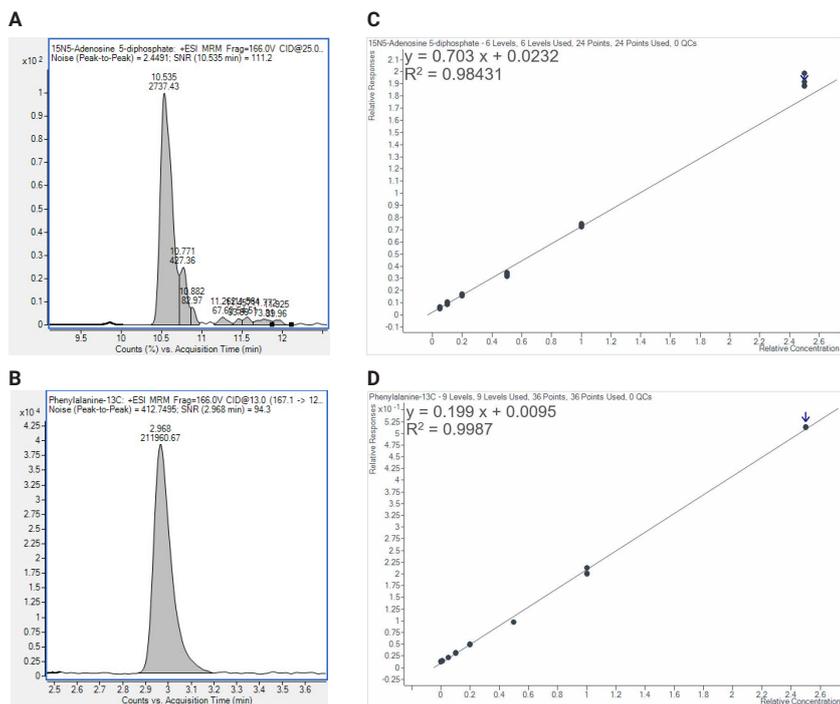


図 8 : 成分クラスの感度を示すために、内因性 ADP および Phe を用いて正規化した血漿抽出物からの安定同位体標識 ADP および Phe の絶対定量は、それぞれ 20 amol と 1.2 amol

高い分析感度

生物学的知見を最大限に得るため、dMRM データベースでは重要な代謝物に注目しました。例えば TCA および解糖パスウェイ内の化合物、主要な細胞エネルギー処理に関する知見を提供する重要なコエンザイムなどです。さらに、アミノ酸やヌクレオチドなどの生体構成要素に注目することで、生物の代謝状態をより幅広く理解できます。代謝物の定量には、正規化のために同位体標識された内部標準を使用しました。図 8 に、血漿抽出物内の 2 つの成分であるアデノシン二リン酸 (ADP) とフェニルアラニン (Phe) の感度を示します。この実験では、さまざまな濃度の $^{15}\text{N}_5$ -アデノシン-5'-二リン酸 ($^{15}\text{N}_5$ -ADP) と ^{13}C -フェニルアラニン (^{13}C -Phe) をプールウシ血漿の抽出物にスパイクしました。5 ms のドウェルタイムのメソッドを用いて、各サンプルを 4 回注入しました。このメソッドを使用することで、20 amol の $^{15}\text{N}_5$ -ADP を 10 % の RSD で検出できました (図 8A)。1.2 amol の ^{13}C -Phe を 1 % の RSD で検出できたため、アミノ酸の検出下限が改善されました (図 8B)。いずれの場合も、検量線は強い直線回帰を示しました (図 8C、 $R^2 = 0.98$ と図 8D、 $R^2 = 0.99$)。

これらの結果は、Agilent 6495 LC/TQ 機器が短いドウェルタイムで、高い再現性と感度で測定できることを示しています。つまりこれは、研究者が複雑なマトリクス中の少量の成分を検出および定量できる、堅牢で使いやすいメソッドです。

シンプルで高速なデータ解析

MassHunter Quantitative Analysis 10 ソフトウェアを使用して、データセット内のすべてのトランジションを統合しました。ソフトウェアツール「化合物一覧表示」では化合物とサンプルがグリッド形式で表示されるため、この作業が容易です。それらの結果を Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアとリンクすることで、統計学に基づく生物学的知見を得ることもできます。MPP ではウィザードベースのインターフェースによってプログラム内でデータを移動し、正規化、ベースライン化、分散テスト、統計的テストを適用できます。図 9 に、5 種類の固有の細胞マトリクスサンプルの 6 回の繰り返し注入のクラスタを含む PCA プロットと、対応するヒートマップを示します。MPP は他にも、サンプル中の傾向の調査に役立ついくつかのプロットを提供できます。例えば箱ひげ図、ボルケーノプロット、階層型クラスタ、バイオリン図などです。このため、このワークフローに含まれるソフトウェアとメタボロミクスデータベースにより、高速で利便性の高いデータ解析を実行し、新たな生物学的知見をより迅速に得ることができます。

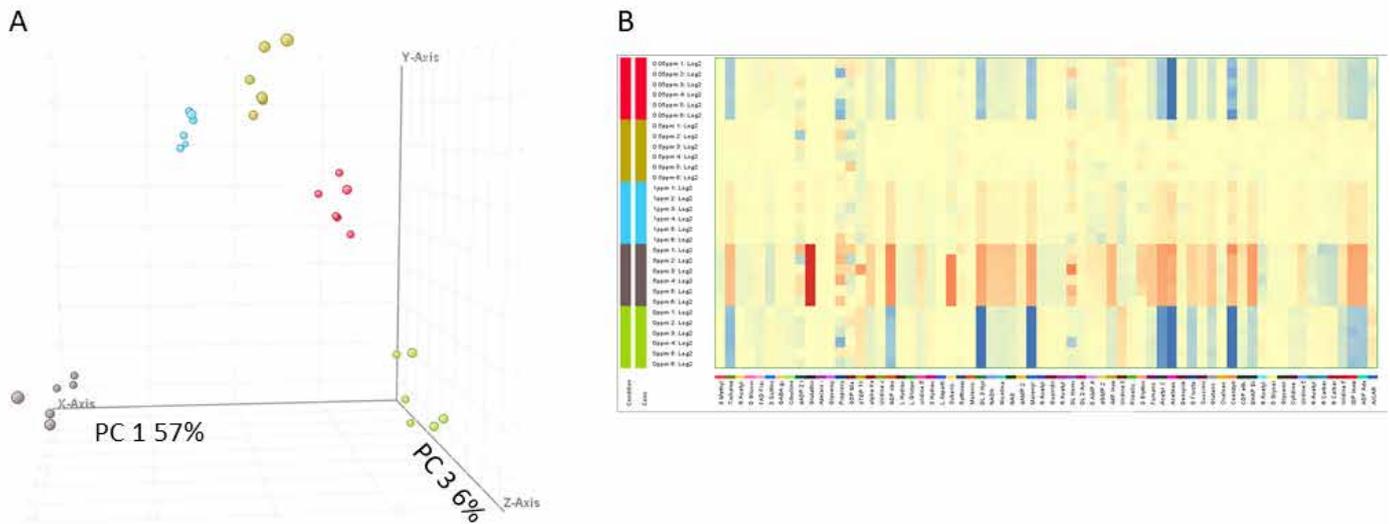


図9：A. (異なるレベルの代謝物スパイクインが含まれる) 5種類の細胞マトリックスサンプルの明確なクラスタリングを示すPCAプロット。緑 = スパイクなし、赤 = 0.05 ppmのスパイクイン、黄 = 0.5 ppmのスパイクイン、青 = 1 ppmのスパイクイン、黒 = 5 ppmのスパイクイン B. サンプル内のさまざまな成分を示すヒートマップ。細胞サンプルにスパイクされた成分に対応します。

結論

アジレントのソリューションは包括的なターゲットメタボロミクスワークフローを提供しているため、研究者はすぐにメタボロミクスの研究に着手できます。Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform と Agilent Captiva EMR-Lipid プレートを組み合わせることで、血漿サンプルや細胞サンプルから極性代謝物を効率的に抽出できます。抽出物は非常にクリーンであるため、クロマトグラフィーの劣化なしで、HILIC-Zカラムに数百回も注入できます。500種類以上の成分のイオンランジションとリテンションタイムのカスタムデータベースを用いて、包括的なdMRMメソッドを構築しました。Agilent 1290 Infinity II Bio LCシステムとHILIC-Zカラムを用いて分離することで、さまざまな代謝化合物クラスでピークとリテンションタイムの再現性を確保できました。Agilent 6495 LC/TQ機器は高速で分析感度が高いため、数百種類もの少量の成分を、短いドウェルタイム（1 ms未満）で検出できました。このワークフローメソッドをカスタマイズすることで、さまざまな研究上の課題に柔軟に取り組むことができます。

[Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS の機能とその他のターゲットメタボロミクスソリューション](#)についてもご覧ください。

参考文献

- Zamboni, N.; Saghatelian, A.; Patti, G. J. Defining the Metabolome: Size, Flux, and Regulation. *Mol. Cell.* **2015**, *58*(4), 699-706.
- Roberts, L. D.; Souza, A. L.; Gerszten, R. E.; Clish, C. B. Targeted Metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2012**, 30.
- Van de Bittner, G.; Sartain, M.; Chang, D.; Apffel, A.; Bernick, K.; Gomez, M. An Automated Dual Metabolite + Lipid Sample Preparation Workflow for Mammalian Cell Samples. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-5065EN, **2022**.
- Spivia, W. R.; Raedschelders, K.; Gomez, M.; Van Eyk, J. E. Agilent Bravo Platform による血漿代謝物の抽出の自動化. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-0685JAJ, **2019**
- Sartain, M.; Gomez, M.; Van de Bittner, G.; Shu, H. Enabling Automated, Low-Volume Plasma Metabolite Extraction with the Agilent Bravo Platform. Agilent Technologies application note, publication number 5994-2156EN, **2022**.
- Stone, P.; Glauner, T.; Kuhlmann, F.; Schlabach, T.; Miller, K. New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple quad Quantification in Complex Analyses. Agilent Technologies technical overview, publication number 5990-3595EN, **2009**.
- Banu Mohsin, S.; Batoon, P. Absolute Quantitation of Fragile Metabolites by Isotope Dilution Mass Spectrometry on the Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS. Agilent Technologies application note, publication number 5994-4439EN, **2022**.
- Yannell, K. E.; Cuthbertson, D.; Simmermaker, C.; Van de Bittner, G.; Parry, E. Improvements to HILIC Robustness – a Targeted HILIC Metabolomics Method for Routine analysis. Agilent Technologies poster, **2021**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA44882.3992013889

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, January 1, 2023

5994-5628JAJP

