

脂質の多様性を捉える 技術開発の現況と展望

池田 和貴
理研 IMS メタボローム研究チーム

脂質メタボロミクス(リピドミクス)とは？

Genomics

Transcriptomics

Proteomics

Metabolomics

by Mass spectrometry

Fatty acid diversities

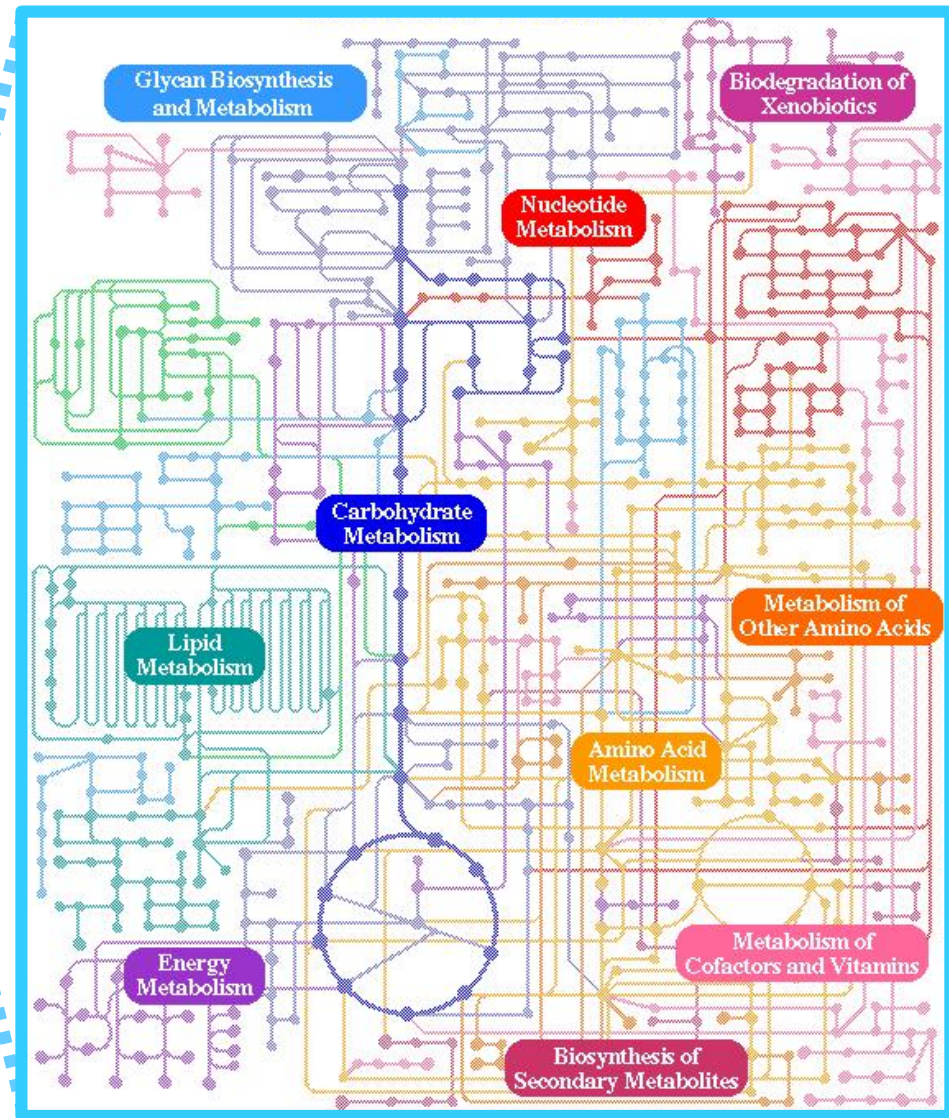
Lipidomics

Water-soluble

Lipid-soluble

Reference standards

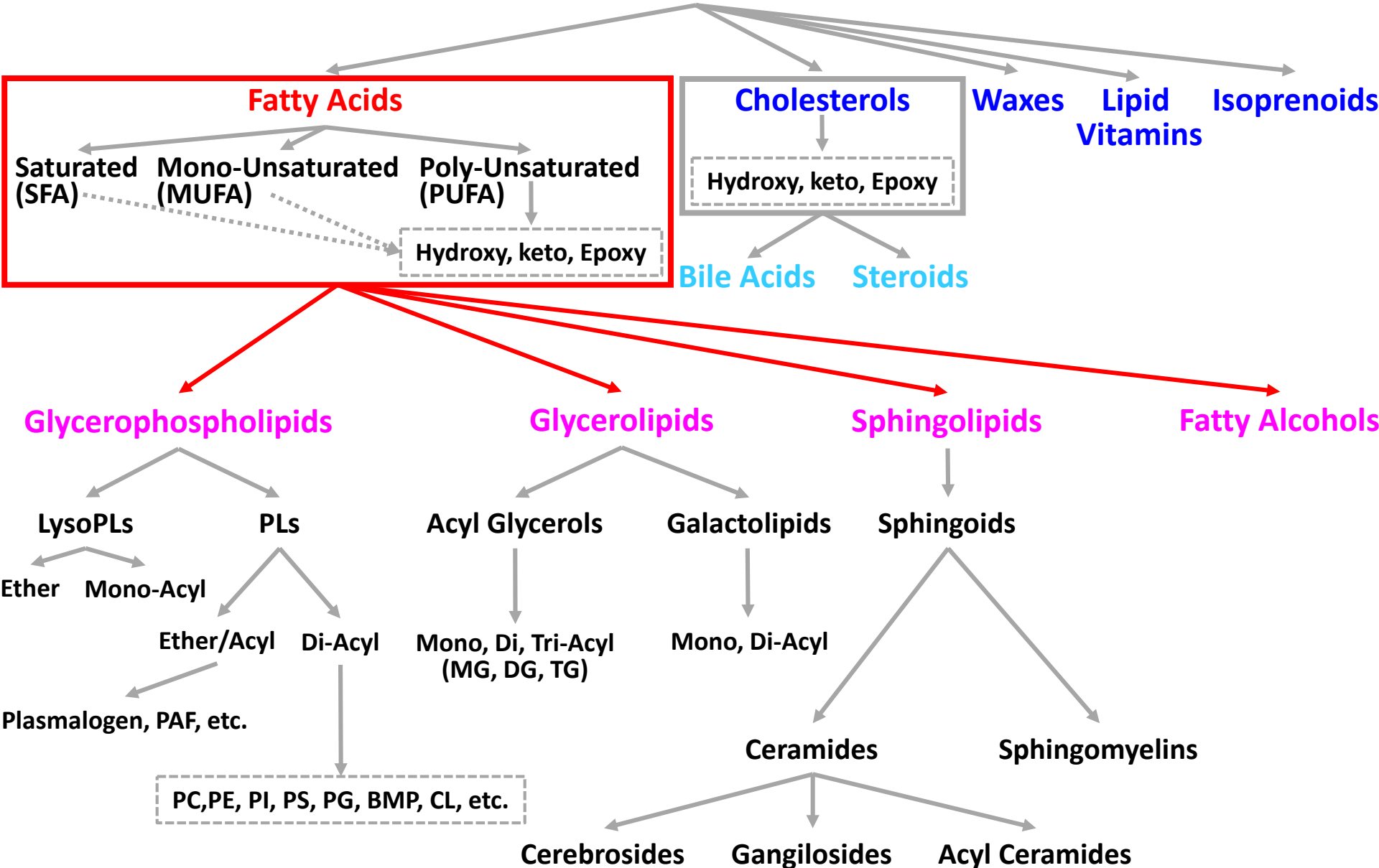
Standard library



KEGG pathway

脂質の分類

Lipids



臓器レベルでの脂質の多様性 (リン脂質レベル)

Lipids

Fatty Acids

Cholesterols

Waxes

Lipid Vitamins

Isoprenoids

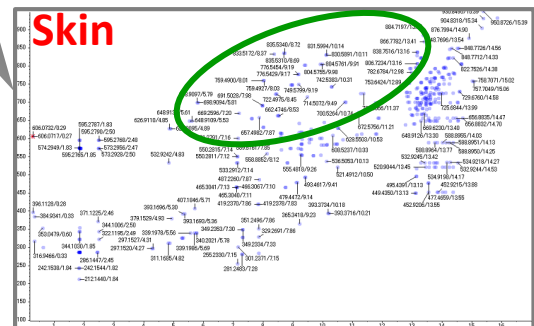
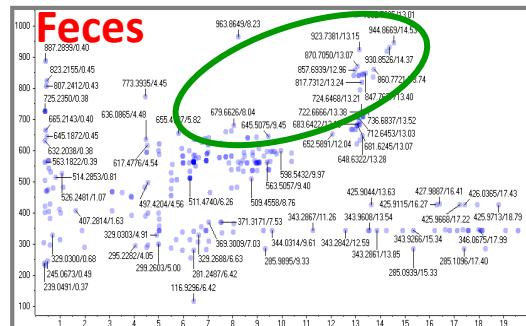
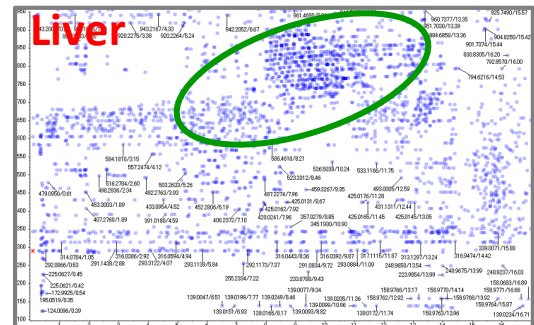
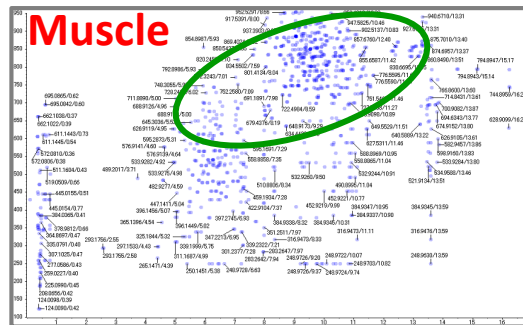
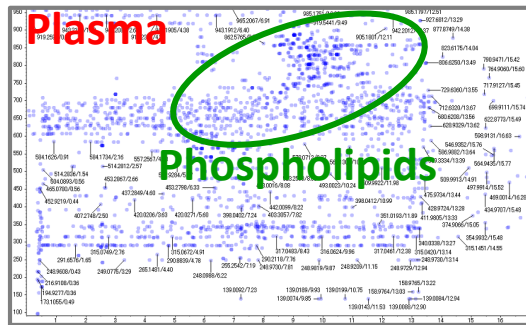
Saturated (SFA) Mono-Unsaturated (MUFA) Poly-Unsaturated (PUFA)

Hydroxy, keto, Epoxy

Hydroxy, keto, Epoxy

Bile Acids

Steroids

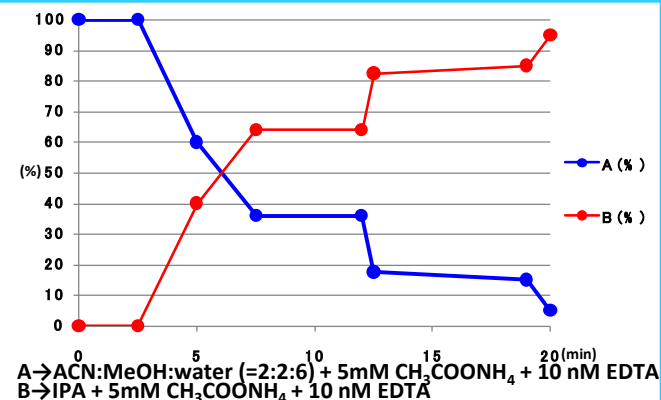
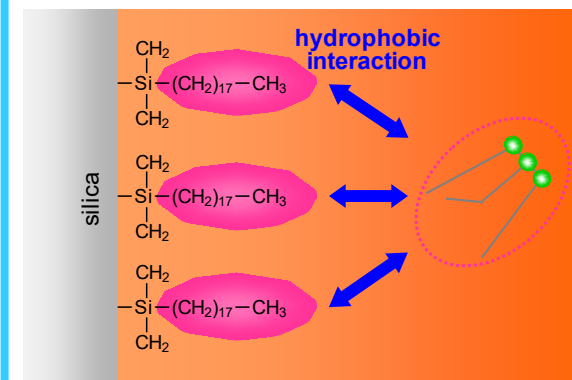


Lipid profiling

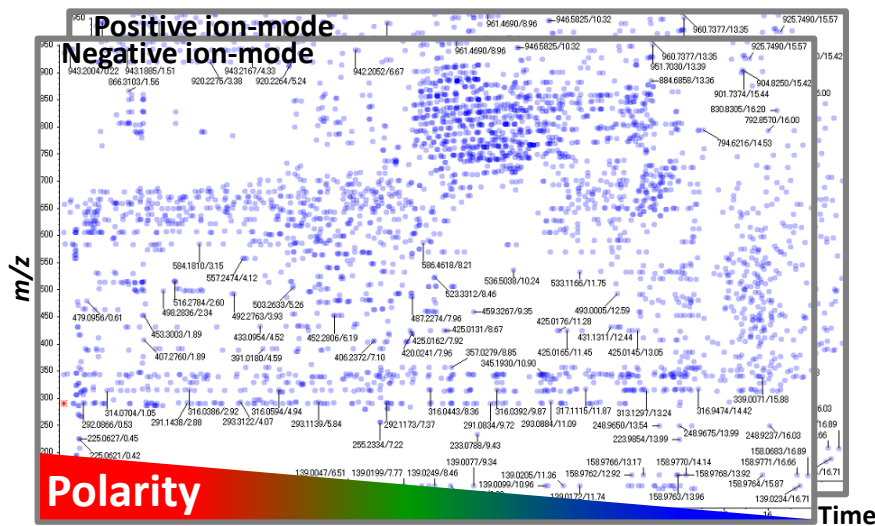


脂質の多様性を捉えるLC分離系

RPLC/QTOF-MS



(Ref) Ikeda K. Bioactive Lipid Mediators Part IV 25, 349–356, 2015



Phospholipid (each class)
Diglyceride
Ganglioside
Galactolipid
Globoside
MGDG, MGMG
DGDG, DGMG
SQDG, SQMG
Sterol, Steroid
Vitamine
etc.

CHCl_3 :MeOH:Water
(=1:2:0.2)

Total
320 μL

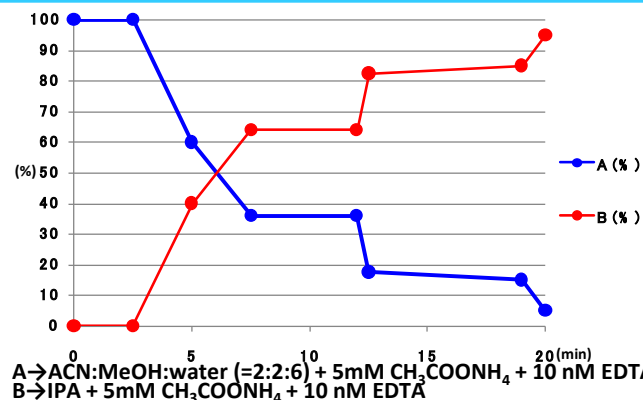
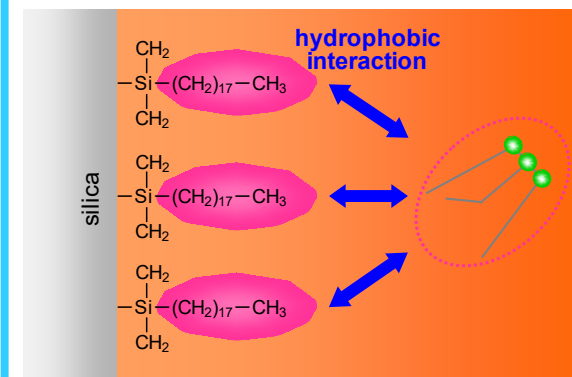
Triglyceride
Ceramide
Sphingomyelin
Sterol ester
Pigment
etc.

Fatty acid
Lysophospholipid
Monoglyceride
Acyl CoA
Acylcarnitine

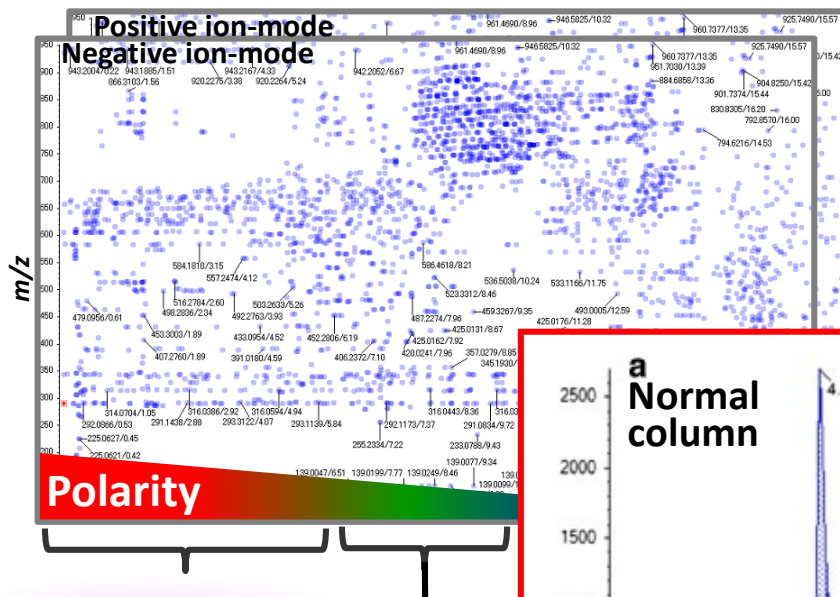
Eicosanoid
Docosanoid
Bile acid
Sphingosine
Sphingosine-1-P (S1P)
etc.

脂質代謝物とLCシステムとのマッチングを理解する重要性

RPLC/QTOF-MS



(Ref) Ikeda K. Bioactive Lipid Mediators Part IV 25, 349–356, 2015

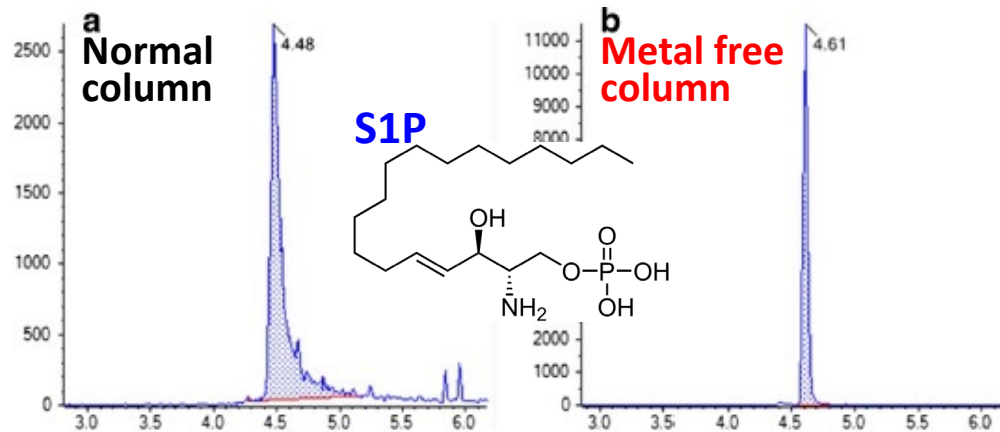


Phospholipid (each class)
Diglyceride
Ganglioside
Galactolipid
Globoside
MGDG, MGMG
DGDG, DGMG

Triglyceride
Ceramide

Fatty acid
Lysophospholipid
Monoglyceride
Acyl CoA
Acylcarnitine

Eicosanoid
Docosanoid
Bile acid
Sphingosine
Sphingosine-1-P (S1P)
etc.



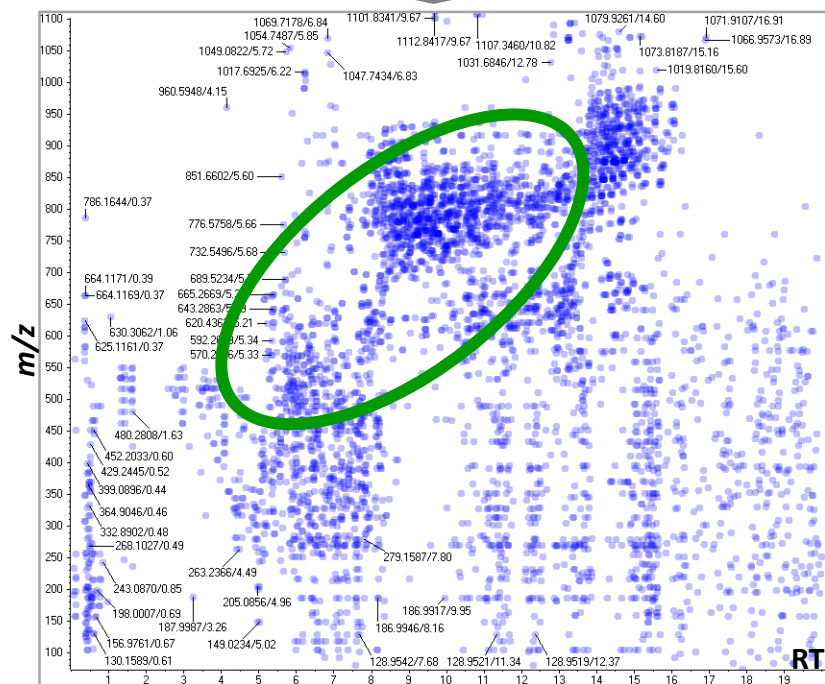
(Ref) Gowda B, Ikeda K, et al., Anal Bioanal Chem., In press, 2018

ハンターゲット解析とは？



ハンターゲット解析

探索分析(四重極飛行時間型)

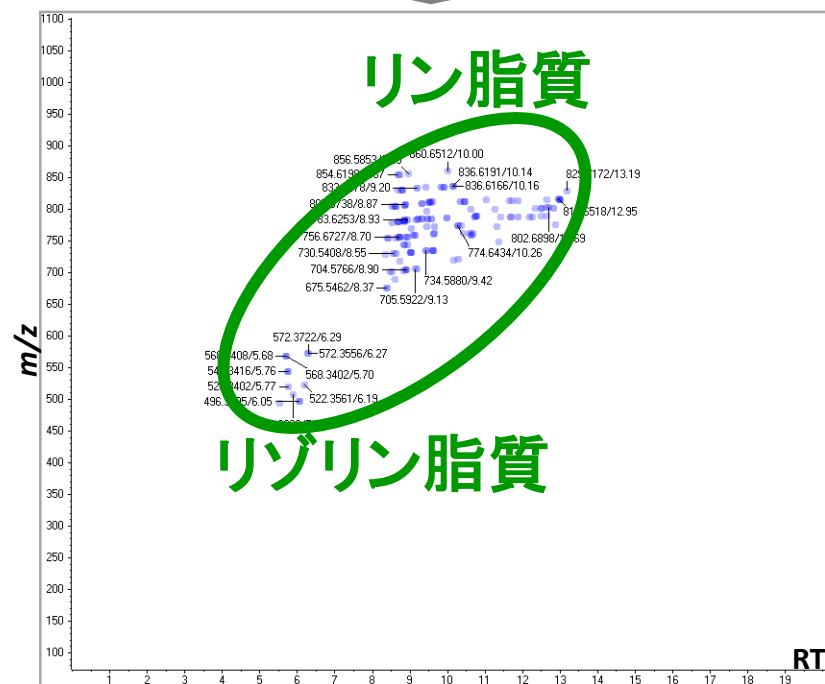


網羅性が高く再解析も可能 (解析技術難)
思いもよらない分子や代謝経路の発見



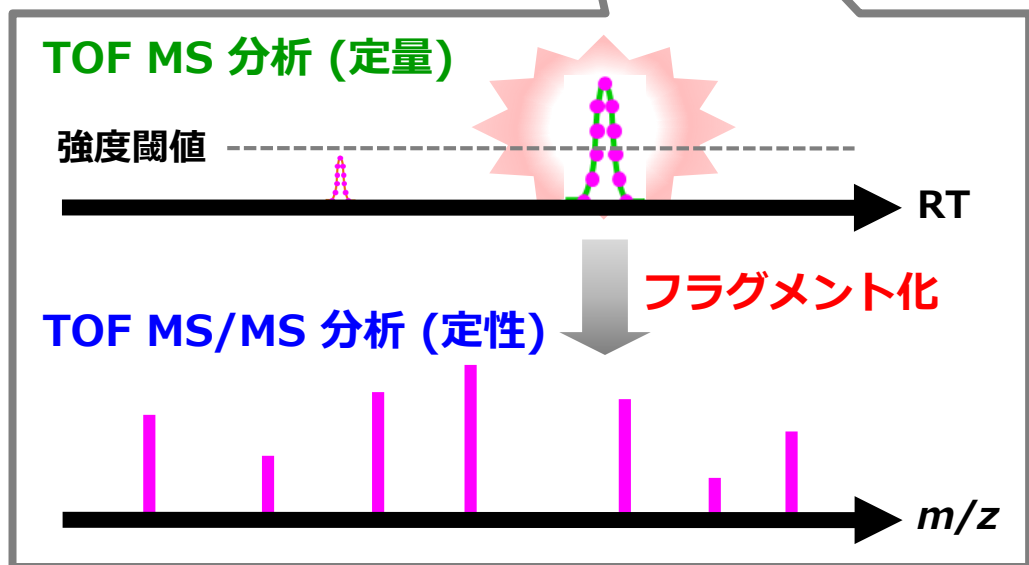
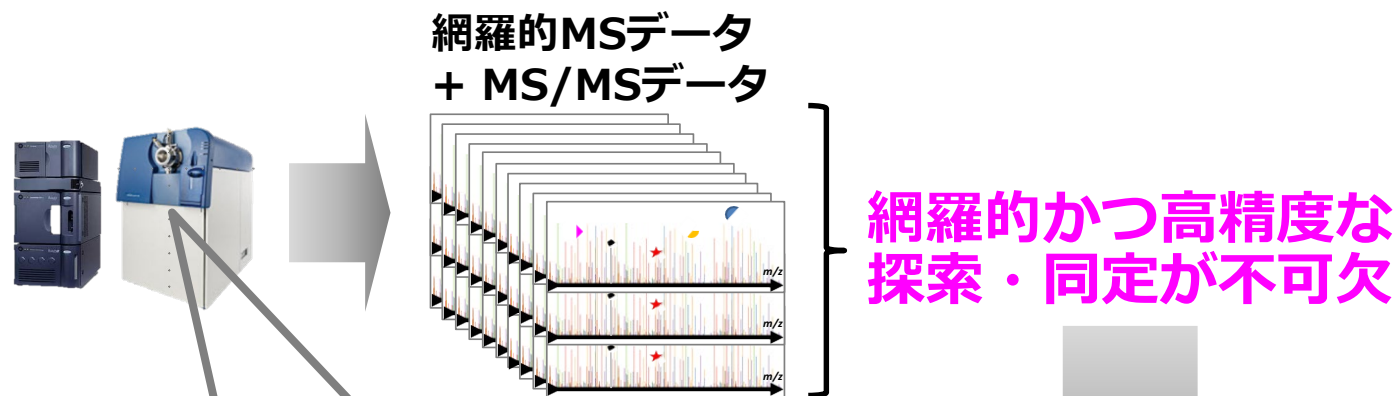
ターゲット解析(従来型)

定量分析(三連四重極型)



網羅性に乏しい
選択性・定量性が高い

探索範囲の広いノンターゲット解析システムの開発



Data Dependent Acquisition (DDA) モード測定

構造スクリーニング技術開発



Lipid discovery



Database

探索範囲の拡大

既存の脂質スクリーニング技術の問題点の改善

Lipidiscovey

5,000 MS/MS data

Step1

MSデータのクオリティーチェック

Step2

高精度MS/MS構造スクリーニング

実測ライブラリーベース



同定精度を高めるプログラム



Lipidiscovey



Database

高精度な同定結果を“抽出”
(構造同定アルゴリズムを満たした)

同定精度
(約90%※)

従来のソフトウェア

Step1

Step2

In silicoベース

スコアリング

同定条件の
設定が不十分

同定精度
が低い
(約50%※)

再検証

- ・LCの移動相組成・条件の違い
(アダクトイオンが変動)
- ・MS分析装置・条件の違い
(フラグメンテーションが変動)
- ・MS/MSスペクトルの解釈不足
(実測でIn silicoデータが非再現)

※正答率

Lipidiscovey による高精度な脂質同定の流れ

Lipidiscovey

5,000 MS/MS data

Step1

MSデータのクオリティーチェック

1,000 MS/MS data

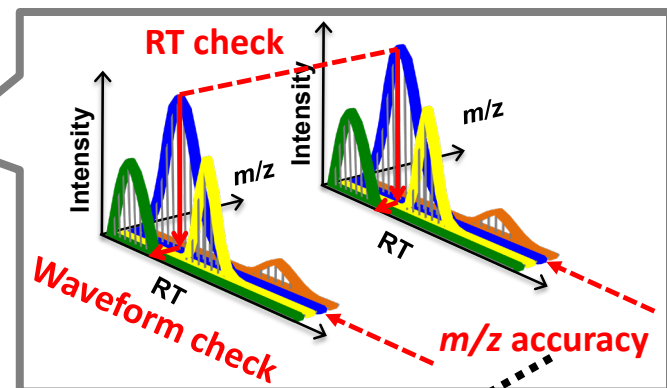
Step2

高精度MS/MS構造スクリーニング

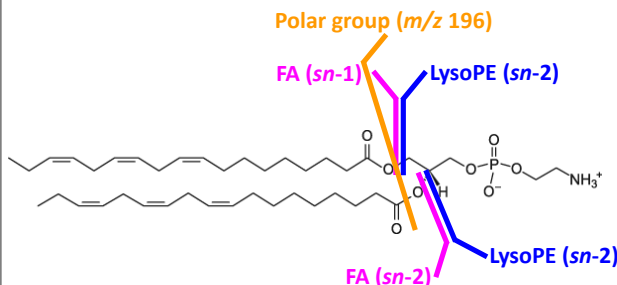
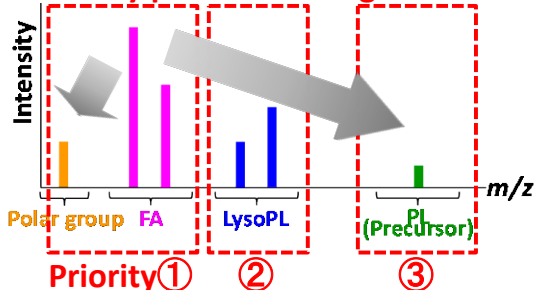
実測ライブラリーベース

同定精度を高めるプログラム

約6~7割
同定抽出



Intensity patterns of fragment ions



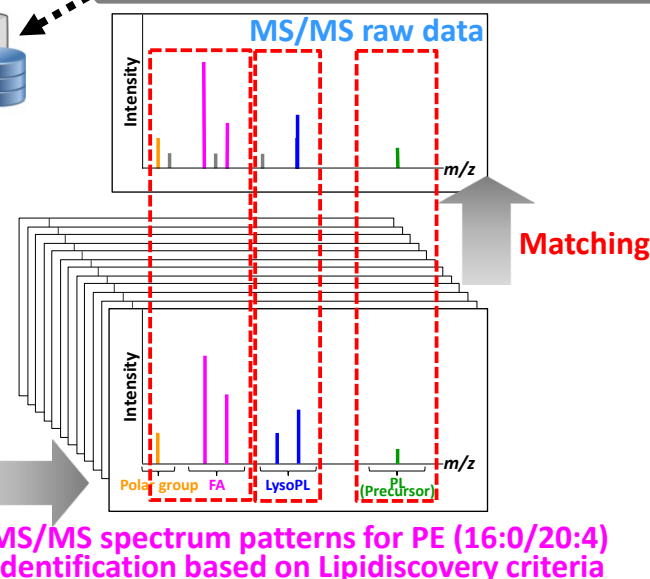
PE (36:4)

↓

1:0/35:4
1:1/35:3
1:2/35:2
1:3/35:1
1:4/35:0
2:0/34:4
⋮

16:0/20:4

Loop calculation



MS/MS spectrum patterns for PE (16:0/20:4)
identification based on Lipidiscovey criteria

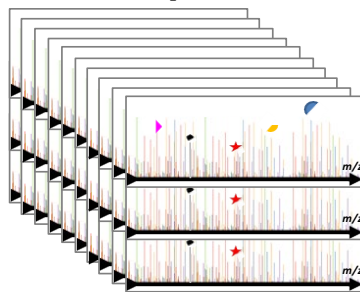
数多くの実測データから同定ルール普遍化
→プログラミング化して高精度な自動同定

探索範囲の広いノンターゲット解析

脂質抽出



一斉MS/MS解析



構造スクリーニング技術

LipidDiscovery

Database

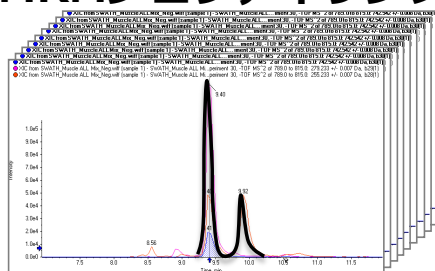


マルチリピドミクス

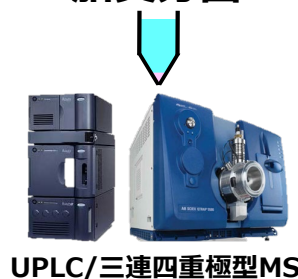
探索範囲の拡大

データの質の向上

MRMプロファイリング



脂質分画



網羅的な探索・同定

| Q1 | Q3 | R.T | |
|----------|----------|------|---------------|
| 804.5760 | 255.2330 | 9.72 | PC(16:0/18:1) |
| 804.5760 | 281.2486 | 9.72 | PC(16:0/18:1) |
| 804.5760 | 744.5576 | 9.72 | PC(16:0/18:1) |

選択性や定量性の高いターゲット解析

新規の脂質代謝物の構造同定に向けた新技術

