

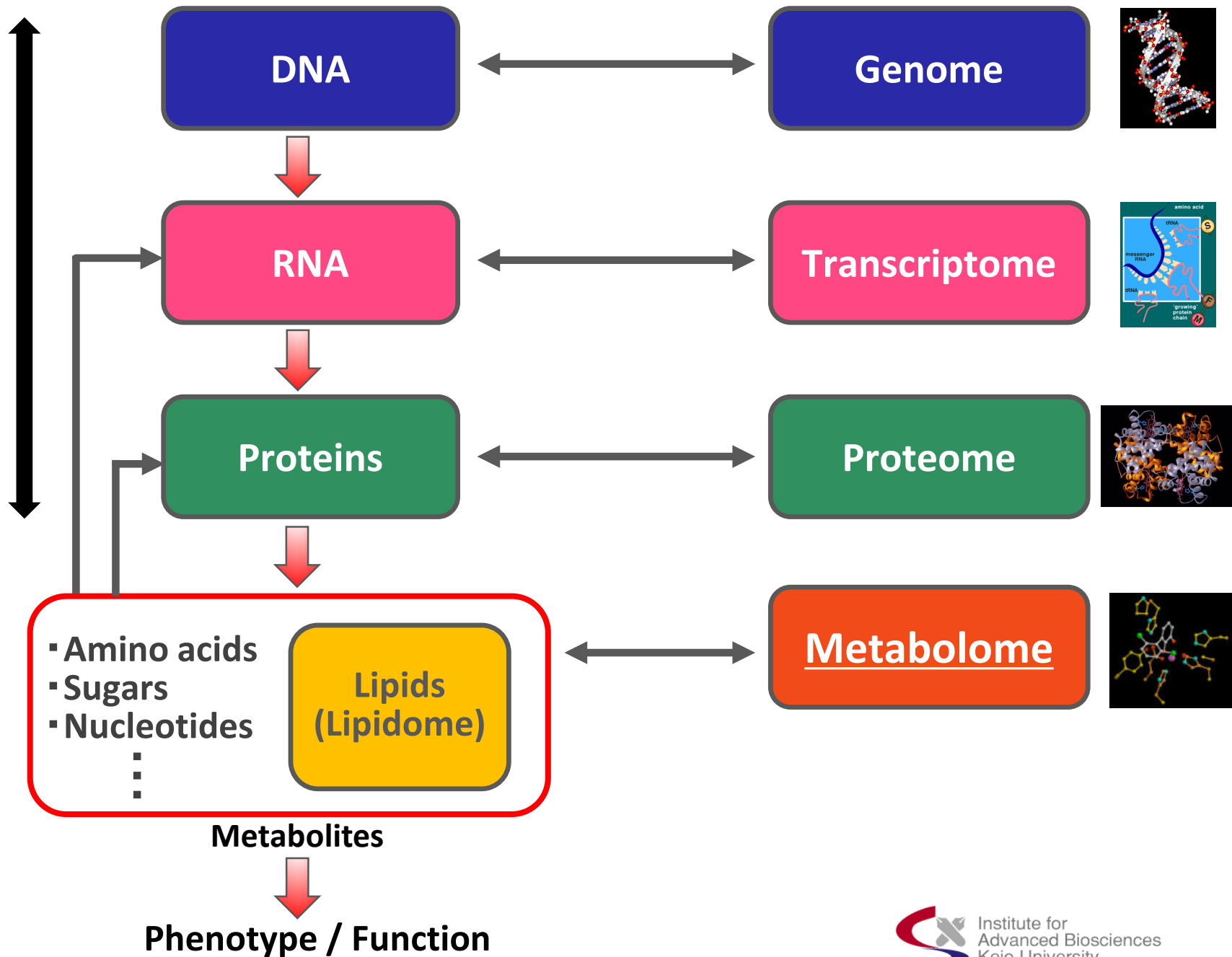
イオンモビリティ、SWATHを用いた メタボロミクス

平山 明由

(慶應義塾大学 先端生命科学研究所)

2018年8月9日

SCIEX 御殿山キャンパス－アカデミア・エキスパートフォーラム



メタボロームとは?

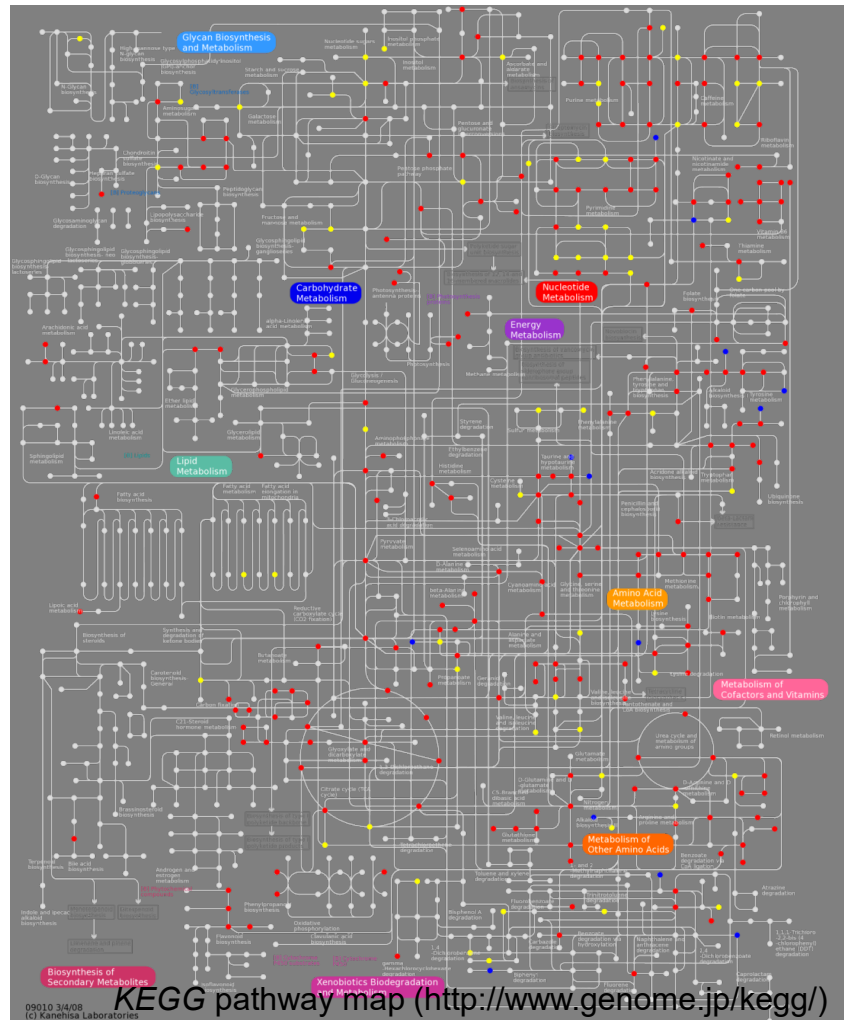
メタボロームとは、生体試料(血液、尿、細胞など)に含まれる、分子量1,500 以下の低分子化合物の総称であり、これらを測定・解析する学問分野を**メタボロミクス**(メタボローム解析)と呼んでいる。

代謝物の種類

- ・アミノ酸
- ・有機酸
- ・糖
- ・脂質
- ・etc...

代謝物の数

- ・微生物 ; 800~1,600
- ・植物 ; 20,000~100,000
- ・ヒト ; 10,000?



本日のトピックス

① イオンクロマトグラフィーー質量分析法(IC-MS)を用いた陰イオン性代謝物の分析

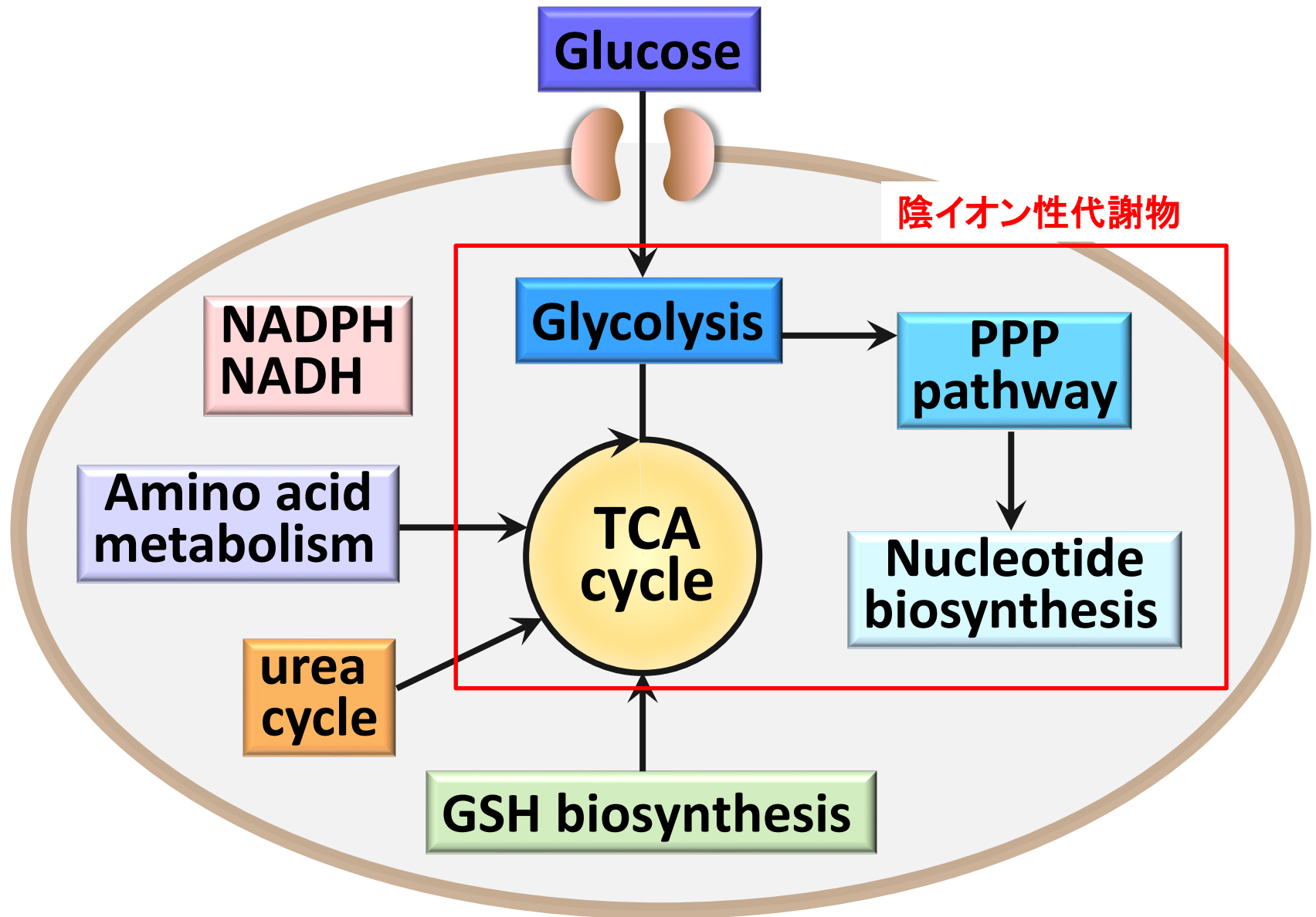
✓ SelexIONを用いた構造異性体の分離

② ジペプチドー斉分析法(ジペプチドーム)の開発

✓ SWATH

✓ SelexION

中心代謝経路



LC-MSを用いた高極性化合物分析

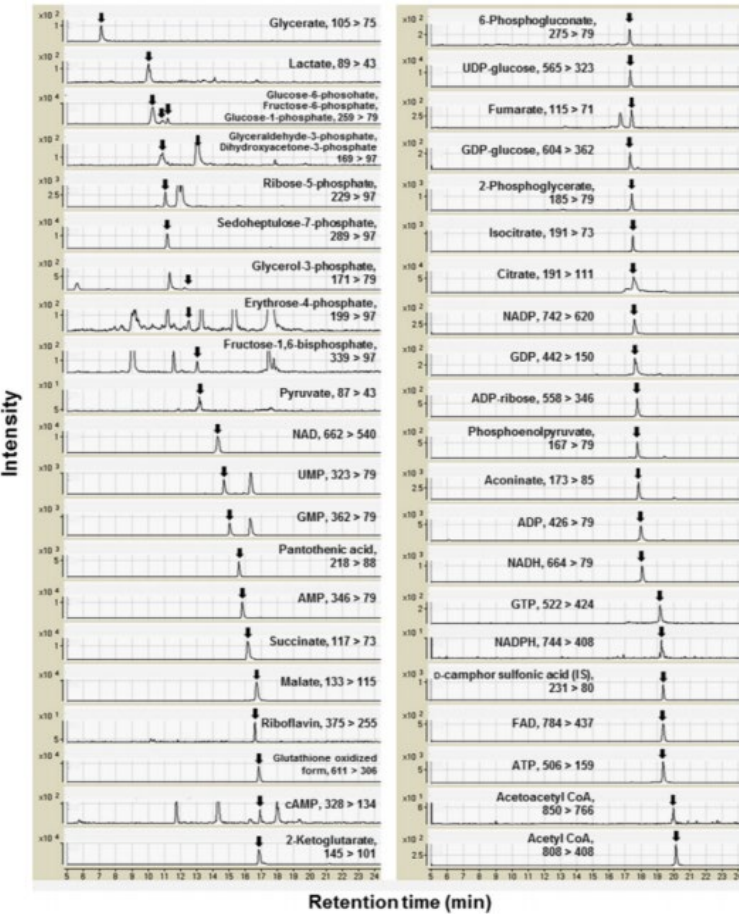
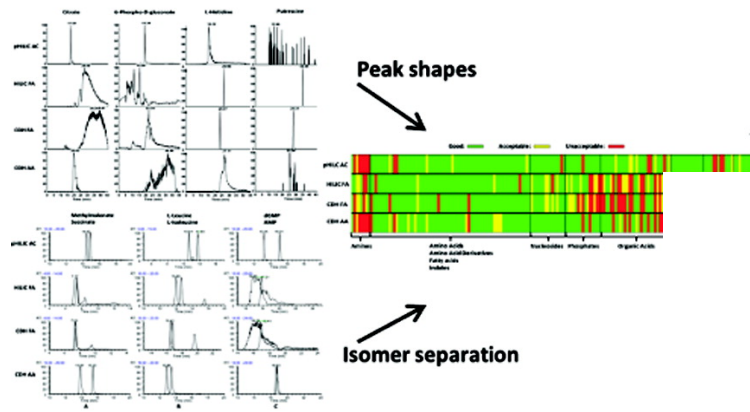


FIG. 3. Multiple reaction monitoring chromatograms of anionic metabolites in the xylose-fermenting recombinant yeast. Yeast cells (YPH499XU) were collected by using the cold methanol method at 24 h after the xylose fermentation start, from which metabolites extracted by using the chloroform-methanol-water method. Arrows indicate retention times of each target metabolite.

HILICカラムを用いた分析

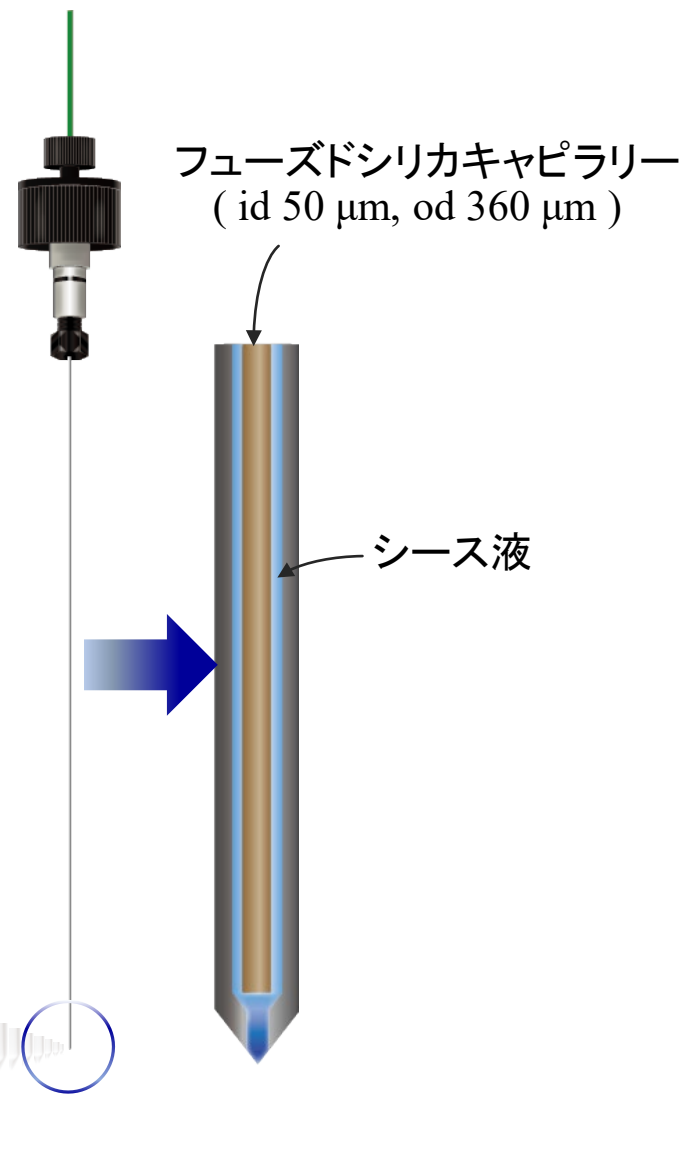
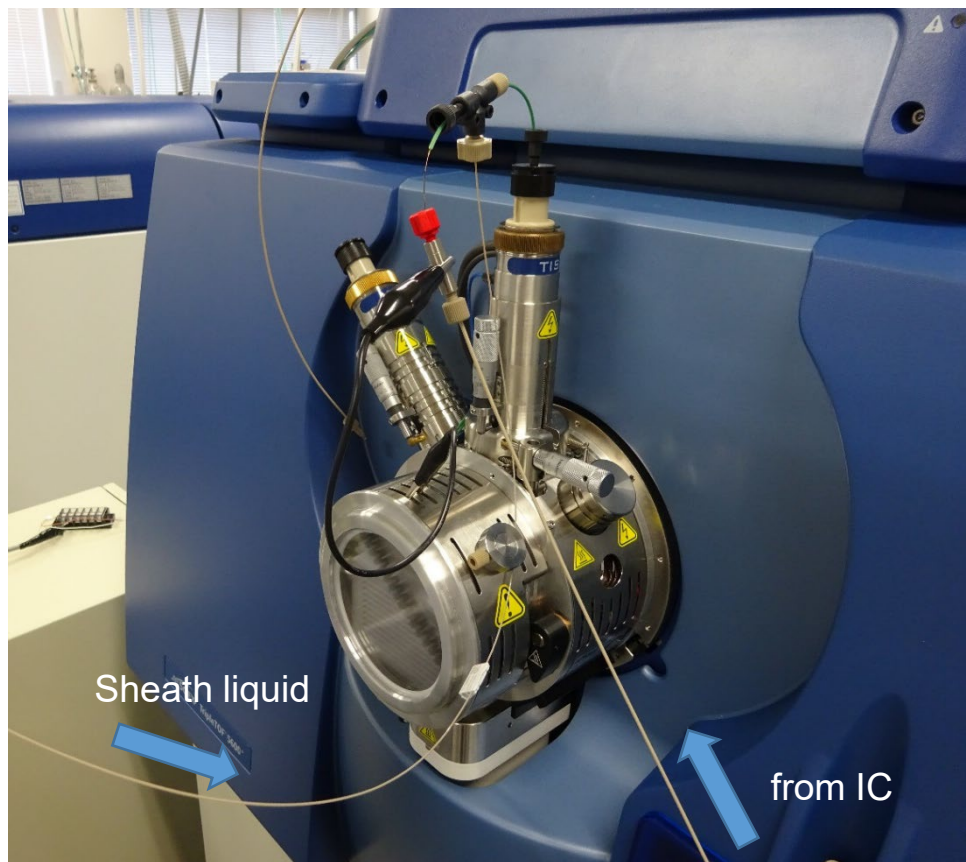
(Zhang et al., *Anal Chem*, 2012)

Ion-pair試薬を用いた分析

(Kato et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2012)

Capillary IC-MS system (Dionex ICS-5000+ and SCIEX Triple TOF 5600)



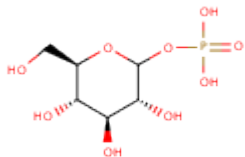


SCIEX CE/MS用スプレー
先端径 125 μm (ABSciex Parts No.1005976)

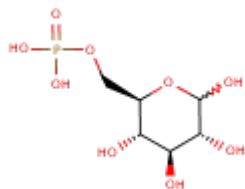
検討に用いたキャピラリーカラム

カラム	基材	基材直径	官能基	イオン交換容量 ($\mu\text{eq}/\text{column}$)	疎水性
AS11-HC-4 μm (0.4 \times 250 mm)	ジビニルベンゼン / ポリビニルベンゼン アンモニウム共重合体	4 μm	4級アルカノールアミン類、 ペリキュラー型イオン交換樹脂	2.9	中(低め)
AS19-4 μm (0.4 \times 250 mm)	ジビニルベンゼン / ポリビニルベンゼン アンモニウム共重合体	4 μm	4級アルカノールアミン類、グラフト型イオン交換樹脂	2.4	超低
AS20 (0.4 \times 250 mm)	ジビニルベンゼン / ポリビニルベンゼン アンモニウム共重合体	7.5 μm	4級アルカノールアミン類、グラフト型イオン交換樹脂	3.1	超低

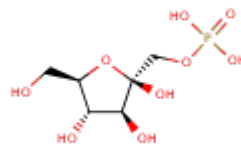
糖リン酸の分離



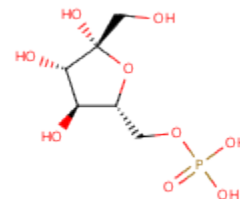
Glucose 1-phosphate
(G1P)



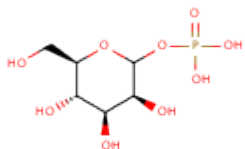
Glucose 6-phosphate
(G6P)



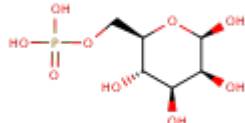
Fructose 1-phosphate
(F1P)



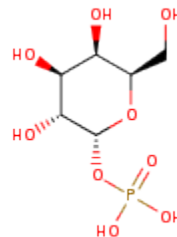
Fructose 6-phosphate
(F6P)



Mannose 1-phosphate
(M1P)



Mannose 6-phosphate
(M6P)



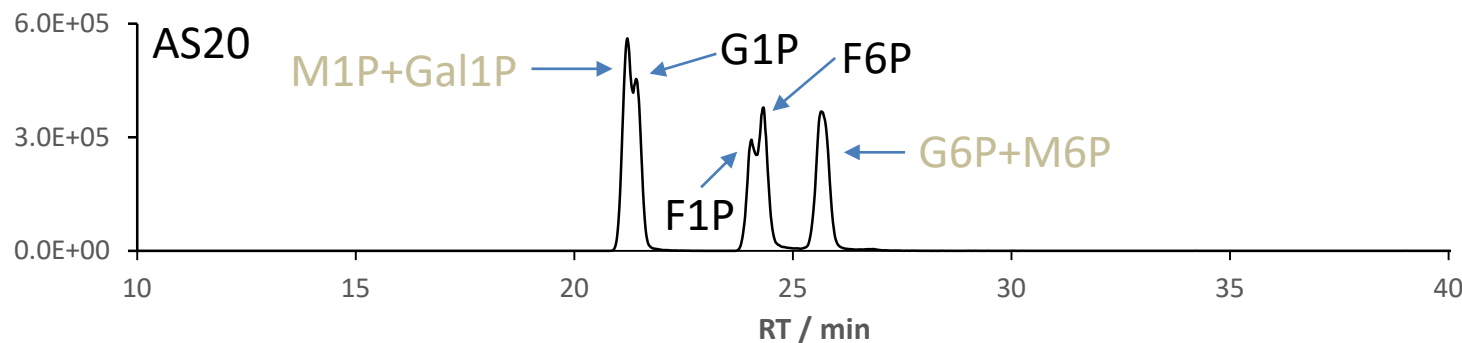
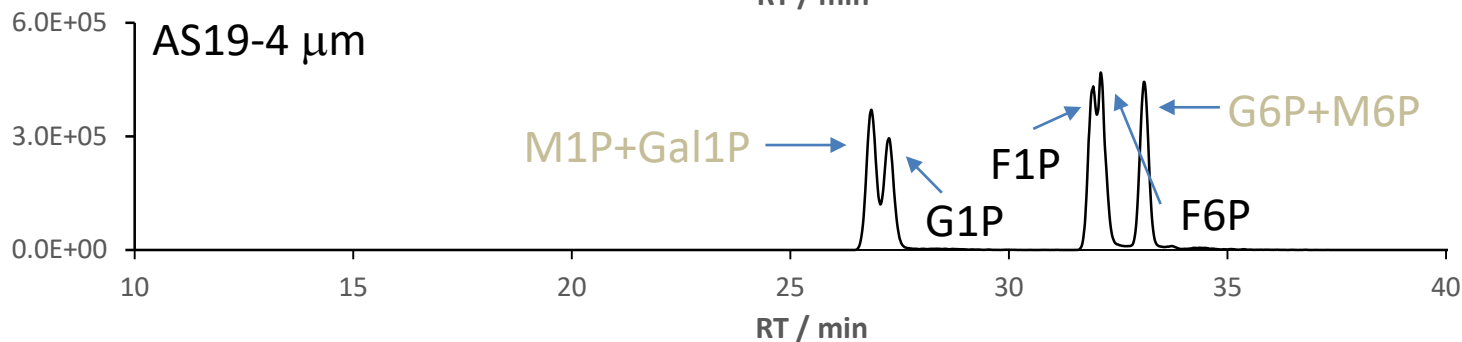
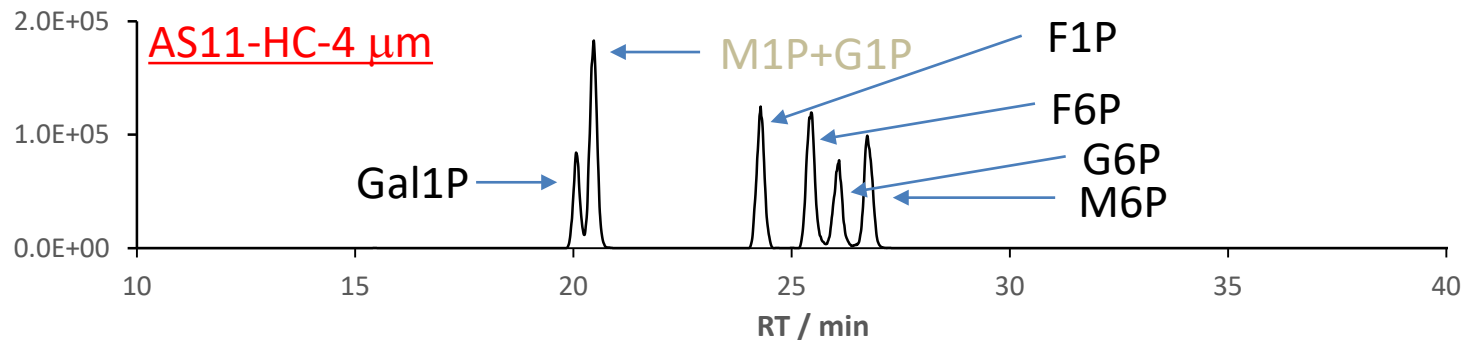
Galactose 1-phosphate
(Gal1P)

これらは全て $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$

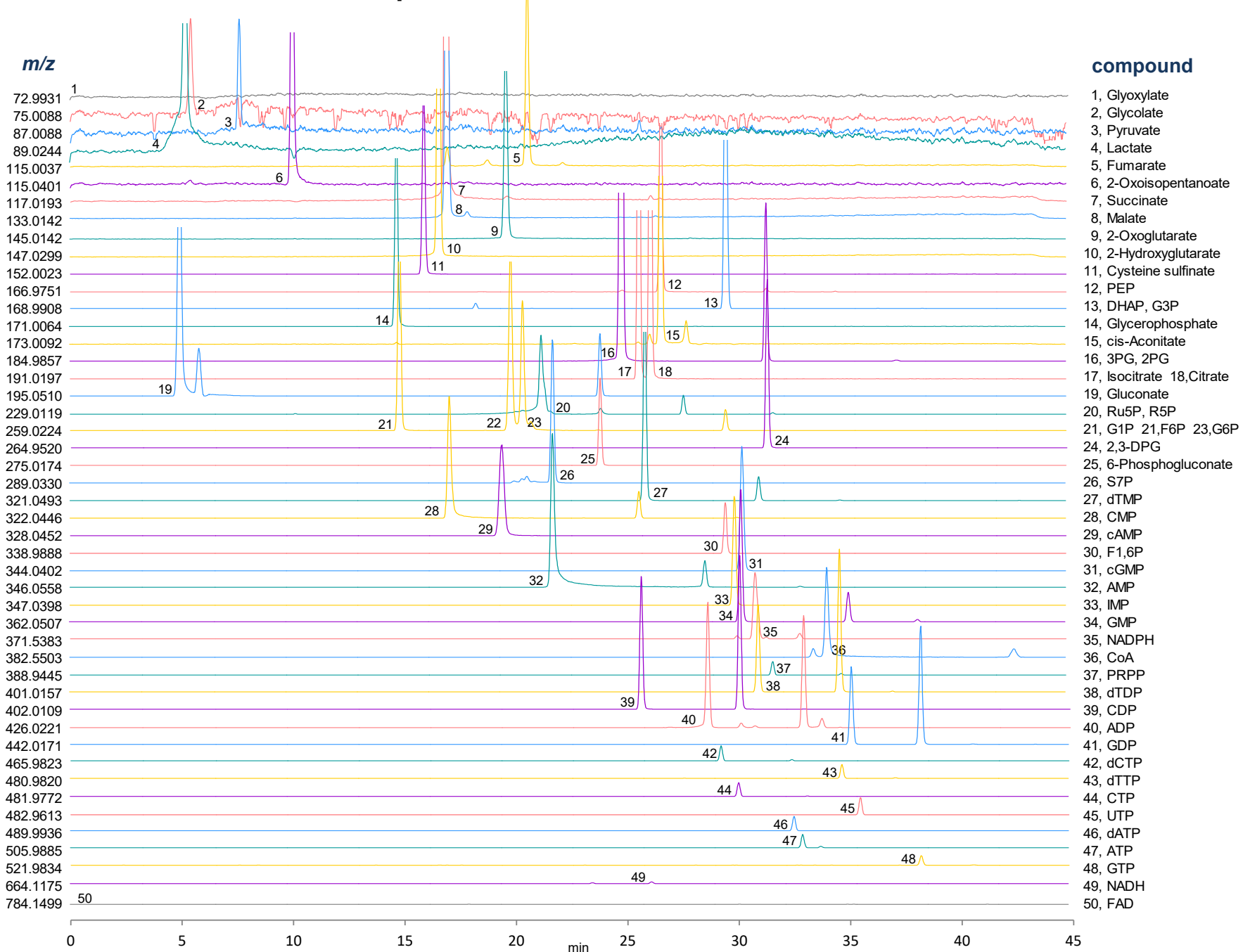


MS単独では分離できない！

異なるカラムによる糖リン酸の分離



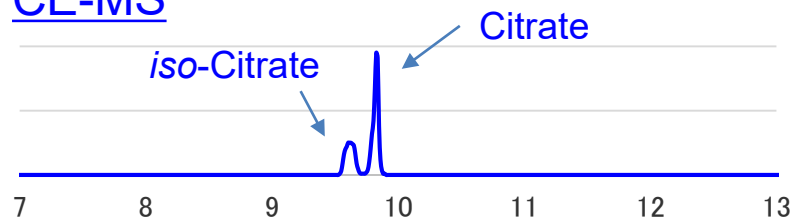
陰イオン性代謝物質(1 μmol/l)の測定結果



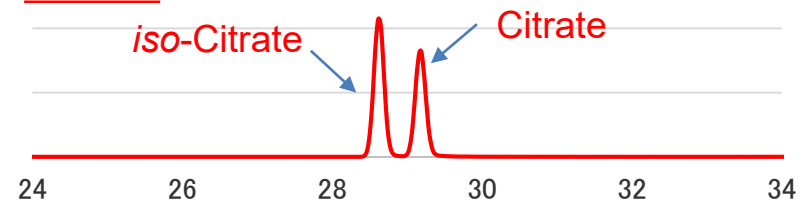
CE-MSとの分離比較

Citrate, *iso*-Citrate

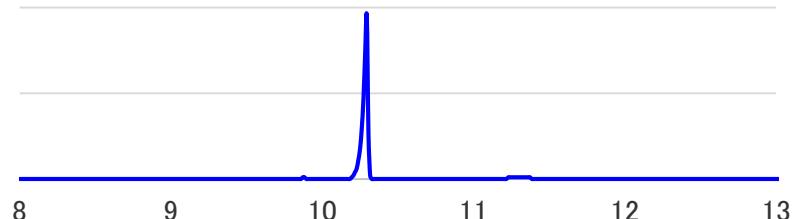
CE-MS



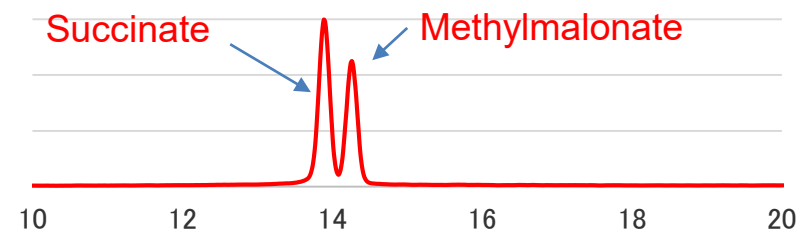
IC-MS



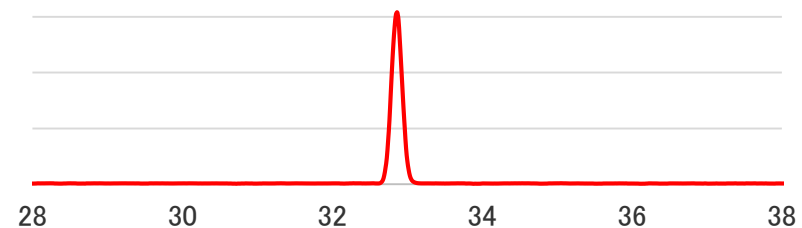
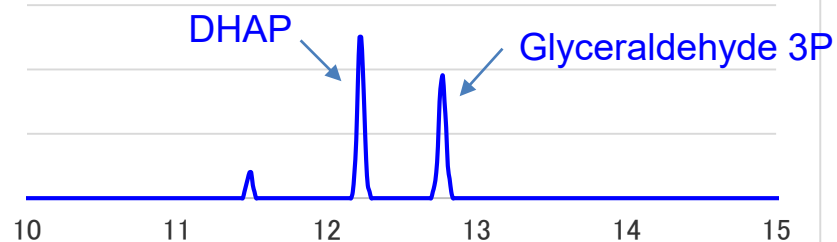
Succinate, Methylmalonate



Succinate Methylmalonate



DHAP, Glyceraldehyde 3P



種々の生体サンプルにおける糖リン酸の分離

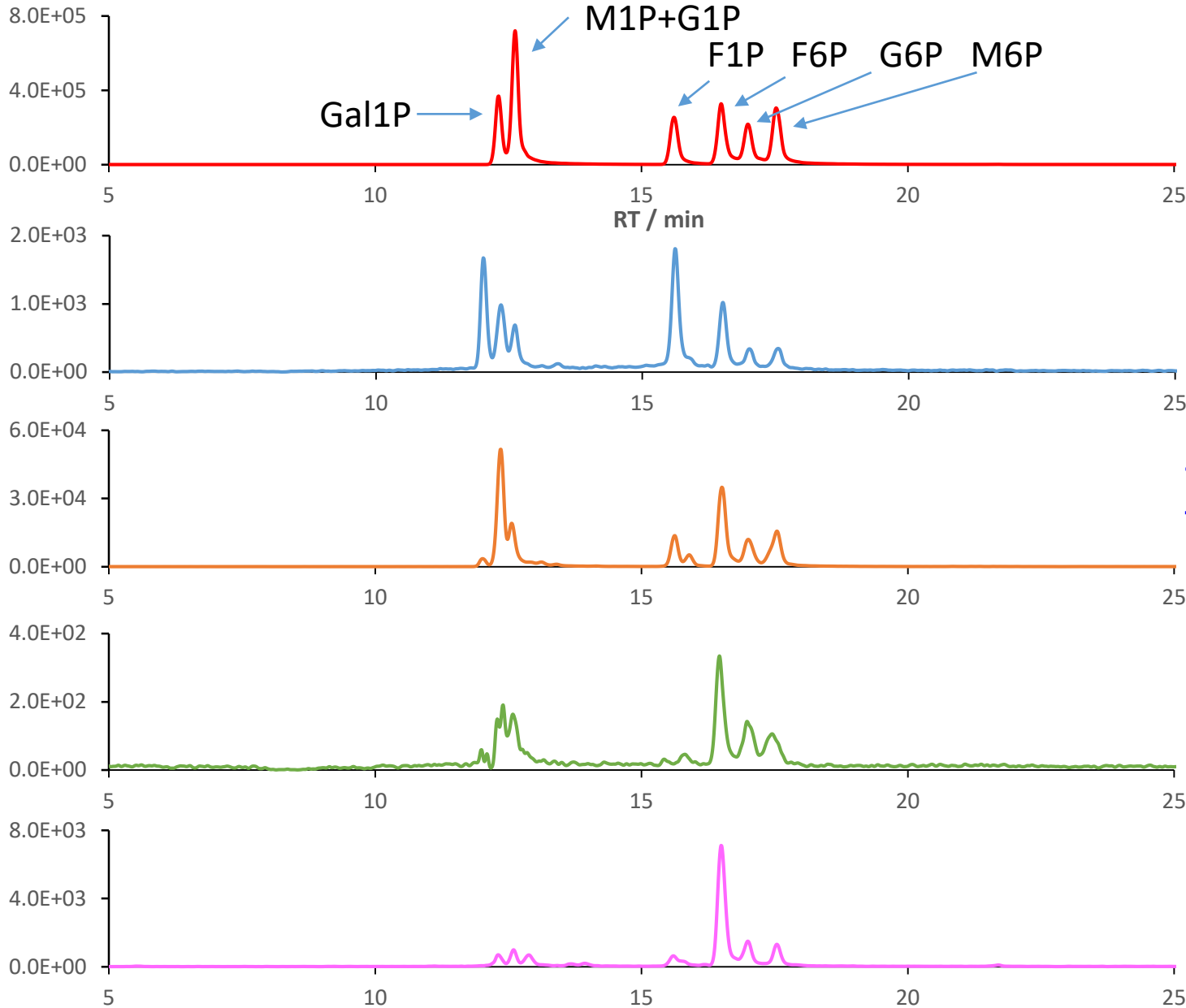
STD (100 μ M)

Cultured cell

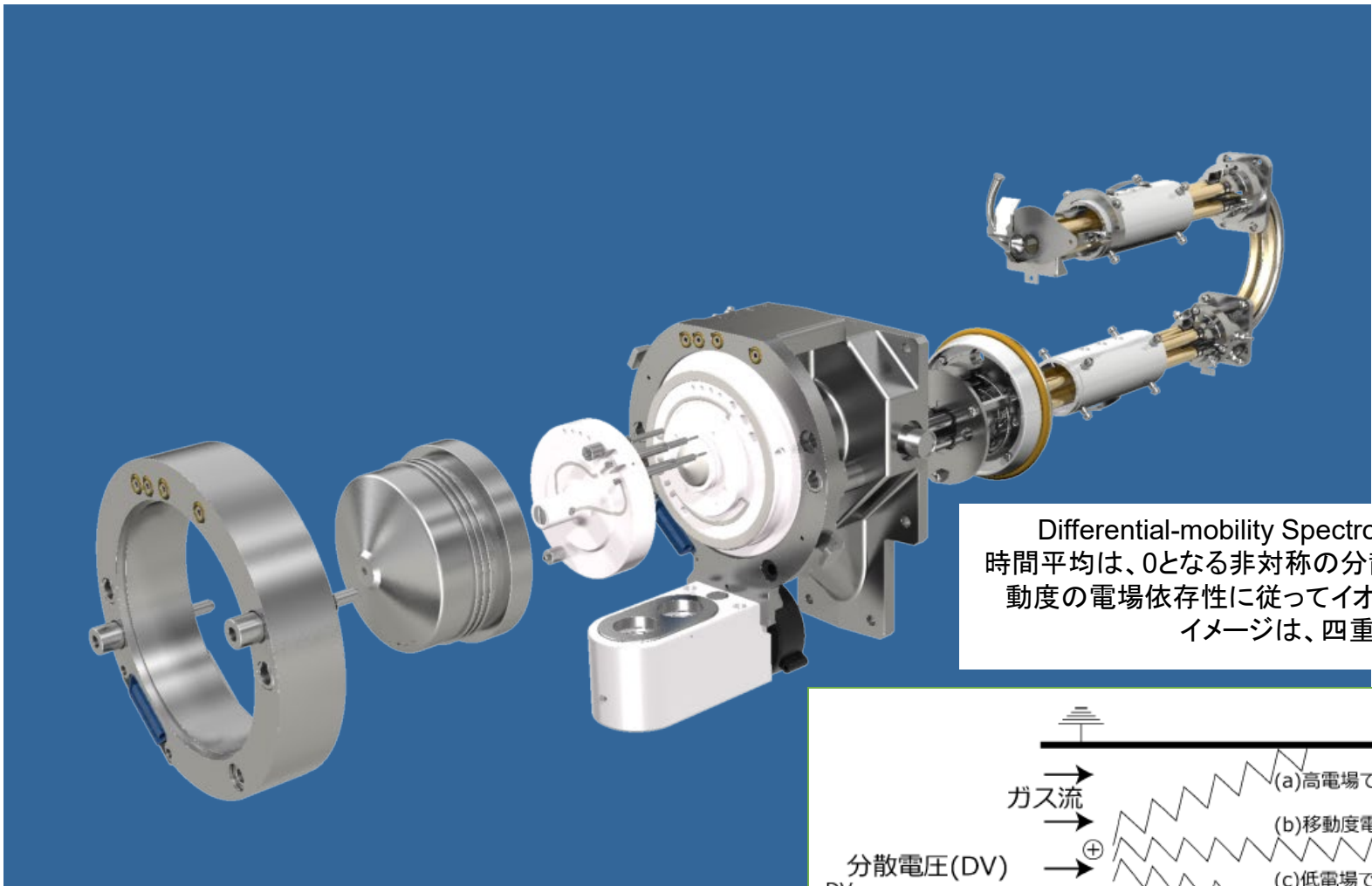
Tissue (liver)

Serum

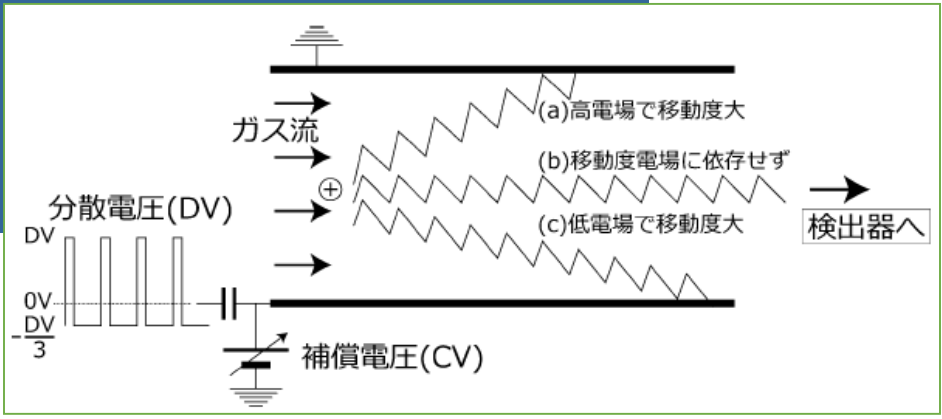
Feces



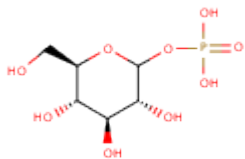
SelexIonを用いた構造異性体の分離



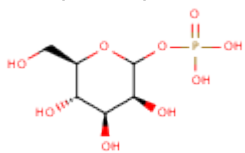
Differential-mobility Spectrometry (DMS)
時間平均は、0となる非対称の分散電圧を印加し、移動度の電場依存性に従ってイオンが分離される。
イメージは、四重極



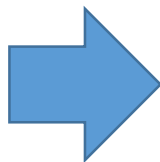
SelexIONを用いた構造異性体の分離



Glucose 1-phosphate
(G1P)



Mannose 1-phosphate
(M1P)



DMS Temperature: Low

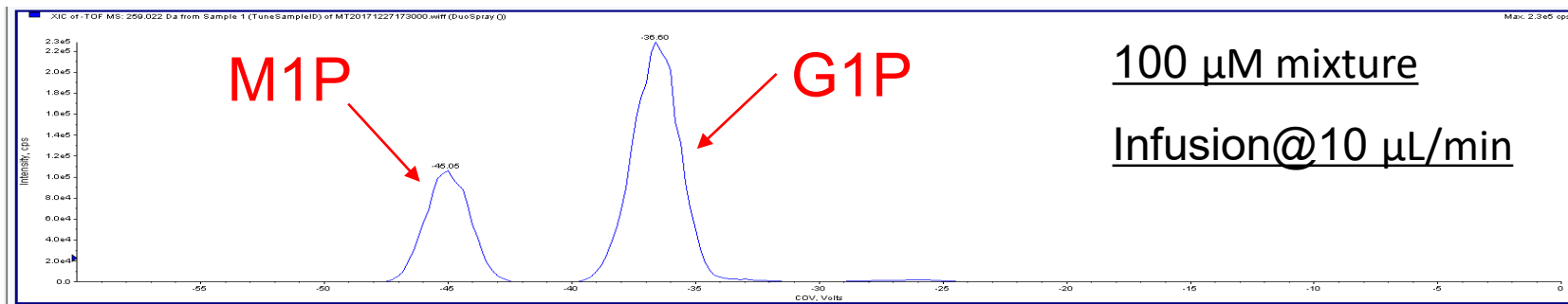
Modifier: 2-Propanol

Modifier Composition: Low

Separation voltage: 3500

DMS Resolution enhancement: Off

最適化したSelexION条件



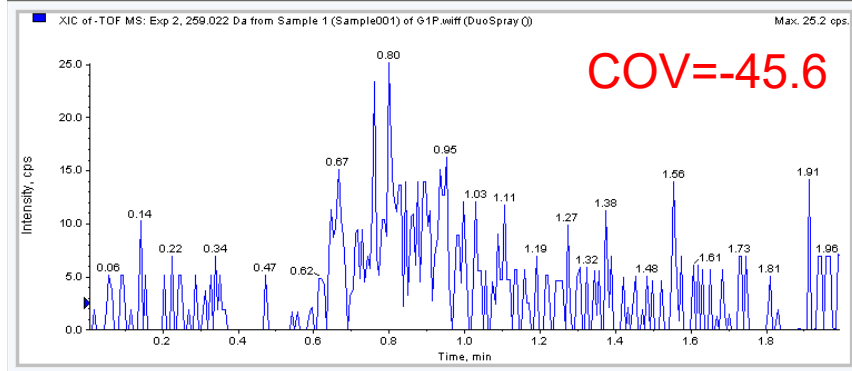
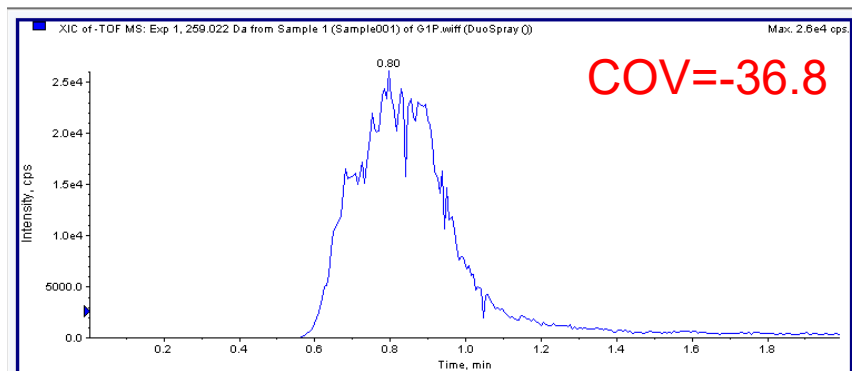
M1PとG1Pの分離がCOV(compensation voltage)の違いによって達成可能

SelexIonを用いた構造異性体の分離

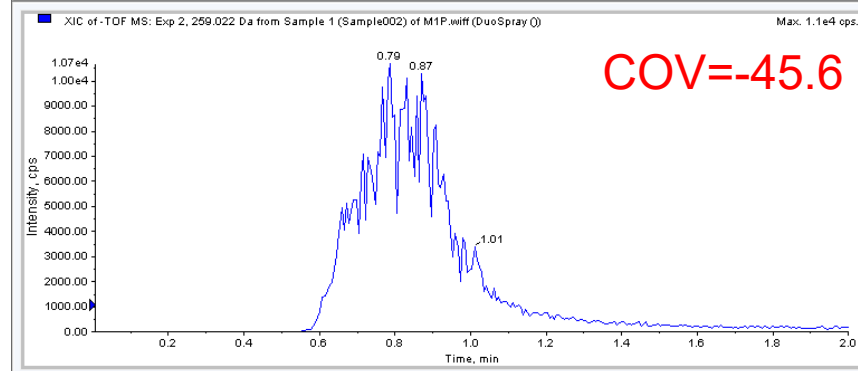
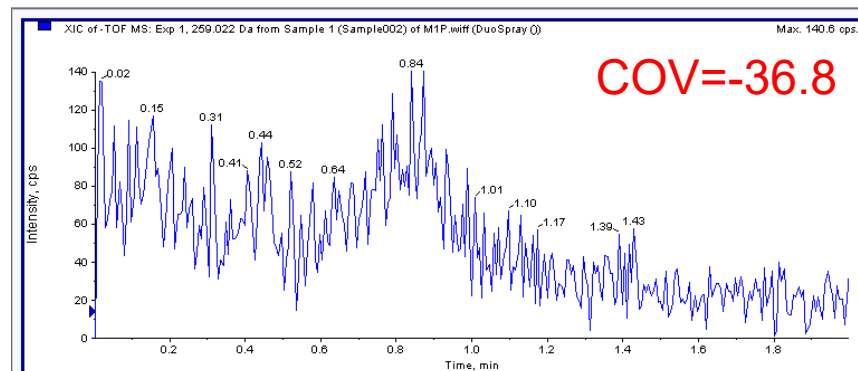
Capillary ICのカラムを外した状態でフローインジェクション分析

COVを0.2ずつ変化させて最適化を行った。

G1P



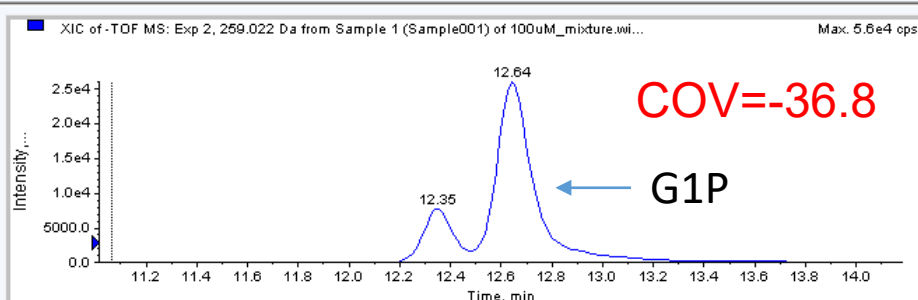
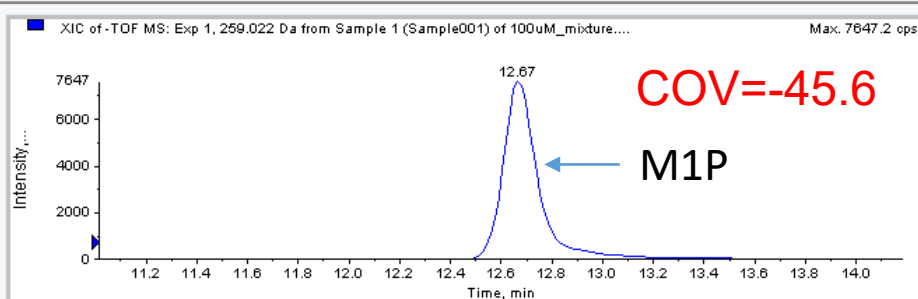
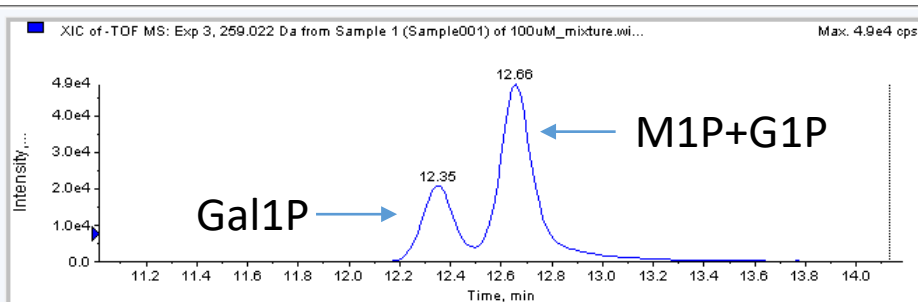
M1P



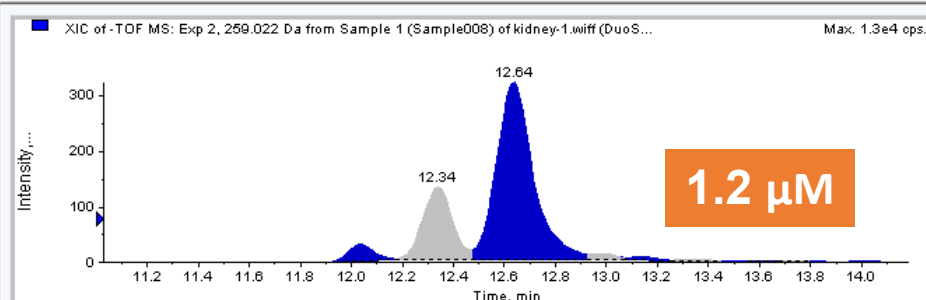
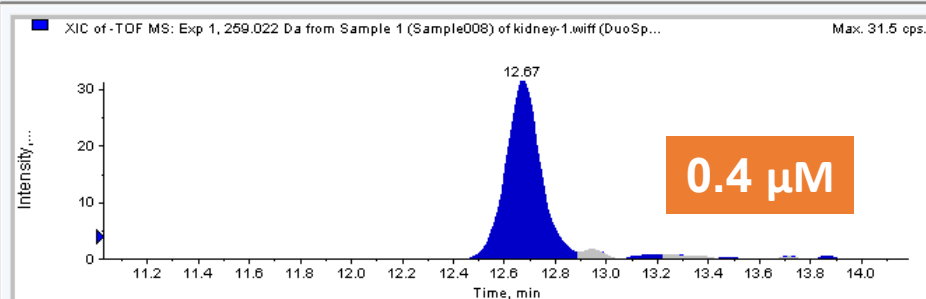
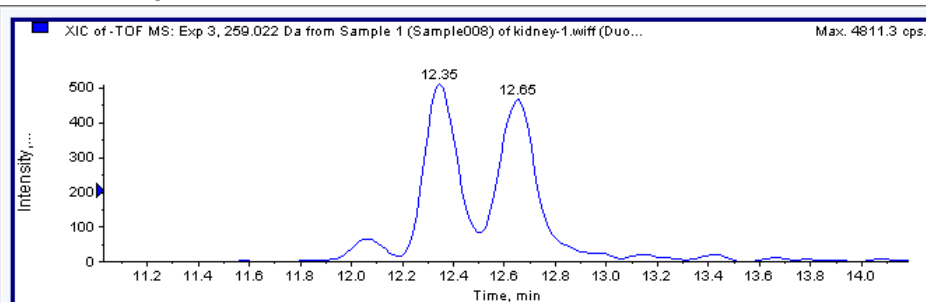
各々が特有のCOVで特異的に検出できていることを確認

Selexlonを用いた腎組織中糖リン酸異性体の測定

STD (100 μ M)



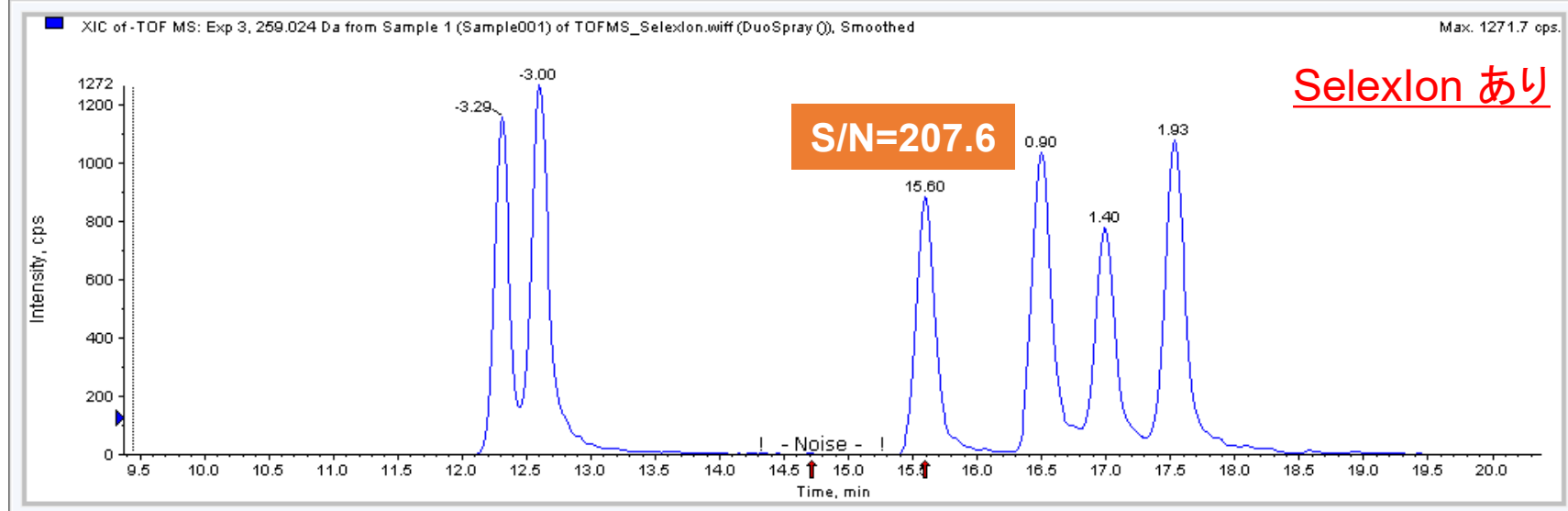
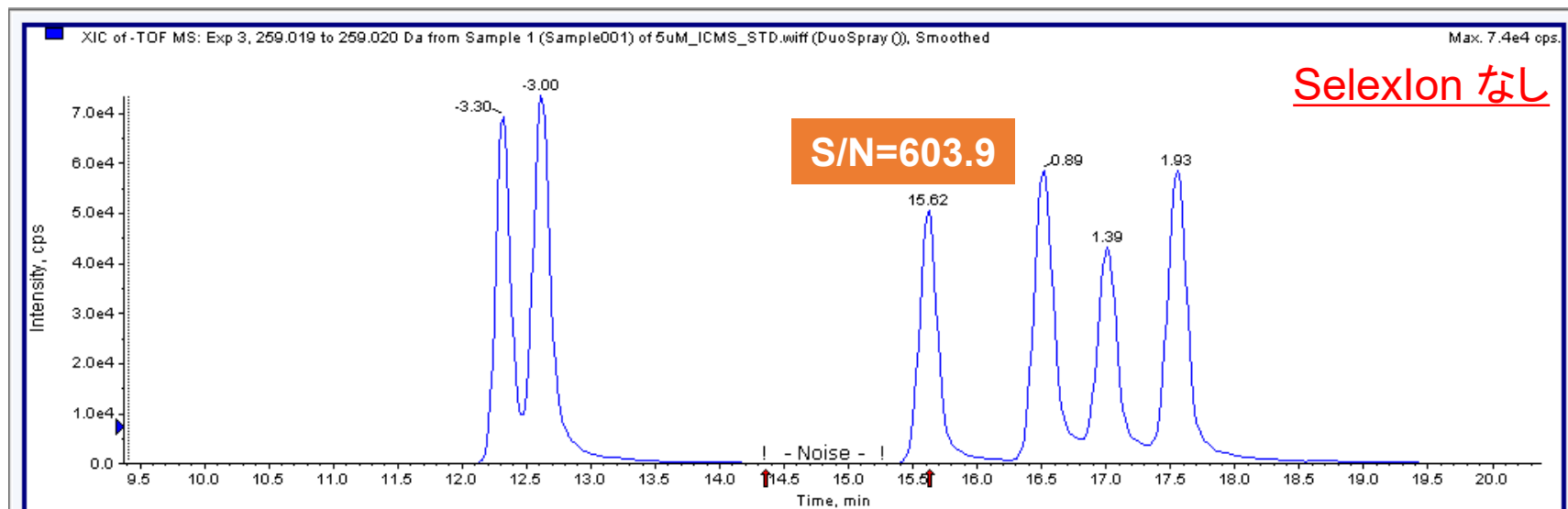
Kidney tissue



従来の測定では、測定したサンプル中にG1PもしくはM1Pが含まれていることは分かっていたが、その存在量、存在比については不明であった。

今回、Selexlonを用いることによって、それぞれの代謝物の存在比まで明らかにすることができた。

Selexlon 接続による感度低下



ピーク高さは1/50程度まで減少するが、S/Nの減少は1/3程度でおさまっている。

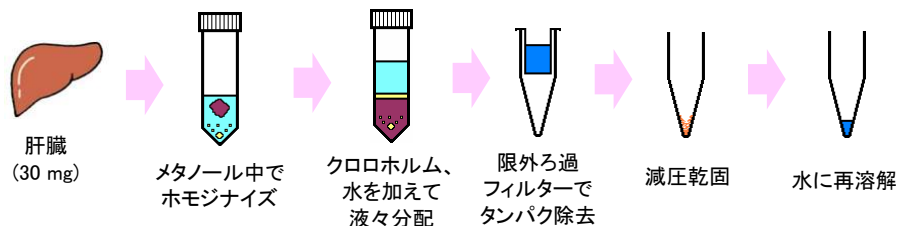
Selexlon 接続による感度低下

Compound	m/z	RT	S/N		減少率(有/無)
			Selexlon無	Selexlon有	
Malate	133.0142	14.43	1046.7	294.9	28%
iso-Citrate	191.0197	23.48	2123.1	1662.6	78%
2,3-DPG	264.9520	28.92	4324	1182.7	27%
CMP	322.0446	14.43	343.9	202.8	59%
ADP	426.0221	25.99	1355.4	870.5	64%

Selexlonを取り付けたことによる感度低下は、最大でも1/4程度

Product ion scan測定における定量性

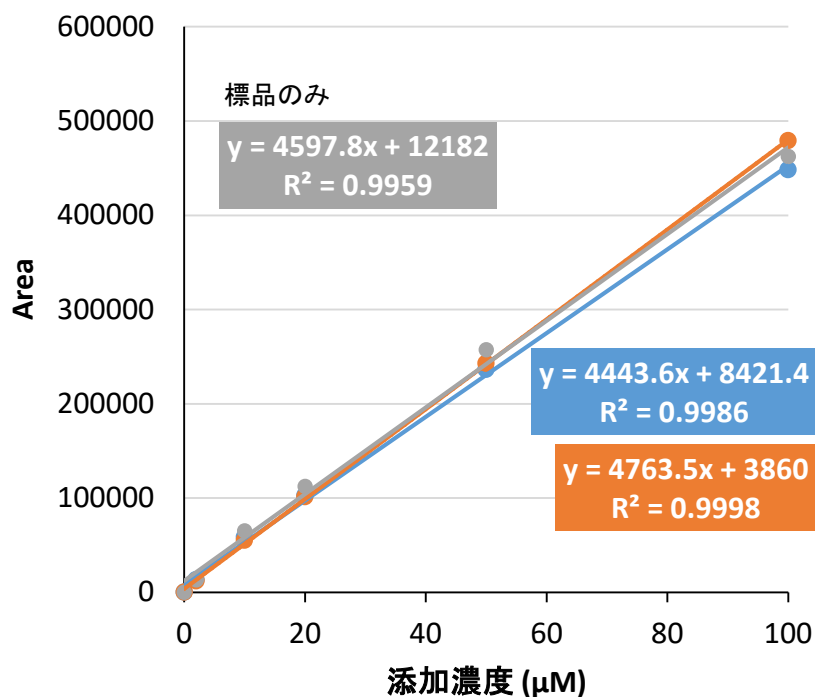
サンプル前処理



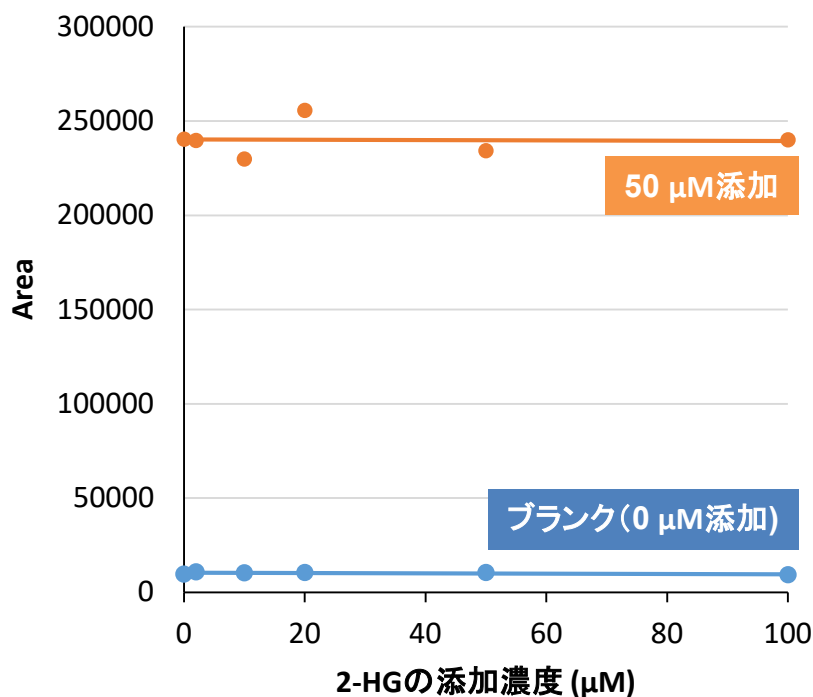
A; 2,10,20,50,100 μM のSTDを添加

B; 50 μM の夾雑(2-Hydroxyglutarate)存在下、2,10,20,50, 100 μM のSTDを添加

Citramalate



(サンプルに元々含まれていたCitramalateは
ブランクとして差し引いています。)

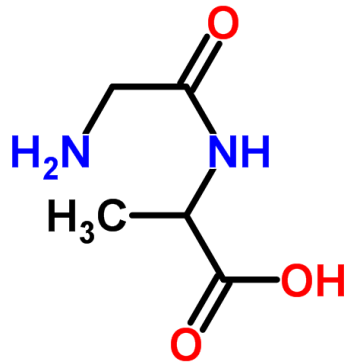


CES(collision energy spread)を用いた
product ion scanでも十分な定量性を確保

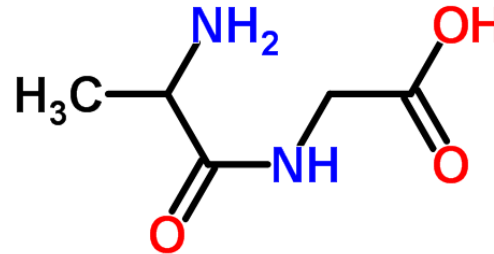
Development of comprehensive dipeptide analysis method

Isomer separation is main difficulty in dipeptide analysis.

ex)



Gly-Ala



Ala-Gly

✓ same molecular formulae

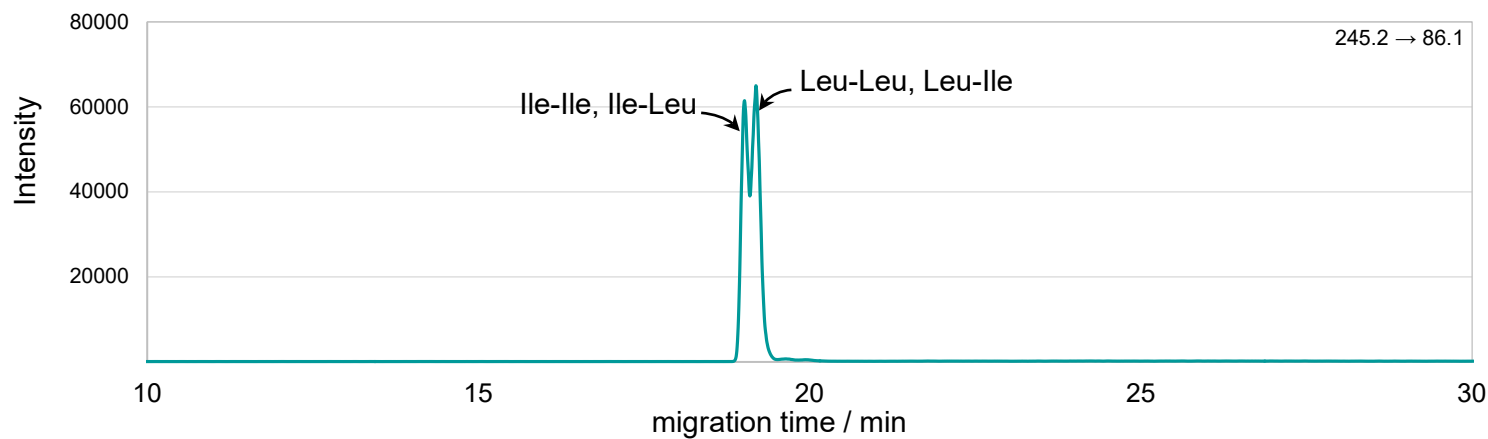
✓ same exact masses

⇒ These compounds cannot be separated in MS only.

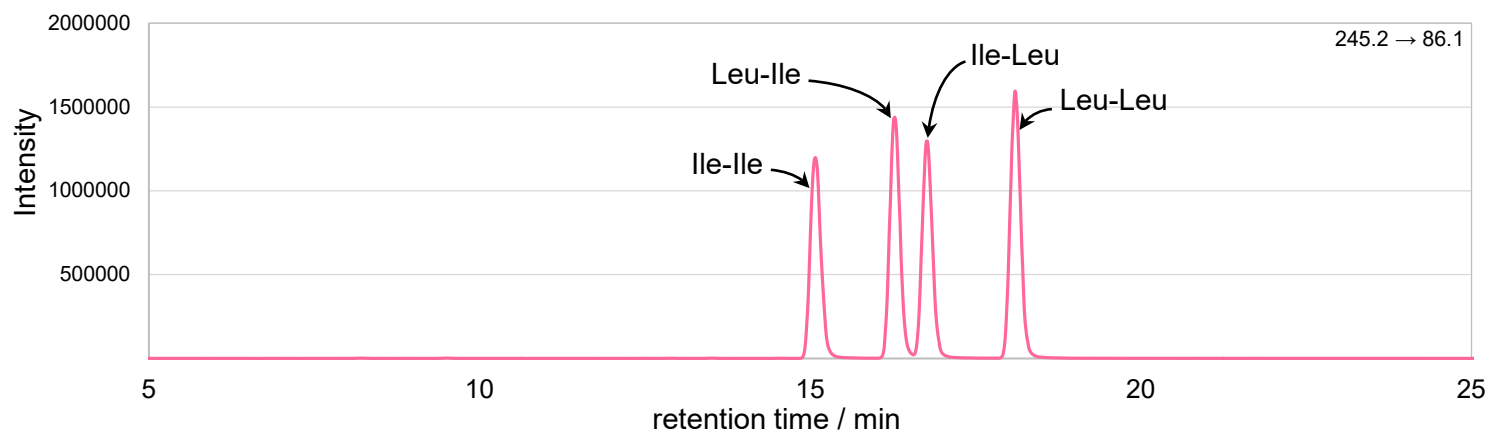
These compounds have to be separated in

chromatography/electrophoresis before introduction to MS.

CE/MS



LC/MS

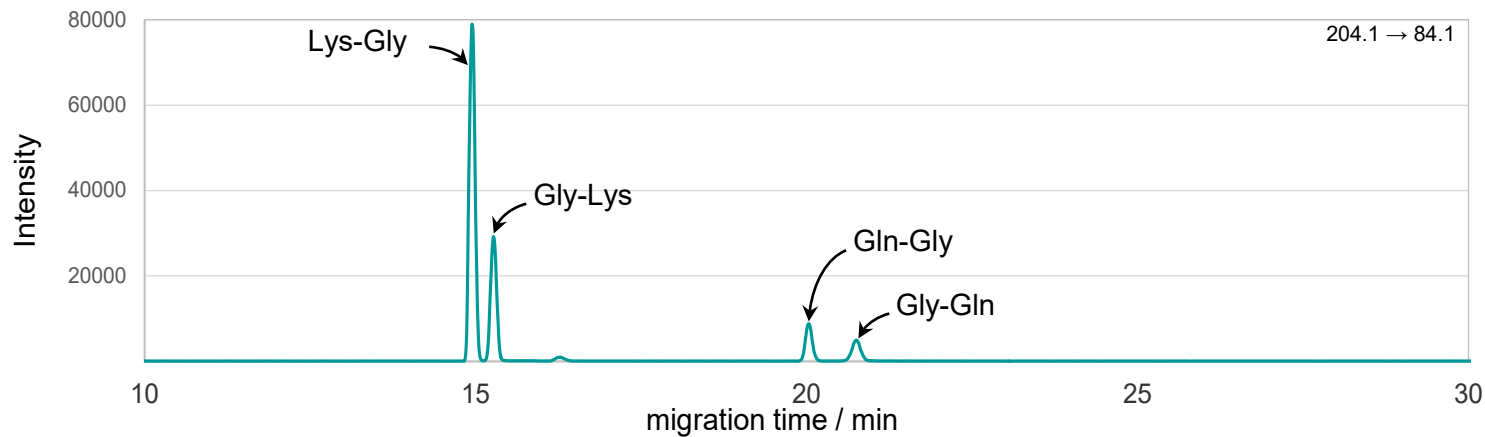


Column: Waters HSS PFP 1.8 μ m, 2.1 x 150 mm

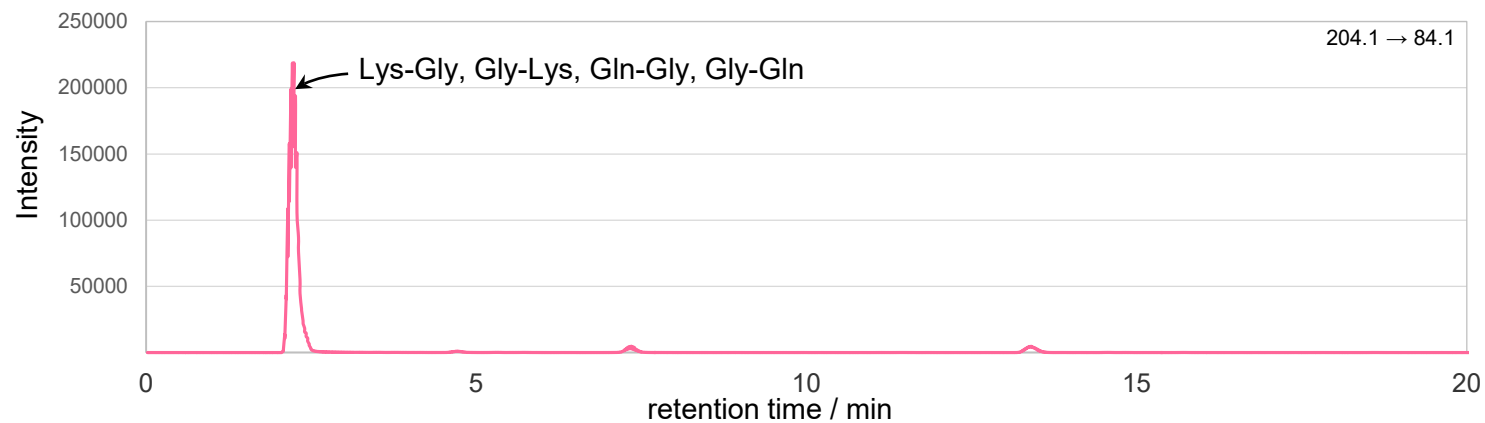
Eluent A: 0.1% FA

B: 0.1% FA in 95/5 acetonitrile/water

CE/MS



LC/MS



Dipeptide detected from cultured cell

	Ala (A)	Val (V)	Leu (L)	Ile (I)	Pro (P)	Phe (F)	Trp (W)	Met (M)	Gly (G)	Ser (S)	Thr (T)	Tyr (Y)	Asn (N)	Gln (Q)	Glu (E)	Lys (K)	Arg (R)	His (H)	Asp (D)
Ala																			
Val																			
Leu																			
Ile																			
Pro																			
Phe																			
Trp																			
Met																			
Gly																			
Ser																			
Thr																			
Tyr																			
Asn																			
Gln																			
Glu																			
Lys																			
Arg																			
His																			
Asp																			

Red: CE-MS; Blue: LC-MS

大腸がん培養細胞の株間におけるジペプチドプロファイル

