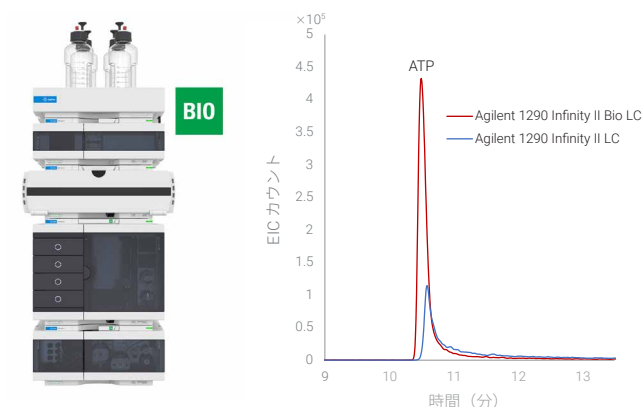


鉄を含まない流路による メタボロミクス分析の改善

メタボロミクスにおける Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 1290 Infinity II LC システムの比較



著者

André Feith
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

Steven Minden, Attila Teleki,
and Ralf Takors
Institute of Biochemical
Engineering
University of Stuttgart,
Germany

概要

メタボロミクスは、細胞や生命体の生理学的状態を解釈・理解するための手段です。近年は液体クロマトグラフィー / 質量分析法が一般的に用いられる分析技法となっています。ただし、堅牢性と使いやすさを向上させる余地はまだあります。本アプリケーションノートは、生体適合性のある流路がステンレスに比べて大きな利点があることを示します。その利点は、Agilent 1290 Infinity II Bio LC と Agilent 1290 Infinity II LC を比較することで証明されました。1290 Infinity II Bio LC では、1290 Infinity II LC と比較して、吸着効果が見られず、ヌクレオチドや糖リン酸などのリン酸化合物のピーク形状と分離能が向上していることが示されました。Saccharomyces cerevisiae 由来の細胞内代謝物抽出物について、0.1 % という優れたリテンションタイムの RSD 値が得られました。これらのデータは、アデニル酸エネルギー電荷などの生理学的パラメータの測定に不可欠な代謝物を、安定して分析できることを示しています。まとめると、ここで得られた結果は、1290 Infinity II Bio LC がメタボロミクスのシームレスで堅牢な分析に最適であることを示しています。

はじめに

メタボロミクスと呼ばれる科学分野は、生体細胞、組織、器官、生命体の代謝物が関与する化学プロセスを説明します。メタボロミクスは、ゲノミクスやプロテオミクスなどの包括的なシステムズバイオロジーに関連するオミクス技術の1つとして、すべての調節メカニズムの共通部分を対象とし、細胞の生理学的状態と表現型を可能な限り正確に表現します。¹最先端の分析ツールは、核磁気共鳴分光分析 (NMR) から、ガス (GC) または液体クロマトグラフィー (LC) と組み合わせたエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) まで多岐にわたります。親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) に基づく液体クロマトグラフィー/質量分析メソッドは、包括的なメタボロミクス研究の標準分析法と見なされています。²ただし、ステンレスベースの従来の HPLC システムでは、ヌクレオチドやリン酸化糖などの代謝物のピークテーリングと吸着が深刻な問題になることがあります。これらの望ましくない副作用は従来、LC システム全体を不動態化するか、移動相を鉄キレート化合物で処理することにより軽減してきました。^{3,4}残念ながら、これらの対策にも欠点があります。不動態化は定期的に再処理する必要があり、システムの寿命を縮める可能性があり、また移動相への添加剤は不要な MS イオン化抑制を引き起こすおそれがあります。したがって、メタボロミクスに最適な LC システムとは、完全に鉄分を含まず、特別な処理が不要なシステムです。このアプリケーションノートでは、生体適合性のある Agilent 1290 Infinity II Bio LC を同等のステンレスベースの LC システムと比較しながら、メタボロミクスでの使用について評価します。1290 Infinity II Bio LC の鉄を含まない流路は、リン酸化化合物の分析に優れた性能を発揮することを示します。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムのモジュール構成は次のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプ (G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプル (G7137A)、Agilent InfinityLab サンプルサーモスタット付属 (オプション 101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Agilent クイックコネクト Bio 熱交換器標準 (G7116-60071) と 2 台の Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013) 付属
- Agilent 6546 LC/Q-TOF (G6546A)

Agilent 1290 Infinity II LC システムのモジュール構成は次のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル (G7167A)、Agilent InfinityLab サンプルサーモスタット付属 (オプション 101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Agilent InfinityLab クイックコネクト熱交換器標準 (G7116-60015) と 2 台の Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013) 付属
- Agilent 6546 LC/Q-TOF (G6546A)

ソフトウェア

- Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア (B.09.00 以降)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis (10.0 以降)

カラム

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、2.1 × 100 mm、2.7 μm、PEEK ライナ付き (部品番号 675775-924)

試薬

Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル (部品番号 5191-4496) および Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS 水 (部品番号 5191-4498) を使用しました。酢酸アンモニウムと水酸化アンモニウムは VWR (ダルムシュタット、ドイツ) から入手しました。すべての代謝物標準 (付録の省略記号表を参照) は、Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。

培養とサンプリング

一倍体の原栄養性 *Saccharomyces cerevisiae* モデル株 GEN.PK 113-7D は、合成培地中の 3 L ステンレス製ベンチトップバイオリアクター (Bioengineering、ヴァルド、スイス) で好氣的に培養しました。このプロセスは、0.1 h⁻¹ の希釈レートで、グルコース制限下での連続発酵として操作しました。定常状態の参照サンプル (タイムポイント 0 秒) は、オフガス信号とバイオマス濃度が滞留時間の 5 倍にわたって一定であるときに抽出しました。次に、ブドウ糖の供給を 120 秒間遮断することで飢餓刺激を培養に与え、この時間枠 (20 ~ 130 秒) の間に 6 回サンプルを採取しました。

サンプリングは、カスタムメイドの半自動サンプリングデバイスを使用して実現し、正確な量を迅速に採取することができました (1 ~ 5 mL の量で誤差は 2% 未満でした)。この実験では、1.5 mL のプロセスを -40 °C メタノール 10 mL に 1 秒以内で直接収集することによりサンプルをクエンチしました。次に、サンプルを 5,000 g で 5 分間、-11 °C でさらに洗浄せずに遠心分離ステップにかけました。得られたペレットを直接急速凍結しました。

抽出のために、凍結したペレットを、50 % (v/v) メタノール、100 mM 酢酸アンモニウム (水酸化アンモニウムで pH 9.2 に調整)、100 μM L-ノルバリン、および 2.5 mM 3-メルカプトプロピオン酸からなる -28 °C の抽出バッファ 1 mL に再懸濁しました。サンプル温度は、-40 °C のクライオスタートで一定のボルテックスと中間冷却により -20 °C 未満に維持しました。次に、完全に再懸濁したサンプルを 1 mL の -28 °C のクロロホルムと混合し、激しくボルテックスをかけ、ロータリーオーバーヘッドシェーカーに 3 時間入れました。抽出物を 20,000 g、4 °C で 10 分間遠心分離しました。すべての極性代謝物を含む上部の水性メタノール相を回収し、-70 °C で保存しました。

サンプル調製

代謝物サンプルは、60 % アセトニトリルおよび 10 mM 酢酸アンモニウム pH 9 で調製しました。酵母由来の代謝物抽出物をさらに 1:10 に希釈しました。

表 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC および Agilent 1290 Infinity II LC を使用したメタボロミクス分析の LC メソッド

パラメータ	設定値																																
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm, PEEK ライナ付き																																
溶媒	A) アセトニトリル B) 水 C) 500 mM 酢酸アンモニウム、pH 9																																
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> <th>C (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>80</td> <td>18</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>0.66</td> <td>80</td> <td>18</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>13.50</td> <td>60</td> <td>38</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>13.51</td> <td>10</td> <td>88</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>14.50</td> <td>10</td> <td>88</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>14.51</td> <td>80</td> <td>18</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>80</td> <td>18</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A (%)	B (%)	C (%)	0.00	80	18	2	0.66	80	18	2	13.50	60	38	2	13.51	10	88	2	14.50	10	88	2	14.51	80	18	2	20.00	80	18	2
時間 (分)	A (%)	B (%)	C (%)																														
0.00	80	18	2																														
0.66	80	18	2																														
13.50	60	38	2																														
13.51	10	88	2																														
14.50	10	88	2																														
14.51	80	18	2																														
20.00	80	18	2																														
流量	0.300 mL/min																																
温度	40 °C、Agilent 熱平衡デバイス (G7116-60013) 搭載																																
MS 検出	表 2 を参照																																
注入	注入量: 1 μL サンプル温度: 4 °C 洗浄: アセトニトリル/水 9:1 で 3 秒間 (フラッシュポート)																																

表 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC および Agilent 1290 Infinity II LC を使用したメタボロミクス分析のソースおよび MS パラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6546 LC/Q-TOF
ガス温度	320 °C
ドライガス流量	8 L/min
ネブライザ	35 psi
ソースガス温度	350 °C
ソースガス流量	11 L/min
Vcap	3,500 V
ノズル電圧	1,000 V
フラグメンタ	125 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
取り込みモード	ネガティブ、低 (m/z 1,700) 質量範囲
質量範囲	m/z 25 ~ 1,700
取り込みレート	2 スペクトル/秒
リファレンス質量	m/z 112.985587, m/z 1,033.988109

結果と考察

メタボロミクスにステンレス製 HPLC システムを使用すると、鉄表面への分析対象物の吸着や鉄複合体の生成により悪影響が生じる可能性があります。MS データが劣化するおそれがあります。吸着はサンプルの注入後、直ちに起こります。したがって、注入 needles、needle seat、およびサンプルループが最も吸着が起こりやすい場所です。1290 Infinity II Bio LC と Infinity II 1290 LC の吸着の違いを調べるために、新しい needles、needle seat、およびサンプルループを両方のシステムに取り付けて、注入の不動態化の影響を軽減しました。PEEK ライナ付き InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いて、カラム内の鉄の相互作用を排除し、吸着効果があるとすれば LC システムのみであるようにしました。交換直後に、まったく同じカラムを使用して、両方のシステムでさまざまな代謝物標準の連続注入を 2 回実行しました（付録の省略記号表にある全代謝物のリストを参照）。これらの注入のクロマトグラムを図 1 に示します。1290 Infinity II LC の 1 回目と 2 回目の注入の間には驚くべきことに、33% (ATP) と 38% (GTP) の面積差がありました。これは金属表面へ大量の吸着があったことを示しています。それと比較して、1290 Infinity II Bio LC は、注入間の面積偏差はわずか 2% (ATP) と 3% (GTP) であり、これはメソッドの精度の範囲内です。

これらのシステム間の吸着の違いを精査するために、この実験レイアウトで 30 種類の代謝物の分析も行いました。図 2 に、すべての代謝物の違いをパーセンテージで示します。結果は、1290 Infinity II Bio LC が優れていることを示しています。

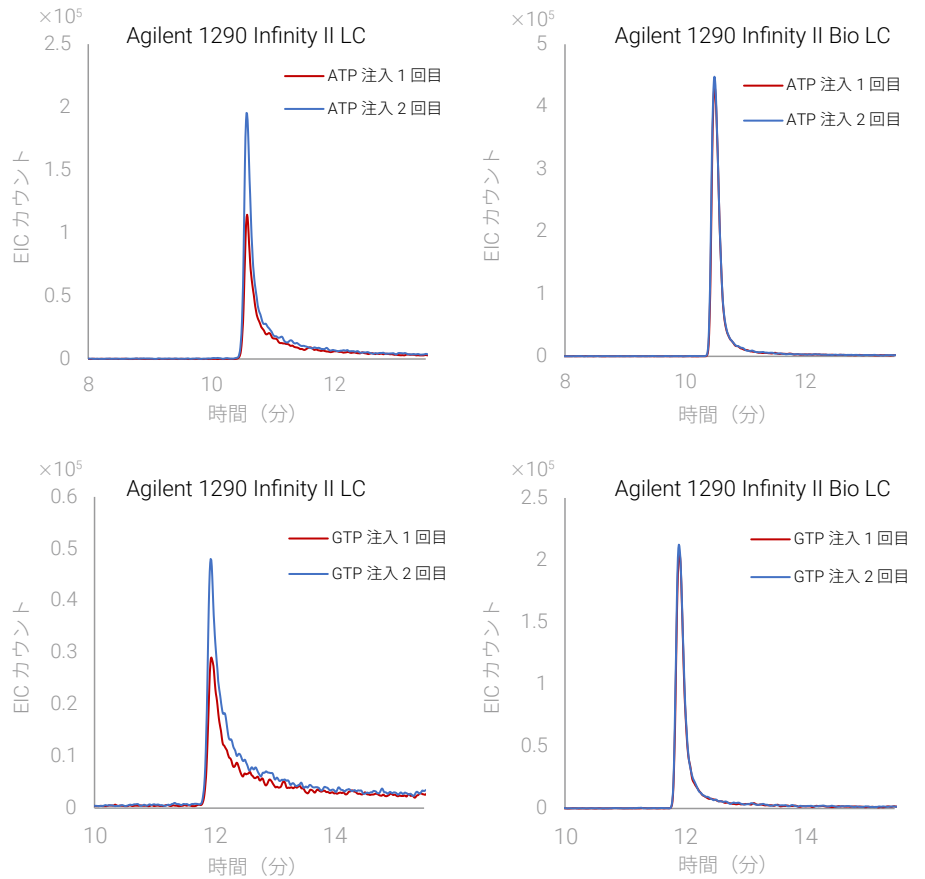


図 1. ATP 吸着実験からのサンプルクロマトグラム（上）、および GTP 吸着実験からのサンプルクロマトグラム（下）

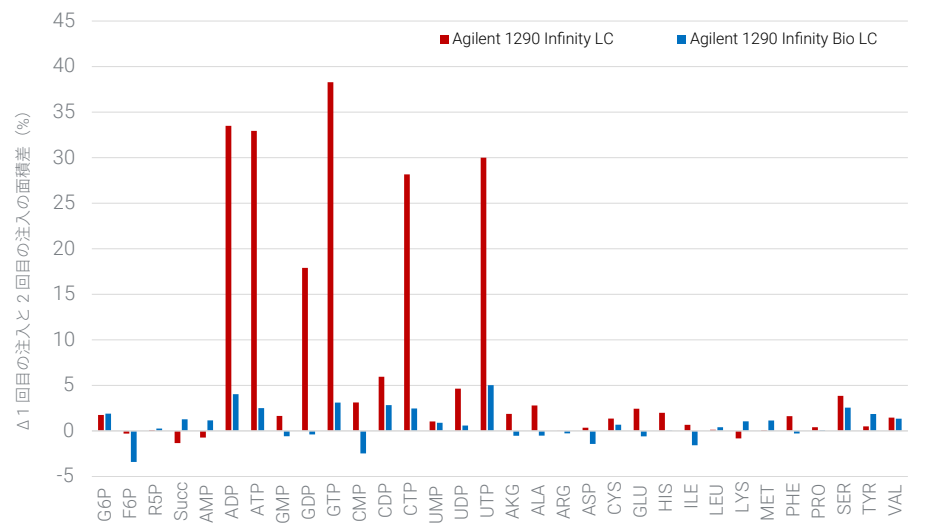


図 2. 32 種類の代謝物の新しい注入流路における 1 回目と 2 回目の注入の面積差

1290 Infinity II Bio LC では、特に ATP、GTP、CTP、UTP などの高度にリン酸化されたヌクレオチドの吸着は観察されませんでした。これは、メタボロミクス分析に最適な性能です。

鉄表面による分析対象物の吸着に加えて、LC システムとの二次的反応によって引き起こされるテーリングや、好ましくないピーク形状も、メタボロミクスにおいてよくある問題になる可能性があります。ピーク形状をよりよく理解して比較するために、前に示した ATP のクロマトグラムをスケールリングして図 3 に示しました。

1290 Infinity II LC (SST LC) と 1290 Infinity II Bio LC (Bio LC) を並べて比較してみると、生体適合性バージョンと比較して、ステンレス製 LC を使用したものには大きなテーリングが見られます。前のグラフで説明した吸着は、カラムが PEEK でライニングされていても、テーリングを増加させています。次に、リン酸化代謝物のテーリングファクター (T_f) を計算して、LC システムの間での違いを定量化しました。これを表 3 に示します。1290 Infinity II Bio LC のテーリングファクターは、分析したすべての代謝物に対してより優れたものになっており、偏差は 0.1 ~ 2.7 T_f 単位です。

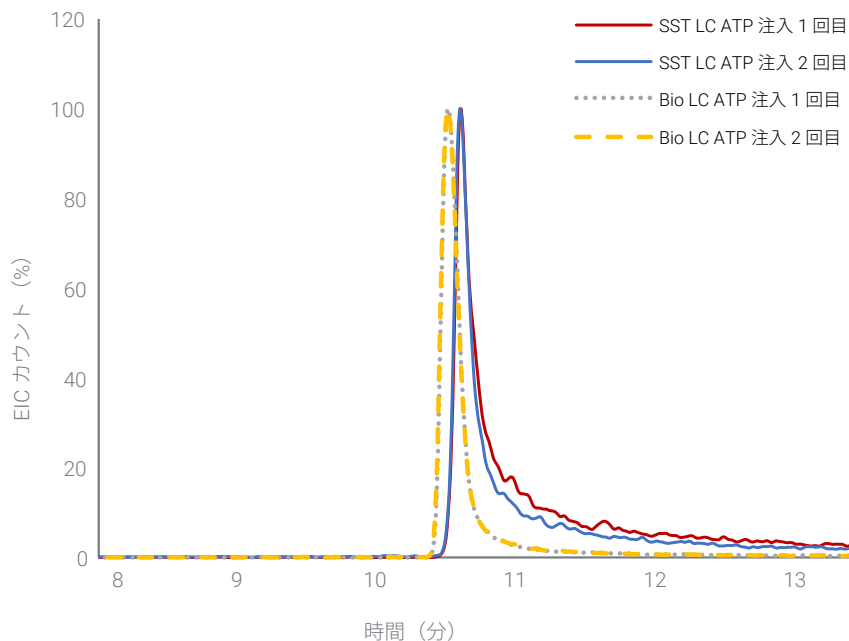


図 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC および Agilent 1290 Infinity II LC における ATP のスケールリングされたクロマトグラム

表 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC および Agilent 1290 Infinity II LC におけるリン酸化代謝物のテーリングファクター

代謝物	テーリングファクター (T_f)		
	Agilent 1290 Infinity II LC	Agilent 1290 Infinity II Bio LC	ΔT_f
G6P	2.8	2.5	0.4
F6P	3.5	3.0	0.5
R5P	3.1	2.7	0.4
AMP	3.1	2.6	0.5
ADP	3.4	2.2	1.2
ATP	4.0	2.3	1.7
GMP	2.6	2.2	0.4
GDP	5.3	2.6	2.7
GTP	4.3	2.5	1.8
CMP	3.0	2.4	0.6
CDP	3.2	2.8	0.4
CTP	3.4	2.3	1.1
UMP	3.4	2.4	1.1
UDP	2.4	2.3	0.1
UTP	2.3	1.9	0.4

メタボロミクスは、大半の分析ケースで MS 検出に依存します。したがって、通常、質量検出による別のレベルの選択性があるため、ピークの形状と分解能が化学者にとって常に最優先事項であるとは限りません。ただし、G6P と F6P、またはロイシンとイソロイシンなどの一部の同重体代謝物では、包括的な分析を適切な LC 分離に依存しています。例えば図 4 は、両方のシステムで分析された標準として、2 つの同重体糖リン酸 G6P と F6P を示しています。

1290 Infinity II LC は、鉄ベースの流路が起こす吸着とピークテーリングのために、2 つの糖リン酸をベースライン分離できません。一方 1290 Infinity II Bio LC では、メタボロミクス分析に十分な分離能で 2 つの糖リン酸を識別できています。

これまでのデータはすべて、制御された詳細分析用の分析標準を使用して生成されたものでした。しかし、実際のメタボロミクス分析では、化学分析で最も複雑なサンプルの 1 つである、細胞内または細胞外の代謝物抽出物を使用します。これらの抽出物は、数千もの異なる代謝物で構成されていることがあります。例えば、ラボの大腸菌 K-12 株には、約 1,500 の細胞内低分子が含まれています。⁵現実の複雑なマトリクスに対処する Agilent 1290 Infinity II Bio LC の能力を調べるために、本物の細胞内 *Saccharomyces cerevisiae* 代謝物抽出物を分析しました。G6P、F6P、AMP、ADP、および ATP のすべてのクロマトグラムの概要を、図 5 および 6 に示します。

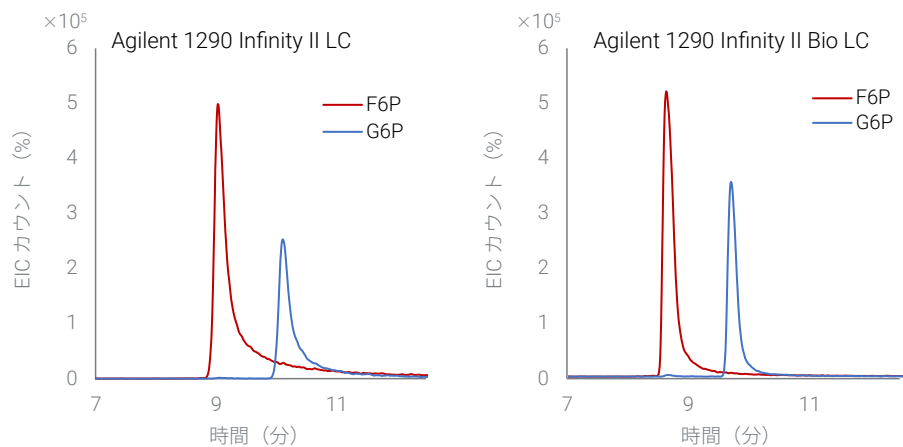


図 4. Agilent 1290 Infinity II LC および Agilent 1290 Infinity II Bio LC における同重体糖リン酸 G6P および F6P の分離

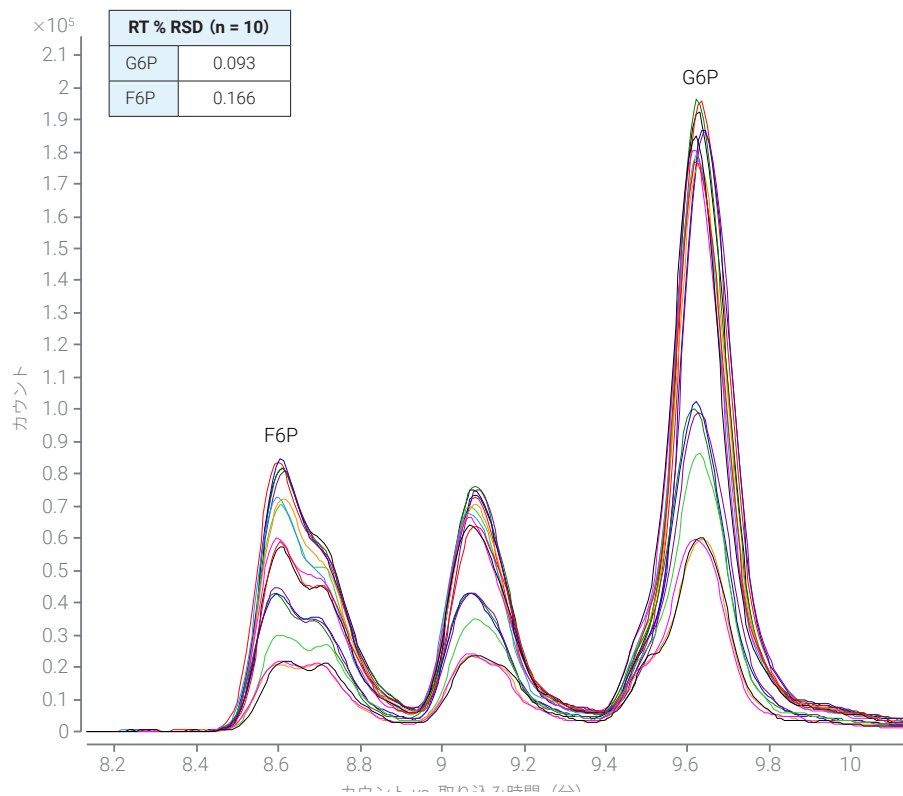


図 5. Agilent 1290 Infinity II Bio LC での G6P および F6P のダイナミック EIC の重ね表示。優れたリテンションタイム (RT) 精度を示します。

10 回の連続注入に基づいて、相対標準偏差 (RSD) を計算し、図内の対応する表に示しています。偏差に関して約 0.1 % という優れた RSD 値が得られ、複雑なマトリックスでのメタボロミクス分析における 1290 Infinity II Bio LC の並外れた性能が証明されました。また、G6P と F6P の同重体ピークは、優れたピーク形状と分離能のおかげで、細胞内ヘキソースリン酸のさらに明確な分析が可能になりました。これらの代謝物は糖消費後の最初の代謝の分岐点を構成するため、この分析は特に重要です。

すべての AxP 種は、リン酸化の程度に関係なく、同様のピーク形状で分析できます。ATP、ADP、および AMP は、アデニル酸エネルギー電荷を通じて細胞のエネルギー状態を反映します。⁶ したがって、細胞の生理機能に関する高品質データを得るには、これらの分析対象物の堅牢な分析が必須です。

代謝物抽出物は、グルコース制限/飢餓下で連続培養された酵母から採取されたため、特徴的な動的代謝物プロファイルを図 7 で特定できます。グルコース飢餓のため、G6P と F6P の面積強度は時間の経過とともに低下し、同時に細胞のエネルギーに相当する ATP の量も低下します。ただし AMP と ADP は、グルコース飢餓のために再リン酸化が遅くなるに従って増加します。

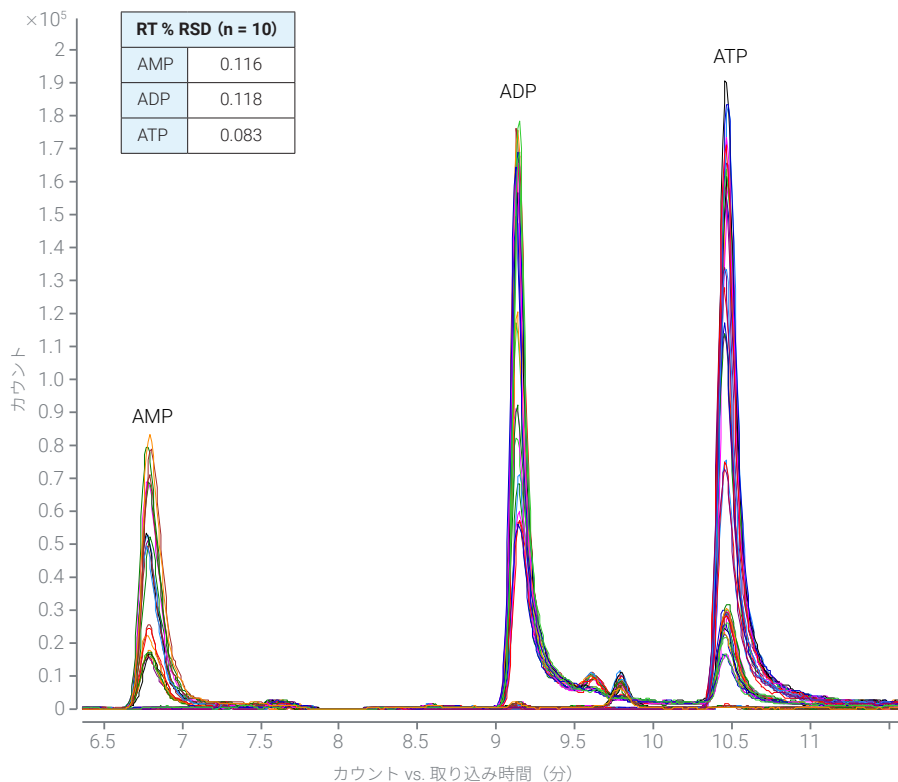


図 6. Agilent 1290 Infinity II Bio LC での AMP、ADP、および ATP のダイナミック EIC の重ね表示。優れたリテンションタイム (RT) 精度を示します。

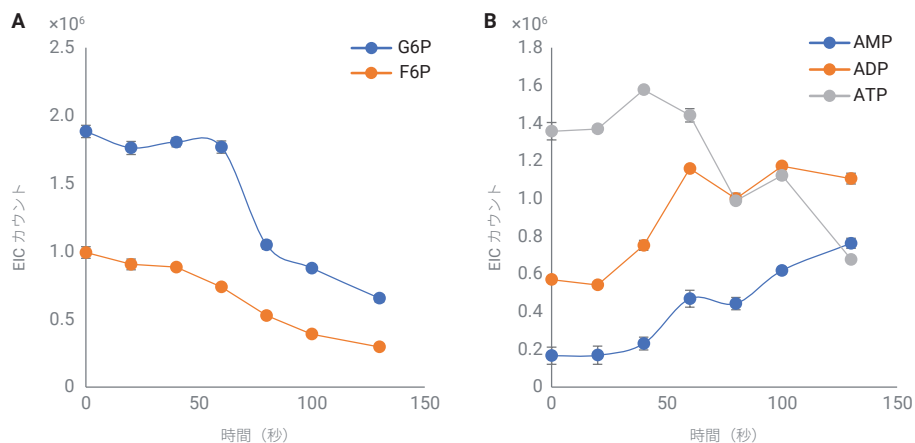


図 7. グルコース飢餓実験中の G6P と F6P (A)、AMP、ADP、ATP (B) の面積強度

結論

複雑なメタボロミクスサンプルの分析は、分析対象物が不安定で要求が厳しいため、煩雑でエラーが発生しやすくなります。ステンレス製の LC システムは不動態化する必要があります。そうでない場合は、特定の移動相添加剤を使用する必要があります。このアプリケーションノートは、Agilent 1290 Infinity II Bio LC がメタボロミクスに最適な選択肢であることを示しています。分析が困難なリン酸化合物に対して、吸着がなく、ピーク形状が良好で、高分離能の分析を実現しました。生体適合性のある流路を用いることにより、従来行っていた処理が不要になりました。複雑なマトリックスにおける堅牢な性能と、優れた精度を組み合わせた Agilent 1290 Infinity II Bio LC は、LC/MS ベースのメタボロミクス分析に最適なフロントエンドです。

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おりません。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。

DE29473172

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, March 24, 2022

5994-4622JAJP

付録

代謝物の省略記号

省略記号	化合物
G6P	グルコース 6-リン酸
F6P	フルクトース 6-ホスフェート
R5P	リボース 5-ホスフェート
Succ	コハク酸
AMP	アデノシン一リン酸
ADP	アデノシン二リン酸
ATP	アデノシン三リン酸
GMP	グアノシン一リン酸
GDP	グアノシン二リン酸
GTP	グアノシン三リン酸
CMP	シチジル一リン酸
CDP	シチジン二リン酸
CTP	シチジン三リン酸
UMP	ウリジン一リン酸
UDP	ウリジン二リン酸
UTP	ウリジン三リン酸
AKG	α -ケトグルタル酸
ALA	L-アラニン
ARG	L-アルギニン
ASP	L-アスパラギン酸
CYS	L-システイン
GLU	L-グルタミン酸
HIS	L-ヒスチジン
ILE	L-イソロイシン
LEU	L-ロイシン
LYS	L-リジン
MET	L-メチオニン
PHE	L-フェニルアラニン
PRO	L-プロリン
SER	L-セリン
TYR	L-チロシン
VAL	L-バリン

参考文献

1. Fiehn, O.; Weckwerth, W. Deciphering metabolic networks. *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 579–588.
2. Feith, A. et al. HILIC-Enabled 13C Metabolomics Strategies: Comparing Quantitative Precision and Spectral Accuracy of QTOF High- and QQQ Low-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites* **2019**, 9, 63.
3. Wakamatsu, A. et al. A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction with Stainless Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1823–1830.
4. Hsiao, J. et al. Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 9457–9464.
5. Weaver, D. et al. A genome-scale metabolic flux model of *Escherichia coli* K-12 derived from the EcoCyc database. *Biol.* **2014**, 8, 79.
6. De la Fuente, I. et al. On the Dynamics of the Adenylate Energy System: Homeorhesis vs Homeostasis. *PLoS One* **2014**, 9, e108676.