

# GC/Q-TOF による、マウス脳における 鎮静剤誘発性変化のメタボロミクス分析

## アプリケーションノート

メタボロミクス

### 著者

Manhong Wu, Ming Zheng, David Clark,  
and Gary Peltz

Department of Anesthesia

School of Medicine

Stanford University

Stanford, CA

Peyman Sahbaie

Veterans Affairs

Palo Alto Healthcare System

Palo Alto, CA

Sofia Aronova and Stephan Baumann

Agilent Technologies, Inc.

Santa Clara, CA

### 概要

マウス脳において鎮静剤が誘発する代謝変化を解明する研究を実施しました。Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF MS の EI MS、EI MS/MS、PCI 機能と、Agilent MassHunter ソフトウェアを組み合わせることで、代謝変化の特定に対応できる、きわめて柔軟性の高い包括的なワークフローが実現しました。このワークフローを用いて、モルヒネ感受性マウス株とモルヒネ耐性マウス株を区別し、モルヒネ投与に対するそれぞれの反応の違いを測定し、各種のテクニックを用いて化合物を同定しました。



**Agilent Technologies**

## はじめに

米国などの工業国では、処方薬のオピオイド鎮静剤の乱用が大幅に増加しています [1, 2]。そのため、麻酔薬依存のメカニズムを理解するための新たなアプローチを確保し、現在の知見を再評価する必要性が高まっています。

麻酔薬依存への感受性が人によって異なるように、マウス株もそうした薬物への感受性はそれぞれで大きく異なります [3,4]。そのため、このアプリケーションノートでは、上述の問題に対応するために、鎮静剤依存のマウスモデルを使用しました。

メタボロミクスは、モルヒネ依存に関する生化学研究で大きな威力を発揮するアプローチで、システムの生理学的状態に関するきわめて直接的な情報が得られます。現在のところ、神経行動学的反応に影響を与える代謝変化に関する知見は、ほとんど得られていません。鎮静剤誘発性の代謝変化が、臨床的に重要な鎮静剤への反応に影響を与える可能性もあります。

このアプリケーションノートでは、ガスクロマトグラフィ/質量分析 (GC/MS) を用いた非ターゲットメタボロミクスアプローチにより、モルヒネ感受性が大きく異なる複数のマウス株における鎮静剤誘発性の代謝変化を特定する研究を紹介します。精密質量データ、フルスペクトル感度、MS/MS 機能、EI および CI モードの利点を得るために、Agilent 7200 GC/Q-TOF を使用しました。このアプローチに、機能豊富な Agilent MassHunter および Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアを組み合わせることで、マウス株によって濃度の異なる代謝物の同定および確認が可能になりました。特に重視したのが、モルヒネ投与に反応して生じる各マウス株間の代謝物濃度の違いの測定です。というのも、こうした変化は、モルヒネ依存のメカニズムを理解するうえで役立つからです。このメタボロミクス研究により、モルヒネ感受性マウス株において、対照群とモルヒネ投与群ではアデノシン濃度が大きく異なることが明らかになりました。また、アデノシン 5'-モノホスフェート、グリセリン酸、コレステロール、神経伝達物質の N-アセチルアスパルチルグルタミン酸といった他の代謝物についても、2つのマウス株間で濃度に違いが見られました。

## 実験手法

### 材料

C57BL/6 および 129Sv1 マウス株 (オス、生後 7~8 週) を Jackson Laboratories (バーハーバー、メイン州) から入手しました。モルヒネを Sigma Chemicals (セントルイス、ミズーリ州) から入手しました。

### 装置

この研究には、Agilent 7890B GC システムと Agilent 7200 GC/Q-TOF システムを使用しました。機器の設定条件を表 1 に示しています。

表 1. GC および質量分析計条件

GC 分析条件	
カラム	Agilent DB-5 MS ウルトライナート、 30 m × 0.25 mm、0.25 μm 膜厚 (p/n 122-5532UI)
注入量	1 μL
スプリットモード比	スプリット 10:1 (EI) およびスプリットレス (ポジティブ CI (PCI) および MS/MS)
注入口温度	250 °C
オープン温度プログラム	60 °C で 1 分、 10 °C/min で 60~325 °C、 3.5 分維持
キャリアガス	ヘリウム、1 mL/min 定流量
トランスファーライン温度	290 °C
MS 条件	
イオン化モード	EI、ポジティブ CI (20 % メタンフロー)
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
質量範囲	40~600 <i>m/z</i>
スペクトル採取レート	5 Hz、セントロイドおよびプロファイル モードの両方で採取

## サンプル前処理

マウスに4日連続でモルヒネを投与するか、同じ期間にわたって対照の塩水を投与しました。生後8週のオスのC57BL/6(モルヒネ感受性)および129Sv1(モルヒネ耐性)から脳幹組織を採取し、7~8回のバイオロジカルレプリケートをおこないました。Folch法により代謝物を抽出しました[5]。水性フラクションを採取し、真空で乾燥させ、ピリジン中ヒドロキシルアミンHClの飽和溶液を用いてメトキシ化により誘導体化したのち、N-メチル-N-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(MSTFA)および1%トリメチルクロロシラン(TMCS)によりシリル化しました。

## データ処理と統計解析

データ処理にあたっては、MassHunter Quantitative AnalysisソフトウェアパッケージのUnknowns Analysisツールを用いてクロマトグラフィピークをデコンボリューションしたのち、Agilent Fiehn GC/MSメタボロミクスリテンションタイムロック(RTL)ライブラリと比較して化合物を同定しました。Molecular Structure Correlator(MSC)ソフトウェアを用いて、暫定的に同定された化合物の構造をさらに確認しました。

多変量統計解析パッケージのMass Profiler Professional(MPP)を用いて、統計解析をおこないました。このパッケージを用い

て、データクラスタリングを視覚化し、ペアワイズ条件間の化合物濃度の有意な違いを特定しました。

## 結果と考察

### クロマトグラフィピークのデコンボリューションとライブラリ検索

Unknowns Analysisツールを用いてクロマトグラフィピークのデコンボリューションをおこなったところ、各サンプル中でおおよそ700の成分を検出することができました(図1)。Agilent-Fiehn代謝物MSライブラリを用いて、検索を行いました。各サンプル中の約70~100成分のマッチファクターは>50でした。有意な変化が見られないすべての成分をMPPでフィルタリングして除外したのち、同定されていない成分とAgilent-Fiehnライブラリにより同定された成分について、NIST MSライブラリ検索をおこない、Agilent-Fiehnライブラリに含まれない成分の確認および同定をおこないました。有意な変化が見られるものの、どちらのライブラリでも良好な一致結果が得られなかった一部の成分については、PCIおよびEI MS/MSを用いた分子式解析や、精密質量情報およびMolecular Structure Correlator(MSC)ソフトウェアツールを用いた構造解析などの追加の分析手順を実施しました。これについてはあとで説明します。

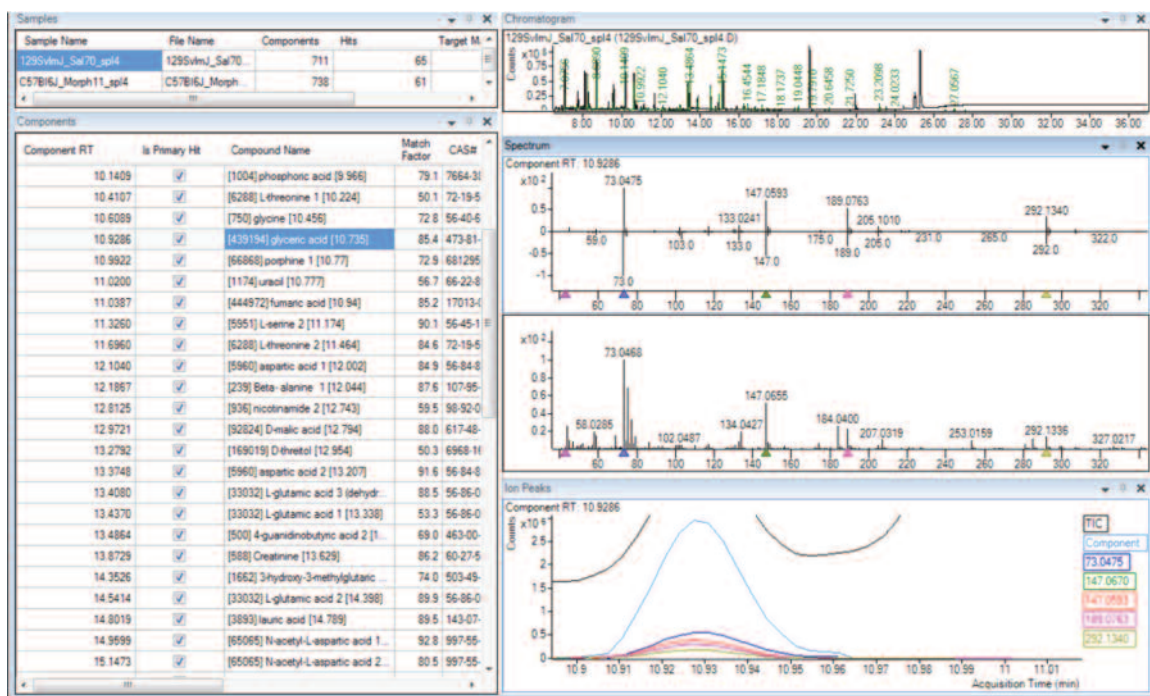


図1. Unknowns Analysis ツールを用いて、デコンボリューションと初期ライブラリ検索をおこないました。右下のパネルは、同じピーク形状を持つデコンボリューションされた成分イオンを示しています。これにより、すべてのイオンが同じ成分に属することが確認されています。

Agilent-Fiehn 単位質量メタボロミクスライブラリを用いて各サンプル中で同定された約 60 の代謝物について、精密質量情報を用いて確認をおこないました。これにより、偽陽性データがある場合には排除することができます。MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの Fragment Formula Annotation (FFA) ツールとライブラリ検索結果を組み合わせることで、同定された成分を簡単に確認できました (図 2)。フラグメントの化学式がライブラリ検索により同定された分子式のサブセットである場合には、フラグメントにアノテーションがつき、緑に色分けされています。これにより、化合物同定結果を迅速に確認することができます (図 2)。同定された代謝物の大部分は、アミノ酸、有機酸、炭水化物にあたるものでした (図 3)。

## 統計解析ワークフロー

メタボロミクスデータの解析には、しばしば面倒で時間のかかるプロセスが伴います。MPP ソフトウェアは、フィルタリングや解析、サンプルモデル作成、予測に適しています。こうしたプロセスでは、複雑でノイズの多いデータを効率的に評価することが求められます。MPP を使えば、使いやすいワークフローにより、データの最適な検証方法を判断することが可能です。高度な解析が必要な場合でも、MPP ではさまざまな統計機能を利用することができます。多様な方法でデータを処理し、データ解析を最適化することが可能です (詳細については、Mass Profiler Professional ブローシャ 5990-4164EN をご覧ください)。

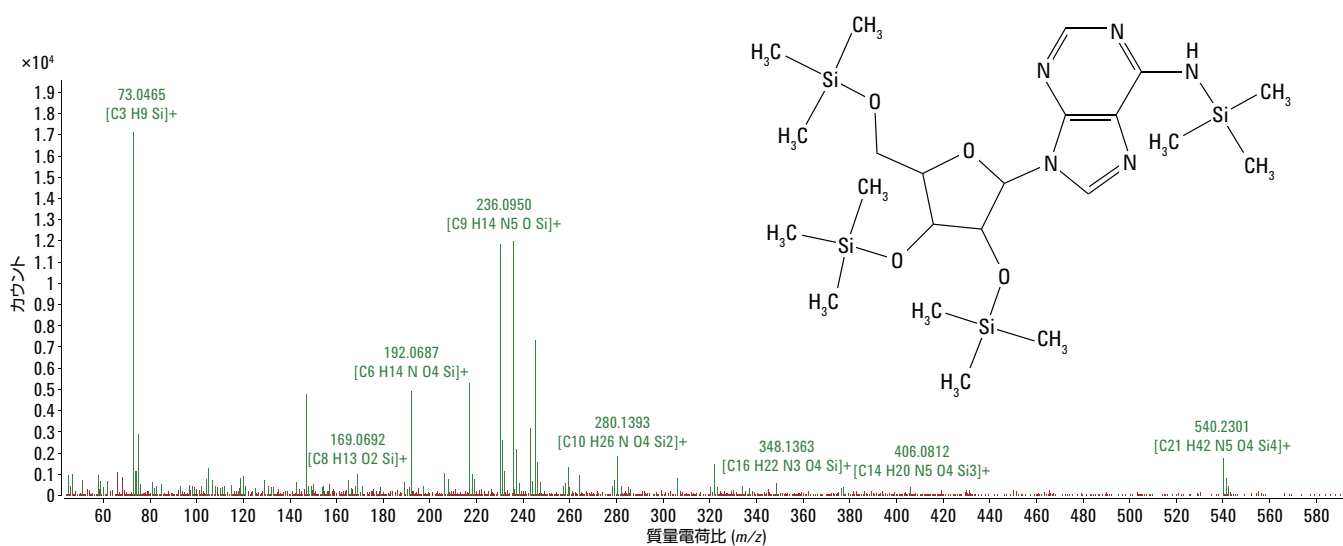


図 2. Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの FFA ツールによりアノテーションがつけられた成分 (アデノシン) のスペクトル。ライブラリヒットが得られると、FFA が自動的に当該分子イオン (MI) を認識し、当該ヒットの分子式および精密質量スペクトルデータをもとに、フラグメント式を割り当てます。これらのアノテーションされたイオンは、緑に色分けされます。イオンフラグメントと良好に一致するものが見つからない場合は、スペクトルの当該イオンは元の色 (赤) で表示されます。

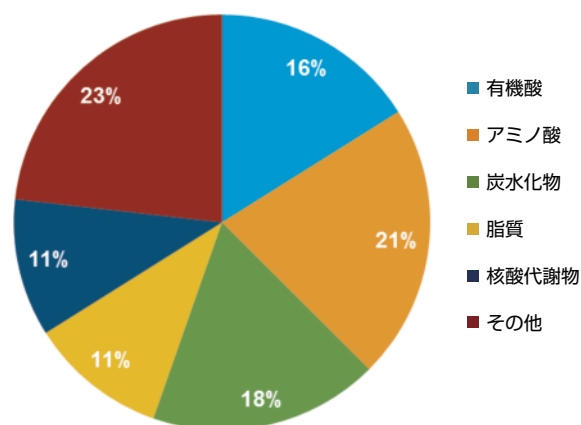


図 3. Agilent-Fiehn ライブラリにより同定された 60 化合物の代謝物種の内訳

Unknowns Analysis ツールを用いたデコンボリューションの完了後、化合物データを xml ベースの化合物交換ファイルフォーマット (.CEF) で保存しました。このファイルを MPP にインポートし、各条件ペアやマウス株で濃度に有意な違いの見られる化合物を特定しました。MPP ワークフローで重要なのは、データ中のノイズの大部分を除外できるように、化合物フィルターを正しく設定することです。これにより、干渉のない統計解析が可能になります。主成分分析 (PCA) により、データ中の固有の分散度を評価したのち (図 4 および 5)、ボルケーノプロットにより有意度および倍率変化分析を視覚化しました (図 6 および 7)。

### 主成分分析によるデータの解析

主成分分析 (PCA) は、データの次元縮小にしばしば用いられる教師なし多変量解析の手法です。PCA では、測定した変数を相関関係のない主成分に変換します。各主成分はオリジナルの変数の線形結合です。図 4 および 5 に、典型的な PCA 分析結果を示しています。この PCA プロットでは、対照群とモルヒネ投与群、および 2 つのマウス株が明確に分離されています。

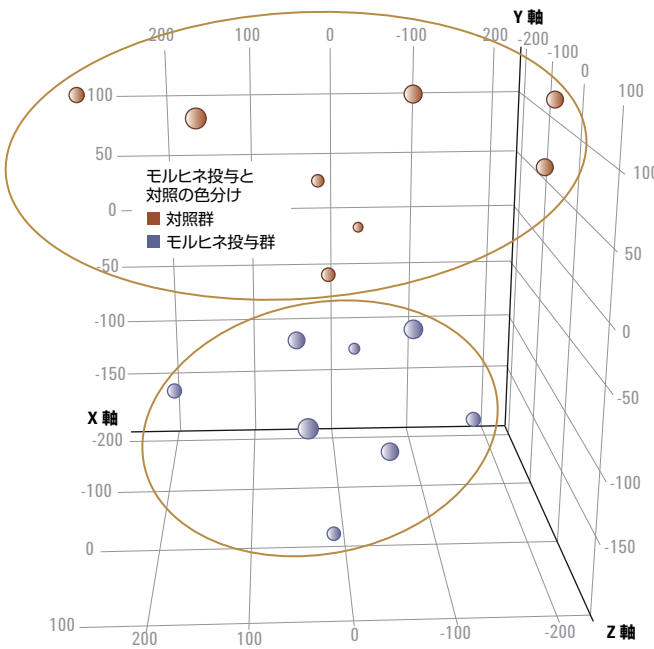


図 4. 129Sv1 株における対照群とモルヒネ投与群の PCA により、2 つの明らかなクラスターが確認されています。クラスタリング分析により、各条件 (対照、赤、モルヒネ、青) について、8 回のバイオロジカルレプリケート (マウス) を解析しました。C57BL/6 株でも同様のプロットが得られました。

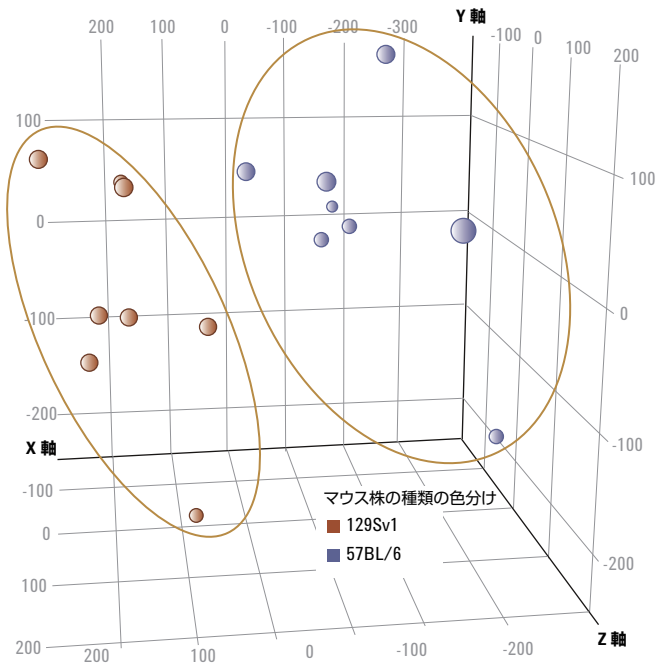


図 5. モルヒネ投与なしのマウス株間比較の PCA では、2 つの明らかなクラスターが示されています。クラスタリング分析により、各マウス株 (129Sv1、赤、57BL/6、青) について、8 回のバイオロジカルレプリケート (マウス) を解析しました。モルヒネ投与後の同じマウス株の比較でも、同様のプロットが得られました。

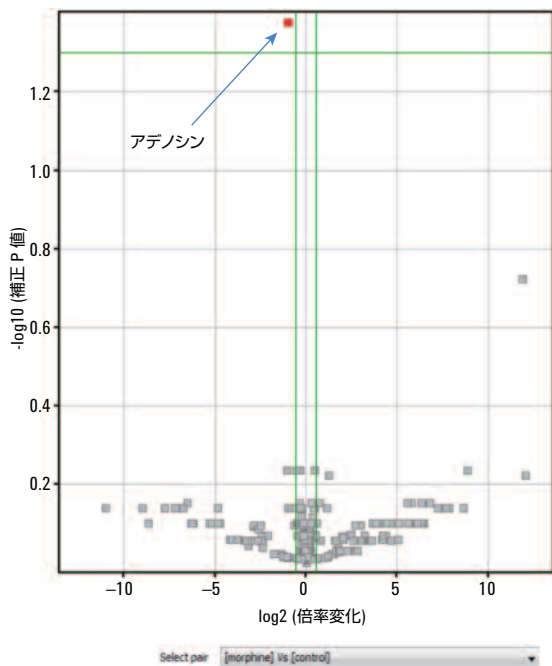


図 6. モルヒネ感受性マウス (C57BL/6) のモルヒネ投与群および対照群について、濃度の倍率変化と確率値の関係を示すボルケーノプロット。C57BL/6 マウス株では、対照群と比べてモルヒネ投与群でアデノシンの濃度が低下しています ( $p < 0.05$ )。2つの条件間で有意な濃度変化が見られた化合物は、アデノシンだけです。緑の線は、 $p = 0.05$  (縦軸) および倍率変化 1.5 (x 軸) のカットオフ値を示しています。

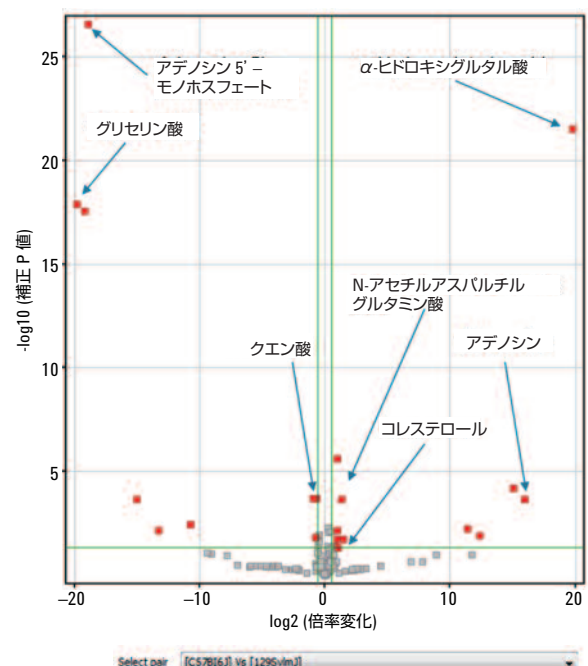


図 7. モルヒネ感受性マウス (C57BL/6) とモルヒネ耐性マウス (129Sv1) について、濃度の倍率変化と確率値の関係を示すボルケーノプロット。2つのマウス株間で、21の化合物で有意な濃度変化が見られています ( $p < 0.05$ )。緑の線は、 $p = 0.05$  (縦軸) および倍率変化 1.5 (x 軸) のカットオフ値を示しています。

## 代謝物の倍率変化分析

PCA に続いて、モルヒネ感受性および耐性マウス (C57BL/6 および 129Sv1) のモルヒネ投与サンプルおよび対照サンプルについて、倍率変化 (FC: Fold Change) 分析を行いました。まず、任意の化合物濃度における各条件およびマウス株間の生物学的に有意な倍率変化の大きさを測定しました。この分析により、任意のクラス間で濃度が大幅に異なる化合物 (エンティティ) を同定しました。

次に、倍率変化により特定された各条件ペアまたはマウス株間の違いが統計的に有意なものか否かを判断するために、一

連の t 検定を実施しました。倍率変化分析の結果および統計的有意性をボルケーノプロットで表示しました。C57BL/6 (モルヒネ感受性) マウスにおけるモルヒネ投与サンプルと対照サンプルの比較により、統計的に有意な変化を示す化合物が、アデノシンだけであることがわかりました。対照と比べて、モルヒネ投与マウスで濃度が低下しました ( $p$ -値  $< 0.05$ 、図 6)。それに対して、モルヒネを投与しない C57BL/6 および 129Sv1 マウスの比較では、 $p$ -値  $< 0.05$  で有意な倍率変化のある多くの化合物 (アデノシン、アデノシン 5'-モノホスフェート、グリセリン酸、コレステロール、神経伝達物質、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸など) が得られました。このことは、2つのマウス株間で代謝が大きく異なることを示しています。

## EI MS/MS および PCI を用いた未知物質の分子式の特定

精密質量/高分解能情報と MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの FFA ツールを用いた Molecular Formula Generation (MFG) を組み合わせれば、各フラグメントの分子式候補を特定することができます。しかし、EI では分子イオンが不明確になることが多いため、正確なアノテーションを確認し、化合物種を絞り込むのは困難です。精密質量 7200 GC/Q-TOF システムの利点の 1 つは、PCI および EI イオン化テクニックを用いた MS および MS/MS により、追加の情報を得られることです。たとえばこの研究では、10.34 分で溶出する未知化合物でその利点が見られます。この物質は、モルヒネ耐性 129Sv1 マウス株ではモルヒネ投与群で対照よりも濃度が高くなりましたが、モルヒネ感受性マウス株では有意な変化が見られませんでした (図 8)。

EI スキャンで得られたイオンについて MS/MS 分析を実施すれば、EI スペクトルに多く存在するプレカーシオンのプロダクトイオンを特定し、干渉を区別することが可能です。この方法を使えば、比較的高い  $m/z$  の干渉イオンを容易に除外することができます。図 9 からは、 $m/z$  129.1022 および  $m/z$  72.0808 のイオンが、プレカーサとして用いた  $m/z$  228.0665 のプロダクトイオンではないことがわかります。実際、129.1022 および 72.0808  $m/z$  イオンのアバンダンスは、2 つのマウス株間で異なりましたが、 $m/z$  228.0665 のイオンとそのプロダクトイオンのアバンダンスは異なっていませんでした。このことは、 $m/z$  228.0665 イオンが、この未知物質と共溶出する別の化合物に属する可能性を示唆しています。このように、MS/MS を用いれば、スペクトル内の干渉を特定することが可能です。

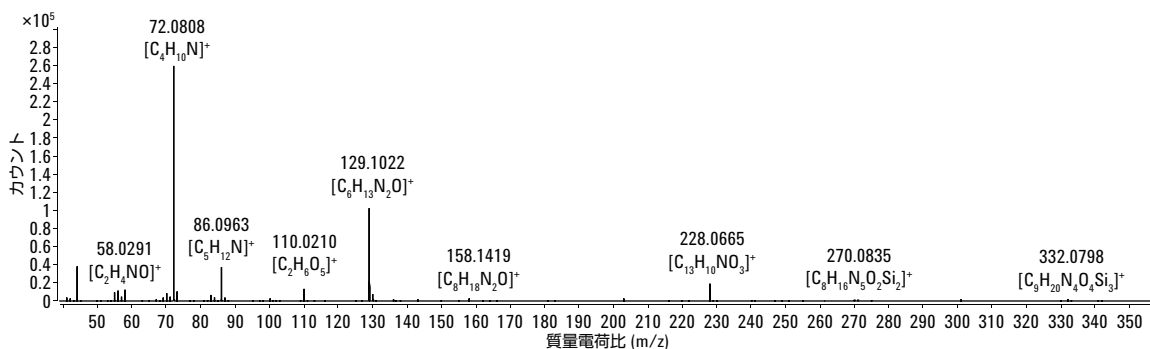


図 8. 10.34 分で溶出する未知物質ピークの EI スペクトル。この物質は、モルヒネを投与した 129Sv1 マウスで濃度の増加が見られました。Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの MFG ツールを用いて、スペクトルにアノテーションをつけています。

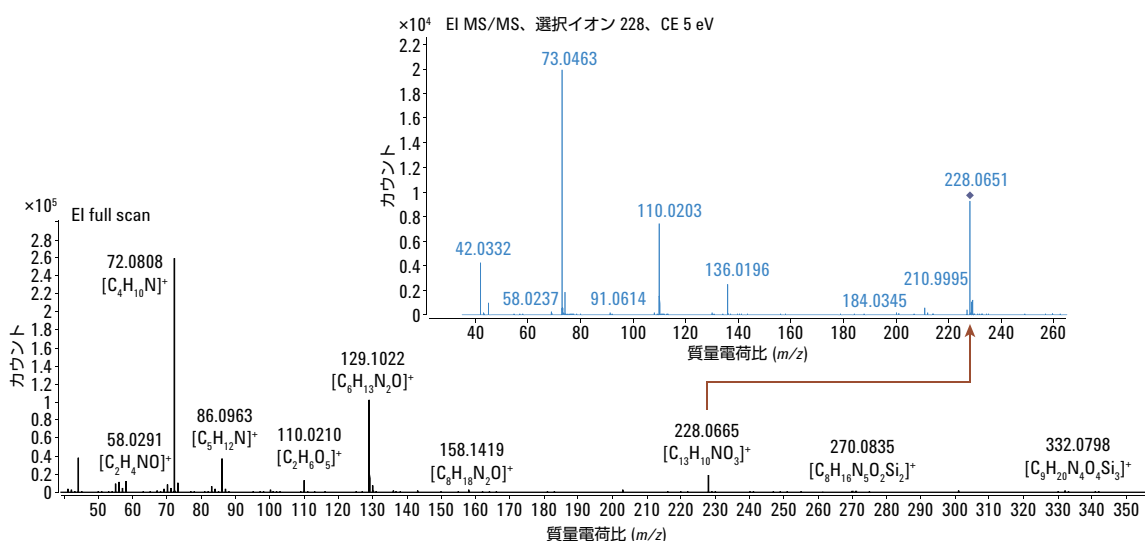


図 9. Agilent 7200 GC/Q-TOF システムで MS/MS 分析をおこなえば、分析対象ピークを汚染している化合物を見つけることが可能です。このケースでは、高いアバンダンス ( $m/z$  72.0808 および  $m/z$  129.1022) をもつスペクトル中の 2 つのイオンが、イオン 228.0665  $m/z$  から派生したものではなく、汚染物質の可能性が明らかになっています。モルヒネ投与群と対照群を比較し、これらのイオンのアバンダンスの変化を追跡することで、この仮説の正しさを確認しました。

その後、メタンを試薬ガスとした MS モードの PCI を用いて、この分子イオンを  $m/z$  158.1419 イオンと特定しました。メタン付加により、分子式を確認することができました ( $C_8H_{19}N_2O$ 、図 10)。高い同位体アバンドンスコアと同位体スペーシングスコアに

より、同定の信頼性が向上しました。正確な分子式を得ることは、化合物同定ワークフローの最初のステップです。そうした分子式は、当該化合物が分析対象なのか、このケースのように分析対象外なのかを判断するのに役立ちます。

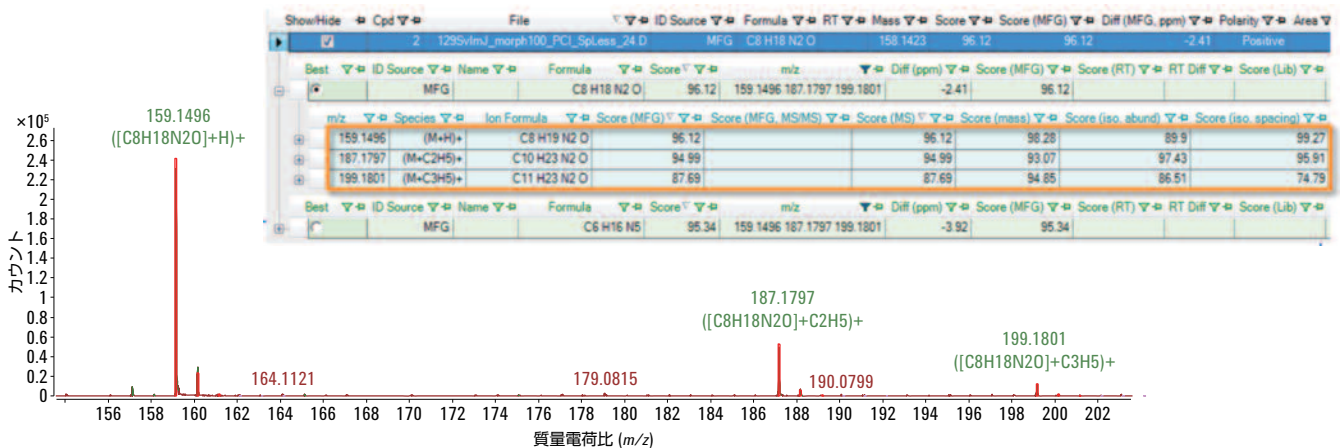


図 10. 10.34 分で溶出する未知化合物のメタン PCI スペクトルデータにより、当該分子イオンが  $m/z$  158.1419 であると確認されています。高い質量精度、同位体アバンドンスコア、同位体スペーシングスコアにより、同定の信頼性が向上しています。FFA を用いて MFG を実行したあとの PCI スペクトルでは、 $m/z$  158.1419 の典型的な PCI メタン付加が示されています：159.1496 (M+H)<sup>+</sup>、187.1797 (M+C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>、199.1801 (M+C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>。理論上の同位体スペーシングアバンドンスコアを赤で重ねて表示しています。スペクトルの上に、FFA ワークフローの結果表を示しています。



## Molecular Structure Correlator ツールを用いた、暫定的に同定された化合物の構造確認

モルヒネ感受性マウス株 C57BL/6 で増加した  $\alpha$ -ヒドロキシグルタル酸は、NIST ライブラリにより暫定的に同定したもので、Agilent-Fiehn RTL ライブラリでは確認されていません。そのため、追加の手順を用いて、この化合物の同定結果を確認しました。まず、EI スペクトルの精密質量情報と MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの MFG ツールを用いて、 $\alpha$ -ヒドロキシグルタル酸とアノテーションされたフラグメントイオンの分子式の一致度を確認しました (図 11)。MSC ソフトウェアを用いて、暫定的に同定された化合物の構造をさらに確認しました (図 12)。

まず、スペクトルを CEF ファイルとして MSC にインポートしたのち、精密質量情報を用いて、MSC によりフラグメント式を予測しました。その後、ChemSpider データベースですべての構造異性体候補を検索しました。 $\alpha$ -ヒドロキシグルタル酸とその他の 2 つの構造で、もっとも高い適合性スコアが得られました (92.88)。高い適合性スコアに加えて、 $\alpha$ -ヒドロキシグルタル酸は、スコアが同じだった他の 2 つの構造に比べて、参考文献の数も多くなりました。この種の確認は絶対確実なものではありませんが、暫定的に同定された化合物を補足的に確認することは可能です。

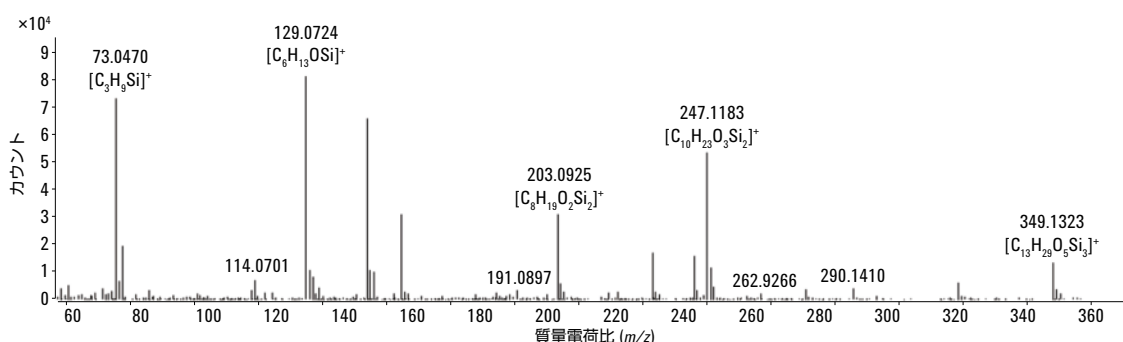


図 11. 精密質量情報と MFG を用いて分子式候補を特定したのち、モルヒネ感受性マウス株 C57BL/6 で増加した化合物を  $\alpha$ -ヒドロキシグルタル酸と同定した分析結果を確認しました。

図 12. Molecular Structure Correlator を用いて、暫定的に  $\alpha$ -ヒドロキシグルタル酸と同定された化合物の構造確認をおこないました。分子式候補に対応する質量エラーと、分子式候補を生成するために切る必要がある結合の数にもとづくペナルティをもとに、各フラグメントイオンをランク付けしています。

## 結論

精密質量情報、フルスペクトルモードの優れた感度、MS/MS機能、EI および CI モードを簡単に切り替えられる機能など、豊富な機能を備えた Agilent 7200 GC/Q-TOF を使えば、メタボロミクス研究を効率的に実施することができます。また、デコンボリューション、統計解析、自動フラグメント式アノテーション、構造解析といった Agilent MassHunter および Agilent Mass Profiler Professional ソフトウェアの多様な機能を使えば、モルヒネ感受性マウス株とモルヒネ耐性マウス株で濃度の異なる代謝物の同定および確認をおこなうことが可能です。GC/MS アプローチと LC/MS アプローチの両方を適用すれば、代謝物をより包括的に分析することができます。このアプリケーションノートで紹介した分析結果は、過去の LC/MS 知見と一致しています [3]。

## 参考文献

1. D. N. Juurlink and I. A. Dhalla, "Dependence and addiction during chronic opioid therapy", *J Med Toxicol* 8, 393-399 (2012).
2. W. Linq, L. Mooney, M. Hillhouse, "Prescription opioid abuse, pain and addiction: clinical issues and implications", *Drug Alcohol Rev* 3, 300-305.(2011).
3. D. Liang, G. Liao, J. Wang, J. Usuka, Y. Y. Guo, G. Peltz, J. D. Clark "A genetic analysis of opioid-induced hyperalgesia in mice", *Anesthesiology* 104, 1054–1062 (2006a).
4. S. B. Smith, C. L. Marker, C. Perry, G. Liao, S.G.Sotocinal, J. S. Austin, K. Melmed, J. D. Clark, G. Peltz, K. Wickman, J. S. Mogil, "Quantitative trait locus and computational mapping identifies Kcnj9 (GIRK3) as a candidate gene affecting analgesia from multiple drug classes", *Pharmacogenet Genomics* 18, 231–241 (2008).
5. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues", *J Biol Chem.*226, 497-509 (1957).

## 詳細

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

June 25, 2013

5991-2481JAJP



**Agilent Technologies**