

HepG2 細胞中の ^{13}C グルコースの 定性フラックス分析

Agilent 6546 LC/Q-TOF と VistaFlux

著者

Siriluck Wattanavanitchakorn
and Sarawut Jitrapakdee
Department of Biochemistry,
Faculty of Science,
Mahidol University,
Bangkok, Thailand

Israr Ansari,
Melissa J. Longacre, and
Michael J. MacDonald
Children's Diabetes Center,
University of Wisconsin
School of Medicine and Public
Health, Madison, WI, USA

Mahmoud El Azzouny and
James Pyke
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA.

概要

Agilent 6546 LC/Q-TOF は、高速な取り込みスピード、優れた同位体比忠実度、広いダイナミックレンジ、高い質量分解能を同時に実現します。フラックス分析で適切な結果を得るためには、同位体比忠実度、高分解能、ダイナミックレンジを同時に実現させる必要があります。Agilent MassHunter VistaFlux ソフトウェアと組み合わせることで、データ取り込みからデータ分析までを網羅した包括的なワークフローとなり、定性フラックス分析を効率的に実行できるようになります。VistaFlux ソフトウェアは、フィーチャー抽出用、同位体取り込みおよび同位体種アブundanceの分析用、天然存在度補正用、統計解析用、代謝経路の視覚化用のツールで構成されています。

このアプリケーションノートでは、 $\text{U-}^{13}\text{C}$ グルコースをトレーサとして使用するヒト癌腫細胞株の定性フラックス分析について説明します。データは 6546 LC/Q-TOF システムで取り込み、MassHunter VistaFlux で解析しました。この研究では、HepG2 細胞の TCA サイクル中のグルコースフラックスに対するピルビン酸カルボキシラーゼノックダウンの効果を示します。

はじめに

安定同位体ラベリングにより、細胞内物質代謝を独自の形で観察できます。メタボロミクスプロファイリングでは、さまざまな代謝物のアバンダンスの適切な概要を得られますが、多くの代謝変化は代謝物レベルで蓄積されたり、減少したりすることはありません。安定同位体追跡により、一般的なメタボロミクスプロファイリングでは得られない洞察に富んだ情報を導き出せます。安定同位体追跡では、同位体種が相互に正規化され、濃縮パーセントが計算されます。細胞数が異なる可能性のある分析困難な生体系で代謝変化を調べる際には、この自己正規化手法により、安定同位体トレーサの研究が優れた選択肢となります。

通常の代謝物の同位体分布を変える、微少なながらも重要な同位体の変化を正確に特定するには、多くの課題があります。質量分析計 (MS) は、複雑なサンプル内の代謝物の適切な同定と定量を実現するために、正確な同位体アバンダンス測定と質量測定の精度を維持しなければなりません。さらに、MS は広いダイナミックレンジと高分解能を同時に提供する必要があります。広いダイナミックレンジが、変化する代謝物濃度や同位体取り込みスピードに対応し、高分解能が共溶出化合物からの干渉を低減します。最後に、データ解析ソフトウェアは同位体種を適切に割り当て、天然同位体補正を実行し、正確なラベルの取り込み総量を提示する必要があります。

6546 LC/Q-TOF と VistaFlux ソフトウェアにより、定性フラックス分析の包括的なワークフローが実現します。6546 LC/Q-TOF は、定性フラックス分析に必要な同位体比忠実度、広いダイナミックレンジ、高い質量分解能を同時に提供します。VistaFlux ソフトウェアは、全面的なデータ解析とフラックスデータの視覚化を提供します。この包括的なワークフローソリューションを、U-¹³C グルコースで処理したビルビン酸カルボキシラーゼノックダウン HepG2 細胞に適用しました。

ビルビン酸カルボキシラーゼ (PC) は、クエン酸サイクル中間体を生成するミトコンドリアアナブレロティック酵素です。この酵素は、肝臓および腎臓での糖新生、脂肪組織での新たな脂肪酸合成、膵β細胞でのグルコース誘発によるインスリン分泌において極めて重要です。近年の研究から、さまざまな同化経路を維持している複数の癌形態にとって PC が重要であることが分かっています。また、これまでに、PC 抑制が浸潤性の高い乳癌細胞の増殖を減速させ、グルコースおよびグルタミンアナブレロティック反応を減少させることが示されています¹。このアプリケーションノートでは、PC 抑制がヒト肝臓癌細胞 (HepG2) に同様の効果を示すことを説明します。

実験方法

細胞培地と試薬

ビルビン酸カルボキシラーゼノックダウン HepG2 細胞は、既報のように、siRNA を使用して調製しました¹。異なる抑制レベルの 5 つの異なるノックダウン細胞株(PC179、PC2096、PC 3436、PC847) を調整しました。約 3×10^6 個の細胞を 60 mm 培地プレートに配置しました。細胞は、10 % (v/v) ウシ胎児血清 (FBS)、100 単位/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養し、2 日間、37 °C、5 % CO₂ で維持しました。3 mM グルコースを含む完全 DMEM 培地に交換し、細胞をさらに 1 日間培養しました。実験当日、0 mM グルコース DMEM とともに 30 分間、細胞をインキュベーションした後、10 mM ¹³C-標識化グルコースを含む 2 mL の DMEM に培地を交換し、細胞を 37 °C で 30 分間培養しました。各細胞株について実験を 3 回繰り返しました。

代謝物抽出

細胞は 150 mM 酢酸アンモニウムで素早く洗浄した後、8:1:1 (v/v/v) メタノール: クロロホルム: 水で抽出し、その後、超音波破碎し遠心分離にかけました。上清を HPLC バイアルに移して注入しました。

LC/MS 分析

6546 LC/Q-TOF と Agilent 1290 Infinity II LC を組み合わせて使用し、データを取り込みました。クロマトグラフィーによる分離を Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、2.1 × 100 mm、2.7 µm (p/n 675775-924) と UHPLC Guard、HILIC-Z、2.1 mm × 5 mm、2.7 µm (p/n 821725-947) で実行しました。最初に 10× 移動相緩衝液原液 (100 mM 酢酸アンモニウム、pH 9.0) を水で調製した後、水 (A) またはアセトニトリル (ACN、B) のどちらかを加えて最終移動相を調製しました。グラジエント溶出中に一定の濃度を保持するために、InfinityLab 不活性化添加剤 (p/n 5191-4506) を水系と有機溶媒系の両方の移動相に添加しました。プールされたサンプルとブランクを分析して、クロマトグラフィーの安定性を確認できるようにしました²。

ソフトウェアパッケージ

- MassHunter Acquisition ソフトウェア、バージョン 10.0
- Agilent Profinder V10.0
- Omix Premium V1.9.30
- PCDL Manager B.08
- Agilent MassHunter Pathways to PCDL ソフトウェア B.08

表 1. LC および MS パラメータ

パラメータ	設定値	MS 条件	
LC 条件		MS システム	6546 Q-TOF LC/MS
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、 2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 675775-924) と UHPLC Guard、HILIC-Z、2.1 mm × 5 mm、2.7 μm (p/n 821725-947)	イオン源	Agilent Jet Stream を使用
移動相	A) 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液、 pH 9、5 μm 不活性化添加剤入り (p/n 5191-4506) B) 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液/ACN 10:90 (v:v)、 pH 9、5 μm 不活性化添加剤入り (p/n 5191-4506)	極性	ネガティブ
流量	0.25 mL/min	ガス温度	200 °C
グラジエント	0 から 2 分、90 %B 2 から 12 分、90 %B ~ 60 %B 12 から 15 分、60 %B 15 から 16 分、60 %B ~ 90 %B 16 から 24 分、90 %B	ドライガス	10 L/min
カラム温度	25 °C	ネブライザ圧力	40 psi
注入量	1 μL	シースガス温度	300 °C
オートサンブラ温度	6 °C	シースガス流量	12 L/min
		キャピラリー電圧	3,000 V
		ノズル電圧	0 V
		フラグメンタ	125 V
		スキマ電圧	65 V
		オクタポール 1 RF 電圧	750 V
		取り込み範囲	m/z 50 ~ 1,000
		参照質量	m/z 980.01638 および 119.0363

データ解析

Agilent MassHunter Pathways to PCDL ソフトウェアを使用し、BioCyc から得られたトリカルボン酸 (TCA) サイクルの化合物情報に基づきパーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) ファイル (.cdb) を作成しました。さらに、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸をカスタム PCDL に加えました。代謝物のリテンションタイムをカスタム PCDL に追加して、この PCDL を Profinder のバッチ同位体種抽出用のデータベースとして使用しました。Profinder で得られた結果をエクスポートして Omix Premium ソフトウェアで視覚化しました。図 1 に、データ解析ワークフローの概要を示します。

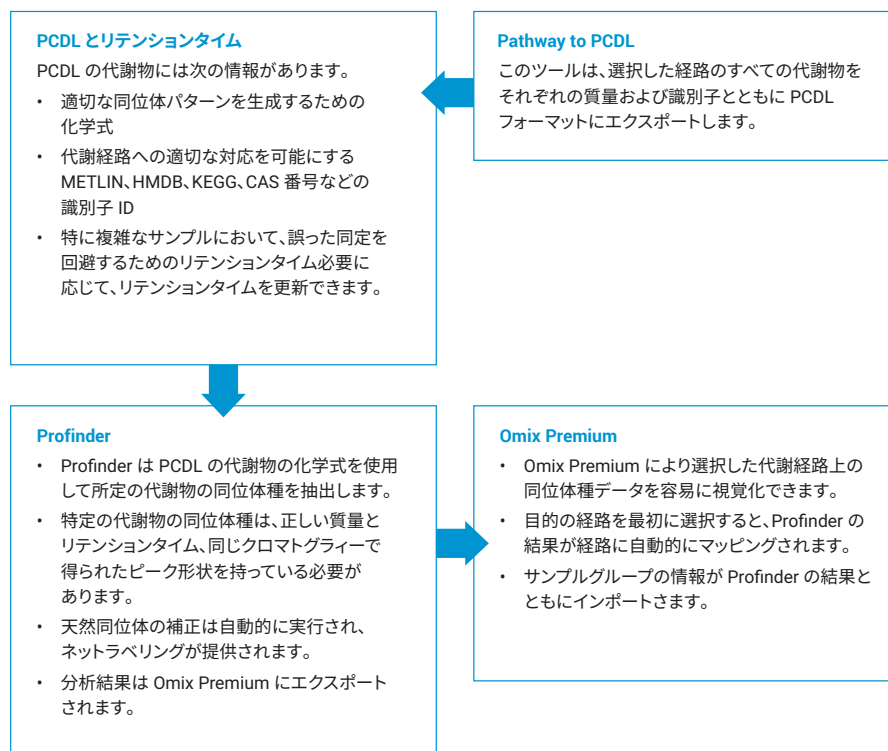


図 1. VistaFlux データ解析ワークフローの概要

結果と考察

フラックスサンプルは 6546 LC/Q-TOF MS で分析しました。図 2 に、リンゴ酸同位体種を 40,000 以上の分解能で分析した MS スペクトルの代表的な例を示します。7 回のテクニカルレプリケートにおけるすべての同位体種強度は 5 % 未満の CV でした (図 3)。6546 Q-TOF の高分解能により、潜在的な干渉が低減し、データ分析の信頼性が向上します。同位体比再現性が優れているため、定性フラックス分析において困難になる低い取り込みレートの検出が可能になります。

Profinder でのバッチ同位体種抽出は、同位体種データを解析するための最も容易で効果的な方法です。これには、リテンションタイム、精密質量、クロマトグラフィーで得られたピーク形状を基に同位体種を同定するアルゴリズムが含まれており、偽陽性を減らすことができます。すべての代謝物について、すべての同位体種のデータを手動で確認しました (図 4)。グループに対して補正済みアバundance またはパーセント濃縮度が個別または組み合わせて示され、再現性を評価できます (図 4)。U-¹³C グルコースは、HepG2 コントロール細胞内のグルタミン酸において主要なラベル化物として $m+2$ を与えます。一方、ピルビン酸カルボキシラーゼノックダウン細胞では比較的低いラベル化率を示します (図 4)。経路上のすべての代謝物を視覚化するために、結果を Profinder アーカイブファイル (.PFA) として Omix Premium にエクスポートしました。Profinder アーカイブファイルには、天然に存在する同位体を補正した結果とともに、サンプルグループ情報と化合物同定機能が含まれています。

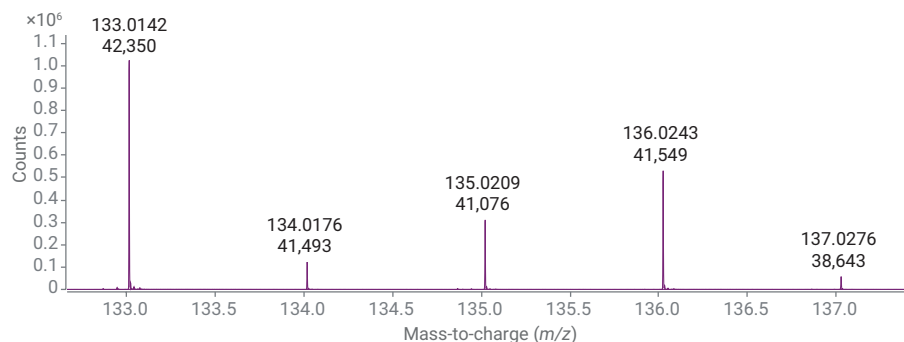


図 2. リンゴ酸同位体種の質量スペクトルと、各イオンピークへの m/z および 分解能の記載

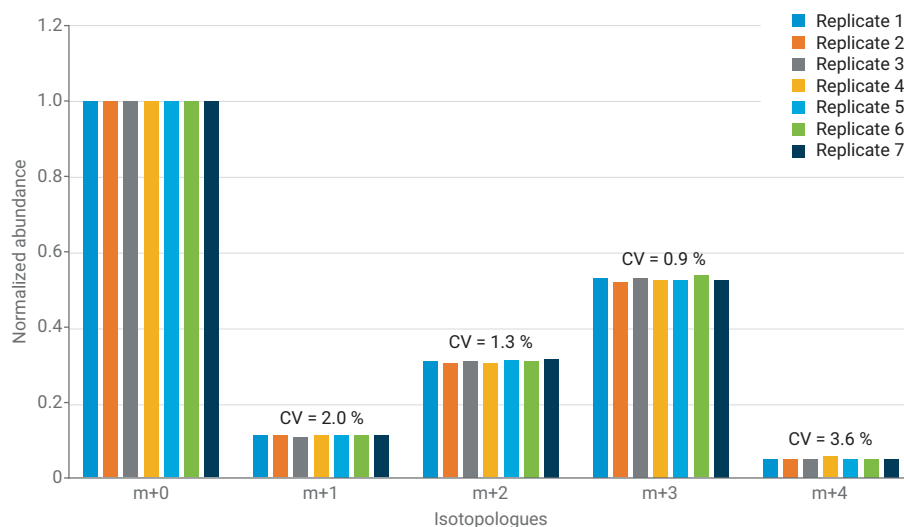


図 3. 7 回のテクニカルレプリケートにおけるすべてのリンゴ酸同位体種の変動係数 (CV%)

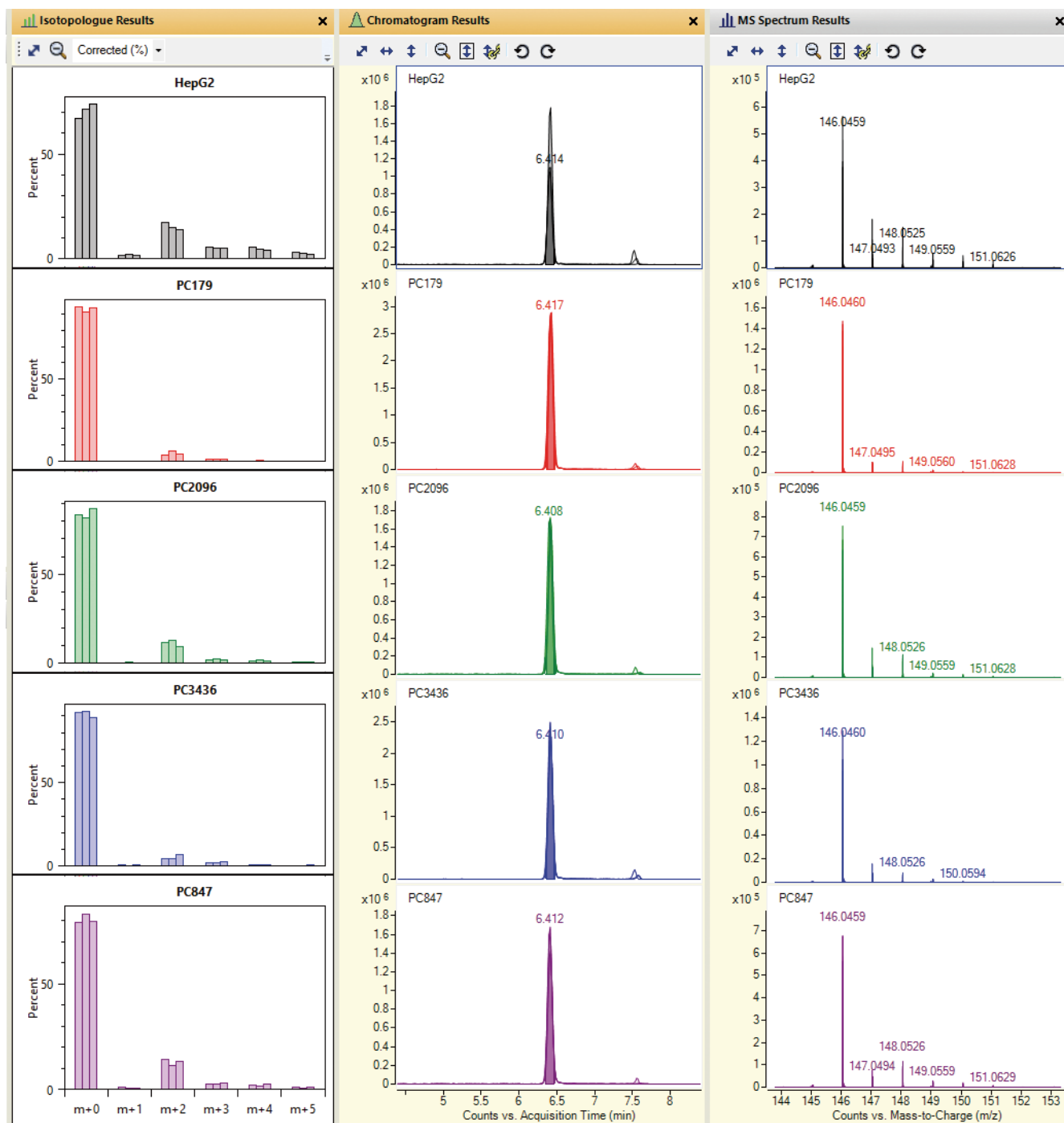


図 4. Profinder での同位体種、クロマトグラム、MS スペクトル結果の視覚化

Omix Premium では、定性フラックスデータの視覚化および解釈用に設計されたグラフィックオプションを利用できます。絶対量または同位体濃縮比のいずれかを使用し、結果を複数の方法で表示できます。クエン酸の分析結果は、HepG2 コントロール細胞内で約 50 % のラベル化率を示したのに対し、PC-ノックダウン細胞内はわずか 25 % 程度でした。ピルビン酸カルボキシラーゼノックダウンによって TCA サイクルへのグルコースのフラックスが減少することを示唆しています (図 5A)。クエン酸の合計アバundanceは、ノックダウン細胞内ではわずかに少ないものでしたが、ラベル化クエン酸のアバundanceは大幅に低いものでした (図 5B)。つまり、ノックダウン細胞により TCA サイクルの代謝回転が減少しているか、または細胞がグルタミン酸などの他のアナプロレティック源に依存し、グルコースフラックスの減少の代わりに TCA サイクルを補充しているからです。

詳細なラベリングパターンを理解するために、ギルトプロットなどの他の表示形式や、個々の同位体種濃縮プロットを使用して表示しました (図 6)。これらのプロットから、今回の $U-^{13}C$ グルコースによる短時間のインキュベーションでは、最も存在量が多いラベル化炭素数が $m+2$ と $m+3$ であることは明白です。インキュベーションの時間が長くなるとTCA サイクルでの回転数が増え、より多くの炭素がラベル化されます。 $m+2$ 、 $m+3$ 、 $m+4$ 、 $m+5$ などの大半の同位体種が、他の細胞と比べるとHepG2 細胞内でより濃縮されました。このことは、ノックダウン細胞では、コントロール細胞よりも TCA サイクルの代謝回転が少ないことを示唆しています。

グルタミン酸が PC ノックダウン細胞内の TCA サイクルを補充していたかを評価するために、グルタミン酸のアバundanceとその同位体種に注目しました。ラベルのないグルタミン酸 ($m+0$) (図 7) は、ノックダウン細胞中により多く蓄積されており、消費量が少なかったことを示しています。対照的に、HepG2 コントロール細胞中では TCA サイクルでより活発に消費され、グルタミン酸が HepG2 細胞内でアナプロレティック基質として働いたことが示唆され

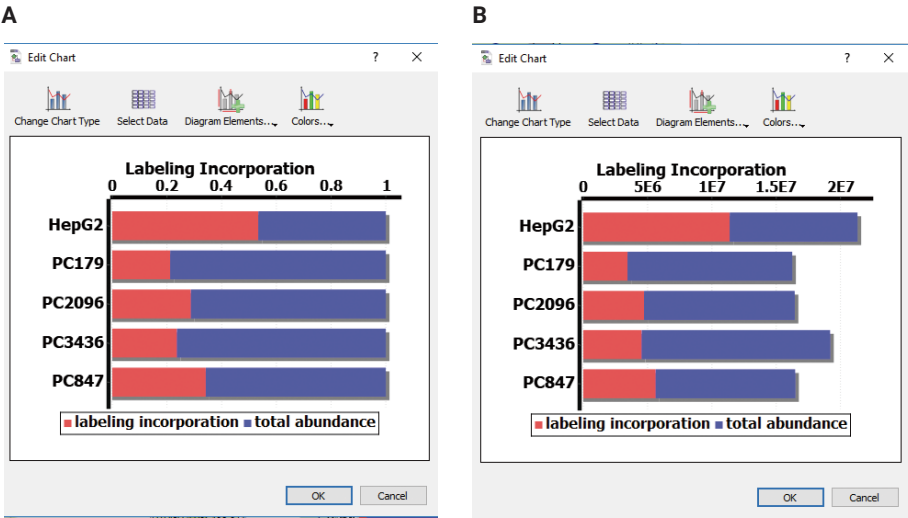


図 5. Omix Premium ソフトウェアにおけるフラクションのラベル取り込み率 (A) またはアバundance (B) を用いたクエン酸分析結果

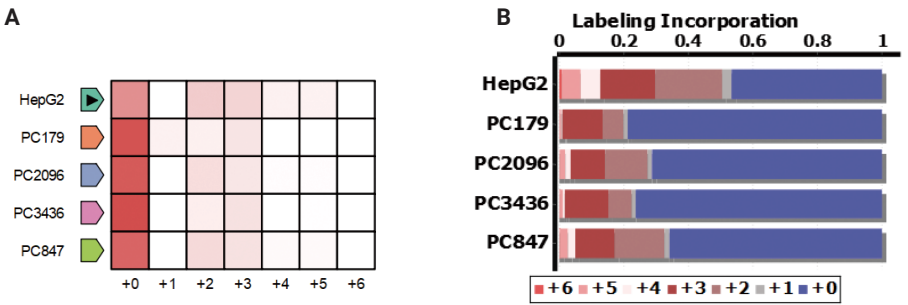


図 6. Omix Premium ソフトウェアに表示されたクエン酸ラベリングのギルトプロット (A) または個別の同位体種濃縮プロット (B)

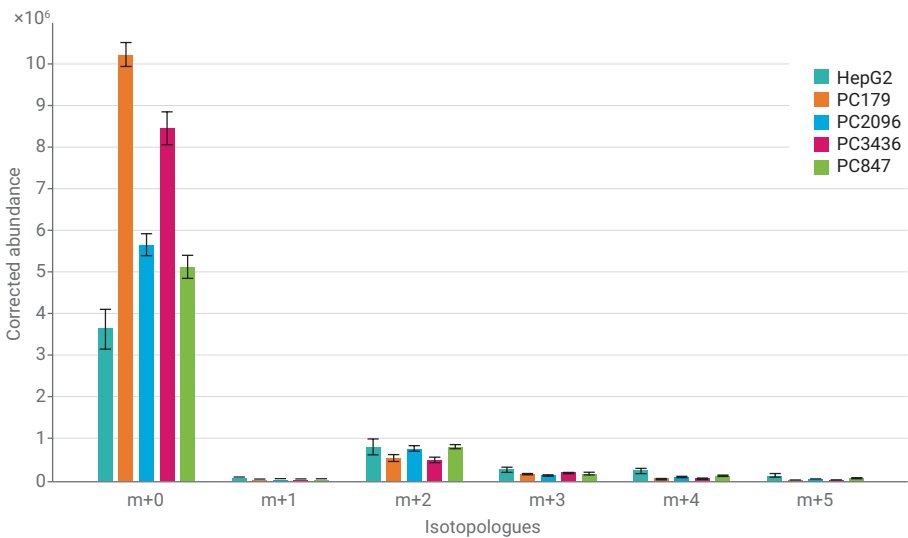


図 7. Omix Premium ソフトウェアに表示されたグルタミン酸同位体種のアバundance

ています。ノックダウン細胞内でのグルタミン酸の働きははるかに小さいものでした。このように、ピルビン酸カルボキシラーゼノックダウンは、TCA サイクル内でグルコースフラックスを変えるだけでなく、TCA サイクルへのグルタミン酸のアナプレロティック反応を低減しまし

た。これらのデータは、乳癌細胞でのグルコースおよびグルタミンアナプレロティック反応への PC ノックダウンの効果と合致しています¹。図 8 は、TCA サイクルに対応した各代謝物とそれぞれの濃縮比の概要を示しています。

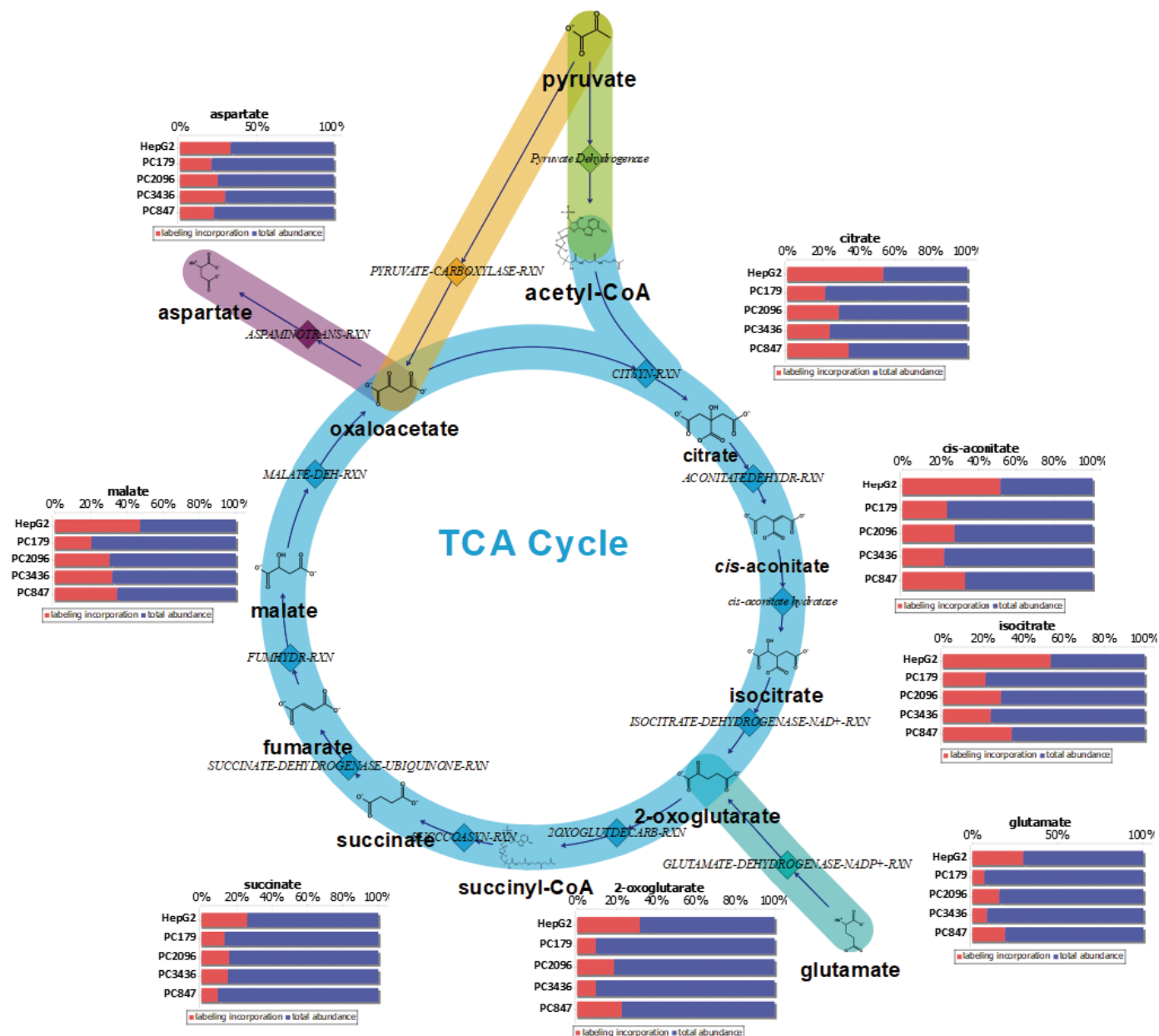


図 8. Omix Premium ソフトウェアに表示された TCA サイクルと関連代謝物ラベリング

結論

6546 LC/Q-TOF は安定同位体標識体の追跡に適した同位体比忠実度、高分解能、ダイナミックレンジを提供します。VistaFlux ソフトウェアと組み合わせることで、定性フラックス分析を実行するための包括的なワークフローソリューションが実現します。このワークフローにより、HepG2 細胞のピルビン酸カルボキシラーゼ酵素ノックダウンではグルコース酸化が少ないことが示されました。グルコース酸化の低下は、グルタミン酸のアナプレロティック反応を低減させます。

VistaFlux ワークフローは、同位体種情報の抽出、天然同位体アバUNDANCEの補正、分析結果の視覚化のための高速かつ強力なソリューションとなります。

参考文献

1. Phannasil. P.; *et al.* Mass spectrometry analysis shows the biosynthetic pathways supported by pyruvate carboxylase in highly invasive breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **2017**, 1863(2), 537–551.
2. Hsiao, J. J.; *et al.* Monitoring of Mammalian Cell Culture Media with HILIC LC/MS. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0024EN, **2018**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, February 21, 2019

5994-0713JAJP