

反復 MS/MS データ取り込み、 Lipid Annotator ソフトウェア、 6546 LC/Q-TOF を組み合わせた 血漿リポドームの分析範囲の改善

著者

Jeremy Koelmel
Department of Chemistry,
University of Florida,
Gainesville, FL, USA

Mark Sartain, Juli Salcedo,
Adithya Murali, Xiangdong Li,
and Sarah Stow
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

はじめに

質量分析ベースのリポドミクスにおける重要な課題は、生体サンプル内で濃度が広範囲にわたる、大規模で多様な脂質種の包括的な特性解析を行うことです。ショットガンリポドミクスにより脂質分析の分野は発展しましたが、同重体種の区別ができないなどの限界に悩まされています。この種は、生物学的な重要性があるとしても、イオン化抑制によりダイナミックレンジを狭めてしまっている可能性があります。このような理由から、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と高分解能質量分析 (MS) を組み合わせて用いる、クロマトグラフィーベースの脂質プロファイリング手法に至りました。

in silico 生成データベースとのプロダクトイオンのスペクトル照合を実行可能にするには、信頼性の高い脂質アノテーションにおいて、MS/MS レベルのデータ取り込みが必要になります。ただし、LC 分離は異性体の脂質種の解明と複雑さの低減には役に立ちますが、データ依存の高分解能 MS/MS データは、クロマトグラフィー溶出時のフラグメンテーションで選択可能なプリカーサの数によって制限されます。このため、複雑なサンプルでは、対象の MS/MS スペクトルすべてを 1 回の分析で取り込むことは不可能です。濃度にバイアスが存在するため、この手法では低アバUNDランスの重要な脂質種を見落とす可能性があります。

このアプリケーションノートでは、これらの課題に対する解決策について説明します。今回は逆相 (RP) クロマトグラフィーを用いました。この手法は、異性体脂質の多くの事例を解決するのに適しており、血漿¹、組織²、および細胞脂質を包括的な方法でプロファイリングする際に一般的に選択される手法です。この LC 分離を Agilent 6546 LC/Q-TOF と組み合わせました。この質量分析計は広いダイナミックレンジを実現すると同時に、取り込みスピードに影響されない高い分解能を備えています。また、完全自動化 Q-TOF 反復 MS/MS 取り込みモードについても評価しました。このモードは、サンプルを複数回注入し、前回 MS/MS フラグメンテーションで選択されたプリカーサをローリングベースで排除します。これらの結果は、反復 MS/MS により血漿リポドームの分析範囲を大幅に改善できることを示しています。反復 MS/MS データは、包括的なリポドミクスワークフローの一部として、Agilent Lipid Annotator ソフトウェアで使用できます。

実験方法

試薬および調製

すべての試薬と溶媒には、HPLC または LC/MS グレードのものを使用しました。アセトニトリル、メタノール、およびイソプロパノールは Honeywell (モリスタウン、ニュージャージー州、米国) から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm ユースポイントメンブレンフィルタカートリッジ (EMD Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで調製しました。フッ化アンモニウムおよび LC/MS グレードの酢酸アンモニウムは Millipore Sigma (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。NIST SRM 1950 ヒト血漿は Millipore Sigma から購入しました。

サンプル前処理

NIST SRM 1950 血漿を氷の上で解凍し、血漿脂質を改変 Folch 抽出法により抽出しました。メタノール (400 μL) を 2 mL エッペンドルフチューブ内の 50 μL 解凍済み血漿に加え、短時間ボルテックスしてから洗浄槽内で 5 分間超音波にかけました。クロロホルム (800 μL) を加え、1 分間ボルテックスしました。相分離を誘導するために、240 μL の水を加えました。次にこの混合物を 1 分間ボルテックスし、4 °C、16,000 × g で 2 分間遠心分離しました。下部層をガスタイトガラスシリンジで注意深く採集し、2 mL Agilent A-Line 褐色ガラスバイアルに移しました。残りの中間層と上部層を再抽出するために、900 μL のクロロホルム/メタノール/水 (86:14:1) 溶液を加え、この混合物を 1 分間ボルテックスして再度遠心分離しました。2 回の 50 μL 抽出により混合された下部層を混合し、真空濃縮器で乾燥させました。乾燥させた脂質抽出物を 100 μL のメタノール/クロロホルム混合物 (9:1、v/v) で再溶解して 1 分間ボルテックスし、不活性化 250 μL オートサンブラガラスインサートに移してから LC/MS 分析を行いました。ポジティブモード分析では、合成ゴムセプタム (p/n 5181-1212) で密閉し、2 μL 注入を実施しました。ネガティブモード分析では、PTFE/シリコン/PTFE セプタム (p/n 5185-5861) で密閉し、5 μL 注入を実施しました。

装置構成

LC システム

Agilent 1290 Infinity II LC システム (以下の機器で構成されます)

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ、サーモスタット付 (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)

MS システム

Agilent Jet Streamを搭載した Agilent 6546 LC/Q-TOF

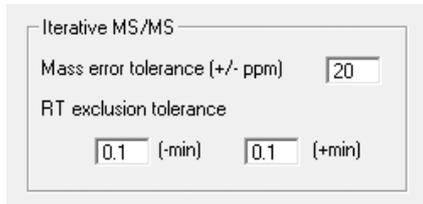
メソッド

データは、従来の自動 MS/MS メソッドまたは後述する反復 MS/MS メソッドを使用して測定しました。表 1 と表 2 に、クロマトグラフィー条件と 6546 Q-TOF のパラメータを示します。

表 1. クロマトグラフィー条件

パラメータ	Agilent 1290 Infinity II LC																		
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)																		
ガードカラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 5 mm、2.7 μm (p/n 823750-911)																		
カラム温度	50 °C																		
注入量	2 μL (ポジティブ)、5 μL (ネガティブ)																		
オートサンブラ温度	50 °C																		
ニードル洗浄	洗浄ポート (50:50 メタノール/イソプロパノール) で 15 秒																		
移動相	A) 10 mM 酢酸アンモニウム、0.2 mM フッ化アンモニウムの 9:1 水/メタノール溶液 B) 10 mM 酢酸アンモニウム、0.2 mM フッ化アンモニウムの 2:3:5 アセトニトリル/ メタノール/イソプロパノール溶液																		
流量	0.6 mL/min																		
グラジエントプログラム	<table border="1"><thead><tr><th>時間 (分)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>70</td></tr><tr><td>1.00</td><td>70</td></tr><tr><td>3.50</td><td>86</td></tr><tr><td>10.00</td><td>86</td></tr><tr><td>11.00</td><td>100</td></tr><tr><td>17.00</td><td>100</td></tr><tr><td>17.10</td><td>70</td></tr><tr><td>19.00</td><td>70</td></tr></tbody></table>	時間 (分)	%B	0.00	70	1.00	70	3.50	86	10.00	86	11.00	100	17.00	100	17.10	70	19.00	70
時間 (分)	%B																		
0.00	70																		
1.00	70																		
3.50	86																		
10.00	86																		
11.00	100																		
17.00	100																		
17.10	70																		
19.00	70																		
ストップタイム	19 分																		
ポストタイム	なし																		
実測カラム圧力	170 ~ 330 bar																		

Acquisition Method Editor 内の反復 MS/MS パラメータを、次のように設定しました。



反復 MS/MS を起動するために、取り込みワークリストを次のようにして設定しました。

- 右クリックし、**Add Columns** (カラムの追加) を選択します。
- **MS Parameter** (MS パラメータ) の Column Type (カラムタイプ) で使用可能なカラムから、**Iterative** (反復) を選択します (図 1)。
- Iterative (反復) 列に **Start** (開始) または **Reset** (リセット) と入力します (図 2)。これは、反復セットの開始を示します。これにより、以前のローリング排除リストをリセットし、新しい排除リストを開始します。
- 以降の反復注入を使用し、かつ排除リストに追加するように指定するには、**Iterative** (反復) またはその他の単語を入力します。
- 空白のセルは、注入が使用もせず排除リストにも追加しないことを示しますが、ワークリストはリセットしません。ただし、完全または部分的 (タイムセグメント) ターゲット MS/MS またはスキャン (MS のみ) 取り込みメソッドでは、ローリング排除リストがリセットされます。

Inj Vol (µl)	Iterative	Comment
As Method	start	
As Method	iterative	
As Method		

図 2. 反復 MS/MS のワークリスト設定

表 2. 546 Q-TOF 自動 MS/MS パラメータ

パラメータ	6546 LC/Q-TOF
ガス温度	200 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ (psig)	50
シーガス温度	300 °C
シーガス流量	12 L/min
VCap	3,500 V (+), 3,000 V (-)
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ	150 V
スキマ電圧	65 V
オクタポール RF Vpp	750 V
参照質量	m/z 121.050873, m/z 1221.990637 (+) m/z 119.03632, m/z 980.016375 (-)
MS および MS/MS 範囲	m/z 40 ~ 1,700 (+)
最小 MS および MS/MS 取り込みスピード	3 スペクトル/秒
選択幅	狭い (~ 1.3 m/z)
コリジョンエネルギー	20 eV (+), 25 eV (-)
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	3
プリカーサアバンダンスベースのスキャンスピード	あり、ターゲット 25,000 カウント/スペクトル
MS/MS 累積時間制限を使用	あり
ターゲット TIC に到達できないプリカーサの除去	なし
MS/MS のスレッショールド	5,000 カウントと 0.001 %
アクティブな排除の有効化	あり、1 回繰り返して 0.05 分間排除
純度	厳密性 70 %、カットオフ 0 %
同位体モデル	一般的な有機分子
プリカーサでのソート	1、2、不明
静的排除範囲	m/z 40 ~ 151 (+) m/z 40 ~ 210 (-)

Add Columns

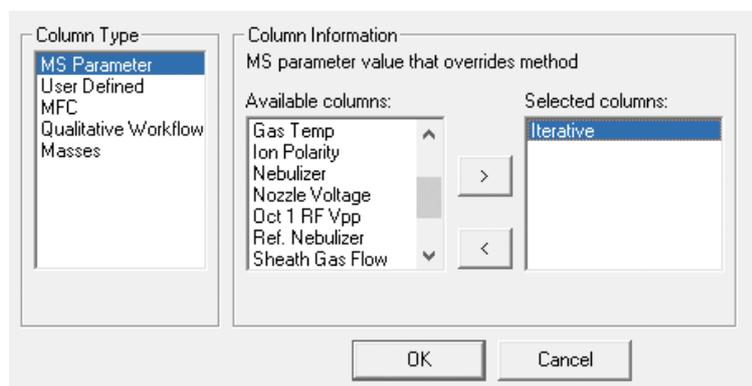


図 1. Add Columns (カラムの追加) ダイアログボックス

ソフトウェア

6546 LC/Q-TOF システムの操作には、Agilent MassHunter Q-TOF Data Acquisition バージョン 10 を使用しました。その他のすべてのデータ解析には、Agilent MassHunter Lipid Annotator バージョン 1.0 を使用しました。メソッドパラメータにはデフォルト値を使用しましたが、ポジティブイオンモード分析では $[M+H]^+$ と $[M+NH_4]^+$ プリカーサのみを考慮し、ネガティブイオンモード分析では $[M-H]^-$ と $[M+HAc-H]^-$ プリカーサのみを考慮しました。エクスポートしたアノテーションの管理と編集には、Agilent MassHunter PCDL Manager バージョン B.08 SP1 を使用しました。

結果と考察

Lipid Annotator ソフトウェアによる血漿の反復 MS/MS データの分析

信頼性の高い脂質のアノテーションでは、*in silico* 生成データベースとのプロダクトイオンのスペクトル照合を実行可能にするために、MS/MS レベルでのデータ取り込みが必要になります。今回の研究では、新たなソフトウェアツール (Lipid Annotator) をベイズスコアリング、確率密度アルゴリズム、および非負最小二乗適合と組み合わせて使用することにより、Kind など^{3,4} が開発した理論的脂質ライブラリ (改変 LipidBlast) を検索し、MS/MS スペクトルのアノテーションを行いました。Lipid Annotator では、MS/MS スペクトルによる信頼性の高いレベルの構造情報のみを提供することにより、脂質物質を過度にアノテーションしないよう特別の注意を払っています。

これまでに、Q-TOF 反復 MS/MS 取り込みモードは、モノクローナル抗体の詳細なペプチドマッピングに効果的であることが示されました⁵。今回 6546 LC/Q-TOF で、このモードの反復取り込みを複雑な脂質サンプルに適用しました。図 3 に、反復 MS/MS の手法を示します。最初の注入は、従来のデータ依存 (従来型) 自動 MS/MS 分析として実行されます。この場合、アクティブな排除リストにより、フラ

グメンテーションでは上位 N 個の高アバンドのプリカーサが選択されます。以降の注入では、カスタマイズ可能な質量誤差許容範囲とリテンションタイム排除許容範囲を使用して、前回の注入の MS/MS フラグメンテーションで選択されたプリカーサをローリングベースで排除します。

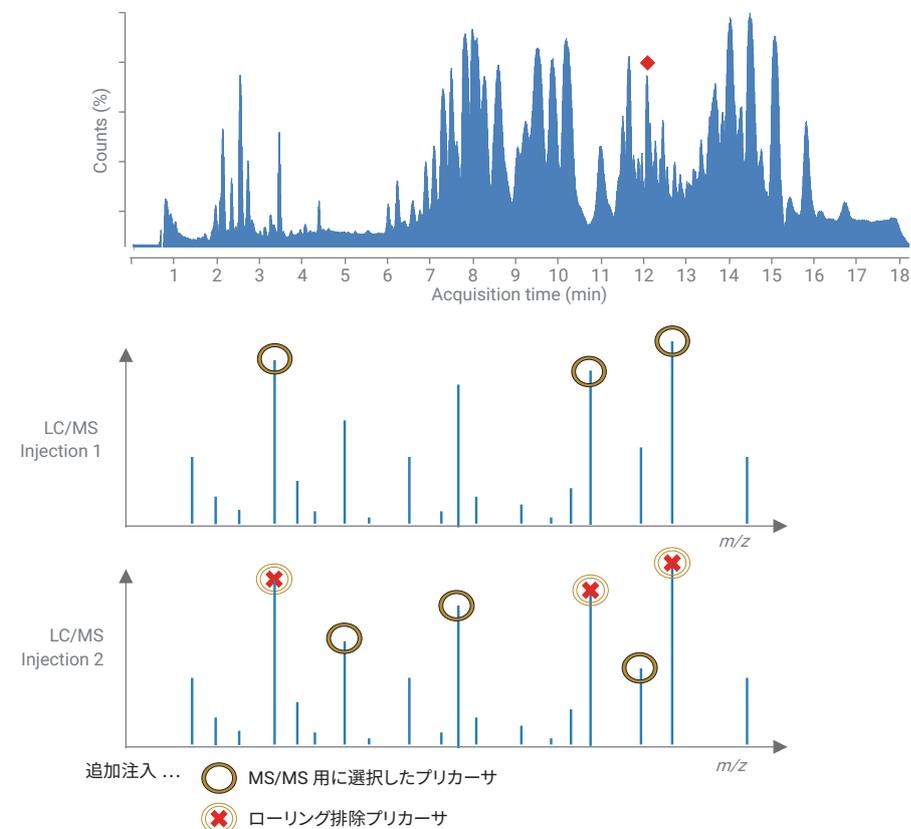
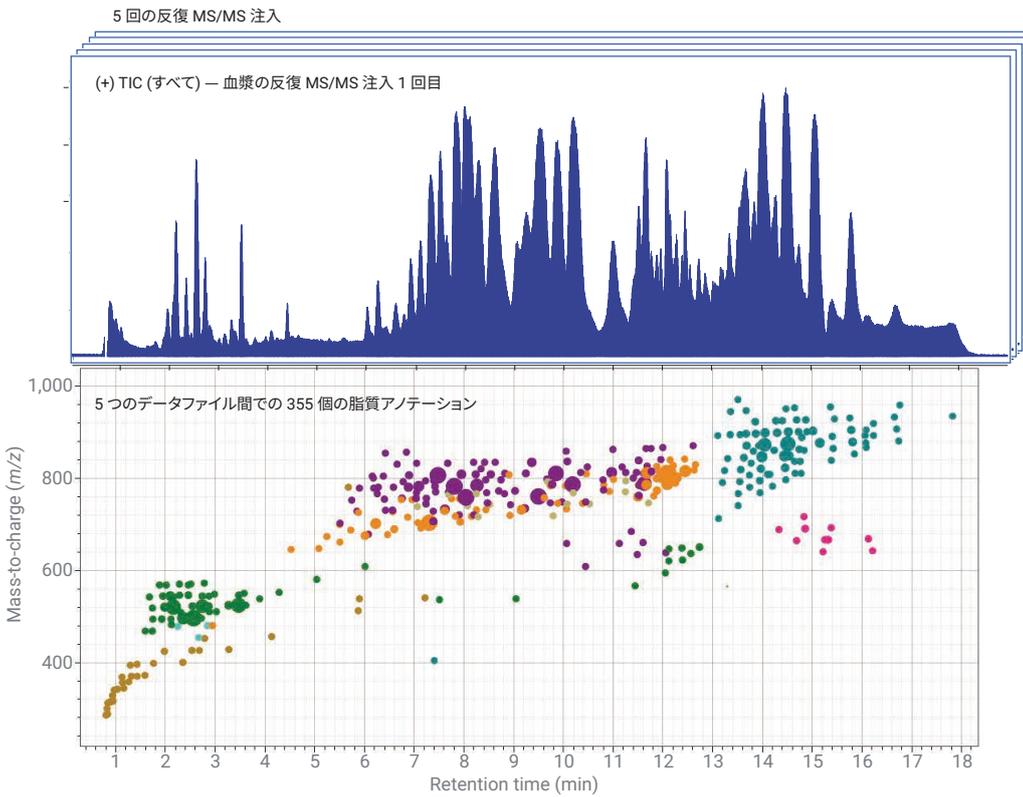


図 3. 反復 MS/MS の原理

Lipid Annotator には、サンプル源が同じ複数の MS/MS データファイルを同時に 1 バッチとして分析する機能があります。図 4 に、5 回の血漿反復 MS/MS データファイルの分析

結果を示します。5 回のポジティブイオンモードのデータファイル間でアノテーションされた 14 クラスを示す 355 個の特定の脂質 (RT が異なる異性体を含む) が存在しました。別に、

5 回のネガティブイオンモードの反復 MS/MS データファイルを 1 バッチとして分析した結果、20 の脂質クラスを示す 326 個の特定の脂質が存在しました (図示なし)。



脂質クラス
クラスあたりの脂質数

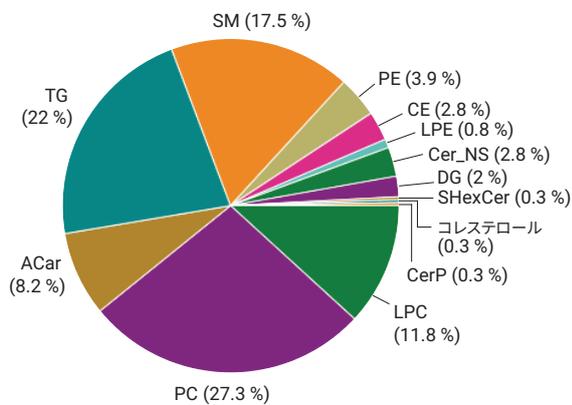


図 4. Lipid Annotator ソフトウェアのビューで並べた、ポジティブイオンモードにおける血漿の代表的なトータルイオンクロマトグラム (TIC)。5 回の反復 MS/MS データファイルを結合した分析結果を示しています。アノテーションされた脂質フィーチャーを m/z 対リテンションタイムとしてプロットしており、円グラフに対応する脂質クラス別に色分けしています。ここでは、アノテーションされた脂質の数をパーセンテージとして示しています。

反復 MS/MS による脂質の アノテーション数の増加

複数の反復 MS/MS データ取り込みファイル間での血漿内累積脂質アノテーション数は、従来の自動 MS/MS ファイルと比較して増加しました (図 5)。これらの結果からわかることは、本研究で用いたメソッドパラメータによる血漿内の包括的な脂質のアノテーションでは、3~5 回の反復 MS/MS 注入で十分であるということです。血漿は一般的で複雑な組成を持つ生体サンプルですが、ここで重要なのは、最適な注入回数はサンプルの複雑さおよび LC/MS 取り込みメソッドパラメータに応じて異なる可能性があるということです。ポジティブモードでの血漿抽出の場合、5 回の連続注入に対して反復 MS/MS を適用すると、5 回の連続注入間で従来の自動 MS/MS 取り込み (n = 223) と比較して、アノテーションされた独自の脂質の分析範囲が 69 % (n = 355) 増加しました (図 5A)。同様に、血漿のネガティブモード分析では、従来の MS/MS (n = 243) と比較して、反復 MS/MS の 5 回の注入 (n = 326) により 34 % 多い脂質のアノテーションが得られました (図 5B)。これらの結果を総合すると、1 回のクロマトグラフィー分析で多数の脂質プリカーサのスペクトル密度が得られることから、LC/MS/MS ベースのリビドミクスデータ取り込みに反復 MS/MS を用いると、特にポジティブイオンモードで優れた結果が得られます。

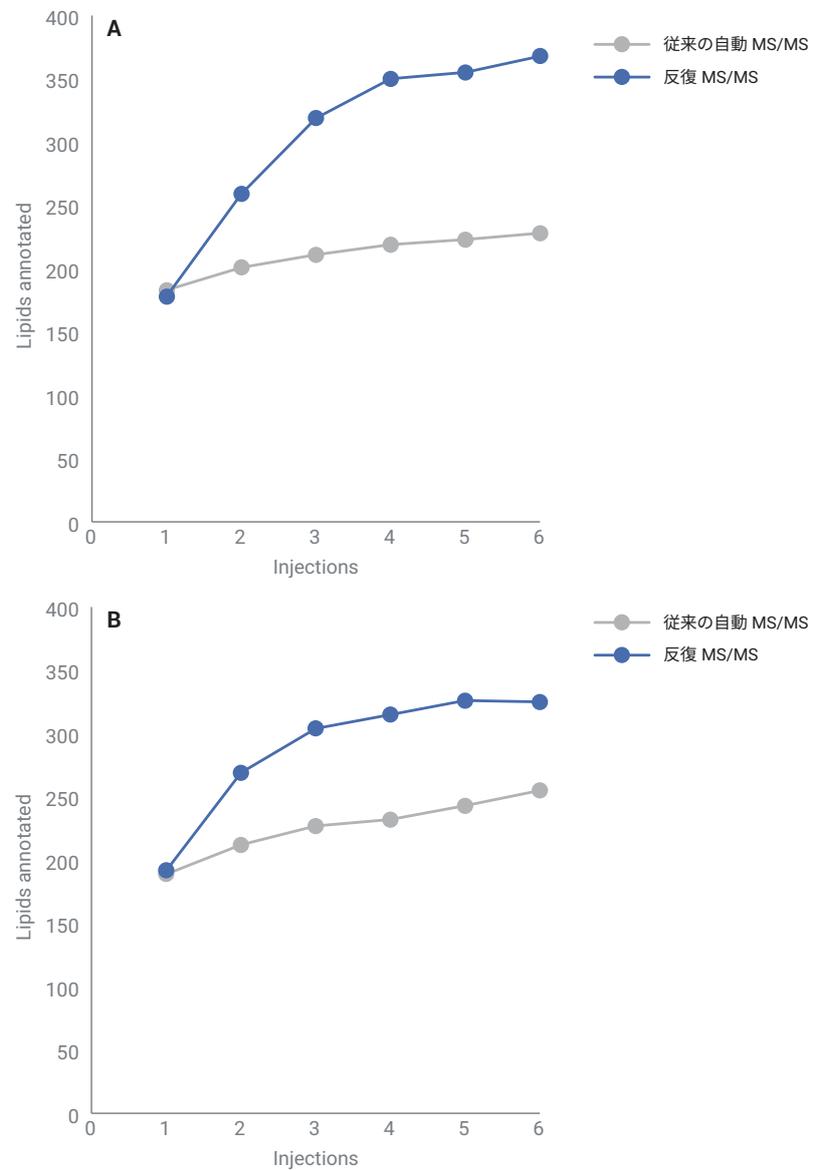


図 5. ポジティブ (A) およびネガティブ (B) イオン化モードの複数のデータ取り込みファイル間での Lipid Annotator ソフトウェアによりアノテーションされた独自の累積脂質フィーチャー

反復 MS/MS による、低アバンドンスの脂質イオンおよび特定の脂質クラスの増加

反復 MS/MS モードでの高アバンドンス脂質プリカーサの連続排除の場合と同様に、トリガー脂質プリカーサの平均ピークアバンドンスは、ポジティブ (図 6A) およびネガティブ (図 6B) 両方の極性データセットにおいて最初の 3 回の血漿の注入間で減少しました。さらに、2 回目の注入でアノテーションされた脂質のピークアバンドンスは、ポジティブおよびネガティブ両方の極性データセットで初回の注入より大幅に低くなりました (t-test p-value <0.001)。

アバンドントなプリカーサを反復して排除することにより、反復 MS/MS では、低アバンドンス (例えば、ジアシルグリセロール)、イオン化が低効率 (例えば、遊離コレステロール)、またはクロマトグラムのスペクトル密集領域に存在 (例えば、トリアシルグリセロール) する脂質クラスが増加することがわかりました。表 3 は、反復 MS/MS の連続注入により、従来の自動 MS/MS と比較して脂質クラスが大幅に増加した例を示しています。

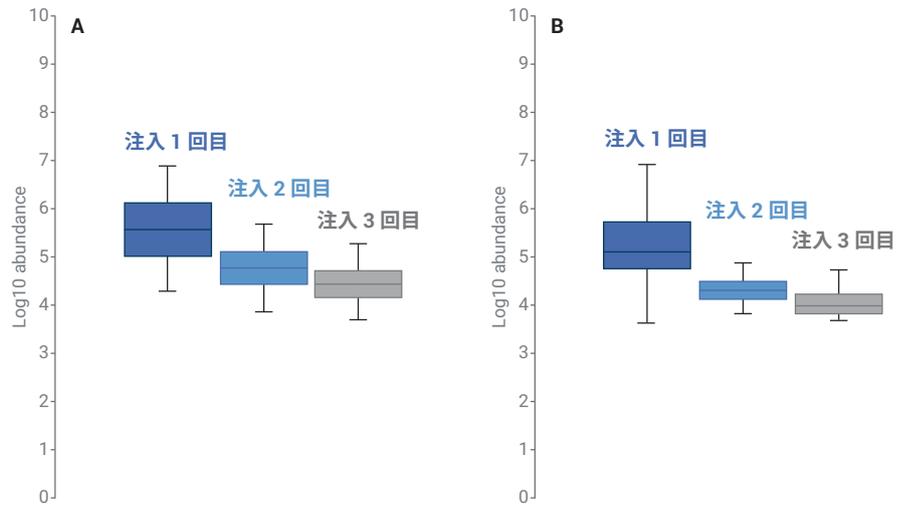


図 6. ポジティブ (A) およびネガティブ (B) イオン化モードの 3 回の連続反復 MS/MS 注入でアノテーションされた脂質に対応するフィーチャーアバンドンスのボックスプロット

表 3. 反復 MS/MS により大幅に増加した脂質クラス。従来の自動 MS/MS と反復 MS/MS データ取り込みで比較した、5 回の連続注入でアノテーションされた脂質の累積数を示しています。

脂質クラス (極性)	アノテーション数 自動 MS/MS	アノテーション数 反復 MS/MS
セラミド非ヒドロキシ脂肪酸スフィンゴシン (+)	2	10
コレステロールエステル (+)	4	10
遊離コレステロール (+)	0	1
ジアシルグリセロール (+)	1	7
ホスファチジルエタノールアミン (+)	2	14
トリアシルグリセロール (+)	46	78
エーテル結合ホスファチジルコリン (-)	17	28
リゾホスファチジルイノシトール (-)	5	9
ホスファチジルエタノールアミン (-)	9	20

図 7 は、増加した脂質クラスの具体的な例について示しています。ここでは、連続注入での MS/MS フラグメンテーションに対して、低アバンドランスのコレステロールエステルに対応するプリカーサが選択されました。

脂質異性体を考慮した MS/MS 取り込みパラメータの最適化

血漿脂質の最適分析範囲を確保するには、MS/MS 取り込みメソッドパラメータが重要なことがわかりました。最初のステップとして、Lipid Annotator で自動 MS/MS または 反復 MS/MS データファイルに対してフィーチャー検出アルゴリズムを使用します。フィーチャー検出は MS1 レベルで実行され、次のステップで MS/MS スペクトルが各フィーチャーと関連付けられます。関連付けられた MS/MS スペクトルのフィーチャーのみが、生成されたフィーチャーテーブルに格納されます。Lipid Annotator によるフィーチャー検出では、1 つのクロマトグラフィーで得られたピークにおいて最低 4 点の MS1 データポイントの使用を推奨します。したがって、この最低要件を満た

すサイクル時間を確保するために、MS/MS 取り込みパラメータ (取り込みスピードおよび 1 サイクルあたりのプリカーサ数) を最適化する必要があります。今回の研究で使用した分離メソッドと血漿サンプルにより、脂質のクロマトグラフィーによるピーク幅が約 6 ~ 14 秒の範囲で、平均ピーク幅が約 8 秒であることがわかりました。したがって、最小観察ピーク幅が 6 秒の場合、サイクル時間 1.43 秒を生成するように MS/MS パラメータを調整しました。これにより、最も狭いクロマトグラフィーで得られたピーク間でも最低 4 点が確保されます。

反復 MS/MS 取り込みパラメータは、特に脂質異性体の場合のリピドームアノテーションに対して重要なことがわかりました。この状況において、複数のアノテーションされた脂質フィーチャーが同じ合計成分 (および同じプリカーサ m/z) を持つがリテンションタイムは異なるように脂質異性体を定義します。ただし、これらのいくつかの場合には、MS/MS スペクトルにより、異性体の差異が構成要素レベル

で詳細に提供されました。例えば、エステル化脂肪酸アシル群に関する情報です (例えば、PC 18:2_18:2 対 PC 16:0_20:4)。血漿を分析することにより、多数の脂質異性体を検出しました。ここでは、355 個のうち 164 個 (ポジティブモード)、および 326 個のうち 143 個 (ネガティブモード) のアノテーションされた脂質が脂質異性体であることを示していました。ワークフローで脂質異性体が見落とされないように、アクティブな排除ウィンドウと反復 RT 排除許容範囲を十分に低く設定し、プリカーサ質量が同じで近接して溶出する異性体が MS/MS に対してトリガーされるようにする必要があります。図 8 に、ピーク幅が狭く近接して溶出するリゾホスファチジルコリン (LPC) 異性体ペアの代表的な例を示します。

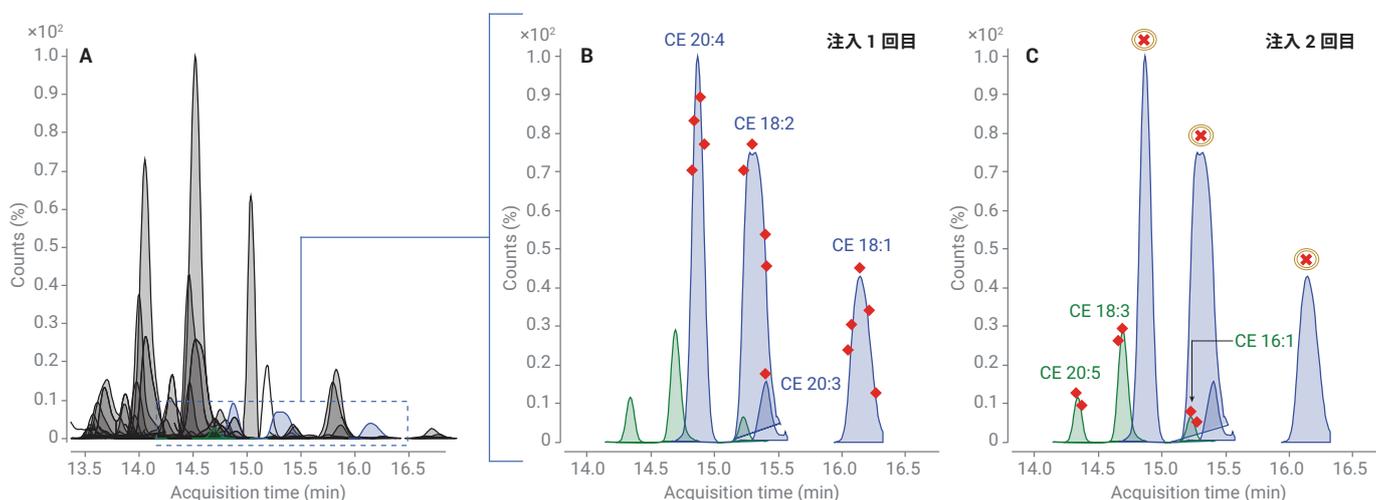


図 7. 反復 MS/MS により血漿脂質抽出から選択されるコレステロールエステル (CE) プリカーサが増加。A) アノテーションされたトリアシルグリセロール (TG) 脂質が密集したリテンションタイム領域の抽出 MS/MS クロマトグラムの重ね表示 (黒いフィーチャー)。B) 最初の注入のフラグメンテーションで 4 つの独自 CE 脂質プリカーサ (青いフィーチャー) が選択されました。C) 高アバンドランスの CE (× 記号) と TG (図示なし) の排除後、次の注入で低アバンドランスの独自 CE プリカーサ (緑のフィーチャー) がさらに 3 つ選択されました。赤のひし形はクロマトグラムでの MS1 スキャンを示しており、ここでは MS/MS に対して CE $[M+NH_4]^+$ プリカーサが選択されました。

結論

このアプリケーションノートでは、LC/Q-TOF データ取り込みの反復 MS/MS モードが、複雑なサンプル中の脂質アノテーションを改善するための優れた手法を提供することを実証しました。血漿脂質の抽出に適用することにより、アノテーションされた脂質の合計数が大幅に増加し、反復 MS/MS により低アバンドンスの脂質クラスが増加しています。

Lipid Annotator ソフトウェアには、反復 MS/MS データを利用して幅広いアノテーション分析範囲を持つカスタム PCDL ライブラリを自動的に生成する機能があります。RT 情報を持つこれらのライブラリは、アジレントのリビドミクスソフトウェアワークフローの重要な要素であり、脂質のアノテーションから差分解析まで、ターゲットおよびノンターゲットの脂質プロファイリングに対応しています。

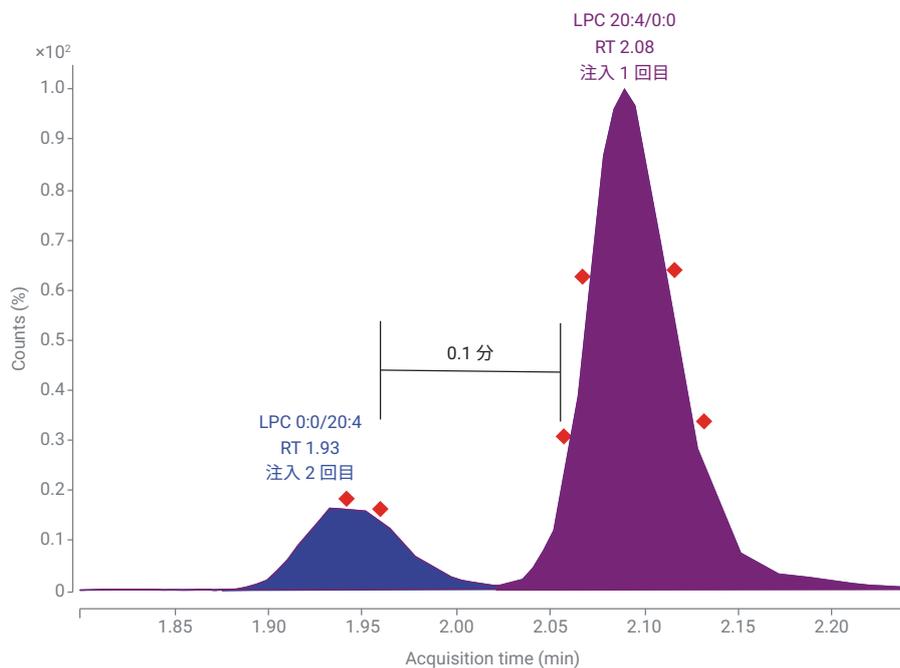


図 8. 脂質異性体に対して最適化された反復 MS/MS パラメータ。Lipid Annotator ソフトウェアでアノテーションされた 2 つのリゾホスファチジルコリン (LPC) 20:4 異性体に対する抽出イオンクロマトグラムを示しています。赤のひし形は仮定の MS1 スキャンを示しており、ここでは MS/MS に対して LPC 20:4 [M+H]⁺ プリカーサ m/z 544.3398 がトリガーされています。反復 RT 排除許容範囲を ± 0.1 分に設定することにより、以降の注入で MS/MS に対して近接 LPC 異性体の同じプリカーサ m/z (± 20 ppm) が確実に取り込まれました。

参考文献

1. Cajka, T.; Fiehn, O. LC/MS Method for Comprehensive Analysis of Plasma Lipids. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-9280, **2018**.
2. Sartain, M.; Sana, T. Impact of Chromatography on Lipid Profiling of Liver Tissue Extracts. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5494, **2015**.
3. Kind, T.; *et al.* LipidBlast *in silico* tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nature Methods* **2013**, *10*(8), 755–758
4. Tsugawa, H.; *et al.* MS-DIAL: data-dependent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods* **2015**, *12*(6), 523–526.
5. Wu, L.; Wong, D. L. An Integrated Workflow for Peptide Mapping of Monoclonal Antibodies. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8633, **2017**.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, March 26, 2019
5994-0775JAJP