

イオンペア dMRM LC/QQQ による 腸内微生物叢由来のインドール代謝物の 定量

著者

Jiye Cheng^{1,2}, Carolina B. Livi³,
and Siddarth Venkatesh^{1,2}

- 1 Edison Family Center for
Genome Sciences and
Systems Biology
- 2 Center for Gut Microbiome
and Nutrition Research,
Washington University in
St. Louis, St. Louis, MO
63108 USA
- 3 Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, 95051 USA

概要

健康・疾病研究においてヒト腸内微生物叢の役割への関心が急激に高まったことで、多様な化合物群からなる微生物叢由来の代謝物の定量が必要とされるようになりました。こういった状況を受け、アジレントは、200 種類を超える中心炭素代謝物を効率的に分離する、再現性と堅牢性に優れたイオンペア逆相 (IP-RP) ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) メソッドを開発しました。このアプリケーションノートでは、宿主の代謝経路と免疫経路との相関性が認められたトリプトファン代謝物およびインドール代謝物の測定を目的とした、この IP-RP dMRM メソッドの拡張について取り上げます。拡張 IP-RP dMRM メソッドでは、関連する生体サンプル中に存在するこれらの化合物を広いダイナミックレンジにわたって高感度検出することができます。

はじめに

腸内微生物叢は、生物の3つのドメインすべてに属する、細菌のメンバーを主とした何十兆もの微生物で構成され、宿主の生態に幅広い影響をおよぼす多数の代謝物群を産生します^{1~4}。必須アミノ酸であるトリプトファン、インドール異化産物は、宿主の生理機能に有益な効果を与える代表的な微生物代謝物群です。

食物由来のトリプトファンは、摂取後に以下の複数のステップを経ます。

- ペプチドおよびタンパク質に取り込まれる
- 宿主の異化作用により、律速酵素であるトリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼおよびトリプトファンヒドロキシラーゼの活動を通して、それぞれキヌレニンとセロトニンになる
- 腸内微生物叢のメンバーにより、トリプトタミン、インドール-3-酢酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-乳酸、インドールなど、さまざまな異化産物に変換される^{5,6}

インドール代謝物は、最終的なクリアランスを高めるために、肝臓でさらに硫酸化されてインドキシル硫酸になります。

インドール代謝物は、多様な活動機構を通して宿主の生態を調節します。例えば、クロストリジウムスポロゲネスは、トリプトファンを代謝してインドール-3-プロピオン酸を産生します。この化合物は、プレグナンX受容体(PXR)の内因性リガンドであり、オクルディン、ゾヌリン-1、E-カドヘリン、クローディン7などのタイトジャンクション構成タンパク質の発現を誘発して腸バリア完全性を改善します⁷。同様に、いくつかのペプトストレプトコッカス種によって産生されるインドールアクリル酸には抗炎症効果があり、この化合物を使用したヒト末梢血単核球の治療は、LPS刺激に対するIL-6およびIL-1の分泌の低下につながります⁸。

一部のインドール代謝物は、アリール炭化水素受容体(AhR)の内因性リガンドであり、上皮内 $\gamma\delta$ T細胞、調節性T細胞、およびIL-22などのサイトカイン産生に作用することで、抗炎症効果および抗菌効果を誘導します^{9,10}。ミクログリア細胞はその代表例であり、AhR依存的にトリプトファン由来のインドキシル-3-硫酸を使用し、実験的自己免疫性脳脊髄炎の症状を改善します¹¹。近年の研究により、ラクトバチルスロイテリが、AhRを活性化し、CD4+上皮リンパ球からCD8 α 細胞へのリプログラミングを引き起こすインドール-3-乳酸の産生菌であることが示されました¹²。興味深いことに、クローン病および潰瘍性大腸炎の患者でも、糞便中のトリプトファンおよびインドール-3-酢酸のレベルの低下およびキヌレニンのレベルの増加が認められています^{13,14}。また、トリプトタミンは、上皮GPCR5-HT4受容体を活性化し、cAMP依存的に結腸のアニオンフラックスを増加させます¹⁵。

腸内微生物叢由来の代謝物は徐々に解明されつつありますが、多様な化合物群からなる代謝物を正確に定量するためのアッセイは、まだ広く利用できる状況にありません。この度アジレントは、あらゆる生物の中心炭素代謝に関わるものを主とした、幅広い化合物クラスの200種類以上の代謝物を効率的に分離できるIP-RP dMRMメソッドを開発しました。このアプリケーションノートでは、微生物由来の代謝物のサブセットを含む、一般的なインドール代謝物群にも対応できるようにすることを目的とした、IP-RP dMRMメソッドの拡張ステップについて説明します。

実験方法

サンプル前処理

インドール-3-アセトアミド、インドール-3-酢酸、インドール-3-酪酸、インドール-3-カルボアルデヒド、インドール-3-カルボン酸、インドール-3-乳酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-ピルピン酸、インドキシル硫酸、トリプトホール、キヌレニン、キヌレニン、キノリン酸、キサントレン酸、および5-ヒドロキシトリプトファンをSigma-Aldrich社から購入し、それぞれ濃度1 mg/mLのメタノール溶液を調製しました。これらの標準物質を組み合わせ、3種類の混合液を調製しました。その際、各混合液に含まれる化合物相互の分子量差が2ダルトン以下にならないようにしました。混合液中の各標準物質の最終濃度は100 μ g/mLとしました。

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II LC
- Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS

MSパラメータ、クロマトグラフィー、およびグラジエントの分析条件は、メタボロミクスdMRMメソッド(アジレントのクイックスタートガイド「MassHunter Metabolomics Dynamic MRM Database and Method」、G6412-90006 Revision A、5991-6467ENを参照)を使用しました。

アジレントのメタボロミクスdMRMメソッドへの新しい化合物の追加

アジレントのダイナミックマルチプルリアクションモニタリング(dMRM)では、MRMトランジションをリテンションタイムでスケジュールすることで、データ品質を損なうことなく、より多くの代謝物を1回で分析できます。そのため、このメタボロミクスdMRMメソッドに新しい化合物を追加するには、まず新しい化合物のリテンションタイムを特定する必要があり、それをもとに各化合物の取り込みパラメータを最適化することができます。

- **ステップ 1.** dMRM メソッドに追加する新しいインドール代謝物のリテンションタイムを特定するために、この dMRM メソッドをスキャンメソッドに変更しました。
- **ステップ 2.** Agilent MassHunter Optimizer を使用して、インドール代謝物の MRM トランジション、フラグメンタ電圧、およびコリジョンエネルギーパラメータを最適化しました。新しいすべての化合物には、Optimizer の注入モードを使用しました。
- **ステップ 3.** Optimizer による MRM 取り込みパラメータの最適化後、リテンションタイム、MRM トランジション、フラグメンタ電圧、およびコリジョンエネルギーパラメータを元のメタボロミクス dMRM メソッドにインポートし、新しいファイル名で保存しました。

結果と考察

この改良 IP-RP dMRM メソッドを使用して、調査対象の微生物叢由来のインドール代謝物を分離しました (図 1)。リテンションタイムとピーク面積レスポンスは、どちらも優れた再

現性 (3 回の測定で RSD < 5 %) を示しました。このことは、調査対象のすべての代謝物で 100 nM を下回っていた定量下限においても同様でした。

表 1. dMRM メソッドに追加したトリプトファン化合物とインドール化合物

化合物	リテンションタイム	フラグメンタ電圧	MRM	コリジョンエネルギー (V)
インドール-3-アセトアミド	12.1	110	173.1 -> 130.0	17
インドール-3-酢酸	16.8	70	174.1 -> 130.0	5
インドール-3-酪酸	17.9	140	202.1 -> 158.1	17
インドール-3-カルボアルデヒド	14.9	140	144.0 -> 115.0	33
インドール-3-カルボン酸	15.3	100	160.0 -> 116.0	17
インドール-3-乳酸	16.5	140	204.1 -> 158.0	17
インドール-3-プロピオン酸	16.7	130	188.1 -> 59.1	13
インドール-3-ピルビン酸	17.3	90	202.1 -> 174.0	5
インドキシル硫酸	16.4	100	212.0 -> 80.0	25
トリプトホール	15.9	80	160.1 -> 116.0	17
キヌレン酸	15.5	80	188.0 -> 144.0	13

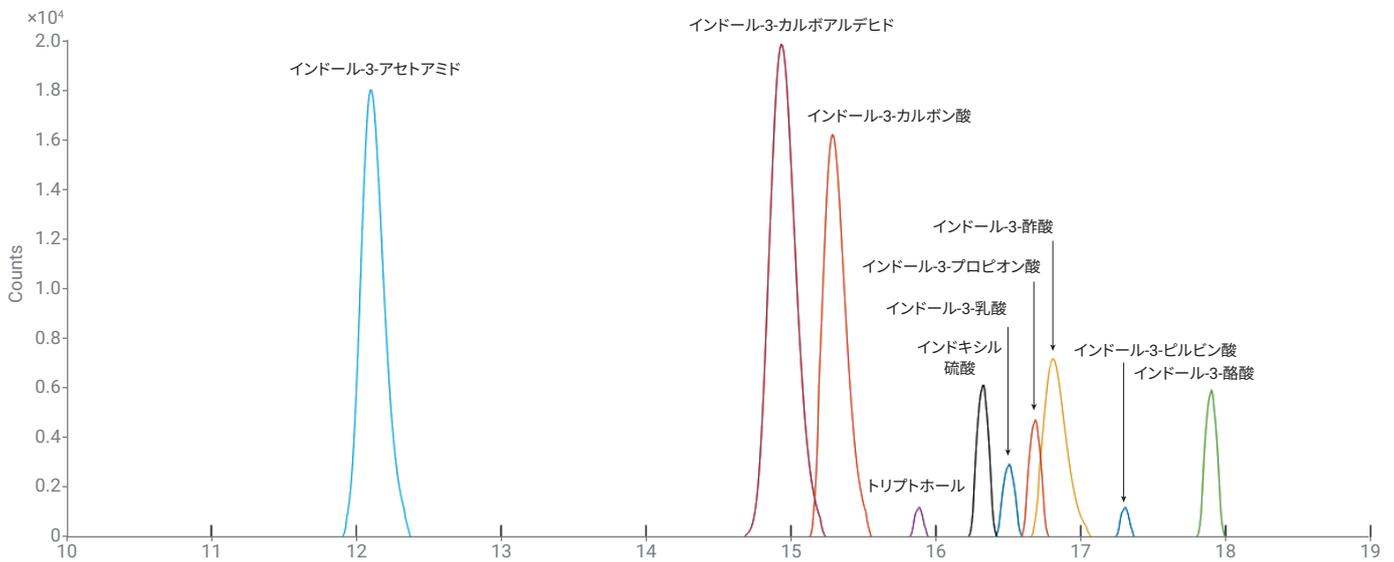


図 1. 微生物叢由来のインドール代謝物の合成 dMRM クロマトグラム

すべての標準物質について、直線性に優れた ($R^2 > 0.999$) 広いダイナミックレンジ (3桁超) の検量線が得られました。図2に、例として、6種類の代表的代謝物の検量線を示します。

結論

このアプリケーションノートでは、重要な微生物代謝物群をより幅広く検出し、測定することを目的とした、既存のメタボロミクス IP-RP dMRM メソッドの拡張による改良について取り上げました。改良したアジレントの IP-RP dMRM メソッドを使用することで、追加したトリプトファン代謝物およびインドール代謝物を高い信頼性で定量することができました。トリプトファン代謝物およびインドール代謝物の測定における分析感度、直線性、およびダイナミックレンジから、このメソッドが生体サンプルの微生物叢 (マイクロバイオーム) アプリケーションに適していることがわかりました。

このメソッドは、先頃発表された次の研究において、生体サンプル中のインドール代謝物レベルの測定に使用されています。

Gehrig, J. L. *et al.* Effects of Microbiota-Directed Foods in Gnotobiotic Animals and Undernourished Children. *Science* **2019**, 365, eaau4732.

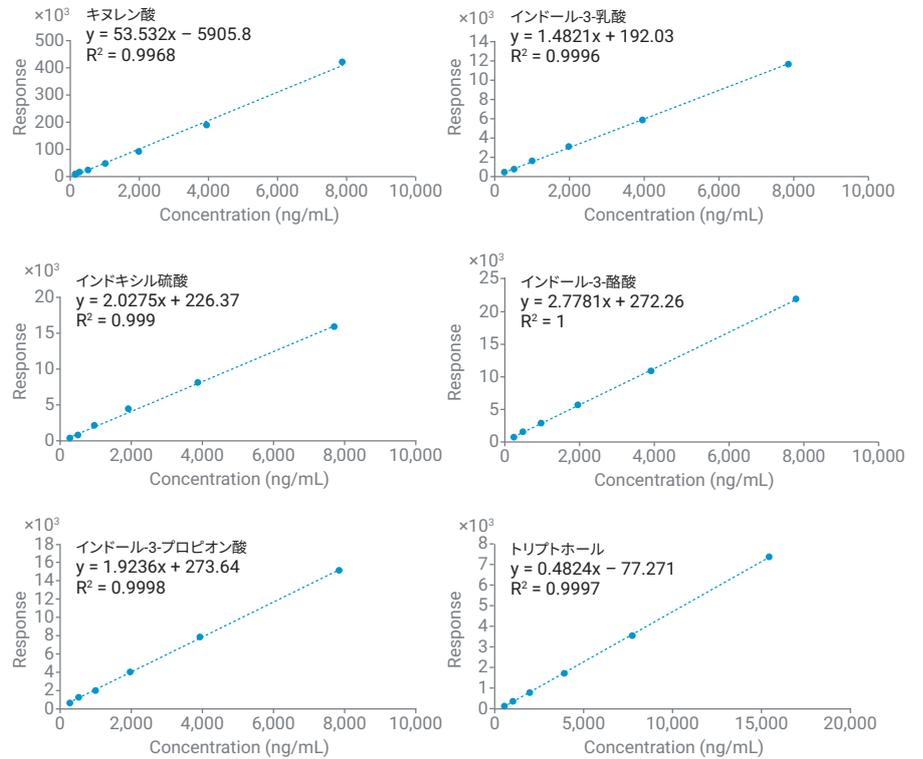


図2. 特定化合物の検量線

参考文献

1. Dodd, D. *et al.* A Gut Bacterial Pathway Metabolizes Aromatic Amino Acids into Nine Circulating Metabolites. *Nature* **2017**, *551*, 648–652.
2. Guo, C. J. *et al.* Discovery of Reactive Microbiota-Derived Metabolites that Inhibit Host Proteases. *Cell* **2017**, *168*, 517–526.
3. Cohen, L. J. *et al.* Commensal Bacteria Make GPCR Ligands that Mimic Human Signaling Molecules. *Nature* **2017**, *549*, 48–53.
4. Milshcheyn, A. *et al.* Accessing Bioactive Natural Products from the Human Microbiome. *Cell Host Microbe* **2018**, *23*, 725–736.
5. Palego, L. *et al.* Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *J. Amino Acids* **2016**, *2016*, 8952520.
6. Hendrikx, T.; Schnabl, B. Indoles: Metabolites Produced by Intestinal Bacteria Capable of Controlling Liver Disease Manifestation. *J. Intern. Med.* **2019**, doi: 10.1111/joim.12892.
7. Venkatesh, M. *et al.* Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function Via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-Like Receptor 4. *Immunity* **2014**, *41*, 296–310.
8. Wlodarska, M. *et al.* Indoleacrylic Acid Produced by Commensal *Peptostreptococcus* Species Suppresses Inflammation. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 25–37.
9. Rothhammer, V.; Quintana, F. J. The Aryl Hydrocarbon Receptor: An Environmental Sensor Integrating Immune Responses in Health and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19*, 184–197.
10. Lamas, B.; Natividad, J. M.; Sokol, H. Aryl Hydrocarbon Receptor and Intestinal Immunity. *Mucosal Immunology* **2018**, *11*, 1024–1038.
11. Rothhammer, V. *et al.* Microglial Control of Astrocytes in Response to Microbial Metabolites. *Nature* **2018**, *557*, 725–728.
12. Cervantes-Barragan, L. *et al.* *Lactobacillus reuteri* Induces Gut Intraepithelial CD4+ CD8 $\alpha\alpha$ +T cells. *Science* **2017**, *357*, 806–810.
13. Lamas, B. *et al.* CARD9 Impacts Colitis by Altering Gut Microbiota Metabolism of Tryptophan into Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands. *Nature Medicine* **2016**, *22*, 598–605.
14. Chimerel, C. *et al.* Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells. *Cell Reports* **2014**, *9*, 1202–1208.
15. Bhattarai, Y. *et al.* Gut Microbiota-Produced Tryptamine Activates an Epithelial G-Protein-Coupled Receptor to Increase Colonic Secretion. *Cell Host Microbe* **2018**, *23*, 775–785.

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, September 26, 2019

5994-1254JAJP

