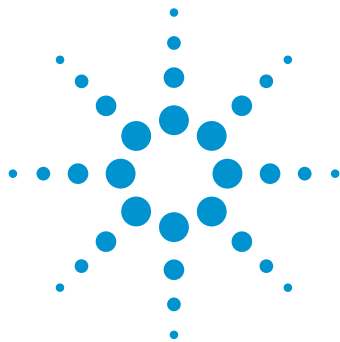




Agilent VistaFlux による軟骨肉腫細胞の ^{13}C -グルタミン定性フラックス分析結果

アプリケーションノート

メタボロミクス

著者

Hui Liu, Weige Qin, Hardik Shah, Bhavapriya
Vaitheesvaran, Vladimir Yong, and Justin R. Cross
Donald B. and Catherine C. Marron Cancer
Metabolism Center,
Memorial Sloan Kettering Cancer Center

Lucia Salamanca-Cardona and Kayvan R. Keshari
Department of Radiology and Molecular
Pharmacology Program, Memorial Sloan Kettering
Cancer Center

概要

パスウェイ全体を通して代謝物量は顕著に変化しないにもかかわらず、フラックスが有意に変化するケースでは、メタボロミクスデータの解析は動的情報の欠如によって多くの場合解釈が困難になります。安定同位体の追跡 (定性フラックス分析) は、これらの状況に対応し、生物系の理解を深めるうえで、きわめて有用な可能性があります。定性フラックス分析では、安定した同位体比トレーサー (通常は、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H など) を生物系に取り込ませ、下流の代謝物の同位体比 (同位体種の分布) 変化を測定します。この手法は特に、安定同位体標識基質の取り込みに適した細胞培地モデルに有用で、標識基質の取り込みの結果としてのラベリングパターンと動態の分析は、酵素機能、パスウェイの重要性、遺伝子発現やタンパク質機能の変化による影響についての知見を提供します。

Agilent MassHunter VistaFlux ソフトウェアは、科学者の定性フラックス分析を支援する包括的ワークフローとして設計され、高分解能な精密質量 TOF および Q-TOF LC/MS により得られたデータの処理および視覚化を容易にします。これらのツールは、フィーチャー抽出、同位体取り込みおよび同位体種アバUNDANCEの分析、天然存在度補正、統計解析、パスウェイのデータ視覚化用に構成されています。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートでは、 $^{13}\text{C}_6$ -グルタミン ($\text{U-}^{13}\text{C-Gln}$) をトレーサーとして使用する軟骨肉腫細胞の定性フラックス分析について示します。Agilent LC/TOF システムでデータを採取し、データの解析および解釈には MassHunter VistaFlux を使用しました。この研究は、TCA 回路代謝での、2-ヒドロキシグルタレート (2-HG) の生成へのグルタミンの寄与について、イソクエン酸脱水素酵素 2 (IDH2) 変異の効果を実証しています。

はじめに

体細胞の IDH 変異は最近、神経腫瘍、急性骨髄性白血病、軟骨肉腫を含む、さまざまな固形腫瘍および血液腫瘍において報告されています。イソクエン酸脱水素酵素 (IDH1/2) の変異は、酵素の活性点で発生し、機能獲得型の表現型を与え、その結果、代謝物の 2-ヒドロキシグルタレート (2-HG) の生成機能を高めま​​す。最近の研究では、この変異が原因で 2-HG が IDH 変異細胞株に高レベルで蓄積することが示されています。高蓄積した 2-HG は、DNA デメチラーゼの TET ファミリ、ヒストンデメチラーゼ、mRNA デメチラーゼ FTO、ALKBH5 の ジュモンジ C ファミリ、プロリルヒドロキシラーゼ (PHD) 酵素などのさまざまな α -ケトグルタル酸 (α -KG) 依存の ジオキシングナーゼ酵素の機能を抑制し、低酸素誘導因子 (HIF)¹ を抑制する競合的阻害薬となります。また、細胞を未分化状態でロックする抑圧的なクロマチン環境を促進します。

軟骨肉腫は、軟骨細胞から発生する肉腫で、軟骨に沈着し、高頻度で IDH 変異の発生を示します。腫瘍由来の株化細胞の入手しやすさから、軟骨肉腫は IDH 変異の結果を理解するために有用なモデルシステムと考えられます。変異酵素によって生成される 2-HG が α -KG および TCA 回路を通してグルタミンから作られることを示すために、定性フラックス分析を行いました。

分析条件

細胞培地と試薬

ヒト軟骨肉腫 CS-1 細胞² は 10 % FBS、25 mM グルコース、4 mM L-グルタミン、100 units/mL ペニシリン、100 ug/mL ストレプトマイシンを含む DMEM にて 5 % CO_2 下、37 °C でインキュベーションしました。代謝のトレーサー実験では、ラベリング期間の開始の前に、一般的な標準 6-ウェル培養プレートに 300,000 細胞/ウェルを 2 日間培養し、各タイムポイントに 3 つのウェルを準備しました。トレーサーを含む培地は、非標識グルタミンを含まない DMEM で、10 % 透析した FBS と 4 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}$]-L-グルタミン (Isotec 605-166、Sigma 社) を追加しました。ラベル期間の開始時、細胞は PBS で 1 度洗浄され、トレーサーを含む培地に移されて 0.5、1、3、8 時間後に採取されました。培地の変化が代謝物プールを攪乱させる場合があるため、コントロール (非ラベル化) 細胞は、10 % 透析した FBS と 4 mM L-グルタミン (同位体濃縮はなし) を含む DMEM に移して、8 時間の $\text{U-}^{13}\text{C-Gln}$ のタイムポイントと正確に一致するよう採取しました。

代謝物抽出

培地をゆっくり吸引して除いた後に、1 mL/well 80 % 水メタノール (v/v) で細胞内成分を抽出しました。タンパク質沈殿を促進するために、プレートは -80 °C で 1 時間以上インキュベーションし、上清を回収しました。抽出物を小型遠心管に移し、21,000 x g で 15 分間、4 °C で遠心分離にかけました。その後、上清を新しいチューブに移し、減圧濃縮器 (Genevac 社製) で濃縮乾固しました。

注意点として、細胞培地の変更および PBS による洗浄は代謝物プールを急速に攪乱する可能性があるため、この実験では、安定同位体を含む培地に播種する前のみ PBS によって細胞を洗浄しました。細胞内部の代謝物および関連するラベリングパターンのレベルを維持するために、採取時に過剰に洗浄することなく培地を吸引した後に抽出溶媒を直接加えました。しかし、このような手順に従う場合、培地に高レベルで存在する可能性がある代謝物の結果を解析する際に

は注意が必要です。これは、PBS 洗浄が細胞の回収直前に行なわれる場合に比べより高濃度の残留培地汚染を招くためです。

LC/MS 分析

乾燥した抽出物を 120 μL の水で再懸濁し、5 分ごとに攪拌しながら氷の上で 20 分間インキュベーションしました。抽出物は 21,000 x g で 15 分間、4 °C で遠心分離し、すべての不溶性物質を取り除きました。100 μL を低容量のオートサンプリャバイアルに移し、プール用 QC バイアルを集めるために 10 μL を各サンプルから取りました。これは、分析実行の開始時に 6 回注入され、その後分析全体を通して定期的に、クロマトグラフィーの安定性を確認するために注入されました。

今回の実験では、次の機器で構成される Agilent LC/MS システムを用いました。

- Agilent 6230 TOF 質量分析計
- Agilent 1290 Infinity バイナリ UHPLC ポンプ
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント
- Agilent 1290 Infinity HTS オートサンブラ

リファレンス質量溶液を導入するために、Agilent 1260 Infinity イソクラテックポンプ (100:1 流量スプリッタ付) を使用しました。LC と MS はデュアルエレクトロスプレーイオンソースで接続され、4 GHz 高分解能モードを使用した負イオンモードで 1 秒あたり 1.5 スペクトルでデータを収集しました。表 1 は分析メソッドを示しています。

分析メソッドは、今回の実験の分析対象となる代謝物に合わせて設計しました。TCA 回路は逆相クロマトグラフィーでは保持力の低い有機酸で構成されているため、イオン対逆相クロマトグラフィーを使用しました。ネガティブモードのエレクトロスプレーイオン化を、ターゲット化合物の最良の検出のために選択しました。

データ解析

Agilent MassHunter Pathways to PCDL ソフトウェアを使用し、BioCyc から求めたトリカルボン酸 (TCA) 回路用にアジレントの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、乳酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、酸化型グルタチオン、2-HG を、Agilent METLIN PCDL をソースとしてカスタム PCDL に加えました。これを Agilent PCDL Manager ソフトウェアで編集し、この分析メソッドで測定されなかった代謝物を除去して各化合物のリテンションタイムを追加しました。作成した PCDL ファイルは、Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアのバッチ同位体抽出用のターゲットリスト (表 2) として使用しました。¹³C の天然存在度を補正済みの Profinder のバッチ結果は、Omix Premium に Profinder アーカイブファイル (.PFA) としてエクスポートしました。これには、サンプルグループ情報、化合物情報、同位体ごとの強度情報が含まれています。カンマ区切り値 (.csv) ファイルとしての完全なデータセットのエクスポートもサポートされています。

表 1. LC/MS 分析パラメータ

パラメータ	値
LC 条件	
カラム	Waters Cortecs C18+ 150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm
移動相	A) 5 mM N,N-ジメチルオクチルアミン、水溶液、pH 5.5 B) 5 mM N,N-ジメチルオクチルアミン、90 % メタノール水溶液、pH 5.5
流量	0.4 mL/min で 0 ~ 8 分間、その後 0.6 mL/min で 8.1 ~ 10 分間
グラジエント	0 分 – 10 %B 8 分 – 100 %B
ストップタイム	10 分
ポストタイム	5 分
カラム温度	30 °C
注入量	15 μL
MS 条件	
イオン化モード	デュアル ESI
イオン化極性	ネガティブ
ガス温度	250 °C
乾燥ガス	13 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
キャピラリー電圧	3,500 V
オクタポール 1 RF 電圧	600 V
取り込み範囲	m/z 50 ~ 1,700
リファレンス質量	m/z 119.0363 および 980.01638

表 2. 同位体抽出のターゲット代謝物リスト

化合物	分子式	CAS	RT (分)
L-グルタミン酸	C ₅ H ₉ NO ₄	56-86-0	2.26
L-アスパラギン酸	C ₄ H ₇ NO ₄	56-84-8	2.29
L-乳酸	C ₃ H ₅ O ₃	79-33-4	2.93
グルタチオン、酸化型	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	27025-41-8	4.84
コハク酸	C ₄ H ₆ O ₄	110-15-6	5.05
2-ヒドロキシグルタル酸	C ₅ H ₆ O ₅	2889-31-8	5.11
フマル酸	C ₄ H ₄ O ₄	110-17-8	5.13
L-リンゴ酸	C ₄ H ₆ O ₅	97-67-6	5.13
オキシグルタル酸 (α-KG)	C ₅ H ₆ O ₅	328-50-7	5.24
グアノシン二リン酸 (GDP)	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₁ P ₂	146-91-8	5.83
アデノシン二リン酸	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	58-64-0	5.93
アコニット酸	C ₆ H ₈ O ₆	499-12-7	6.1
トレオ-イソクエン酸 (クエン酸から未分離)	C ₆ H ₈ O ₇	6061-97-8	6.1
クエン酸 (トレオ-イソクエン酸から未分離)	C ₆ H ₈ O ₇	77-92-9	6.1
グアノシン三リン酸 (GTP)	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₄ P ₃	86-01-1	6.57
アデノシン三リン酸	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	987-65-5	6.63

結果と考察

Profinder で同位体種抽出の後、結果を確認し必要な場合はマニュアルで補正しました。より一貫性のある結果を得るために、グルタミン酸と α -KG については手作業で精査しました。同位体種を Profinder で表示することにより、安定同位体ラベルの取り込みおよびサンプルグループ内での繰り返し分析の再現について、有用な理解を得ることができます。天然同位体の存在度を補正した場合と補正しない場合について、生データ値または % 補正済み値として表示することができました。図 1 に、2-HG の同位体種の結果を示します。結果をタイムポイントごとに天然存在度の補正済み値として表示します。このケースでは、各タイムポイントはバイオロジカルレプリケート全体で優れた再現性を示していますが、必要な場合、この段階で異常値のサンプルを除外できます。時間の経過に伴い 2-HG M+0 が減少し、これに対応して 2-HG M+5 が増加しており 8 時間後、ほとんどの 2-HG プールがグルタミン由来の安定同位体標識炭素でラベル化されていることが明らかになりました。

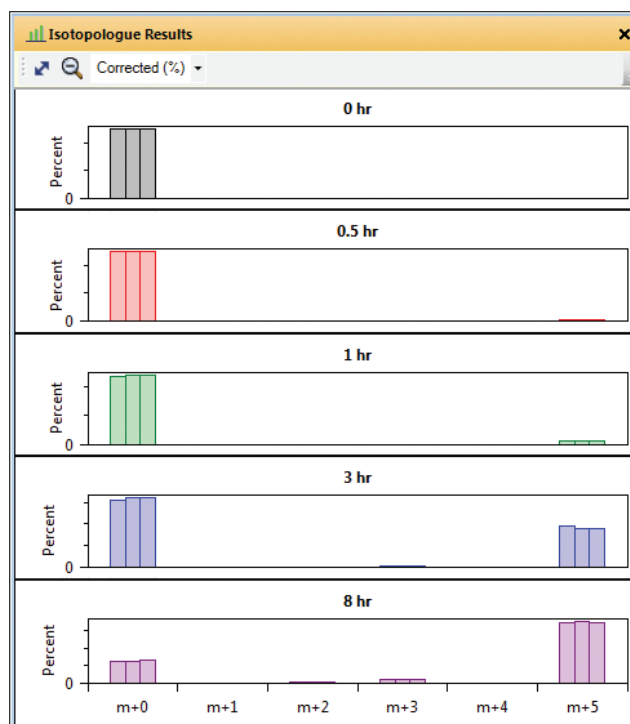


図 1. Agilent MassHunter Profinder での 2-HG の同位体種の表示。

生物学的パスウェイに基づいて、安定同位体の動向を明らかにすることは、定性フラックス分析における最も重要な目的のひとつです。Profinder の結果をパスウェイ上に表示するために、ヒト BioCyc データベースから Omix Premium を用いてネットワークを作成しました。データベースに登録されていない TCA 回路に関わる分析対象の代謝物 (乳酸、ピルビン酸、酸化型グルタチオン、アスパラギン酸、グルタミン酸) は、マニュアルでこのネットワークに追加しました。ADP、GDP、ATP、GTP などのいくつかの代謝物は恒常的に存在する

ため、アバンダンスは細胞の量とよく相関します。これらの化合物への取り込みをモニタリングするために、情報視覚化と同じオプションを用いて代謝物ノードを TCA 回路から分離して表示することにしました。ネットワーク作成後、Profinder の結果を Omix Premium にインポートしました (図 2)。このプログラムでは、左の Component View にネットワーク内のすべての代謝物をリスト表示し、メインウィンドウにネットワークを表示し、下の Data Manager ウィンドウではインポートした Profinder の結果表示を選択できます。

Omix Premium は、定量フラックスデータの視覚化および解析用に最適なグラフィックオプションを提供し、これには代謝物ノードのプロパティの変更機能および関連するチャートやグラフの追加機能が含まれています。ネットワークがより複雑な場合、ノードを色分けして代謝物アバンダンスを表示し、実験のクイックサマリを得ることができます。図 2 で、色付けされた強度は、測定された代謝物のアバンダンスを示しています (グレーに色付けされた代謝物ノードはこの実験で測定されていない化合物です)。

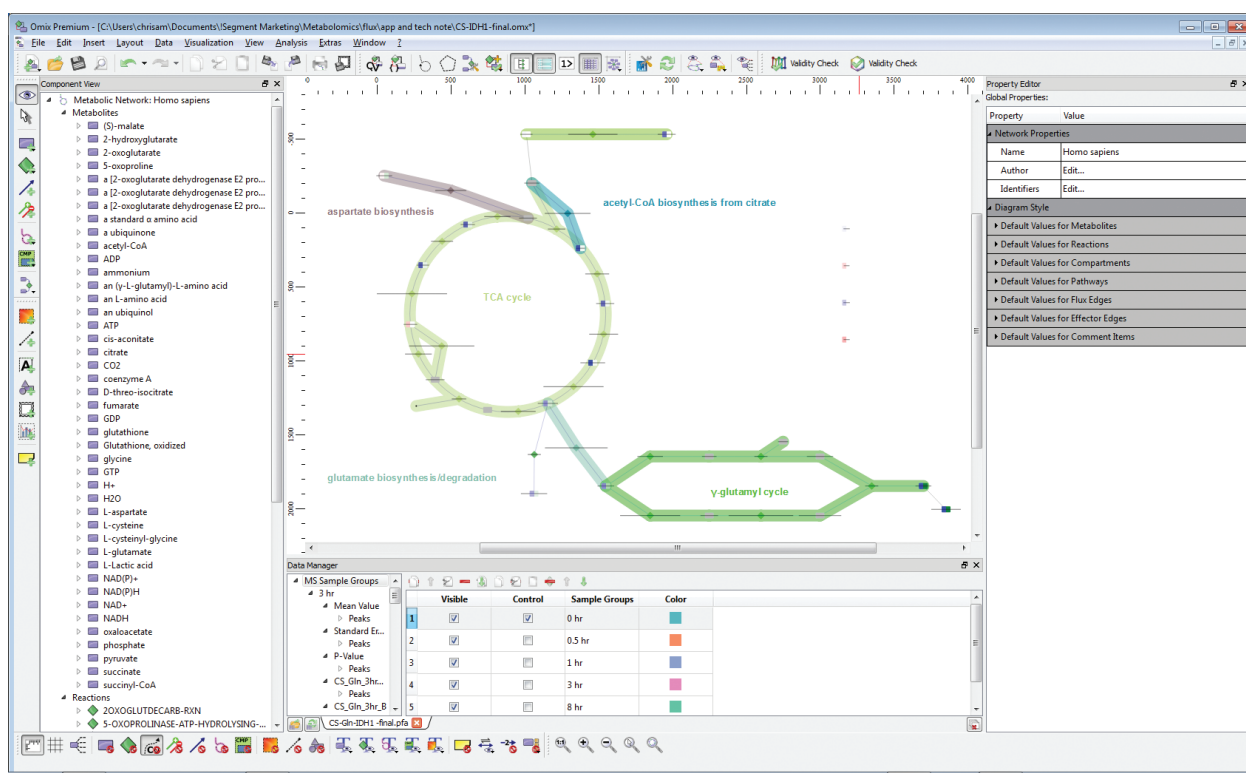


図 2. ネットワークとインポートした Agilent MassHunter Profinder の結果を表示する Omix Premium ソフトウェア。

2-HG について図 3 に示すように、代謝物ノードの色には 3 つのオプションがあります。色付けされたノードは、この代謝物が高い濃度で存在すること (図 3A の色の強度)、または安定したラベル取り込みが起こっていること (図 3B) を示すために使用できます。図 3C は両方の情報を示す、組み合わせビューです。

代謝物ノードについて示された情報は、コントロールグループとして割り当てられたサンプルと比較して最大の倍率変化がどこで生じているかを示すように設計されています。パスウェイ全体でのデータのおおまかなレビューが完了すると、安定同位体取り込みのより詳細な調査が可能です。図 4 は、クエン酸について、各代謝物ノードの横で追加の情報をキルトプロットと横方向の棒グラフで表示しています。このプロットは、同位体種のアバンダンスと取り込み比をまとめたもので、ノードに表示されるサマリ情報を詳しく説明しています。この例では、タイムポイントの結果はキルトプロットの y 軸で表示され、同位体種は x 軸で示されています。色の強度は、トレーサー取り込みの相対量を示しています。棒グラフは、合計代謝物アバンダンス (検出されたすべての同位体種の合計) と安定同位体取り込み率を表示しています。これらのビューは、Profiler での手作業でのデータ調査中に観測された最初の結果、つまり U-¹³C-Gln 含有培地中でのインキュベーション後 3 時間および 8 時間で 2-HG の M+5 同位体種への大きな取り込みがあり、グルタミンが IDH2-変異型の CS-1 細胞中で 2-HG を生成する主要な基質であることと強く相関しています。

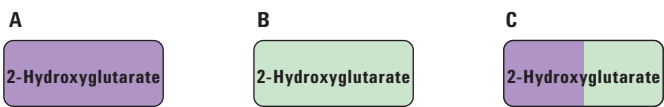


図 3. 色付けされた 2-HG ノード、A) 色のグラデーションは他の検出された代謝物と相対的な代謝物のアバンダンス、B) 安定標識の取り込み率、C) 左側がアバンダンスで右側が取り込み率に色付けが分割

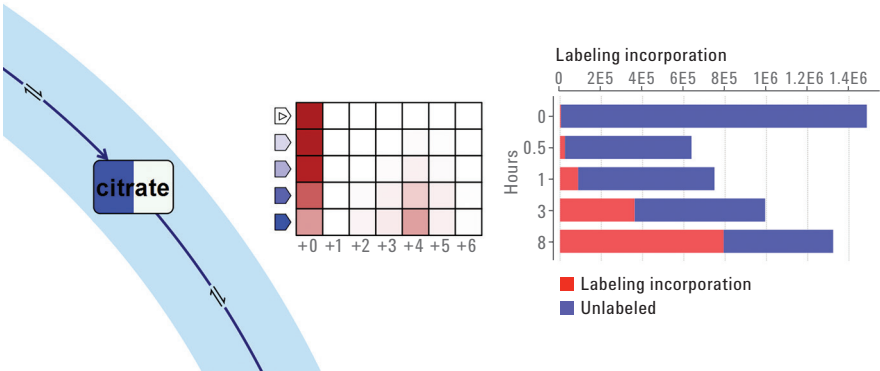


図 4. CS-1 株化細胞でのクエン酸への U-¹³C-Gln トレーサー取り込みに関する詳細情報。

図 5 は、同位体取り込みについての詳細な情報を表示するためのもう一つの有用なビューを示しています。このプロットは、異なるグループ (タイムポイント) の同位体の結果を繰り返し測定で観測される標準偏差を示すエラーバー付で表示しています。このプロットは Profinder での同位体種の表示と同様のビューを提供します。この例では、酸化型グルタチオンは、時間の経過とともに 1 つ目、次に 2 つ目

の Gln-由来の 5-炭素ビルディングブロックグルタミン酸でラベル化されることを明らかに示しています。ノードの色付け部分は、酸化型グルタチオンが高アバンドランスの代謝物であることを示しており、1 つ目と 2 つ目の Gln-由来のサブユニットを取り込むために時間がかかることが明らかになりました。

代謝物ノードは ADP、GDP、ATP、GTP などの化合物も含めることができ、実験を通して細胞レベルでの取り込みや変化は見られません (図 6)。これは Gln が 8 時間の周期以内にこれらの代謝物の生体合成パスウェイに大きく寄与しないことを意味しています。しかし、2- および 3-リン酸ヌクレオチドプールの相対的なアバンドランスに関する情報を含めることは、細胞の状態や生存の解析に有用です。

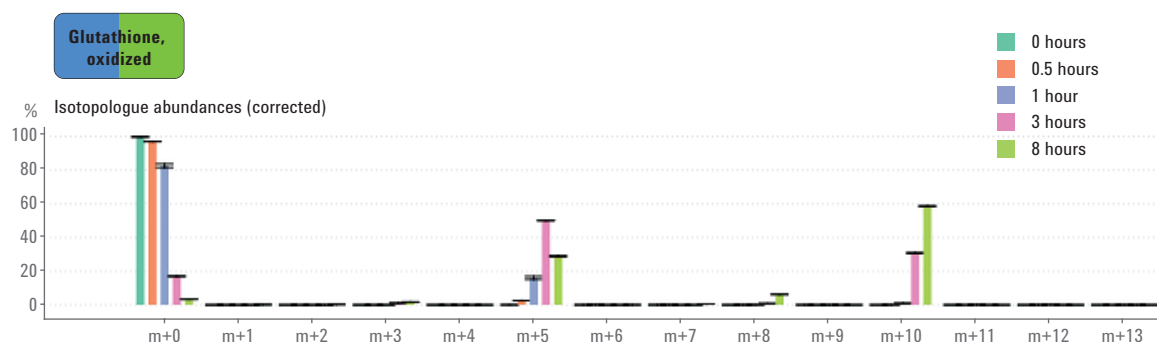


図 5. グルタミンの経時的な取り込みを示す棒グラフによるグルタチオン同位体種のアバンドランス。

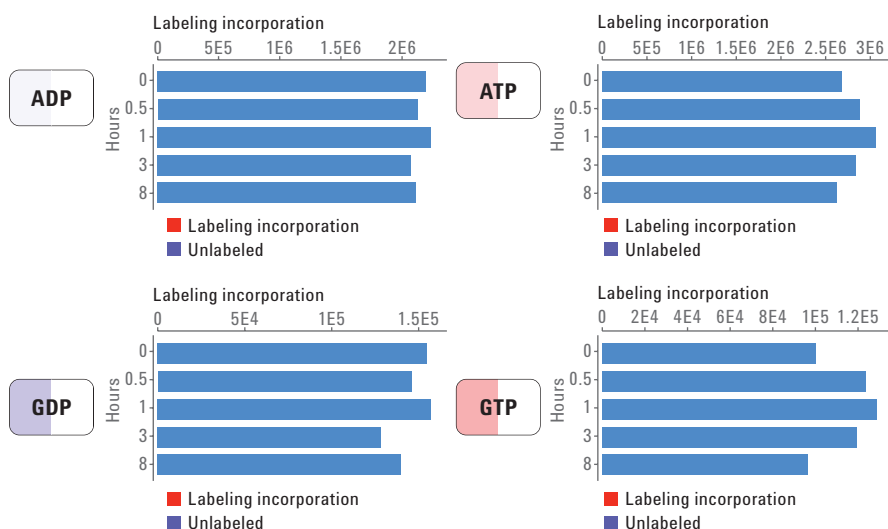


図 6. 恒常性の高い代謝物 ADP、GDP、ATP、GTP のフラックス全体の表示。

これらのビューを統合し、ネットワーク全体での同位体種の分布とラベル化の動態を比較することが可能です (図 7)。プレゼンテーションのために、代謝物ノードの色付け部分は BioCyc からインポートされる構造式に置き換えることができます。基本的な統計の情報もキルトプロットに重ね合わせることができます。図 7 に、コントロールグループ (0 時間のタイムポイントのサンプルとして示す) 内のアバUNDANCEと関係する各同位体種のウェルチの t 検定の結果を示します。ここで、• は $p < 0.05$ を示しています。

これらの定性フラックスプロファイリングの結果は、U- ^{13}C -Gln が、2-HG プールのラベル化よりも先立ってグルタミン酸 (Glu) をラベル化することをはっきりと明らかにしています。これは、2-HG を生成する還元反応を完了するための変異 IDH2 酵素の相対的に低い活性を反映しています。Glu、 α -KG (本書では示していません)、2-HG すべてに U- ^{13}C -Gln トレーサーからの 5 個の ^{13}C 原子が保持されているため、グルタミンから 2-HG へのパスウェイがダイレクトと推測することもできます。また、TCA 回

路内の U- ^{13}C -Gln の時計回りの (酸化の) 消費があることを示し、主として M+4 同位体種としてのコハク酸、フマル酸、リンゴ酸への取り込みが示されています。オキサロ酢酸 (OAA) は、ほとんどの細胞で低濃度で存在し、抽出および LC/MS による分析で再現するだけの安定性はありません。しかし、OAA プールは、主として M+4 同位体種としてラベル化される L-アスパラギン酸 (Asp) と平衡状態にあります。

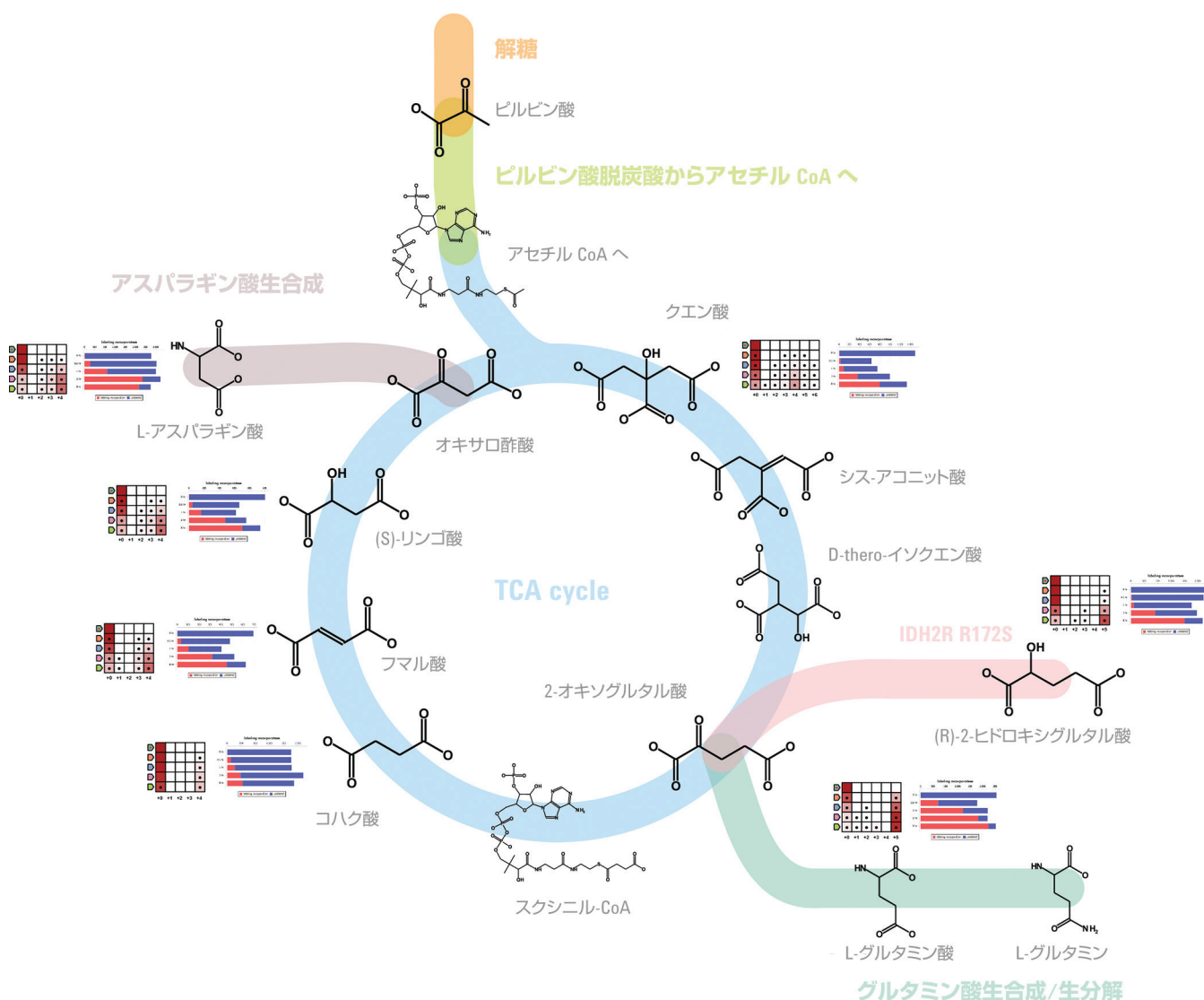


図 7. 2-HG および TCA 回路代謝物の U- ^{13}C -Gln ラベル化サマリ。

時間の経過に伴い、M+3 ラベル化が、2-HG、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、アスパラギン酸に見られます。これは M+4 ラベル化された OAA がアセチル-CoA に由来する 2 個の炭素と結合した結果で、クエン酸 M+4 となります。下流の代謝物に見られる M+3 同位体種は、野生型 IDH 反応による脱炭酸の結果で、前 (酸化) 方向に作用します。逆方向に作用する野生型 IDH 酵素によって生じる、クエン酸での M+5 ラベル化も見られます。8 時間の間に、次の現象による複雑なラベル化パターンが観察されました。

- TCA 回路のさらなる回転
- コハク酸、フマル酸、クエン酸に由来するラベル化パターンの存在
- リンゴ酸酵素の潜在的な作用

これらのパターンは別の安定した同位体標識基質を使用、または特定の炭素の位置での Gln ラベル化によってさらに調査することができます。最終的に、サマリビューで、代謝物ラベル化の相対的動態を評価でき、Asp と Glu ラベル化が安定状態に近づいていく様子を 8 時間のラベル化で観測することができます。他の代謝物のプールが代謝物の安定状態に到達するためにはさらに長い時間が必要となることが明らかになりました。

結論

Agilent MassHunter VistaFlux ワークフローを使用し、代謝のトレーサーとして U-¹³C-Gln を用いて定性フラックスプロファイリングを CS-1 軟骨肉腫細胞内で実行しました。この分析では、Gln-由来の α -KG から 2-HG に転換するための IDH2 変異アイソフォームの動態を実証しています。8 時間にわたって、2-HG プールの大部分が IDH 変異を持つ細胞内で M+5 同位体種としてラベル化されます。この 2-HG の生成の増加は、IDH2 R172S 変異酵素の活性によって促進され、内在性の 2-HG デヒドロゲナーゼの機能を上回って 2-HG をハイレベルに蓄積することを可能にします。その後、2-HG は、TET ファミリーの DNA デメチラーゼおよびジメチル化 C ファミリーのヒストンデメチラーゼを含むさまざまな α -KG 依存のジオキシングナーゼ酵素にとっての競合的阻害物質となり、結果的に、DNA 過剰メチル化を含むエピジェネティックな変化をもたらし、未分化なクロマチン環境への変化を促進します。分析では、TCA 回路への U-¹³C-Gln トレーサーの取り込みが起こることも示しています。

手動でのデータマイニングと比較し、VistaFlux は安定同位体追跡の処理のための包括的で自動かつ高速なワークフローを提供します。同位体種の抽出および定性フラックスプロファイリングデータのパスウェイへの視覚化ツールも含んでいます。

参考文献

1. Losman, J. A.; Kaelin, W. G. Jr. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* **2013**, *27*(8), 836-52.
2. Susa, M.; et al. Alendronate inhibits growth of high-grade chondrosarcoma cells. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 1879-1888.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, May 6, 2016

5991-6810JAJP



Agilent Technologies