

Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF システムによる 酵母ステロールの代謝プロファイリング

アプリケーションノート

メタボロミクス

著者

Manhong Wu, Robert St. Onge,
Sundari Suresh, Ronald Davis, and
Gary Peltz
School of Medicine and Biochemistry
Genome Center
Stanford University
Stanford, CA
USA

Sofia Aronova and Stephan Baumann
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA
USA

概要

Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF システムと Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアを用いて、新規抗真菌薬候補の酵素標的を正確に決定するための酵母ステロールの代謝プロファイリングを行いました。エルゴステロール生合成経路中間体の相対濃度を調べるターゲット分析に、精密質量高分解能 GC/Q-TOF 技術による非ターゲット分析を組み合わせることで、きわめて包括的な結果が得られました。電子イオン化 (EI) によるスペクトル情報を、MS/MS の精密質量プロダクトイオンスペクトルデータにより補完し、薬剤治療により酵母中に蓄積する化合物を同定しました。

はじめに

出芽酵母の *Saccharomyces cerevisiae* は、生体構造が単純なことに加えて、ゲノム中のあらゆる遺伝子を個別に欠失させた菌株を使用できることから、魅力的なモデル生物です。新規抗真菌薬を評価するこの研究でも、出芽酵母を使用しました。抗真菌薬ではしばしば、菌膜の主要構成要素であるエルゴステロールが標的になります。エルゴステロールは、動物細胞におけるコレステロールと同様に機能します。

しかし、エルゴステロールとコレステロールは機能が似ている一方で、酵母ステロール生合成に関与する酵素の多くは、哺乳類細胞の同様の酵素とは構造や特異性が異なります。そのため、エルゴステロール生合成経路を阻害する薬剤は、抗真菌治療薬としての可能性を有しています。これらの薬剤は、補完的な遺伝学および分析アプローチにより同定できます。最上位のハイスループットアプローチとしては、ハプロ不全プロファイリング (HIP) スクリーニング [1] を行いました。HIP では、薬剤に対する遺伝子を欠失した酵母を成長させます。その結果として菌株の感度が向上すれば、ヘテロ接合遺伝子座の生成物が阻害剤の標的である可能性があります。さらに、高分解能なガスクロマトグラフィー/四重極飛行時間型質量分析計 (GC/Q-TOF) による酵母ステロールの代謝プロファイリングを用いた分析アプローチを遺伝学アプローチと組み合わせれば、薬剤候補の酵素標的を特異的に同定することが可能です。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートでは、7200 シリーズ Q-TOF GC/MS システムと Agilent 7890 ガスクロマトグラフ (GC) を組み合わせ、薬剤治療の結果として蓄積した化合物を同定することで、新規抗真菌薬の標的を正確に同定する方法を紹介します。このアプローチでは、まず特性が明確に定義されている 2 つの抗真菌薬を用いてバリデーションしたのちに、新薬の治療特性を評価しました。機器の広いダイナミックレンジにより、酵母細胞中に幅広い濃度で存在する脂質代謝物を同時に定量することができました。

ターゲットとなるエルゴステロール生合成経路中間体の相対濃度と、薬剤治療サンプルと非治療サンプルにおいて蓄積した非ターゲット代謝物の比較をもとに、酵母中のステロール代謝に影響を与える複数の抗真菌薬候補のメカニズムを特定しました。また、MS/MS 精密質量プロダクトイオンスペクトルと Molecular Structure Correlator (MSC) ツールを組み合わせ、蓄積した代謝物の構造確認を行いました。

実験手法

試薬と標準

標準と試薬	供給元
テルピナフィン	Sequoia Research Products
フルコナゾール	Sigma-Aldrich
トタロール	Sigma-Aldrich
NCE 1181-0519	ChemDiv
MSTFA (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) + 1 % TMCS (トリメチルクロロシラン)	Sigma-Aldrich
メトキシアミン塩酸塩	Sigma-Aldrich
無水ピリジン	Sigma-Aldrich

使用機器

この研究には、7890A GC と 7200 シリーズ GC/Q-TOF を使用しました。機器条件を表 1 に示します。

表 1. GC および MS 機器条件

GC 条件	
カラム	HP-5 MS UI、30 m × 0.25 mm、0.25 μm フィルム (p/n 19091S-433UI)
注入量	1 μL
スプリット比	20:1
スプリット/スプリットレス 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 コンスタントフロー
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
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
スキャン範囲	50~600 m/z
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
MS/MS モードの衝突エネルギー	15 V

サンプル前処理

野生酵母株 (BY4743) の 6 つの生物学的複製サンプル 5 mL を、成長を 10 % 阻害する濃度の薬剤とともに培養し、1 前後の OD₆₀₀ で採取しました (およそ 3 × 10⁷ cells/mL)。フォルチ法により酵母脂質を抽出しました [2]。オリジナル培地の 2.5 OD₆₀₀ 単位に相当する下部有機相を高速真空装置により乾燥させ、ピリジン中 40 mg/mL メトキシアミン塩酸塩により誘導体化したのち、MSTFA + 1 % TMCS 混合物を用いてシリル化し、最終容積を 100 μL としました。この溶液から、1 μL を GC に注入しました。

データ解析

定量には Agilent MassHunter Quantitative ソフトウェア B.05 を使用しました。Mass Hunter Qualitative Analysis ソフトウェア B.05 を用いてすべてのスペクトルをデコンボリューションし、NIST11 マススペクトルライブラリと比較して分析対象代謝物を同定しました。

多変量解析ソフトウェア Mass Profiler Professional (MPP) を用いて、デコンボリューション後のデータの統計的解析を行い(データフィルタリング、統計有意度、微量化合物の検出、視覚化)、薬剤治療サンプルに顕著な濃度で存在する化合物を測定して対照と比較しました。これにより、予想外の複数の代謝物が検出できました。

結果と考察

データ解析

GC/Q-TOF データのクロマトグラフィーデコンボリューションを用いれば、精密質量情報から、同じ整数質量のフラグメントイオンをもつ共溶出化合物を識別することができます。MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアでは、以下の4つのステップでデコンボリューションが行われます。

1. **ノイズ解析**では、各イオンクロマトグラムのノイズファクターを計算します。
2. **化合物認識**では、ノイズ解析の結果とリテンションタイムを用いて、各クロマトグラフィー成分のモデルピーク形状を決定します。
3. **スペクトルデコンボリューション**では、最小二乗法を用いて、各成分のスペクトルを作成します。
4. **化合物同定**では、各成分を EI スペクトルライブラリと比較します。

無作為アプローチの利点の1つは、ターゲットイオンを考慮せずにデコンボリューションを行うことができるという点です。**化合物認識**の手順で決定されたピーク形状情報により、隣接したスキャン中で同じピーク形状と頂点をもつ成分を同定できます。

ピークデコンボリューションは、同じ分子式をもつ異なる化合物の識別にも役立ちます。図1は、3つの化合物が $C_{29}H_{48}O$ と同定されたことを示していますが、4,4-ジメチル-8,24-コレスタジエノールのスペクトルと一致する EI スペクトルをもつのは、右図のピークだけです。ガイド付きの9ステップのワークフロー(以下を参照)と Mass Profiler Professional (MPP) 多変量統計解析ソフトウェアパッケージにより、これらの化合物のうち、倍率変化と有意性基準を満たすのは、4,4-ジメチル-8,24-コレスタジエノールのみと判定されました。

ピークデコンボリューションが完了したのちに、コンパウンドエクスチェンジファイル(.CEF)を作成しました。その後、MPPを用いて、薬剤治療により濃度が有意に変化している化合物を判定しました。MPP 統計解析手順は以下の通りです。

1. 実験の種類、ワークフロー、生物の定義
2. データソースとして MassHunter Qualitative Analysis を選択
3. Qualitative Analysis から .CEF ファイルをインポート
4. アバンダンスとモデルイオンフィルターの設定

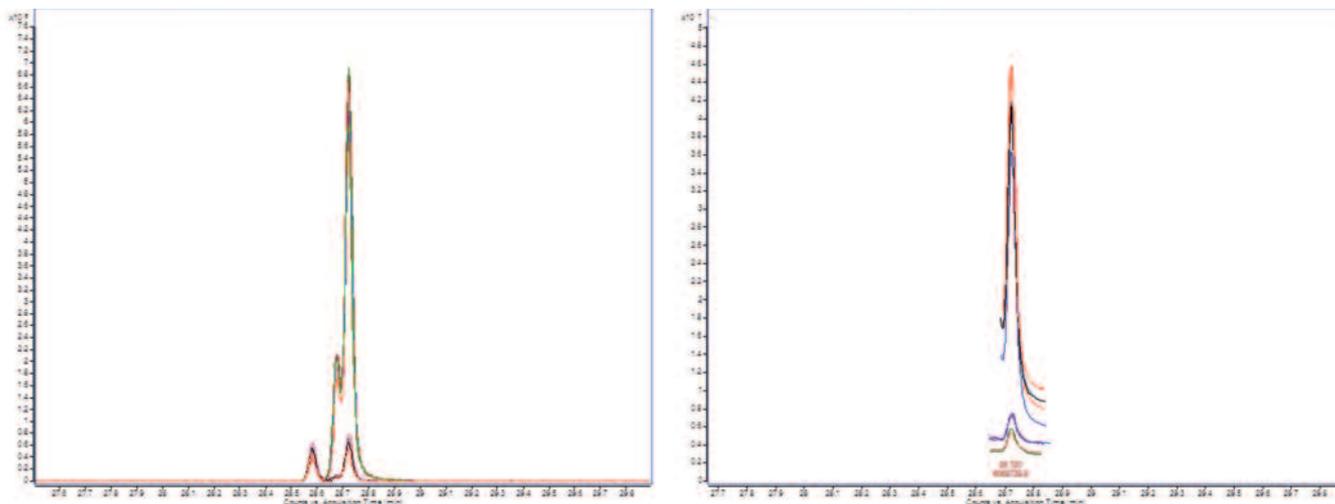


図1. クロマトグラフィーデコンボリューションを用いれば、同じ分子式をもつ共溶出化合物を分離できます。左図では、同じフラグメントイオンをもつ共溶出化合物の抽出イオンクロマトグラム(EIC)を重ねて表示しています。右図では、MassHunter デコンボリューション実施後に得られたこれらの化合物のうちの1つ(4,4-ジメチル-8,24-コレスタジエノール)の化合物クロマトグラムを示しています

5. リテンションとマッチファクター調整パラメータの設定
6. キャリブレーションタイプの選択
7. ベースライン補正の選択
8. 条件フィルターフラグの設定
9. ボルケーノプロットをもとにフィルタリング。これは有意性に関するスチューデント T 検定 ($p < 0.05$) と倍率変化閾値 (= 2) を組み合わせたものです。

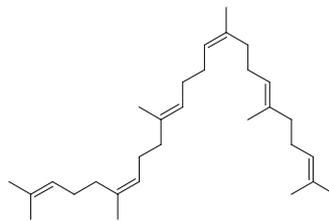
概念実証

すでに述べたように、特性が明確に定義されている 2 つの抗真菌薬を用いて、酵母ステロールの代謝プロファイリングにおける精密質量高分解能 GC/Q-TOF 分析の有効性を実証しました。テル

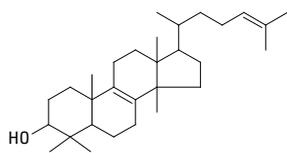
ピナフィンとフルコナゾールは広く用いられている抗真菌薬で、エルゴステロール生合成経路の特定のステップを標的とし、それぞれのステロール経路阻害メカニズムは十分に理解されています。テルピナフィンは ERG1 遺伝子産物のスクアレンエポキシダーゼを阻害し、スクアレンがこの経路の中間体であるスクアレンエポキシドに変換されるのを阻害します。これにより、酵母がスクアレンを産生する一方で、スクアレンがダウンストリームの中間体へ効率的に変換されなくなるため、スクアレンが蓄積します。フルコナゾールは ERG11 遺伝子産物のシトクロム P450 14 α -デメチラーゼまたはラノステロールデメチラーゼを阻害します。この場合、ラノステロールの蓄積が予想されます。関連するステロールについて、薬剤治療サンプルと非治療サンプルにおける代謝物量の変化を評価しました (図 2 および 3)。予想どお

代謝物

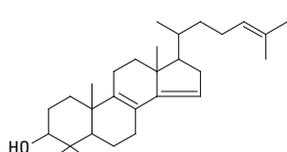
スクアレン



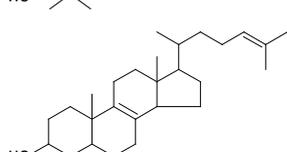
ラノステロール



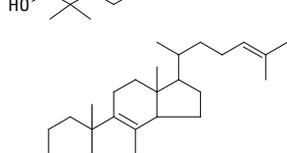
4,4-ジメチル-5 α -コレスタ-8,14,24-トリエン-3 β -オール



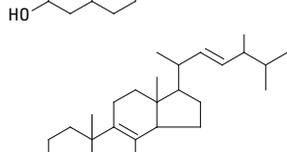
4,4-ジメチル-5 α -コレスタ-8,24-ジエン-3 β -オール



チモステロール



エルゴステロール



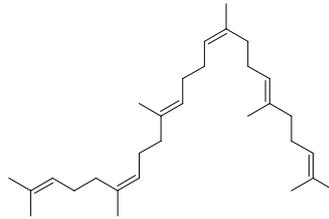
治療サンプルの倍率変化



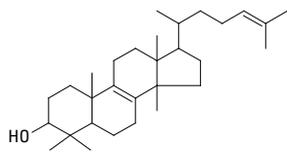
図 2. テルピナフィン治療による各種ステロール代謝物量の倍率変化。ERG1 遺伝子産物のスクアレンエポキシダーゼ阻害によるスクアレンの蓄積が見られます

代謝物

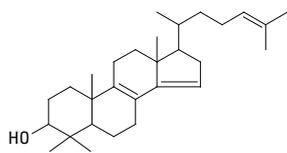
スクアレン



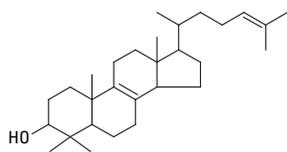
ラノステロール



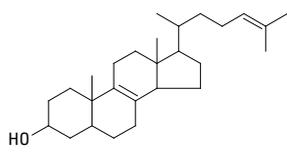
4,4-ジメチル-5 α -コレスタ-8,14,24-トリエン-3 β -オール



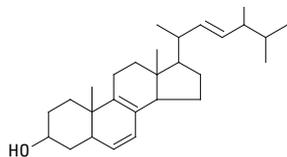
4,4-ジメチル-5 α -コレスタ-8,24-ジエン-3 β -オール



チモステロール



エルゴステロール



治療サンプルの倍率変化

3.0 (上昇)

14.1 (上昇)

フルコナゾール

Erg11

>27.7 (低下)

>32.7 (低下)

>37.5 (低下)

2.8 (低下)

図 3. フルコナゾール治療による各種ステロール代謝物量の倍率変化。ERG11 遺伝子産物の 14 α -デメチラーゼ阻害によるラノステロールの蓄積が見られます

り、テルビナフィンおよびフルコナゾール治療サンプルにおいて、それぞれスクアレンとラノステロールの蓄積が観察されました。MPP を用いた解析では、フルコナゾール治療により、14 α -デメチラーゼ活性が阻害されることから、複数の 14 α -メチルステロールが蓄積することもわかりました。この非ターゲット分析で得られた結果は、エルゴステロール生合成経路におけるいくつかのダウンストリームの酵素が「手当たり次第」的な性質を

もち、余分なメチル基のある蓄積したステロールを基質として利用できることを示しています。

EI フラグメンテーションスペクトルと精密質量情報を用いて、蓄積した 14 α -メチルステロールの分子式を決定しました (表 2)。フラグメントイオンの精密質量測定により、化合物同定の信頼性が高まりました。

表 2. フルコナゾール治療の非ターゲット分析の結果

成分 (<i>m/z</i> @ RT)	化合物	分子式	誘導体化種の MI (<i>m/z</i>)	MI の精密質量 (<i>m/z</i>)	質量誤差 (ppm)
469 @ 28.08	14- <i>a</i> -デスメチルエビステロール	C ₂₉ H ₄₈ O	484.4095	484.4101	1.24
379 @ 28.26	14- <i>a</i> -デスメチル 4- <i>a</i> -メチルチモステロール	C ₂₉ H ₄₈ O	484.4095	484.4107	2.48
467 @ 28.39	14- <i>a</i> -デスメチル 3-ケト-4-メチルチモステロール	C ₂₉ H ₄₆ O	482.3938	482.3931	-1.45

RT = リテンションタイム
MI = 分子イオン

新規抗真菌薬候補の特性に関する代謝プロファイリング

遺伝スクリーニング結果をもとに、トタロールや新規化学物質 (NCE) 1181-0519 などの複数のエルゴステロール生合成経路阻害剤候補を選択しました。これらの新薬候補により誘発される酵母中の代謝変化をより明確に理解するために、ターゲット分析と非ターゲット分析の両方を行い、治療後の代謝物濃度を治療していない対照の濃度と比較しました。

また、MS/MS 分析により、薬剤治療により蓄積した代謝物の同定確認に必要な構造情報を取得しました。この分析では、NCE 1181-0519 とトタロールの標的がそれぞれ Erg25 と Erg26 であることが明らかに示されました。

MPP を用いた統計解析により、異なる調節を受けた成分を容易に同定できました (図 4)。

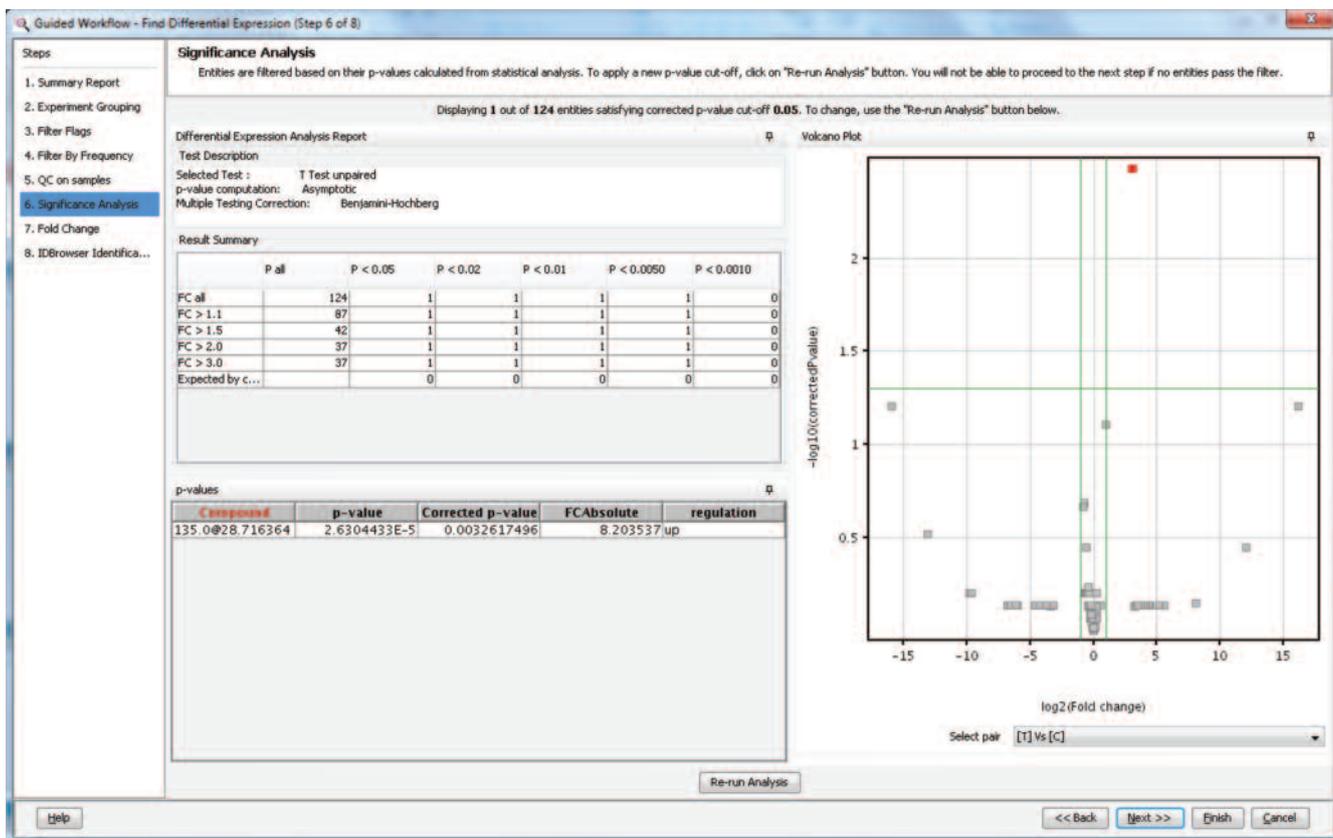
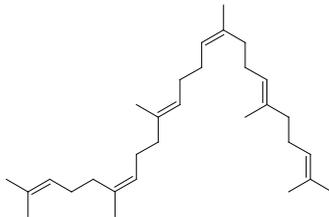


図 4. MPP の有意性解析により、NCE 1181-0519 治療による有意な倍率変化の上昇を示すのは 1 つの化合物 (4,4-ジメチル-8,24-コレスタジエノール) のみであることが示されています

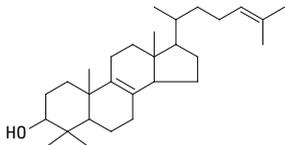
NCE 1181-0519 では、生物学的に有意な倍率変化の有意性基準である < 0.05 を満たしたのは、4,4-ジメチル-8,24-コレスタジエノールのみでした。このことは、この NCE が Erg25 を特異的に阻害することを示しています。ダウンストリーム中間体の減少も、この結論を裏づけています (図 5)。

代謝物

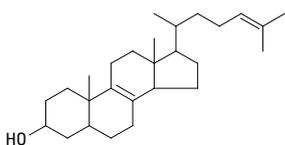
スクアレン



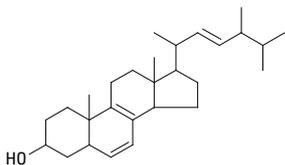
4,4-ジメチル-5 α -コレスタ-8,24-ジエン-3 β -オール



チモステロール



エルゴステロール



治療サンプルの倍率変化

1.3 (上昇)

6.2 (上昇)

Erg25

1181-0519

2.9 (低下)

1.3 (低下)

図 5. NCE 1181-0519 治療による各種ステロール代謝物量の倍率変化。4,4-ジメチル-8,24-コレスタジエノールの蓄積とダウンストリーム中間体のダウンレギュレーションは、この薬剤の標的が Erg25 であることを裏づけています

トタロール治療では、4 α -カルボキシ-4 β -メチル-5 α -コlest-8,24-ジエン-3 β -オール¹の蓄積が見られました。これは、トタロールの標的が Erg26 であることと一致しています (図 6)。この化合物は通常、生物学的に不安定な中間体であるため検出されず、したがって、もともとはこの実験のターゲットではありませんでした。トタロール治療によるこの化合物の蓄積は、非ターゲット分析を用いることではじめて明らかになりました。

精密質量プロダクトイオンスペクトル情報を用いて、この代謝物の構造を確認しました (図 7)。さらに、Molecular Structure Correlator ソフトウェアを用いて MS/MS フラグメントの構造を予測し、適合性スコアを作成して、蓄積した化合物のもっとも有力な構造候補を評価しました (図 8)。

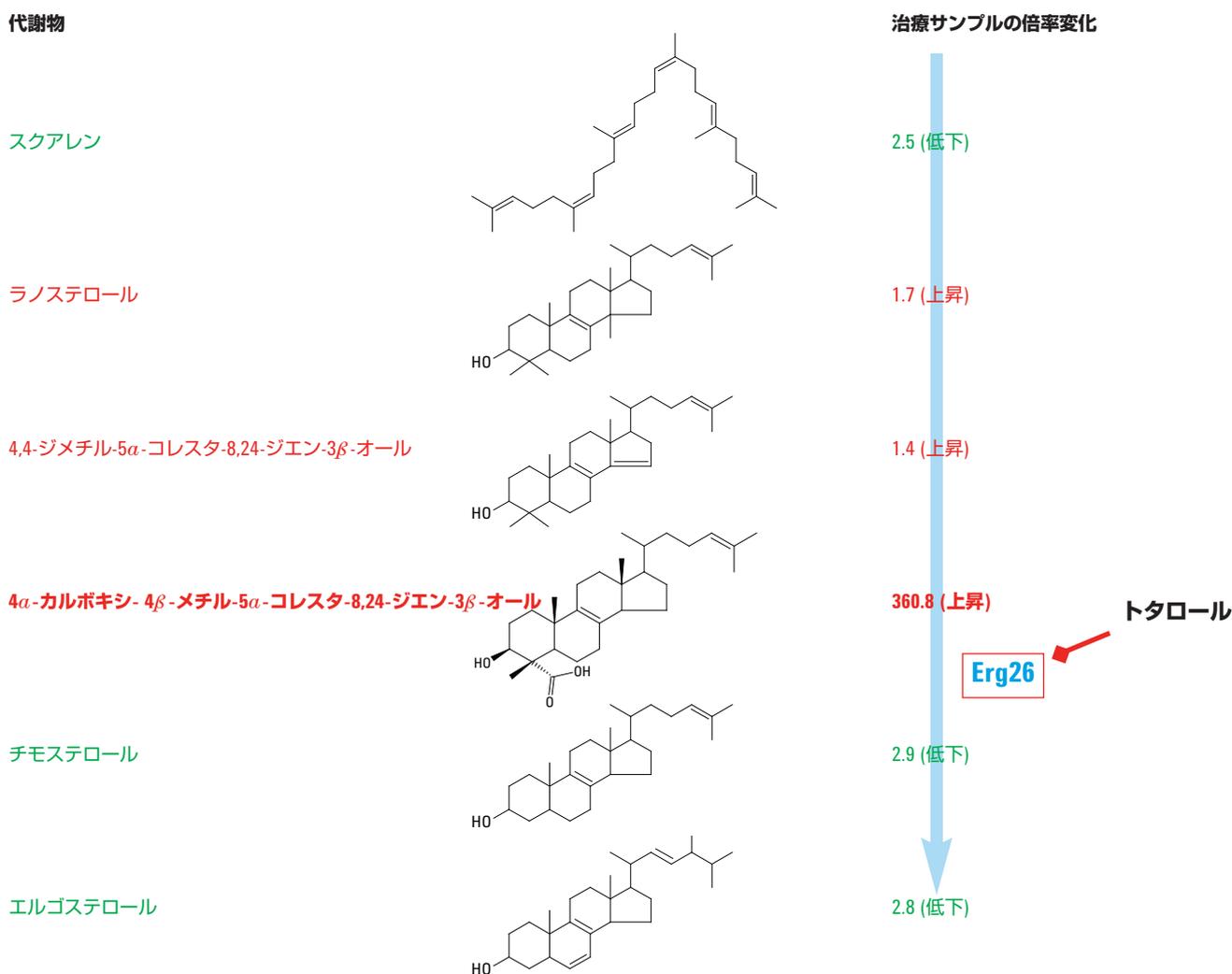
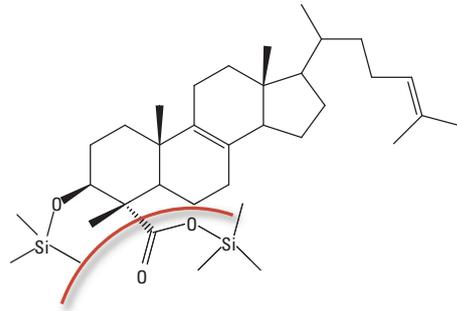


図 6. トタロール治療による 4 α -カルボキシ-4 β -メチル-5 α -コlest-8,24-ジエン-3 β -オール¹の量の倍率変化。トタロールの標的が Erg26 であることと一致しています



4α-カルボキシ-4β-メチル-5α-コレスタ-8,24-ジエン-3β-オール

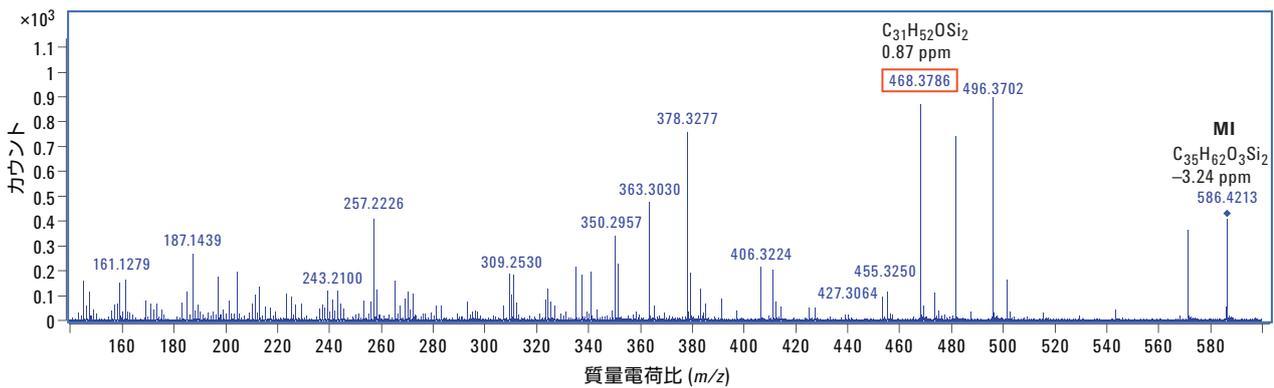


図7. MS/MS プロダクトイオンスペクトルは、非ターゲット分析により同定された蓄積中間体 (4α-カルボキシ-4β-メチル-5α-コレスタ-8,24-ジエン-3β-オール) の構造確認に役立ちます

精密質量情報にもとづく
プリカーサ分子式

適合性スコア

ChemSpider または
.mol ファイルから構造を抽出

対応する
フラグメントの
構造

ID	Formula	Isomers	Taut. Gaps	dM(ppm)	dM(ppm)	Product	Precur.	Overall
1	C35H62O3Si2	6	5	3.2	3.2	92	94	94
2	C36H80O6	52	39	2.5	2.5	70	96	91
3	C31H60O4Si2	2	1	8.6	8.6	24	72	63

m/z	Intensity	norm. Intense	Formula	dM(ppm)
496.3719	620.97	98.86	C31H52OSi2	2.4
468.3786	620.97	98.86	C35H62O3Si2	8.8
468.3790	590.80	95.14	C31H52OSi2	-1.7
468.3790	590.80	95.14	C27H50O2Si2	9.0
378.3282	505.17	81.35	C28H42	-0.3
378.3282	505.17	81.35	C24H48OSi	0.0
461.3495	460.80	77.81	C31H50O2Si	11.1
461.3498	460.80	77.81	C29H48O2Si2	11.1
363.3035	313.52	50.49	C27H39	11.1
363.3035	313.52	50.49	C23H43OSi	11.1
363.3035	313.52	50.49	C23H43OSi	11.1
257.2230	301.69	49.58	C18H29	13.1
571.3947	247.62	39.88	C34H50O3Si2	8.8
350.2955	227.09	36.57	C28H38	3.7
350.2955	227.09	36.57	C22H42OSi2	12.7
187.1444	164.36	26.47	C14H19	19.9
351.3641	189.43	29.87	C28H38	1.9
351.3641	189.43	29.87	C23H42OSi2	19.4
335.2704	158.48	25.52	C25H35	8.7

図8. Molecular Structure Correlator では、MS/MS プロダクトイオンスペクトルの各精密質量フラグメントにイオンが割り当てられます。このソフトウェアツールは、ChemSpider データベースを検索します。可能性のあるすべての異性体を評価することも、MDL Molfile 経由で構造を追加し、特定の化合物のみを評価することもできます

フルスペクトル採取モードの 7200 GC/Q-TOF の優れた感度により、必要なすべての代謝物を 1 回の実験で同定することができました。この感度は、特性が明確にわかっていない抗真菌薬のメカニズムを解明するうえで、重要な役割を果たしました。図 9 に、

2 種類の新規抗真菌薬の代謝プロファイリング結果をまとめています。この結果は、エルゴステロール生成経路における NCE 1181-0519 とトタロールの標的が、それぞれ遺伝子 ERG25 と ERG26 であることを示しています。

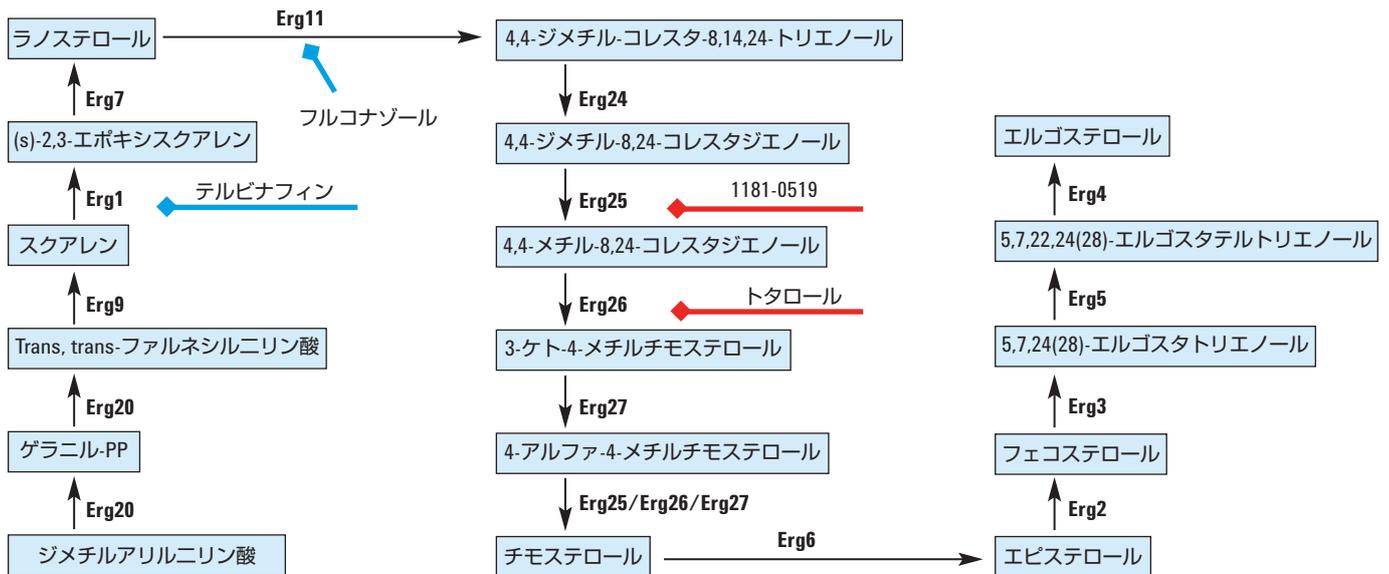


図 9. エルゴステロール生成経路の概略図。この研究で特定された、NCE1181-0519 とトタロールの遺伝子標的 (赤) を示しています

結論

7200 シリーズ GC/Q-TOF システムを用いた酵母ステロールの代謝プロファイリングは、抗真菌薬の酵素標的を同定するための強力なツールで、ハプロ不全プロファイリングと組み合わせれば、薬剤の阻害メカニズムをさらに詳細に解明することができます。7200 GC/Q-TOF の精密質量情報とフルスペクトル感度により、ターゲット化合物に加えて、治療により蓄積する未知の化合物を確実に確認および同定することが可能です。最大 5 桁のダイナミックレンジにより、幅広い細胞内濃度の代謝物を同時に定量することができました。

このアプローチを用いて、NCE1181-0519 とトタロールを含む複数の抗真菌薬候補のメカニズムを解明しました。分析にあたっては、ターゲット分析と非ターゲット分析を組み合わせ、Mass Profiler Professional を用いて、中間体の濃度を統計的に評価しました。また、7200 GC/Q-TOF では、精密質量 MS/MS プロダクトイオンスペクトルと Molecular Structure Correlator ツールを組み合わせ、未知代謝物の構造を確認および解明することが可能です。

参考文献

1. G. Giaever, P. Flaherty, J. Kumm, M. Proctor, C. Nislow, D. F. Jaramillo, A. M. Chu, M. I. Jordan, A. P. Arkin, R.W Davis. "Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 793-798 (2004).
2. 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).

詳細情報

本書に記載のデータは代表的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

June 28, 2012

5991-0571JAJP



Agilent Technologies