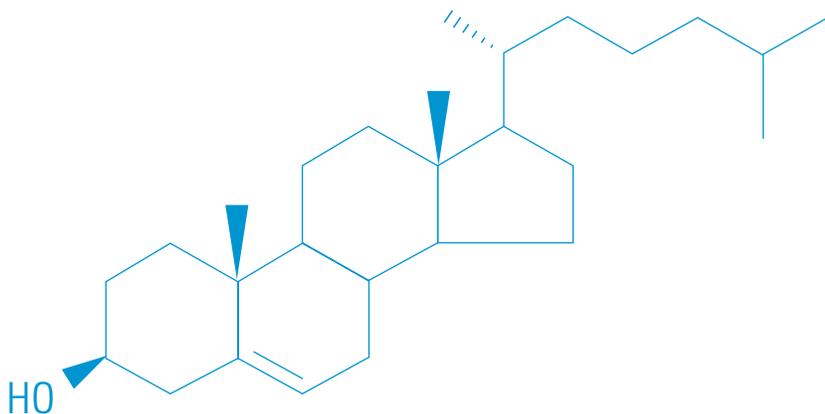




# リポミクスを理解する

## リポミクスとは

「リポミクス」という言葉は、有機体に存在するすべての脂質、および多様な細胞プロセスにこれらの脂質が与える影響を表しています。リポミクスを理解するには、脂質を集散的にそして個別に分析し、定量化することが重要です。質量分析法は、リポミクス研究のための有効な脂質プロファイリングをサポートする強力な分析検出ツールとして用いられています。



## リポミクスワークフロー

ショットガンリポミクスワークフローは、内部標準物質を使用して少数の脂質についての定量的な脂質クラスデータを迅速に得るための確立された技術です。この手法は、脂質クラス、組成、アルキル基に関する情報を提供しますが、脂質の明確な同定は提供しません。ショットガンリポミクスは、トリプル四重極 (QQQ) 質量分析計または四重極飛行時間型 (Q-TOF) 質量分析計のどちらかで実行することができます。研究者は、プリカーサイオンスキャンモードまたはニュートラルロススキャンモードを QQQ 質量分析計で使用して、特定

の脂質クラスをターゲットとすることができます。Q-TOF 機器は、スキャンモードでは QQQ 機器よりも高い感度、高い質量精度を備えています。QQQ のニュートラルロススキャン測定のような特異性は備えていません。

ショットガンリポミクスは、脂質の化学的多様性や、きわめて異なるイオン化効率を原因とするイオン抑制が重大な制約となっています。脂質を分離せずに、MS および MS/MS 情報のみで、二重結合の場所やアルキル基の位置などの生体に関連した構造の差を解決することはできません。脂質クラスの多様な化学的性質は、個別の脂質を分離し同定するため

の分離手法の開発を検討するうえで重要な検討事項です。

リポミクスのプロファイリングは、分離ベースの手法です。より包括的な手法として登場し、数百種類の脂質の相対的な定量および同定を 1 回の分析で提供します。この手法の開発は、クロマトグラフィーの進歩、イオンモビリティ質量分析法 (IMS) の開発、最先端のソフトウェア解析ツールによって可能となりました。

# さまざまなアプリケーションに対応する アジレントのリピドミクスツール

複数のアプリケーション分野にわたるグローバルリピドミクス研究を推進するため、アジレントはクロマトグラフ、質量分析機器、消耗品、インフォマティクス、テクニカルサポートを提供しています。

## 基本研究および臨床研究

複雑な生体サンプル中の脂質を研究対象として、脂質バイオマーカーを同定できます。また、従来の解析メソッドよりも詳細に、細胞代謝物を理解することができます。リピドミクスは、脂質プロファイルのドキュメント化、代謝疾患で生じる脂質変化の解明に使用されます。また、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、高血圧症、肥満のメカニズムを理解するうえで中心的な役割を果たしています。

## 農業

土壌および植物生物学への影響を通じ、農業分野での脂質の機能性を解明します。

## 食品および栄養

脂質、またはタンパク質と脂質が、どのように細胞やサブ細胞機能、例えばシグナル伝達や遺伝子発現を調整するかを特定し、評価しま

す。包括的なリピドミクス研究では、食品と健康との新しい関連性が発見されています。

## 医薬品

脂質を同定することにより、衰弱性疾患に対し、創薬および効果的な治療の基盤を提供します。

## バイオ燃料

脂肪酸および石油を産出する微細藻類の脂質を、エンジン適合性およびバイオディーゼルの性能指標を決定するための重要なマーカーとしてプロファイリングします。リピドミクスは、バイオディーゼルの成分である脂肪酸エチルエステル (FAEE) を製造するための新しいストレインのエンジニアリングで役割を果たしています。

「私たちは、低濃度の脂質を検出するための高度なワークフローをアジレントと共同開発しました。ワークフローでは、捕捉、分離、ナノ流体クロマトグラフィーを使用した後、高分解能のタンデム質量分析計を使用します。この手法により、重要な知見が得られます。アジレントとのパートナーシップにより、私たちはメタボロミクス、グリコミクス、プロテオミクスに加えリピドミクスに関する分野まで研究を拡大しています」

**MARKUS WENK 博士**  
シンガポール国立大学



# リピドミクス研究における分離の課題

## 複数の手法と複数のソリューション

脂質の構造は多様であるため、すべてのクラスに適した単一のソリューションは存在せず、多くの分離手法を必要とします。ガスクロマトグラフィー／質量分析法 (GC/MS) は従来より脂肪族アシルの特性解析に使用されてきました。しかし、アルキル基情報の詳細は得られますが、サンプル前処理法 (けん化) が原因で脂質レベルの情報は失われます。GC/MS では、優れたクロマトグラフィー分離およびイオン化によって、テルペンおよびステロール類を優先的に分析できます。

液体クロマトグラフィー (LC) および超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は、非常に広範囲に適用可能な手法です。脂質レベルの情報を維持し、誘導体化を必要とせず、大気圧イオン化質量分析計と容易に接続できます。クロマトグラフィーメソッドの選択は、分離および検出される脂質のクラスに影響を与えるため、アプリケーションに最適なものを選ぶことが重要です。

脂質カテゴリ	GC/MS	LC/MS	SFC/MS
脂肪酸 (アシル)	...	..	..
グリセロ脂質 (トリグリセリド)	.	...	..
グリセロリン脂質		...	..
スフィンゴ脂質		...	..
ステロール脂質	...	..	..
プレノール脂質		..	..
サッカロ脂質		...	..
テルペン (植物)	...	..	..
ポリケタイド	.	..	..

表 1. 脂質クラスごとの異なるクロマトグラフィーによる分離の相対的な強度の概要。

... は所定のクラスの最高の分離テクニックを示しています。

アジレントは、GC/MS、LC/MS、SFC/MS などの装置からデータ分析ソフトウェアまで、さまざまなリポミクスソリューションを提供しています。

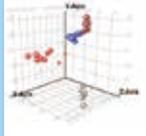
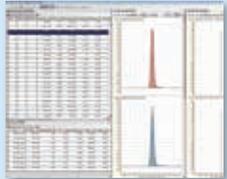
	データ取り込み	フィーチャー抽出	アラインメントと統計解析	同定	パスウェイ解析
		MassHunter ソフトウェア	Mass Profiler Professional ソフトウェア		
分析機器		 定性	 分析と視覚化	 Agilent METLIN データベースと Agilent Fiehn ライブラリを 使用した ID Browser	 KEGG などの 公的データベースを使用した Pathway Architect
		 Profunder			
					

図 1. アジレントのリポミクスワークフローソリューション

# 強力かつ柔軟で信頼性の高い リポミクス研究を支える技術

## 脂質の分離

順相 LC と逆相 LC には、脂質の分離においてそれぞれ異なる利点があります。順相 LC は脂質クラスをすばやく評価できます (図 2)。逆相 LC は優れたリテンションタイムの再現性と 1 つの脂質クラス内での脂質の分離を実現しています (図 3)。包括的な脂質分析では、順相 LC はクラスベースの分離のために使用され、続いて分離された各フラクションが逆相 LC で各個別の脂質に分離されます。

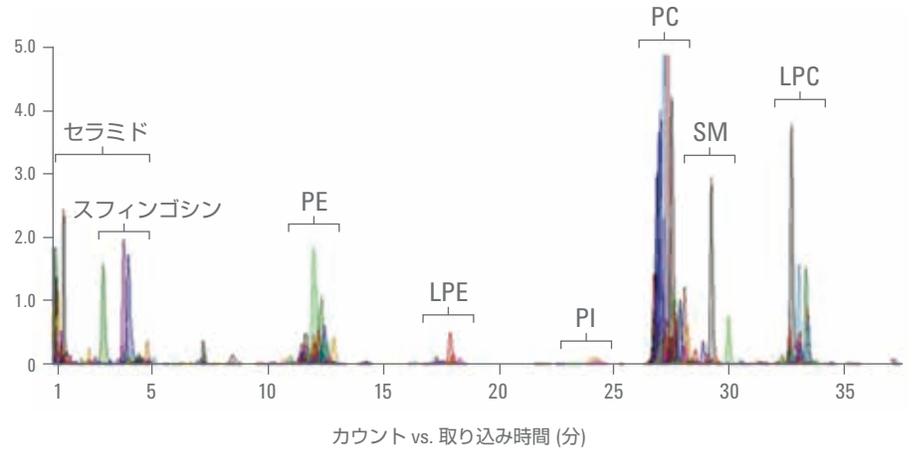


図 2. 順相 LC/MS 分離による肝臓抽出物の脂質クラスごとの分離。  
PE = ホスファチジルエタノールアミン、LPE = リゾホスファチジルエタノールアミン、  
PI = ホスファチジルイノシトール、PC = ホスファチジルコリン、LPC = リゾホスファチジルコリン。

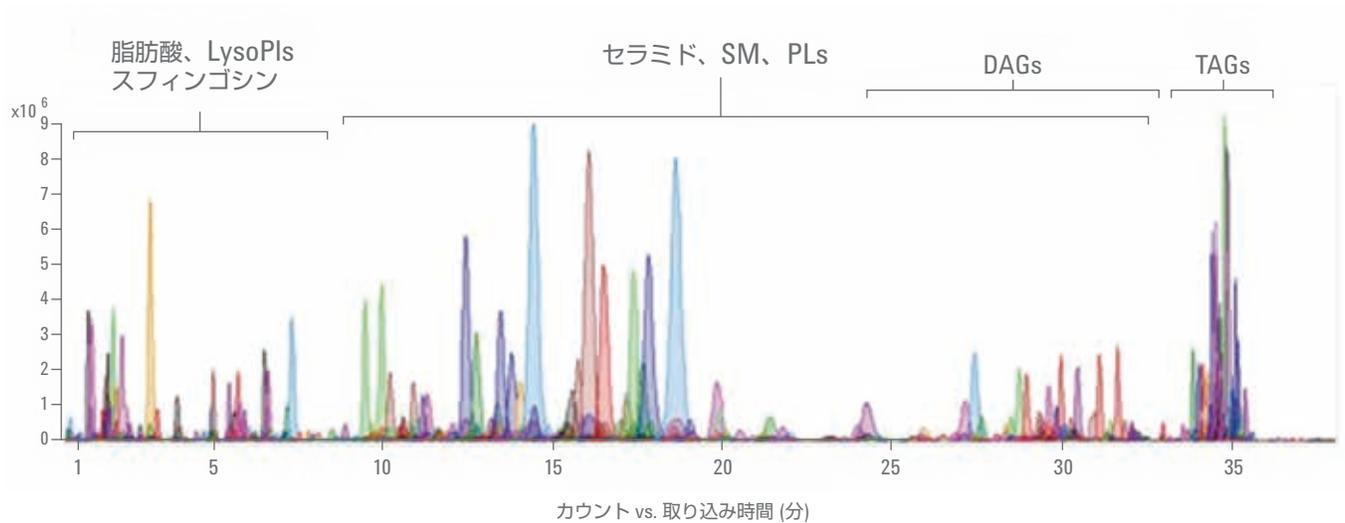


図 3. 逆相 LC/MS による肝臓抽出物の脂質クラス内の分離。  
PL = リン脂質、SM = スフィンゴミエリン、DAG = ジアシルグリセロール、TAG = トリアシルグリセロール。

## 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC)

SFC は、非常に高密度の二酸化炭素を、SFC 移動相での主成分として使用します。順相クロマトグラフィーの一種の SFC は逆相 LC と直交し、極性脂質と非極性脂質の高い分離を 1 回の分析で実現します。SFC は、複雑な脂質混合物の分離においてきわめて効果的です (図 4)。Agilent 1260 SFC システムは、シンプルなバルブスイッチによって、LC と SFC モード間を簡単に切り替えられるようにデザインされています。

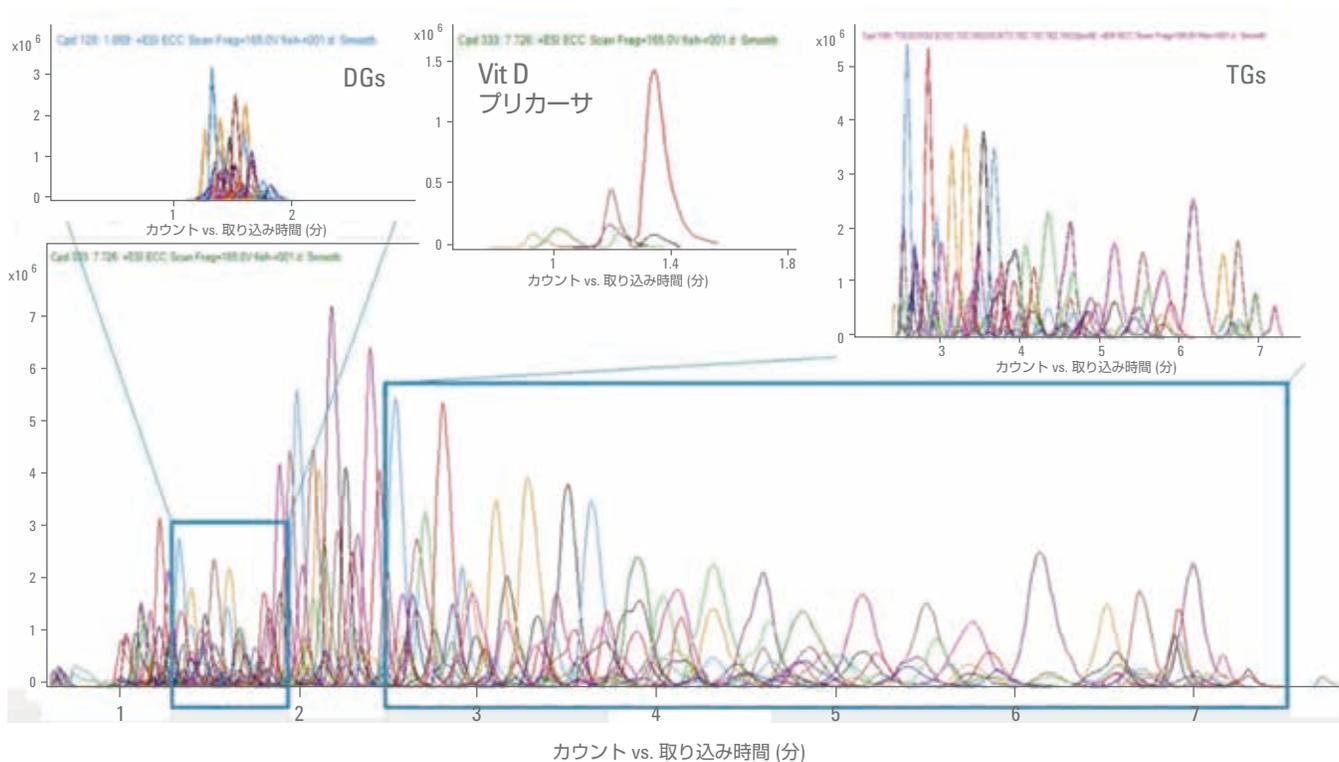


図 4. 市販の栄養補助食品中の魚油の SFC/MS 分析。抽出イオンクロマトグラムから、高分解能の SFC が複雑な脂質混合物の分析能力を備えていることが分かります。

Agilent 1260 Infinity 分析 SFC/UHPLC ハイブリッドシステムは、質量分析計 (MS) を追加の検出器として組み込むことによって、汎用性を大幅に向上させます。SFC/MS と HPLC/MS 間の迅速な切り替え機能は、リポミクス研究においてきわめて強力な機能です。

### Agilent 1260 SFC システム

- 統合されたシステム – すべての Agilent LC/MS プラットフォームで最先端の SFC による単一ソフトウェアコントロールを実現
- 環境への配慮 – LC メソッドでは容易に分離できない化合物を、使用する有機溶媒の量を制限して、高速かつ高分解能で分離可能
- 強力な分離能力 – 極性および非極性の脂質を 1 回の実行で分離可能
- 汎用性の高さ – 最高の信頼性に加え、高い柔軟性を実現



## イオンモビリティの利点

イオンモビリティテクノロジーにより、脂質などの複雑なサンプルに対し、直交型の分離次元が加わります。クロマトグラフィー分離の後に、脂質はガス相でさらに分離され、脂質イオンの衝突断面積を基に分離されます (図 5)。イオンモビリティでは、複雑なサンプルを脂質クラスで分離することもできます。Agilent 6560 IM Q-TOF システム (図 6) は、正確な質量測定をクラス最高水準の分解能の移動度分離とともに提供します。

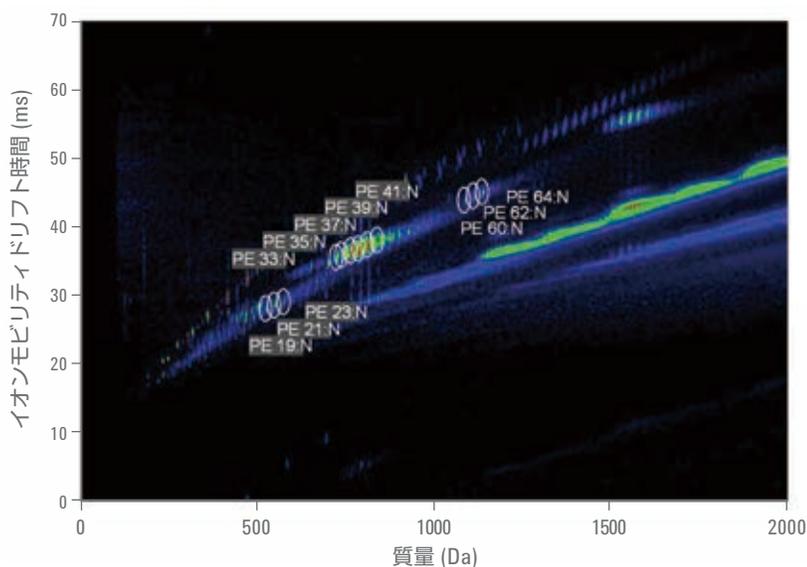


図 5. ホスファチジルエタノールアミン (PE) の導入混合物の IMS 分離。ドリフト時間の増大は、炭素原子の数の増大と関連付けられます。

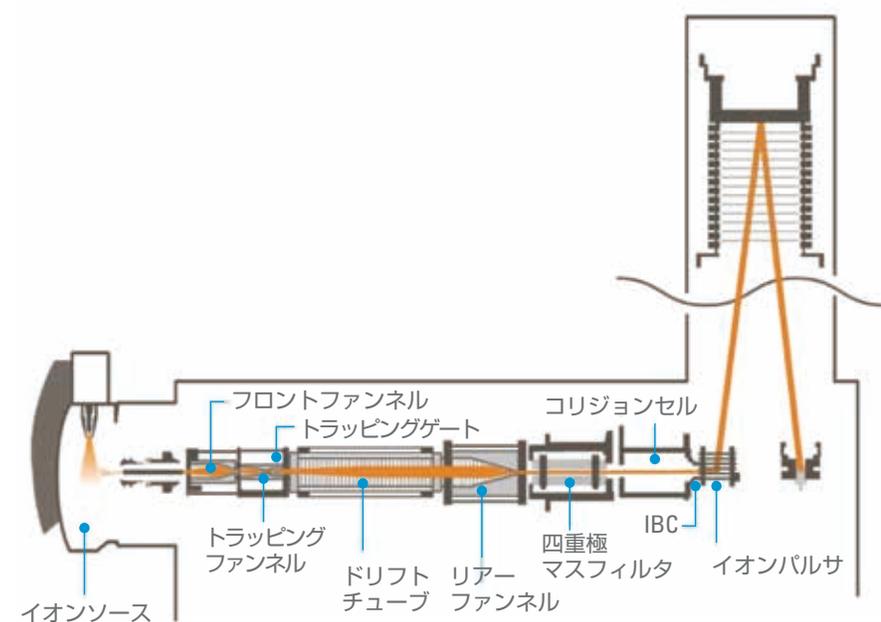


図 6. イオン濃縮用のフロントファンネル、トラッピングイオンファンネル、ドリフトチューブ、集束用のリアファンネルで構成されるダイナミックなファンネルアセンブリの各要素が、細心の注意を払って設計されています。これにより、イオン源から Q-TOF 高分解能マスアナライザへのイオン透過率が向上しています。このため、LC/IM/MS 分析を使用した複雑なサンプルの分離および特性解析を高感度で実行でき、ターゲット分子の構造的多様性の研究手段を提供します。

## 脂質の同定

LIPID Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) は、国際的に最初に認められた脂質分類システムを開発するために設立された研究施設のコンソーシアムです。多数の脂質を同定するために必要となる脂質の学名および構造表現も開発対象に含まれます。LIPID MAPS 分類システムは、8 つの脂質カテゴリ (図 7) で構成されています。各カテゴリは、脂肪族鎖、立体異性、キラリティ、頭部に起因する広範な構造的および機能的多様性によって特性分析されます。

完全な脂質のアノテーションおよび同定には、クラス、元素組成、アルキル基のサイズと位置、二重結合の数と場所、二重結合の位置関係 (シストランス) が含まれます。

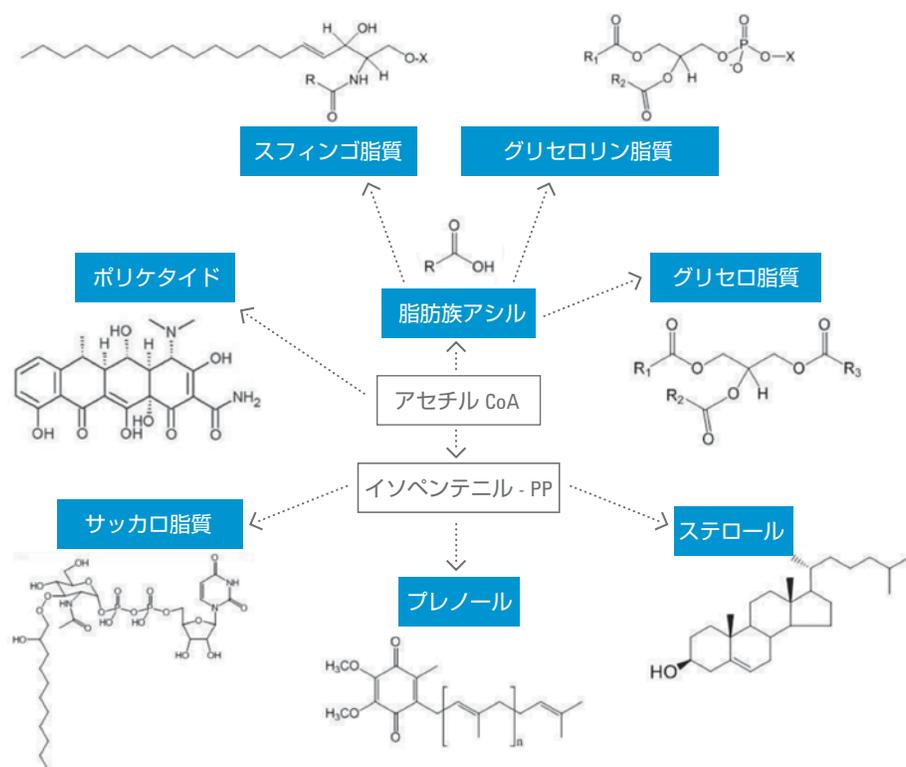


図 7. LIPID MAPS コンソーシアムで定義されている 8 つの異なる脂質クラス

アジレントは、脂質のアノテーションまたは同定のための 3 つのソリューションを提供しています。データベース照合、MS/MS スペクトルライブラリ照合、MS/MS 理論スペクトル照合を用いることができます。データベースとの一致は、Agilent-METLIN データベースか SimLipid (PREMIER Biosoft のサードパーティソフトウェア) を使用して実行できます。MS/MS スペクトルライブラリマッチングは、化学標準を使用して生成される Agilent-METLIN MS/MS ライブラリのみを使用して実行されます。SimLipid は、脂質スペクトルの MS/MS 理論照合もサポートしています。

Agilent-METLIN データベースおよび MS/MS ライブラリは、脂質のアノテーションおよび同定に使用できます。MS/MS スペクトル標準がある約 640 種類の脂質のエントリに加え、LIPID MAPS からの約 36,600 種類の脂質のエントリが含まれています。SimLipid データベースには、8 つの脂質カテゴリと 36,224 の脂質エントリが含まれています。

## 柔軟性の高いソフトウェア

脂質プロファイリングでは、サンプルグループ間の脂質の差違を比較し、発見するために複数のサンプルが分析されます。アジレントは、脂質フィーチャー抽出法およびサンプル全体のアライメント向けに、Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアを提供しています。MS の結果は SimLipid にエクスポートされ同定されるか、または Mass Profiler Professional (MPP) にエクスポートされ、統計解析されます。SimLipid が同定に使用されない場合、ビルトインの ID Browser と正確な質量照合のために Agilent-METLIN データベースを使用して脂質は MPP で同定されます。アジレントのソフトウェアソリューションを組み合わせて使用し (図 8)、データ解析手法によりさまざまなワークフローを採用できます。

MS/MS データが取り込まれる場合、MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアを使用して分析は実行されます。SimLipid または Agilent METLIN Metabolite パーソナル化合物データベースおよびライブラリ (PCDL) のどちらかにより、同定も行われます (図 9)。

SimLipid は、PREMIER Biosoft International の Web サイトから入手できます。

[www.premierbiosoft.com/lipid/index.html](http://www.premierbiosoft.com/lipid/index.html)

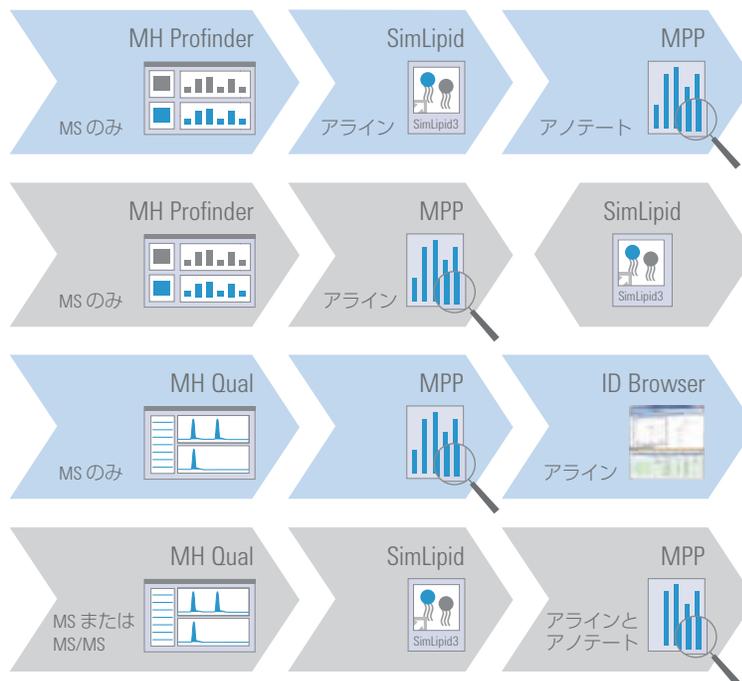


図 8. MassHunter ソフトウェアに統合されたリポドミクスワークフロー

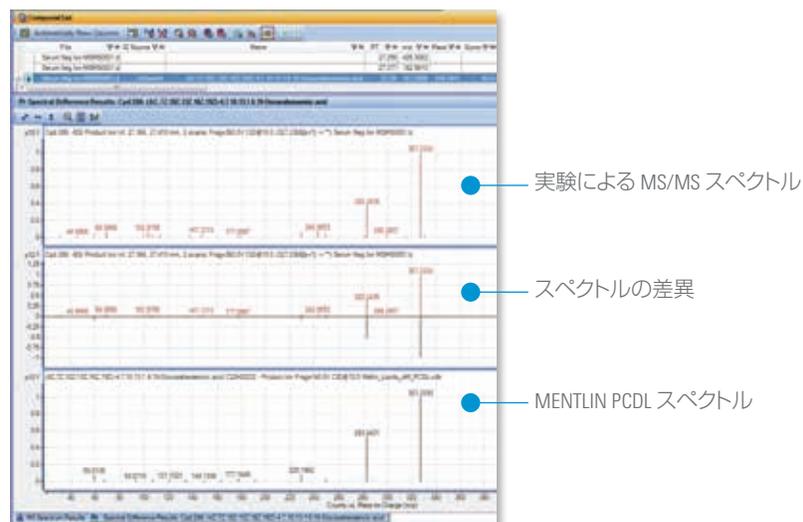


図 9. ヒトの血漿サンプルの MassHunter 定量分析と METLIN Metabolite PCDL の MS/MS ライブラリ検索の結果の比較。上のスペクトルは、化合物 1 つについての Agilent Q-TOF で採取された MS/MS スペクトル、下のスペクトルは METLIN からのライブラリスペクトルを示しています。中央は、スペクトルの差異を示しています。化合物リスト (92.6) のスコアは高品質のヒットを示しています。

## Pathway Architect が解明する重要な生物学的コンテキスト

脂質サンプルの LC/MS による分析には、クロマトグラフィーの適切な選択、および検出された化合物のアノテーションと同等に特別な課題が伴います。ノンターゲットプロファイリングの手法では、生物学的コンテキストがなくても多数の候補脂質が提示されます。

MPP の Pathway Architect モジュールは、データを検索し、フィルタリングして、生物学的パスウェイにマッピングして視覚化します。2 つのタイプのパスウェイ解析がサポートされています。1 つは文献情報由来ネットワーク解析で、発行済みの文献の自然言語処理をベースとしています。もう 1 つは、KEGG、BioCyc、Wikipathways などの公表されている洗練された生物学的パスウェイを解析するためにデザインされています。実験データは、これらのパスウェイに投影され、ユーザはデータを対話形式でフィルタリング、ズーム、選択することができます。パスウェイは選択でき、脂質、タンパク質、代謝物、転写物、遺伝子のリストをエクスポートし、他のプログラムで使用して新しいパスウェイから導かれた実験を作成することができます。

この例では (図 10)、脂質分析のワークフローは MS および MS/MS によるサンプルのノンターゲットプロファイリングから始まり、可能な限り多くの脂質化合物を検出します。SimLipid 同定ソフトウェアを使用して結果にアノテートした後、KEGG パスウェイ上の Pathway Architect で視覚化できます。

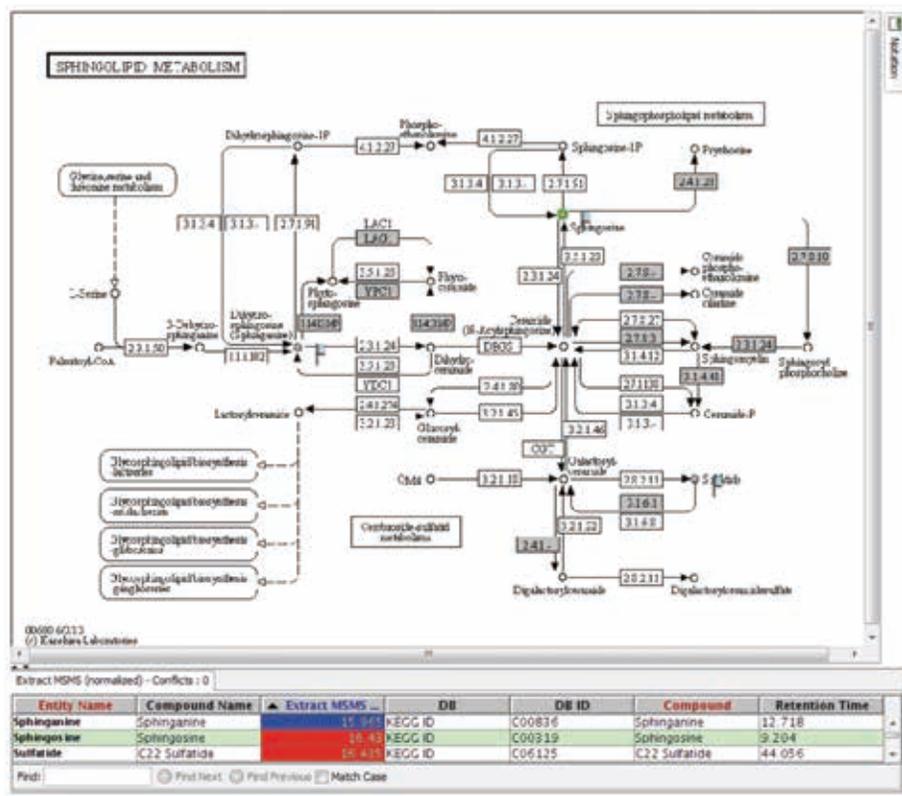


図 10. KEGG パスウェイデータベースを使用した、Pathway Architect でのヒト血漿サンプルのパスウェイ解析の結果。3 つの脂質化合物が SimLipid を使用して同定され、スフィンゴ脂質代謝物パスウェイ内に存在することがわかりました。化合物がパスウェイ上に黄色のドットで強調表示され、現在選択されている化合物 (スフィンゴシン) は緑色の背景色で描かれています。

# リピドミクスを自動化する

## 分析結果を向上するための サンプル前処理法の自動化

リピドミクス研究におけるサンプル前処理の自動化プロトコルは再現性を高め、サンプル前処理の時間を短縮します。さらに、自動化により、研究者はより複雑な課題に時間を割くことが可能になり、人為的誤差が無い高い再現性を得ることができます。これは、長期間にわたる研究では特に重要なことです。一例として、ヒト血漿からのリン脂質およびスフィンゴ脂質の半自動化抽出メソッドが、シンガポール国立大学のリピドミクスインキュベーター (SLING) の Markus Wenk 博士のラボで Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform を使用して開発されています。

## 手動プロトコルと半自動化プロトコルでの手順の比較

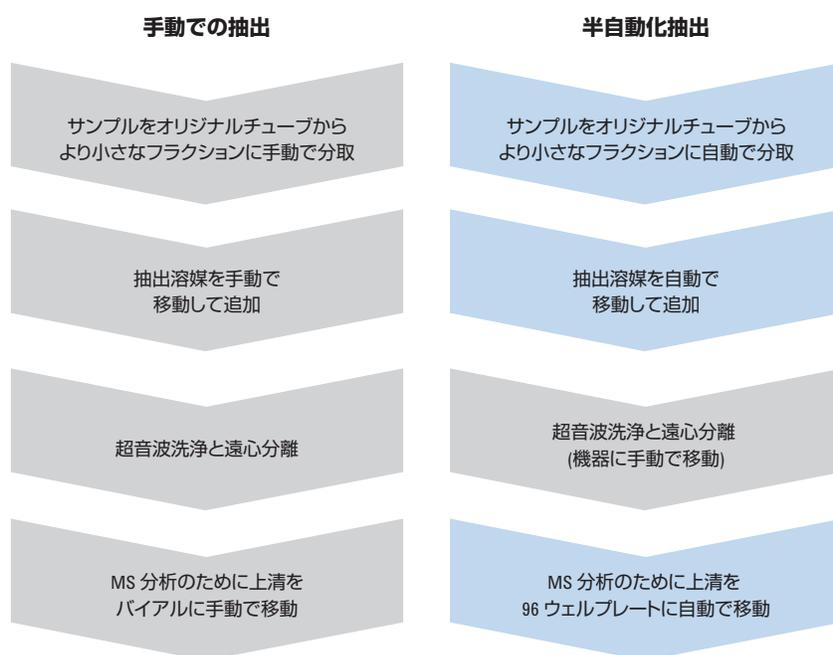
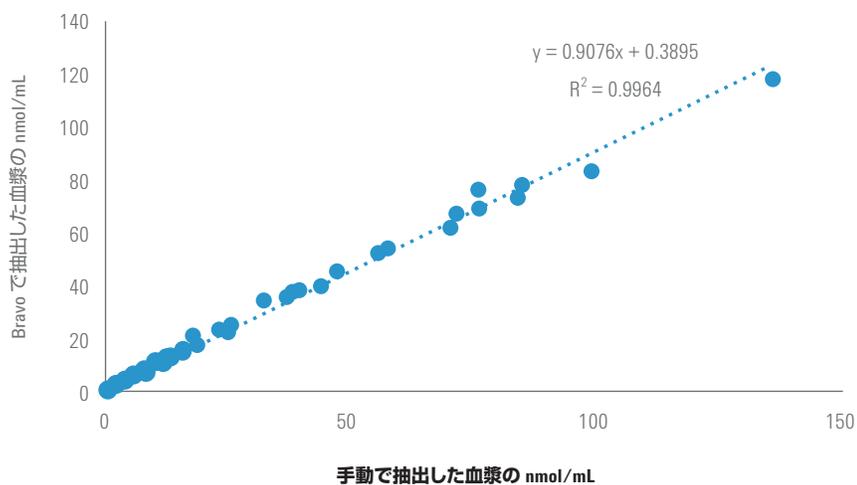


図 11: Wenk 博士のラボではリン脂質およびスフィンゴ脂質についてサンプル前処理の 4 つの手順のうち 3 つの手順が Bravo Liquid Handling Platform を使用した自動化メソッドに置き換わります。



アジレントの自動化リキッドハンドリングソリューションは、液体の取り扱い、ラベリング、シーリングなどのミスの原因となりやすい作業を簡略化することによってデータ品質の低下を損なうことなくスループットを向上させます。



脂質標準	RSD (%) 半自動化	RSD (%) 手動
PE 14:0/14:0	4.80	7.13
PC 14:0/14:0	5.85	5.72
C17 セラミド	7.32	11.97
LysoPC 20:0	5.27	5.05
SM 30:1	3.79	4.96
GluCer d18:1/8:0	6.81	6.34

図 12: 回帰プロットは、半自動の Bravo Liquid Handling Platform を使用した前処理メソッドと手動の前処理メソッドの定量結果の比較を示しています。右の表から、標準脂質の定量において半自動メソッドの方が優れていることが分かります。

# リポミクス研究に対応する AGILENT GC/MS および LC/MS ソリューション

## GC/MS 機器



### 5977A シリーズ GC/MSD システム

ターゲット分析に加え、未知化合物のスクリーニングに最適です。Agilent 5977A GC/MSD は、高い信頼性と使いやすさを備え、大量のサンプルをスクリーニングすることができます。



### 7000C および 7010 トリプル四重極 GC/MS システム

より条件の厳しいターゲット分析においても、最高の MS/MS 定量を可能にし、7010 ではさらに低い検出限界を達成します。



### 7200B GC/MS Q-TOF システム

未知の脂質を高分解能の MS/MS データで同定できます。Agilent 7200B GC/MS Q-TOF は、連続的な高分解能データによって、7890B GC の分離能力を補完します。



アジレントの豊富な種類の GC/LC カラムと消耗品は、リポミクスの研究をサポートします。お客様のラボニーズに合わせて豊富なラインナップのなかからお選びいただけます。

## LC/MS 機器



### 1260 Infinity 分析 SFC システム

Agilent 1260 SFC/MS は、LC メソッドでは容易に分離できない脂質を高速かつ高分解能で分離します。極性の脂質および非極性の脂質を、高い柔軟性、高精度、優れた信頼性で、わずか 1 回の分析で網羅的に分離解析できます。



### 6500 シリーズ Accurate-Mass Q-TOF

6500 シリーズ Q-TOF は、低分子量の化合物のプロファイリングおよび同定に最適で、MS/MS 機能を備えています。代表的な質量精度により、脂質の同定の信頼性が向上し、データベース検索での偽陽性が低減します。



### 1290 Infinity II LC

優れた分離性能と検出性能で、最高品質のデータを提供し、信頼性が飛躍的に向上します。優れたサンプル数および注入サイクル速度を新しい操作性と組み合わせて、最高のスループットを実現しています。



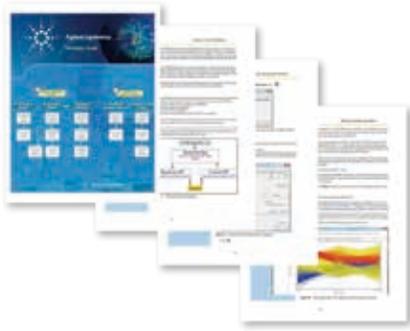
### 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS システム

6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS システムは、極めて高速の MRM トランジションおよび堅牢で信頼性の高い性能を備え、最大の稼働時間を実現し大量のサンプルセットを分析できます。フェムトグラムレベル以下の感度により低濃度の脂質を検出できます。



### Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (自動分注器)

Bravo を用いると、脂質分析において、捕集チューブからウェルプレートへのサンプル分注、液体添加、サンプル濃縮を自動で行うことができます。



詳細については、リポドミクスワークフローの概要およびガイド (英語) をダウンロードしてご覧ください。MassHunter 定量分析、Profiler、SimLipid、MPP ソフトウェアを使用した、リポドミクス分析の手順について示されています。ガイドには、リポドミクスワークフローの手順が詳細に記載されています。それぞれ、5991-1643EN および 5991-1644EN を、[www.agilent.com/chem/library](http://www.agilent.com/chem/library) で検索してください。

お問い合わせ先

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は薬事法に基づく登録を行っておりません。  
また、本資料記載の情報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. 2015

Published in Japan, May 11, 2015

5991-5419JAJP



**Agilent Technologies**