

Instrument: Pegasus® GC-HRT 4D

Pegasus GC-HRT 4D を活用した酵母代謝物の高度特性評価

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

Key Words: Yeast, Metabolomics, Gas Chromatography, High Resolution Mass Spectrometry

1. Introduction

酵母は古くから発酵やワイン製造に利用されてきました¹。近年では、*S. cerevisiae* 株がバイオエタノール生産における主要な細胞プラットフォームとして用いられています²。さらに酵母は、システム生物学におけるモデル生物としての役割を維持しつつ、有機酸などの高付加価値かつ持続可能な化学物質を生産する「細胞工場」としての可能性についても研究が進められています^{3,4}。こうしたバイオエンジニアリングを実現するためには、酵母の代謝を明確に理解することが不可欠です。

メタボロミクス研究および代謝学における最大のボトルネックは、生体内に存在する多様な化合物クラスの特徴評価にあります。本研究では、酵母の分子プロファイリングを目的として、ガスクロマトグラフィー-高分解能飛行時間型質量分析 (GC-HRT) および包括的二次元ガスクロマトグラフィー-高分解能飛行時間型質量分析 (GC×GC-HRT) を用いた解析を検討しました。

GC×GC が有するピークキャパシティの向上、高いクロマトグラフィー分離能、ならびによりクリーンな質量スペクトルを取得できる特長と、高分解能・高質量精度 TOFMS の能力を組み合わせることで、Pegasus GC-HRT 4D はメタボロミクスにおけるディスカバリーワークフローを次のレベルへと引き上げます。図1は、複雑なメタボロミクスサンプルに対して、クロマトグラフィー分離能の向上がもたらす利点を明確に示しています。

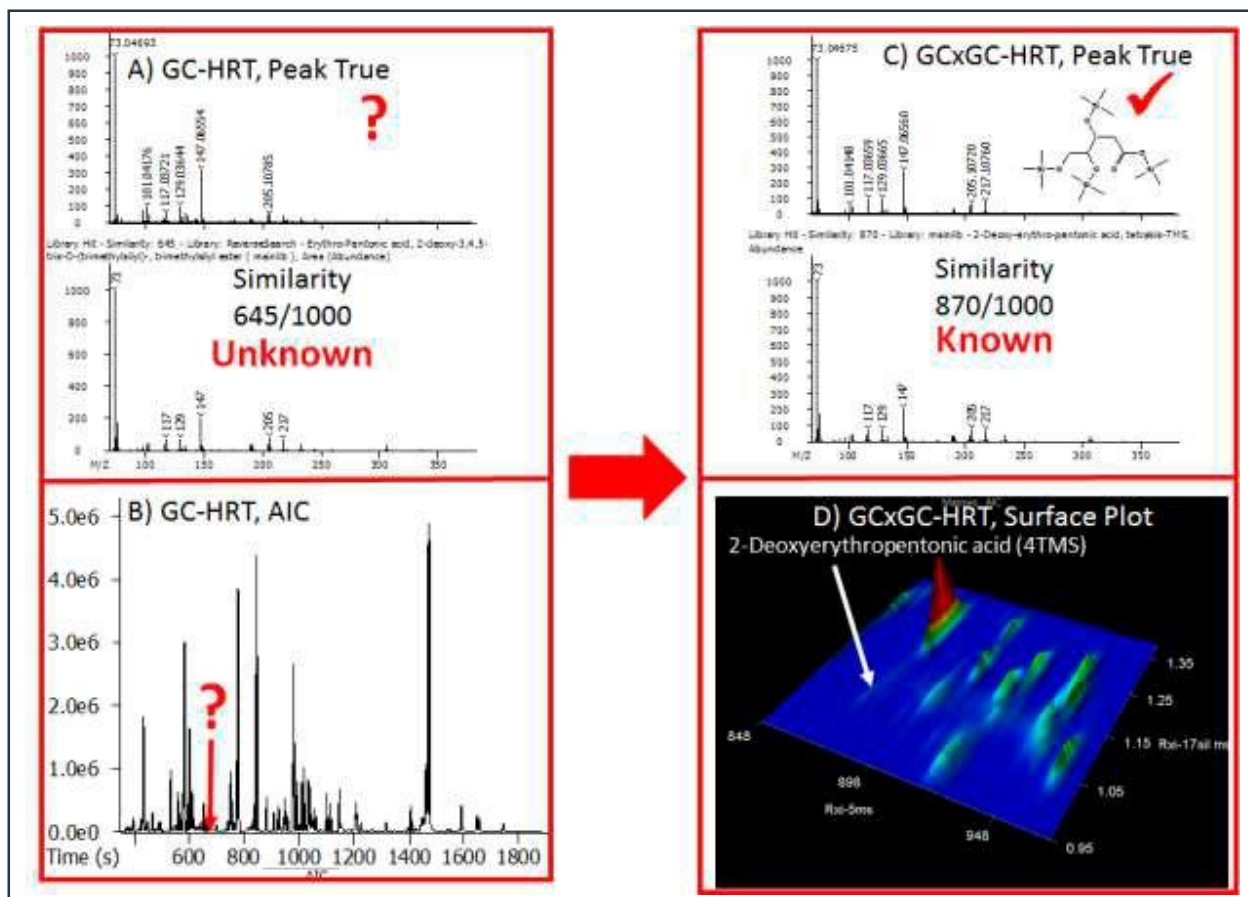


図1. 2-デオキシエリトロペントン酸 (4TMS) の特性評価における GC-HRT の Peak True 質量スペクトルおよび AIC (A, B) と、GC×GC-HRT の質量スペクトルおよびサーフェスプロット (C, D) の比較

2. Experimental

酵母自己消化物 (Sigma-Aldrich) および乾燥ペーカーズイースト (市販品) を、以下の手順に従って分析用に調製しました。酵母粉末 (15–30 mg) を、 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3 = 1:1:2$ (v/v/v) 混合溶媒 10 mL で抽出し、2 mL GC バイアルにろ過しました。溶媒は SpeedVac を用いて除去しました。

残渣は、以下の 2 段階で誘導体化しました。

- 1) メトキシ化 : MEOX (ピリジン中メトキシルアミン塩酸塩 20 mg/mL) 20 μL を添加し、60° C で 60 分間反応
- 2) シリル化 : MSTFA 80 μL を添加し、60° C で 60 分間反応

GC および GC×GC データは、表1に示す装置条件を用いて取得しました。包括的なデータ処理は、ChromaTOF® ソフトウェアを用いて実施し、1) 質量キャリブレーション、2) ピーク検出 (デコンボリューションデータ)、3) NIST 2014 および Wiley 10 ライブラリを用いたスペクトル類似度検索を行いました。

Table 1. *Pegasus* HRT GC-High Resolution TOFMS Conditions

Gas Chromatograph	LECO GCxGC Quad Jet Thermal Modulator & MPS2 Autosampler
Injection	1 μL 、スプリット 20:1、250°C (CI 時はスプリットレス)
Carrier Gas	He、1.0 mL/min、定流量
Column One	Rxi-5 MS, 30 m x 内径0.25 mm x 膜厚0.25 μm (Restek, Bellefonte, PA, USA)
Column Two	Rxi-17SilMS, 0.9 m x 内径0.25 mm x 膜厚0.25 μm (Restek, Bellefonte, PA, USA)
Temperature Program	65°C で 1 分保持後、10°C/min で 320°C まで昇温し 6 分保持 第2オープン は第1オープンより +5°C で制御
Modulation	1 次元分析 : 0 s 2 次元分析 : 3 s ※モジュレーター 温度は第2オープン より +15°C
Mass Spectrometer	LECO <i>Pegasus</i> HRT
Transfer Line	300°C
Ion Source Temperature	250°C (EI); 200°C (CI)
Acquisition Mode	高分解能モード, R = 25,000 (FWHM)
Ionization Mode	EI および/または CI (試薬ガス: メタン中5% NH_3)
Mass Range (m/z)	35-510 (EI); 60-1200 (CI)
Acquisition Rate	GC-HRT: 10 spectra/s; GCxGC-HRT: 200 spectra/s

3. Results and Discussion

酵母自己消化物サンプルに、重水素 (D) および ^{13}C で同位体標識した 23 種類の内部標準を添加し、抽出後、分解能 25,000 ($m/z = 219$) で動作するガスクロマトグラフィー—高分解能飛行時間型質量分析 (GC-HRT) により分析しました。さらに、電子イオン化 (EI) および化学イオン化 (CI) を組み合わせた相補的なイオン化手法、大規模ライブラリ (NIST, Wiley) を用いたスペクトル類似度検索、ならびに 1 ppm 未満の高質量精度を有するイオンに基づく分子式決定を適用することで、酵母成分の信頼性の高い特性評価を行いました。

高分解能デコンボリューション (High Resolution Deconvolution : HRD®) の結果は、図2に示す酵母抽出物サンプルの分析イオンクロマトグラム (AIC) に反映されています。表2には、代表的な酵母成分について、化合物名、分子式、保持時間、ピーク面積、およびスペクトル類似度を示しています。これらの化合物には、有機酸、二塩基酸、アミノ酸、糖類、塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドが含まれていました。NIST および Wiley ライブラリに対するスペクトル類似度検索の結果、これらの化合物群における平均類似度は 911/1000 でした。

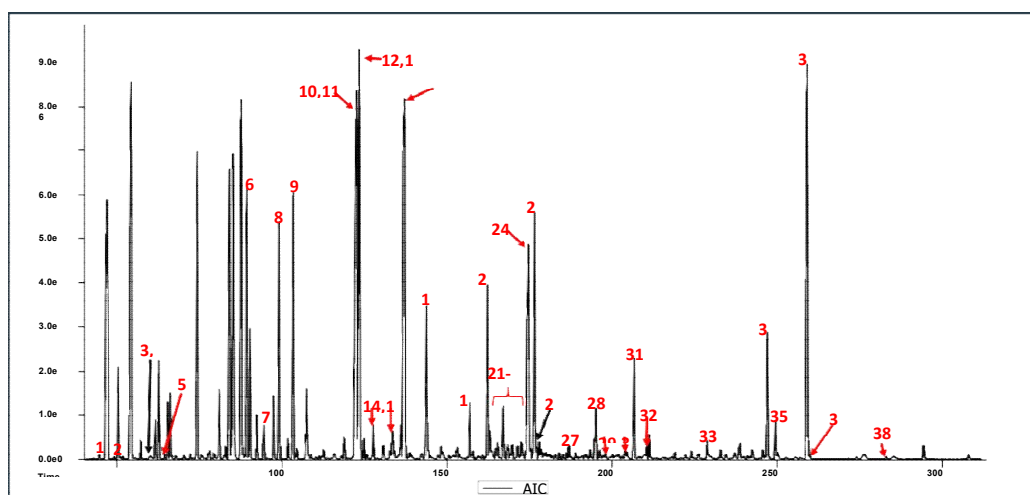


図2. 酵母自己消化物の EI-HRT 分析イオンクロマトグラム (AIC)

表2. 酵母自己消化物中の代表的化合物

Peak #	Name	Formula	R.T. (s)	Area	Similarity	Peak #	Name	Formula	R.T. (s)	Area	Similarity
1	ビロビン酸 (MEXL, TMS)	C ₇ H ₁₅ NO ₅ Si	446	1137387	934	20	オルニチン (4TMS)	C ₁₇ H ₄₄ N ₂ O ₂ Si ₄	1622	27497881	945
2	グリコール酸 (2TMS)	C ₈ H ₂₀ O ₃ Si ₂	491	715276	920	21	マンノース (5TMS)	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	1629	3629958	840
3	2-アランカルボン酸 (TMS)	C ₈ H ₁₂ O ₃ Si	588	236557	910	22	アデニン (2TMS)	C ₁₁ H ₁₂ N ₅ Si ₂	1669	10309603	903
4	シュウ酸 (2TMS)	C ₈ H ₁₈ O ₄ Si ₂	598	982722	920	23	カダベリン (4TMS)	C ₁₇ H ₄₆ N ₂ Si ₄	1736	1858360	876
5	3-ヒドロキシ酪酸 (2TMS)	C ₁₀ H ₂₄ O ₅ Si ₂	643	1061101	900	24	リシン (4TMS)	C ₁₈ H ₄₆ N ₂ O ₂ Si ₄	1746	35951466	835
6	イソロイシン (2TMS)	C ₁₂ H ₂₆ NO ₂ Si ₂	876	8087728	964	25	チロシン (3TMS)	C ₁₈ H ₃₅ NO ₃ Si ₃	1765	73102265	959
7	アラセリン酸 (3TMS)	C ₁₂ H ₃₀ O ₄ Si ₃	944	3040518	831	26	D-ソルビトール (6TMS)	C ₂₄ H ₆₂ O ₆ Si ₆	1785	1068732	814
8	セリン (3TMS)	C ₁₂ H ₃₁ NO ₃ Si ₃	990	37929232	925	27	キサンチン (3TMS)	C ₁₄ H ₂₈ N ₄ O ₂ Si ₃	1862	1355710	919
9	スレオニン (3TMS)	C ₁₃ H ₃₃ NO ₃ Si ₃	1033	42516832	948	28	ミオイノシトール (6TMS)	C ₂₄ H ₆₀ O ₆ Si ₆	1950	5944599	912
10	メチオニン (2TMS)	C ₁₁ H ₂₇ NO ₂ SSi ₂	1220	15297318	825	29	グアニン (3TMS)	C ₁₄ H ₂₉ N ₅ O ₃ Si ₃	1972	1391280	911
11	5-オキソプロリン (2TMS)	C ₁₁ H ₂₃ NO ₃ Si ₂	1226	210548974	928	30	スベロニン (6TMS)	C ₂₈ H ₇₄ N ₄ Si ₆	2036	612262	907
12	アスパラギン酸 (3TMS)	C ₁₃ H ₃₁ NO ₄ Si ₃	1233	73421702	957	31	トリプトファン (3TMS)	C ₂₀ H ₃₆ N ₂ O ₂ Si ₃	2066	30428930	927
13	4-アミノ酪酸 (3TMS)	C ₁₃ H ₃₃ NO ₂ Si ₃	1235	46969520	924	32	スベロミジン (5TMS)	C ₂₂ H ₅₉ N ₃ Si ₅	2103	1388814	940
14	シスチン (3TMS)	C ₁₂ H ₃₁ NO ₂ Si ₃	1275	5484621	963	33	ミオイノシトールリン酸 (7TMS)	C ₂₇ H ₆₉ O ₉ PSi ₇	2287	2058184	943
15	オルニチン (3TMS)	C ₁₄ H ₃₆ N ₂ O ₂ Si ₃	1358	5209095	908	34	アデノシン (4TMS)	C ₂₂ H ₄₅ N ₅ O ₄ Si ₄	2470	14863948	953
16	フェニルアラニン (2TMS)	C ₁₅ H ₂₇ NO ₂ Si ₂	1367	52692227	955	35	マルトース (3TMS)	C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈	2493	6188006	939
17	グルタミン酸 (3TMS)	C ₁₄ H ₃₃ NO ₄ Si ₃	1371	97699927	866	36	トレハロース (8TMS)	C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈	2590	77375142	961
18	アスパラギン (3TMS)	C ₁₃ H ₃₂ N ₂ O ₃ Si ₃	1437	24267014	952	37	グアニン (5TMS)	C ₂₅ H ₅₃ N ₅ O ₃ Si ₅	2598	718577	804
19	アラセリン酸 (4TMS)	C ₁₅ H ₄₁ O ₆ PSi ₄	1567	5723912	905	38	5-アデノシンリン酸 (3TMS)	C ₂₅ H ₅₄ N ₅ O ₇ PSi ₅	2830	454839	887

正確質量に基づく分子イオンおよびフラグメントイオンを活用することで、化合物同定の妥当性が裏付けられました。例えば、アミノ酸の一部について観測 m/z 値および計算 m/z 値を、分子イオンおよびフラグメントイオンごとにまとめた結果を表3に示します。これらのアミノ酸における質量精度 (ppm) の絶対値平均は 0.72 ppm でした。

ChromaTOF によるデータ取得およびデータ処理ソフトウェアは、高分解能と高精度を組み合わせることで、分離の新たな次元である高分解能デコンボリューション (HRD) を実現します。その例として、図3では、ChromaTOF 処理により、共溶出していた非標識および標識 (D および ¹³C) トリプトファン (3TMS) が分離された結果を示しています。Peak True (デコンボリューション後) 質量スペクトルを NIST 14 データベースで検索したところ、非標識アミノ酸に対して 933/1000 の高い一致度が得られました。D 標識体、¹³C 標識体、および非標識体に由来する [M-C₈H₂₀NO₂Si₂]⁺ フラグメントの質量精度は、それぞれ -0.39、-0.25、および -0.83 ppm でした。

表3. 酵母自己消化物中アミノ酸の正確質量測定結果

Name	Formula	R.T. (s)	Ion	Obs m/z	Calc m/z	PPM
グリシン (3TMS)	C ₁₁ H ₂₉ NO ₂ Si ₃	893	M ^{●+}	291.14974	291.15006	-1.09
セリン (3TMS)	C ₁₂ H ₃₁ NO ₃ Si ₃	990	[M-C ₄ H ₉ O ₂] ⁺	204.12358	204.12344	0.68
メチオニン (2TMS)	C ₁₁ H ₂₇ NO ₂ SSi ₂	1220	M ^{●+}	293.12956	293.12955	0.00
5-オキソプロリン (2TMS)	C ₁₁ H ₂₃ NO ₃ Si ₂	1226	M ^{●+}	273.12096	273.1211	-0.50
アスパラギン酸 (3TMS)	C ₁₃ H ₃₁ NO ₄ Si ₃	1233	M ^{●+}	349.15586	349.15554	0.92
オルニチン (3TMS)	C ₁₄ H ₃₆ N ₂ O ₂ Si ₃	1358	M ^{●+}	348.20799	348.20791	0.22
フェニルアラニン (2TMS)	C ₁₅ H ₂₇ NO ₂ Si ₂	1367	[M-C ₇ H ₇] ⁺	218.10245	218.10271	-1.18
			[M-C ₄ H ₉ O ₂] ⁺	192.12014	192.1203	-0.86
グルタミン酸 (3TMS)	C ₁₄ H ₃₃ NO ₄ Si ₃	1371	M ^{●+}	363.17114	363.17119	-0.13
アスパラギン (3TMS)	C ₁₃ H ₃₂ N ₂ O ₃ Si ₃	1437	M ^{●+}	348.17121	348.17152	-0.89
オルニチン (4TMS)	C ₁₇ H ₄₄ N ₂ O ₂ Si ₄	1622	M ^{●+}	420.24718	420.24744	-0.60
リシン (4TMS)	C ₁₈ H ₄₆ N ₂ O ₂ Si ₄	1746	M ^{●+}	434.26272	434.26309	-0.84
チロシン (3TMS)	C ₁₈ H ₃₅ NO ₃ Si ₃	1765	[M-C ₁₀ H ₁₅ O ₅] ⁺	218.10243	218.10271	-1.30
トリプトファン (3TMS)	C ₂₀ H ₃₆ N ₂ O ₂ Si ₃	2066	[M-C ₈ H ₂₀ NO ₂ Si ₂] ⁺	202.10449	202.10465	-0.83

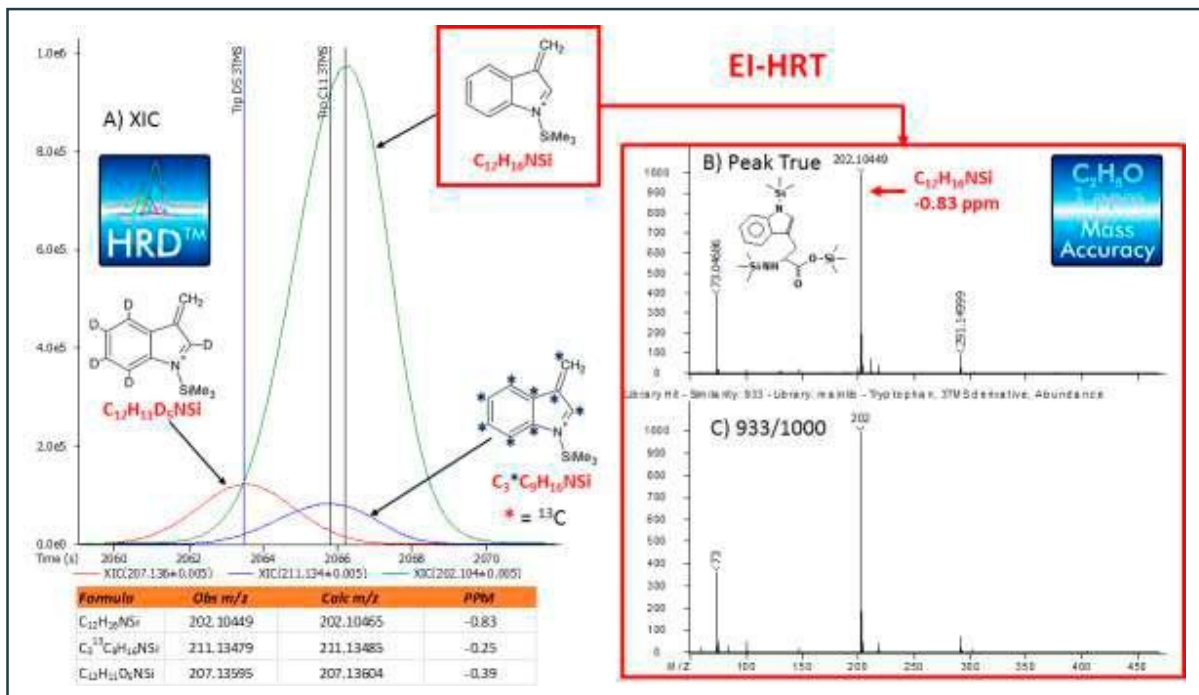


図3. A) D 標識体、¹³C 標識体および非標識トリプトファン (3TMS) フラグメントに由来する [M-CaH₂NO₂Si]⁺ の抽出イオンクロマトグラム (XIC)。 B) 非標識トリプトファン (3TMS) の Peak True 質量スペクトル。 C) NIST ライブラリ質量スペクトルトリプトファン (3TMS)。

酵母化合物の同定確認には、相補的な CI-HRT データも活用されました。例として、重水素標識体 D₆ (m/z = 619.34560, R = 31.529) および非標識体 (m/z = 613.30806, R = 32.553) の myo-イノシトール (6TMS) に由来する高分解能プロトン化分子イオンの XIC を図4に示します。これらの付加イオンに対する分子式および質量精度は、それぞれ C₂₇H₅₅D₆O₆Si₆ (0.18 ppm) および C₂₇H₆₁O₆Si₆ (0.38 ppm) でした。

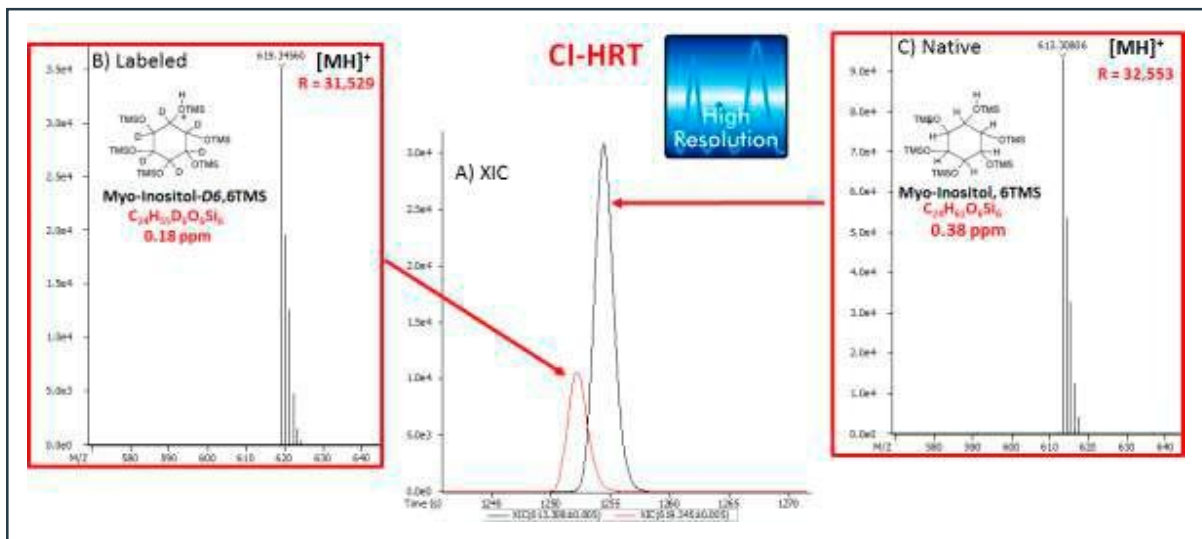


図4. A) 標識体および非標識 myo-イノシトールの XIC。 B) 標識 myo-イノシトールの CI-HRT Peak True 質量スペクトル。 C) 非標識 myo-イノシトールの CI-HRT Peak True 質量スペクトル。

Pegasus GC-HRT 4D は、ソフトウェア上で動作モードを選択し、変調周期を指定するだけで、1 次元 (1D) および 2 次元 (2D) モードのいずれでも運用可能です。HRT 4D が有する強化されたクロマトグラフィー性能により、信頼性高く同定された化合物を伴う高品質な質量スペクトルデータが得られ、メタボロミクス・プロファイリングにおけるディスカバリー用途に適したツールであることが示されました。ベーカースイースト抽出物の等高線図を拡大した結果から、GC×GC-HRT 実験によって得られるクロマトグラフィー分離能の向上が明確に示されています (図5)。

また、アスパラギン (Asn) について、GC-HRT と GC×GC-HRT モードで取得したデータのスペクトル類似度を比較すると、784 から 945/1000 へと大幅な向上が確認されました (図6)。このようなクロマトグラフィー分離能向上の効果を示す追加例を表4に示します。

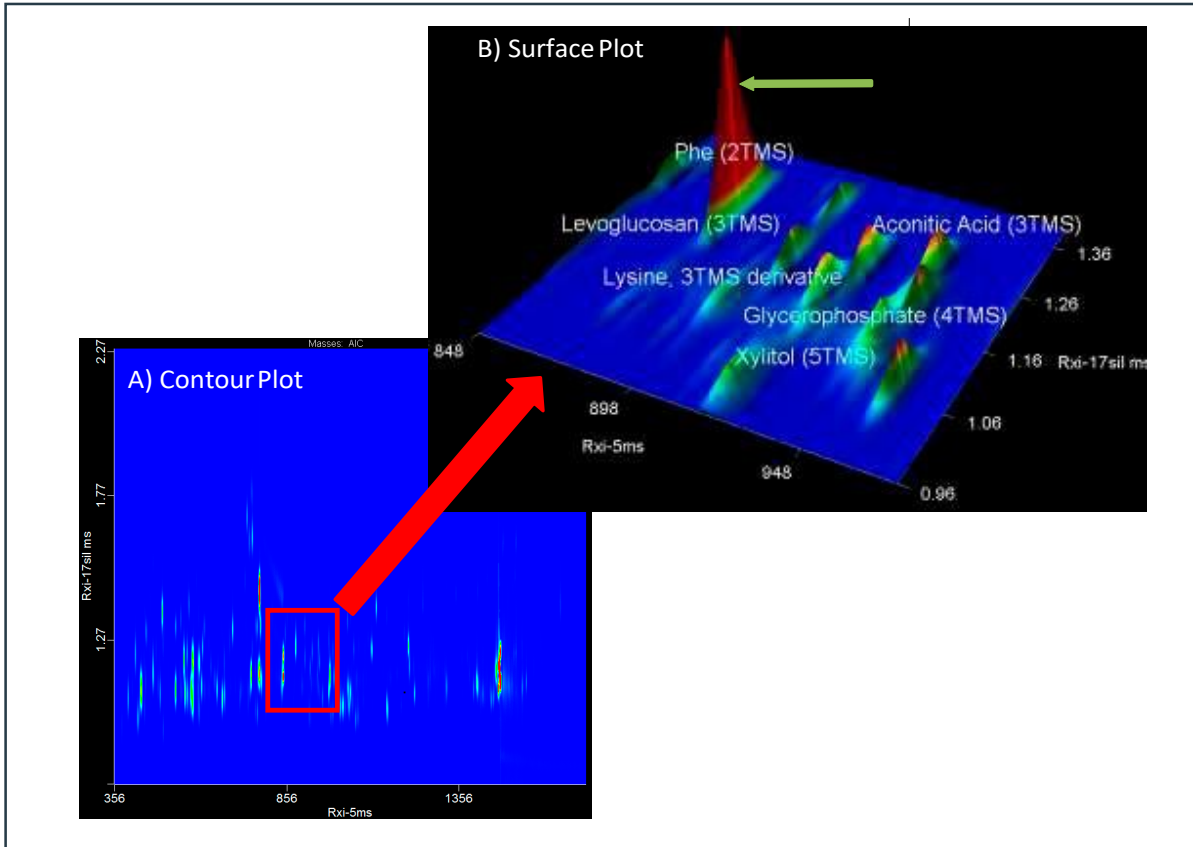


図5.
A) ベーカースイースト抽出物の GC×GC-HRT 等高線図。
B) クロマトグラフィー分離能の向上を示す表面プロット拡大領域。

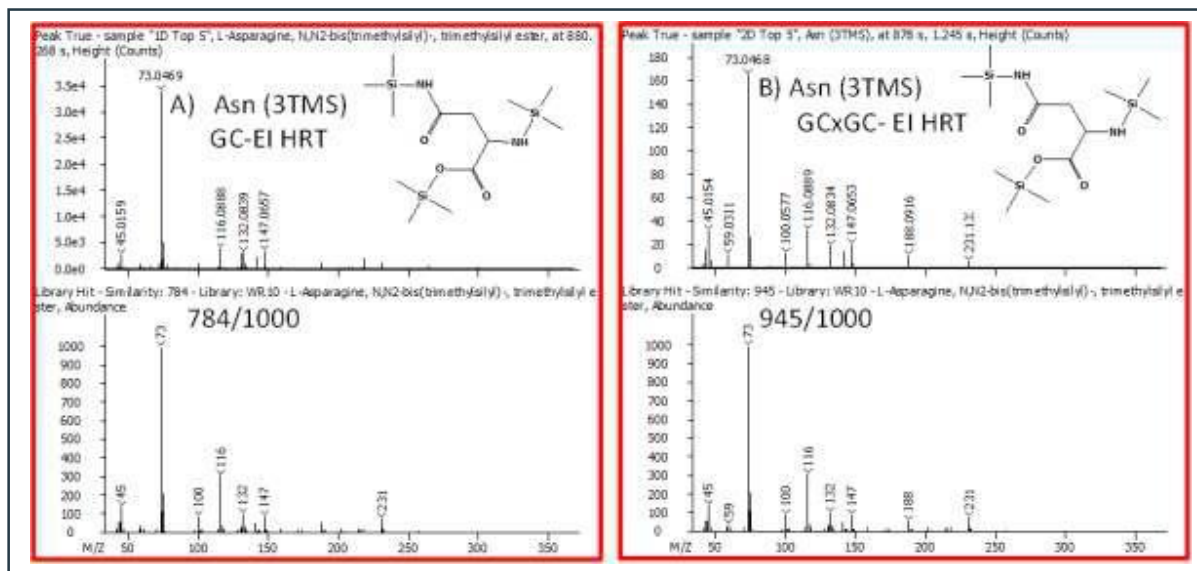


図6. ベーカースイースト中 Asn (3TMS) における GC-HRT スペクトル類似度 (A) と GC×GC-HRT 類似度 (B) の比較。GC×GC による分離能向上により、よりクリーンなスペクトルが得られ、類似度スコアが改善していることが分かります。

表4. ベーカーズイースト抽出物に対する GC-HRT および GC×GC-HRT データ取得におけるスペクトル類似度スコアの比較。GC×GC により得られたクリーンなスペクトルが、ライブラリ類似度スコアに大きく寄与しています。



Name	Formula	Similarity (GC-HRT)	Similarity (GCxGC-HRT)
フェニルアラニン (2TMS)	C ₁₅ H ₂₇ N ₀ O ₂ Si ₂	812	916
2-デオキシエリトロペントン酸 (4TMS)	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	645	870
アスパラギン (3TMS)	C ₁₃ H ₃₂ N ₂ O ₃ Si ₃	784	945
レボグルコサン (3TMS)	C ₁₅ H ₃₄ O ₅ Si ₃	805	881
テトラデカン酸メチル	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	933	942
キシリトール (5TMS)	C ₂₀ H ₅₂ O ₅ Si ₅	857	890
(E)-アコニット酸 (3TMS)	C ₁₅ H ₃₀ O ₆ Si ₃	768	910
グルタミン (3TMS)	C ₁₄ H ₃₄ N ₂ O ₃ Si ₃	835	923
グリセロリン酸 (4TMS)	C ₁₅ H ₄₁ O ₆ PSi ₄	735	879

4. Conclusion

LECO Pegasus GC-HRT 4D と ChromaTOF ソフトウェアは、メタボロミクスサンプルを高い確度で解析するための有力なツールです。電子イオン化 (EI) および化学イオン化 (CI) を組み合わせた高分解能・高質量精度データにより、化合物の迅速かつ信頼性の高い同定が可能となります。本研究では、Peak Find 処理を用いることで、複雑な酵母マトリックス中に共溶出する重水素標識体、¹³C 標識体、および非標識化合物を分離・同定できることが示されました。さらに、クロマトグラフィー分離の次元を追加することで、GC-HRT 4D のディスカバリー性能は大幅に向上し、代謝物探索ワークフローにおいて極めて価値の高い分析装置であることが示されました。

5. References

- ¹Chambers P.J. and Pretorius I.S. "Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research" *EMBO reports*, **2010**, 11(12), 914-920.
- ²Araque E., Parra C., Rodriguez M., Freer J. and Baeza J. "Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production" *Enzyme and Microbial Technology*, **2008**, 43, 120-123.
- ³Raab, AM, Gebhardt G., Bolotina N., Weuster-Botz D. and Lang C "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid" *Metab. Eng.*, **2010**, 12(6), 518-25.
- ⁴Porro D., Bianchi M.M., Brambilla L., Menghini R., Bolzani D.E., Carrera V., Lievens J., Liu C.-L., Ranzl B.M., Grontall



L. and Alberghina L. "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts" *Applied and Environmental Microbiology*, **1999**, 4211-4215. **LECO Corporation** | 3000 Lakeview Avenue | St. Joseph, MI 49085 | Phone: 800-292-6141 | 269-985-5496

info@leco.com • www.leco.com | ISO-9001:2015 Q-994 | LECO is a registered trademark of LECO Corporation.
Pegasus, ChromaTOF-HRT, High Resolution Deconvolution, HRD are registered trademarks of LECO Corporation.