

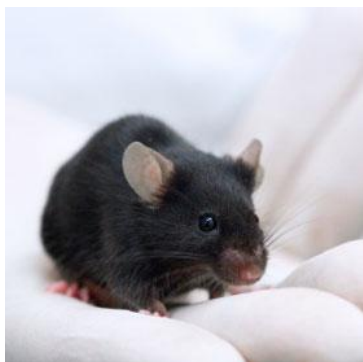
# マウス肝臓メタボロミクス解析への GC 高分解能飛行時間型質量分析法の応用

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

**Key Words:** GC-HRT MS、高分解能飛行時間型質量分析計 (High Resolution Time-of-Flight MS)、質量精度、代謝物、肝疾患、ライブラリーマッチ

## 1. Introduction

肝疾患は世界で 8 億人以上に影響を及ぼし、年間少なくとも 150 万人の死亡原因となっています。アルコール摂取およびアルコール性肝疾患 (Alcoholic Liver Disease : ALD) は、米国における罹患率および死亡率の主要な要因であり続けています。ポリ塩化ビフェニル (Polychlorinated Biphenyls : PCBs) は残留性の高い環境汚染物質であり、PCB への曝露は非アルコール性脂肪性肝疾患との関連が報告されています。これらを含む肝疾患のモニタリングは、血清や血漿中の代謝物評価によって実施可能ですが、疾患組織そのものを評価することで、より基礎的かつ重要な知見が得られます。組織中で検出される変化は、生物学的・生理学的理解を深め、循環系への反映につながる可能性があります。この種の研究において、マウスは有用なモデル動物です<sup>1</sup>。



これらの研究における中核的な分析手法は、感度および同定能力に優れるガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) です。近年では、高分解能飛行時間型質量分析計 (Time-of-Flight MS : TOFMS) の進展により、分析の選択性および包括性がさらに向上しています。本研究では、LECO 社製 Pegasus® GC 高分解能飛行時間型質量分析計 (GC-HRT) を用い、アルコール曝露および脂肪食条件の異なるマウスの疾患肝臓から抽出した代謝物の同定および差分解析を実施しました。特に、不飽和脂肪食を与えたマウスにおけるアルコールおよび PCBs の影響を評価するため、アルコール誘導によってマウス肝臓中で有意な存在量変動を示す代謝物の同定が重要となります<sup>2</sup>。

## 2. Results

脂肪食に PCB またはエタノールを併用した処理群および脂肪食のみの対象群から得た肝臓抽出物を、シリル化誘導体とした後に分析しました。図 1 には、4 サンプルにおける異性体分析対象であるイソロイシンおよびロイシン (m/z 201.183) の応答を示しています。これら 2 種のアミノ酸は脂肪酸代謝と密接に関連しています。ペア間およびサンプル間での相対強度の違いに注目してください。

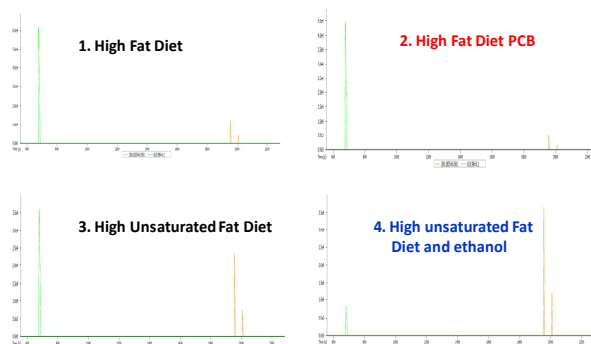


図 1 代表的な肝臓抽出物サンプルにおける m/z 200.183 (±0.001) (金色) および 613.981 (±0.001) (緑色) の抽出イオンクロマトグラム

イソロイシンおよびロイシンの同定は、図 2 および図 3 に示すライブラリー検索により、それぞれスペクトル類似度スコア 830 および 740 を示し、同定の妥当性が確認されました。さらに、表 1 および表 2 に示すように、質量精度 2 ppm 未満の高精度フラグメントイオンの決定により、妥当性がさらに強まりました。

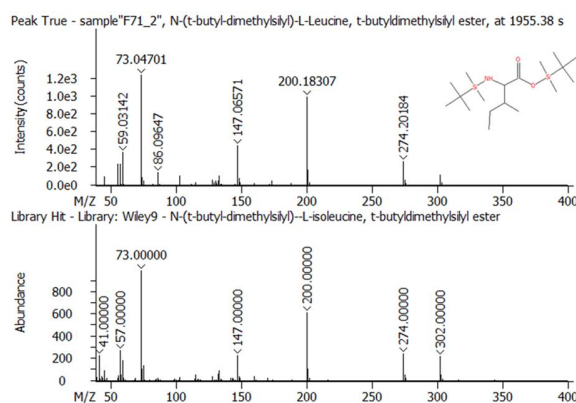


図 2 イソロイシン bis-TBDMS ピークの Peak True およびライブラリーマッチ。

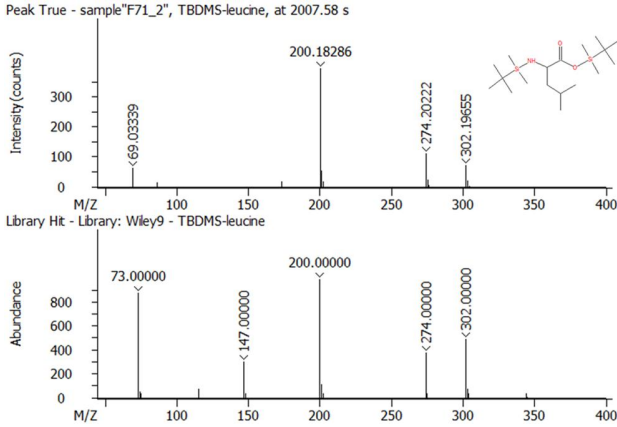


図3 ロイシン bis-TBDMS (C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>) の Peak True およびライブラリーマッチ

表1 イソロイシン bis-TBDMS のフラグメントイオン

Ions	Species	Neutral Formula	Mass	ΔPPM
302.1966	(M-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	302.1971	-1.62146
274.2017	(M-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -CO) <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>32</sub> NOSi <sub>2</sub>	274.2018	-0.54704
200.1829	(M-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> Si) <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>26</sub> NSi	200.1831	-0.84922

表2 ロイシン bis-TBDMS のフラグメントイオン

Ions	Species	Neutral Formula	Mass	ΔPPM
302.1966	(M-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	302.19655	0.1985462
274.2017	(M-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -CO) <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>32</sub> NOSi <sub>2</sub>	274.20222	-1.932884
200.1829	(M-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> Si) <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>26</sub> NSi	200.18286	0.1998173

図4には、各処理条件下における肝臓抽出物中のロイシンおよびイソロイシンの相対量を示します。図4に示すように、PCB処理では脂肪食のみの場合と比較して、イソロイシンおよびロイシンの両方が約20%減少しました。これに対し、エタノール摂取では、脂肪食のみと比較してロイシンおよびイソロイシンが2~3倍に増加しました。

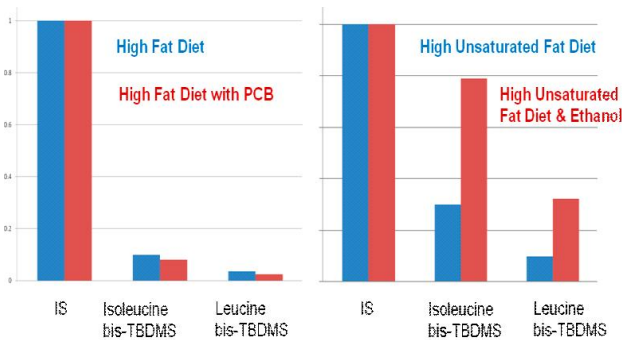


図4 PCB摂取(左)またはエタノール摂取(右)によるイソロイシンおよびロイシンの相対変化

標的組織として肝臓を用い、脂肪に富む食餌条件であることから、疾患状態における脂肪酸の変化をモニタリングする機会が得られる可能性が示唆されます。

例として、trans-13-オクタデセン酸 tert-ブチルメチルシリルエステルは、ライブラリー検索によりスペクトル類似度が770以上となり、4サンプル中に存在することが確認されました(図5、図6)。さらに、GC-HRTによるフラグメントイオンの高精度質量決定(質量精度2ppm未満)により、構造の追加確認が得られました。

高不飽和脂肪食条件下でPCBに曝露した場合、同一食餌条件の未処理群と比較してオクタデセン酸の相対量は3倍以上に増加しました(図7)。一方、高不飽和脂肪食条件下でPCBの代わりにエタノールを摂取した群では、図7に示すように約8倍に増加しました。これらは、本研究で変動が観察された多数の代謝物のうちの3例です。

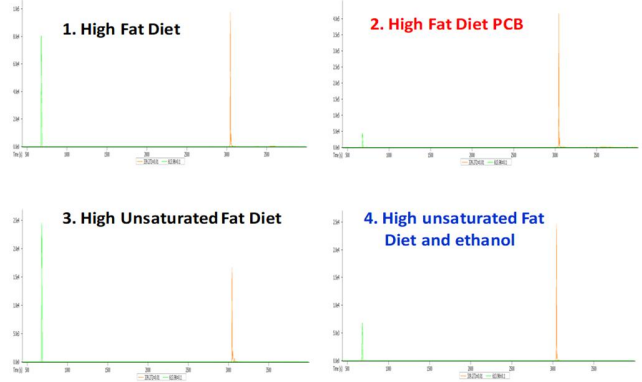


図5 抽出物中における m/z 339.272 (±0.001; オクタデセン酸) の抽出イオンクロマトグラム

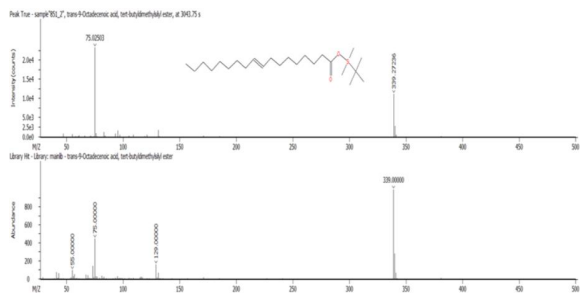


図6 trans-13-オクタデセン酸 tert-ブチルメチルシリルエステルのライブラリーマッチ

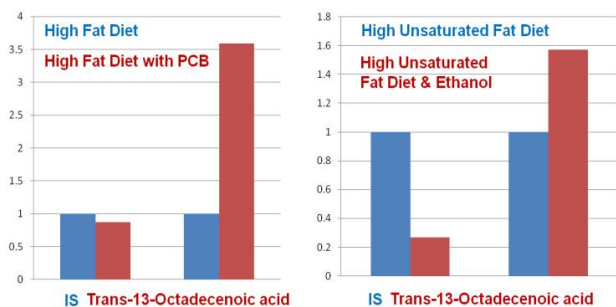


図 7 高脂肪食条件下における *trans*-13-オクタデセン酸の相対変化 (左)。高不飽和脂肪酸およびエタノール併用条件下における *trans*-13-オクタデセン酸の相対変化 (右)。(注：正確な異性体形は、複数のオクタデセン酸異性体の中で最も適合度の高いものではない。)

### 3. Conclusions

本研究では、Pegasus GC-HRT が正常肝臓および疾患肝臓抽出物における代謝変化の解析に有効なツールであることを示しました。主要な 3 種の代謝物であるイソロイシン、ロイシン、およびオクタデセン酸は、取得したスペクトルに対するライブラリーマッチングおよび分子イオン・フラグメントイオンの高精度質量一致に基づいて同定されました。本手法は、本研究においては PCB およびエタノールに起因する代謝変化の解析において、高い有効性を示しました。

### 4. Experimental

すべてのサンプルは、GC-HRT 分析用に誘導体化するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存しました。各代謝物抽出液から  $20\ \mu\text{L}$  を分取し、窒素気流下で乾固させました。乾固残渣を、ピリジン中に新たに調製した  $20\ \text{mg}/\text{mL}$  のエトキシアミン溶液に溶解しました。混合液をボルテックス後、 $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させました。次に、MTBSTFA (1% TBS) 溶液  $40\ \mu\text{L}$  をバイアルに添加し、十分にボルテックスした後、 $60^{\circ}\text{C}$  のオーブンで 30 分間反応させました。内部標準混合溶液 ( $200\ \text{ng}/\mu\text{L}$ )  $10\ \mu\text{L}$  を添加しました。最終混合液  $65\ \mu\text{L}$  を分取し、GC-HRT 分析用バイアルに移しました。

本研究では、Agilent 7890 ガスクロマトグラフおよび Restek Rxi-5Sil MS カラム (5% ジフェニル/95% ジメチルポリシロキサン、 $60\ \text{m} \times$  内径  $0.25\ \text{mm} \times$  膜厚  $0.25\ \mu\text{m}$ ) を装備した GC-HRT 装置を使用しました。

### 5. References

- <sup>1</sup>Jessica Wapner. Scientific American. October 21, 2010.
- <sup>2</sup>Neil Loftus, Alan Barnes, Simon Ashton, Filippos Michopoulos, Georgios Theodoridis, Ian Wilson, Cheng Ji, and Neil Kaplowitz. J Proteome Res. 2011 February 4; 10(2): 705-713.

