

Instrument: Pegasus® BT and ChromaTOF® Sync

包括的 GC-TOFMS メタボロミクスワークフロー

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

Key Words: 糖尿病, 飛行時間型質量分析法 (Time-of-Flight Mass Spectrometry TOFMS), ChromaTOF Sync

1. Introduction

慢性疾患である糖尿病は、グルコース代謝の異常により高血糖を呈する疾患であり、インスリン分泌不全、インスリン抵抗性、またはその両方が原因となります¹。糖尿病はすでに世界的な流行レベルに達しており、全世界で 4 億 2,000 万人以上の成人が罹患していると報告されています。この数は 2045 年までに約 6 億 3,000 万人に増加すると予測されています²。2 型糖尿病 (Type-2 diabetes mellitus : T2DM) は、全糖尿病症例の約 90% を占め、失明、腎不全、心筋梗塞、下肢切断の主要な原因となっています。適切な治療介入や予防を行うためには、糖尿病を早期に診断することが極めて重要です。疾患の早期予測は、T2DM バイオマーカーを同定するためのメタボロミクス手法の導入によって促進されます。このアプローチでは、疾患を有する被験者と健常者を統計的に比較し、関連する重要代謝物を特定するために、包括的なデータを取得することが求められます。本アプリケーションノートでは、疾患群および健常群被験者由来の血漿抽出物を対象とした自動誘導体化から、ガスクロマトグラフィー (GC) と飛行時間型質量分析計 (TOFMS) を組み合わせたデータ取得、さらに ChromaTOF Sync を用いたデータ処理による疾患候補バイオマーカー検出までの、完全な解析ワークフローについて紹介します。

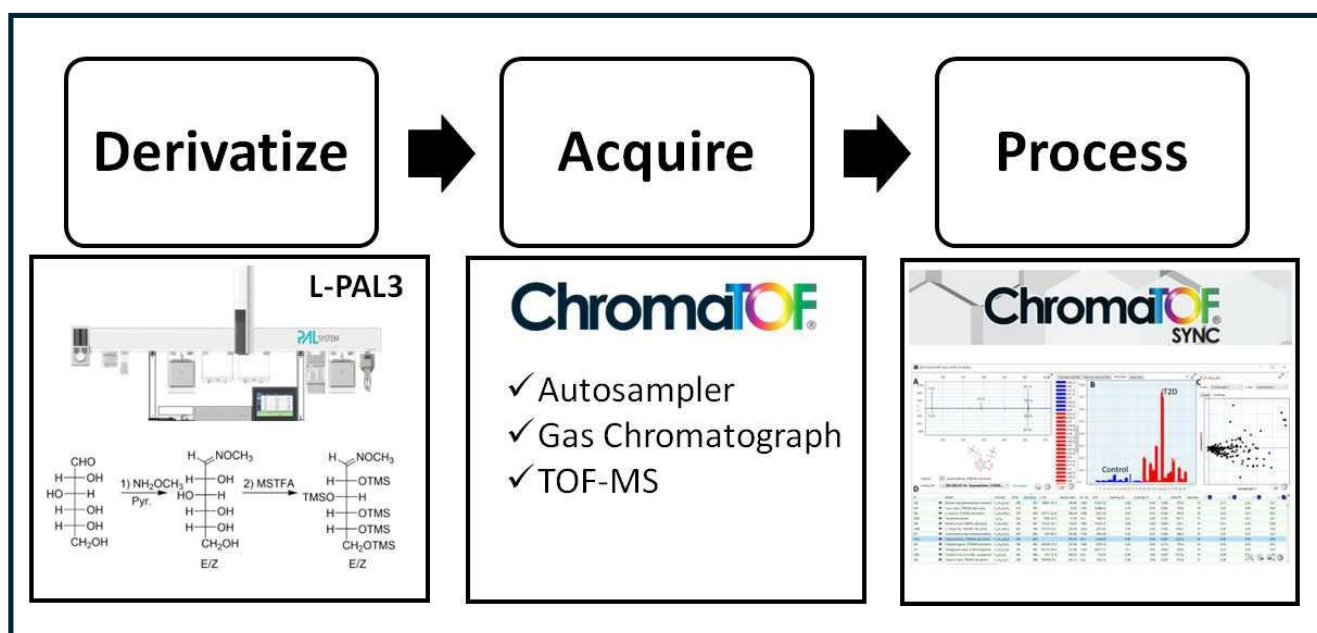


図1. GC-TOFMS メタボロミクスワークフローの全容 : 1) 自動誘導体化、2) データ取得、3) 統計解析処理

2. Experimental

包括的メタボロミクスワークフローの構築および評価のため、対照群（15 検体）および疾患群（15 検体）のサンプルを BioIVT（米国ニューヨーク州 Westbury）より入手しました。血漿ドナーには、異なる年齢層の男女が含まれています。2 型糖尿病（Type-2 diabetes mellitus : T2DM）患者は、高血圧、腎疾患、高脂血症、心血管疾患などの併存疾患を有していました。

サンプル抽出は、血漿 100 μL を 1.5 mL マイクロチューブに分注することから開始しました。血漿にメタノール 400 μL を添加し、白濁した溶液を形成させました。各サンプルを 1 分間ボルテックス混和した後、5,000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた不均一混合物の上清を 2 mL GC バイアルに回収しました。キャップを外した状態のバイアルを Speed Vac に設置し、減圧下・室温で 2 時間乾燥させました。続いて、バイアルを凍結乾燥機に移し、 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、0.1 mbar 未満の条件で 30 分間乾燥しました。

得られた乾固残渣は、LECO 製 L-PAL3 オートサンプラーを用いて誘導体化しました。具体的には、1% tert-ブチルジメチルクロロシラン（TBDMCS）を含む N-メチル-N-[tert-ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド]（MTBSTFA、RESTEK、米国ペンシルベニア州 Bellefonte）を 80 μL 添加し、 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 45 分間加熱しました。誘導体化後のサンプルは、GC-TOFMS（LECO Pegasus BT）を用いて 3 回繰り返し測定しました。測定条件は表1に示します。取得したデータは、ChromaTOF Sync および ChromaTOF BT ソフトウェアを用いて処理・解析しました。

Table 1. Instrument Parameters

Gas Chromatograph	Agilent 7890 & L-PAL 3 Autosampler
注入条件	1.0 μL (スプリット 20:1; $250\text{ }^{\circ}\text{C}$)
キャリアガス	ヘリウム 1.4 mL / min, 定流量
カラム (一次元)	Rxi-5MS, 30 m x 内径 0.25 mm x 膜厚 0.25 μm (Restek)
昇温プログラム	$50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.5 分) から $10\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ で $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで昇温、 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 10 分保持
Mass Spectrometer	LECO Pegasus BT
イオン源温度	$250\text{ }^{\circ}\text{C}$
イオン化法	EI
質量範囲 (m/z)	45-650
取得速度	10 spectra / s

3. Results and Discussion

ガスクロマトグラフィー高性能飛行時間型質量分析（GC-TOFMS）を用いた血漿サンプルのデータ取得により、情報量の豊富な包括的データが得られました。取得したデータファイルは、まず ChromaTOF Sync により処理しました。ChromaTOF Sync による処理には、ピーク検出、データアラインメント、データベース比較、および統計解析（主成分分析：Principal Component Analysis, PCA）が含まれます。これらのデータ処理および解析の結果、健常群と 2 型糖尿病（Type-2 diabetes mellitus : T2DM）患者群の血漿サンプルを有意に識別する複数の化合物が注釈付けされました（ $p < 0.01$ ）。候補バイオマーカーとしては、分岐鎖アミノ酸、短鎖ヒドロキシ置換カルボン酸、ならびにプリン代謝物が含まれます（表2）。これらの化合物は、これまでも複数の研究グループにより、糖尿病の潜在的バイオマーカー、あるいはケトアシドーシスのモニタリング指標として報告されています。³⁻⁵

表2: アノテーションされた潜在的T2DM バイオマーカー

代謝物	p-value
ロイシン	0.000
イソロイシン	0.000
バリン	0.018
尿酸	0.000
3-ヒドロキシ酪酸	0.002
ヒポキサンチン	0.000

ChromaTOF Sync の処理結果には、血漿サンプル中の代謝物について、名称、分子式、保持時間、定量イオン、および p 値が含まれます (図2)。図の中央部には、選択した代謝物 (例: ヒポキサンチン) のピーク面積が表示されており、対応する数値データは下部の表 (D) に示されています。また、図には選択した代謝物に対するスペクトル類似度スコアに加え、観測スペクトルおよびライブラリスペクトル (A) も含まれています。さらに、ChromaTOF Sync には、サンプル間の比較を目的とした主成分分析 (PCA) 機能 (C) も搭載されています。

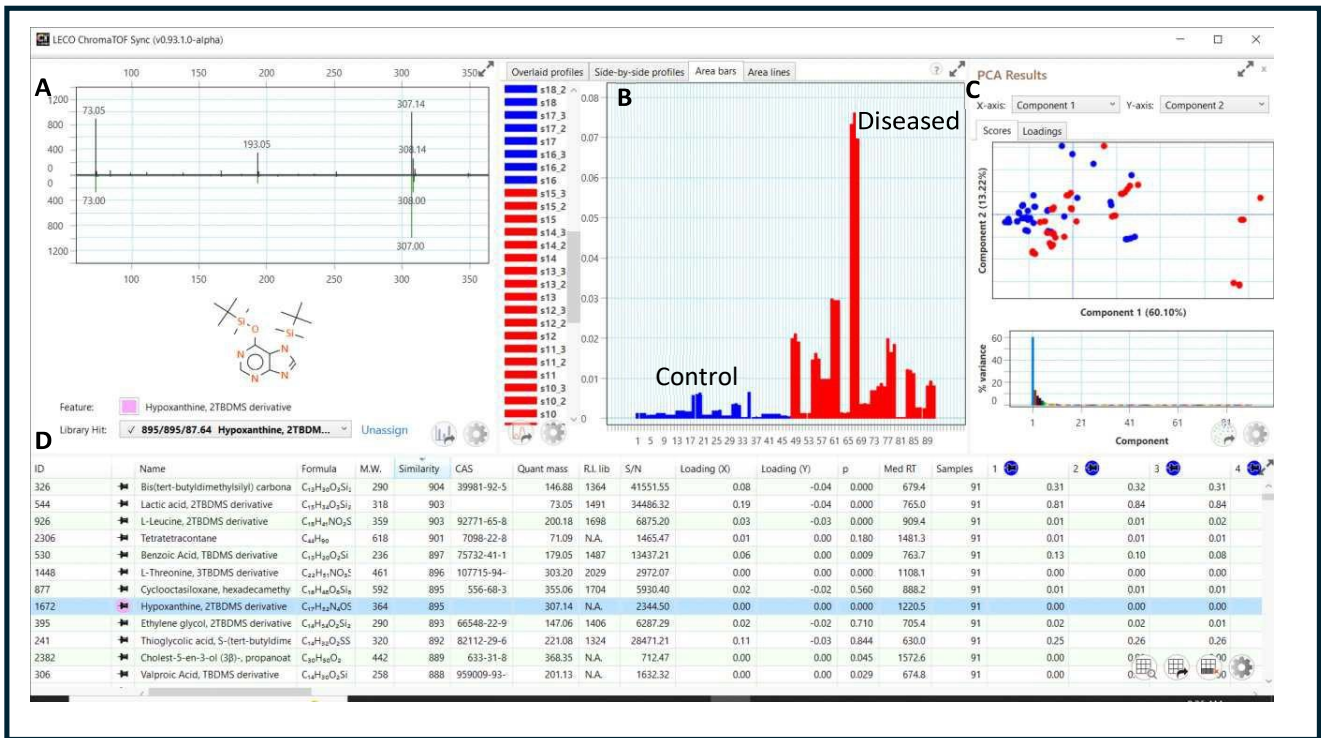


図2. T2DM 患者および健常者ヒト血漿の比較における ChromaTOF Sync の解析結果。表示内容には、選択代謝物ヒポキサンチンのスペクトルライブラリ検索結果 (A)、健常群および疾患群におけるヒポキサンチンの棒グラフ表示 (B)、PCA プロット (C)、およびサンプル中代謝物の一覧表 (D) が含まれる。

ChromaTOF Sync は単独でも強力なデータ処理ツールですが、ChromaTOF Sync と ChromaTOF BT ソフトウェアを組み合わせることで、代謝物アノテーションは大幅に向上します。本ワークフローでは、化合物の信頼性の高い特性評価を目的として、データファイルを ChromaTOF BT ソフトウェアでも処理しました。ChromaTOF BT ソフトウェアは高いデコンボリューション性能を有しており、より高品質なスペクトルデータを生成することで、データベースマッチング精度および質量差 (mass delta) 計算の向上に寄与します。自動処理の結果、血漿抽出物中から、酸類、ジカルボン酸、アミノ酸、脂肪酸、ステロール類など、複数の代謝物が注釈付けされました。表3に示す代表的な化合物セットにおける平均スペクトル類似度スコアは 820/1000 でした。

表3. コントロールサンプル中の代表的化合物

Name	Formula	R.T. (s)	Similarity
Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	520	725
Carbamic acid, N,N-dimethyl-, TBDMS	C ₈ H ₁₂ NO ₂ Si	525	957
3,3-Dimethylacrylic acid, TBDMS	C ₁₁ H ₂₂ O ₂ Si	560	746
3-Methyl-2-ketobutyric acid, TBDMS	C ₁₁ H ₂₂ O ₃ Si	564	753
3-Pyridinol, TBDMS derivative	C ₁₁ H ₁₀ NOSi	587	792
Maltol, TBDMS	C ₁₂ H ₂₀ O ₃ Si	603	766
2-Butoxyethanol, TBDMS	C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si	604	743
Phenol, TBDMS	C ₁₂ H ₂₀ OSi	605	801
Hexanoic acid, TBDMS	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Si	611	923
Levulinic acid, TBDMS	C ₁₁ H ₂₂ O ₃ Si	665	835
m-Cresol, TBDMS	C ₁₃ H ₂₂ O ₂ Si	685	936
Tiglic acid, TBDMS	C ₁₁ H ₂₂ O ₂ Si	723	750
2-Octenoic acid, TBDMS	C ₁₄ H ₂₈ O ₂ Si	759	718
Benzoic acid, TBDMS	C ₁₃ H ₂₀ O ₂ Si	764	948
Lactic acid, 2TBDMS	C ₁₅ H ₃₄ O ₃ Si ₂	765	871
Glycine, 2TBDMS	C ₁₄ H ₃₃ NO ₂ Si ₂	796	736
Glycolic acid, 2TBDMS	C ₁₄ H ₃₀ O ₃ Si ₂	776	862
Phenylacetic acid, TBDMS	C ₁₄ H ₂₂ O ₂ Si	792	851
L-Alanine, 2TBDMS	C ₁₅ H ₃₅ NO ₂ Si ₂	799	903
Oxalic acid, 2TBDMS	C ₁₄ H ₃₀ O ₄ Si ₂	807	894
Uracil, 2TBDMS	C ₁₆ H ₃₂ N ₂ O ₂ Si ₂	842	708
a-Hydroxybutyric acid, TBDMS	C ₁₆ H ₃₆ O ₃ Si ₂	814	900
DL-Glycerinaldehyde, 2TBDMS	C ₁₅ H ₃₄ O ₃ Si ₂	819	839
3-Hydroxypropionic acid, 2TBDMS	C ₁₅ H ₃₄ O ₃ Si ₂	828	809
Nonanoic acid, TBDMS	C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si	832	881
Urea, 2TBDMS	C ₁₅ H ₃₂ N ₂ O ₂ Si ₂	878	786
3-Hydroxybutyric acid, 2TBDMS	C ₁₆ H ₃₆ O ₃ Si ₂	838	912
2-Hydroxyisovalerate, 2TBDMS	C ₁₇ H ₃₈ O ₃ Si ₂	846	794
2-Aminobutanoic acid, TBMS	C ₁₆ H ₃₇ NO ₂ Si ₂	848	884
Decanoic acid, TBDMS	C ₁₆ H ₃₄ O ₂ Si	899	724
Benzenepropanoic acid, TBDMS	C ₁₅ H ₂₄ O ₂ Si	870	704
Benzophenone-d10 (ISTD)	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O	872	637
(±)-2-Phenylpropanoic Acid, TBDMS	C ₁₅ H ₂₄ O ₂ Si	875	754
L-Valine, 2TBDMS	C ₁₇ H ₃₉ NO ₂ Si ₂	882	797
Succinic acid, 2TBDMS	C ₁₆ H ₃₂ O ₄ Si ₂	948	705
1-Dodecanol, TBDMS	C ₁₈ H ₄₀ OSi	968	752
L-Leucine, 2TBDMS	C ₁₈ H ₄₁ NO ₂ Si ₂	909	912
Isoleucine, 2TBDMS	C ₁₈ H ₄₁ NO ₂ Si ₂	930	885
3,4-Dimethylbenzoic acid, TBDMS	C ₁₅ H ₂₄ O ₂ Si	934	854
3-methyl-2-oxopentanoic acid, 2TBDMS	C ₁₈ H ₃₈ O ₃ Si ₂	946	738
L-Proline, 2TBDMS	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂ Si ₂	955	852
L-Serine, 3TBDMS	C ₂₁ H ₄₉ NO ₃ Si ₃	1090	725

Name	Formula	R.T. (s)	Similarity
Glycerol, 3TBDMS	C ₂₁ H ₅₀ O ₅ Si ₃	1024	908
Dodecanoic acid, TBDMS	C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si	1025	866
Erythrono-1,4-lactone, 2TBDMS	C ₁₆ H ₃₄ O ₂ Si ₂	1027	865
L-Aspartic acid, 3TBDMS	C ₂₂ H ₄₉ NO ₅ Si ₃	1181	825
L-Pyroglutamic acid, 2TBDMS	C ₁₇ H ₃₅ NO ₃ Si ₂	1067	887
Glyceric acid, 3TBDMS	C ₂₁ H ₄₈ O ₅ Si ₃	1069	786
Salicylic acid, 2TBDMS	C ₁₉ H ₃₄ O ₃ Si ₂	1076	839
L-Cysteine, 3TBDMS	C ₂₁ H ₄₉ NO ₂ SSi ₃	1208	715
N-Acetylaspartic acid, 2TBDMS	C ₁₈ H ₃₇ NO ₅ Si ₂	1080	715
L-Glutamic acid, 3TBDMS	C ₂₃ H ₅₁ NO ₅ Si ₃	1242	842
L-Threonine, 3TBDMS	C ₂₂ H ₅₁ NO ₃ Si ₃	1108	900
2-Hydroxybenzeneacetic acid, 2TBDMS	C ₂₀ H ₃₆ O ₃ Si ₂	1112	706
Malic acid, 3TBDMS	C ₂₂ H ₄₈ O ₅ Si ₃	1119	701
Myristoleic acid, TBDMS	C ₂₀ H ₄₀ O ₂ Si	1136	812
L-Lysine, 3TBDMS	C ₂₄ H ₅₆ N ₂ O ₃ Si ₃	1295	795
Myristic acid, TBDMS	C ₂₀ H ₄₀ O ₂ Si	1141	942
L-Phenylalanine, 2TBDMS	C ₂₁ H ₃₉ NO ₂ Si ₂	1147	878
Hippuric acid, 2TBDMS	C ₁₅ H ₂₃ NO ₃ Si	1148	905
4-Hydroxybenzoic acid, 2TBDMS	C ₁₉ H ₃₄ O ₃ Si ₂	1160	774
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TBDMS	C ₂₄ H ₄₆ O ₂ Si	1332	774
Pentadecanoic acid, TBDMS	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	1195	827
L-Histidine, 3TBDMS	C ₂₄ H ₅₁ N ₃ O ₃ Si ₃	1396	737
Hypoxanthine, 2TBDMS	C ₁₇ H ₃₃ N ₄ O ₂ Si ₂	1220	910
Arachidonic Acid, TBDMS	C ₂₆ H ₄₆ O ₂ Si	1406	829
Isovanillic acid, 2TBDMS	C ₂₀ H ₃₆ O ₄ Si ₂	1232	719
9-Hexadecenoic acid, (Z)-, TBDMS	C ₂₂ H ₄₄ O ₂ Si	1238	886
Palmitic Acid, TBDMS	C ₂₂ H ₄₆ O ₂ Si	1247	944
Doconexent, TBDMS	C ₂₈ H ₄₆ O ₂ Si	1491	796
Uric acid, 4TBDMS	C ₂₈ H ₄₀ N ₄ O ₃ Si ₄	1517	792
Margaric acid, TBDMS	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si	1297	880
L-Glutamine, 3TBDMS	C ₂₃ H ₅₂ N ₂ O ₃ Si ₃	1317	795
Lignoceric acid, TBDMS	C ₃₀ H ₆₂ O ₂ Si	1608	763
Oleic Acid, (E)-, TBDMS	C ₂₄ H ₄₈ O ₂ Si	1334	948
Vaccenic acid, (E)-, TBDMS	C ₂₄ H ₄₈ O ₂ Si	1337	808
Stearic acid, TBDMS	C ₂₄ H ₅₀ O ₂ Si	1345	950
2-Hydroxyhippuric acid, 2TBDMS	C ₂₁ H ₃₇ NO ₄ Si ₂	1374	842
3,5-Dihydroxybenzoic acid, 3TBDMS	C ₂₅ H ₄₆ O ₅ Si ₃	1402	710
Citric acid, 4TBDMS	C ₂₀ H ₃₆ O ₇ Si ₄	1408	813
L-Tyrosine, 3TBDMS	C ₂₇ H ₃₃ NO ₃ Si ₃	1417	793
L-Tryptophan, 3TBDMS	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₃ Si ₃	1509	829
Cholesta-3,5-diene	C ₂₇ H ₄₄	1573	889
Cholesterol, TBDMS	C ₃₃ H ₆₀ OSi	1865	935

疾患サンプル (赤) およびコントロールサンプル (青) の分析イオンクロマトグラム (Analytical Ion Chromatogram : AIC) を図3に示します。図中には、ChromaTOF Sync の解析結果から得られた候補バイオマーカーとして、3-ヒドロキシ酪酸、馬尿酸、およびヒポキサンチンの3つのピークマーカが表示されています。これらの代謝物は、図4、図5、および図6に示す抽出イオンクロマトグラム (Extracted Ion Chromatogram : XIC) から分かるように、T2DM サンプルにおいて相対的に増加していることが確認されました。各図には、Peak True スペクトル、ライブラリマッチスペクトル、および対応するスペクトル類似度スコアも併せて示されています。

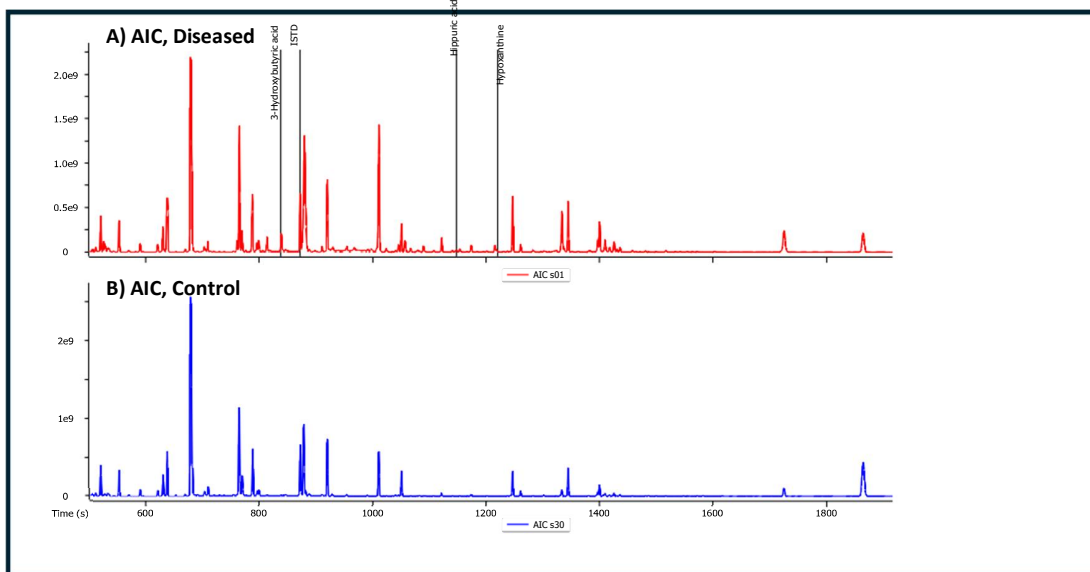


図3. T2DM サンプル (A) およびコントロールサンプル (B) の AIC。疾患サンプルの XIC には、3-ヒドロキシ酪酸、馬尿酸、ヒポキサンチンのピークマーカを表示

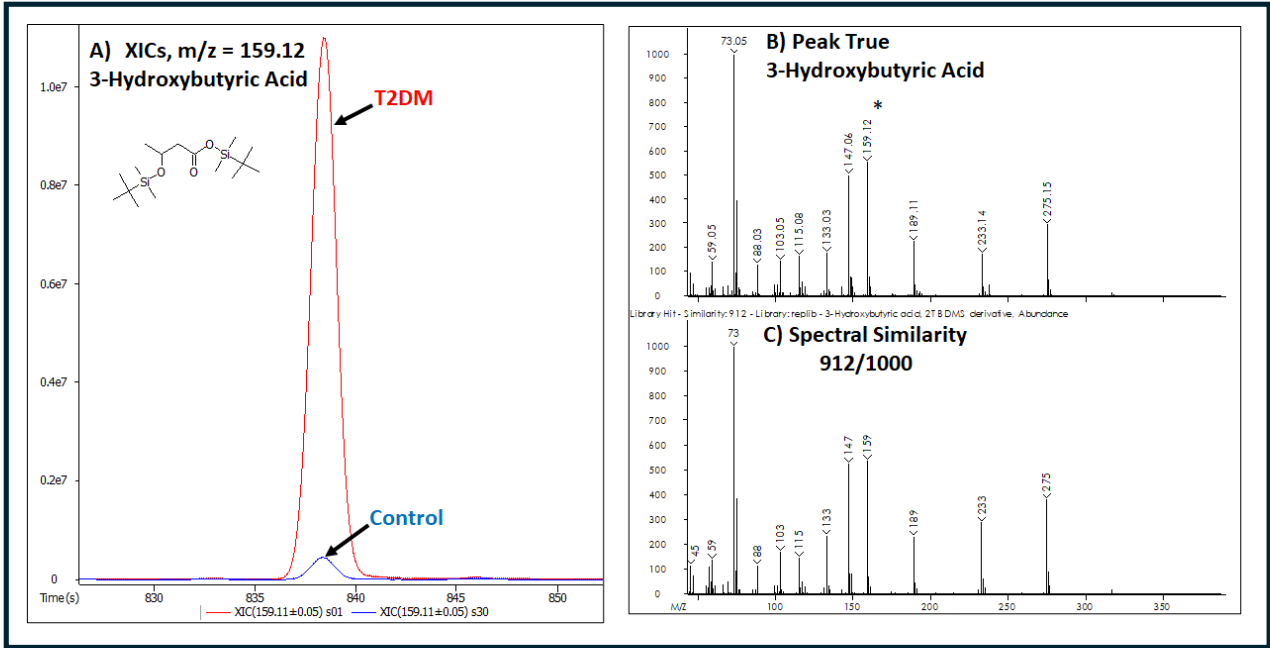


図4. A) 3-ヒドロキシ酪酸の XIC ($m/z = 159.12$: コントロールおよび T2DM サンプル)、B) Peak True スペクトル、C) ライブラリスpekトル。

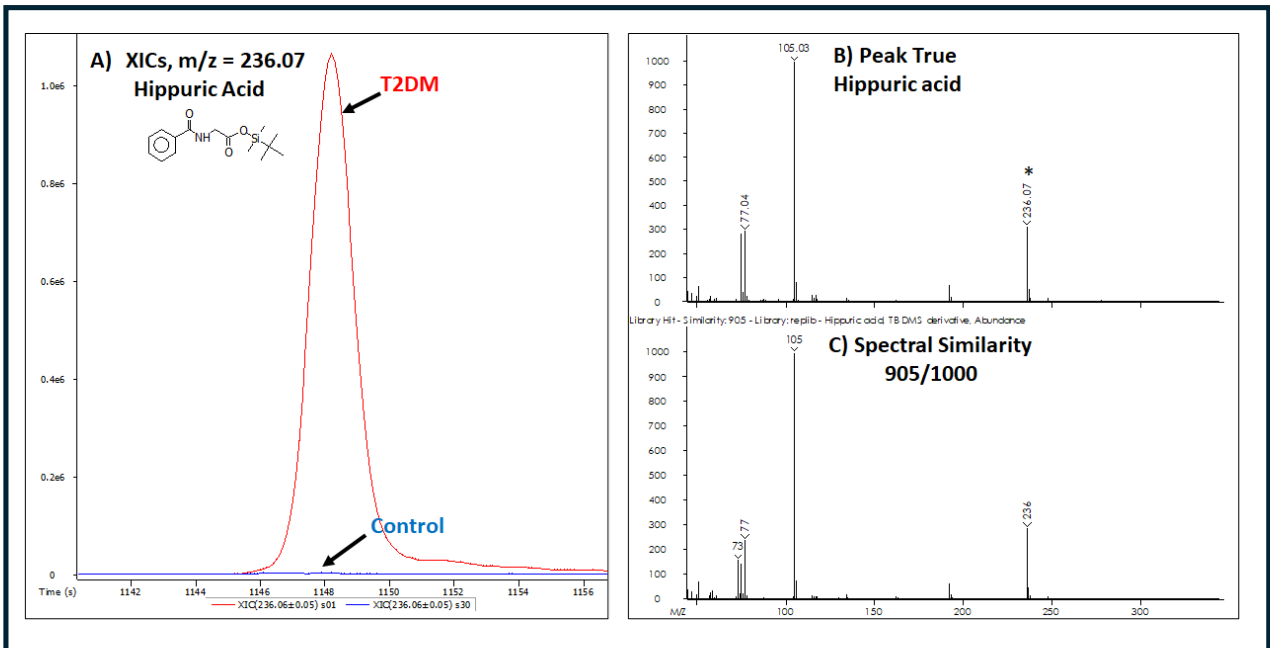


図5. A) 馬尿酸の XIC ($m/z = 236.06$: コントロールおよび T2DM サンプル)、B) Peak True スペクトル、C) ライブラリスpekトル。

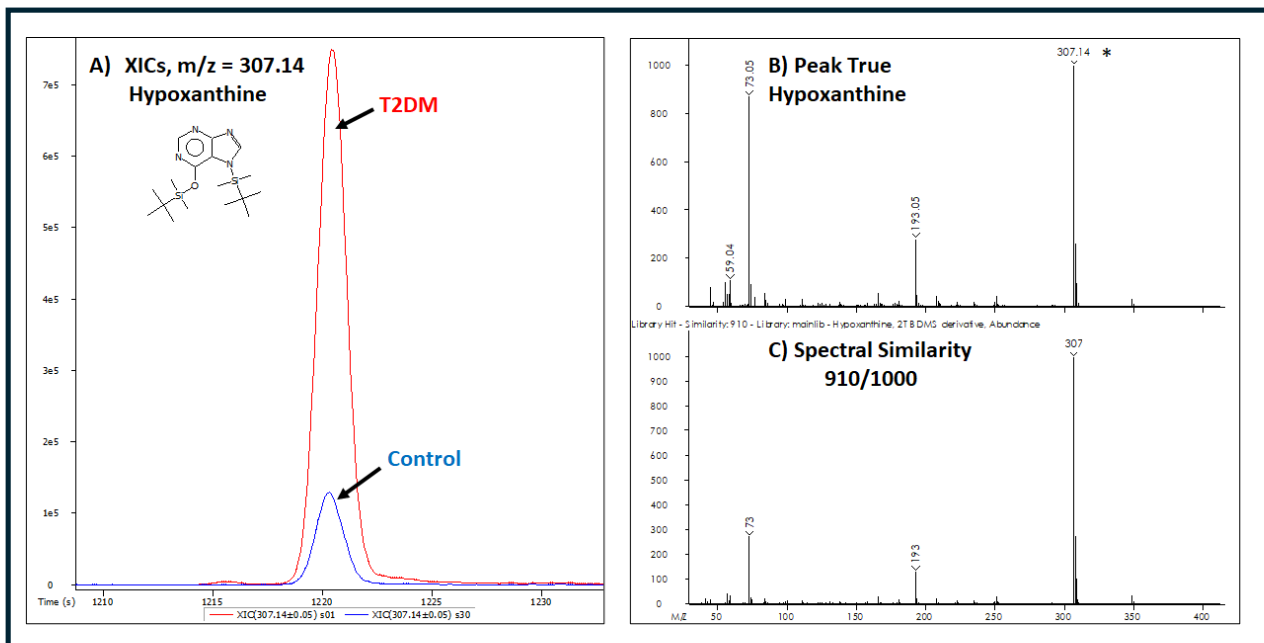


図6. A) ヒポキサンチンの XIC ($m/z = 307.14$: コントロールおよび T2DM サンプル) 、 B) Peak True スペクトル、 C) ライブラリスpekトル。

4. Conclusion

LECO Pegasus BT、ChromaTOF BT、および ChromaTOF Sync ソフトウェアを用いて、T2DM の潜在的バイオマーカーを注釈付ける包括的な GC-TOFMS メタボロミクスワークフローを構築しました。本ワークフローは、自動化されたサンプル前処理、データ取得、ならびにデータアラインメントおよび統計解析を含むデータ処理で構成されています。ChromaTOF Sync と ChromaTOF BT ソフトウェアを併用することで、候補疾患バイオマーカーの信頼性の高い特性評価が可能となることが示されました。

5. References

- ¹Gedela S., Rao A.A., Medicherla N.R., *International Journal of Biomedical Science* **2007**, 3(4), 229-236.
- ²Laakso M., *Molecular Metabolism* **2019**, 27, S139-S146.
- ³Long G., Yang Z., Wang L., Han Y., Peng C., Yan C., and Yan C., *BMC Endocrine Disorders*, **2020**, 20,174.
- ⁴Long L., Liu H., Wang Yan, Wang Yuming, Liu J., Zhou Z., Chu H., Zhuang P., and Zhang Y., *Journal of Chromatography B*, **2015**, 997, 96-104.
- ⁵Zhao X., Fritsche J., Wang J., Chen J., Rittig K., Schmitt-Kopplin S., Fritsche A., Haring H-H. Schleicher E.D., Xu G., and Lehmann R., *Metabolomics* **2010**, 7, 362-374.

LECO Corporation | 3000 Lakeview Avenue | St. Joseph, MI 49085 | Phone: 800-292-6141 | 269-985-5496

ChromaTOF[®] | SYNC



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