



Title	Orbitrap Fusionを用いたCE-MSと四重極GC-MSでのアミノ酸分析の比較
Author(s)	澄田, 智美; 島村, 繁; 布浦, 拓郎
Citation	低温科学, 79, 43-49
Issue Date	2021-03-20
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.79.43
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81351
Type	departmental bulletin paper
File Information	09_p043-049_LT79.pdf



Orbitrap Fusion を用いた CE-MS と 四重極 GC-MS でのアミノ酸分析の比較

澄田 智美^{1)*}, 島村 繁¹⁾, 布浦 拓郎¹⁾

2020 年 11 月 9 日受付, 2021 年 1 月 23 日受理

微量メタボローム解析技術（アミノ酸のピバロイル / イソプロピルエステル誘導体を用いた GC-MS での分析及び質量キャリブレーション用のソフトウェアである MassWorks を用いた解析）によるアミノ酸のアイソトポマー解析は、アミノ酸生合成経路だけでなく、前駆体となる有機酸を生産する TCA 回路等周辺の主要代謝経路の解明にも有効な手段である。しかし、この僅かなバイオマスで解析可能な手法であっても、その適用に十分なバイオマスを得ることが困難な環境微生物も存在する。また、GC-MS での解像度では、他の化合物との十分な分離が困難な場合もある。そこで、より高精度で高感度な解析手法の開発を目指し、キャピラリー電気泳動インターフェイス ZipChipTM とオービトラップ搭載機種 Orbitrap Fusion を用いた CE-MS での分析及び解析ソフトウェア Xcalibur Qual Browser を用いた代謝解析技術の基盤構築を進めている。本報では微量メタボローム解析における、従来の GC-MS と新技術の CE-MS の両者を比較しつつ紹介する。

Detection of tracing of stable isotope labelled amino acids using Orbitrap-Fusion CE-MS and Quadrupole GC-MS

Tomomi Sumida¹, Shigeru Shimamura¹ and Takuro Nunoura¹

Isotopomer analysis for amino acids in tracer-based metabolomics is useful to identify major metabolic pathways producing amino acid precursors such as the TCA cycle in addition to amino acid biosynthetic pathways. A novel method of tracer-based metabolomics that consists of quadrupole GC-MS analysis for pivaloyl/isopropyl derivatives of amino acids and MassWorks software for identification of stable isotope probing required less amount of samples comparing with the methods available previously. However, even with the novel method, isotopomer analysis of amino acids for some of environmental microbes is not applicable because of the difficulty in obtaining sufficient biomass. Thus, we are developing an accurate and sensitive analysis by CE-MS analysis with an Orbitrap Fusion MS compound with a capillary electrophoresis interface ZipChipTM. Here, we report the comparison of current GC-MS and developing CE-MS methods to identify isotopomers of amino acids.

キーワード：メタボローム解析, 安定同位体, 質量分析

Metabolomics, ¹³C tracer analysis, Stable isotope, Mass spectrometry

1. 解析手法

GC-MS での測定分析は Agilent Technologies 社製のガスクロマトグラフィー質量分析計 6890 N GC-5973 A MSD (HP-5 ms カラム) を用いて行い、Cerno Bioscience 社製の質量キャリブレーションソフトウェア MassWorks により同位体標識率を算出した。CE-MS での分析は 908 devices 社製の ZipChip CE System と Thermo Fisher Scientific 社製のオービトラップ質量分

*連絡先

澄田 智美

国立研究開発法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC)

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 15

e-mail: sumidat@jamstec.go.jp

1) 海洋研究開発機構 (JAMSTEC)

Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

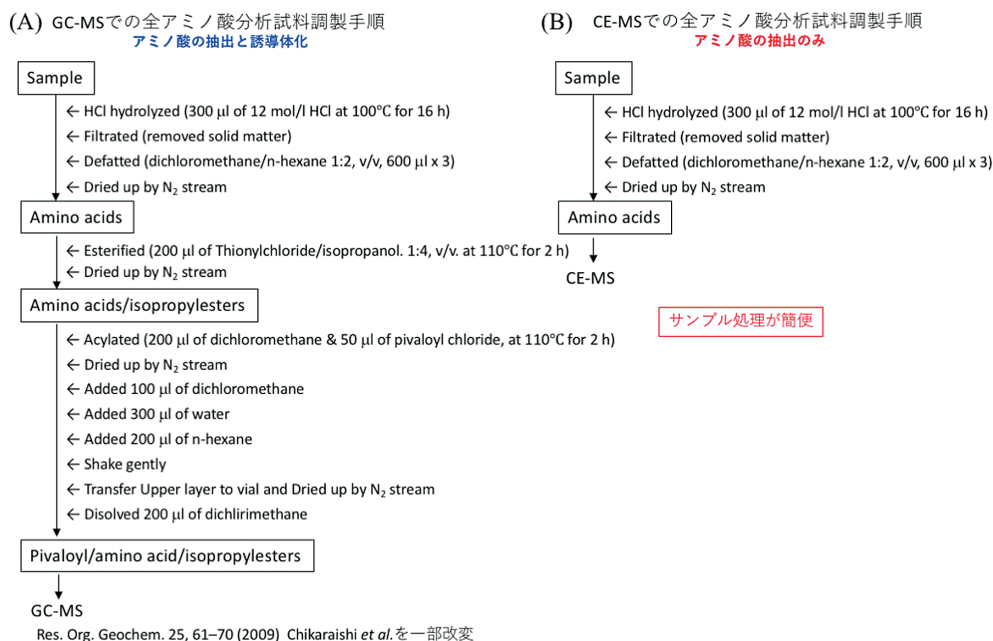


図 1：アミノ酸試料の調製法の比較.

析計 Orbitrap Fusion を用いて測定を行い、同じく Thermo Fisher Scientific 社製の解析ソフトウェア Xcalibur Qual Browser により同位体標識率を算出した。測定原理に関する詳細は、本特集号「3. 安定同位体の天然存在量及び安定同位体標識の検出法—2：ガスクロマトグラフ-質量分析計と MassWorks」と「5. オービトラップ質量分析計を用いたアミノ酸解析の可能性」を併せて参照されたい。

2. 全アミノ酸試料調製方法の改善

本研究では、試料検体として ¹³CO₂ を添加して培養標識した化学合成独立栄養細菌 (Aquificae 門) の菌体を用いた。GC-MS 分析用のアミノ酸の抽出と誘導体化は、Chikaraishi *et al.*, 2009 の方法を一部改変して行なった。GC-MS 分析用の試料調製は、全菌体のタンパク質をアミノ酸に加水分解するため、濃塩酸で処理後、脱脂、イソプロピルエステル誘導体化及びピバロイル誘導体化の工程を経る (図 1(A))。一方で、CE-MS での分析用の試料は、誘導体化が不要であり、加水分解および脱脂のみにより調製されるため (図 1(B))、GC-MS 用の試料調製に比べて非常に簡便である。

Chikaraishi *et al.*, 2009 の方法での試料調整では、脱脂後の窒素ガス気流下での乾固時に、試料バイアルにメタノールを加えて共沸させていた。しかし、その方法で調製した試料を CE-MS で分析したところ、アミノ酸の主鎖および側鎖のカルボキシル基がエステル化されている

と想定されるピークが検出された。そこで、濃塩酸処理後の試料にメタノールを加えることで、実際にエステル化が生じるのか否か、標品のアスパラギン酸を用いた検証を以下のように実施した (図 2)。

濃塩酸に溶かした標品のアスパラギン酸を用い、メタノールの添加・非添加で N₂ 乾固を行った試料用いて CE-MS のポジティブイオンモードで測定した結果、メタノールを加えた試料ではアスパラギン酸の [M+H]⁺ m/z 134.045 の他に、主鎖もしくは側鎖の COOH 基のどちらかがエステル化された [M+H+CH₂]⁺ の m/z 148.060 と、主鎖と側鎖の両方がエステル化された [M+H+CH₂+CH₂]⁺ の m/z 162.076 が検出された (図 2 (A))。この検証の結果、一連の試料処理に伴うエステル化により生じる技術的な問題も明確になった。なかでも顕著な事象は、エステル化したアスパラギン酸とグルタミン酸の識別において生じる。主鎖もしくは側鎖の COOH 基のどちらかがエステル化されたアスパラギン酸 [M+H+CH₂]⁺ は、グルタミン酸 [M+H]⁺ の m/z 値 (m/z 148.060) と等しくなり、また、CE-MS 分析による保持時間もグルタミン酸の [M+H]⁺ と非常に近い。そのため、解析時のピークの同定を難しくする (図 2(B))。このようなエステル化はメタノールの非添加試料では生じないため、アミノ酸の試料調製では、脱脂後の乾固時にメタノールを添加せずに乾固することを推奨する。

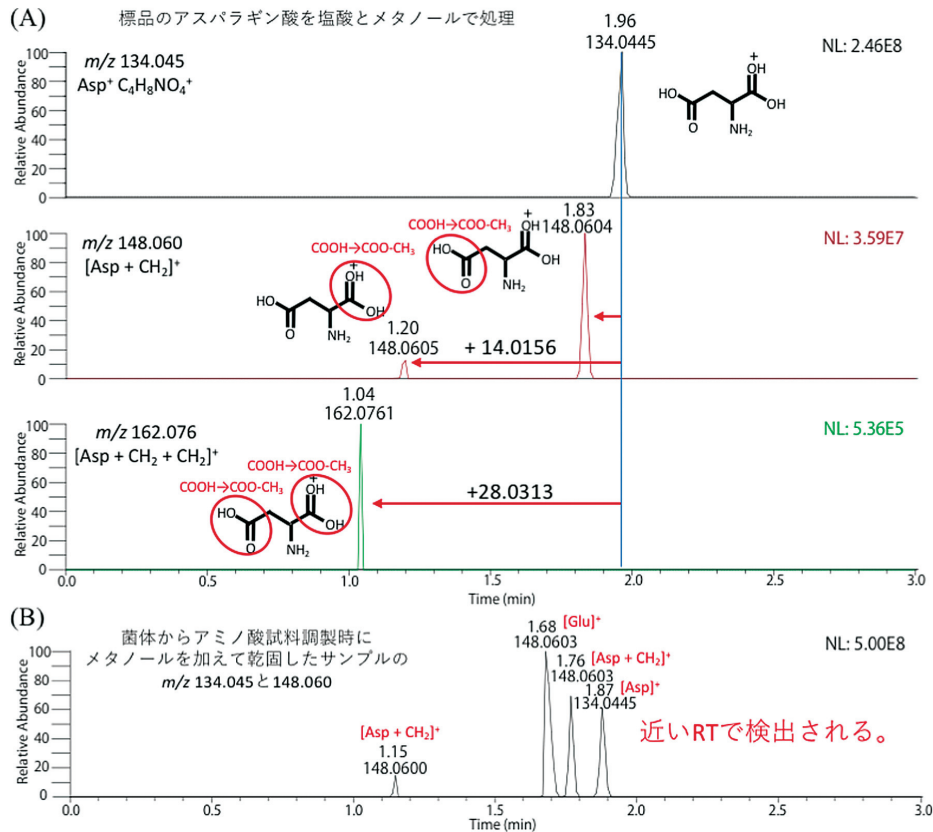


図2：全アミノ酸試料調製時の塩酸とメタノール処理によるエステル化の影響。

3. アイソトポマー分析手法の比較

TCA 回路の反応方向の確定を行う際には、それぞれ、ピルビン酸、オキサロ酢酸、オキソグルタル酸を前駆体とするアミノ酸であるアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸が鍵となる。そのため、これら3つのアミノ酸のアイソトポマー解析が多くの研究で行われている (Nunoura *et al.*, 2018)。GC-MS での分析の場合、ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体化アミノ酸のイオン化時にそれぞれの構造に特異的なフラグメンテーションが生じる (Chikaraishi *et al.*, 2009)。従って、アミノ酸に取り込まれている安定同位体標識率を算出するには、プリカーサーイオン $[\text{M}]^+$ の代わりに $[\text{M}]^+$ からプロピルエステル基が脱離した $[\text{M}-59]^+$ に対応したイオンフラグメントの安定同位体標識率が解析される。例えば、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸の場合、 $[\text{M}]^+$ がそれぞれ m/z 215, 301, 315 のため、 $[\text{M}-59]^+$ は m/z 156, 242, 256 となる。それに対し、CE-MS ではフラグメンテーションが起きにくい ESI によるイオン化でのポジティブイオンモード測定のため、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ を解析しており、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸の $[\text{M}+\text{H}]^+$ はそれぞれ m/z 90.055, 134.045, 148.060 となる。Orbitrap では精密質量での測定が可能のため、分

析された $[\text{M}+\text{H}]^+$ もサブ 1 ppm (内部標準による LockMass 機能使用時) の質量精度で精密質量を得ることができ、解析ピークの同定精度は非常に高い。図3の同位体標識試料は $^{13}\text{C}_2$ が十分に取り込まれているため、各アミノ酸に複数の ^{13}C の取り込みが確認できる。非標識試料をコントロールとして用いた GC-MS 及び CE-MS の解析結果を比較すると (図3(A, E)), GC-MS では夾雑物由来のピークが確認された (図3(A)の青枠内)。 ^{13}C の天然存在比は約 1.1% であり、 ^{13}C が分子内に2個存在する $^{13}\text{C}_2$ 標識されたアミノ酸の天然存在比は非常に少ないはずであり、非標識コントロールの試料では $^{13}\text{C}_2$ の位置に同位体標識ピークは検出されないはずである (図3(E))。このように、GC-MS を用いて試料を解析する際には夾雑物の影響を受けるアミノ酸が存在することを留意する必要がある。同位体標識試料 (図3(B)) を解析する際には、非標識コントロール (図3(A)) の $^{13}\text{C}_1$ 及び $^{13}\text{C}_2$ の存在量を引くことにより実際の存在量を計算する必要がある。一方で CE-MS の解析では、Orbitrap の質量分解能が高いため、アミノ酸由来のピークと夾雑物由来のピークを精密質量で分けることが可能である。また、CE-MS では安定同位体が複数個アミノ酸に取り込まれた際、それぞれの安定同位体標識されたアミノ酸のピークは、 ^{12}C と ^{13}C の精密質量差

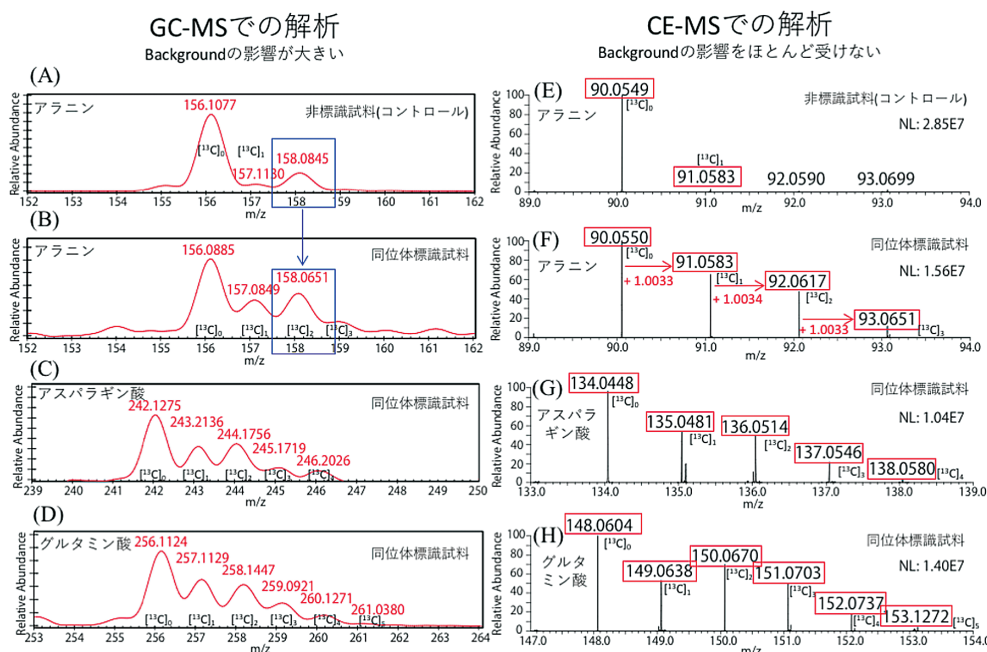


図3: アイソプマー解析の比較.

である 1.003 の質量で正確にピークがシフトするため (図3(F)), より精度の高い解析が可能となる. 実際, 図3 (G)に示すように, $[^{13}\text{C}]_1$, $[^{13}\text{C}]_2$ のピークを近傍に検出される夾雑物のピークと区別して解析する事ができる.

4. 標品を用いた CE-MS での MS/MS 分析

GC-MS を用いてアミノ酸の1位の炭素の安定同位体標識率を解析する場合, プリカーサーイオン $[\text{M}]^+$ からプロピルエステル基が脱離した $[\text{M}-59]^+$ のフラグメントイオンの量比 (分子全体に含まれる安定同位体標識率に対応) と, 1位のカルボニル基が脱離した $[\text{M}-87]^+$ のフラグメントイオンの量比 (1位の炭素を除いた残りの構造に含まれる安定同位体標識率に対応) とを比較することでおこなわれる. 一方で, 同様の解析を CE-MS で行う場合には, プリカーサーイオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ をさらに MS/MS 分析して得られたフラグメントイオンの安定同位体標識率を解析する必要がある. 従って両者の比較のため CE-MS での MS/MS 測定で得られるフラグメントイオンの解析を行った.

Cambridge Isotope Laboratories, Inc より入手したアラニン (L-ALANIN ($1-^{13}\text{C}$, 99%)), アスパラギン酸 (L-ASPARTIC ACID ($1,4-^{13}\text{C}_2$, 99%)) 及びグルタミン酸 (L-GLUTAMIC ACID ($5-^{13}\text{C}$, 99%)) を用いて MS/MS 測定を行った結果, アラニンでは MS/MS により生じるフラグメントイオンのうち, カルボキシル基の脱離により生成するフラグメントイオンが CE-MS の検

出下限値 (m/z 50) を下回るため解析ができなかった. 一方で, アスパラギン酸及びグルタミン酸に関しては, MS/MS によるフラグメントイオンの解析が可能であった (それぞれ図4と図5). アミノ酸の主鎖のカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) の脱離により生成したイオン ($[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+ = [\text{M}+\text{H}-46]^+$, アスパラギン酸では m/z 88.039, グルタミン酸では 102.055) は, 図4, 5の星の位置に ^{13}C の安定同位体標識が入っており, それぞれ $[\text{M}+\text{H}-46]^+ + 1.003$ の m/z で検出される. それに加えて, アスパラギン酸では3位と4位の側鎖 ($-\text{CH}_3-\text{COOH}$) の脱離により生成したイオン ($[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{COOH}]^+ = [\text{M}+\text{H}-60]^+$, m/z 74.024 + 1.003) が, グルタミン酸では1位と5位のカルボキシル基の脱離により生成したイオン ($[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}-\text{HCOOH}]^+ = [\text{M}+\text{H}-92]^+$, m/z 56.050) が検出された.

1位のカルボキシル基の炭素の安定同位体標識率の解析には, $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+ = [\text{M}+\text{H}-46]^+$ のマススペクトルが利用される. 現行の CE-MS の分析方法では, プリカーサーイオンのエリア値は算出できるが, 残念ながら MS/MS 分析のエリア値は算出することができないため, 主鎖の標識率の解析はエリア値ではなくピーク強度を用いる. 例えば図3(G)のアスパラギン酸の分析では (図6), 標識の数が1個 $[^{13}\text{C}]_1$ の 135.048 ($[\text{M}+\text{H}]^+ + 1.003$) のプリカーサーイオンに対する MS/MS 分析の $[\text{M}+\text{H}-46]^+$ のピークは, m/z 88.040 ($[\text{M}+\text{H}-46]^+$) と 89.043 ($[\text{M}+\text{H}-46]^+ + 1.003$) の2つが確認される (図6(A)赤枠内). この2つのピーク強度を

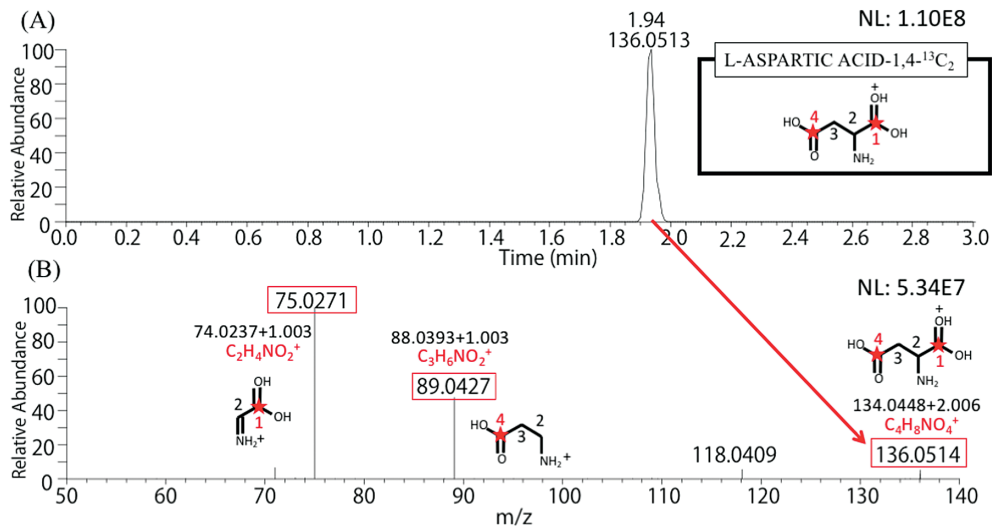


図4：アスパラギン酸の(A)マスキロマトグラム及び(B)MS/MS スペクトルとフラグメンテーションパターン。

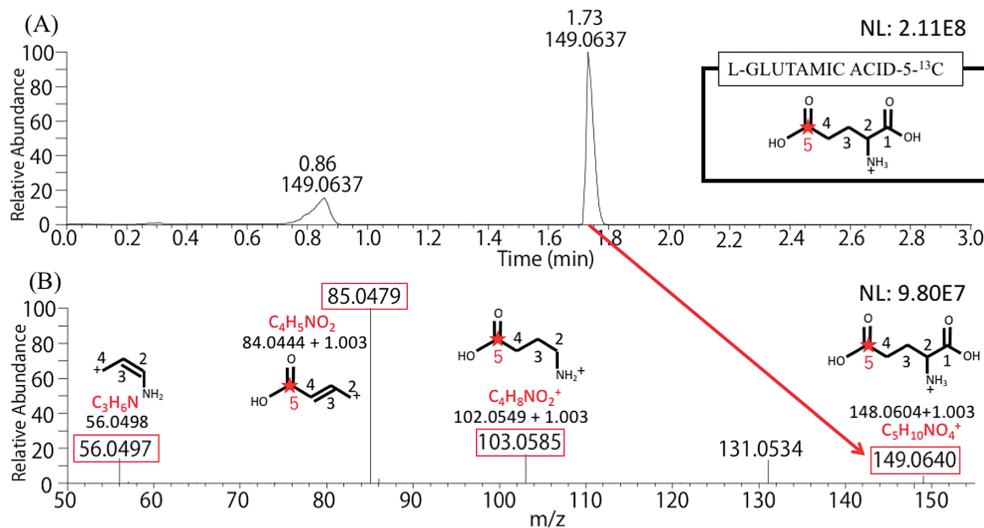


図5：グルタミン酸の(A)マスキロマトグラム及び(B)MS/MS スペクトルとフラグメンテーションパターン。

比較することにより、カルボキシル基の同位体標識率を見積もることができる。実際に、CE-MS のプリカーサーイオン $[M]^+$ のエリア値からの算出された、1つの炭素が¹³Cで標識されているアスパラギン酸（存在比22.8%）のうち（表1）、約28%に1位のカルボキシル基が標識されており、残りの72%は主鎖以外の炭素が標識されている事が分かる。複数の炭素が¹³Cで標識されている場合にも m/z 136.051（2個標識 $[^{13}\text{C}]_2$, $[M]^+ + 2.007$, 図6(B)), m/z 137.055（3個標識 $[^{13}\text{C}]_3$, $[M]^+ + 3.010$, 図6(C)) を MS/MS 分析し、 $[M+H-46]^+$ のフラグメントイオンを解析することで、同位体標識化率を解析することができる。

アラニンとアスパラギン酸に関して、GC-MS

(+MassWorks) と CE-MS (+Xcalibur Qual Browser) との同位体標識率解析の結果を表1にまとめた。この結果、GC-MS と CE-MS で解析方法の相違に起因すると推測される差異はあるものの、検出された同位体標識率は従来の GC-MS での解析結果と新技術の CE-MS での解析結果はほぼ一致していることがわかる。このように CE-MS を用いた解析は、より微量な試料での解析が可能で試料調製が容易であり、且つ、従来の GC-MS での解析と同程度、もしくはそれ以上の精度で同位体標識率を解析することができる可能性が高い。今後、分析条件をさらに検討し、簡便で優れた精度で代謝解析が可能な技術基盤の構築を進めたい。

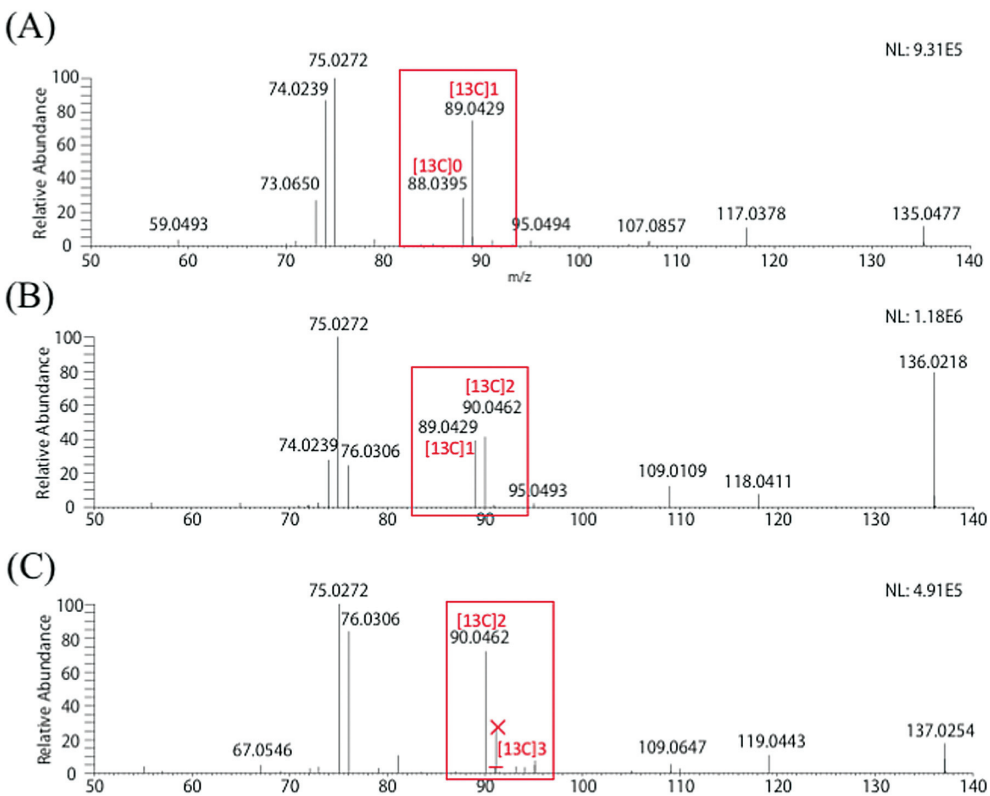


図 6：図 3(G)のアスパラギン酸の MS/MS スペクトル.

表 1：GC-MS 及び CE-MS 解析によるアミノ酸の ^{13}C の標識の数と存在量 (%) の比較.

		GC-MS [M-59] ⁺ から 算出	CE-MS [M+H] ⁺ から 算出	アミノ酸の主鎖と側鎖の標識の数		GC-MS [M-59] ⁺ と [M-87] ⁺ から 算出	CE-MS [M+H] ⁺ と MS/MS から 算出
アラニン	標識の数	存在量 (%)		主鎖	側鎖	存在量 (%)	
	[¹³ C] ₀	62.0	46.4	[¹³ C] ₀		62.0	46.4
	[¹³ C] ₁	18.8	28.1	[¹³ C] ₁	[¹³ C] ₀	4.8	MS/MS から 算出できない
				[¹³ C] ₀	[¹³ C] ₁	14.0	
	[¹³ C] ₂	10.8	20.6	[¹³ C] ₁	[¹³ C] ₁	10.8	
				[¹³ C] ₀	[¹³ C] ₂	0.0	
[¹³ C] ₃	8.5	4.8	[¹³ C] ₃		8.5	4.8	
アスパラギン酸	標識の数	存在量 (%)		主鎖	側鎖	存在量 (%)	
	[¹³ C] ₀	49.8	38.4	[¹³ C] ₀		49.8	38.4
	[¹³ C] ₁	20.6	22.8	[¹³ C] ₁	[¹³ C] ₀	11.5	6.3
				[¹³ C] ₀	[¹³ C] ₁	9.1	16.5
	[¹³ C] ₂	15.3	24.4	[¹³ C] ₁	[¹³ C] ₁	14.4	11.9
				[¹³ C] ₀	[¹³ C] ₂	0.9	12.5
	[¹³ C] ₃	10.1	12.0	[¹³ C] ₁	[¹³ C] ₂	9.9	11.4
				[¹³ C] ₀	[¹³ C] ₃	0.2	0.6
[¹³ C] ₄	4.2	2.5	[¹³ C] ₄		4.2	2.5	

謝辞

本研究を行うにあたり、ご助言とご指導をいただくと

共に本稿の執筆の機会をいただいた、北海道大学低温科学研究所の力石嘉人教授に深くお礼を申し上げます。また、理化学研究所の千葉洋子研究員には一部の解析にご

協力いただきました。本項の研究の一部は、日本学術振興会科学研究費（基盤研究 A：研究代表者 布浦拓郎）（19H00988）及び、（新学術領域研究（研究領域提案型）：研究代表者 跡見晴幸，研究分担者 布浦拓郎（19H05684），北海道大学低温科学研究所共同研究（20G043）からの支援を受けて行われました。

参考文献

力石嘉人・高野淑識・大河内直彦（2009）アミノ酸（ピバロ

イル/イソプロピルエステル誘導体）の GC/MS による解析. *Res. Org. Geochem.*, **25**, 61-70.

Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yanagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H. and Takai K. (2018) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science*, **359**, 559-563.