

ICR臨床研究入門

リピドミクス

(3) LC-MSによる脂質分析 (ターゲット解析とノンターゲット解析)

北 芳博

東京大学大学院医学系研究科

ライフサイエンス研究機器支援室 准教授

リピドミクス解析の目的と主な手法



どんな脂質が含まれるかを知りたい
検体間比較したい（疾患群 vs 対照群）
定量したい

LCMS／GCMS／（CEMS）

- ノンターゲット解析
- ワイドターゲット解析
- 定量分析（ターゲット解析）

局在が知りたい

イメージング

- イメージングMS（質量顕微鏡）
- ラマン分光イメージング

脂質代謝を調べたい（フラックス解析）

タンパク質の脂質修飾が知りたい

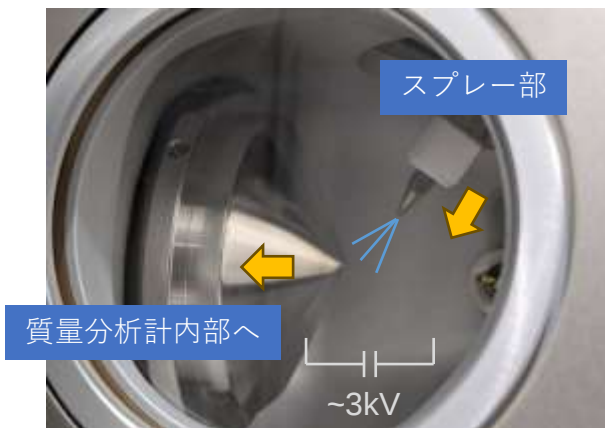
その他

- NMR（MRI）
- IR（FT-IR）

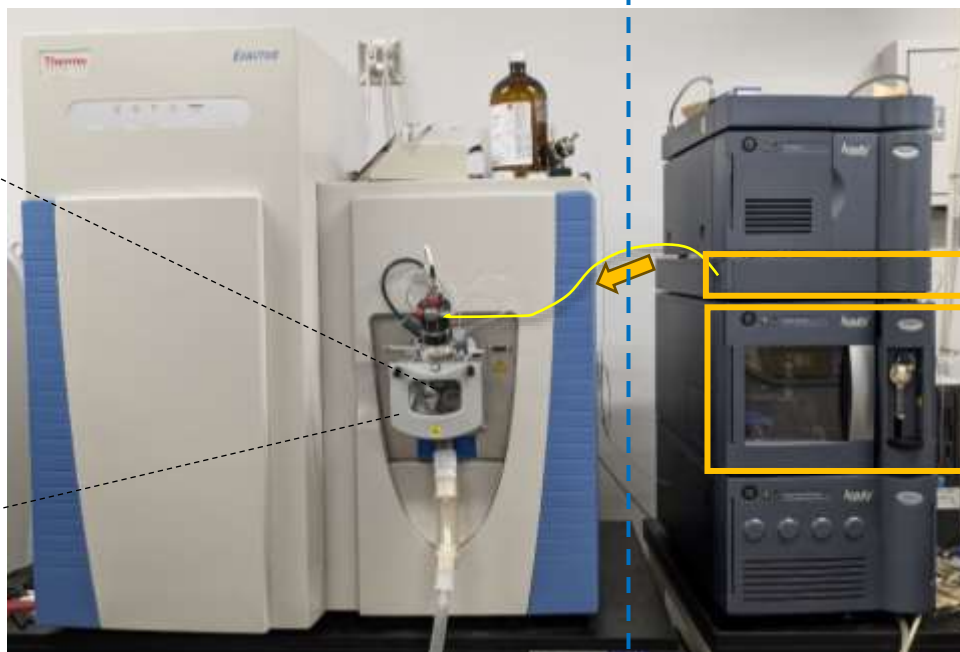
LC-MSシステム

質量分離 ← イオン化 ← クロマト分離

イオン源を横から見た図



エレクトロスプレーイオン源 (ESI) がよく用いられており"LC-ESI-MS"とも呼ばれる



質量分析計(MS)

液体クロマトグラフ(LC)

← UV検出器 (不使用)

← 分離カラムはこの中に

← オートサンプラー
試料は液体 (数 μ Lを注入)

← 高圧グラジエントポンプ

リピドミクスで行われるLC分離について

どの分離モードがよく使われる？

◎逆相（最も報告が多い）

▲順相（あまり使われない）

○HILIC（親水性相互作用クロマト／順相系固定相で逆相分離）

○SFC（超臨界流体クロマト／専用のLC装置が必要）

クロマト分離の目的は？

カラム保持時間（RT）の情報が成分同定や同一性の確認に役立つ

微量・低濃度成分の検出感度改善

マトリクス効果によるイオン化抑制の軽減

MRM、all-ion fragmentation などクロマトに依存したMS手法では省略できない

クロマトはどうしても必要？

クロマト分離せずに直接MSに試料を導入する分析方法もある（direct infusion MS）

ナノLCは？

報告はとても少ない（プロテオミクスとは対照的）

質量分析計の種類とリピドミクス手法

トリプル四重極型

低い分解能
低い質量精度
広いダイナミックレンジ
微量高感度測定モード (MRM)
高速正負イオン化モード切り替え

Q-TOF型・フーリエ変換型

高い分解能
高い質量精度
中程度のダイナミックレンジ

ターゲット解析

目的成分のみデータ化
同定 (定性分析) はしない
定量はMS/MS (MRM) で実施

ノンターゲット解析

探索的・発見的な測定
データベースを用いたピーク同定
定量比較はMSデータで実施



解析の流れ

ターゲット解析 (MRM)

目的成分を決める (～数100成分)



検出条件を最適化 (標品・実検体テスト)
(理論値・文献値が使えることもある)



未知試料のLC-MS測定 (MRMモード)



標的ごと・検体ごとに正しい保持時間に出
現するクロマトピークの面積をデータ化

化合物名	サンプル	MRM面積
PGE2	検体1	4000
	検体2	5000
	検体3	3000
LTB4	検体1	200
	検体2	ND
	検体3	3000
PAF	検体1	500
...	...	...

すべての標的と検体について面積データを得る
「不検出」情報もデータ化される
成分を「検出」はするが「同定」はしない

ノンターゲット解析

未知試料のLC-MS/MS測定 (DDA, DIA)



MSデータからピークを抽出
(質量、保持時間、イオン強度)



各MSピークのうちMS/MS情報が取得でき
ているものについてはデータベース検索に
より推定化合物名を付与 (同定)

質量	保持時間	推定化合物名	MS1面積	検体1
				検体2
				検体3
496.34	7.8	LPC 16:0	21000	...
523.61	9.4		4500	
758.56	11.95	PC 34:2	8000	
760.55	12.11	PC 34:1	15100	

アノテーションされないピークもある
成分ではなく「ピークを検出」するため
「成分不検出」の情報は積極的にデータ化されない
結果を統合して最終データにする
(詳細な手順はソフトウェアにより異なる)

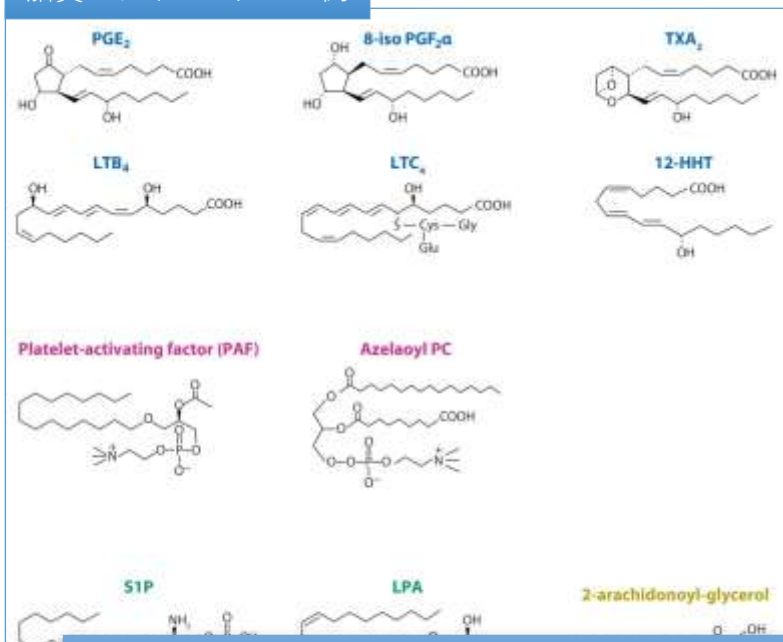
ターゲット解析

(例 1 : 脂質メディエーター斉分析)

脂質メディエーター

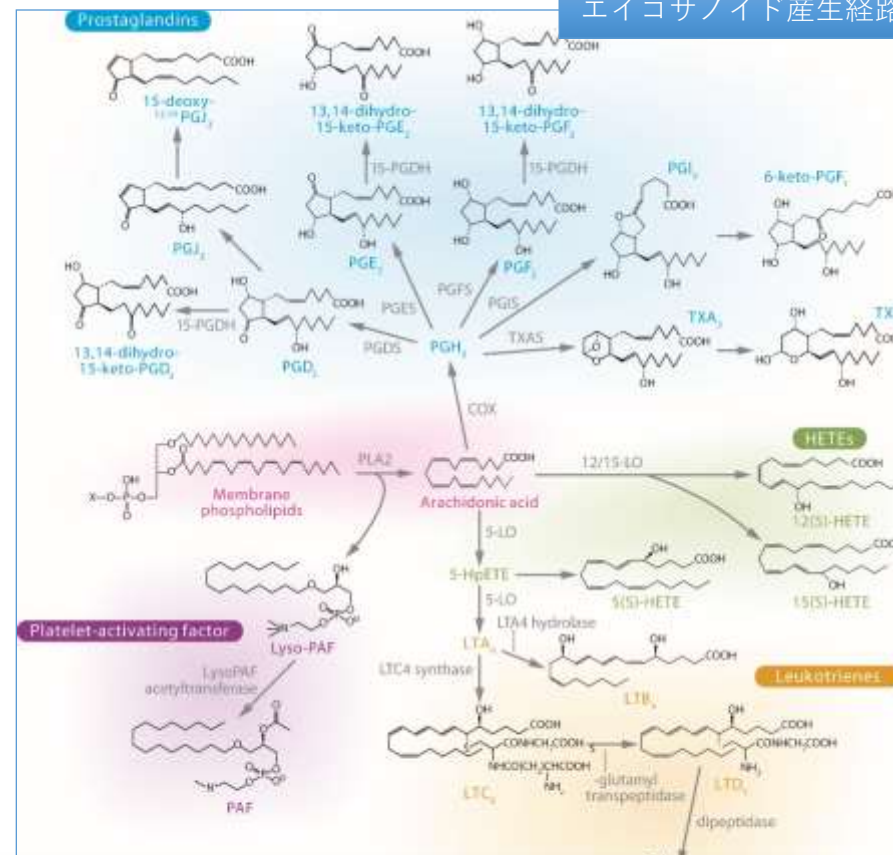
- 生理活性を示す生体内脂質代謝物
 - 脂肪酸代謝物
 - リン脂質代謝物
 - スフィンゴ脂質代謝物
 - コレステロール代謝物・・・他

脂質メディエーターの例



- 脂質代謝により産生
- 異性体や構造類似の代謝物が多い
- 多彩な生理機能、疾患との関連性

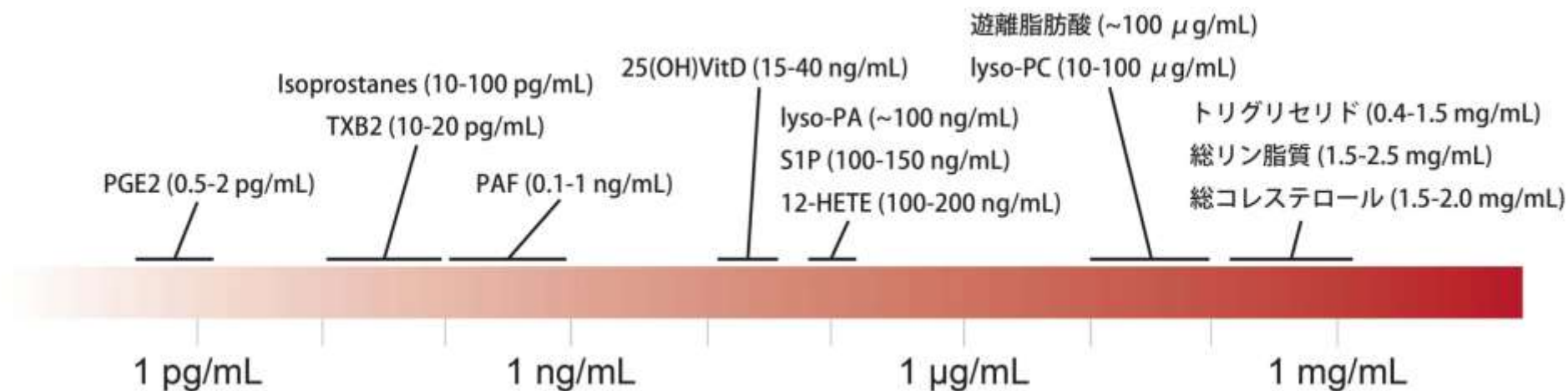
エイコサノイド産生経路



関連するものをまとめて検出・プロファイリングしたい

脂質メディエーターの量

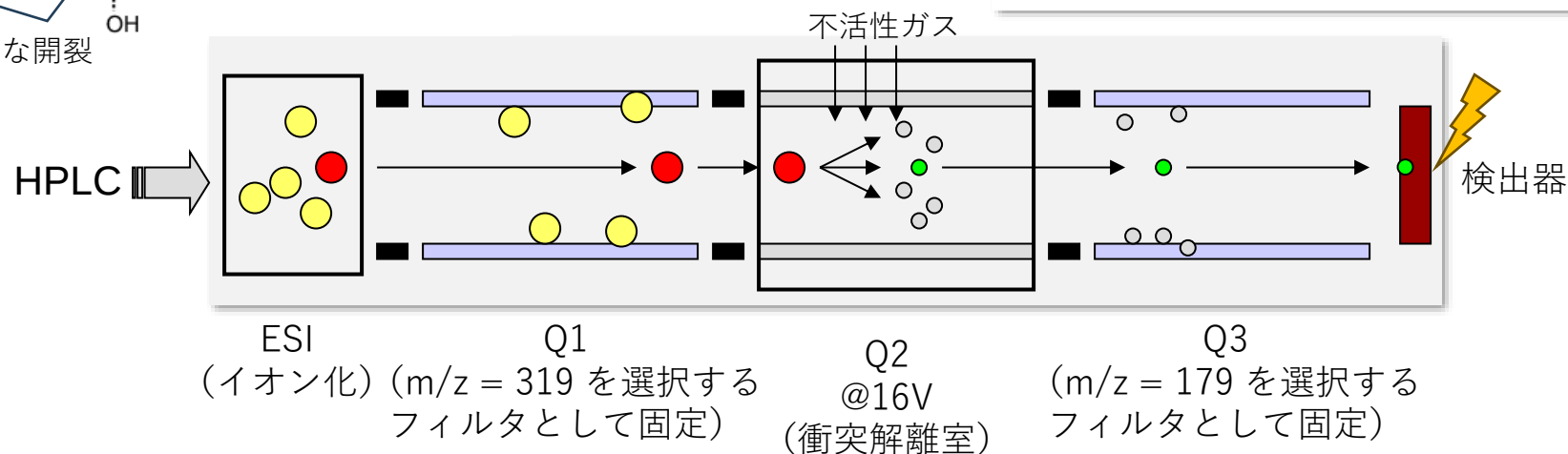
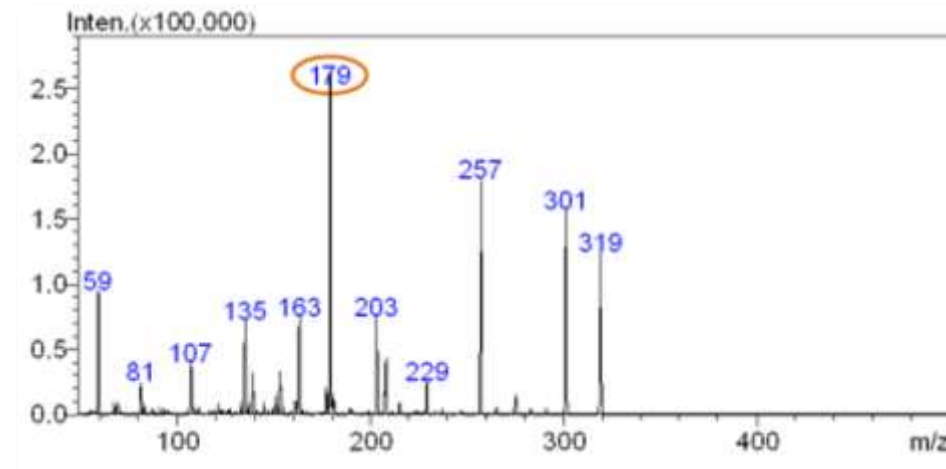
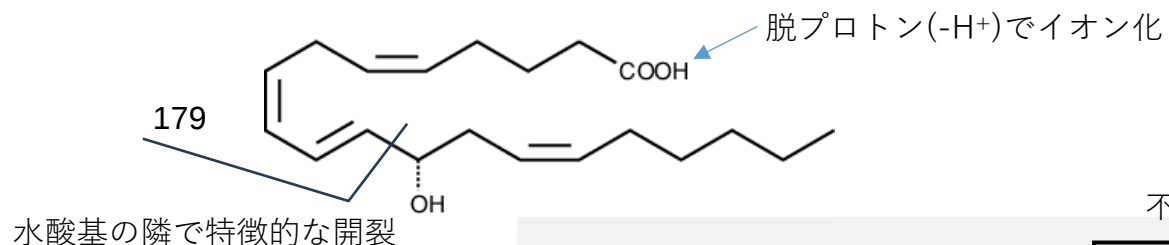
血中の脂質濃度の例



- $10^7 \sim 10^8$ 程度の濃度レンジ
 - その中でも脂質メディエーターの濃度は高くない
- 高感度分析の必要性
 - ノンターゲット法では検出できないことが多い

MRM法の原理

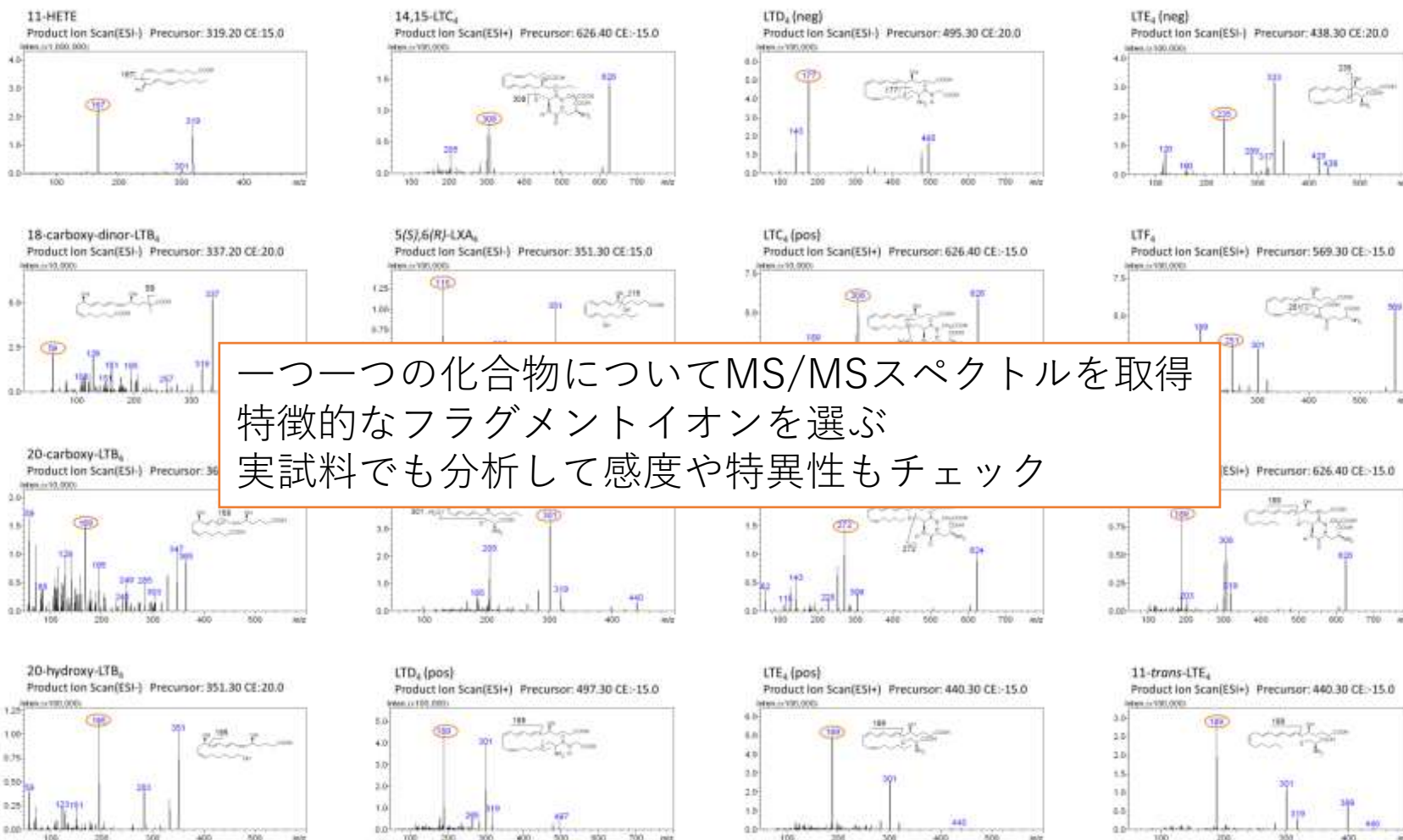
例) 12-HETE (分子量320) をMRM検出する場合



MRMは4つの項目で規定される {Pol: Neg, Q1mz: 319, Q3mz: 179, CE: 16}
質量分析計にこれを測定条件として設定する場合“MRMチャンネル”と呼ばれる
また「319→179」のような質量変化を表す部分を指して“MRMトランジション”という

スペクトルデータは得られないかわりにMRMクロマトグラムが得られる
目的化合物ごとに異なるMRMトランジションを高速に切り替えながら同時に測定できる (最大500MRM/秒程度)

標品を分析してMRMトランジションを作成



標品を分析してMRMトランジションを作成

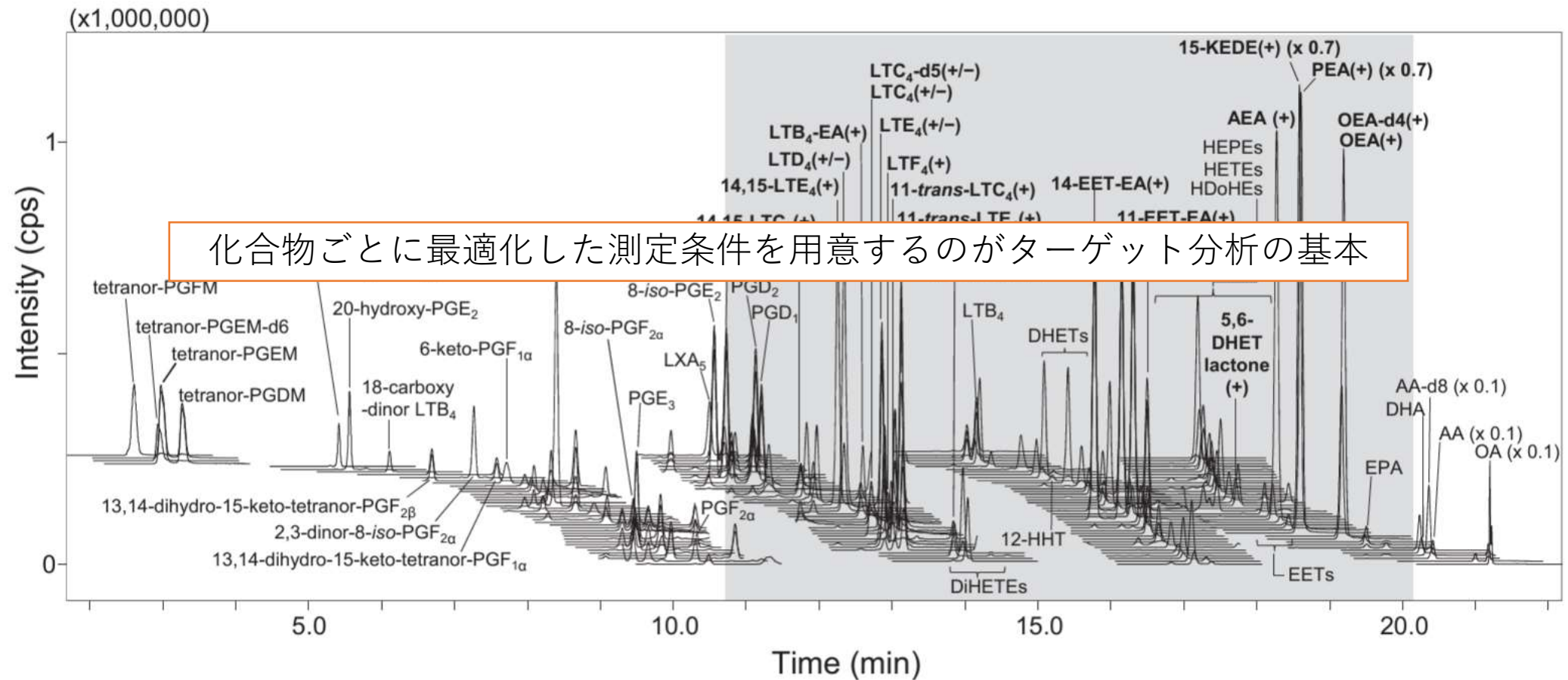


クロマトグラムの保持時間 (RT) 情報も重要
構造類似の化合物や異性体も多いため分離状況を確認

標品を分析してMRMトランジションを作成

Category	Pathway	Name	CAS no.	Polarity	Transition (m/z)	CE (V)	T _R (min)	IS-group	Polarity-switching method			Negative-only method		
									LLOQ (pg)	Range	Linearity (R ²)	LLOQ (pg)	Range	Linearity (R ²)
OA		OA	112-80-1	Neg	281.2>281.2	11	21.19	13	-	-	-	-	-	-
LA	LOX	13-HODE	29623-28-7	Neg	295.2>195.1	18	16.61	8	5	5-1000	0.9978	20	20-1000	0.9983
LA	LOX	9-HODE	73543-67-6	Neg	295.2>171.1	18	16.61	8	5	5-1000	0.9989	20	20-1000	0.9994
LA	LOX	13-KODE	54739-30-9	Neg	293.2>113.1	22	16.96	8	50	50-1000	0.9968	50	50-1000	0.9990
LA	LOX	9-KODE	54232-59-6	Neg	293.2>185.1	20	17.12	8	50	50-1000	1.0000	50	50-1000	0.9966
ALA	LOX	9-HOTrE	89886-42-0	Neg	293.2>171.1	15	15.66	8	20	20-1000	0.9981	5	5-1000	0.9904
ALA	LOX	13-HOTrE	87984-82-5	Neg	293.2>195.1	17	15.83	8	20	20-1000	0.9992	5	5-1000	0.9961
ALA		ALA	463-40-1	Neg	277.2>277.2	20	19.43	12	-	-	-	-	-	-
EDA	NE	15-HEDE	77159-57-0	Neg	323.2>223.2	19	18.16	9	5	5-500	0.9995	5	5-500	0.9953
EDA	NE	15-KEDE	105835-44-7	Pos	323.2>207.2	-14	18.54	9	0.5	0.5-500	0.9965	-	-	-
DGLA	COX	PGE ₁	745-65-3	Neg	353.2>235.2	16	11.10	3	2	2-1000	0.9994	2	2-1000	0.9987
DGLA	COX	PGD ₁	17968-82-0	Neg	353.2>235.1	14	11.22	3	2	2-1000	0.9956	5	5-1000	0.9962
DGLA	LOX	15-HETrE	92693-02-2	Neg	321.2>221.2	15	17.44	8	2	2-1000	0.9966	1	1-1000	0.9986
DGLA	NE	8- <i>iso</i> -PGF _{1α}	26771-96-0	Neg	355.2>293.2	24	9.52	3	5	5-1000	0.9949	5	5-1000	0.9976
DGLA	NE	8- <i>iso</i> -PGF _{1β}	N.A.	Neg	355.2>293.2	24	9.58	3	5	5-1000	0.9946	5	5-500	0.9907
DGLA	NE	8- <i>iso</i> -PGE ₁	21003-46-3	Neg	353.2>235.2	17	10.81	3	2	2-1000	0.9954	5	5-1000	0.9971
DGLA	NE	8- <i>iso</i> -PGA ₁	211186-29-7	Neg	335.2>235.2	13	13.00	3	5	5-1000	0.9982	1	1-1000	0.9970
DGLA		DGLA	1783-84-2	Neg	305.2>305.2	20	20.93	13	-	-	-	-	-	-
AA	COX	Tetranor-PGFM	23109-94-6	Neg	329.2>311.2	15	2.68	1	1	1-1000	0.9978	1	1-1000	0.9984
AA	COX	Tetranor-PGEM	24769-56-0	Neg	327.2>309.2	15	3.03	1	0.5	0.5-1000	0.9984	0.5	0.5-1000	0.9986
AA	COX	Tetranor-PGDM	N.A.	Neg	327.2>309.2	15	3.19	1	1	1-1000	0.9980	1	1-1000	0.9987
AA	COX	20-hydroxy-PGF _{2α}	57930-92-4	Neg	369.2>325.2	21	5.47	3	2	2-1000	0.9992	2	2-1000	0.9985
AA	COX	20-hydroxy-PGE ₂	57930-95-7	Neg	367.2>287.2	18	5.61	3	1	1-1000	0.9979	1	1-1000	0.9975
AA	COX	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF _{1β}	23015-45-4	Neg	299.2>113.1	24	6.67	3	5	5-1000	0.9973	5	5-1000	0.9974
AA	COX	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF _{1α}	24379-94-0	Neg	299.2>113.1	24	7.55	3	5	5-500	0.9973	20	20-500	0.9979
AA	COX	6-keto-PGF _{1α}	58962-34-8	Neg	369.3>245.2	27	7.70	3	5	5-1000	0.9990	5	5-1000	0.9996
AA	COX	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGD ₂	N.A.	Neg	297.2>109.1	23	7.94	3	20	20-1000	1.0000	20	20-1000	0.9923
AA	COX	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGE ₂	20675-85-8	Neg	297.2>109.1	21	8.62	3	5	5-1000	0.9987	5	5-1000	0.9973
AA	COX	6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF _{1α}	63983-53-9	Neg	369.2>113.1	31	8.90	3	5	5-1000	0.9970	20	20-1000	0.9964
AA	COX	2,3-dinor-6-keto-PGF _{1α}	N.A.	Neg	341.3>135.1	24	8.93	3	-	-	-	-	-	-
AA	COX	TXB ₂	54397-85-2	Neg	369.2>195.1	14	9.50	2	5	5-1000	0.9992	5	5-1000	0.9972
AA	COX	11- β -PGF _{2α}	38432-87-0	Neg	353.2>193.1	25	9.66	3	20	20-1000	0.9984	20	20-1000	0.9995
AA	COX	PGF _{2α (or ent-PGF_{2α)}}	551-11-1 (54483-31-7)	Neg	353.2>193.1	26	10.30	3	20	20-1000	0.9960	20	20-1000	0.9986
AA	COX	PGE ₂ (or ent-PGE ₂)	363-24-6 (65085-69-0)	Neg	351.2>271.2	17	10.72	3	2	2-1000	0.9991	1	1-1000	0.9976
AA	COX	11-dehydro-TXB ₂	67910-12-7	Neg	367.2>305.2	17	10.79	3	5	5-1000	0.9986	5	5-1000	0.9992
AA	COX	15-keto-PGF _{2α}	35850-13-6	Neg	351.2>219.2	17	10.83	3	5	5-1000	0.9966	5	5-1000	0.9986

脂質メディエーター高感度一斉定量メソッド

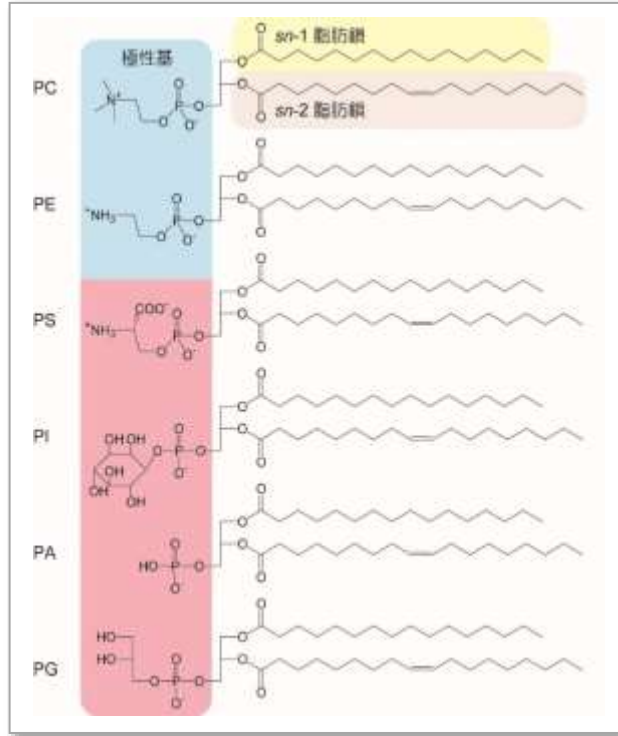


ターゲット解析

(例 2 : リン脂質のワイドターゲット解析)

脂肪酸の組み合わせによるリン脂質の多様性

リン脂質



脂肪酸

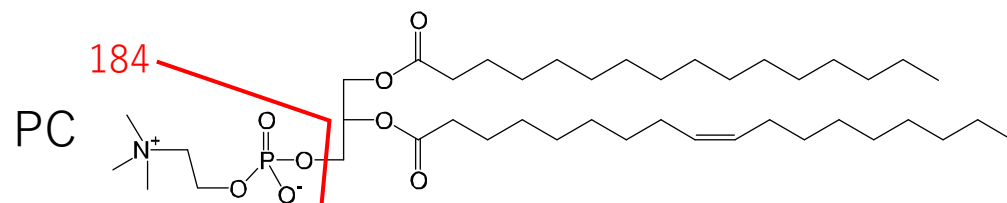
数値表現 (Numerical symbol)	示性式 $\text{CH}_3-(\text{R})-\text{CO}_2\text{H}$	組織名	慣用名	略号	融点 (°C) [22]
4:0	$-(\text{CH}_2)_2-$	ブタン酸	酪酸 (ブチル酸)	Bu	
5:0	$-(\text{CH}_2)_3-$	ペンタン酸	古草酸 (バレリアン酸)	Pe	
6:0	$-(\text{CH}_2)_4-$	ヘキサン酸	カプロン酸	Hx	
7:0	$-(\text{CH}_2)_5-$	ヘプタン酸	エノント酸 (ヘプチル酸)	Hp	
8:0	$-(\text{CH}_2)_6-$	オクタン酸	カプリル酸	Oc	
9:0	$-(\text{CH}_2)_7-$	ノナン酸	ペラルゴン酸	Nn	
10:0	$-(\text{CH}_2)_8-$	デカン酸	カプリン酸	Dec	
12:0	$-(\text{CH}_2)_{10}-$	ドデカン酸	ラウリン酸	Lau	44.2
14:0	$-(\text{CH}_2)_{12}-$	テトラデカン酸	ミリスチン酸	Myr	53.9
15:0	$-(\text{CH}_2)_{13}-$	ペンタデカン酸	ペンタデシル酸		
16:0	$-(\text{CH}_2)_{14}-$	ヘキサデカン酸	パルミチン酸	Pam	63.1
16:1(n-7) 16:1(Δ^7)	$-(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$	9-ヘキサデセン酸	パルミトレン酸	Δ^7 Pam	0.5
17:0	$-(\text{CH}_2)_{15}-$	ヘプタデカン酸	マルガリン酸		
18:0	$-(\text{CH}_2)_{16}-$	オクタデカン酸	ステアリン酸	Ste	69.6
18:1(n-9) 18:1(Δ^9)	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$	cis-9-オクタデセン酸	オレイン酸	Ole	14.0
18:1(n-7) 18:1(Δ^{11})	$-(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9-$	11-オクタデセン酸	バクセン酸	Vac	
18:2(n-6) 18:2($\Delta^6,12$)	$-(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7-$	cis,cis-9,12-オクタデカジエン酸	リノール酸	Lin	-5.0
18:3(n-3) 18:3($\Delta^6,12,15$)	$-(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7-$	9,12,15-オクタデカトリエン酸	(9,12,15)-リノレン酸	aLnn	-11.3
18:3(n-6) 18:3($\Delta^6,9,12$)	$-(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_4-$	6,9,12-オクタデカトリエン酸	(6,9,12)-リノレン酸	yLnn	
18:3(n-5) 18:3($\Delta^6,11,13$)	$-(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7-$	9,11,13-オクタデカトリエン酸	エレオステアリン酸	eSte	
20:0	$-(\text{CH}_2)_{18}-$	エイコサン酸	アラキジン酸	Ach	75.6
20:2(n-9) 20:2($\Delta^8,11$)	$-(\text{CH}_2)_6(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_6-$	8,11-エイコサジエン酸		Δ^8 ArC	
20:3(n-9) 20:3($\Delta^5,8,11$)	$-(\text{CH}_2)_6(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_3-$	5,8,11-エイコサトリエン酸	ミード酸	Δ^8 ArC	
20:4(n-6) 20:4($\Delta^5,8,11,14$)	$-(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_4(\text{CH}_2)_5-$	5,8,11-エイコサテトラエン酸	アラキドン酸	Δ^8 ArC	-49.5
22:0	$-(\text{CH}_2)_{20}-$	ドコサン酸	ベヘン酸	Beh	81.5
24:0	$-(\text{CH}_2)_{22}-$	テトラコサン酸	リグノセリン酸	Lig	86.0
24:1	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}-$	cis-15-テトラコサン酸	ネルボン酸	Ner	
26:0	$-(\text{CH}_2)_{24}-$	ヘキサコサン酸	セロチン酸	Crt	
28:0	$-(\text{CH}_2)_{26}-$	オクタコサン酸	モンタン酸	Mon	
30:0	$-(\text{CH}_2)_{28}-$	トリアコタン酸	メリシン酸		

少なくとも1,000種類以上のリン脂質分子種



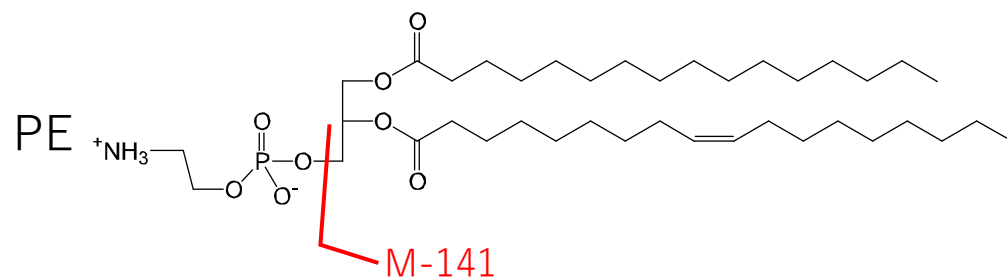
一斉解析したいが入手できるのは一部の分子種のみ

極性基に関連したフラグメンテーション



$M \rightarrow 184$

※Mは分子量関連イオンのm/z



$M \rightarrow M-141$

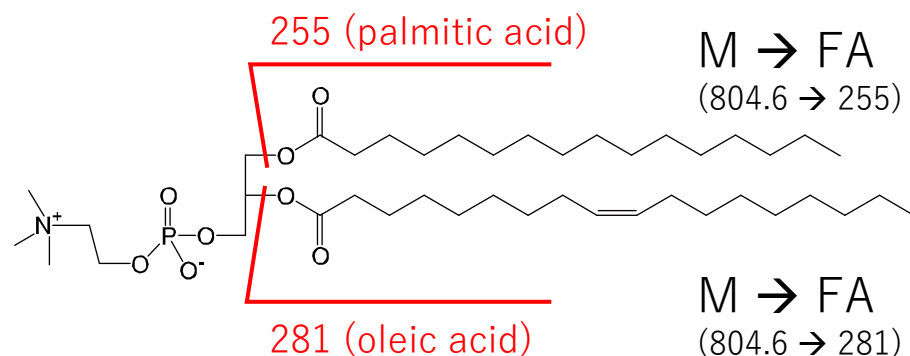
-141

Name	Q1	Q3
PE_32:1	690.5	549.5
PE_32:0	692.5	551.5
PE_34:3	714.5	573.5
PE_34:2	716.5	575.5
PE_34:1	718.5	577.5
PE_34:0	720.6	579.5
PE_36:4	740.5	599.5
PE_36:3	742.5	601.5
PE_36:2	744.6	603.5
PE_36:1	746.6	605.6
PE_36:0	748.6	607.6
...	...	...

脂肪酸組成によらず極性基の種類ごとに同じようなフラグメンテーションがおきる
極性基のMRMでは脂肪酸の組成違いは識別できない

アシル基（脂肪酸）関連フラグメンテーション

PC 16:0/18:1



負イオンモードでは脂肪酸フラグメントが生じる

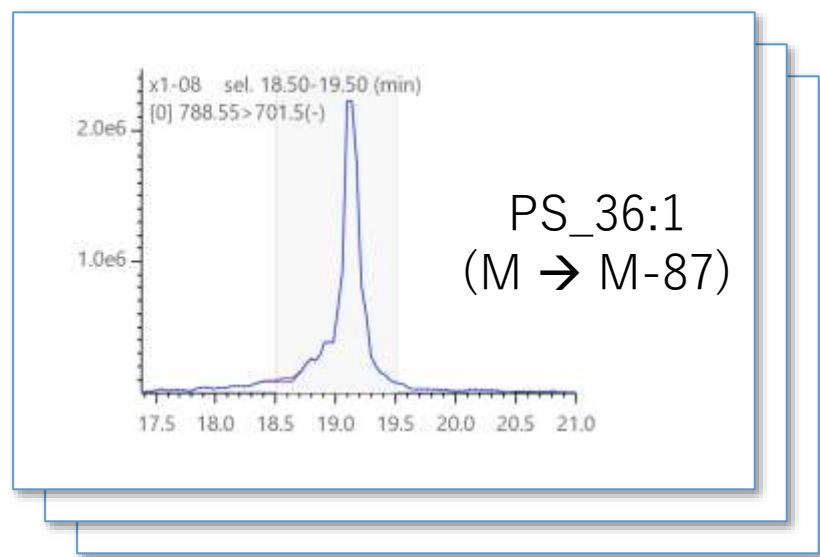
脂肪酸組成を区別した脂質名で検出・解析できる
ただし脂肪酸の結合位置異性体は区別できない
MRMチャネル数が多くなりすぎないように調整必要

Name		Q1	Q3
PC_32:2	PC_16:1_16:1	774.5	253.2
PC_32:1	PC_16:0_16:1	776.5	255.2 253.2
PC_32:0	PC_16:0_16:0	778.6	255.2
PC_34:3	PC_16:1_18:2	800.5	253.2 279.2
PC_34:2	PC_16:0_18:2	802.6	255.2
			279.2
	PC_16:1_18:1		253.2 281.2
PC_34:1	PC_16:0_18:1	804.6	255.2
			281.2
	PC_16:1_18:0		253.2 283.3
PC_34:0	PC_16:0_18:0	806.6	255.2
		806.6	283.3

※リン脂質分子はギ酸アダクトとしてイオン化

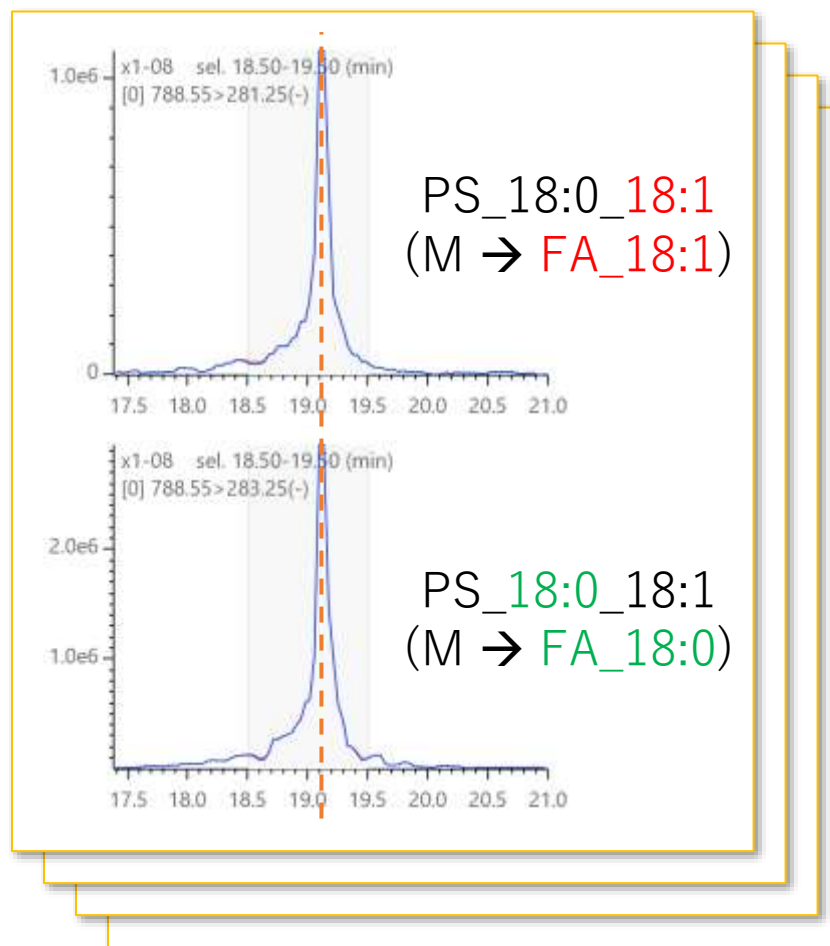
リン脂質ターゲット解析の実施例（２段階分析法）

1st method（極性基MRM）



分子量ごとに
面積値をデータ化

2nd method（脂肪酸MRM）



脂肪酸組成
(=脂肪酸ペア) ごとに
面積値をデータ化

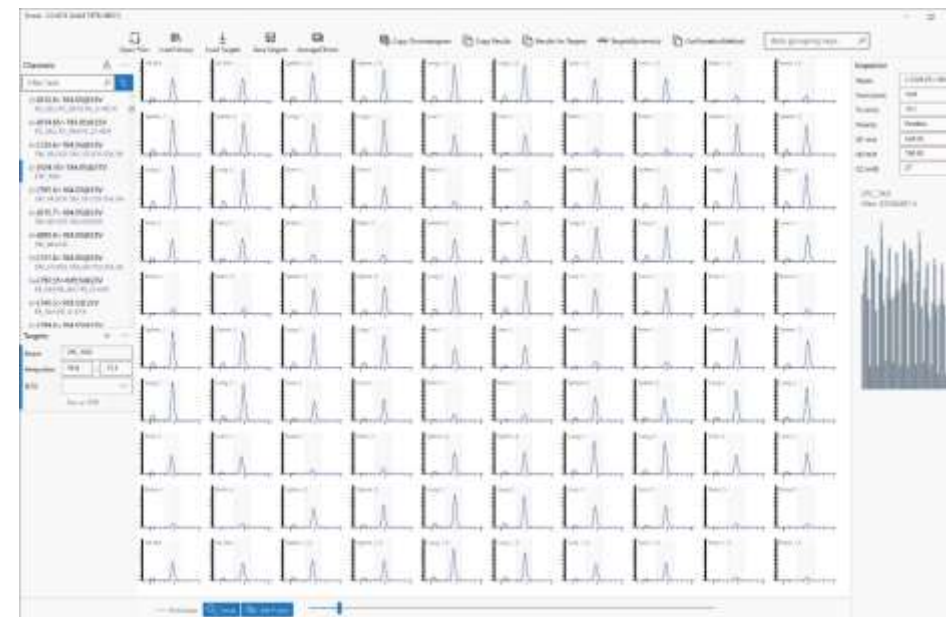
ターゲット解析用のソフトウェア

装置メーカー製のソフトウェア

- 標準のMRM定量ソフトウェア（各社・省略）
- MRM用オプションソフトウェア
 - LabSolution Insight (島津)、MultiQuant (Sciex)、MS Quan (Waters)など

オープンソース／アカデミア

- Skyline (ワシントン大学・MacCoss Lab)
(skyline.ms)
- MRMPROBS (東京農工大・津川先生)
(systemsomicslab.github.io/compms/mrmp probs/main.html)
- TRACES (東大・北)
(github.com/KitaYoshihiro/TRACES)



TRACES

ノ ン タ ー ゲ ッ ト 解 析

ノンターゲット法のMS/MS測定（DDAとDIA）

DDA（データ依存的MS/MS取得）

昔からある自動MS/MS測定法

1. MSスペクトル取得
2. MSピーク検出
3. 強度の高いピークを選択(Top-Nなど)
4. 各ピークについてMS/MSを取得
5. (1.に戻る)
(1秒サイクルくらいでずっと繰り返す)



得られるデータ

- MSピークリスト (RT, m/z, 面積)
- 主要なMSピークのMS/MSスペクトル

興味のあるMSピークのMS/MSスペクトルが
取得されているかどうかはある程度偶然に左右される

DIA（データ非依存的MS/MS取得）

近年オミクスでよく使われるMS/MS測定法
(原理は2つ)

- All-ion fragmentation系(AIF, MS^E)
- SWATH系 (SWATH, SWATH類似法)

1. MSスペクトル取得
2. MSとは独立に全質量範囲について
MS/MSを取得
3. (1.に戻る)
(1秒サイクルくらいでずっと繰り返す)



得られるデータ

- MSピークリスト (RT, m/z, 面積)
- 任意のMSピークのMS/MSスペクトル
(DDAより品質は劣る)
- MS/MSフラグメントのピーク面積

MS-DIALによるDIAノンターゲット解析例



まとめ

ターゲット解析

- 目的成分のみを測定
- トリプル四重極型MSのMRMモードで高感度測定
標品を使って成分ごとに個別の測定条件を設定
理論値で拡張することで数千種類の脂質も分析可能
- 検出および定量が目的、未知成分の同定はしない

〇〇という脂質は見えなかった？

測定していないのでわかりません

ノンターゲット解析

- 発見的・探索的測定
- Q-TOFやフーリエ変換型MSによる高い質量分解能を活用
- ピークを検出して成分同定（MS/MSデータがあれば使う）と相対定量
- 同定精度はデータの品質による（データベース検索の結果を鵜呑みにしない）

測定結果の脂質リストが前回と違っていて比較できないんだけど？

成分リストは毎回異なります

〇〇という脂質のデータが無い...
不検出だったのですね？

確認させてください

セミターゲット解析（ハイブリッド解析）というものもある

- ノンターゲット解析のデータを使ったターゲット解析
興味のある成分の保持時間や質量(m/z)などを使ってデータを抽出して数値化
- 本来のノンターゲット解析もあわせて実施

リン脂質類の組成を知りたい

セミターゲット解析ですね