

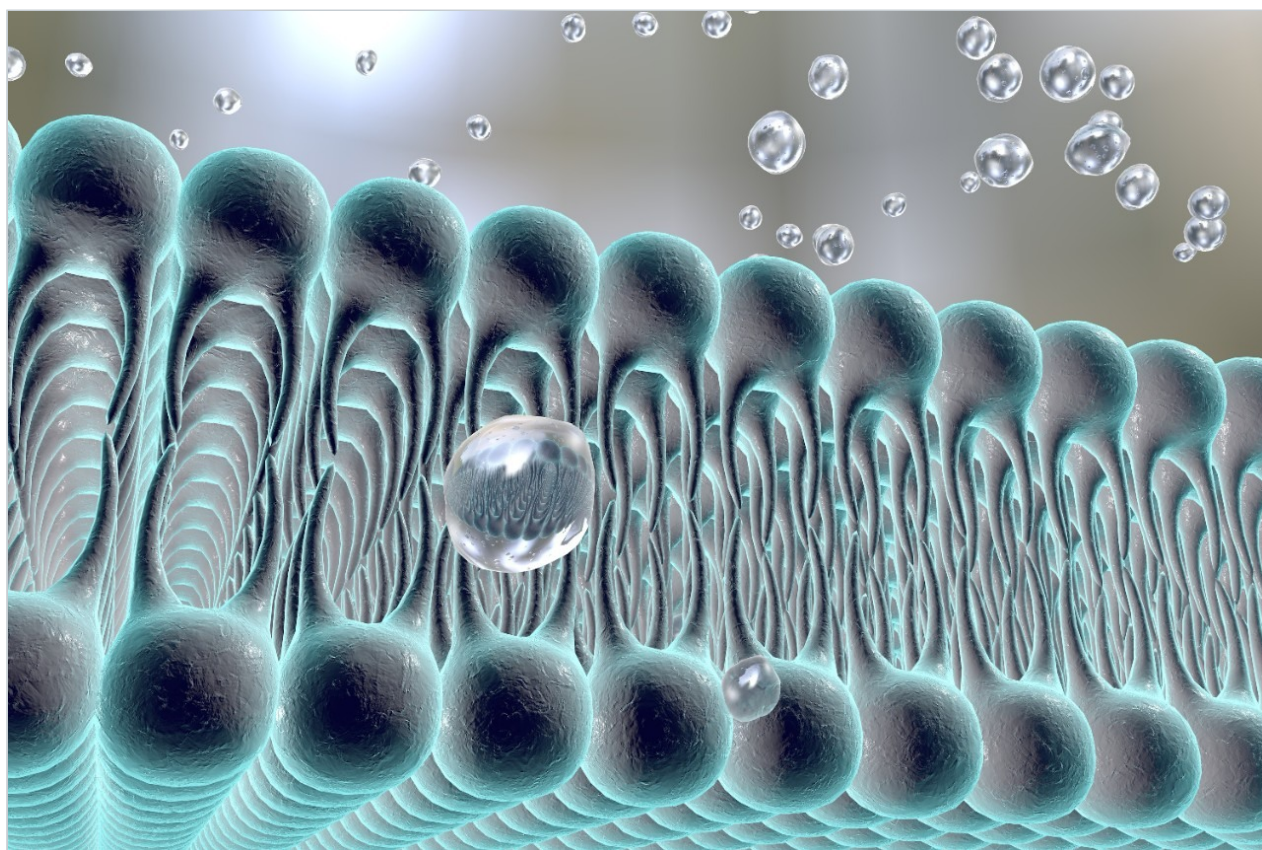
アプリケーションノート

## CCS、保持時間、MS/MS ライブラリーによる 包括的な脂質プロファイリングの達成

---

Nyasha Munjoma, Sarah Lennon, Jeff Goshawk, Hans Vissers, Giorgis Isaac, Graham Mullard, Steven Lai,  
Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation



研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

---

要約

このアプリケーションノートでは、標準化したプロトコルを使用して、複数の脂質クラスに属する 100 種の認証済み標準試料で構成されるサンプルセットについて、RT および CCS の情報を取得し、Broeckling らによる予測 TWCCSN<sub>2</sub> モデルをバリデーションします。

## アプリケーションのメリット

- 簡単に展開できる分析法およびライブラリーにより、返された識別情報に対する信頼性が増加し、生産性が向上
- ヒト血漿および組織サンプルについてこれまでに報告された 3,200 種を超える脂質が含まれている、キュレーションされた脂質データベース
- 脂質標準試料により CCS 予測モデルのバリデーションが可能になり、対象範囲を拡大するための in-silico での値の取り込みが可能となる
- RT の測定値を割り当てることにより、偽陽性の同定が低減
- ライブラリーに組み込まれた複数の付加イオンに関する包括的な MS/MS 情報により、信頼性が向上
- UNIFI または Progenesis Q1 インフォマティクスを使用した高速データ解析と可視化により、最大限の柔軟性を実現

---

## はじめに

脂質は重要な生体分子としてよく知られており、シグナル伝達、膜へのアンカリング、エネルギー貯蔵など、さまざまな分子機能で多様な役割を果たします。リピドームに関する知見を得るために、質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィー（LC-MS）などの分析テクノロジーはルーチン分析手段となっており、これによって包括的でハイスループットで頑健なソリューションが提供されます。高分解能戦略を使用した探索ベースのワークフローにより、複雑なサンプルのプロファイリングが可能になり、多数の脂質の同定候補を提供します。探索リピドミクスにとって大きな障害は、データベース検索から対象の脂質を正確で確実に同定する能力です。保持時間（RT）や衝突断面積（CCS）などの追加の生理化学的特性や診断 MS/MS 情報を検索スペースに組み込むことで、返される識別情報の信頼性を高めることができます。

CCS は、脂質分子種の化学構造や 3 次元立体配座に密接に関連する重要な物理化学的特性ですが、サンプルマトリックスの種類や複雑さとは無関係です<sup>1</sup>。このため CCS 値は、RT や m/z などの他の分子識別子に加えて、直交する特性として使用することで、脂質同定の特異性を高めることができます<sup>1</sup>。in-silico で、および実験で導出したいいくつかの CCS データベースが、Paglia らによって報告されているように、これまでに公開されていますが<sup>1</sup>、偽陽性率が高く、多くの場合、同定に生物学的関連性が欠けています。CCS データベースに実験的に測定された CCS 値を追加するのが理想的ですが、市販されている脂質標準試料の数が限られているため、十分な対象範囲を得るには in-silico 測定が必要です。

本研究では、標準化したプロトコルを使用して、複数の脂質クラスに属する 100 種の認証済み標準試料で構成されるサンプルセットについて、RT および CCS 情報を取得し、Broeckling らによる予測 TWCCSN<sub>2</sub> モデルをバリデーションしました<sup>2</sup>。実験的に得られた測定値と予測値の間に強い相関関係が確立されたことにより、ライブラリーの残りの脂質に in-silico CCS 値を入力できました。フラグメントイオンの情報もライブラリーに追加され、複数の付加イオンの種類が説明されます。ヒト血漿および組織（心臓および肝臓）からの抽出物を、内因性分子種を同定するための追加の試験サンプルとして使用しました。

---

## 実験方法

### サンプル情報

CCS 予測ツールの正確度を評価するために、さまざまな脂質の標準試料を取り込みました。これらは 14 クラスにわたる 69 種の個別の脂質で構成されており（Avanti Lipids、米国アラバマ州）、これらは逆相（RP）クロマトグラフィーで明確に異なる挙動を示す（共溶出を防ぐため）7 種以下の脂質/混合物を含むサンプルグループに分けて、IPA に溶解させました。サンプルは、標準試料のカスタム混合試料として、3 つの濃度レベルで 3 回繰り返し注入しました。さらに、Odd Chain LIPIDOMIX、Light Splash LIPIDOMIX、Differential Ion Mobility System Suitability LIPIDOMIX、Ceramide LIPIDOMIX、Splash LIPIDOMIX、Deuterated Ceramide LIPIDOMIX を、IPA で 1:10 および 1:100 に希釈して、繰り返し注入しました（n = 3）。

### ライブラリーの構築

追加のクラスベースの脂質抽出物（PS、PE、PG、Cer、SM 混合物）を 0.1 mg/mL および 0.01 mg/mL に調製し、技術的な 3 回繰り返しとして取り込みました。これらを使用して、選択した脂質の生物学的関連性を確認し、信頼性を高めました。ライブラリーの有用性を評価するために、ヒトの血漿、肝臓、心臓組織からの抽出物をスクリーニングしました。

### LC 条件

LC システム:	ACQUITY Premier UPLC
カラム:	ACQUITY Premier CSH C <sub>18</sub> 、2.1 × 100 mm、1.7 μm
カラム温度:	55 °C
流速:	0.4 mL/分

移動相: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル/水/1 M ギ酸アンモニウム (600/390/10) (A) および 0.1% ギ酸含有 IPA/アセトニトリル/1 M ギ酸アンモニウム (900/90/10) (B)

分析時間: 12 分

注入量: 1~4  $\mu$ L

## グラジエント

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.4	50	50	初期条件
0.5	0.4	47	53	6
4.0	0.4	45	55	6
7.0	0.4	35	65	6
7.5	0.4	20	80	1
10	0.4	1	99	6
11	0.4	1	99	1
12	0.4	50	50	1

## MS 条件

MS システム: SYNAPT XS

イオン化モード: ESI (+/-)

キャピラリー電圧: 3 kV (+); 2.5 kV (-)

測定モード: HDMS<sup>E</sup>

取り込み範囲: 50 ~ 1200 Da

コリジョンエネルギー: 直線ランプ (トランスファー CE) 25 ~ 45 eV

コーン電圧:	30 V
ソース温度:	120 °C
脱溶媒温度:	500 °C
コーンガス流量:	150 L/時間
脱溶媒流量:	1,000 L/時間
ヘリウムセルのガス流量:	180 mL/分
IMS のガス流量 (窒素):	90 mL/分
IMS 波速:	900 m/秒
IMS 波高:	40 V

## インフォマティクス

MassLynx、UNIFI、Progenesis QI

---

## 結果および考察

### CCS 予測値のバリデーション

カスタム混合物に含まれている、および市販されている 100 種を超える個別の脂質を使用して、in-silico CCS 予測をバリデーションしました<sup>2</sup>。脂質標準試料は、すべての主要な脂質クラスをカバーし、脂質構造の広い断面を確保するように選択しました。測定した脂質標準試料の平均 CCS 測定値は、以下のパーセンテージの差を計算することで予測値と比較します。

$$\frac{(\text{実測CCS} - \text{予測CCS}) * 100}{\text{実測CCS}}$$

CCS の測定値と in-silico 予測値を比較した結果、すべてのクラスで高い相関性が認められました。図 1 に、3 つの脂質クラスの例が示されており、 $r^2 > 0.96$  の優れた直線性が得られたことが強調されています。

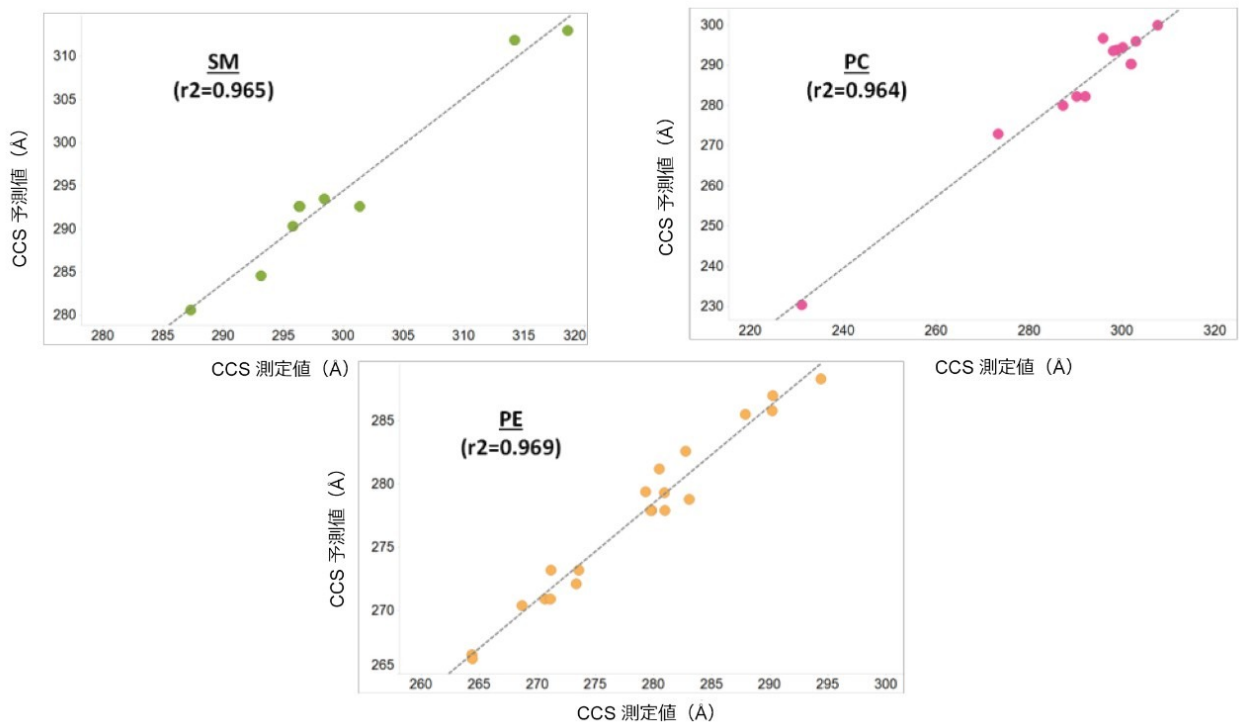


図 1. 既知の脂質標準試料の CCS 測定値を使用した CCS 予測値の評価。脂質クラスの例として、スフィンゴミエリン (SM)、ホスホコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) の 3 種が示されています。データは、ネガティブ ESI とポジティブ ESI の両方のプロトン付加イオンについて示されています。

飽和しているピーク、CCS の測定値と予測値の間の誤差が 5% 以上のピーク、および保持時間の偏差が 0.1 分以上のピークを除外しました。偽陽性のヒットを減らすために保持時間を補正後、実験データの 96.8% (陽イオン) および 95.5% (陰イオン) が、その in-silico 値と比較したところ、CCS の許容誤差である ± 5% 以内に収まることがわかり、以前に報告されたデータによる試験結果が確認されました<sup>2</sup>。

計 32 種および 16 種の脂質クラスが、それぞれ陽イオンおよび陰イオンの CCS 値とともに示されています。CCS の分布は、143 ~ 349 Å (陽イオン) および 124 ~ 334 Å (陰イオン) の範囲です。陽イオンに対応する脂質クラスのサブセットについての CCS の分布例が、図 2 に示されています。

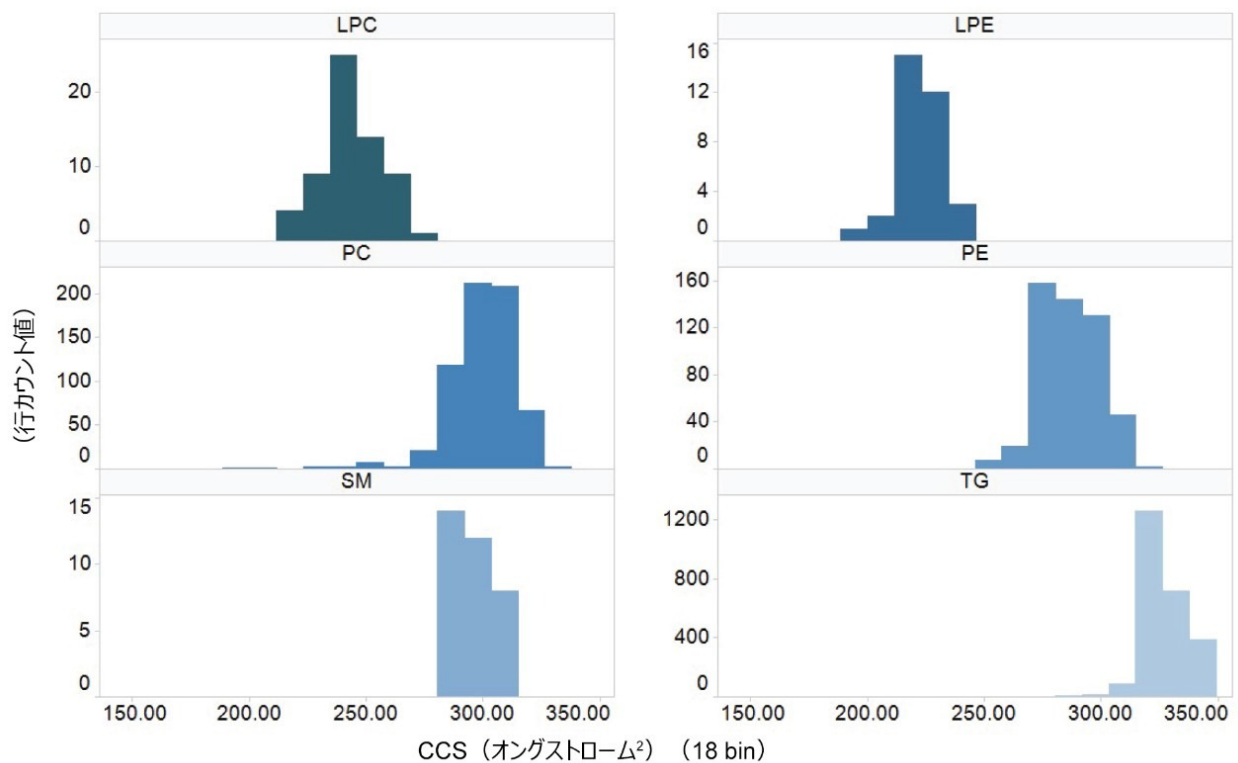


図 2. ライブラリーからの 6 種の脂質クラス (ESI+) の CCS 分布の例

## データベースの概要

化合物を確実に正確で高い信頼性で同定するためには、包括的で適切にキュレーションされたデータベースを利用することが重要です。そのため、ここで紹介する包括的な脂質データベースは、これらのニーズに対応するために、3,200 の脂質のエントリーで構成されており、ポジティブ ESI とネガティブ ESI の両方に共通の付加イオンのほとんどが含まれています。図 3 に両イオン化モード間での脂質のエントリーの分布が示されており、図 4 には両イオン化モードでの付加イオンが示されています。示している 3,200 種の脂質のうち、43% のエントリーは両方のイオン化モードで示されています。これには、識別情報の信頼性が高くなる利点があります。例えば、リン脂質を検討する際に、ヘッドグループと脂肪酸のアシル鎖の両方を特性解析する能力が可能になります。

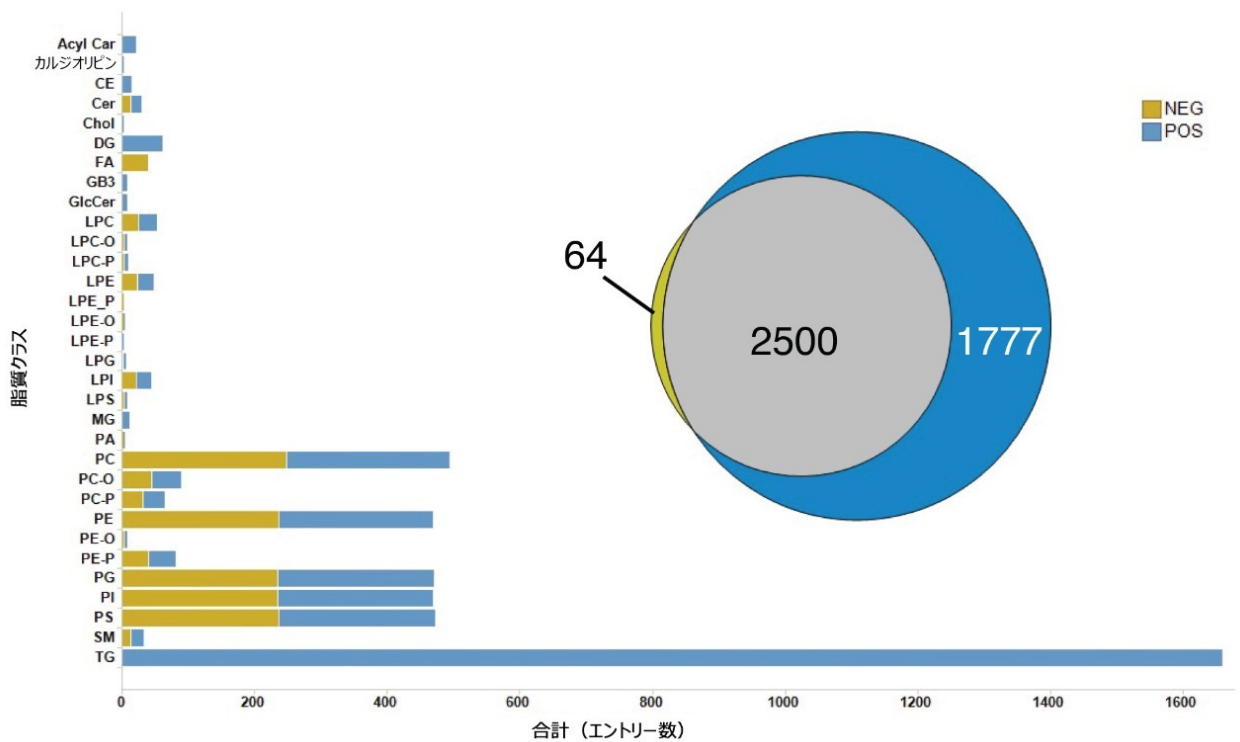


図 3. ポジティブ ESI (青色) とネガティブ ESI (黄色) の脂質ライブラリーの構成。計 3,200 のエントリーが含まれ、43% が両方のイオン化モードに共通です。

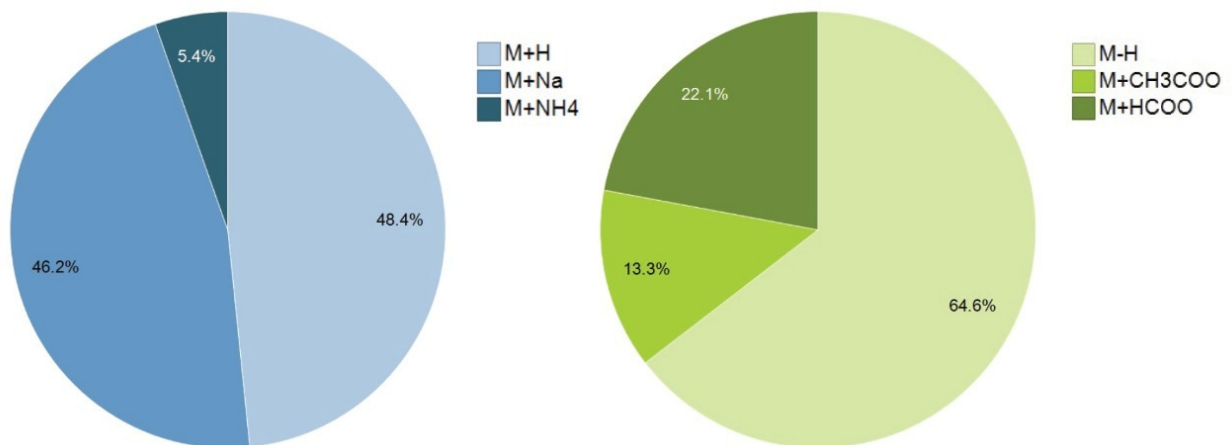


図 4. ポジティブイオン化モード (青色) とネガティブイオン化モード (緑色) のライブラリー内に示されている付加イオンの分布

ライブラリーの生成に使用したクロマトグラフィー分析法は、12 分のサイクル時間で構成されており、この分析法は、以前に大規模なリピドミクス試験で、特異的かつ頑健で、再現性が高いことが実証されています<sup>3</sup>。さらに、



この方法では、ACQUITY Premier システムのハイブリッド表面テクノロジーの利点も活用されます。このテクノロジーでは、リン酸化脂質分子種およびカルボキシル化脂質分子種の感度と回収率が、大幅に向上します（アプリケーションノート 720007092JA <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/acquity-premier-lc-technology-significantly-improves-sensitivity,-peak-shape-and-recovery-for-phosphorylated-and-carboxylate-lipids.html>>）。CCS のバリデーションに使用した 100 種の脂質標準試料に関連する保持時間の値も確認に使用し、データベースに追加しました。血漿抽出物のクロマトグラフィーの例が、実験的に測定した脂質標準試料の RT の分布とともに、図 5 に示されています。

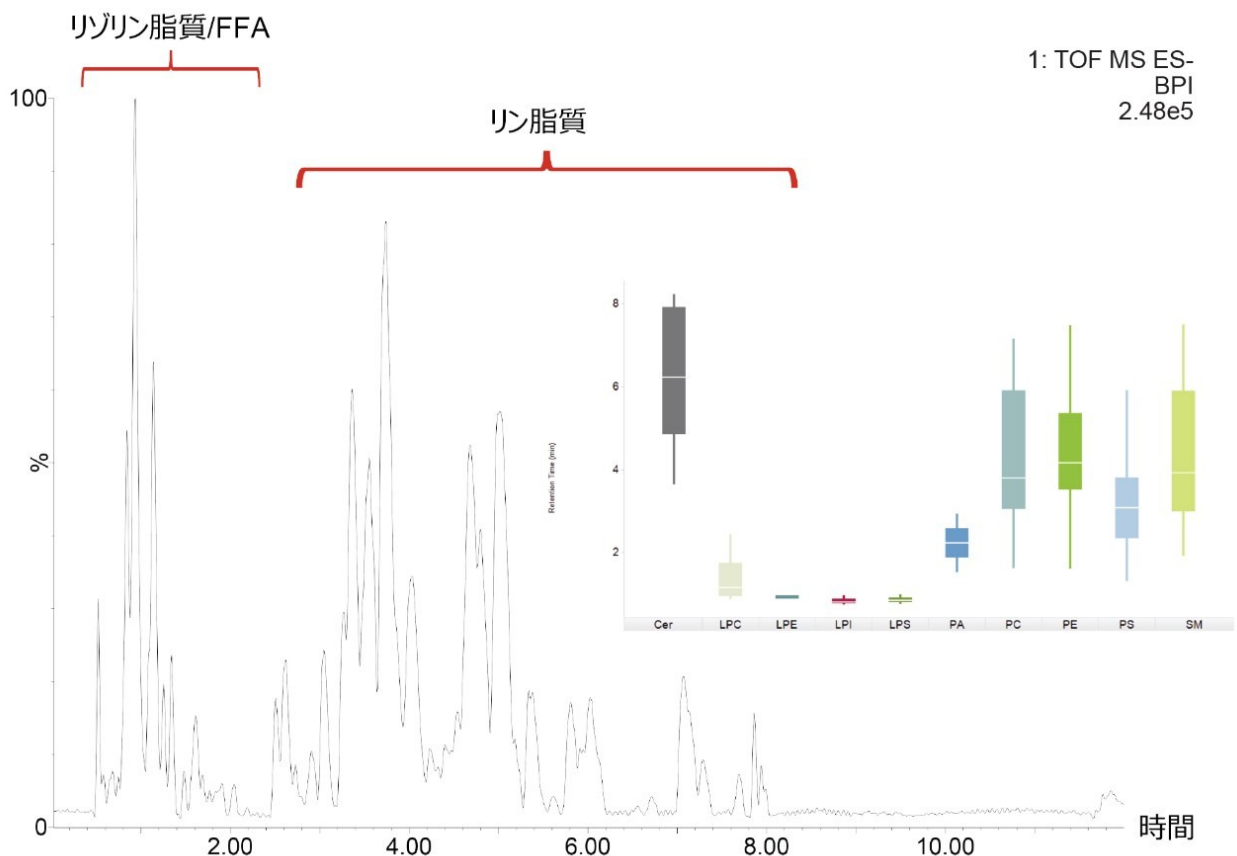


図 5. 血漿抽出物のクロマトグラム (ESI-)。さまざまな脂質グループが RT に基づいて強調されています。挿入図は、測定した多数の脂質標準試料について得られた RT の分布です。

## 最大限の柔軟性を実現する Progenesis QI および UNIFI の有用性

ライブラリーの有用性を示すために、さまざまな内因性マトリックスについてデータベース検索を行いました。ライブラリーは柔軟性が最大限になるように構築されており、Progenesis QI または UNIFI 解析ソフトウェアを用いて検索できます。図 6 に、Progenesis QI 検索を用いた内因性 TG (44:2) の同定が示されています。ウォーターズの脂質プロファイリングライブラリーの検索結果を LipidMaps の検索結果と比較すると、ウォーターズの脂質ライブラリーを使用した場合に、フラグメントイオンスコアが 42% 高く、全体的な同定スコア (CCS および MS/MS

を含む)が17%高い結果でした。同定スコアに認められたこの増加は、CCSおよびMS/MSの情報によって得られた特異性の向上によるものです。図7に、CCSを展開することが、どのようにデータベース検索後に返される多数の識別情報をフィルタリングする役に立つかが、強調されています。

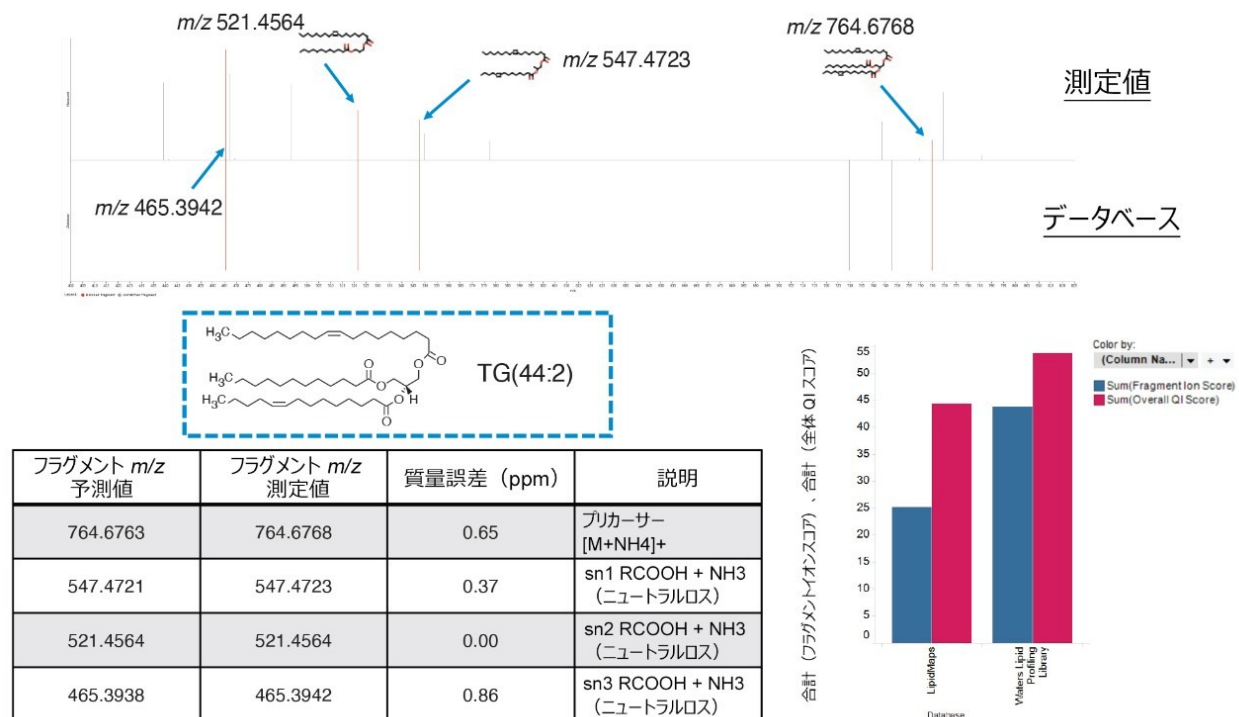


図6. ヒト血漿抽出物の Progenesis Q1 データベース検索の例。NH<sub>4</sub><sup>+</sup> が付加された TG (44:2) が示されています。ウォーターズの脂質プロファイリングライブラリーを検索するときスコア (フラグメントイオンおよび全体のスコア) が上がることが、強調されています。ミラープロットでは、実験データ (測定値) のフラグメントイオンがデータベースのフラグメントイオンと一致することが示されています。

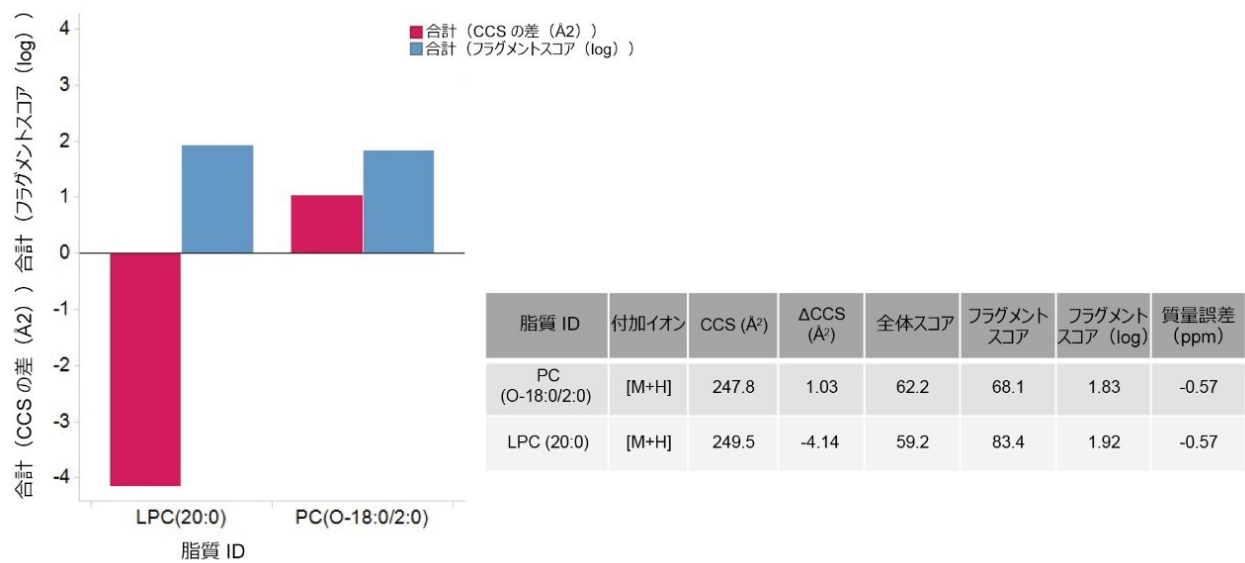
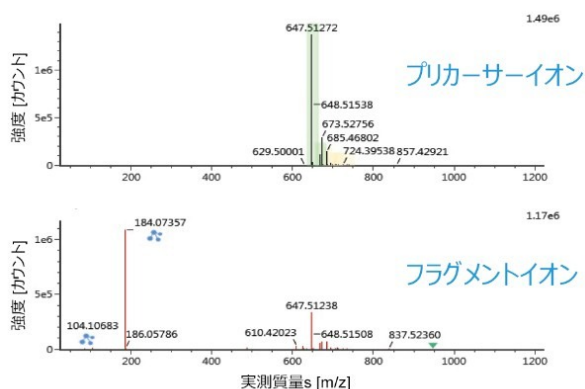


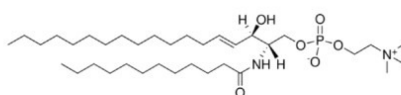
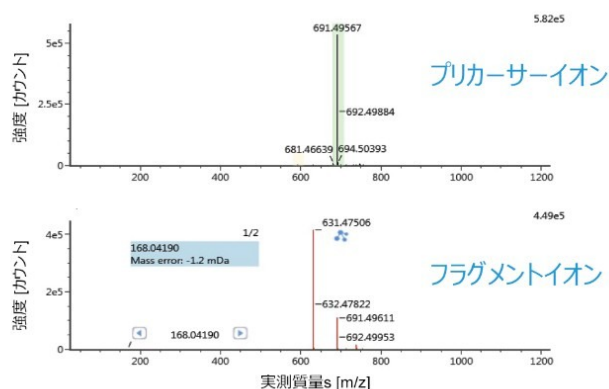
図 7. CCS に基づく多数の可能性のある識別情報のフィルタリング。この例では、データベース検索の一部として CCS を導入することが、最も信頼性の高い同定結果を強調するのに非常に有用であることが示されています。

同様に、Odd Chain LIPIDOMIX をスパイクしたヒト血漿に対応するデータを、UNIFI を使用して解析しました (図 8)。SM(d18:1/12:0) に関連する MS/MS が、陽イオンデータと陰イオンデータの両方について示されており、ライブラリーで一致したフラグメントイオンが明確にマークされています。

## ポジティブイオン



## ネガティブイオン



SM(d18:1/12:0)

図 8. ウォーターズの脂質ライブラリーに対して検索した、UNIFI 解析データ。この例では、SM(d18:1/12:0) のプリカーサーイオンおよびフラグメントイオンに対応する、陽イオンスペクトルと陰イオンスペクトルが示されています。

## 結論

- in-silico CCS 値を生成する予測アルゴリズムが、14 種の脂質クラスにわたる 100 種を超える脂質標準試料を使用して、正常にバリデーションされました。
- CCS、MS/MS、保持時間の情報を取り入れたことにより特異性が向上したことが示されており、これによって同定スコアが上がり、信頼性が高まっています。
- 生物学的関連性と抽出物からの測定値に基づく、広範囲に及ぶデータベースのキュレーション。
- このライブラリーの汎用性により、UNIFI や Progenesis Q1 のインフォマティクスで使用できます。

## 参考文献

- Paglia, G., Smith, A. J., Astarita, G. (2021) Ion Mobility Mass Spectrometry in the Omics Era : Challenges

and Opportunities for Metabolomics and Lipidomics.doi:10.1002/mas.21686.

2. Broeckling, C. D. et al. Application of Predicted Collisional Cross Section to Metabolome Databases to Probabilistically Describe the Current and Future Ion Mobility Mass Spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2021) doi:10.1021/jasms.0c00375.
3. Giorgis Isaac, Nyasha Munjoma, Lee A. Gethings, Lauren Mullin, Robert S. Plumb. A Robust and Reproducible Reversed-Phase Lipid Profiling Method for Large Sample Sets, Waters Application Note, 720006959EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/a-robust-and-reproducible-reversed-phase-lipid-profiling-method-for-large-sample-sets.html>> .
4. Giorgis Isaac, Robert S. Plumb. ACQUITY Premier LC Technology Significantly Improves Sensitivity, Peak Shape, and Recovery for Phosphorylated and Carboxylate Lipids, Waters Application Note, 720007092EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/acquity-premier-lc-technology-significantly-improves-sensitivity,-peak-shape-and-recovery-for-phosphorylated-and-carboxylate-lipids.html>> .

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

SYNAPT XS 高分解能質量分析計 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

UNIFI 代謝物構造推定アプリケーションソリューション <<https://www.waters.com/134682897>>

UNIFI 科学情報システム <<https://www.waters.com/134801648>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

Progenesis QI <<https://www.waters.com/134790652>>

720007317JA、2021年7月