

다양한 분야에서 응용가능한 LC-MS/MS Metabolomics 분석 기술

대사체학 분석(Metabolomics)은 생물학적 시스템 내에서 대사산물로 알려진 작은 분자(<1kDa)에 대한 포괄적인 연구를 하는 과학의 한 분야이다. 대사산물은 물질대사의 중간생성물 혹은 최종 산물이며 신체의 다양한 생화학적 경로에 관여한다. Metabolomics(대사체학)은 수많은 대사산물들을 체계적으로 분석할 수 있는 학문이다. 분석할 수 있는 작은 분자량의 대사산물에는 아미노산을 포함하여 당류, 지방산, 지질, 스테로이드, 유기물질 등등이 있다. 최근에는 여러 분야의 오믹스(genome, transcriptome, proteome, metabolome)를 연결하는 Multi-omics 를 통해 생물학적 연구가 진행되고 있는데 Metabolomics 도 다른 오믹스 정보와 통합하여 더 나은 이해와 종합적인 정보 제공이 가능하다 [1]. Metabolomics 는 세포, 조직, 혈액, 엑소솜과 같은 생물학적 샘플의 대사 상태와 정확한 이해를 위해 이러한 대사산물의 동정(identification) 및 정량(Quantification) 분석하는 것을 목표로 한다 [2].

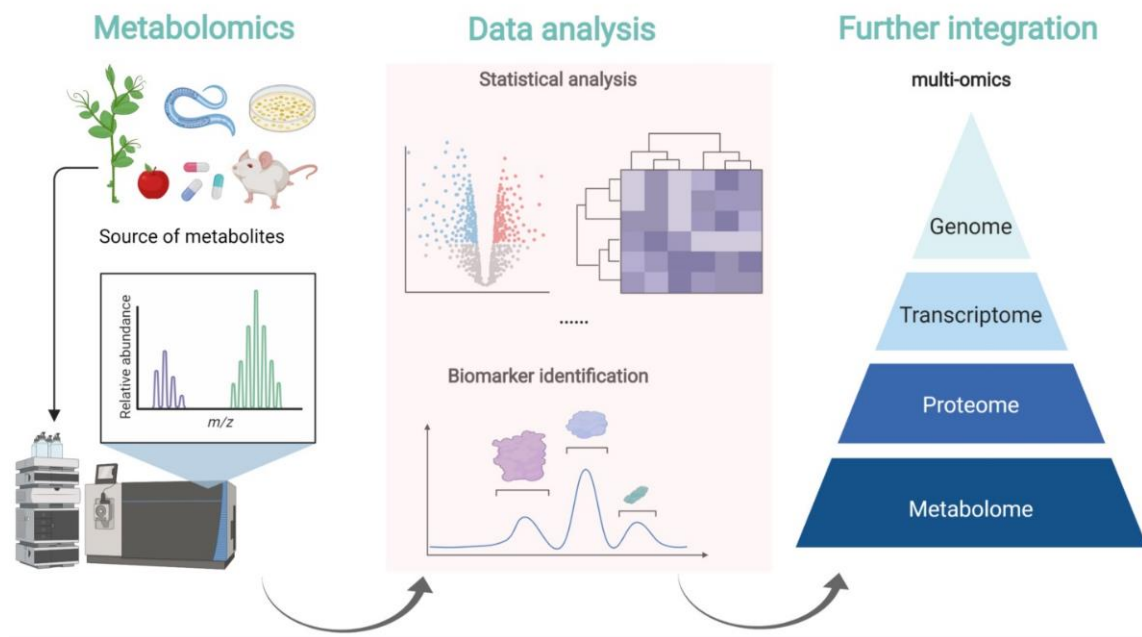


그림 1. Metabolomics 실험, 데이터분석, 멀티오믹스 통합 분석 [3]

Metabolomics 분석에 사용되는 장비로는 일반적으로 질량 분석기인 Mass Spectrometry (MS) 및 핵자기 공명(NMR) 분광법과 같은 정교한 기술이 포함되며 그 외에도 액체 크로마토그래피(Liquid Chromatography: LC), 기체 크로마토그래피(Gas Chromatography: GC), 모세관 전기 영동법(CE), supercritical-fluid 크로마토그래피(SFC)가 있다 [4]. 하지만 대사체 분석에서 MS 가 단독으로 사용되기 보다는 LC 나 GC 에 결합한 형태로 많이 쓰이고 그 중에서도 샘플의 범용성이 넓은 LC-MS 의 형태로 가장 많이 사용되어지고 있다 [1]. 다양한 조건(예: 정상군, 질병군, 치료 전후)에서 서로 다른 샘플의 대사 프로파일을 비교함으로써 연구자들은 대사 변화를 이해하고, 바이오마커를 발견하고, 신체의 기본 생화학적 과정에 대한 귀중한 정보를 얻을 수 있다. Metabolomics 는 생물 의학 연구, 약물 개발, 영양 및 정밀 의학을 포함한 다양한 분야에서 응용되고 있다 [4].

Untargeted and targeted metabolomics

Metabolomic 분석 방법에는 기본적으로 2 가지 플랫폼이 있다. 목적에 따라 “Untargeted (discovery-global)”과 “Targeted(validation-tandem)”으로 나눌 수 있다 [2]. Untargeted metabolomics 는 포괄적이고 탐구적인 접근 방식이다(discovery). 이 방식에서는 사전에 정의한 타겟 대사물질이나 검출되었으면 하는 물질을 미리 정하지 않고 해당 샘플에 존재하는 광범위한 대사산물의 global 한 프로파일링과 분석이 진행된다. 따라서 Untargeted metabolomics 는 대사 지형에 대한 광범위한 개요를 제공하며 잠재적으로 특정 생물학적 조건 또는 특정 질병과 관련이 있을 수 있는 novel 한 대사 물질을 발견할 가능성도 있다 [5].

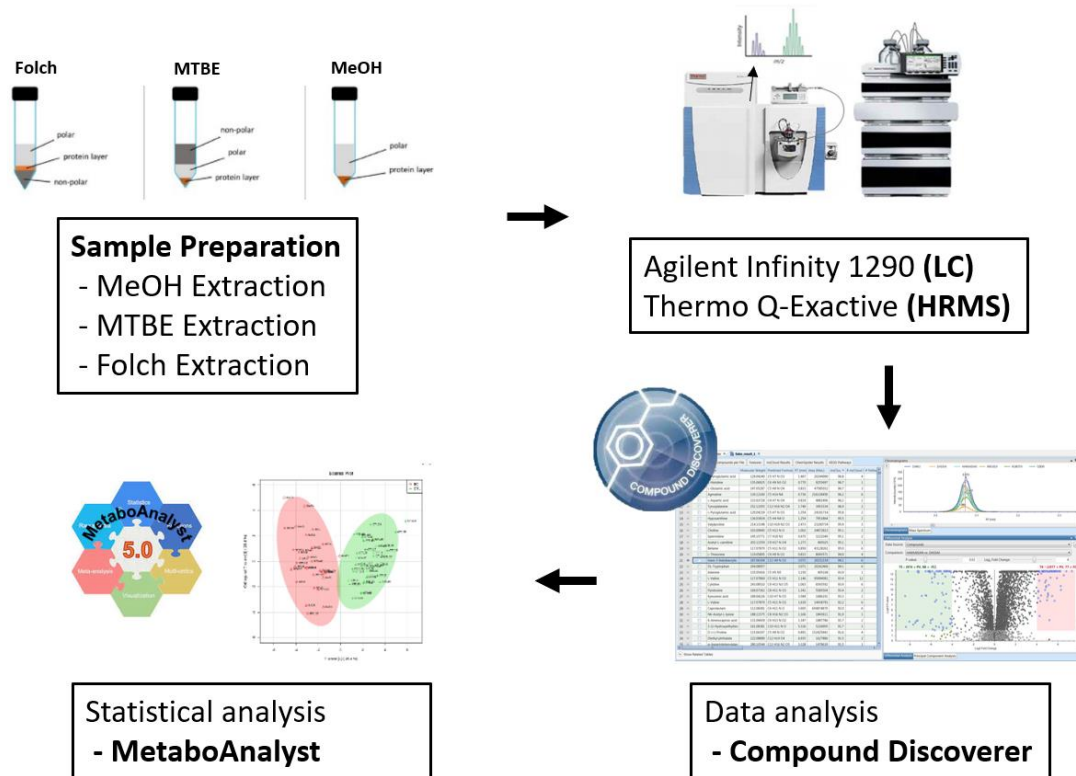


그림 2. Untargeted Metabolomics 진행 방식 [6]

반면에 Targeted Metabolomics 는 사전연구를 통해 알려진 특정 대사산물이나 대사산물 그룹들을 정량화하는 것에 중점을 두고 있다. Tandem MS 모드로 진행되며 연구하고자 하는 생물학적 signaling pathway 또는 metabolic process 를 기반으로 관심 있는 대사산물을 미리 그룹화하여 선택하고 샘플내에서 관심있는 물질의 양적 비교를 하게 된다. Targeted Metabolomics 은 종종 Untargeted Metabolomics 의 결과를 검증(validation)하기 위해 사용되거나 특정 조건 또는 유도물질 투여 시 연관 있는 대사산물과 downstream 대사산물들의 수준을 모니터링 하기위해 사용된다 [7].

	Untargeted Metabolomics	Targeted Metabolomics
특징	<ul style="list-style-type: none"> ● Broad coverage ● Hypothesis generating ● Global metabolite profiling ● Relative quantification 	<ul style="list-style-type: none"> ● Specificity ● Hypothesis driven ● Quantitative accuracy ● Absolute quantification of specific features

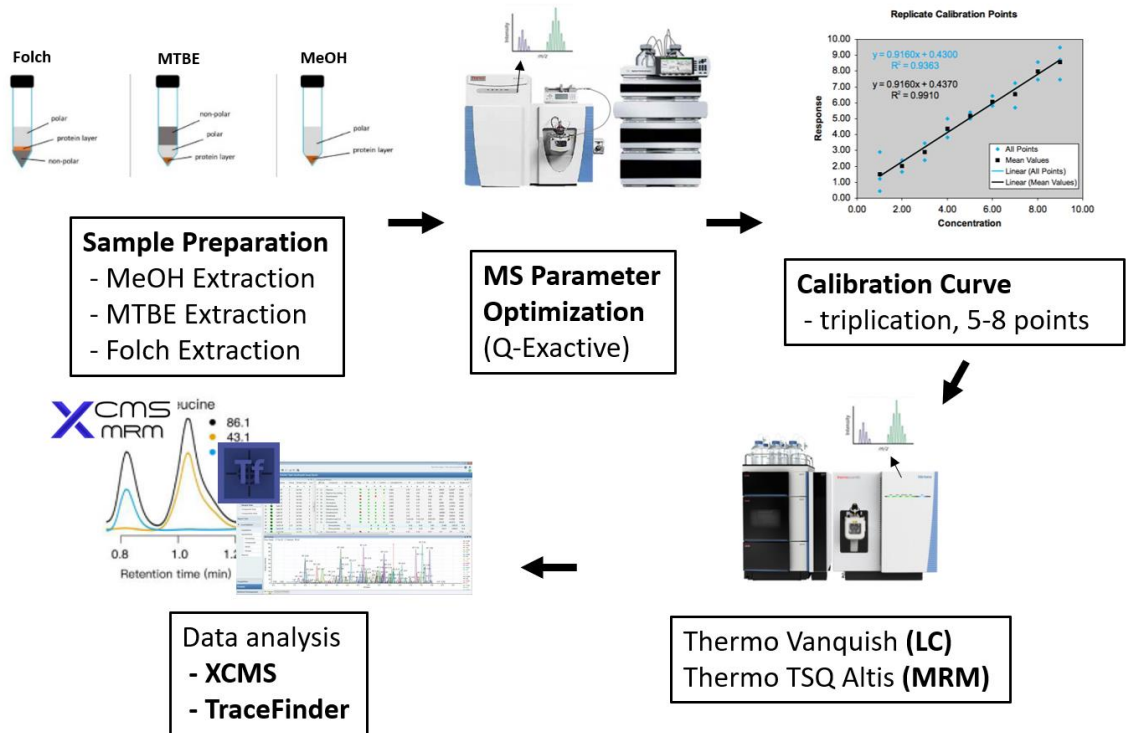


그림 3. Targeted Metabolomics 진행 방식 [6]

LC-MS based Metabolomics Workflow

LC-MS 를 Metabolomic 분석방법은 일반적으로 아래와 같이 진행된다 [2, 8].

1) Sample preparation

Metabolomics 분석은 Cell pellet, tissue, serum/plasma, body fluid, plant samples(root, leaf, extract) 등 다양한 샘플에서 수행 가능하다.

2) Sample quenching and extraction

대사적으로 active 한 샘플들은 quenching 또는 grinding 이 필요하다. Quenching 에서 중요한 것은 모든 효소 및 화학적 활동을 멈추면서 대사산물의 변화는 최소화하는 것이다. Extraction 은 methanol 을 주로 이용하고 MTBE 나 methanol-water-chloroform 의 혼합 용매인 Folch 를 사용하기도 한다.

3) Separation

추출된 대사물은 시료 준비 후 액체 크로마토그래피로 분리한다. LC 는 극성, 크기 및 소수성과 같은 물리화학적 특성에 따라 대사산물을 분리하는 데 사용된다. 주로 사용되는 방법은 Reverse phase LC 이고 C18 컬럼에서 물질을 이동상으로 흘러 분리하게 된다.

4) Ionization

LC 분리 후 용출된 대사산물은 이온화를 위하여 질량 분석기에 투입되며 70eV의 전자빔으로 이온화된 시료를 repeller를 이용하여 analyzer에 투입하고 전자기장을 통과하는 pattern을 통해 mass-to-charge(m/z) 그래프에 기초하여 분리된 대사산물을 검출한다.

5) Detection

대사산물은 Retention time(RT)과 MS signature에 따라 정성 및 정량 할 수 있게 되며 이러한 MS 장비의 종류는 Quadruple(사중극자), Time of flight(TOF), Ion trap, Orbitrap, FT-ICR 등이 있다.

6) Metabolite identification & Data analysis

대사산물 동정은 질량 스펙트럼을 데이터베이스와 비교하는 방식이나, 실제 표준과 일치하는 RT, MS/MS Fragmentation 분석 등 다양한 방법을 통해 진행할 수 있다. 이후 데이터 분석 단계에서는 처리된 데이터에 대해 통계 및 분석을 수행하여 서로 다른 샘플 그룹 간의 대사산물 차이를 분석 및 정성/정량화 한다. 이바이오젠에서는 DEM(Differentially expressed metabolites), PCA, PLS-DA, Heatmap, VIP Score, Volcano plot, pathway 등 다양한 분석자료를 제공한다 [4].

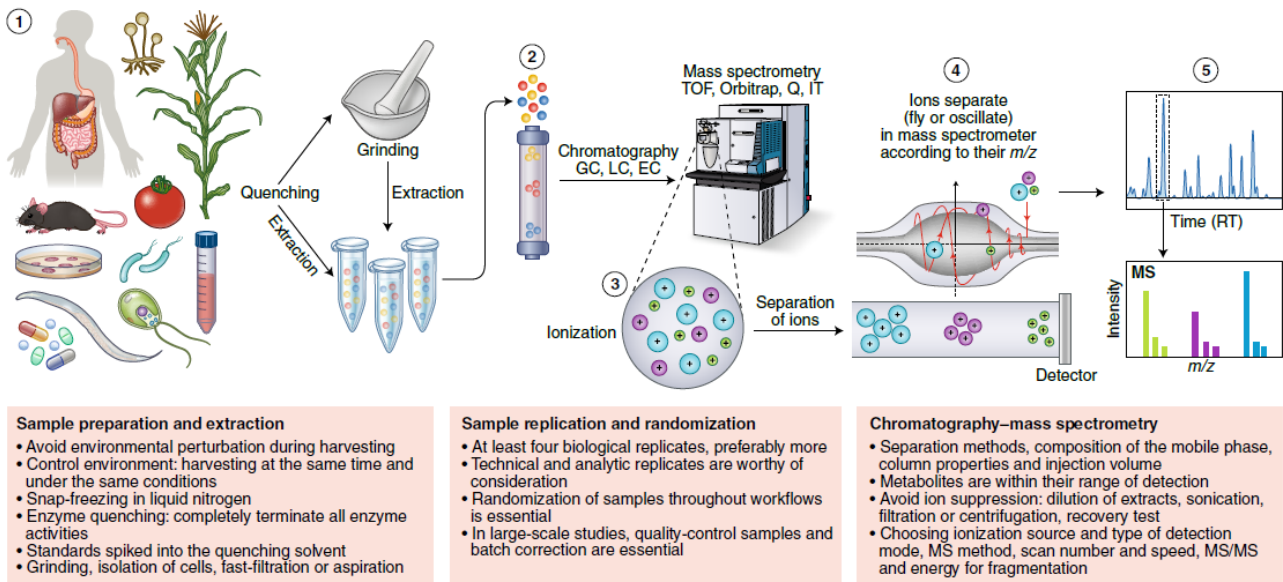


그림 4. Metabolomics workflow [8]

Metabolomics application

Metabolomics 연구는 다양한 분야에서 광범위하게 응용되고 있는데 이것은 대사산물 분석 정보가 생물학적 시스템의 대사 상태에 대한 스냅샷을 제공하기 때문이다. 그 적용으로는 새로운 바이오마커 발굴, 질병 예측, 약물, 스트레스, 생활습관, 영양학, 장내 미생물, 시스템 생물학 등에 분야에서 활용되고 있다. 특히 metabolomics 는 암, 심혈관 질환, 당뇨병, 신경퇴행성 장애, 대사 증후군을 포함한 다양한 질병과 관련된 특정 대사산물 또는 대사 패턴을 identification 할 수 있고 이러한 대사산물은 조기 진단, 질병 예후 및 치료 반응 모니터링을 위한 잠재적인 바이오마커 역할을 할 수 있다. 그리고 개개인의 Metabolomics 정보는 정밀의학

분야에서도 사용되고 있다. 개인화된 의학적 접근법을 위해 연구되고 있으며, 개인의 고유한 metabolomics profiling 은 치료 계획을 조정하고 약물 반응을 예측하는 데 사용된다. 또한 방대한 metabolome 데이터와의 관계들을 효과적으로 밝혀낼 수 있는 기술에 대한 지속적인 개발과 metabolomics 와 융합한 Multi-omics(genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics)분석을 통해 더욱 포괄적이고 체계화된 대사산물 예측을 하고 검증할 수 있다 [9].

Future potential of Metabolomics market

현재까지, *Escherichia coli* 에서 발견 예측되는 3,700 개 대사산물 중에 700 개, 효모에서 발견 예측되는 2,680 개 대사산물 중에 500 개, Human 에서 발견 예측되는 114,100 개 대사산물 중에 8,000 개, 식물계에서 발견 예측되는 3,700 개 대사산물 중에 700 개가 분석되었다고 알려져 있다 [8]. 그리고 2020 년까지 publication 되거나 citation 된 Metabolomics 관련된 논문은 지속적으로 증가하고 있으며 [10] Metabolomics 의 글로벌 시장도 계속 성장하고 있고 2032 년까지 복합 연간 성장률(CAGR)이 13.2%로 예측되고 있다 [11]. 아직도 새롭게 발굴할 대사산물이 많고 Metabolomics 추출방법, 정량법, 피크 분석법, 데이터 활용법은 계속 발전하고 있기 때문에 이러한 노력은 여러 species 의 대사물질 발견 및 비교를 용이하게 하고 Metabolomics 연구분야에 기여할 것이다.

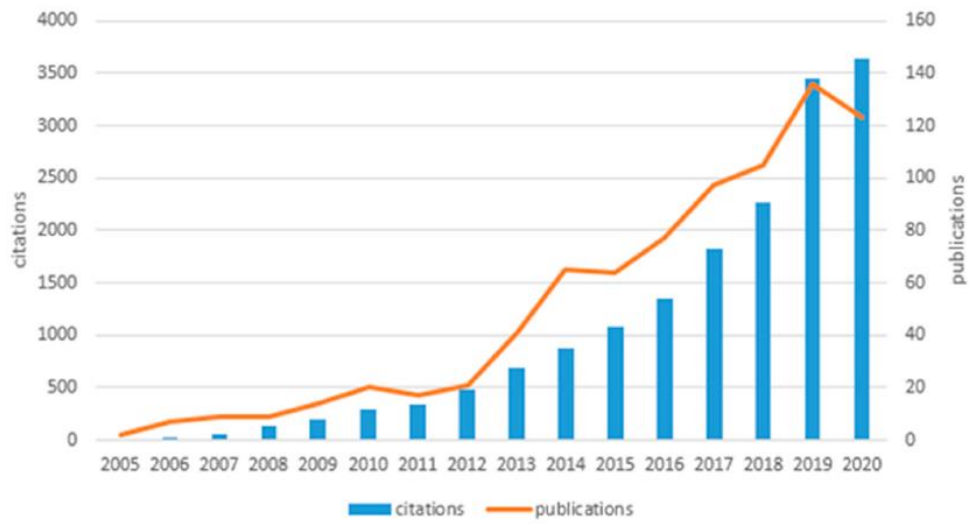


그림 5. Number of Publications about Metabolomics [10]

Publications on Metabolomics

LC-MS metabolomics 를 활용하여 연구된 최신 논문을 하나 소개하고자 한다. 이 연구는 Bladder cancer (방광암)에 대한 Untargeted metabolomics 연구로 2023 년 6 월에 발표가 되었다. 방광암은 사망과 재발 가능성이 높은 악성 종양이다. Cystoscopy 가 진단 및 환자 추적을 위한 검사로 사용되고 있고 Transurethral resection 과 림프절 절제술 등이 있으나 매년 진행하기에는 환자들에게 물리적, 비용적 부담이 가고 있다. 해당 논문에서는 환자들의 urine 샘플 검사로 진단할 수 있는 방법 규명을 위해 high resolution 의 LC-MS 장비를 이용한 metabolomics 를 연구에 적용하였다. 총 100 개의 방광암(BC) 환자 샘플과 정상 샘플(NC)을 비교하여 LC-MS metabolomic 분석을 진행하였다.

No.	Name		Formula	m/z ^a	RT [min]	VIP ^b	FC ^c	P-value	FDR	AUC	Spec. [%] ^d	Sens. [%] ^d
1	Oleamide ^{e,g,h}	Cancer versus control	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2790	5.08	1.70	3.00	2.34E-20	1.73E-18	0.953	90	89
2	Indoleacetic acid ^{e,f,g}		C ₁₀ H ₉ NO ₂	217.0974	2.02	2.08	0.15	1.14E-19	5.43E-18	0.944	90	90
3	Isostearic acid ^{e,g,h}		C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2785	0.20	1.95	0.16	1.28E-19	5.99E-18	0.944	86	89
4	N-Alpha-acetylysine ^{e,f,g}		C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	268.1056	0.14	1.96	14.89	4.17E-17	9.94E-16	0.912	80	90
5	Azelaic acid ^{e,f,g,h}		C ₉ H ₁₆ O ₄	171.1014	2.54	1.94	0.35	2.97E-16	6.01E-15	0.900	87	81
6	Indoleacetic acid ^{e,f,g}	LG versus control	C ₁₀ H ₉ NO ₂	217.0974	2.02	2.12	0.18	1.16E-13	4.19E-12	0.934	87	96
7	Isostearic acid ^{e,g,h}		C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2785	0.20	1.97	0.18	4.91E-13	1.50E-11	0.923	89	82
8	Isostearic acid ^{e,g,h}	HG versus control	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2785	0.20	1.94	0.13	1.64E-13	1.43E-11	0.967	97	87
9	Oleamide ^{e,g,h}		C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2790	5.08	1.73	4.65	2.88E-13	1.85E-11	0.962	96	87
10	Indoleacetic acid ^{e,f,g}		C ₁₀ H ₉ NO ₂	217.0974	2.02	2.12	0.12	5.02E-13	2.75E-11	0.958	96	93
11	2-Furoylglycine ^{e,f,g,h}		C ₇ H ₇ NO ₄	170.0447	1.60	2.00	0.11	7.81E-13	3.66E-11	0.954	96	87
12	Azelaic acid ^{e,f,g,h}		C ₉ H ₁₆ O ₄	171.1014	2.54	1.87	0.27	1.87E-12	7.16E-11	0.946	90	87
13	Cis,cis-Muconic acid ^{e,f,h}		C ₆ H ₆ O ₄	125.0232	1.53	1.97	0.09	3.03E-12	1.08E-10	0.942	91	87
14	Phenylglyoxylic acid ^{e,f,h}		C ₈ H ₆ O ₃	151.0386	1.85	1.89	0.18	5.16E-12	1.62E-10	0.937	96	83
15	N-Alpha-acetylysine ^{e,f,g}		C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	268.1056	0.14	1.85	15.22	1.47E-11	3.85E-10	0.928	100	80
16	Methylmalonic acid ^e		C ₄ H ₆ O ₄	119.0344	0.03	2.12	0.13	1.55E-11	3.95E-10	0.927	93	90
17	3,4-Dihydroxymandelic acid ^e		C ₈ H ₈ O ₅	226.0709	1.85	1.79	0.19	4.10E-11	8.36E-10	0.918	90	83
18	N-Acetylserotonin ^{e,f}		C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	175.1227	1.75	1.81	0.21	8.73E-11	1.57E-09	0.911	87	90
19	3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid ^e		C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.0654	1.79	1.87	0.15	1.06E-10	1.87E-09	0.909	86	87
20	Tiglylglycine ^{e,f}		C ₇ H ₁₁ NO ₃	199.1076	1.56	1.69	0.32	1.66E-10	2.74E-09	0.905	81	87

그림 6. 정상군과 비교하여 방광암 환자에서 통계적으로 유의하게 검출된 대사산물 [12]

실제로 정상군(NC)과 비교하여 방광암 환자(BC)들에서 통계적으로 유의하게 올라간 대사산물들을 분석할 수 있었고 51 개의 선정된 대사산물 중 5 개가 특히 높은 abundance(AUC)를 보였고 Low-grade BC 에서는 2 개, High-grade BC 에서는 13 개의 대사산물이 높은 AUC 를 보여 중요하다고 판단되었다 [12]. 또한 MetaboAnalyst 로 pathway analysis 를 진행하였고 그룹간 차이가 나는 4 개의 pathway 가 밝혀졌으며 enrichment analysis 에서는 2 개의 주요 pathway 가 BC 와 유의한 관련성을 보였다 (그림 7). 종합해보았을 때, 이렇게 나온 Metabolomics 데이터는 앞으로의 방광암 의심 환자에서 복잡한 치료 절차 없이 소변으로 간편한 진단 및 빠른 재발 판정에 기여할 것으로 보인다 [12].

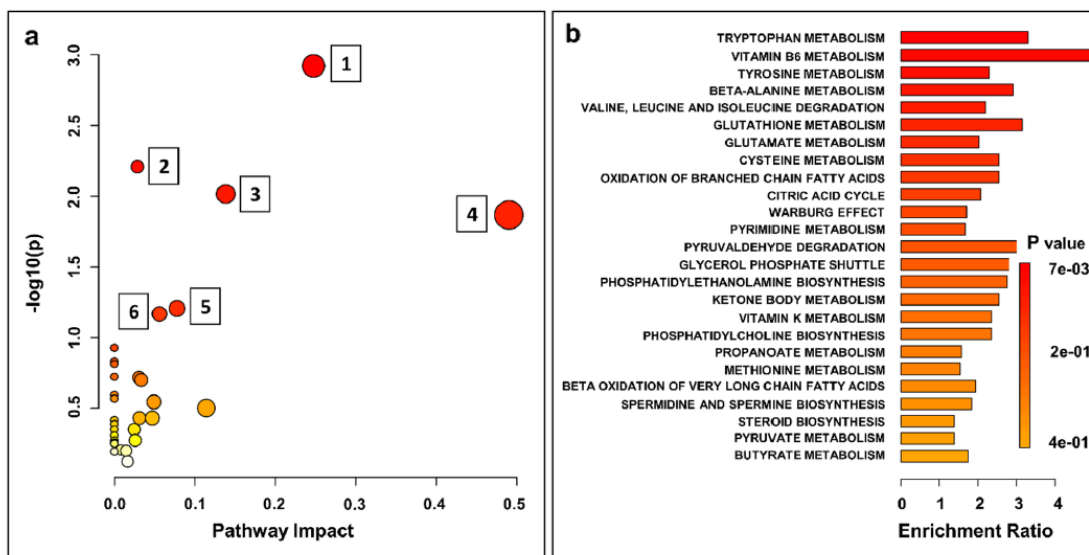


그림 7. 유의한 대사산물들의 Pathway analysis 와 Quantitative enrichment analysis [12]

E-biogen's Metabolomics Service

이바이오젠의 LC-MS Metabolomics 서비스는 여러가지 샘플 등에 존재하는 metabolite 의 동정(Identification) 및 정량(Quantification)을 목적으로 시료에 포함되어 있는 대사산물을 검출할 수 있는 서비스이다. Untargeted 방식과 Targeted 방식 모두 서비스하고 있으며 샘플 전처리부터 LC-MS 실험, 분석 및 데이터 분석까지 서비스에 포함되어 있다. Metabolomics 분석을 위해서는 3 반복 이상의 샘플이 요구되며 시료는 Cell pellet, Tissue, Serum/Plasma, Bacteria, Plant leaf/root/extract 등으로 준비, 그 외의 시료는 상담이 필요할 수 있다. 또한 Targeted metabolomics 서비스의 경우, 보고자 하는 Target metabolite 에 대한 사전 실험 디자인 검토(최적화 & 검량곡선) 및 분석 건적 상담이 요구된다.

Untargeted Metabolomics

Sample Type	Cell pellet, Tissue, Serum/Plasma, Bacteria, Plant leaf & root, etc.
Analysis Instrument	LC: Agilent 1290 MS: Thermo Q-Exactive MS (High Resolution MS)
Software	Compound Discoverer, MetaboAnalyst
Turnaround time	~ 6 weeks after sample arrival

Targeted Metabolomics

Sample Type	Cell pellet, Tissue, Serum/Plasma, Bacteria, Plant leaf & root, etc.
Analysis Instrument	LC: Thermo Vanquish MS: Thermo Q-Exactive MS & Thermo TSQ Altis (MRM)
Software	XCMS, TraceFinder
Turnaround time	8 weeks for optimization & calibration, 4 weeks for analysis

< 참고 문헌 >

1. Dudley, E., Yousef, M., Wang, Y., & Griffiths, W. J. (2010). Targeted metabolomics and mass spectrometry. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 80, 45-83.
2. Nalbantoglu, S. (2019). *Metabolomics: basic principles and strategies*. Mol. Med, 10.
3. Chen, Y., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2022). Guide to metabolomics analysis: a bioinformatics workflow. *Metabolites*, 12(4), 357.
4. Zhou, J., & Yin, Y. (2016). Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, 141(23), 6362-6373.
5. Chen L, Zhong F, Zhu J. Bridging Targeted and Untargeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics via Hybrid Approaches. *Metabolites*. 2020; 10(9):348. <https://doi.org/10.3390/metabo10090348>
6. E-biogen, 2023_LC-MS_Metabolomics_service_v1
7. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol*. 2012 Apr;Chapter 30:Unit 30.2.1-24. doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.
8. Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepois, K., D'Auria, J., Ewald, J., ... Fernie, A. R. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods*, 18(7), 747–756. doi:10.1038/s41592-021-01197-1
9. Pinu FR, Goldansaz SA, Jaine J. Translational Metabolomics: Current Challenges and Future Opportunities. *Metabolites*. 2019; 9(6):108. <https://doi.org/10.3390/metabo9060108>
10. Lv, Z., Gong, Z. G., & Xu, Y. J. (2022). Research in the field of exercise and metabolomics: A bibliometric and visual analysis. *Metabolites*, 12(6), 542.
11. <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2023/04/20/2651231/0/en/Metabolomics-Market-Size-Growing-at-13-2-CAGR-Set-to-Reach-USD-8-3-Billion-By-2032.html>
12. Nizioł, J., Ossoliński, K., Płaza-Altamer, A. et al. Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Sci Rep* 13, 9802 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36874-y>