

# メタボローム解析のための計測技術開発とそれを用いた代謝経路推定

●富田 勝<sup>1,2)</sup> ◆西岡 孝明<sup>3)</sup> ◆曾我 朋義<sup>1,2)</sup> ◆金井 昭夫<sup>1,2)</sup>

1) 慶應義塾大学 先端生命科学研究所 2) 慶應義塾大学 環境情報学部 3) 京都大学大学院 農学研究科

## ＜研究の目的と進め方＞

ゲノム解析時代には、大量の DNA 塩基配列が決定され、蓄積された。現在のポストゲノム科学時代においては、ゲノム解析された生物種について、“omics”という言葉で表される3つの階層、(mRNA とタンパク質、代謝物質) ごとに定量的に計測することによって、生命活動を理解しモデル化することが目標である。これら3つの階層を互いに関連づけて統合しているのが、代謝反応ネットワークである。したがってメタボローム解析の目的も、代謝物質の計測と代謝ネットワークの構築、という2つである。

ある生物種のゲノム解析がおこなわれると、その生物がつくりだしている mRNA とタンパク質を容易に推定することができる。また、ほとんどの生物種に共通に存在していて、十分な生化学的知識が蓄積されている1次代謝物質については、KEGG などの代謝データベースを参照することによって、ゲノムからそれらの代謝反応ネットワークや1次代謝物質を推定することができる。しかし、生物種の生命活動を特徴づけている2次代謝物質は、ほとんどのものが未知であり、それらの代謝反応ネットワークもまた未知である。

本研究課題の目的は、omics データを互いに関連付けて生命活動を理解するために必要な、2次代謝物質の同定と代謝反応ネットワークを構築することである。そのために、(1) 未知代謝物質を同定し、(2) 同定した2次代謝物質 (とその生合成中間体) から生合成代謝経路を推定する、ために必要な計測技術の開発と、バイオインフォマティクスとケモインフォマティクスを融合した新しい物質同定法の開発、が必須である。

現在のメタボローム解析では、CE や LC の移動時間と MS で測定される分子イオンの  $m/z$ 、という2つのパラメータで代謝物質を同定している。あらかじめ代謝物質を化学合成した標準化合物を用いて、この2つのパラメータを測定しておくことになる。しかし、このような標準化合物の数は限られているので、近年の高分離な LC や CE と、高感度かつ高分解能の質量分析を組合わせたメタボローム解析では、1生体試料あたり数千から数万の代謝物質が検出されるにもかかわらず、わずかに数百が同定・定量できているにすぎない。標準化合物に依存しないで、マススペクトルから未知代謝物質の化学構造式を自動的に推定するツールの開発が必須である。

標準物質がなくても、物質を特定することができれば、他の分野にも応用可能な極めて有効な未知物質の分析法となり、分析化学にとっても画期的である。我々のこれまでの研究では分析化学を細胞モデリングのためのパラメータ取得のために用いてきた。本研究ではメタボローム解析を主体とし、細胞内に存在する代謝物質の網羅的かつ総括的な解析を目的とするものである。これまでセットアップした研究環境を利用しつつ、新しい視点でデータの取得および解析が行われることになる。

## ＜2007年度の研究の当初計画＞

前年度に引き続き、未知代謝物質の特定法の開発に全力をあげる。(1) 分子イオンの  $m/z$  値からモノアイソトピック質量を精密に測定し、その質量と同位体イオンの強度比から未知代謝物質の化学組成式を決定する方法を開発する。マススペクトルの測定条件の改良だけでなく、CE-TOFMS で計測した大量のデータを高速に処理できるソフトウェアや  $m/z$  値を高精度に計算するソフトウェアの開発をおこなう。(2) 標準物質を用いて、異なるイ

オン化エネルギーで collision-induced dissociation (CID) をおこなった MS/MS スペクトルを系統的に測定する。これを解析して化学構造式と断片化イオンとの関係を収集する。

## ＜2007年度の成果＞

・データ処理の高速化と高精度化

CE-TOFMS で計測した2群間のデータから、バイオマーカの候補になり得る顕著な差を検出するメタボローム・ディファレンシャルディスプレイ (2006年度の研究成果) を改良し、大量のデータを高速に処理できるソフトウェア JDAMP を新たに開発した。従来、Mathematica のスクリプトであったプログラムを、画面 (GUI) は Java 言語、計算エンジンは C++ で実装し、ユーザが対話的に処理を進められ、結果を検索・確認しながら解析できる仕組みとした。特にデータの比較に重要なバックグラウンドとノイズの除去のプロセスに、従来6時間程度 (1計測データあたり) を要していたが、JDAMP では30分程度で処理することができるようになった。その後の時間補正、濃度の補正、結果の可視化のプロセスもそれぞれ数分程度で処理が終了できるよう高速化を測った。

また、CE-TOFMS の計測データに含まれる離散的な  $m/z$  と intensity の値から、精密質量を高精度に計算するソフトウェアも開発した。計測時に質量既知の物質を連続的に質量分析装置に導入し、質量の補正を行なってはいるが、更にバックグラウンドの歪みを3次元的に捉えてマススペクトルの歪みをソフトウェア上で補正することで、より高精度に精密質量を計算する機能を実装した。標準物質でベンチマーク試験を行ったところ、ほぼ全てのピークの  $m/z$  値を理論値から 5ppm 程度の誤差に収めることができた。更に CE-TOFMS に特異的に検出されるフラグメント、アダクト、リングング、スパイクノイズなどの特徴を調査し、検出したピークの全てにピーク間の関連付けと意味付けを自動的に施す機能を実装した。複数の計測データを同時に解析するため、JDAMP と同様、計測データ間で高精度な時間補正を行い、ピークのアライメントを行うこともできる。また、標準物質の泳動時間や分子構造からニューラル・ネットワークを用いて予測した移動時間も同時にアライメントすることで、各ピークに物質名の候補をアノテーションすることができることもできる。これらの機能の実装により、CE-TOFMS で計測したデータにどのような代謝物質が入っているのかを解析する時間を、大幅に短縮させることができた。

・基礎代謝物質の高分解能MS/MS測定

基礎代謝物質 695 について、前年度に最適化した測定条件を用いて標準化合物の QqTOF-MS による MS/MS 測定をおこなった。測定した 4510 件のマススペクトルはメタボロームのマススペクトルデータベースである MassBank に登録して公開している (<http://www.massbank.jp>)。

マススペクトルで測定したイオンの  $m/z$  値には、仮にもっと高性能な質量分析計である FT-ICR-MS などでも測定したとしても、測定誤差がつきものである。しかし、QqTOF-MS で測定した CID スペクトルに現れる全てのイオンを化学組成式で表現しておく、測定誤差を含まない理想的な CID マススペクトルが得られるはずである。そこで、各イオンの実測  $m/z$  値の代わりに化学組成式で置き換えた「誤差フリー」のマススペクトルも作成・保存しておくことにした (図1)。化学組成式で表現したマススペ

クトルは、化学構造と断片化イオンとの関係の解析を容易にし、マススペクトルの検索速度や検索精度の向上も期待できる。

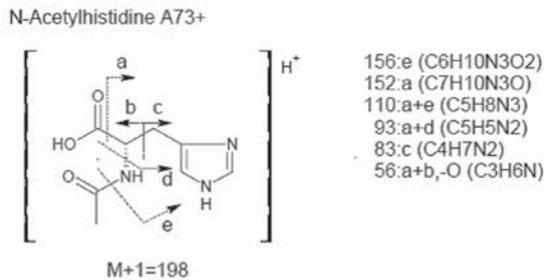


図1. 化学組成式で表した MS/MS の例

・フラグメントイオンのprecursor-product関係の測定

質量分析計の中で代謝物質を高エネルギーの窒素ガスで壊す (CID) と、分子は一度に小さな断片に粉々に壊れるのではなく、大きな断片から小さな断片へと、順番に壊れると推定される。ある分子の中で最も不安定な化学結合で先ず切断して大きな断片イオンが生成し、次にその断片イオンの中で最も不安定な化学結合が切断してさらに小さな断片イオンを生成する、を繰り返している。このように大きな断片イオン (precursor ion) から小さな断片イオン (product ion) が生成する関係、すなわち precursor-product 関係、は化学構造に特異的であるはずである。そこで、いくつかの標準化合物についてIT-MS測定をおこなった(図2)。

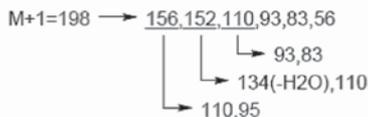


図2. IT-MS で測定した precursor-product 関係

IT-MS の測定結果は、図1 で示した MS/MS における断片化スキームを実験的に裏付けるものとなっている。

<国内外での成果の位置づけ>

CE-TOFMS で計測した大量のデータを高速に処理できるソフトウェアと  $m/z$  値を高精度に計算するソフトウェアは国内外を問わず最初である。これらはメタボローム解析のための計測技術を格段に向上させ、広く利用されることが期待される。

500 を超える代謝物質の標準化合物について、異なる CID 条件で測定した 4500 件以上の MS/MS スペクトルを公開した例は世界ではじめてである。しかも、いずれのスペクトルも極めて良質であり、本研究グループの高い測定技術を国内外にアピールした。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

LTQ オービトラップ質量分析計による測定において、同位体イオンを感度よく検出できる実験条件を見つけることが、今年度の課題の1つであった。しかし、期待されるような感度の向上は得られなかった。むしろ、今年度に開発した精密質量を高精度に計算するソフトウェアを用いると、CE-TOFMS の計測データから、同位体イオンを感度よく測定できることがわかった。

<今後の課題>

今後の課題としては、現在、1 計測データにつき 30 分程度の処理時間を要するが、処理を並列計算することにより、更に短時間に処理できるようにすることがあげられる。また、同位体イオンからの組成式の絞込みや、代謝経路とリンクした解析機能なども引き続き実装を行う。

MS/MS スペクトルから得られた断片化イオンが生成する機構や順番を実験的に裏付けるために、IT-MS で測定した precursor-product イオンの関係がとても有効であることがわかった。来年度以降も、MS/MS と IT-MS による測定を継続する。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 801291231

Hashimoto, M., Ishihama, Y., Tomita, M. and Soga, T.:

Microelectrospray interface with coaxial sheath flow for high-resolution capillary electrophoresis/mass spectrometry separation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 3579-3584(2007).

2. 801291233

Soga, T., Ishikawa, T., Igarashi, S., Sugawara, K., Kakazu, Y. and Tomita, M.: Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis mass spectrometry using silanol mask technique, *Journal of Chromatography A*, 1159, 125-133(2007).

3. 708071724

Toya, Y., Ishii, N., Hirasawa, T., Tomita, M. and Soga, T.: Direct measurement of isotopomer of intracellular metabolites using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for efficient metabolic flux analysis, *Journal of Chromatography A*, 1159, 134-141 (2007).

4. 801291234

Morohashi, M., Shimizu, K., Ohashi, Y., Abe, J., Mori, H., Tomita, M. and Soga, T.: P-BOSS: A new filtering method for treasure hunting in metabolomics, *Journal of Chromatography A*, 1159, 142-148 (2007).

5. 708081034

Ishii, N., Nakayama, Y. and Tomita, M.: Distinguishing of enzymes using metabolome data for the hybrid dynamic/static method, *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 4, 19(2007).

6. 705011903

Kinoshita, A., Nakayama, Y., Kitayama, T. and Tomita, M.: Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to the tolerance of oxidative stress, *FEBS Journal*, 274, 1449-1458 (2007).

7. 705011901

Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Hoque, A., Yee, Ho, Pei., Kakazu, Y., Sugawara, K., Igarashi, S., Harada, S., Masuda, T., Sugiyama, N., Togashi, T., Hasegawa, M., Takai, T., Yugi, K., Arakawa, K., Iwata, N., Toya, Y., Nakayama, Y., Nishioka, T., Shimizu, K., Mori, H. and Tomita, M.: Multiple high throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations, *Science*, 316, 593-597 (2007).

8. 705011904

Kinoshita, A., Tsukada, K., Soga, T., Hishiki, T., Ueno, Y., Nakayama, Y., Tomita, M. and Suematsu, M.: Roles of Hemoglobin Allosterity in Hypoxia-induced Metabolic Alterations in Erythrocytes: SIMULATION AND ITS VERIFICATION BY METABOLOME ANALYSIS, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 10731-10734(2007).

9. 801291235

Itoh, H., Naito, Y. and Tomita, M.: Simulation of developmental changes in action potentials with ventricular cell models, *Systems and Synthetic Biology*, 1, 11-23(2007).

10.708071713

Baran, R., Robert, M., Suematsu, M., Soga, T. and Tomita, M.: Visualization of three-way comparisons of omics data, *BMC Bioinformatics*, 8, 72(2007).

11.801291236

Negishi, Y., Nakamura, H., Yachie, N., Saito, R. and Tomita, M.: eXpanda: an Integrated Platform for Network Analysis and Visualization, *In silico Biology*, 7, 0013(2007).

12.705021212

Ishii, N., Suga, Y., Hagiya, A., Watanabe, H., Mori, H., Yoshino, M. and Tomita, M.: Dynamic simulation of an in vitro multi-enzyme system, *FEBS Letters*, 581, 413-420(2007).