

LC/イオントラップMSによる大腸菌メタボローム解析システムの開発

加藤 尚志, 曾我 朋義

1 はじめに

生体中で生産される代謝物質全体を網羅的に解析するメタボローム (metabolome) 研究は, ゲノム (genome), プロテオーム (proteome) に続く第三の *-ome 研究として注目を集めている。ゲノム, プロテオームにおける DNA シーケンスやマイクロアレイ技術, 二次元電気泳動から MALDI-TOF までの一連の解析技術の例を挙げるまでもなく, これらの網羅的研究分野には網羅的な分析技術が必要不可欠である。筆者らの研究グループでは, これまでに陽イオン代謝物¹⁾, 陰イオン代謝物²⁾, スクレオチド類³⁾のキャピラリー電気泳動/質量分析計 (CE/MS) によるメタボローム解析法を確立している。これらの手法により, 枯草菌メタノール抽出溶液中から 1692 種類の代謝物質を検出し, そのうち 150 種類の同定・定量分析を可能とした⁴⁾。CE/MS は, メタボローム解析法としてこれまで用いられてきた GC/MS とは異なり, 不揮発性代謝物の誘導体化などの煩雑な前処理を必要とせず, 直接生体中に含まれる代謝物の測定が可能な手法である。また, 検出器として用いる MS 部分を現在もっとも一般的な四重極 (Q) 型からイオントラップ (IT) 型, 飛行時間計測 (TOF) 型, 三連四重極 (Triple Q) 型, QqTOF ハイブリッド型などへ目的に応じて使い分けることにより, 同一の条件で定性から定量まで幅広い分析を行うことができる。しかし, CE 分離の原理上の問題から測定可能な物質はイオン性物質に限られており, 電気的に中性な非イオン性代謝物の分析は事実上不可能であった。

これに対し, 液体クロマトグラフィーを分離手段として用いる LC/MS 法では, CE/MS 法と比較すると親水性の高い化合物の分離度が低い場合があるが, 非イオン性物質の分離も可能であり, MS インターフェースとしてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) だけではなく大気圧化学イオン化 (APCI) などを用いることも可能であるなど, CE/MS の弱点を補ういくつかの利点がある。そこで筆者らは, LC/MS 法を CE/MS 法を補完する手段として位置付け, IT 型質量分析計と LC を利用した新規メタボローム解析システムを開発し, その有用性について検討を行った。また, 本法を用いた代謝物質探索用 LC/MS/MS ライブラリを作成し, 実際に大腸菌抽出溶液に含まれる脂溶性代謝物の網羅的解析への応用も行ったので, これについても紹介する。

2 MS/MS ライブラリ作成

京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターが提供する KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

データベースは, 生体中から検出された代謝関連化合物に関する巨大データベースであり, ホームページ⁵⁾上から無料で検索することが可能となっている。筆者らは, このデータベースに収録されている化合物を中心に, 定量や定性のために用いる標準物質として, 2004 年 6 月現在 1906 種類の試薬を保有している。その中から, CE/MS で測定できない電気的に中性な化合物や, 疎水性の高い化合物を中心とした 867 化合物について, LC/MS による測定を行った。質量分析計にはアジレントテクノロジー社のイオントラップ型 LC/MS (LC/MSD Trap) を使用した。インターフェースには ESI 法と APCI 法を用いた。それぞれの測定条件と検出された化合物数を表 1 に示す。この中には ESI でのみ検出される化合物も 33 化合物存在したが, 検出可能な化合物数は APCI を用いたほうが多く, 特に疎水性の高い化合物についての感度が ESI よりも高い場合が多かったため, 以降の測定はすべて APCI 法を用いて行うこととし, 検出された m/z 値と保持時間からなる LC/MS ライブラリを作成した。

次に LC/MS により検出された化合物について LC/MS/MS 測定を行った。positive ion モード, negative ion モードをあわせて, 延べ 636 化合物について LC/MS/MS 測定を行い, それぞれ 340 化合物, 239 化合物について MS/MS スペクトルを得た。さらに, これらの MS/MS スペクトルと保持時間などの情報を用いて, 装置付属のアプリケーションにより

表 1 大腸菌疎水性代謝物 LC/MS 分析条件と検出された化合物数

LC/MS 条件	
LC	
カラム	Capcellpak C8-DD 250 mm × 4.6 mm-i.d. (3 μm, 資生堂)
移動相	流速: 1.0 ml/min
グラジエント条件	A: 超純水 (Milli-Q) B: メタノール
	0~10分 B: 60%~100%
	10~40分 B: 100%
カラム温度	25°C
MS	
装置	LC/MSD Trap XCT (アジレントテクノロジー社)
イオン源	APCI (大気圧イオン化法)
	ESI (エレクトロスプレーイオン化法)
検出化合物	
APCI	
positive ion モード	481
negative ion モード	427
ESI	
positive ion モード	335
negative ion モード	205

LC/MS/MS ライブラリの構築を行った。

3 大腸菌抽出溶液測定への LC/MS/MS ライブラリの適用

CE/MS 測定では原理的に電荷を持った親水性の高い化合物しか測定できないため、大腸菌メタノール抽出液から水-メタノール-クロロホルム液液分配処理により得られた水-メタノール相のみを測定している。しかし、クロロホルム相には CE/MS では測定できない脂溶性成分が多く含まれていると考えられるため、大腸菌メタボローム解析における LC/APCI-MS 法への期待は非常に大きい。そこで、今回は CE/MS によるメタボローム測定時と同様の前処理法により得られたクロロホルム相について LC/APCI-MS/MS 法を適用すると同時に、得られた結果を標品により作成した LC/MS/MS ライブラリによる解析も試み、本法の有用性について検討した。

大腸菌からの抽出操作と前処理プロトコルを図1に示す。今回は得られたクロロホルム相を直接 LC/MS に注入し、ultraScan モードを用いて LC/MS 測定を行った。そのうち有意なピークが得られたマスクロマトグラムを図2、図3に示す。positive ion モードにおいては 57 の m/z 値において 129 個のピークが検出された。そのうち、保持時間と検出された m/z 値から 21 個のピークが LC/MS ライブラリにヒットした。同様に negative ion モードにおいては、35 の m/z 値において 54 個のピークが検出され、そのうち 7 ピークがライブラリにヒットした。

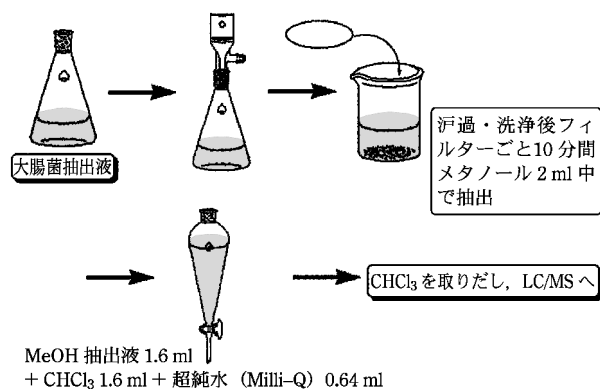


図1 大腸菌代謝物抽出、前処理プロトコル

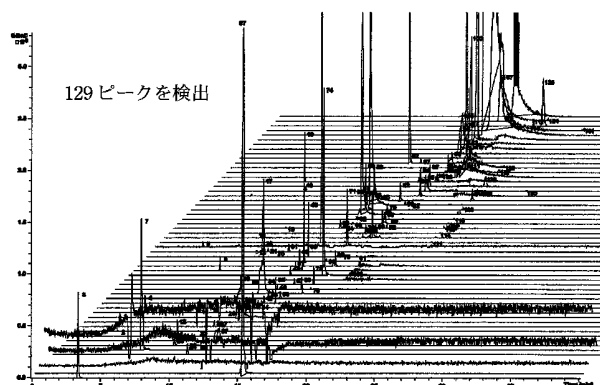


図2 大腸菌疎水性代謝物マスクロマトグラム (positive ion モード)

次に同じ抽出溶液について LC/MS/MS 測定を行った。今回は、scan 測定の結果から自動的に precursor ion を選択して MS/MS 測定を行う AutoMS/MS モードと、事前に選択された precursor ion についてのみ MS/MS 測定を行う MRM モードの二種類で測定し、それぞれによって得られた結果について比較を行った。その結果、AutoMS/MS モードでは、positive ion モードで 253 ピーク、negative ion モードでは 95 ピークが検出され、それぞれ 6 ピーク、4 ピークがライブラリにヒットした。MRM モードでは、LC/MS 測定においてピークが得られた positive ion、negative ion 合わせて、計 92 の m/z 値について測定を行った。今回用いた装置の仕様では、同時に 10 の m/z 値を precursor ion として設定することが可能であるが、監視する m/z 値が増えると各測定値の時間間隔の広がりが無視できなくなるため、今回はスループットとのバランスを考えて、監視する precursor ion を 5 個までに限定し、複数回測定を行うこととした。その結果、positive ion モードで 50 ピーク、negative ion モードで 25 ピークが検出され、それぞれ 4 ピーク、3 ピークがライブラリにヒットした。AutoMS/MS モードでは、同時に測定を行う precursor ion の数に上限があるため、同じ時間帯に強いピークが検出されるとピークが検出され

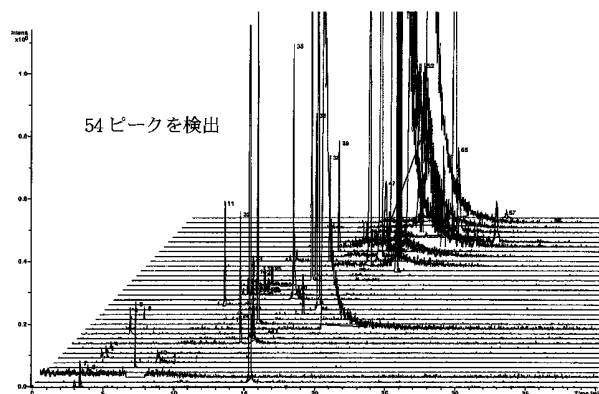


図3 大腸菌疎水性代謝物マスクロマトグラム (negative ion モード)



加藤尚志 (Hisashi Kato)

慶應義塾大学先端生命科学研究所 (〒997-0017 山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1)。東北大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了。博士 (理学)。
◀現在の研究テーマ▶生体中に含まれる低分子化合物の新規分離分析法開発。◀趣味▶読書、スポーツ観戦。
E-mail : hisashik@ttck.keio.ac.jp



曾我朋義 (Tomoyoshi Soga)

慶應義塾大学先端生命研究所 (〒997-0017 山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1)。慶應義塾大学工学部応用化学科卒。博士 (工学)。
◀現在の研究テーマ▶細胞内代謝物質の網羅的測定法および未知物質の同定法の開発。◀主な著書▶“メタボローム研究の最前線” (分担執筆) (シュブリンガー・フェアラーク東京)。
◀趣味▶美味しい魚を釣ること。
E-mail : soga@sfc.keio.ac.jp

にくくなることも予想されたが、結果的にわずかとはいえ MRM よりも多くのピークが検出された。また、LC/MS 測定では見られなかったピークも検出されており、メタボローム解析における AutoMS/MS モードの有用性が確かめられた。

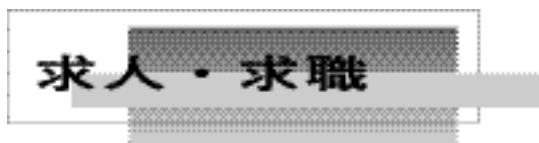
4 おわりに

本報では、LC/APCI-MS/MS 法を中心とした新規大腸菌疎水性メタボローム解析法の開発を行った。現在までのところ、検出されたピーク数に対するライブラリのヒット率は決して高いものではなく、そのヒット率を改善するためには今後より多くの脂溶性成分に関するライブラリデータの拡充が必須となることは明らかである。しかし、CE/MS 法を補完する手法とし

ては十分なポテンシャルを見せており、今後質量分析計の装置的な発展やライブラリの拡充とともに、より有用な手法として確立されていくものと期待される。

文 献

- 1) T. Soga, D. N. Heiger : *Anal. Chem.*, **72**, 1236 (2000).
- 2) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohhashi, M. Tomita, T. Nishioka : *Anal. Chem.*, **74**, 2233 (2002).
- 3) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, T. Nishioka : *Anal. Chem.*, **74**, 6224 (2002).
- 4) T. Soga, Y. Ohhashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka : *J. Proteom Res.*, **2**, 488 (2003).
- 5) <http://www.genome.ad.jp/kegg/>



求人

H 200428 慶應義塾大学先端生命科学研究so研究スタッフ募集

研究内容：生命現象を解明するためのメタボローム解析 (① CE/MS, LC/MS による細胞内代謝物質の網羅的分析法の開発, ② メタボローム解析を用いたバイオマーカーの探索, 新規創薬の開発)。応募資格：① LC, CE 等の分離分析法, 質量分析計の経験がある方, ② 学位不問。勤務地：慶應義塾大学先端生命科学研究so。待遇：応相談。着任時期：即。応募方法：① 履歴書, ② 業績リスト, ③ これまでの研究内容および志望動機 (A4 判 1 枚), ④ E-mail アドレス。書類選考合格者は面接。応募締切：定員になり次第。応募先：慶應義塾大学先端生命科学研究so 渉外担当 塩澤明子 (電話：0235-29-0534, E-mail : info@iab.keio.ac.jp)。

* * *

◇求人・求職欄掲載申し込みの手引き◇

1. 求人・求職欄掲載申込方法

E-mail (同時に FAX でも送付) で申し込むか、原稿と「5. 必要事項」を記入した用紙および原稿のフロッピーディスクを添えて本会事務局宛に郵送ください。

掲載申込締切は、毎月 25 日、翌々月の 5 日発行の本誌に掲載します。

2. 求人欄掲載料 (1 回の掲載につき)

大学・官公庁は無料、維持会員は年 3 回、特別会員は年 1 回無料です。個人会員は会員外の扱いとなります。

会 員：1~5 行まで 6,000 円, 6~10 行まで 10,000 円
会員外：1~5 行まで 12,000 円, 6~10 行まで 20,000 円
行数は最大 10 行 (1 行 32 字詰) を厳守してください。

3. 求職欄掲載料

会員に限り無料で掲載します。原稿は 3 行 (1 行 32 文字) までとし、匿名でも結構です。

4. 原稿の書き方

求人の原稿は、表題名、会社概要、職種及び募集人数、資格、待遇、勤務地、応募方法、応募先など求人者の知りたい事項を記入してください。但し、匿名は認めません。

求職の原稿は、希望職種、専攻、経験年数、学位、年齢、性別、希望給与などを記入してください。

5. 必要事項

申込者の会員番号、住所、所属、氏名、電話、FAX、掲載希望号を記入してください。

6. 応募・照会

求人に対する応募は、求人 H 番号を記して直接求人側に連絡してください。

求職に対する照会は、求職 S 番号を記して本会 事務局長に書面で 連絡してください。

7. その他

E-mail で申し込みの場合は、タイトル欄に求人 (又は求職) と題記してください (添付ファイルはお断りします)。

求人・求職 (匿名の場合) の機密は厳守します。

本会は、求人・求職の斡旋は行いません。又、求人・求職欄を利用された結果に対する責任は、一切負いません。

本欄に適さない原稿は、掲載をお断りすることがありますので、御了承ください。

8. 問合せ・E-mail 申込先

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ 305 号 社団法人日本分析化学会総務課求人・求職関係 [電話：03-3490-3351, FAX: 03-3490-3572, E-mail : shomu@jsac.or.jp]