

**3S-Ca02 GC/MS を用いたメタボロミクス研究のワークフロー**

○津川 裕司

(理研 CSRS)

hiroshi.tsugawa@riken.jp

ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) は代謝産物の抽出、分析、そしてデータ解析に至るまでのワークフローが確立されてきており、これからメタボロミクスを始めようとする研究者に推薦すべき装置の1つである。1 サンプルに要する分析時間は約 30 分であり、1 日あたり 48 サンプル分析可能である。また、同定できる代謝物数は 100-200 であり、アミン、アミノ酸、アミド、有機酸、脂肪酸、糖類などが解析対象として含まれる。逆に分析が困難な代謝物は糖リン酸、核酸、CoA 体であるため、生体の中心代謝産物を議論したい場合には不向きかもしれない。一方、味覚や嗅覚に関わる成分を多数検出できることから、食品などの官能・品質評価には最も魅力的な装置である。

代謝産物の抽出法は mix solvent と呼ばれる MeOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub> を 2.5:1:1 (v/v/v) で混合した溶液により行う。内部標準物質には様々なものが用いられているが、大阪大学福岡研究室で用いているものは Ribitol である。抽出した液体を一旦乾燥させた後、メトキシアミン及び *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) により誘導体化したものを 1  $\mu$ L 分析に供する。使用するカラムは 95:5 methyl/phenyl 組成 (30 m  $\times$  0.25 mm i.d. 0.25  $\mu$ m) のものが一般的に用いられ、少なくとも大阪大学では 80°C から 330°C までの昇温プログラム (80°C 2min hold-15°C /min-330°C 6 min hold) により化合物分離を行っている。上記方法で得られるピーク幅は 2-5 sec であるため、質量分析のスキャンスピードは 10 scans/sec 以上で行うことが推奨される。

本発表では、「化合物同定を如何に正確に行うか」を重点的にお話ししたい。現在、大阪大学福岡研究室、理化学研究所、さらには Oliver Fiehn の研究室が提供している化合物データベースなどが利用可能であるが、「どのように分析・解析すれば、うまく化合物が同定できるか？」を知らないで化合物データベースを使ってしまうと、全く同定されないという悲しい結果となってしまいます。このような事態を避けるために本発表では、これらのライブラリーを有効活用するための代謝産物の抽出・分析における注意点、並びにデータプロセッシングの方法を整理しながら紹介する。少なくとも大阪大学の化合物データベースを用いたいならば、以下の要件を満たさなければならない。

1. カラムには CP-SIL 8CB low bleed/MS (30 m  $\times$  0.25 mm i.d. 0.25  $\mu$ m, Agilent) もしくは InertCap 5MS/NP (30 m  $\times$  0.25 mm i.d. 0.25  $\mu$ m, GL Sciences) を用いる。
2. 昇温条件は上述のものを用いる。
3. 分析前に必ずアルカンミックスと呼ばれる C8-C40 のアルカンが混合されたものを測定する。
4.  $m/z$  のスキャン範囲は 85-500  $m/z$  に設定する。

上記のような条件で分析データを取得した後は、Wageningen UR の Arjen Lommen が開発したピーク検出及びピークアライメントソフトウェアである MetAlign<sup>1)</sup> と、発表者が開発した化合物同定及び多変量解析ソフトウェアである Aloutput<sup>2)</sup> を用いた所謂 MetAlign-Aloutput システムにより、代謝物テーブル (統計解析に適用可能なデータ行列) が簡単に手に入られる。

化合物同定がうまくできれば次は、単変量、及び多変量解析を用いて有意な代謝産物を見つけ出す「データマイニング」を行う。本発表では、1. 代謝産物の棒グラフ・ラインチャート一括出力法、2. 主成分分析の解釈法、3. PLS-DA の意義、及び解釈法、4. 代謝マップに投影する方法の4つを、時間が許す限り紹介する。

## 参考文献

1. A. Lommen, Anal. Chem., 81, 3079 (2009)
2. H. Tsugawa, Y. Tsujimoto, M. Arita, T. Bamba, and E. Fukusaki, BMC Bioinformatics, 12, 131, (2011)

## 参考 web

<https://sites.google.com/site/esitomonokai/>

## Practical method for GC/MS based metabolomics

○Hiroshi Tsugawa

(RIKEN CSRS)

**3S-Ca03 CE-MS を用いたメタボローム解析**○及川 彰<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup>山形大農, <sup>2)</sup>理研・CSRS)

oikawa@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

キャピラリー電気泳動 (CE; Capillary Electrophoresis) は、バッファーを充填した微細なガラスキャピラリー中に高電圧を付加することにより発生する電気浸透流を駆動力とした電気泳動を行うことによって、サンプル中の成分を荷電や形状などによって分離する手法である。メタボローム解析においては、ガスクロマトグラフィー (GC) や液体クロマトグラフィー (LC) と同様に、質量分析計 (MS) の前段の分離部として用いられている。CE-MS は、アミノ酸や有機酸、ヌクレオチド、糖リン酸、アミン類などのイオン性化合物を誘導体化することなく分離・検出することに適している。これらの化合物は、生体内では解糖系やクエン酸回路などの中心代謝やエネルギー代謝に関わっており、CE-MS を用いたメタボローム解析ではこれらの代謝物を一斉に解析することが出来る。

対象が水溶性代謝物であるため、サンプルの抽出ではメタノール/水系が用いられることが多い。また前処理では、キャピラリーにおける分離を妨害する脂質などの疎水性物質やタンパク質などの高分子物質を除くため、液液分配や限外濾過などが多く用いられている。分離に用いられるキャピラリーはフェーズドシリカキャピラリーが多いが、電気浸透流の方向を逆転させるために陽イオンをチューブ内側に露出させるような官能基を塗布したキャピラリーも用いられる。分析は陽イオンと陰イオンに分けて行われることが多いが、前者の手法がほぼ確立している一方、後者は依然として様々な手法が検討されている。分析時間は 30 分から 1 時間であることが多く、分析に必要な試料は数 nL である。

メタボローム解析では得られるデータ量が非常に多く、分析後のデータ解析がネックとなることが多い。CE-MS を用いたメタボローム解析は山形県鶴岡市にある慶應義塾大学先端生命科学研究所で主に行われているが、分析手法と同様にデータ解析についても重視しており、専門のデータ解析用ソフトウェアの開発も進めている。一方、市販されている MS にもソフトウェアがしばしば付属しているが、操作性や解析時間の点でメタボロームデータ、特に他サンプルのデータを取り扱う際には問題があることが多い。

CE-MS を用いたメタボローム解析は、その対象がエネルギー生産などに関わる中心代謝であることから、大腸菌やクラミドモナスなどの比較的代謝が単純な生物や、ガン細胞などの特定の細胞での研究が多い。一方で、分析対象に含まれるアミノ酸や有機酸は食品の風味に関わる代謝物であり、また水溶性ビタミンや機能性成分の多くは CE-MS で分離検出できるため、食品や農産物の品質チェックなどにも応用されている。

CE は GC や LC と比べるとマイナーな手法であり、世界的に見ても研究報告は上記した山形県鶴岡市から集中している。しかし、CE-MS の操作方法や得られるデータは比較的 LC-MS のそれらと似ており、LC-MS を扱った経験のある研究者であれば容易に使用することができる手法である。またメタボローム解析における応用範囲も医療から食品産業まで幅広い。今後、CE-MS を用いたメタボローム解析が多くの研究者によって利用されることを期待したい。

## Metabolomic analysis by using CE-MS

○Akira Oikawa<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup>Fac. Agric., Yamagata Univ., <sup>2)</sup>CSRS, RIKEN)