

HMT でのメタボロミクス手順

Metabolomics at HMT

メタボロミクスに限らず、物質測定を行うためには試料中に存在する物質プロファイルをできるだけ維持（保存）した状態で分析する手法を選択し、応用しなければならない。とくにメタボロミクスにおいては、様々な物性を持つ代謝物質を一斉に、かつ網羅的に測定する技術が鍵となる。加えて、個々の代謝物質の定性、定量性も維持しなければならないため、代謝物質をしっかりと分離、分析する機器分析法を確立する必要がある。また、数百以上にも及ぶ膨大な量のデータから必要な情報を効率的にピックアップする技術も欠かせない。

本章では、HMT が行うメタボロミクスについて、順序立てて説明する。

8.1 前処理

生体試料に代表される有機試料からの効率的かつ網羅的な代謝物質抽出法の開発は、CE-MS の性能を最大限に引き出すためにいくつかの必要条件を満たさなければならない。

まず、タンパク質変性等による酵素賦活化が定量性を担保する重要な要素である。HMT ではタンパク質変性用の有機溶媒として、取扱いの簡便さや普遍的なメソッドを作成するという観点から、メタノールを採用している。培養細胞または大腸菌等の *in vitro* 実験試料では、メタノール溶媒中で細胞の回収を行い、迅速に酵素活性の反応を停止させる。血液試料では、血液を直接メタノールに注入する。動物組織や植物組織等の固体試料に関しては、試料とメタノールの混合物を作成した後、ビーズショッカー等を用いて破碎処理を行いながら酵素を失活させる。

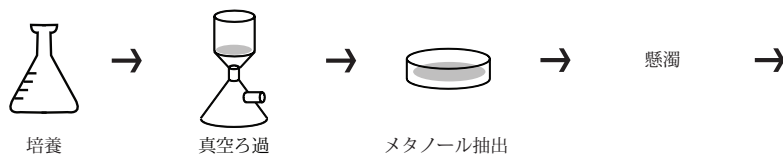


図 8.1 CE-MS 分析のための標準的な代謝物質抽出手順

次に、キャピラリー電気泳動を安定的な運用を妨害するリン脂質や他の脂質可溶性の代謝物質およびタンパク質の除去を行う。代謝物質の泳動相であるキャピラリーはシリカであり、脂質やタンパク質が吸着しやすい。これらの物質がキャピラリー内壁に吸着し泳動相としての役割が損なわれるのを防ぐため、除去する必要がある。HMT では脂溶性物質の抽出に頻用されるブライ-ダイアー法²⁴⁷を用いて、メタノール、水、クロロホルムの混合液の水相画分を取り出すことにより、水溶性の代謝物質の回収と脂質およびタンパク質の除去を行っている。続いて限外ろ過し、タンパク質を可能な限り除去する。限外ろ過は取り出した水溶性画分を濃縮し、検出感度を高める効果もある。

最終的に代謝物質は、CE による高分離を実現するために、低伝導率 (すなわち水が好ましい) の溶液で溶解する。

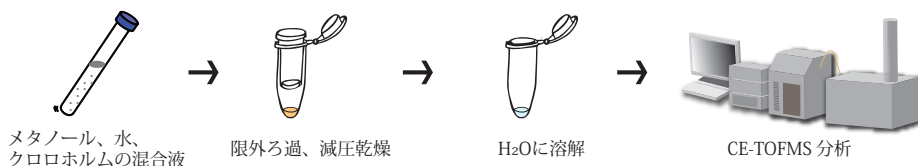
以上の要件を満たすよう開発された前処理法 (図 8.1) は、試料によらず、わずかな修正で幅広い試料に応用可能である。HMT では菌体、培養細胞、生体液、動物組織、植物組織および食物他多数の試料からの抽出プロトコルを用意している。

CE-MS に必要な試料量はサンプルの性質によるが、湿重量で 50 mg が目安となる。通常バクテリアでは $10^8 \sim 10^9$ 細胞、高等動物細胞では 2×10^6 細胞、動物組織および植物組織のでは 50 mg、生体液 (尿、血漿、脳脊髄液 (CSF)、乳など) では 50 ~ 100 μL あればメタボローム解析を行うための代謝物質を得ることができる。

8.2 測定

CE-MS 法は高分解能を有するキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis; CE) と高分解高感度検出器である質量分析計 (Mass Spectrometry; MS) を連結させて分析する手法である。CE-MS 法を用いることで、図 8.1 で示した前処理法に従って準備した検体に含まれるイオン性代謝物質の網羅的な測定が可能となった²⁴⁸。

CE-MS で試料を測定するために必要なメソッドはカチオンモードとアニオンモードの 2 メソッドのみである。イオン性代謝物質は大別して陰イオンと陽イオン、中性イオンに分かれるが、電気泳動の性質上、極性を持つイオンが測定の対象となる。カチオンモードでは主に窒素有する代謝物質が、アニオンモードでは主にカルボキシル基やリン酸基をもつ代謝



物質が検出される。アミノ酸などは分子内にアミノ基とカルボキシル基の両方の官能基を持つが、両測定モードでの測定を比較し、最適なモードを選択している。

HMT の CE-MS のカバレッジは 1300 物質に及ぶ (2011 年 11 月現在)。

8.3 データ解析

質量分析計で得られたデータは、各代謝物質固有の質量電荷比 (m/z)、泳動時間 (MT) および信号強度 (Intensity) として記録される。 m/z および MT は定性に、Intensity (検出されたピークの面積値) は定量に用いられる。各代謝物質、各試料でこれらのデータを算出し、統合することでデータ解析は完了となるが、解析対象となる代謝物質は数百を超えるため、全ての解析をマニュアル操作で行うのは非現実的である。そのため、膨大なデータを自動的に作成、解析するソフトウェアの運用は必要不可欠である。

HMT では、慶應義塾大学先端生命科学研究所が開発した MasterHands™ を用いてピークの自動積分やデータの整列 (アラインメント) 等のデータ解析を行っている。MasterHands™ の利点は、CE-QMS、CE-TOFMS に合わせて調整されていることと GUI を用いずにデータの前処理 (ピーク抽出やノイズの削除) ができることである。データは現在、最終的にマニュアルでの修正 (Curation) を必要とするが、全工程の自動化に向けて開発が進められている。

MasterHands™ により得たデータは、HMT が自社開発したソフトウェア ProNote (非売品) および G-DACSOM (非売品) により自動的に試験系に応じて修正されたのち、表やグラフとして出力される。

ProNote は主に試験条件 (試料情報、時系列情報など) や前処理条件、測定条件、解析方法 (比較対象群の選択、 t -検定の種類の選択、グラフタイプの選択等) を記録するデータベースであり、いわば司令塔にあたる。G-DACSOM はそれらの情報を元に表の作成や図の描画を行う手足となり、テキストデータや画像ファイルを作成する。これらのソフトウェアの導入により、人為的なミスの削減やハイスループットなデータ解析を実現している。

8.4 ソフトウェア

ワークフローを停滞させることなく実行、運用するためには、とくにソフトウェアの導入や開発が重要となる。HMT では随時、自動前処理装置や解析ソフトウェアを導入し、ワークフローの律速を解消してきた。また、ラボラトリー情報管理システム (LIMS) の運用により、膨大な量の試験、検体、データの管理も行っている。本項では、HMT が利用するソフトウェアについて紹介する。

8.4.1 MasterHands™

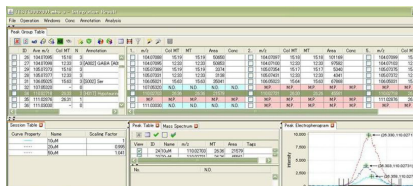


図 8.2 MasterHands™

MasterHands は、慶應義塾大学先端生命科学研究所が開発するメタボロミクス解析用ソフトウェアである。 m/z 50-1,000 のピークを網羅的に検索し、泳動時間と信号強度を自動検出する機能 (自動積分機能) を備えているのみならず、各試料で検出される代謝物質の整列 (アラインメント) や

代謝物質名を付与する機能 (アノテーション) も単独のソフトウェアで実現している。

同様の機能を持つソフトウェアはその他にも多く存在し、対応する数々のアドオンプログラムもリリースされているので、求める機能と拡張性をもとにプラットフォームを選択するのが一般的である。

8.4.2 VANTED™

VANTED™ (図 8.3) は、ライプニッツ研究所 (独) のクリスチャン・クルカス氏が中心となって開発しており、パスウェイマップの作成およびグラフのマッピングが可能で、汎用性の高非常に優れたフリーウェアである。HMT では、VANTED™ をカスタマイズして使用している。

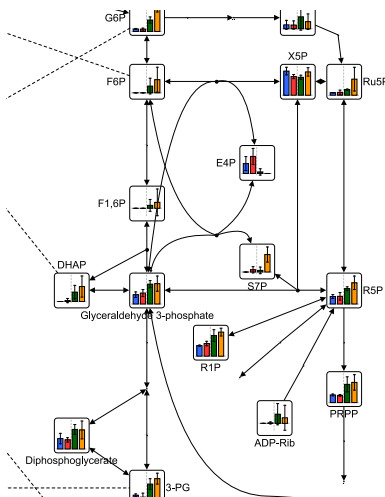


図 8.3 VANTED™

8.4.3 StatSuite™

StatSuite™ は、HMT が開発するメタボロミクスに特化した統計解析用ソフトウェアであり、解析の目的により PeakStat™ と SampleStat™ に区別される (表 8.1、表 8.2)。

8.5 未知物質同定

質量分析では、標準物質を同時に分析することで同定を行っており、当然ながら標準物質を所有していない物質は同定できない。そのため、化合物名が付与されない (アノテーションされない) ピーク (アンノウンピーク) が存在する。アンノウンピークは検出されるにも

表 8.1 StatSuite™ が備える機能

有意差検定	StatSuite™ には複数の有意差検定手法が実装されている。それらの手法は、データ (標本) の性質 (正規分布を仮定できるか、分散が等しいかなど) によって適切なものを選択しなくてはならない。PeakStat は、それらの性質を自動判別し、適切な手法を選択して有意差検定を行う機能も備えている。
階層的クラスタリング (HCA)	試料間で変動が似ている代謝物質どうしを集め、クラスタを作成する。
HeatMap	HCA の結果を HeatMap で図示する。試料間の差を視覚的に捉えたい場合に使用する。
グラフ表示	視覚的に比較解析を行えるよう、様々な実験計画に対応したグラフ表示機能を有している。折れ線グラフ、棒グラフ、BoxPlots などに対応している。
ZScore	全ての代謝化合物のデータを標準化したものをプロット表示し、試料間の代謝プロファイルと比較する。
Volcano Plots	2 群比較を行う際、比率分析や有意差検定を行うが、どちらの手法も値の絶対値により過大・過小評価することがあるため (検出下限値に近い場合など)、それら単体の手法だけでは群間差の決定的な判断は難しい。そこで、比率および t 検定の結果を二次元プロットすることで、2 群間の差が大きい代謝物質が視覚的に判断できる。
主成分分析 (PCA)	情報を 2 ~ 3 次元まで落とし、試料間での代謝プロファイル比較を容易にする。

表 8.2 PeakStat™ と SampleStat™ の機能

PeakStat™	統計的仮説検定	正規性検定, F 検定 2 群間の有意差検定 (t 検定, Mann-Whitney など) 分散分析 (ANOVA, Kruskal-Wallis)
	クラスタリング	HCA (階層的クラスタリング) HeatMap: HCA の結果描写
	グラフ表示	Box plots, Z Score plots, Volcano plots
SampleStat™	多変量解析	PCA, PLS

かわらず、代謝の中での位置づけができず、生物学的な考察に利用することはできない。

しかし、CE-MSから得られる精密質量と移動時間 (MT) の情報から、アンノウンプークの同定を試みることは可能である。

精密質量は分子式特有のものであり、精密質量を精確に測定することが出来れば精密質量から分子式を求めることができる。実際は測定結果には誤差が含まれ、誤差の分だけ精密質量から推定される分子式の候補の数は増えていくが、TOFにおける精密質量の測定誤差は約 10 ppm 以下であり、未知物質候補は数個にまで絞り込める。さらに、質量分析により得られた同位体の分布と分子式候補の同位体分布を比較することにより、分子式が決定できる。

また、検出器として TOF MS の代わりにタンデム質量分析計を使用すれば未知物質の部分構造を推定することができる。HMT では未知物質の構造推定に、CE-Q MS/TOF MS(QSTAR, AB SCIEX) システムを使用している。MS/MS スペクトルのデータベースには一般に公開されているものがあり (例えば、MassBank^{*})、実際に標品を持たなくともアンノウンプークの同定が可能である。さらに、CEにおけるMTは、泳動に用いる緩衝液が同じであれば、価数と水和イオン半径により決定される。価数と水和イオン半径は構造に依存するため、例えばMS/MSにより推定された候補未知物質のMTを予測^{251 252}することにより、さらに絞り込むことができる。

* <http://www.massbank.jp/>