

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 17 年度採択研究代表者

小田 吉哉

(エーザイ(株)シーズ研究所 主幹研究員)

「定量的メタボロミクスとプロテオミクスの融合」

1. 研究実施の概要

我々はメタボローム解析をプロテオーム解析と同じ程度まで容易にする試みから始めた。そのために高速液体クロマトグラフィー (HPLC) という安定した分析計と質量分析 (MS) を使って極性代謝物分析系の構築を開始した。これまで正の電荷を持ちうる代謝物についてはコーティングしたキャピラリーカラムを使うことによって逆相系ナノ LC/MS 分析が可能となり、ATP などリン酸含有代謝物は陰イオン交換カラムと順相系ナノ LC/MS 分析が可能となった。しかし同時にソフトウェア、前処理、感度において課題があることが明確になった。ソフトウェアについては異なる MS 装置で分析したデータの解析を可能にした MS++を開発し、自動高速バッチ処理を可能にした JobRequest を開発してウェブにて一般公開を開始した。しかし未知代謝物の自動同定システム開発については未着手であった。前処理については古くて新しい問題でもある。つまり同じサンプルでも前処理が異なれば、結果が異なる。そのため相対定量であれば大きな問題にならないであろうが、絶対定量については依然困難である。感度については哺乳類細胞中では検出限界以下の代謝物も多々あり、サンプルの前処理法の改良と合わせた取り組みが必要である。

2. 研究実施内容

細胞内にある種々の生体物質を網羅的に解析することによって生命現象を理解しようとするためには、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス、そしてこれらを統合するためのシステムバイオロジーが必要である。我々はトランスクリプトミクスについては必要な情報を得ることができるシステムを有しており、プロテオミクスについては既にトップレベルの技術基盤を構築していると自負している。これらに比べてメタボロミクス関連技術は我々の取り組みだけでなく、世界的に見ても他のオミクスに比べると技術開発が遅れている。そこで我々は極性メタボローム解析をプロテオーム解析と同じ程度まで容易にする試みから始めた。

まず極性代謝物についてアミノ酸など正電荷を帯びる代謝物と ATP などリン酸含有代謝物に分けて、分析計としてはもっとも汎用性が高い LC/MS による分析法を構築した。また感度を上げるために石橋カラムによるナノ LC カラムを使用した。正電荷代謝物の場合、逆相カラムによってもっとも良いピーク形状が得られたがカラム内径を細くするに従ってピーク形状が大幅に悪くなった。し

かしキャピラリー内壁をコーティングしてから石橋カラムを作ることでこの問題は解決した。リン酸含有代謝物については順相様のナノ LC カラムで良好なピーク形状を得ることができたが分離と試料負荷量が充分でなかった。そこで陰イオン交換カラムをオンラインで直列に使うことによってこの問題を解決できた。試料の前処理では、我々が既に開発していたピペットチップ型脱塩濃縮チップ、SPE C-tip の固相を C18, SCX, SAX など種々変えると同時に HPLC 分析で汎用されているイオンペア試薬を組み合わせることによってある程度解決できた。しかしリン酸含有代謝物分析では試料中のリン酸(H₃PO₄)が妨害物質となることが明らかとなったが、これは培養細胞の取り扱いにおいて、PBS (Phosphate Buffer Saline) の代わりに生理食塩水を使うことで解決できた。ただし細胞から代謝物を抽出する際に、培養細胞を採集して直ちにメタノール溶媒を添加する方法と、細胞を液体窒素で凍結し溶解する方法では、代謝物によって量が大幅に異なってしまった。これは細胞採集後の代謝酵素活性による影響と、メタノールによる除タンパク質と代謝物の共沈という人為的な要因によるものである。現時点では、コントロールとサンプルとを同時に処理して測定するという相対定量であれば問題は少ないであろうと思われるが絶対定量では、問題を残したままとなった。またこれまでの測定結果からヒト由来の細胞中における正電荷極性代謝物やリン酸含有代謝物はダイナミックレンジが広いと一度に検出できる数はあまり多くなかった。装置のダイナミックレンジは MS に依存しているため、検出限界以下の代謝物群については別途注入試料量を増やすか、誘導体化を行うなどの方策が必要であろう。(エーザイ:小田グループ)

現在いろいろな MS 装置が市販されていて、製造メーカーが異なれば、あるいは同じメーカーでも機種が異なれば、解析ソフトウェアが異なり互換性がない。よって MS 装置ごとに異なるソフトウェアが必要になる。また通常 MS 装置一台につきライセンスが一つであるため研究室にある複数のコンピュータで使用するためには追加ライセンスを購入しなければいけない。さらにメタボロミクスは新しい学問であり、どのようなデータを集め解析するかは未だ試行錯誤の状況である。よって新たなアイデアや改良を思いつく度に抽出すべきデータも変わる。ここで指すデータとは MS 装置から得られる m/z とその強度であり、MS/MS スペクトルならプレカーサーイオンの値、LC/MS なら溶出時間やマスクロマトグラムにおけるピーク面積などである。しかし MS メーカーが供給する既存のソフトウェアでは自分らに必要な情報を自由自在に、かつ自動で取り出し加工することができない。そこでこれらの課題を解決するために、MS 装置から得られるデータを読み込める「MS++」を開発した。現在 MS++ ではサーモフィッシャー社の LCQ/LTQ/TSQ における Xcalibur、アプライドバイオシステムズ社の Qsatr における Analyst QS、ウォーターズ・マイクロマス社の Q-TOF における MassLynx の測定データを読み込むことができ、さらにアプライドバイオシステムズ社の 4000QTRAP における Analyst 1.4 や島津製作所の LC/MS や GC/MS のデータにも対応中である。さらにプロテオミクスで提唱されている(しかし普及していない)m/zXML 形式ファイルにも対応中である。MS++ ではこれらのデータを読み込み、必要な情報を取り出せるだけでなく、独自の形式や m/zXML 形式に保存することもできる。つまり一度 MS++ 独自形式に保存さえすれば、ライセンスを気にせず自由にどのコンピュータでも解析できる。さらに MS++ ではファイルごとの独自形式の保存に加えて、指定したスペクトルごとに独自形式で保存できる。これはメタボロームデータベース構築

を意識して作成したものである。ところで MS++はプラグイン方式のソフトウェアとなっているため、研究者各自で必要な機能を追加したり、逆に不要な機能を削除したりできる。しかし MS データを自由に解析できるように作っているため、MS データ解析については手動で(一つずつ)対応しなくてはならず、自動処理には不向きなソフトウェアである。そこで我々は別途 JobRequest と称したソフトウェアを構築した。これは MS++の持つ機能をバッチ的に自動処理させる役割を持つ。例えば指定したスペクトルやファイルを一括して MS++形式に保存したり、m/z 値やピーク強度を一括してリスト化したりする作業である。また通常、一つの研究室には複数のコンピュータがあるため、これらの CPU を有効利用して、一つのジョブを複数のコンピュータに割り当てることで演算処理を高速化している。残念ながら JobRequest ではメタボロミクス用の自動同定システムを搭載していないが、プロテオミクス用として X!Tandem を搭載している。これは現在普及している検索エンジン Mascot よりも高速な同定エンジンである。メタボロミクス用としては、実際の測定データ(仮想データでも可能)に基づいた MS/MS スペクトル情報と、新たな測定によって得られた MS/MS スペクトルを照合するシステム X! Hunter を搭載する予定である。なお JobRequest はオープンソース・ソフトウェアのためユーザー自身で自由に書き換えができる。MS++および JobRequest については CREST のホームページにて公開しており、自由にダウンロードできる (<http://www.cellmetabo.jst.go.jp/ja/topics/jobrequest.html>)。 (エーザイ:小田グループ)

キャピラリー LC や CE に応用可能な新規カチオン性ポリマーコートキャピラリーの開発を行った。本コート法は、ケイ酸のシリカゲルへの重合反応を利用したもので、様々なポリマーを重合反応時に共存させておくことで、フェーズドシリカキャピラリー内壁に任意のポリマーを固定化するものである。カチオン性ポリマーであるポリブレンや DEAE デキストランを固定化したキャピラリーをメタボローム分析に応用したところ、従来法に比べ、再現性および頑健性に優れた方法を確認することができた。本成果は学会発表し、現在論文準備中である。また MS とのインターフェース部においてネブライザーガスフリーでも安定してイオン化できるインターフェースを構築し、キャピラリー分離における分離性能を向上させた。本法をメタボローム分析に応用し、今まで分離できていなかったリン酸化糖異性体の完全分離に成功した。本成果についても学会発表し、現在論文準備中である。データ解析関連ではプログラミング言語として Perl を用いたデータ解析スクリプトを数十種類開発し、LAN 経由でサーバー中のスクリプトを動作させ、データ解析の一元化、高速化するシステムを実現した。一部のスクリプトは外部にも公開した (例えば、<http://empai.iab.keio.ac.jp/>)。 (慶應大学:石濱グループ)

3. 研究実施体制

(1) 小田 吉哉「エーザイ(株)シーズ研究所」グループ

研究項目

- ・定量的メタボロミクスとプロテオミクスの融合

(2) 石濱 泰「慶応義塾大学・先端生命科学研究所」グループ

研究項目

- ・オミクス解析における質量分析計への試料導入法および質量分析計からの大規模データ解析法の開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

(慶応大学:石濱グループ)

- Ishihama, Y., Optimization of nanoLC-MS systems for proteomics, Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, *in press*.

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:1 件(CREST 研究期間累積件数:1 件)