

メタボローム解析の紹介

2016年7月6日 統合データベース講習会：AJACS安芸（広島大学医学部）

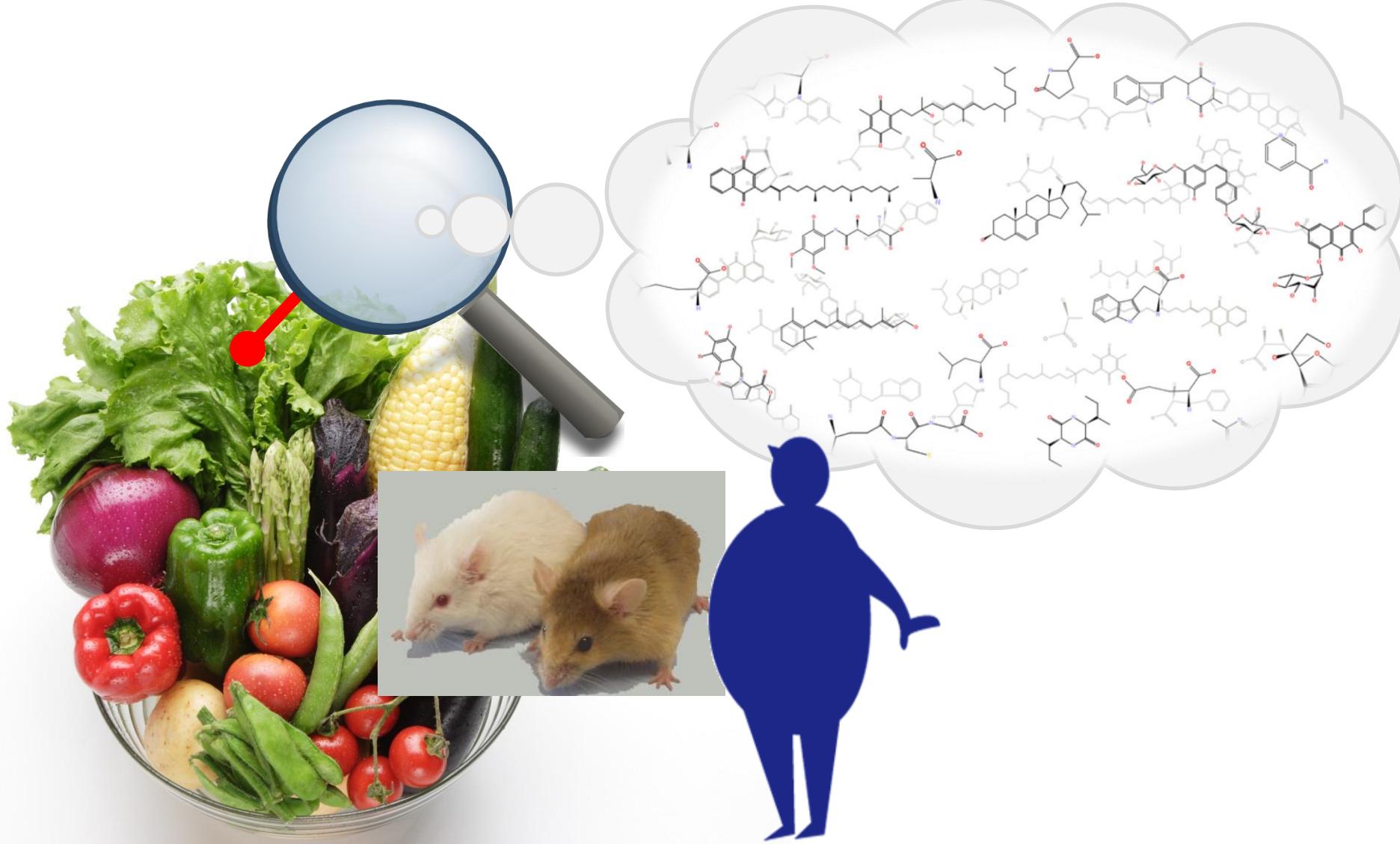


櫻井 望

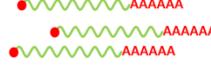
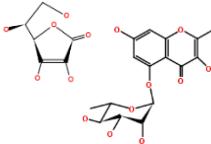
公益財団法人かずさDNA研究所
技術開発研究部
メタボロミクスチーム

メタボロミクス

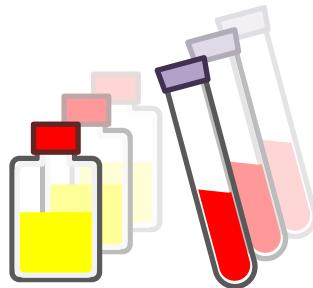
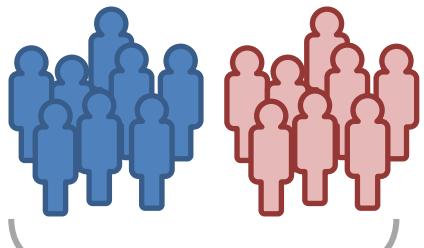
代謝産物を網羅的に検出する技術



オーム科学：全体像をとらえる研究

	構成要素	計測値	計測装置
ゲノム	 GTAACCTTA CGTTAAAGC TAGCTTGAA AACGTAGCG GATTGAT	遺伝子 塩基配列 遺伝子注釈	DNAシークエンサ
トランスクリプトーム	 AAAAAA AAAAAA	mRNA 転写量 塩基配列	DNAマイクロアレイ DNAシークエンサ
プロテオーム		タンパク質 蓄積量 アミノ酸配列	二次元電気泳動 質量分析装置 (MS)
メタボローム		代謝化合物 蓄積量 化合物注釈 組成式 構造式	質量分析装置 (MS) 核磁気共鳴 (NMR)

メタボローム解析の流れ



サンプル



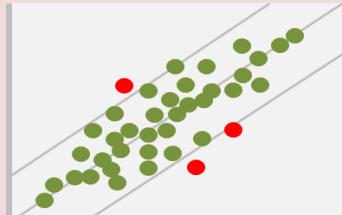
機器分析



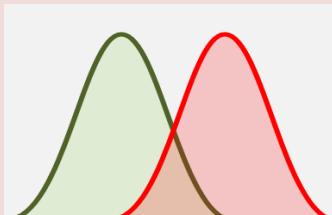
	サンプル1	サンプル2	サンプル3	...
成分 1	8325	52013	26440	
成分 2	5	35	26	
成分 3	624	3901	1339	
成分 4	5421	76548	28575	
成分 5	300	2676	276	
成分 6	559	6555	5852	
成分 7	9589	80873	29508	
成分 8	480	1145	51	
成分 9	189	3018	520	
成分 10	449	2298	714	
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

メタボロームデータ ≈ 成分表

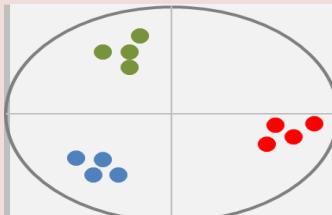
遺伝子発現解析
DNAアレイ
次世代シークエンサ
と同じ



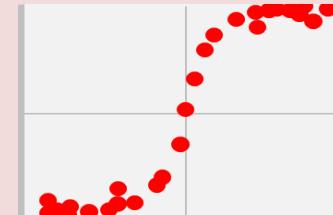
二点間比較



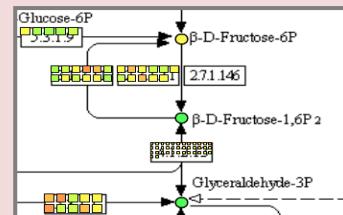
有意差検定



モデル構築

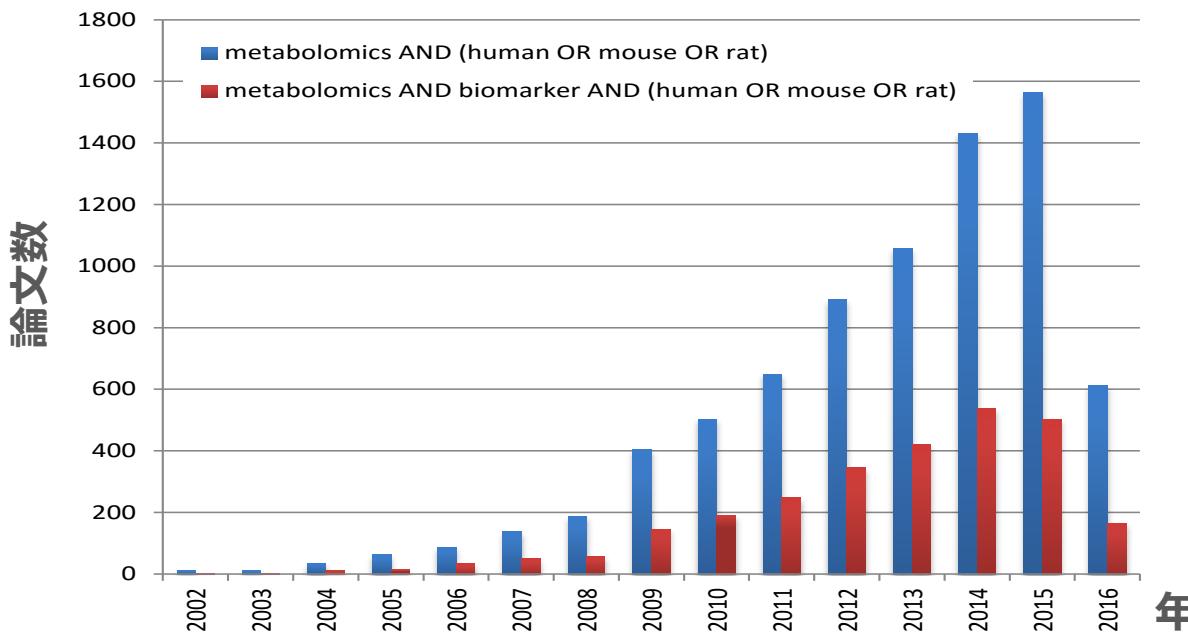


相関性解析



代謝経路解析

PubMed論文数



36%が
Biomarkerに関連

どんなバイオマーカーが知られているか？

1) www.hmdb.caにアクセス
(またはGoogleで「hmdb」を検索)

2) Search欄に「marker」とタイプして検索



ご要望

全般的なこと

- サンプルの種類・解析法の種類・データ解析法
- どういったサンプルから何を見ることができて、どういう解釈にたどり着けるのか、具体的に。
- これから始めるに当たって、設備や費用

個別

- 化合物の帰属に使えるデータベース (MassBank等)

題材

- ヒト・マウス等で疾患に関係が深いもの
- 肝疾患について
- 肝臓がんのメタボローム解析の解釈

本日の内容

メタボロームの基礎知識

- 分析装置の種類と特性
化合物の多様性
質量分析装置の原理
- 化合物の同定方法

手作業による解析例

- 尿のデータを使って

実習

- 化合物データベース検索
- MS/MS検索

付録資料

- 役立つデータベース・ツール・サービス

オーム科学：全体像をとらえる研究



分析装置の種類と特性

化合物の多様性に対応するために

メタボロームの基礎知識

- 分析装置の種類と特性
化合物の多様性
質量分析装置の原理
- 化合物の同定方法

手作業による解析例

- 尿のデータを使って

実習

- 化合物データベース検索
- MS/MS検索

付録資料

- 役立つデータベース・ツール・サービス

化合物の数

一般の化合物データベース

※2015年8月現在

KEGG	16,684
KNAPSAck	50,899
UNPD	229,358
DNP	272,415
PubChem	60,774,309
CAS	101,526,536

主に植物

天然物

天然物

人工物等も

人工物等も

植物界全体の見積もり

～20万

Strack D & Dixon R (2003)

～100万

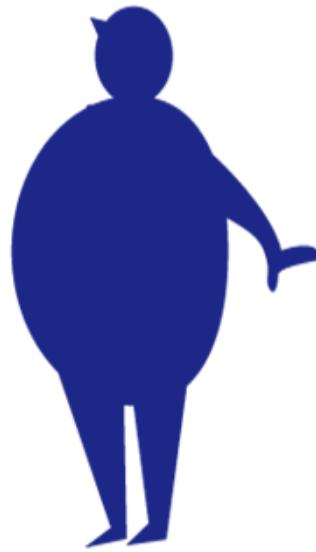
Afendi FM et al (2012)

ヒトの代謝物データベース



	全体	血液	尿
41,993	4,549	4,056	
Detected	3,821	2,273	1,741
Expected	38,172	2,276	2,315

ヒトのメタボローム



ゲノム

環境
(食べ物・腸内細菌)



表現型
(ヒトメタボローム)

主に使われる検出装置

質量分析計 (MS)

- 【利点】
- 高感度
 - 他の成分分離装置（クロマトグラフィー）などと接続可能
 - 部分開裂情報（MS/MSフラグメンション）が分かる
- 【欠点】
- 立体構造を決定することはできない
 - 抽出操作が必要



LCQ (Thermo Fisher)

核磁気共鳴 (NMR)

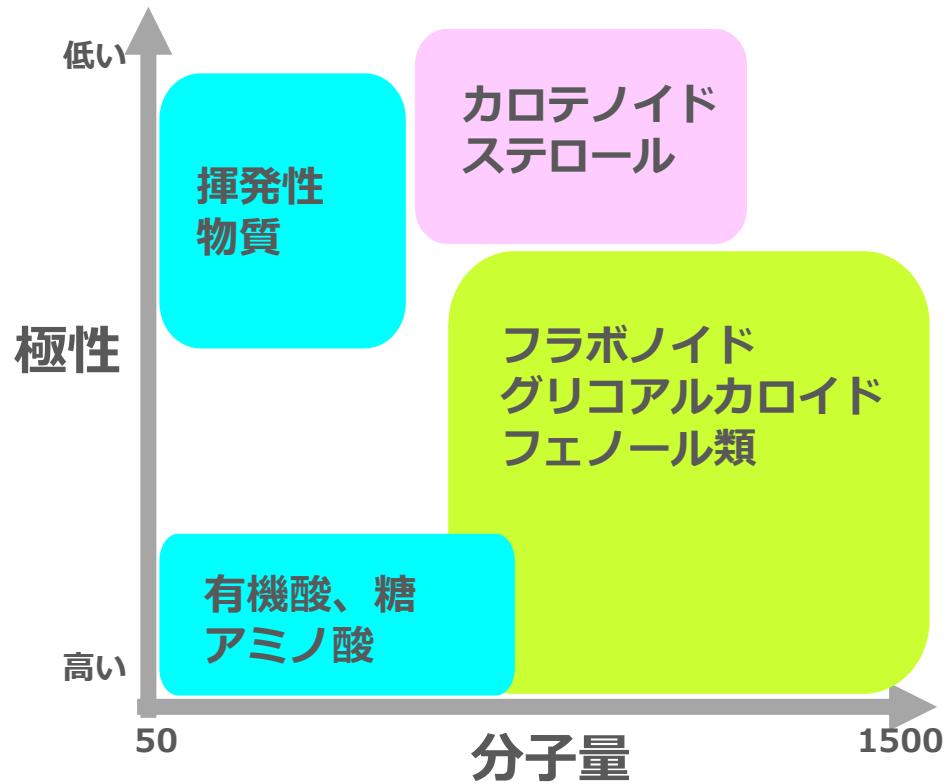
- 【利点】
- 化合物の立体構造を知ることができる
 - 抽出操作が省ける（リアルタイムで経時的变化を知ることができる）
- 【欠点】
- MSと比較して感度が低い（微量成分のシグナルは見えにくい）



http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/taiken/taiken_damr.htmlより

化学的性質の多様性

- 幅広い性質



- 幅広い存在量

適切な抽出や、場合によっては濃縮が必要
1分析で全ての代謝物を測定するのは不可能

分析装置の特性



クロマトグラフィー

質量分析装置

二次代謝産物
一次代謝産物

揮発性物質
一次代謝産物

LC/MS (液体クロマトグラフィー-質量分析)

- ・糖質
- ・ホルモン
- ・カロティノイド
- ・ポリフェノール
- ・アルカロイド
- ・テルペノイド
- ・水溶/脂溶性ビタミン
- ・色素
- ・抗生素質
- etc

(キャピラリー電気泳動-質量分析) CE/MS

- ・アミン
- ・糖リン酸
- ・糖ヌクレオチド
- ・ヌクレオチド
- ・ヌクレオシド
- ・ニコチンアミド補酵素
- etc

揮発性有機化合物全般

- ・炭化水素
- ・脂質
- ・ケトン系
- ・アルコール
- ・ラクトン
- ・芳香族
- ・エステル系
- ・テルペン類
- ・脂肪酸
- etc

GC/MS (ガスクロマトグラフィー-質量分析)

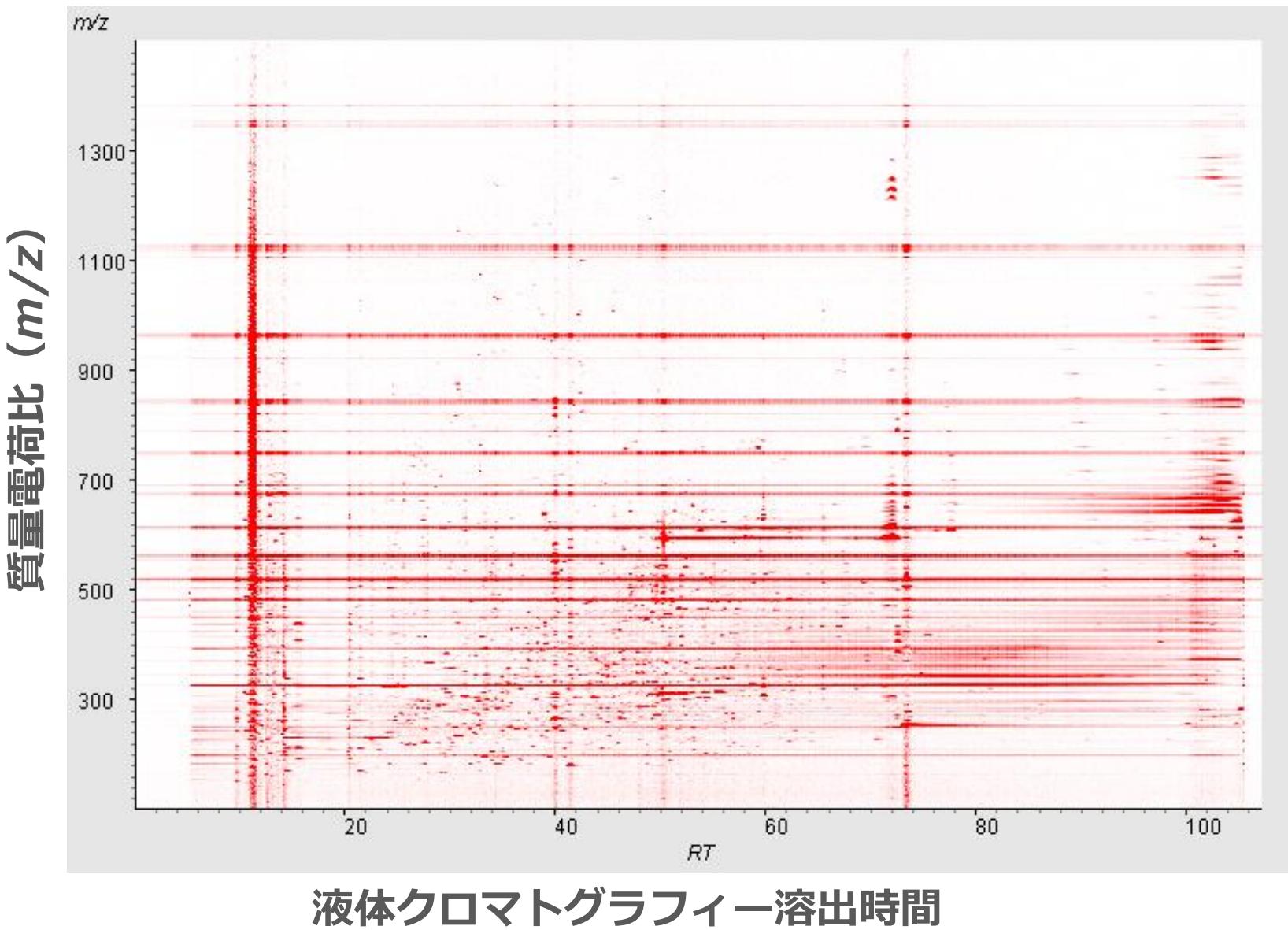
低極性

高極性

Agilent Technologiesのホームページより
GC/MSとLC/MSとCE-MSに適した測定対象の例

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002393>

尿の分析例 (LC-MS)



小まとめ

化合物には大きな多様性がある

- 検出したい物質によって、使用する装置や条件設定が異なる
- 適宜、抽出・濃縮が必要
- 異なる分析技術を組み合わせる必要性

質量分析装置の原理

イオン化
GC-MSのデータと
LC-MSやCE-MSデータの違い

フラグメント化
(構造を知る手がかり)

メタボロームの基礎知識

- 分析装置の種類と特性
化合物の多様性
質量分析装置の原理
- 化合物の同定方法

手作業による解析例

- 尿のデータを使って

実習

- 化合物データベース検索
- MS/MS検索

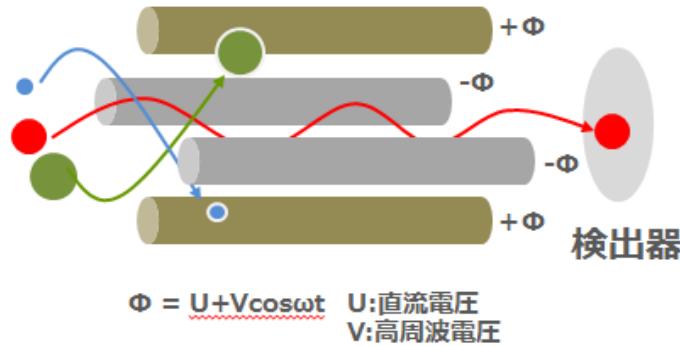
付録資料

- 役立つデータベース・ツール・サービス

質量分析の原理 – 荷電粒子の運動性を利用

四重極型 (Q)

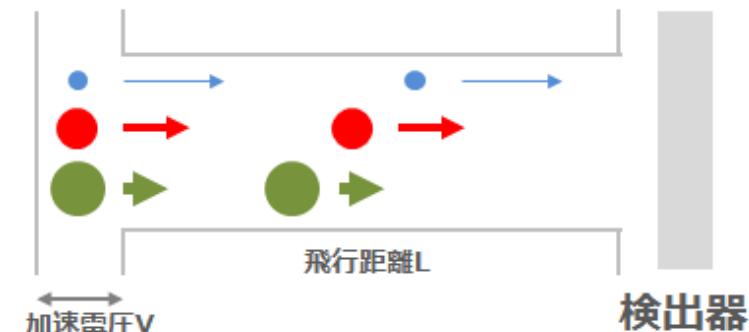
重さが釣り合う分子だけが検出器に到達する



飛行時間型(TOF)

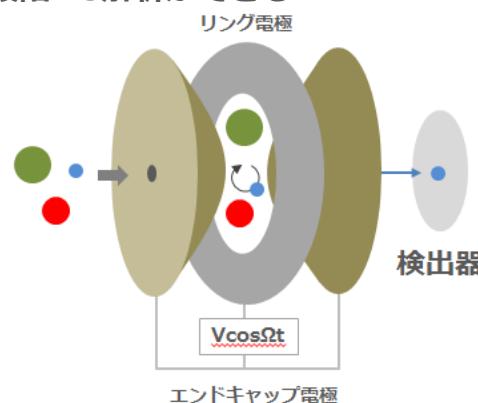
軽い分子ほど早く飛ぶ

スキャンが高速。分子量に上限がない



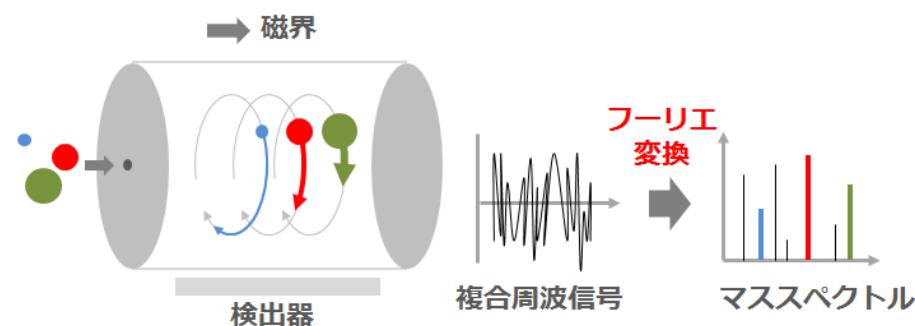
イオントラップ型 (IT)

重さが釣り合わなくなったものが検出される
多段階MS解析ができる



フーリエ変換型 (FT)

軽い分子ほど早く回転する
超精密質量が得られる



分子は荷電粒子（イオン）として検出される 単位：質量電荷比 (m/z)

イオン化



ハードイオン化法

- 電子イオン化 (EI)

GC-MS

ソフトイオン化法

- エレクトロスプレーイオン化 (ESI)
- 大気圧化学イオン化 (APCI)
- マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) タンパク質向け

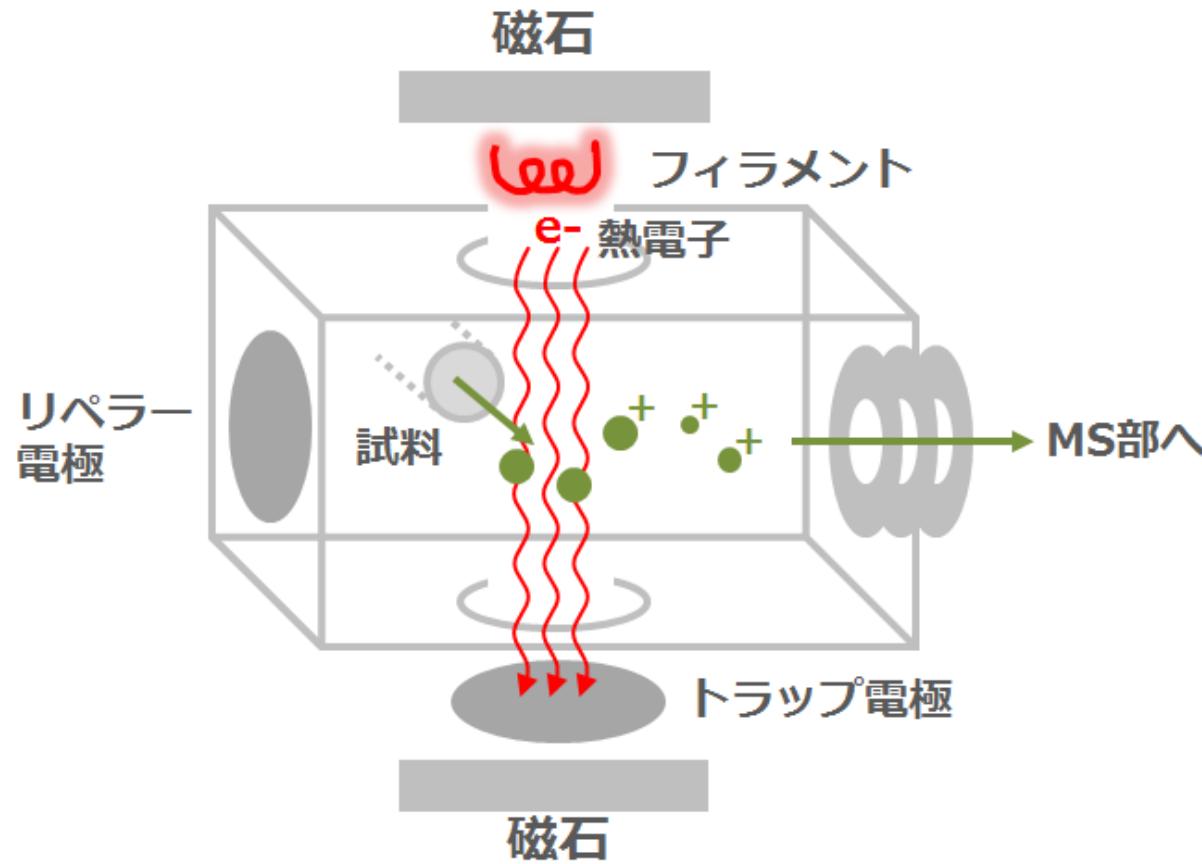
アンビエントイオン化 (紙幣の表面など、身のまわりのものを直接分析する)

- 脱離エレクトロスプレーイオン化 (DESI)
- リアルタイム直接分析 (DART) などなど

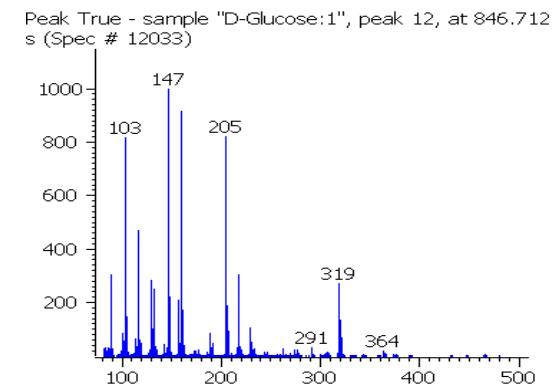
※イオン化のされやすさは、化合物の種類や設定条件によって異なる。

検出強度は絶対量 (mol数) を表すものではない。化合物間で存在量を直接比較できない。

電子イオン化： Electron Ionization (EI)



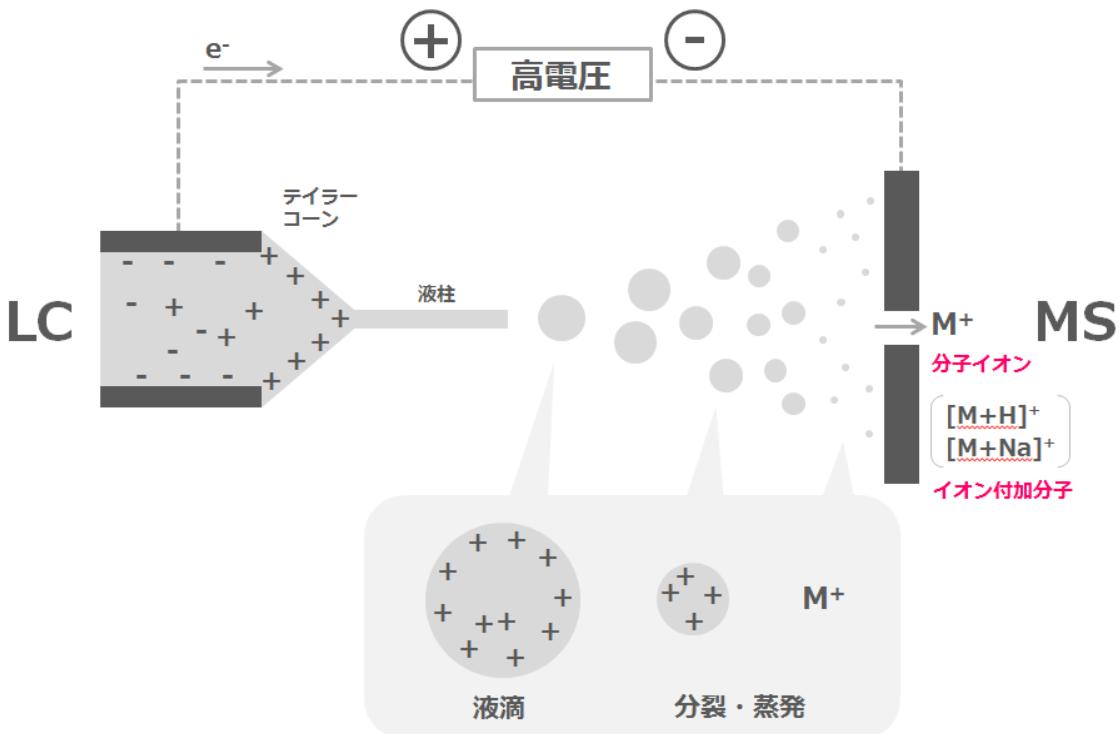
GC-MS



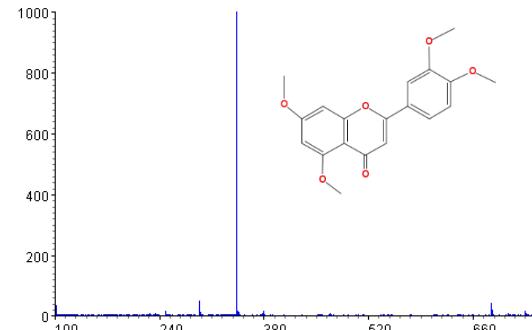
EIでのマススペクトル

- GC-MSで使われる
- イオン化と同時に**フラグメント化**が起こる（ハードイオン化法）
→ 元の分子の質量がわからない
- 装置によらず、化合物特有のフラグメントが生成しやすい

エレクトロスプレーイオン化: Electrospray Ionization (ESI)



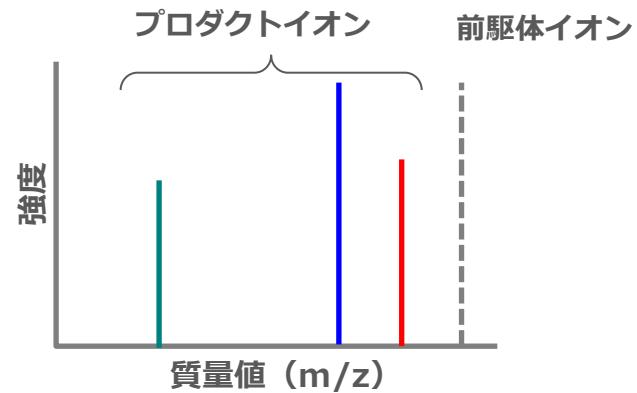
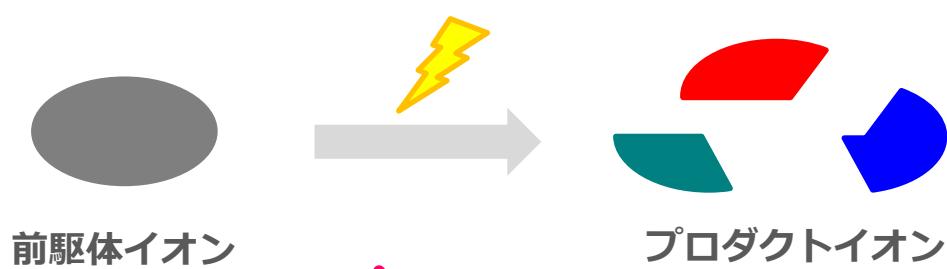
Luteolin tetramethyl ether



ESIでのマススペクトル

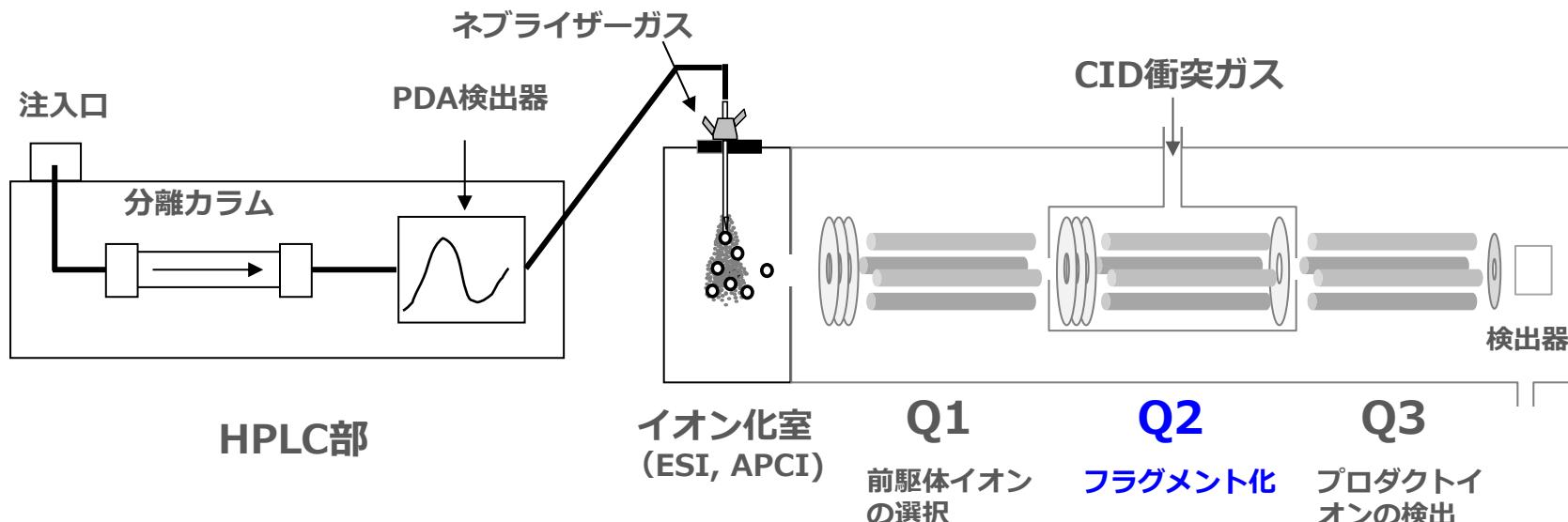
- LC-MS, CE-MSで使われる
- 分子があまりフラグメント化されずに検出される（ソフトイオン化法）
→ 元の分子の質量がわかる
- イオン付加分子（アダクト）が検出される
- 陽イオン検出（Positive）と陰イオン検出（Negative）がある
- 共溶出物がイオン化を妨げる場合がある（イオンサプレッション）

フラグメント化

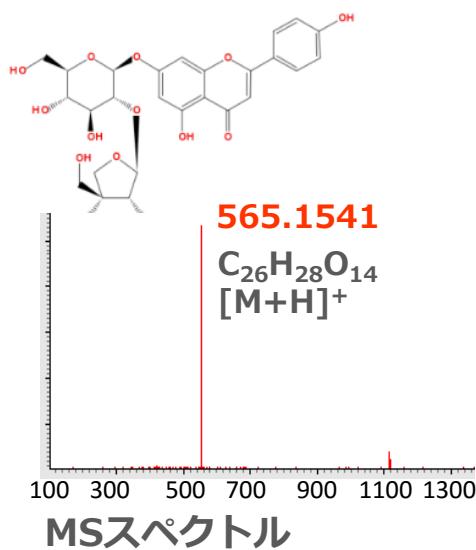


- 热電子との相互作用
 - 電子イオン化
- 不活性ガスとの衝突
 - 衝突誘起解離 Collision-induced dissociation (CID)
 - 高エネルギーCID (HCD)

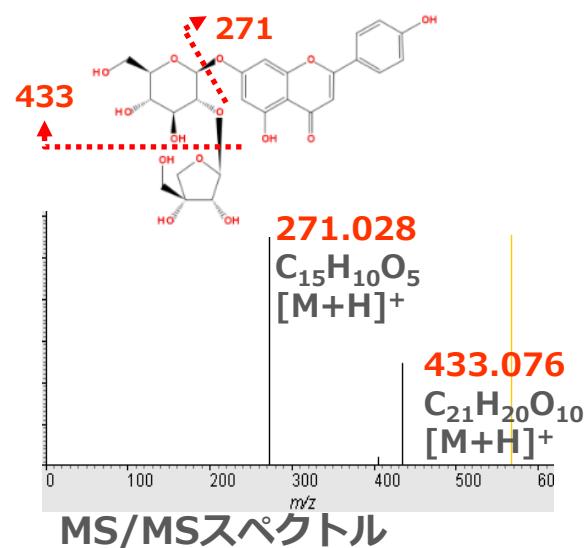
LC-MSにおけるMS/MS解析



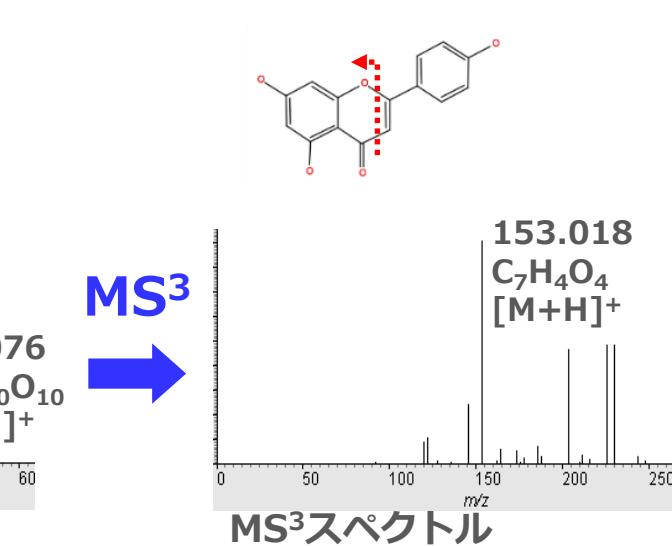
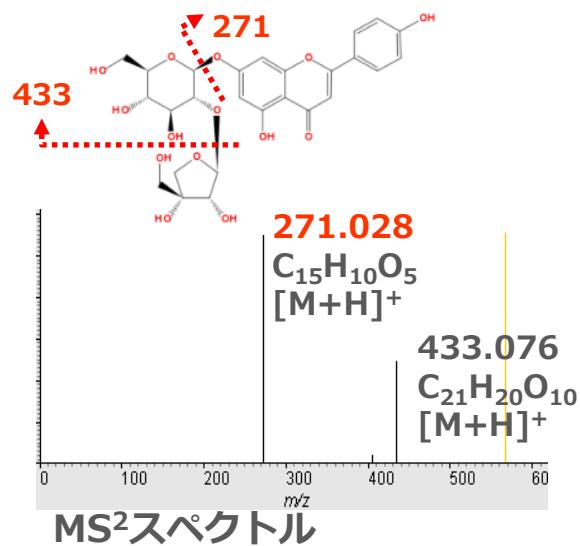
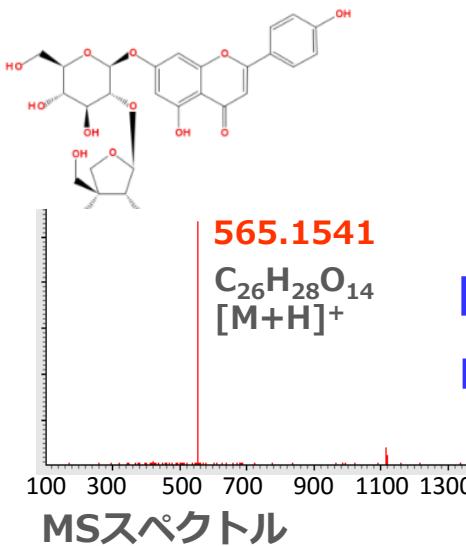
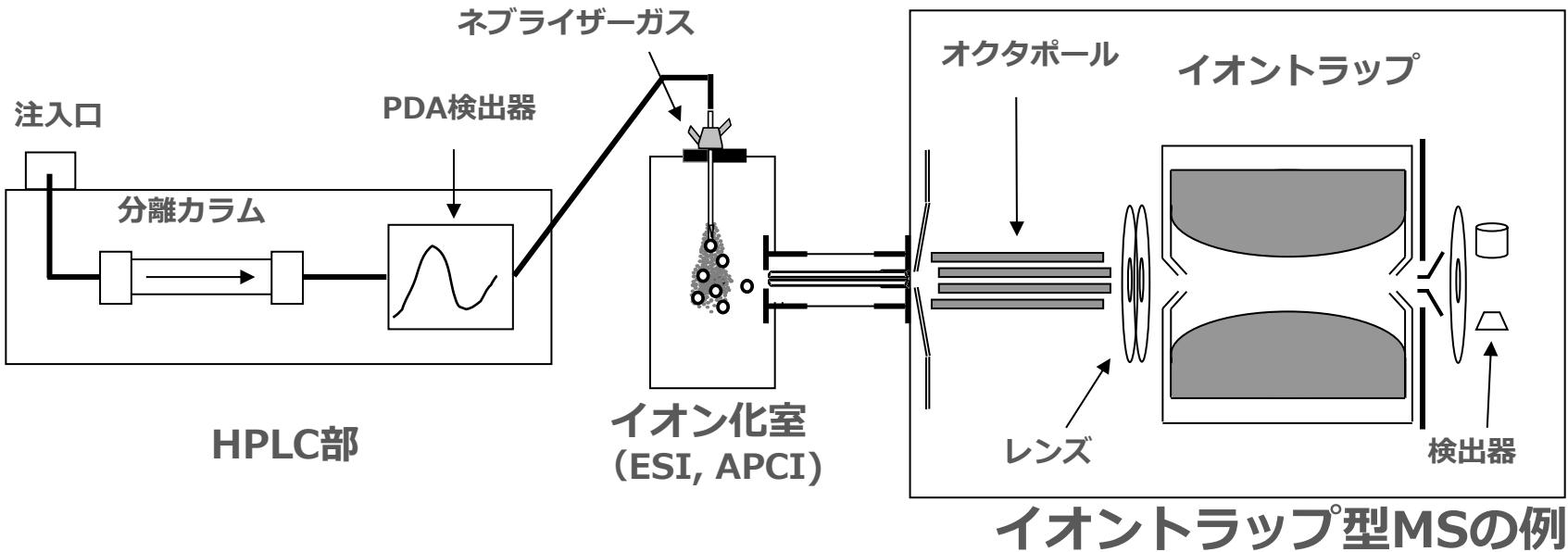
三連四重極型MS



MS/MS



イオントラップ型MSにおける多段階MS解析



小まとめ

質量分析は、イオンを検出する

- イオン化されない化合物は検出できない
- イオン化法によってデータの特性が異なる (EIとESI)
- ESIではアダクトが生じる

部分構造の質量値も得られる

- フラグメントの情報が定性に使える

化合物の同定方法

メタボロームの基礎知識

- 分析装置の種類と特性
化合物の多様性
質量分析装置の原理
- 化合物の同定方法

手作業による解析例

- 尿のデータを使って

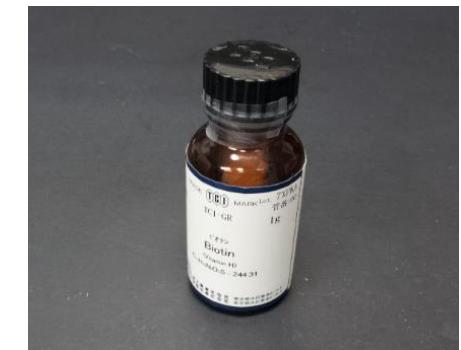
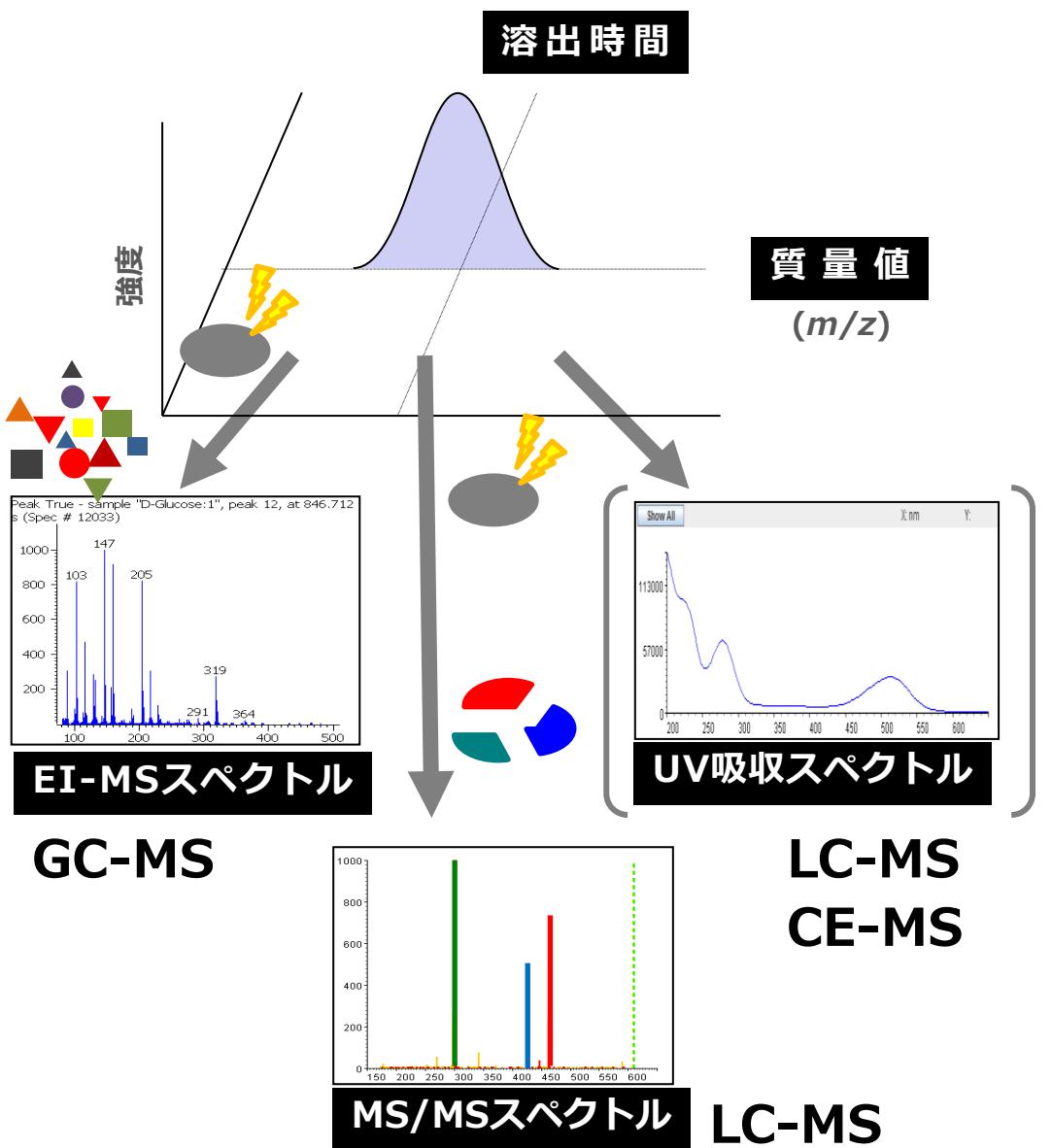
実習

- 化合物データベース検索
- MS/MS検索

付録資料

- 役立つデータベース・ツール・サービス

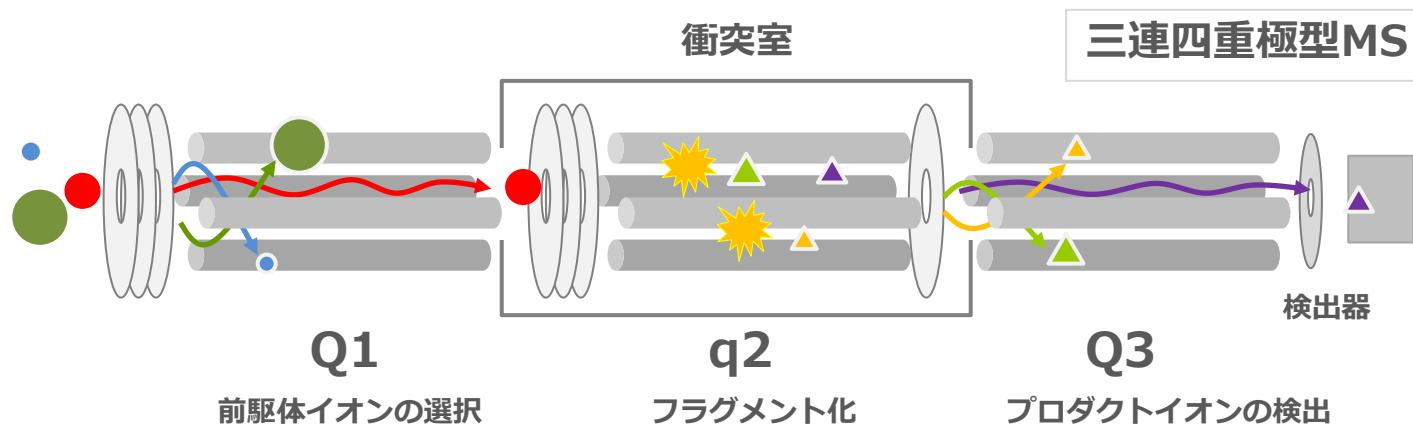
クロマトグラフィー-質量分析による化合物の同定



精製標品

同じ装置個体、
同じ条件で測定

Multiple Reaction Monitoring (MRM)



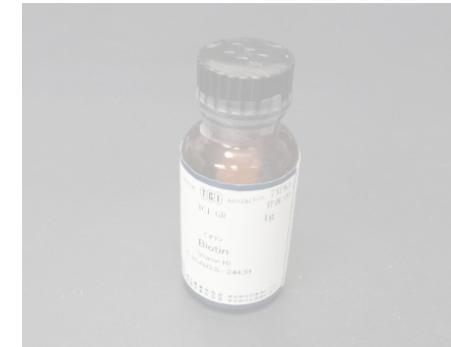
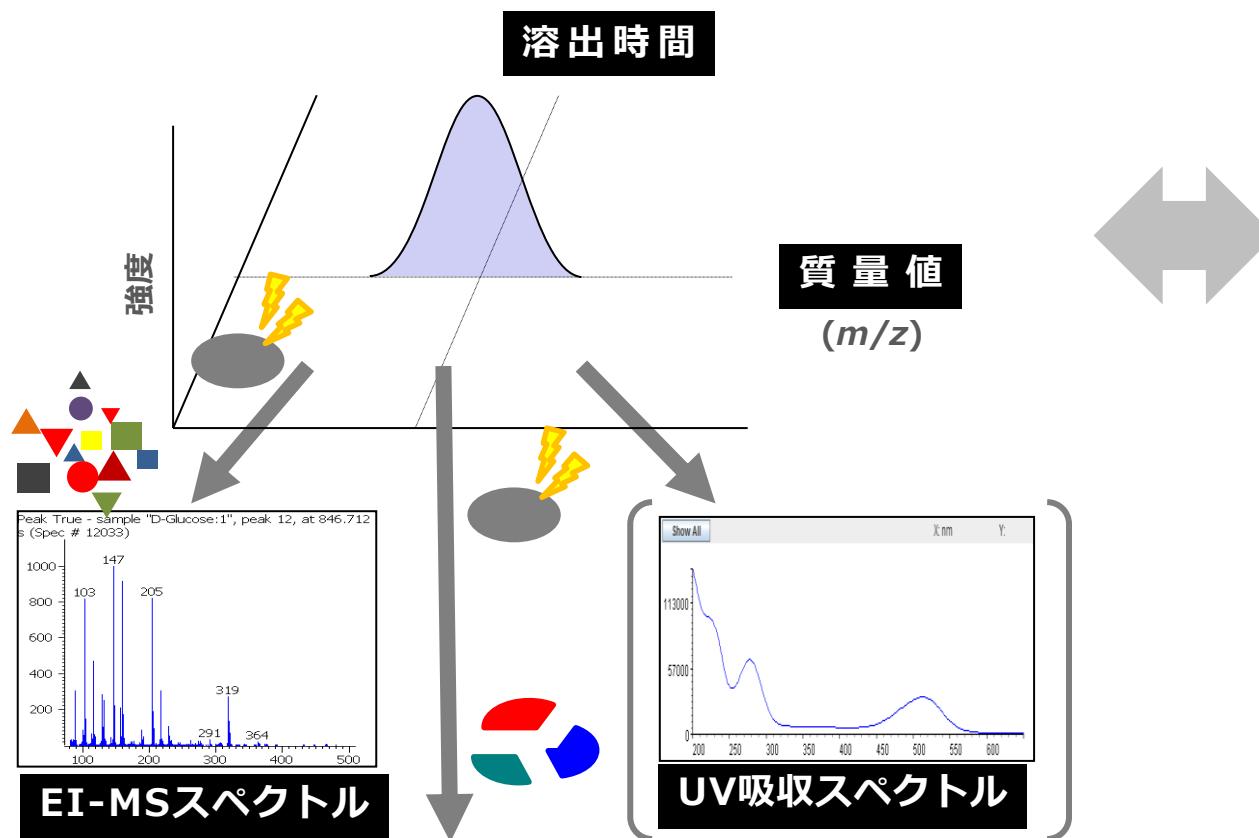
Q1とQ3の二段階の選抜により、特異的かつ高感度に特定の化合物を検出する方法

標品を測定することにより、Q1で選択する m/z と、Q3で検出する m/z の最適な組み合わせ（MRMトランジション）を決めることができる。トランジションを適用する溶出時間範囲を限定することも可能。一分析で多数の化合物を検出することができる。



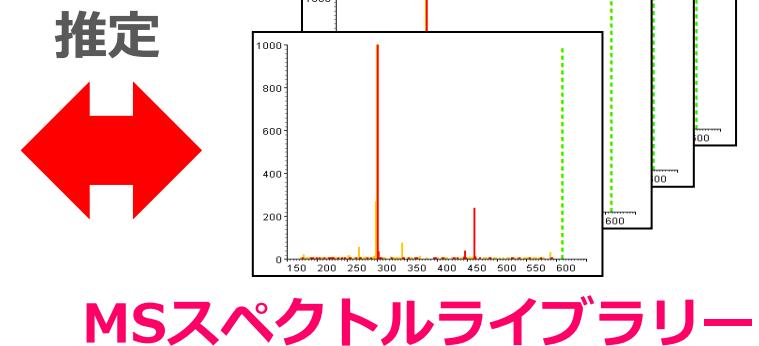
ワイドターゲットメタボロミクス

化合物の推定

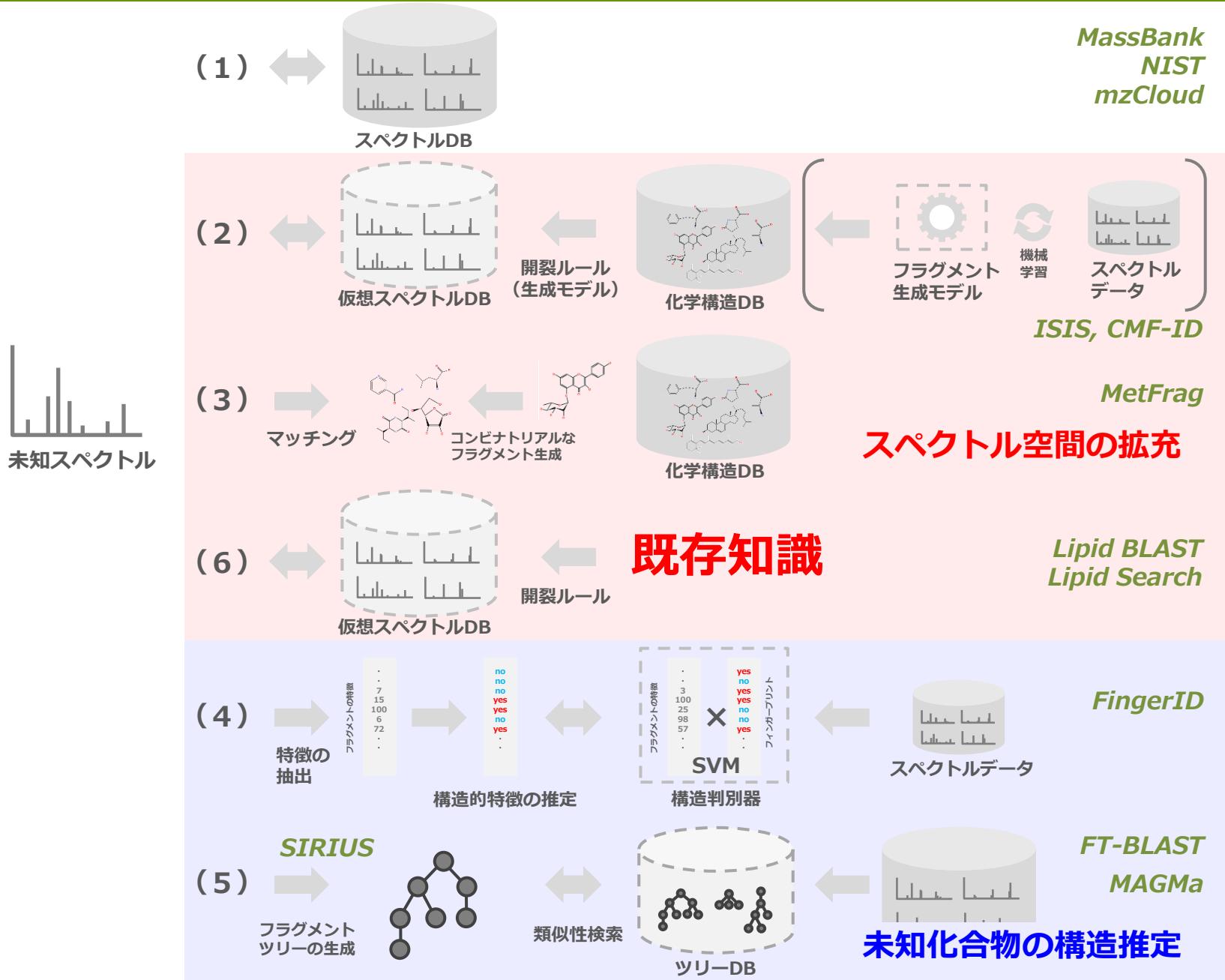


精製標品

同じ装置個体、
同じ条件で測定



MS/MSスペクトルによる構造推定のとりくみ



MS/MSスペクトル自動解読のとりくみ

MS-FINDER (RIKEN)

http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-FINDER/index.html

CSI:FingerID (Germany)

<http://www.csi-fingerid.org/>

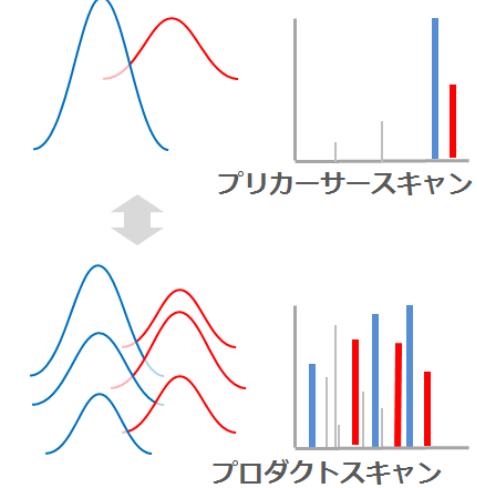
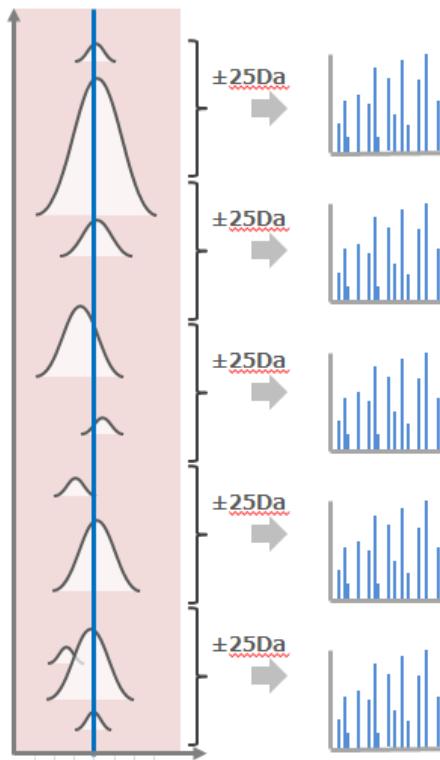
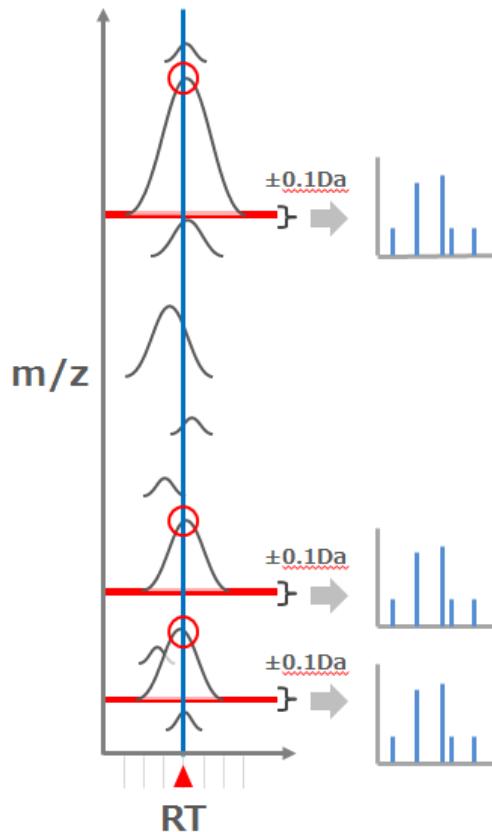
全化合物についてMS/MSを取得する技術

Data Independent Acquisition (DIA)

SWATH (ABSciex)

MS^E (Waters)

vDIA, All-ion Fragmentation (Thermo)



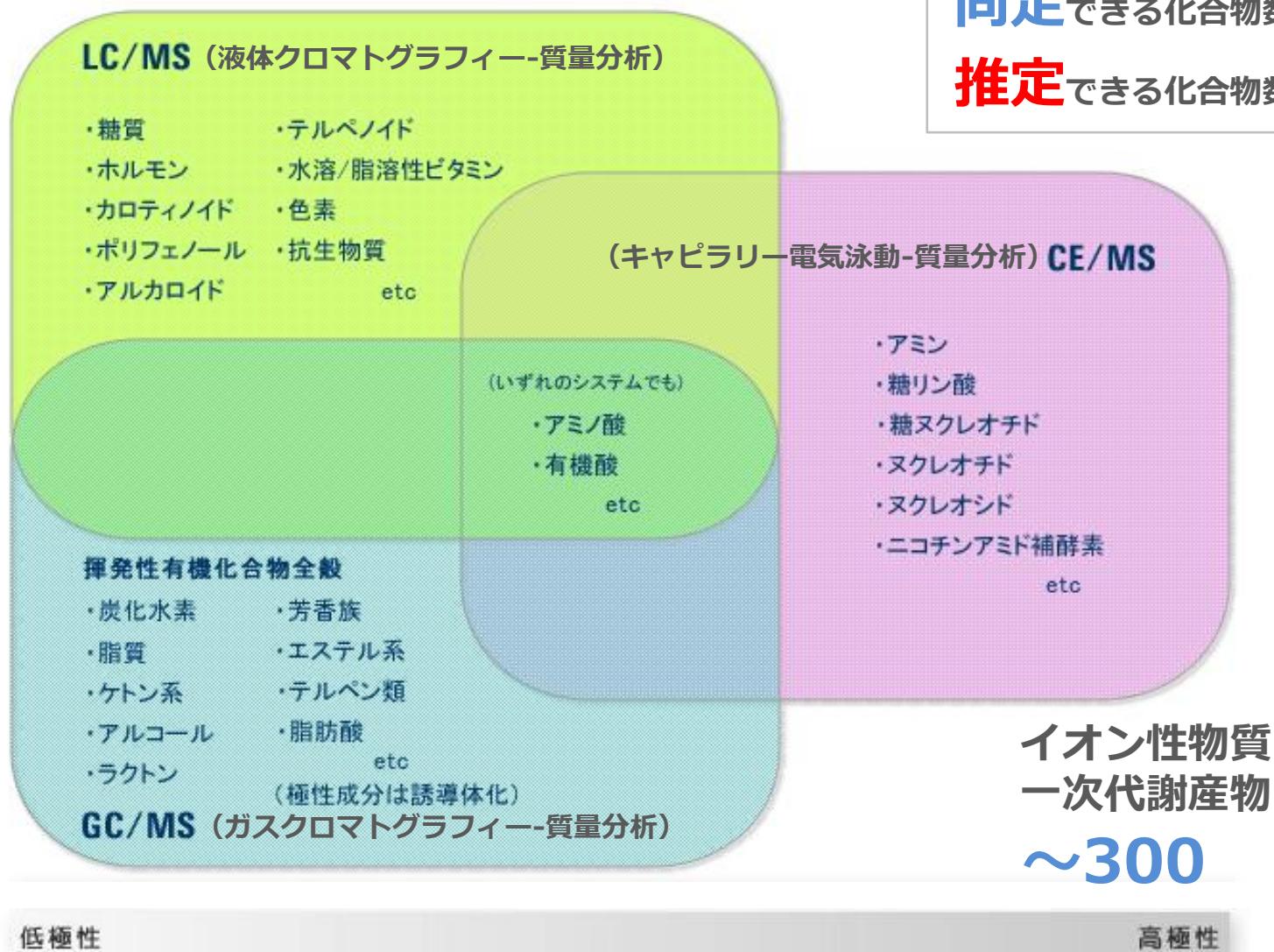
分析装置の特性

二次代謝産物 一次代謝産物

~ 500
 $10^3 \sim$

揮発性物質 一次代謝産物

~300



Agilent Technologiesのホームページより
GC/MSとLC/MSとCE-MSに適した測定対象の例

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002393>

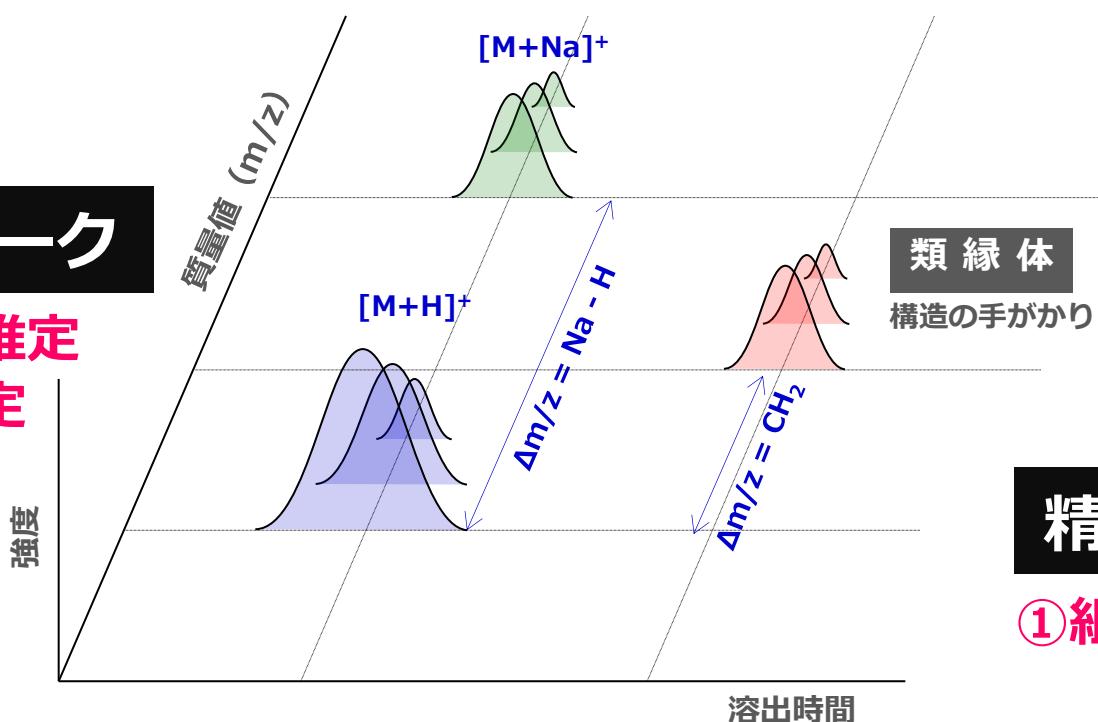
LC-MSでの化合物推定に役立つ情報

質量差分

④アダクトの判定

同位体ピーク

- ②炭素数の推定
- ③価数の判定



精密質量値

①組成式の推定

①精密質量による組成式の推定



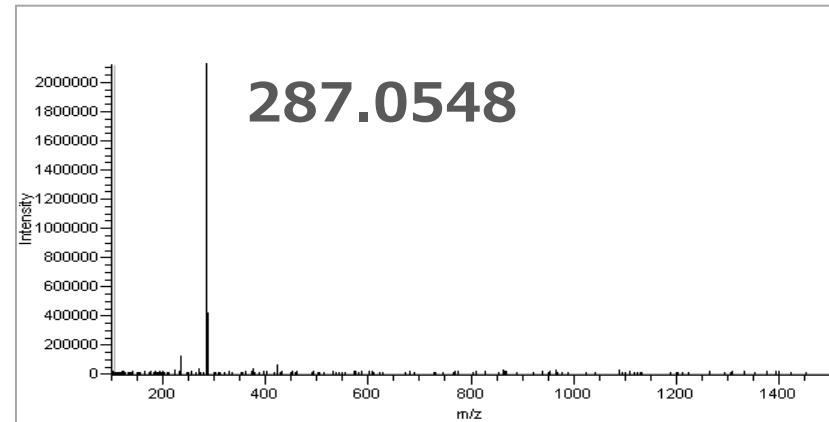
FT/ICR-MS (Orbitrap-MS)
フーリエ変換イオンサイクロトロン
共鳴型

質量精度: ~1 ppm



TOF-MS
飛行時間型

2~10 ppm



MSスペクトル

元素	精密質量
¹² C	12(定義)
¹ H	01.007825
¹⁶ O	15.994915
¹⁴ N	14.003074
³¹ P	30.973763
³² S	31.972071

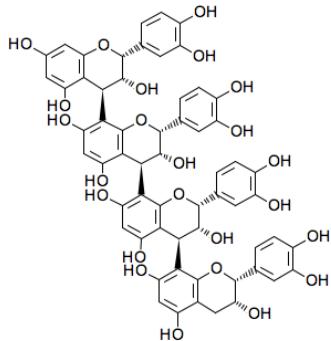
287.0548
→

候補組成式	質量理論値 ([M+H] ⁺)	質量差 (Δppm)
<chem>C15H10O6</chem>	287.05501	-0.75
<chem>C16H6N4O2</chem>	287.05635	5.41
<chem>C10H10N2O8</chem>	287.05099	13.27
<chem>C21H6N2</chem>	287.06037	-19.42
<chem>C22H6O1</chem>	287.04914	19.71
<chem>C9H10N4O7</chem>	287.06223	-25.87

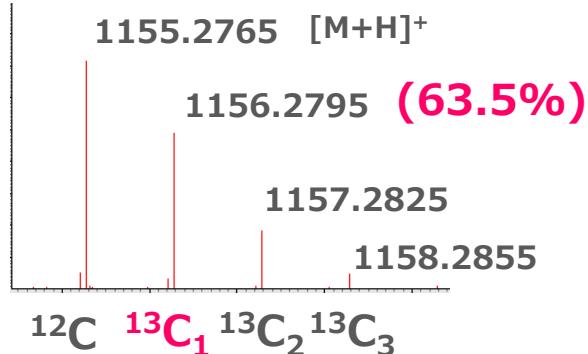
※ppm: ある質量範囲の質量値に対する100万分率
分子量1000の場合、1 ppmの誤差は、
 $1,000 \times 1 (\text{ppm}) / 1,000,000 = 0.001 \text{ Da}$

②¹³C安定同位体ピークによる炭素数の推定

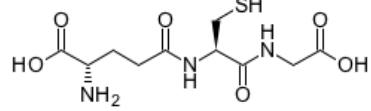
¹³C₁/¹²Cピーク強度比から、構造中の炭素の数が推定できる



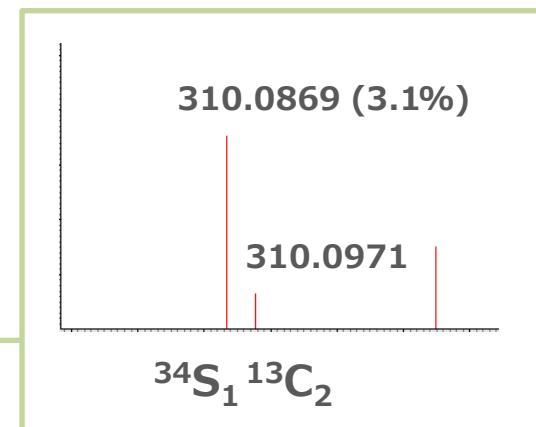
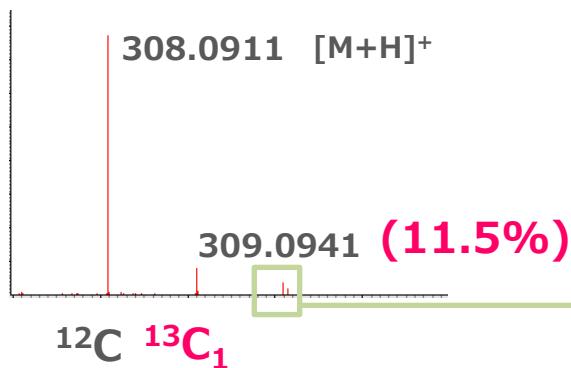
エピカテキン四量体
C₆₀H₅₀O₂₄



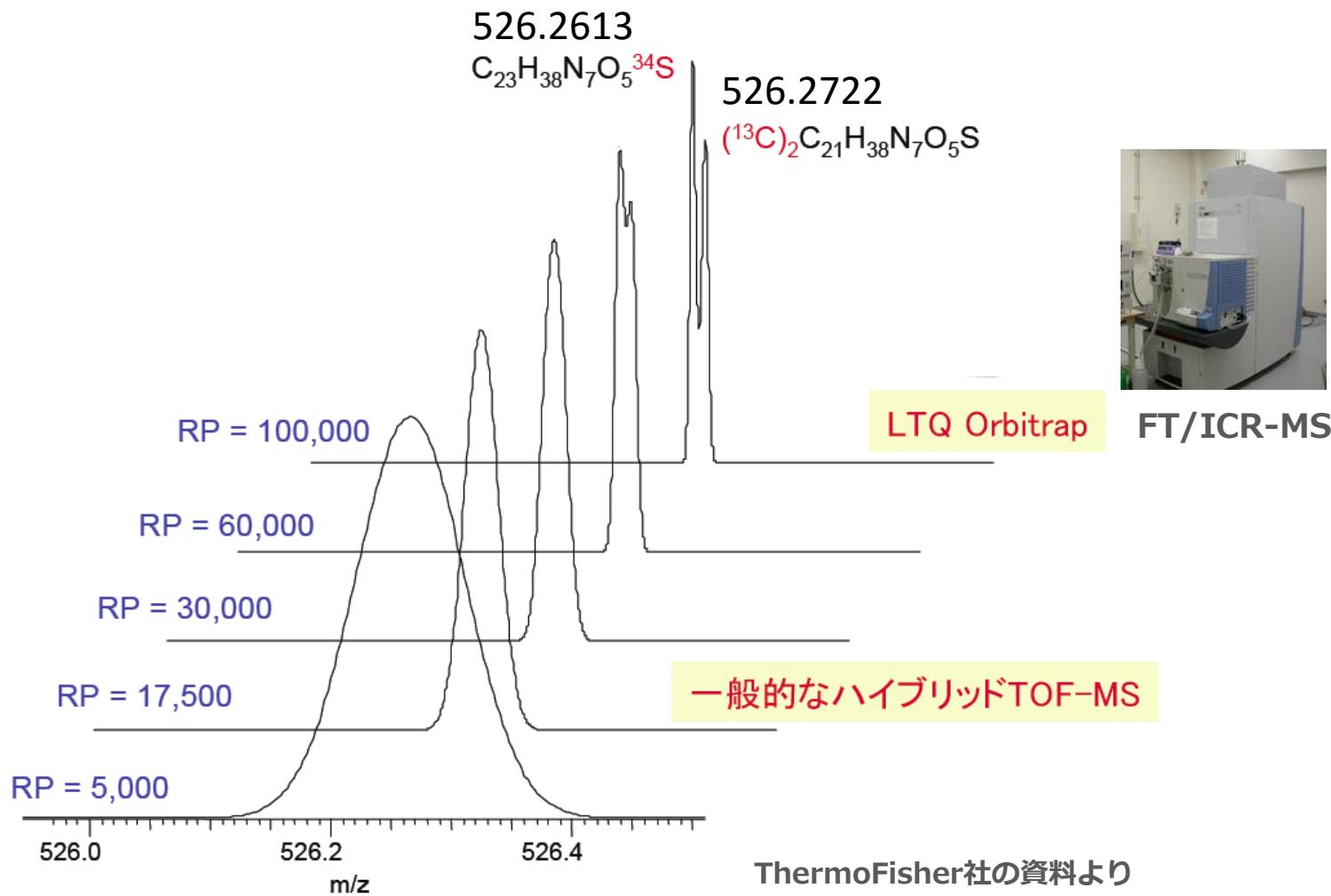
安定同位体	精密質量	天然存在比率
¹² C	12	98.9%
¹³ C	13.0034	1.1%
<hr/>		
³² S	31.9721	95.0%
³⁴ S	33.9679	4.2%
<hr/>		
¹⁴ N	14.0031	99.6%
¹⁵ N	15.0001	0.4%



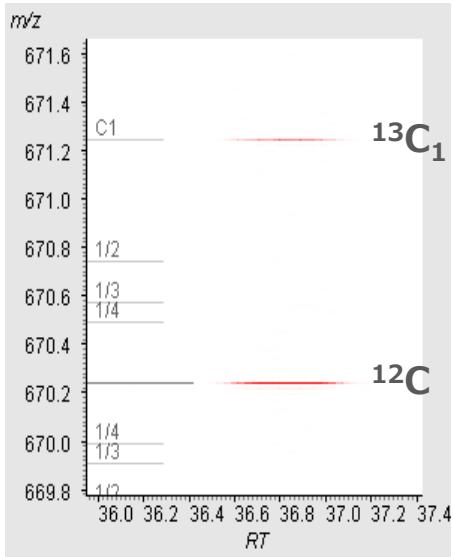
グルタチオン
C₁₀H₁₇N₃O₆S



MSの分解能

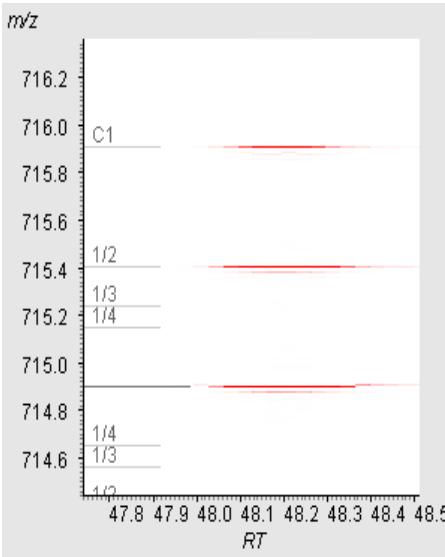


③価数の判定



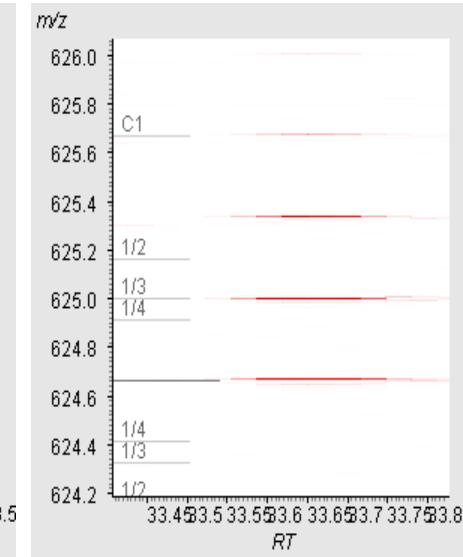
1価

例) $[M+H]^+$



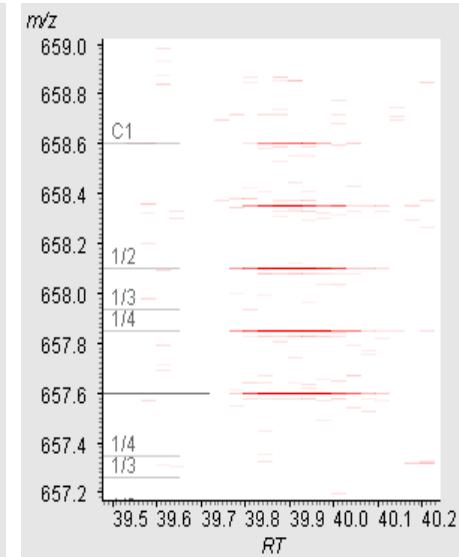
2価

例) $[M+2H]^{2+}$



3価

例) $[M+3H]^{3+}$



4価

例) $[M+4H]^{4+}$

原因

例) M = 600の分子が
2価として検出されると

$^{12}\text{C}: [M+2\text{H}]^{2+} = \text{301}$

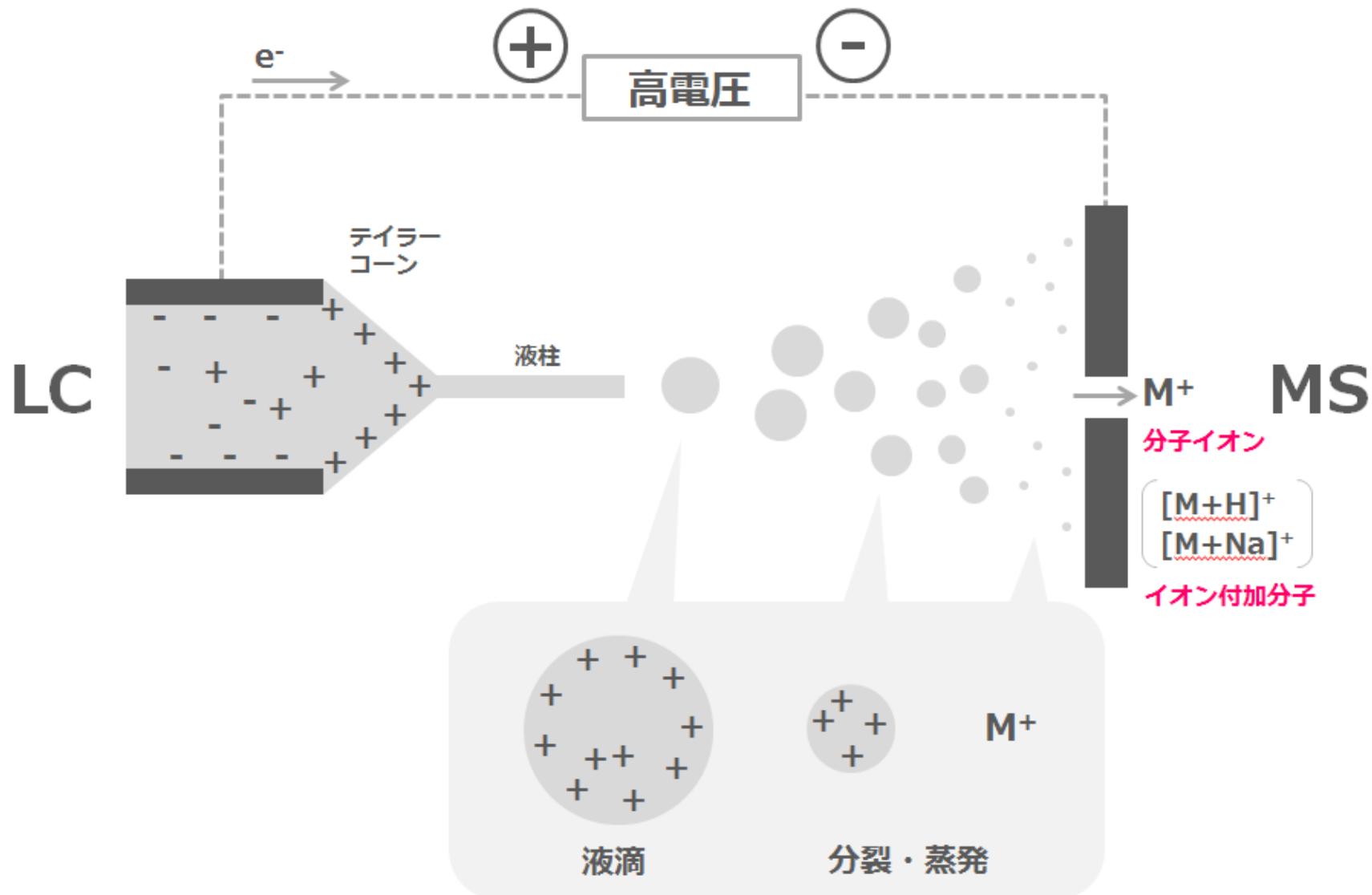
$^{13}\text{C}_1: [M+2\text{H}]^{2+} = \text{301.5}$

$^{12}\text{C}: M+2\text{H} = \text{602}$

$^{13}\text{C}_1: M+2\text{H} = \text{603}$

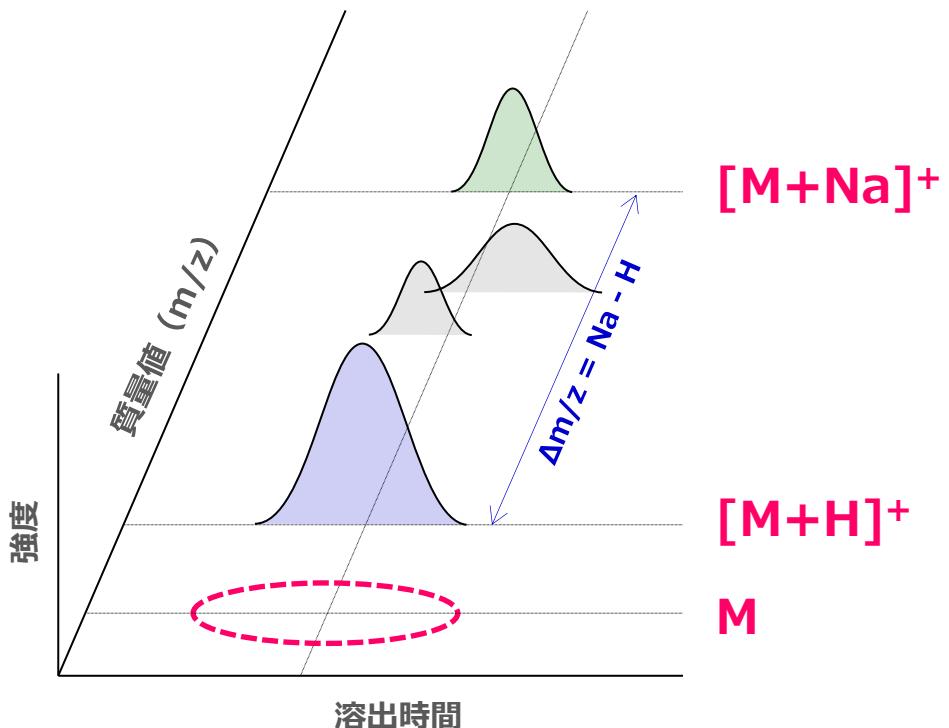
m/z (質量電荷比)

エレクトロスプレーイオン化: Electrospray Ionization (ESI)



④アダクト（イオン付加分子）の判別

同じ時間に同じ消長で観測されたピーク間の質量差分から判別



データベース検索では、観測されたイオンの質量値から中性分子Mの質量を計算して検索する

Naの質量を引き
電子の質量を加える

Hの質量を引き
電子の質量を加える

小まとめ

質量分析による化合物の同定

標品との比較が必要

化合物を推定するための手がかりが得られる

- 化合物データベース検索
- 組成式候補
- 炭素の数、硫黄原子の有無
- 値数
- アダクト
- フラグメントのスペクトル



メタボロームデータとは

- 標品との比較結果（～数百）
- 上記手がかりからの推定結果

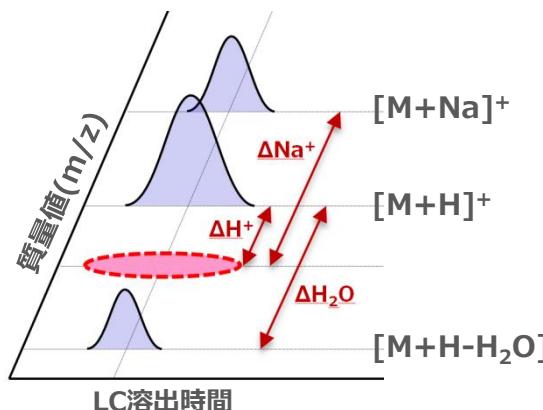
使っているソフトがどれだけ信頼できるかを確認する

PowerGet (宣传)

精密質量の正確な評価



アダクト・多価イオンの正確な判定



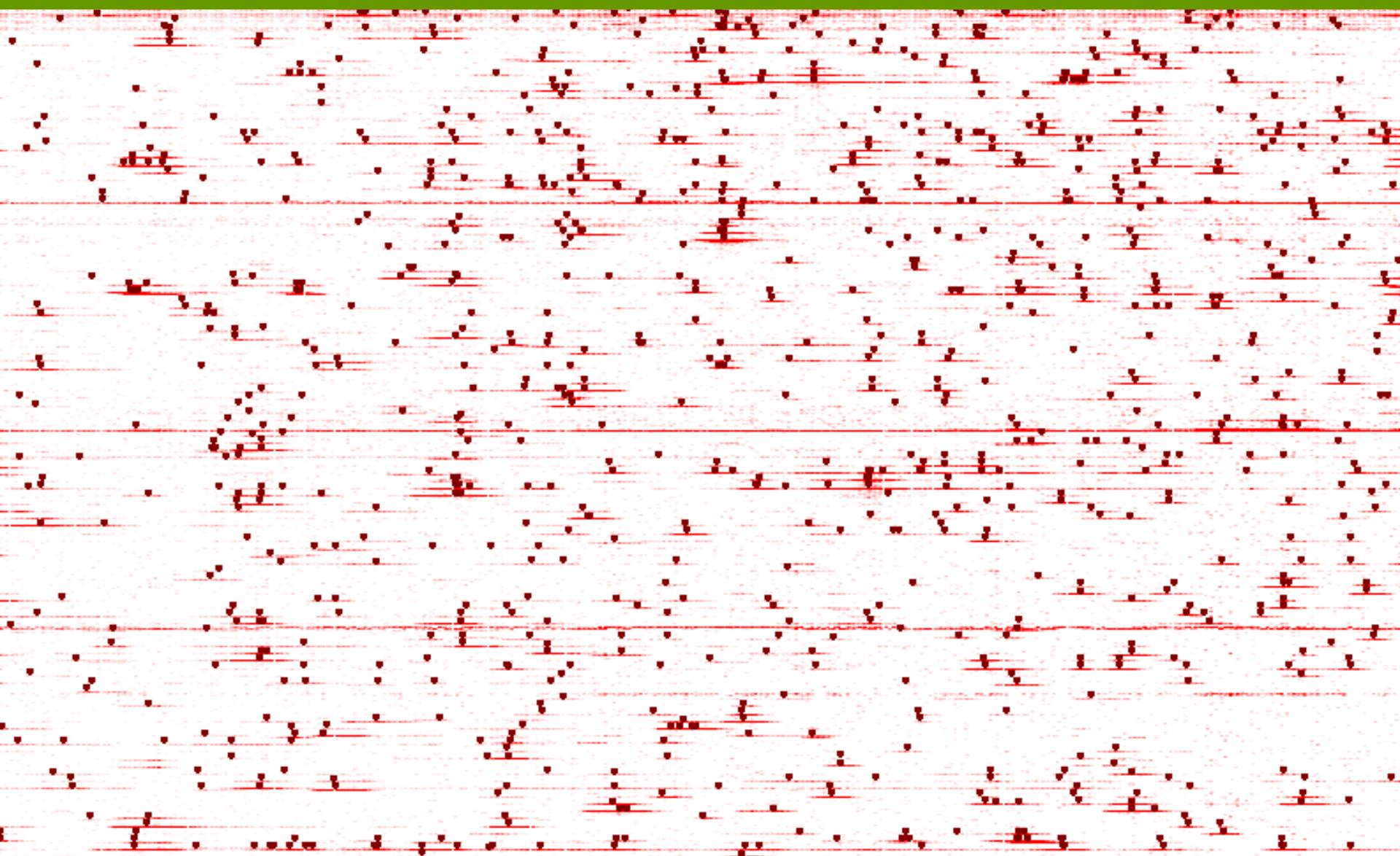
高速な組成式推定・DB検索



Sakurai et al. (2012)
Bioinformatics

正確なピーク抽出・アダクトの判定による組成式推定

PowerGet (宣伝)



全てのピークを拾いきる世界最高水準の技術

メタボロームの基礎知識

- 分析装置の種類と特性
化合物の多様性
質量分析装置の原理
- 化合物の同定方法

手作業による解析例

尿のデータを使って

手作業による解析例

- 尿のデータを使って

実習

- 化合物データベース検索
- MS/MS検索

付録資料

- 役立つデータベース・ツール・サービス

夕食90分後サンプル

Positive: 4111ピーク (3829成分)



ID	Intensity	R.T. (min)	m/z	Adduct	Annotation
P1931	1,092,799	50.05	595.34807	[M+H]+	[6] 2 formulae (e.g. for L-Urobilin;L-Stercobilin;Stercobilin) with multiple hits for compound DBs.
P2077	952,228	71.77	597.36426	[M+H]+	[6] 2 formulae (e.g. for L-Urobilinogen;L-Stercobilinogen;Stercobilinogen) with multiple hits for compound DBs.
P0066	672,744	39.75	265.11819	[M+H]+	[2] C13H16N2O4 (e.g. for Phenylacetylglutamine;alpha-N-Phenylacetyl-L-glutamate) with multiple hits for compound DBs.
P1932	421,481	49.86	593.33235	[M+H]+	[6] 2 formulae (e.g. for I-Urobilinogen;Mesobilirubinogen;Urobilinogen) with multiple hits for compound DBs.
P0067	321,690	39.76	529.22868	[2M+H]+	[2] C13H16N2O4 (e.g. for Phenylacetylglutamine;alpha-N-Phenylacetyl-L-glutamate) with multiple hits for compound DBs.
P0236	287,367	47.77	286.20114	[M+H]+	[2] C15H27N1O4 (e.g. for Heliovicine) with multiple hits for compound DBs.
P2952	165,415	71.34	595.34807	[M+H]+	[6] 2 formulae (e.g. for L-Urobilin;L-Stercobilin;Stercobilin) with multiple hits for compound DBs.
P2245	165,001	51.65	310.20105	[M+H]+	[2] C17H27N1O4 (e.g. for Metipranolol) with multiple hits for compound DBs.
P3503	134,034	102.18	373.32457	[M+H]+	[8] No hits
P3504	111,011	102.17	643.58772	[M+H]+	[8] No hits
P2138	104,990	50.27	310.20107	[M+H]+	[2] C17H27N1O4 (e.g. for Metipranolol) with multiple hits for compound DBs.
P2953	103,793	71.23	593.33322	[M+H]+	[6] 2 formulae (e.g. for I-Urobilinogen;Mesobilirubinogen;Urobilinogen) with multiple hits for compound DBs.
P3505	93,091	102.26	666.60340	[M+ACN-H2O]	[8] No hits
P0068	89,397	39.70	551.21088	[2M+Na]+	[2] C13H16N2O4 (e.g. for Phenylacetylglutamine;alpha-N-Phenylacetyl-L-glutamate) with multiple hits for compound DBs.
P3768	89,386	104.80	624.19989	[M+CH3OH-2]	[8] No hits
P1933	84,744	49.44	271.16517	[M+H]+	[8] No hits
P3769	84,327	104.86	610.18358	[M-H2O+H]+	[8] No hits
P3510	79,248	102.49	653.57222	[M+H]+	[1] C40H76O6 (e.g. for TG(12:0/12:0/13:0)[iso3]) with a single hit for each compound.
P2545	73,085	59.52	307.20149	[M+H]+	[2] C17H26N2O3 (e.g. for 13alpha-Angeloyloxylupanine) with multiple hits for compound DBs.
P2394	70,581	55.25	314.23232	[M+H]+	[2] C17H31N1O4 (e.g. for (4Z)-decenoylcarnitine) with multiple hits for compound DBs.
P4034	67,427	103.30	694.49660	[M+CH5N+H]	[8] No hits
P3097	64,994	67.22	448.30531	[M+H]+	[8] No hits
P2078	64,678	72.04	593.33425	[M+H]+	[6] 2 formulae (e.g. for I-Urobilinogen;Mesobilirubinogen;Urobilinogen) with multiple hits for compound DBs.
P2079	59,612	71.99	595.34842	[M+H]+	[6] 2 formulae (e.g. for L-Urobilin;L-Stercobilin;Stercobilin) with multiple hits for compound DBs.

Urobilin, Urobillinogen, Phenylacetylglutamine, Testosteron誘導体など

夕食90分後サンプル

Negative: 4741ピーク (4464成分)



ID	Intensity	R.T. (min)	m/z	Adduct	Annotation
P1301	734,481	39.74	263.10357	[M-H]-	[2] C13H16N2O4 (e.g. for Phenylacetylglutamine;alpha-N-Phenylacetyl-L-gluta...) with [6] 2 formulae (e.g. for L-Urobilinogen;L-Stercobilinogen;Stereobilinogen) with multiple hits
P3800	580,837	71.74	595.34901	[M-H]-	[2] C19H28O5S1 (e.g. for Dehydroepiandrosterone sulfate;3beta-Hydroxyandros...) with multiple hits
P4132	359,600	67.36	367.15840	[M-H]-	[2] C19H30O5S1 (e.g. for 5alpha-androstan-3alpha-ol-17-one sulfate) with multiple hits
P3801	208,223	71.18	369.17426	[M-H]-	[2] C27H40O11 (e.g. for Valtrate hydrine B3) with multiple hits for compound DBs.
P2435	176,048	50.28	539.24891	[M-H]-	[2] C26H38O9 (e.g. for Taxawallin G) with multiple hits for compound DBs.
P4004	162,720	65.19	493.24359	[M-H]-	[2] C31H48O8 (e.g. for Quadrangularic acid F;(+)-Quadrangularic acid F) with multiple hits
P2436	142,647	50.02	593.33371	[M+HCOOH]-	[2] C25H36O12 (e.g. for Kickxioside) with multiple hits for compound DBs.
P1302	142,009	39.73	527.21415	[M-H]-	[2] C25H38O8 (e.g. for Androsterone glucuronide;Androsterone 3-glucuronid...) with multiple hits
P3928	138,084	63.08	465.24918	[M-H]-	[1] C19H28O6S1 (e.g. for 3b,16a-Dihydroxyandrostenone sulfate) with a single hit for each compound DB
P2073	137,107	53.99	383.15319	[M-H]-	[1] C32H50O10 (e.g. for 13-Deoxytedanolide) with a single hit for each compound DB
P3802	134,266	71.28	593.33390	[M-H]-	[2] C25H38O8 (e.g. for Androsterone glucuronide;Androsterone 3-glucuronid...) with multiple hits
P3311	126,608	61.96	465.24917	[M-H]-	[1] C27H42O11 (e.g. for Cortolone-3-glucuronide) with a single hit for each compound DB
P2437	125,505	49.23	541.26502	[M-H]-	[1] C27H42O11 (e.g. for Cortolone-3-glucuronide) with a single hit for each compound DB
P2438	120,959	50.07	541.26515	[M-H]-	[1] C27H42O11 (e.g. for Cortolone-3-glucuronide) with a single hit for each compound DB
P2439	113,974	49.92	600.28435	[M-H]-	[8] No hits
P4319	110,717	102.37	443.24242	[M-H]-	[1] C26H36O6 (e.g. for Bufotalin;3beta,14,16beta-Trihydroxy-5beta-bufa-20...) with a single hit for each compound DB
P3214	97,886	80.46	449.25436	[M-H]-	[2] C25H38O7 (e.g. for Laserpitin) with multiple hits for compound DBs.
P4279	96,955	75.14	512.26853	[M-H]-	[1] C26H43N107S1 (e.g. for Sulfoglycolithocholic acid) with a single hit for each compound DB
P2440	91,787	49.81	591.31808	[M-H]-	[1] C32H48O10 (e.g. for Debromoaplysiatoxin) with a single hit for each compound DB
P2957	90,671	52.12	539.24893	[M-H]-	[2] C27H40O11 (e.g. for Valtrate hydrine B3) with multiple hits for compound DBs.
P2958	88,165	51.67	541.26516	[M-H]-	[1] C27H42O11 (e.g. for Cortolone-3-glucuronide) with a single hit for each compound DB
P0243	82,632	12.60	632.20333	[M-H]-	[2] C23H39N1O19 (e.g. for 3'-Sialyllactose) with multiple hits for compound DBs.
P2074	74,339	53.82	481.24422	[M-H]-	[2] C25H38O9 (e.g. for 11-beta-hydroxyandrosterone-3-glucuronide) with multiple hits
P2959	73,543	51.70	431.22852	[M-H]-	[6] 2 formulae (e.g. for Radiosumin) with multiple hits for compound DBs.

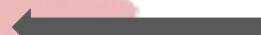
硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体を多く検出

抱合化反応

グルクロン酸抱合



UDP-グルクロン酸転移酵素



腸肝循環



胆汁

$$\Delta m/z = 176.03209 (C_6H_8O_6)$$

硫酸抱合



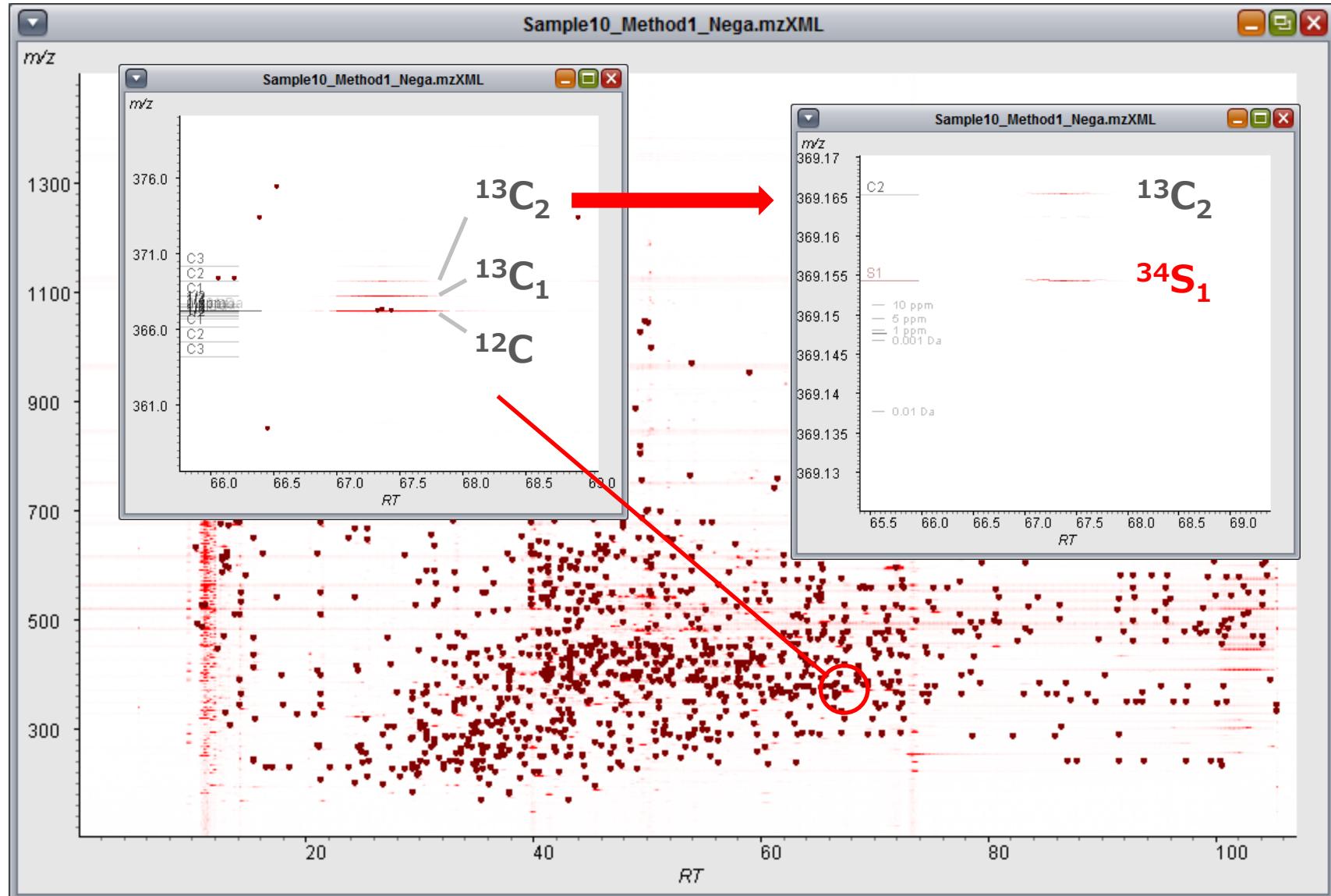
スルフォトラン
スフェラーゼ



$$\Delta m/z = 79.95681 (SO_3)$$



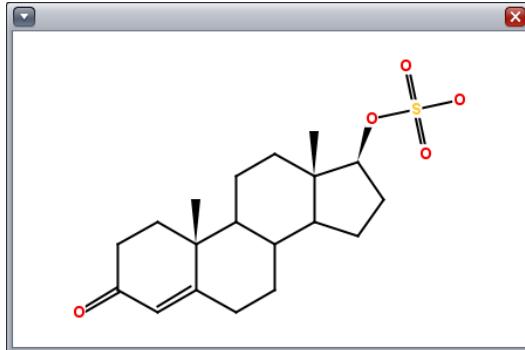
硫酸抱合体の候補 (ΔSO_3 での検索)



1185 / 4741ピーク → 数百ピーク

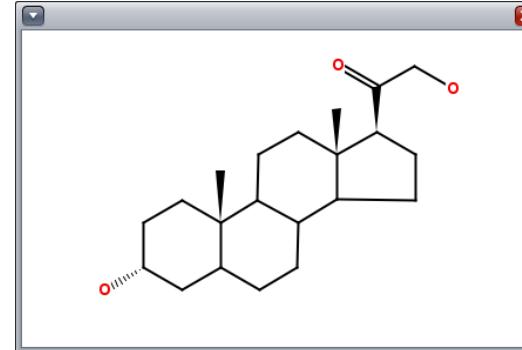
硫酸抱合体の候補

硫酸抱合体としてデータベースに登録されているもの

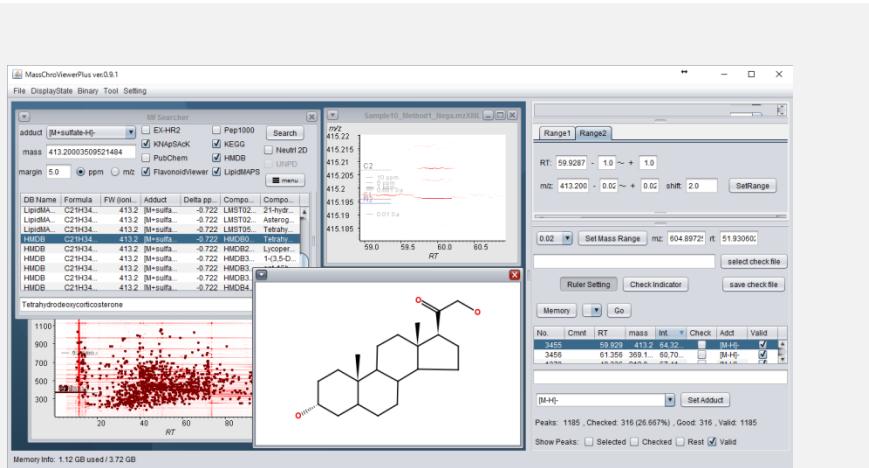


Testosterone sulfate
Dehydroepiandrosterone sulfate

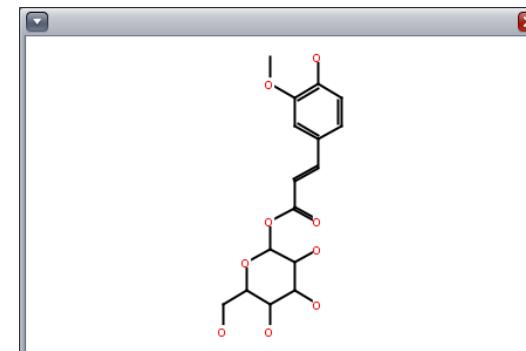
硫酸抱合体としてデータベースに登録されていない、抱合体の候補



Tetrahydrodeoxycorticosterone



MassChroViewer



1-O-Feruloylglucose

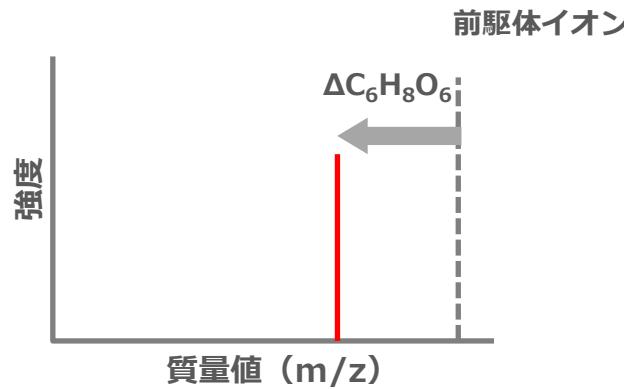
グルクロン酸抱合体の検出

$\Delta C_6H_8O_6$ のデータベース検索ではうまく行かない

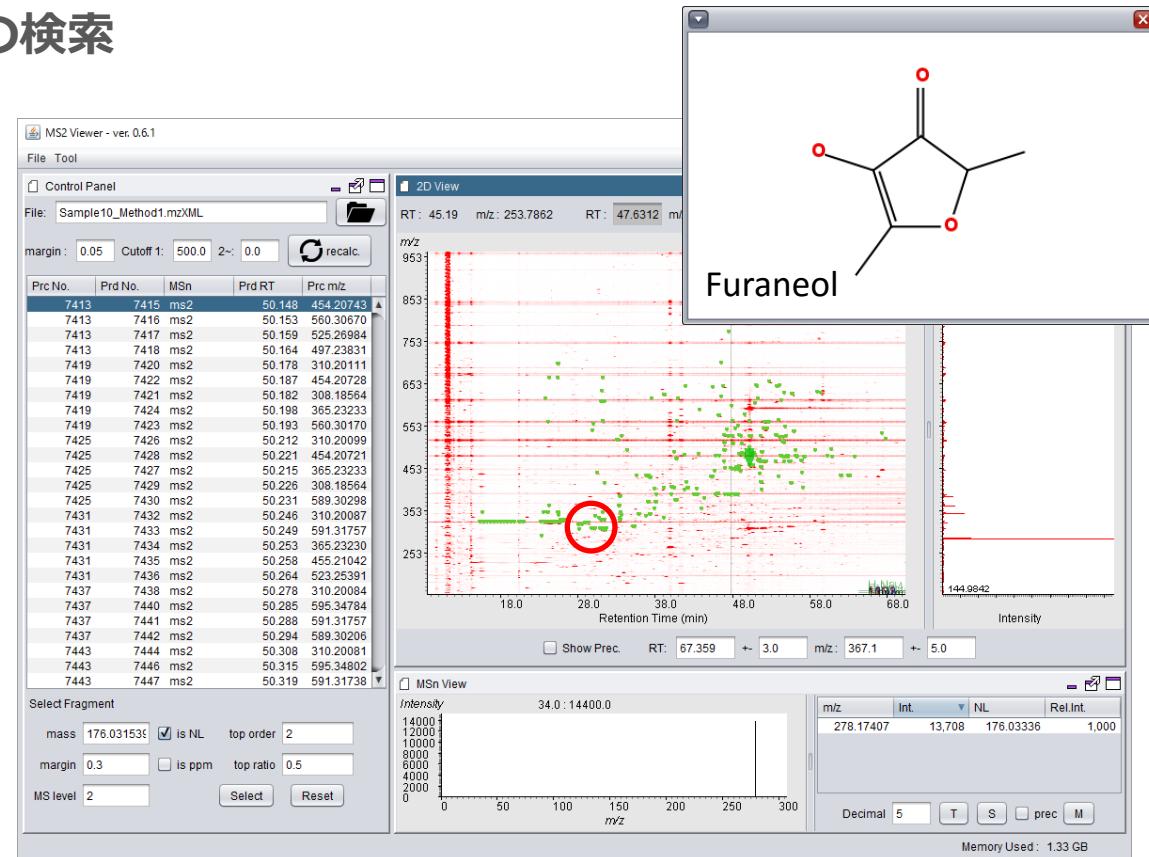
- ・ C, H, Oからなる差分なので、たまたまその差分をもつ化合物が沢山ある
- ・ 安定同位体による確認ができない



MS/MSでのニュートラルロスの検索



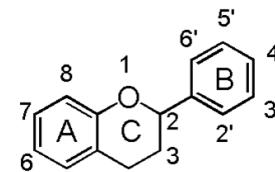
Ms2Viewer



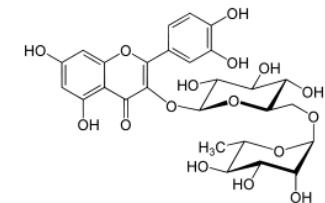
フラボノイドの推定（宣伝）

フラボノイド 茶カテキン、ポリフェノール、大豆イソフラボンなど

- 天然には～7000種類が存在
- 糖鎖の位置などが異なる構造異性体が多い



フラボノイド基本骨格



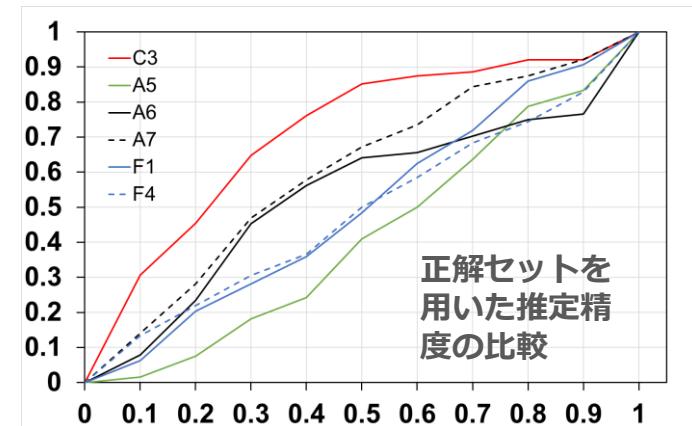
配糖体の例：ルチン

FlavonoidSearch

MS/MSデータから、フラボノイドの基本骨格を推定するツール

- 1) 143種類の標品を質量分析(MS/MS解析)
- 2) 基本骨格の開裂のしかたをルール化 (経験知)
- 3) 約7000種類の既知構造に、そのルールを適用
- 4) 出現するMS/MSフラグメントを予測しデータベース化

FlavonoidSearch
FingerID
CFM-ID (jaccard)
--- (DotProduct)
MetFrag (renumber)
MetFrag (localSDE / renumber)

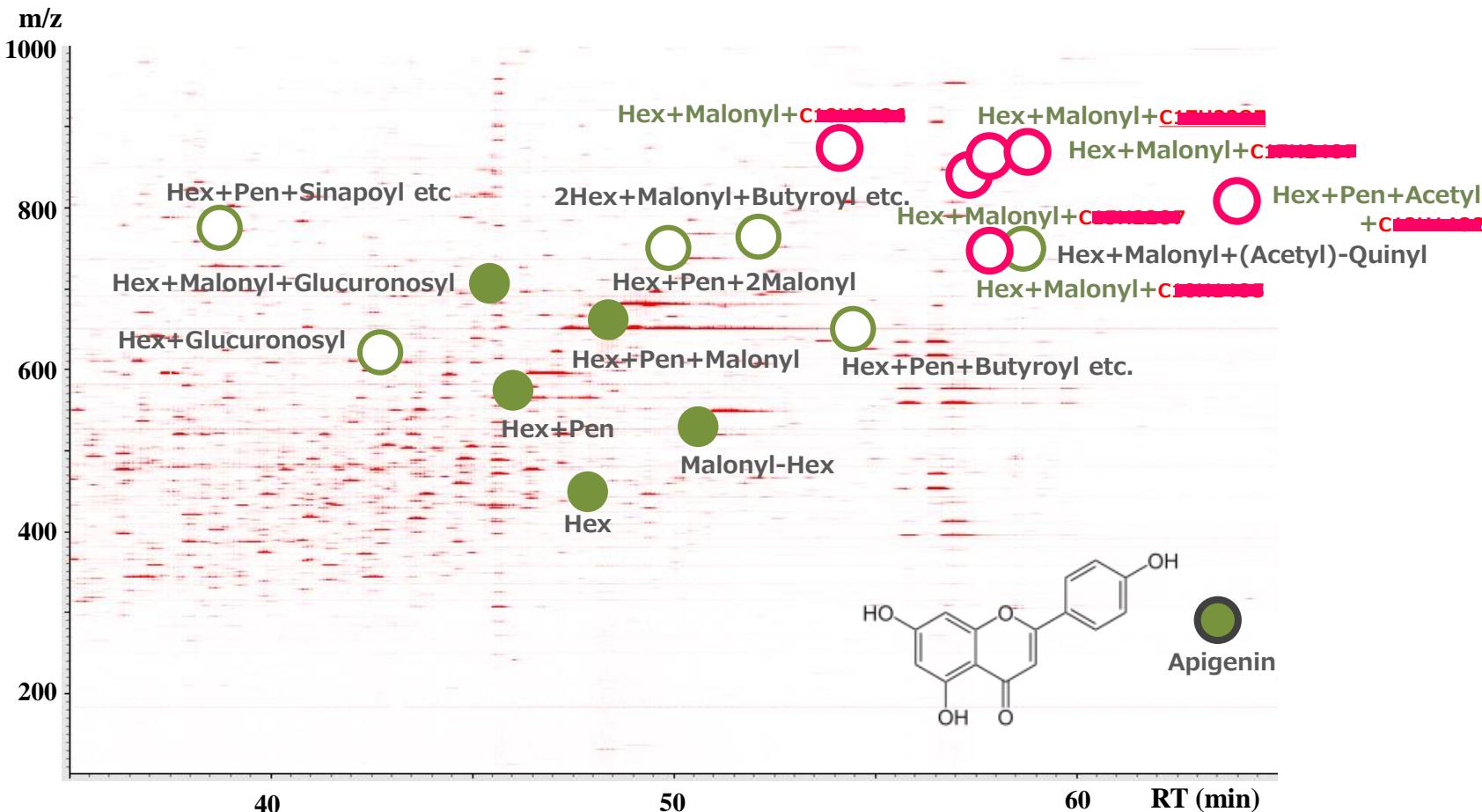


既存ツール以上の予測精度

網羅的なフラボノイド解析（フラボノーム）が可能に

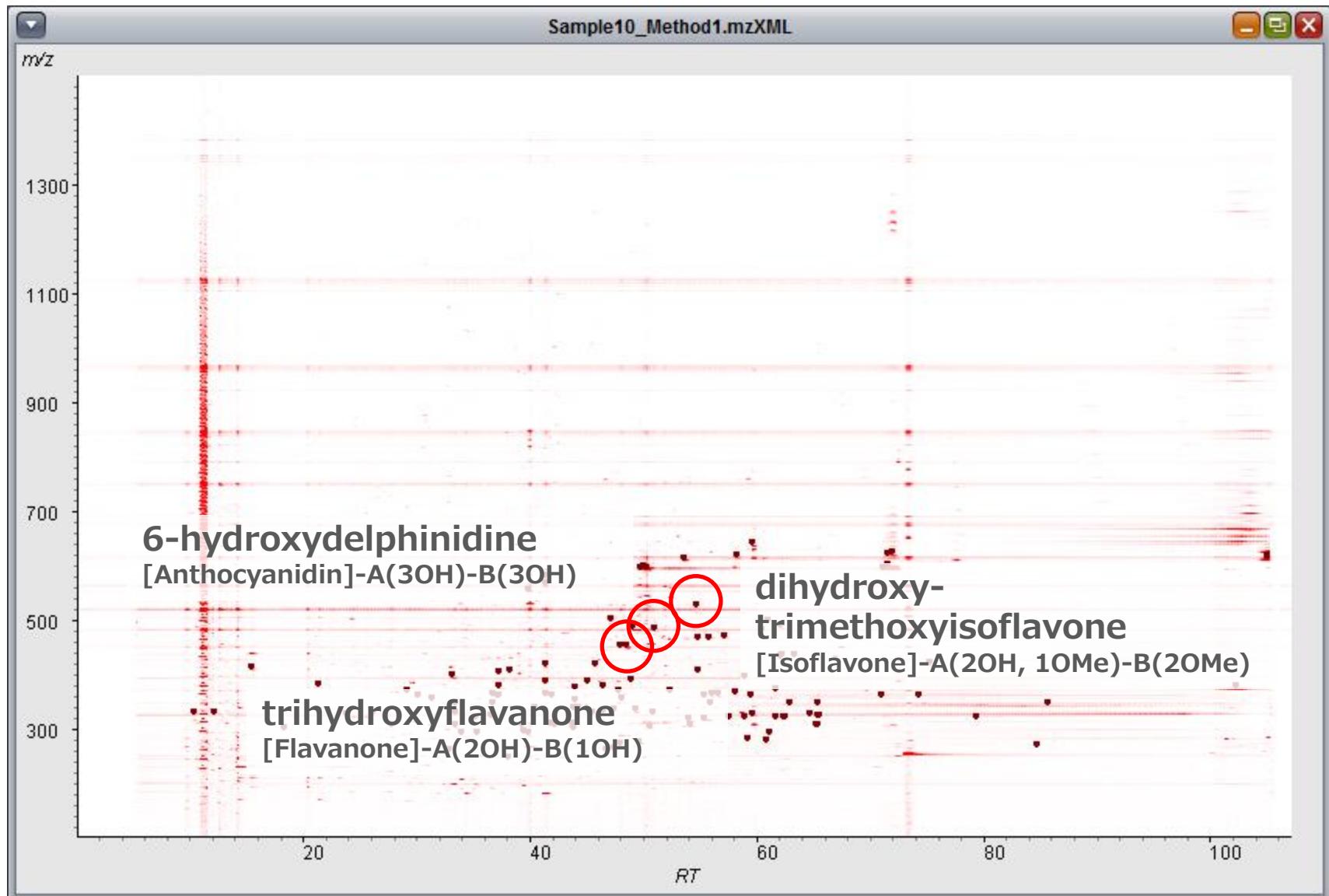
パセリから新規フラボノイド候補を見つける（宣伝）

アピゲニン誘導体の探索



- 既知の誘導体
- 既知の修飾基が付加した未知の誘導体
- 未知の修飾基が付加した未知の誘導体

フラボノイドの網羅的検出



127ピーク

小まとめ

手がかりを駆使することで、未知化合物を探索し、背景にある生物機能を考察できる



見たいデータを見ることができるツール・データベースを得る

実習

メタボロームの基礎知識

- 分析装置の種類と特性
化合物の多様性
質量分析装置の原理
- 化合物の同定方法

手作業による解析例

- 尿のデータを使って

実習

- 化合物データベース検索
- MS/MS検索

付録資料

- 役立つデータベース・ツール・サービス

実習1 データのダウンロード

実習で使うファイルのダウンロードをお願いします

<http://webs2.kazusa.or.jp/sakura/ajacs60/>

※アクセスPWはお手元の配布資料に

AJACS安芸

資料

Download	metabolome_files.zip (43.1 MB)	実習用ファイル(下記全部が含まれます)
Download	metabolome_siryou.pdf (*** MB)	配付資料

以下のファイルが含まれます。

解析ソフト

Ms2Viewer_0.6.1

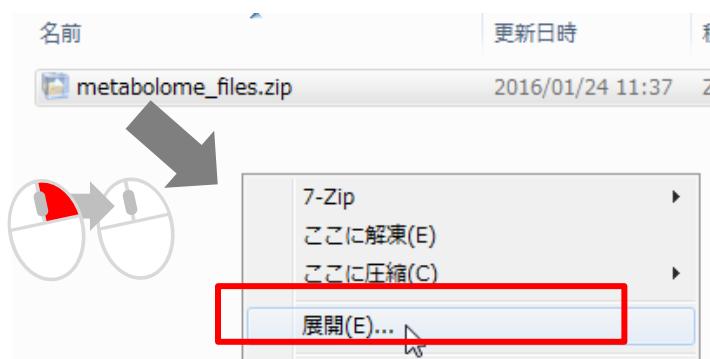
サンプルデータ(尿Positive)
Urine_pos.mzXML

サンプルデータ(尿Negative)
Urine_neg.mzXML

サンプルデータ(パセリPositive)
Parsley_pos.mzXML

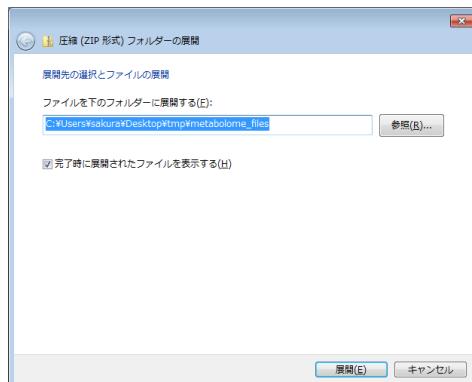
実習1 zipファイルの展開のしかた

1) 右ドラッグで「展開...」を選択



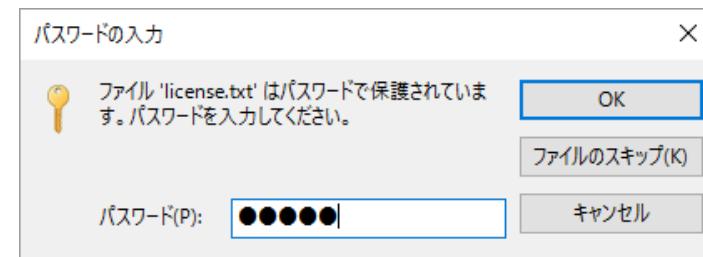
- ①ファイル上でマウス右ボタンを押し、ボタンを押したままカーソルを少し移動させてボタンを放す
(右ドラッグ)
- ②メニューに「展開...」が現れるので、選択する

2) 「展開」ボタンを押す



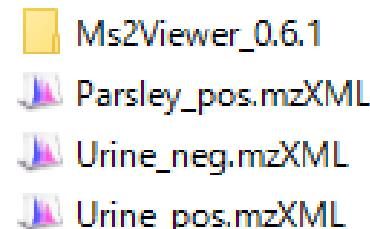
展開先を確認・変更するためのウィンドウが現れる。
通常はそのまま「展開」ボタンを押せばよい

3) パスワードを入力



ウェブページアクセス用のパスワードと一緒にです

4) ファイルを確認



上記4つのファイル・フォルダが出来ていれば成功です

実習2 観測されたm/zから化合物を検索（1）

ChemSpiderで検索 (<http://www.chemspider.com/>)

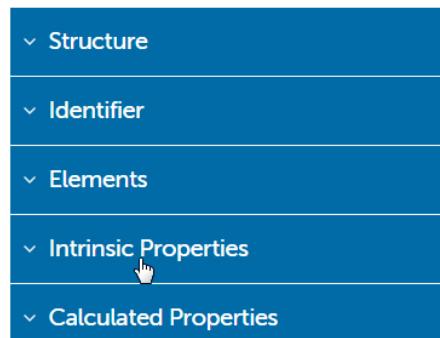
例) 166.0861455

1) Advancesを選択



2) Intrinsic Propertiesを選択

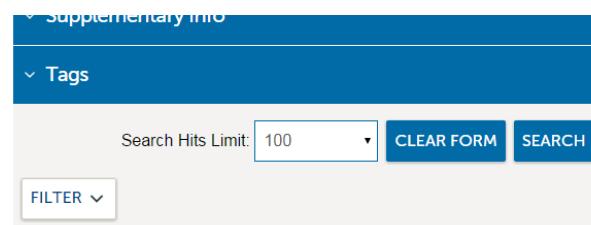
Advanced search



3) 下の方に、Monoisotopic Massの欄があるので、観測されたm/z、±許容誤差、アダクトの種類、チャージを選択

The search form includes a checked checkbox for 'Monoisotopic Mass' with the definition '12Cピーカーのm/zのこと'. The 'M+H' aduct type and '+e' charge are selected. The search parameters are set to 'min/max' with a +/- error of 0.001.

4) 一番下にある「Search」ボタンを押す。



実習3 観測されたm/zから化合物を検索（2）

HMDBで検索 (<http://www.hmdb.ca/>)

例) 166.0861455

1) Search -> MS Searchを選択

HMDB

Browse ▾

Search ▾

Downloads

About ▾

ChemQuery Structure Search

Molecular Weight Search

Text Query

Sequence Search

Advanced Search

MS Search

MS/MS Search

GC/MS Search

※画面が小さいときは、右上の
を押すとメニューが出てくる

HMDB

Browse ▾

Search ▾

Downloads

2) 検索するm/z、モード（Positive/Negative）、アダクト、許容誤差（Daまたはppm）を入れてSearchボタンを押す

Query Masses (Da)

166.0861455

Enter one mass per line (maximum 150 query masses per request)

Ionization

Ion Mode

Positive

Adduct Type

M+H
M+NH₄
M+Na
M+CH₃OH+H
M+K
M+ACN+H
M+2Na+H
M+IsoPron+H

Molecular Weight Tolerance ±

5 ppm

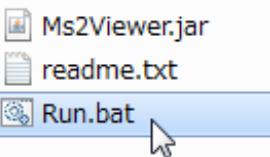
Search

Load Example

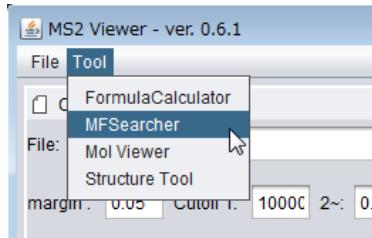
実習4 観測されたm/zから化合物を検索（3）

MFSearcherで検索

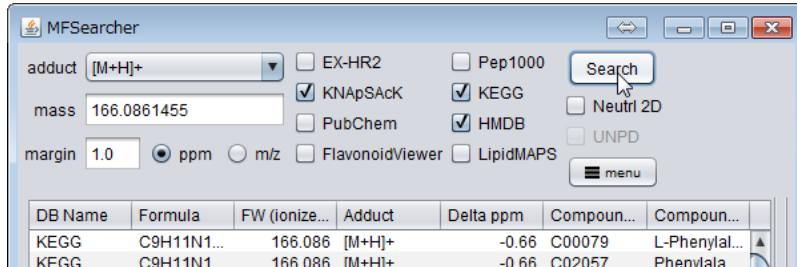
1) ダウンロードしたMS2Viewの、Run.batをダブルクリックして起動



2) ToolメニューのMFSearcherを選択



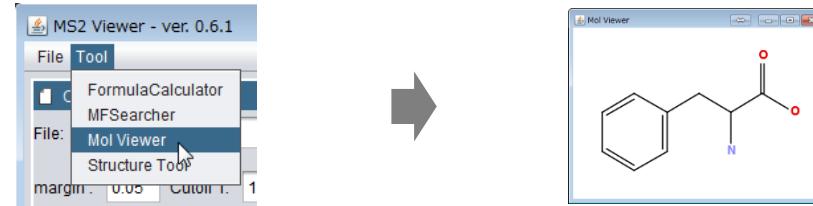
3) mass, アダクト、許容誤差、検索対象データベースを選択し、Searchボタンを押す。



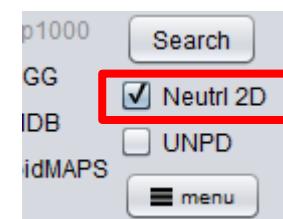
Tips1) 一覧から候補を選び、Linkボタンを押すと、オリジナルのサイトがひらく



Tips2) ToolメニューのMol Viewerを開いている状態で、一覧から候補を選ぶと、構造が表示される
※データベースによっては表示されない場合もあります



Tips3) Neutral 2Dボタンを押して検索すると、立体を無視して化学結合が同じデータが縮約して表示されます



Compound	Compound
PC:[-1]f5...	hydroxy(3-p...
PC:[-1]f5...	lithium;6-(2...
KG:C000...	L-Phenylala...
PC:[-1]f2...	magnesiul...
PC:5909...	methanidyl...
PC:5883...	methanidyl...
PC:[-1]59...	methoxy(6-...
PC:2053...	methoxy(ph...
PC:8891...	methyl (1E)...

実習5 生データを見てみる（1）

MS2Viewerでヒト尿のデータを見る

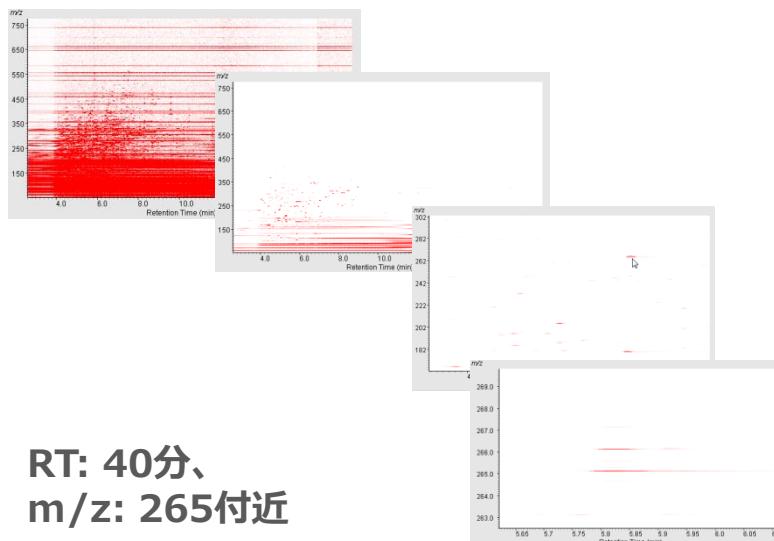
例) 265.1181120988591

Viewerの操作が難しい場合は、直接m/z値をMFSearcherで検索してください。

1) Control Panelのフォルダアイコンから、ダウンロードした「Urine_pos.mzXML」を開く

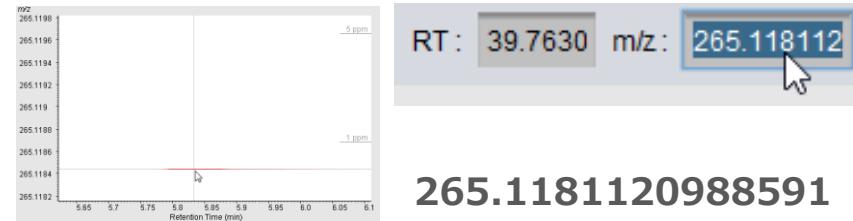


2) 色の濃さを調整しながら、一番強度が強そうなピークを探してみる



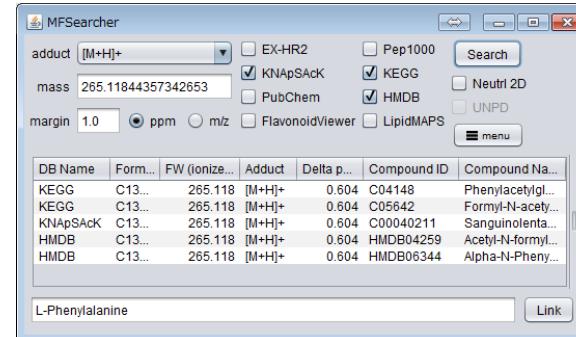
RT: 40分、
m/z: 265付近

2) ^{12}C ピーク（モノアイソトピックピーク）を十分に拡大して、ピーク位置をダブルクリックし、正確なm/z値を取得する。



265.1181120988591

3) 取得した値を使いMFSearcherで検索する



[M+H]
+,
1 ppm,
KNApSAck,
KEGG,
HMDBで検索

4) HMDBのデータを元サイトで見てみる
結果一覧を選んでLinkボタン

実習6 生データを見てみる（2）

パセリのデータを見てみる（データベースでMS/MS検索をしてみる）

Viewerの操作が難しい場合は、ホームページからMS/MSデータをコピー&ペーストして下さい

1) Control Panelのフォルダアイコンから、DLした「Parsley_pos.mzXML」を開く

2) グルタチオンのピークを探す

RT: 20.5分、
m/z: 308.1付近

3) MS2データを取得する

- ①2D画面でShow Prec.のチェックを入れ、MS/MSが取得されたプレカーサーイオンを表示させる。
- ②ピートップ付近のプリカーサーイオン周辺をクリックし、MS2データ一覧表の該当イオンをハイライトさせる
- ③一覧表でハイライトしたイオンをクリックする
- ④MSn View画面で数値データを確認する
- ⑤「S」ボタンを押して、MassBank検査フォーマットでデータをクリップボードにコピーする

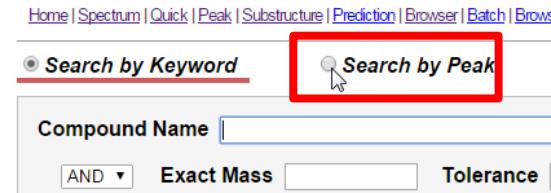
m/z	Int.	NL	Rel.Int.
179.095...	21,759	128.995...	1,000
179.966...	20,901	128.124...	961
234.103...	5,610	73.98666	258
161.942...	5,589	146.148...	257
162.942...	5,421	145.148...	249

Decimal prec

4) MassBank (www.massbank.jp/) へ行き、画面中程の「Quick Search」を選択する



5) Search by Peakを選択する



6) Peak Dataの欄に、3) でコピーしたデータを貼り付け、Searchボタンを押す。

Peak Data

```
179.0958730492175 1000.0
179.96603363554688 980.5802752100052
234.10397338867189 257.8445299065206
161.9420168015625 256.8715206709108
162.94259540039062 249.15615974983573
291.094482421875 117.3300816359285
233.0174560546875 76.397835802111118
```

* m/z and relative intensities(0-999), delimited by a space.
[Example1](#) [Example2](#)

Cutoff threshold of relative intensities

Number of Results

Search

結果画面で、グルタチオンの結果がヒットしていることが確認する

実習7 生データを見てみる（3）

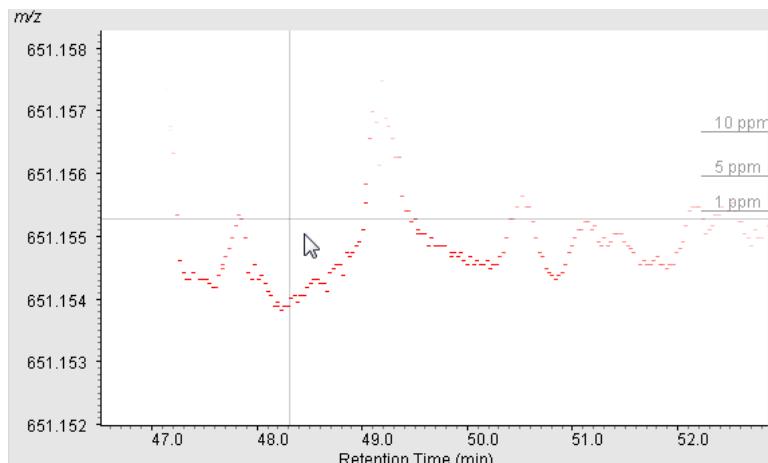
パセリのデータを見てみる（MS/MSの解釈）

1) Control Panelのフォルダアイコンから、DLした「Parsley_pos.mzXML」を開く

2) 色の濃さを調整しながら、一番強度が強そうなピークを探してみる

RT: 48.2分、
m/z: 651.15付近

3) ^{12}C ピーク（モノアイソトピックピーク）を十分に拡大して、ピーク位置をダブルクリックし、正確なm/z値を取得する。



強度が極端に強い領域でマスズレが起きているデータなので、強度が弱い部分を参考に、上図のような部分を正確なm/z値として取得する

4) 取得した値を使いMFSearcherで検索する

m/z: 651.155265037963

[M+H]⁺, 1 ppm, KNApSAcK, KEGG, HMDBで検索

5) 構造が異なる2種類のものがヒットしていることがわかる（HMDBなど）。

6) ピークトップ付近のMS2データを取得する

①2D画面でShow Prec.のチェックを入れ、MS/MSが取得されたプレカーサーイオンを表示させる。

②ピークトップ付近のプリカーサーイオン周辺をクリックし、MS2データ一覧表の該当イオンをハイライトさせる

③一覧表でハイライトしたイオンをクリックする

④MSn View画面で数値データを確認する

例)

m/z	Int.	NL	Rel.Int.
271.06799	1,750,064	380.08624	1,000
519.10907	1,081,284	132.04517	618
565.12860	91,336	86.02563	52

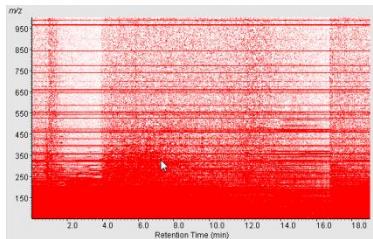
7) Structure Toolを使い、上記二つの化合物候補のうちどちらにあてはまるかを考えてみる

2D画面の基本操作（1）

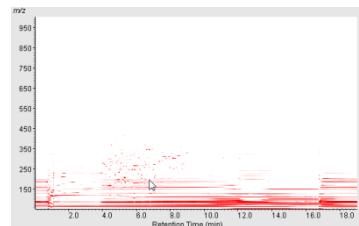
MS2Viewerマニュアル

色の濃さの調整

CTRLキー、SHIFTキーを両方
押しながら、マウスホイールを回す



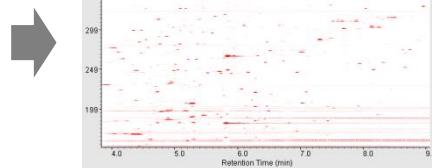
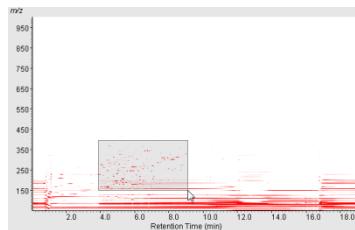
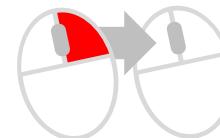
手前に回すと
濃くなる



奥に回すと
薄くなる

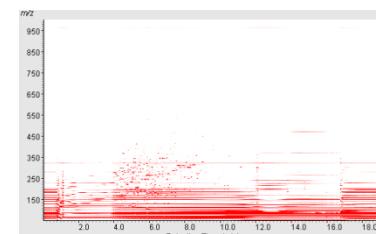
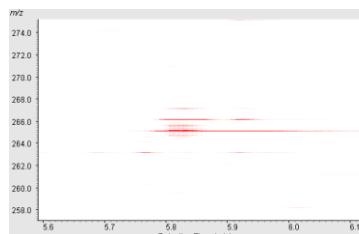
選択範囲を拡大

マウス右ボタンドラッグ



全体表示に戻す

右ボタンをダブルクリック



縦方向だけ全体表示

CTRLキーを
押しながら右
ボタンダブル
クリック



横方向だけ全体表示

SHIFTキーを
押しながら右
ボタンダブル
クリック

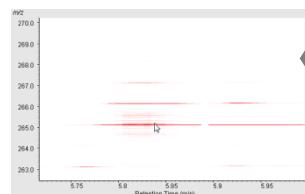


2D画面の基本操作（2）

MS2Viewerマニュアル

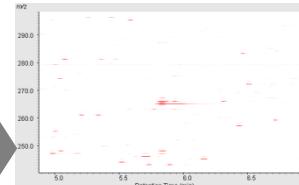
拡大・縮小

マウスホイールを回す



拡大：
手前に回す

縮小：
奥に回す



縦方向だけに拡大・縮小

CTRLキーを押しながらマウスホイールを回す

CTRL



横方向だけに拡大・縮小

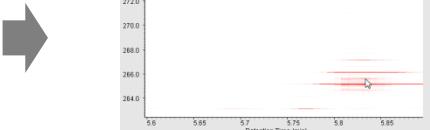
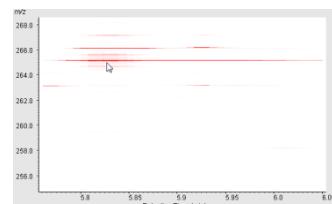
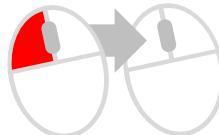
SHIFTキーを押しながらマウスホイールを回す

SHIFT



移動

マウス左ボタンをドラッグ



縦方向だけに移動

CTRLキーを押しながら左ボタンドラッグ

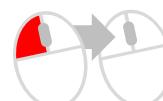
CTRL



横方向だけに移動

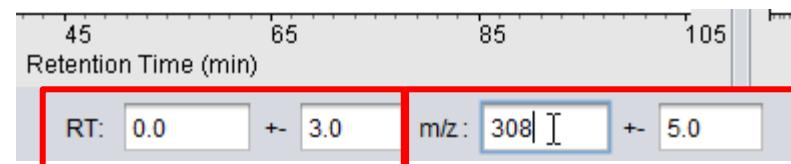
SHIFTキーを押しながら左ボタンドラッグ

SHIFT



任意の選択範囲を表示

2D画面下部のボックスに任意の値を入力して、リターンキーを押す



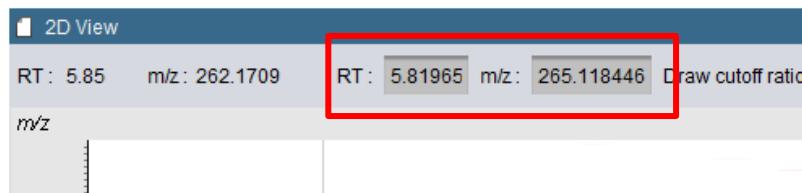
※RT（溶出時間、単位は分）と、m/zのボックスは、それぞれ独立しています。両方の範囲を指定する場合は、RT、m/zそれぞれで、値を設定後にリターンキーを押し下さい

2D画面の基本操作（3）

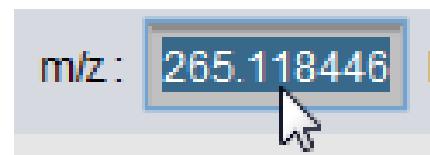
MS2Viewerマニュアル

現在位置の取得

マウス左ボタンをダブルクリック



2D画面上部のボックスに、ダブルクリックした位置の正確な保持時間とm/z値が表示されます。

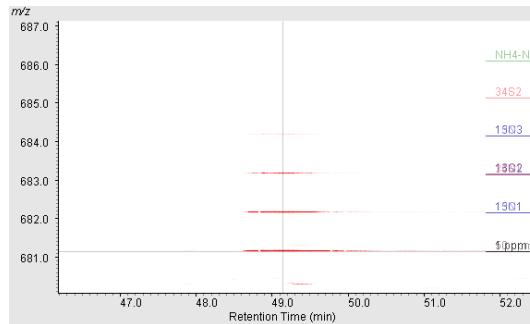


ボックスの中の数字を選択し、CTRLキー+「C」キーを押すと、数値がクリップボードにコピーされます。

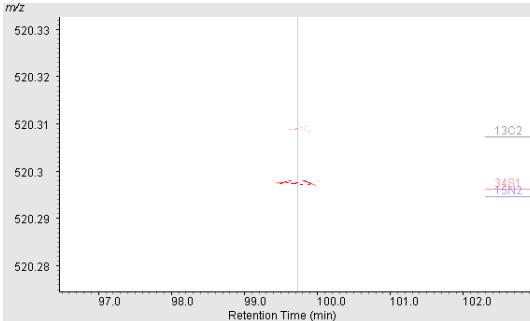
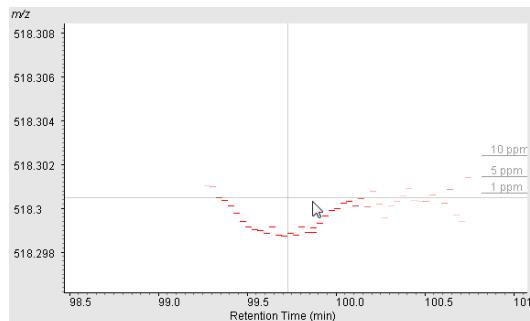
※マウス操作で数字を選択しにくい場合は、CTRLキー+「A」キーを押すと、ボックスの中が全選択されます。

CTRL + 「C」キー：コピー

CTRL + 「A」キー：数字を全選択



2D画面の右端には、m/zの差分を示すルーラーが、ダブルクリックした位置を基準点として表示されます。

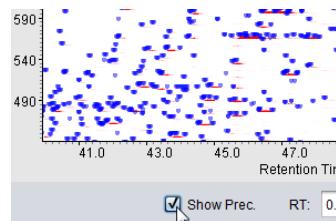


拡大して正確なm/z値を取得したり、そこを起点に³⁴Sピークを判別したり、アダクトの判断をしたりなどに利用できます。

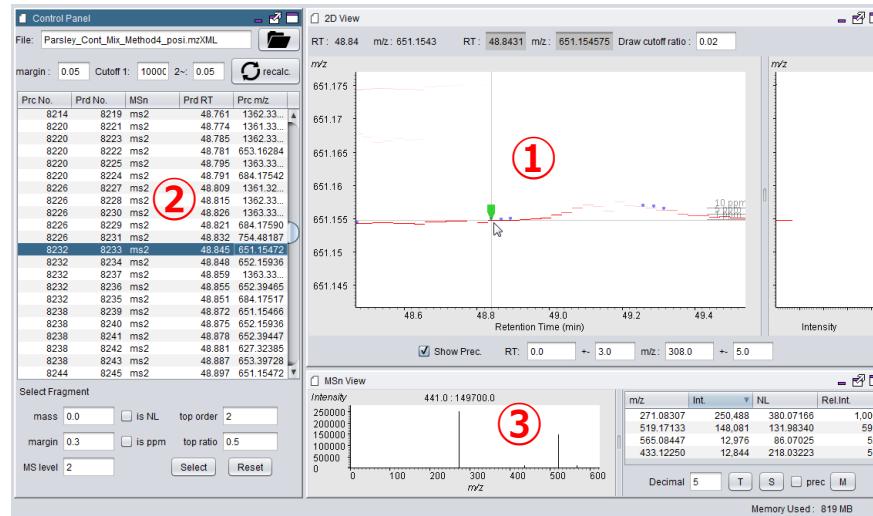
MS2データの操作

MS2Viewerマニュアル

2D画面下部、Show Prec.にチェックをつけます



2D画面上では、MS2データが取得された前駆体イオン（Precursor）の位置を示すインジケーター（青い点）が示されます。

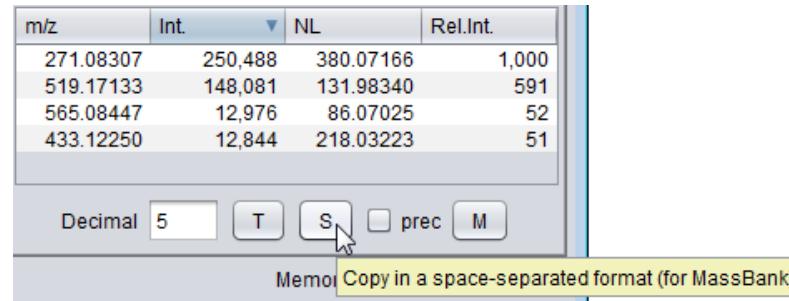


①2D画面上をクリックすると、クリック位置に最も近いプリカーサーイオンが、MS2Viewer画面左の一覧表でハイライトされます。

②ハイライトされたプリカーサーを一覧表上でクリックすると、2D画面上ではその位置が緑のインジケーターで示されます。

③また、②で一覧表をクリックすると、画面下部のMSn View画面に、MSnスペクトルの情報が表示されます。

MSn Viewの数値データ表示画面の下部にある、「T」、「S」、「M」のボタンを押すと、数値データを決まったフォーマットでクリップボードにコピーできます。



「T」：タブ区切りテキストでコピーします。

「S」：スペース区切りでコピーします。

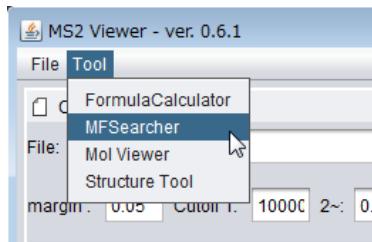
上記ふたつは、m/z値と強度値をコピーします。強度は、最大強度を1000とした相対強度です。

precのチェックをつけた場合は、プリカーサーのm/z値が、1行目に付加されます。

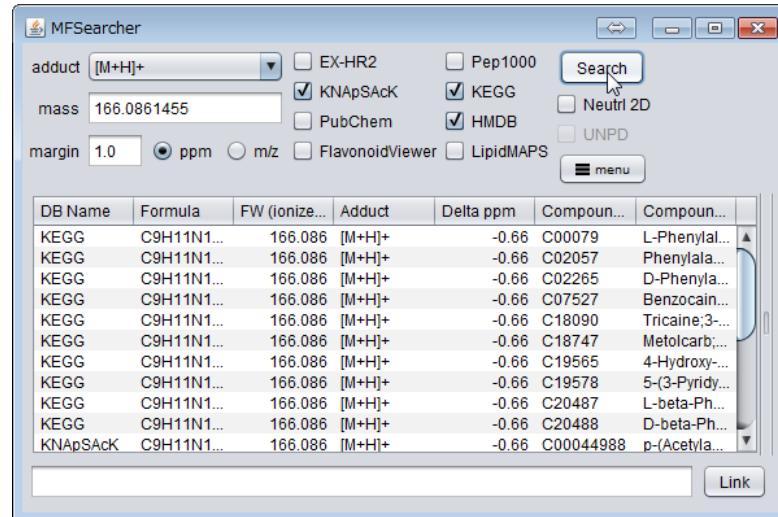
「M」：MAGMaというウェブツール用のフォーマットでコピーします。MAGMaはMS3以上の多段階MSのデータの場合に有効に候補を絞り込むためのツールです。

m/z値から化合物DBを一括検索をしたり組成式候補を計算したりするツール

1) ToolメニューのMFSearcherを選択



2) mass, アダクト、許容誤差、検索対象データベースを選択し、Searchボタンを押す。

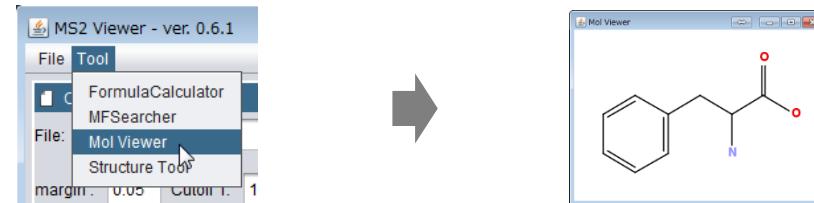


ヒットした候補が一覧表示されます。

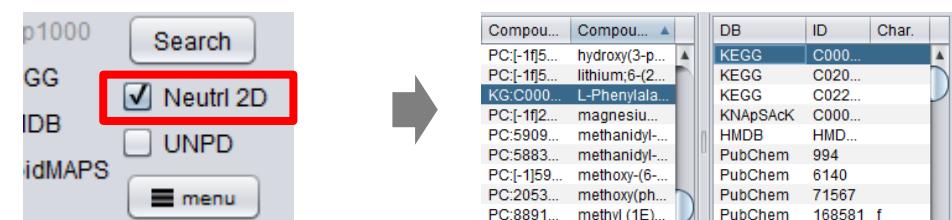
Tips1) 一覧から候補を選び、Linkボタンを押すと、オリジナルのサイトがひらく



Tips2) ToolメニューのMol Viewerを開いている状態で、一覧から候補を選ぶと、構造が表示される
※データベースによっては表示されない場合もあります



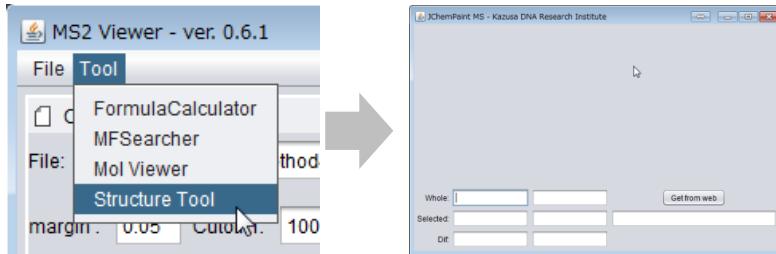
Tips3) Neutrl 2Dボタンを押して検索すると、立体を無視して化学結合が同じデータが縮約して表示されます



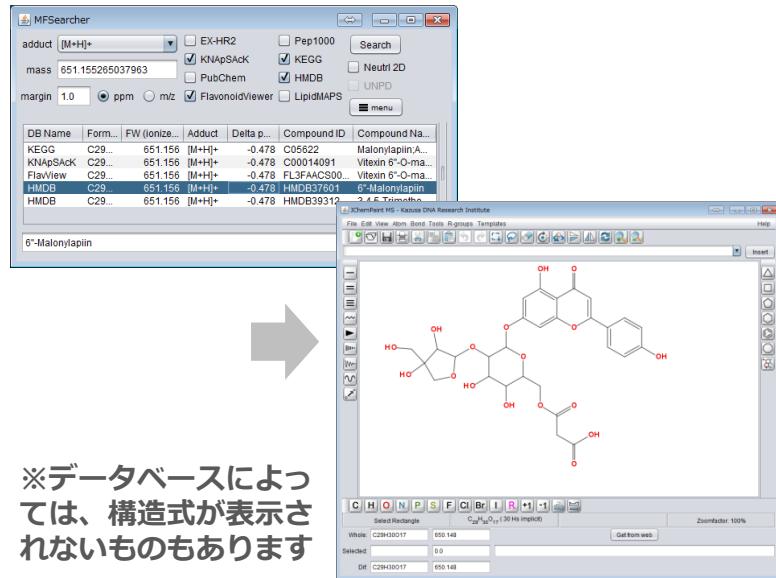
Structure Tool

MS2Viewerマニュアル

ToolメニューからStructure Toolを選択すると、下記のような画面が表示される

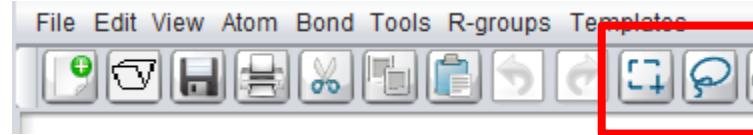


MFSearcherの結果一覧をクリックすると、Structure Tool画面内に構造式が表示される

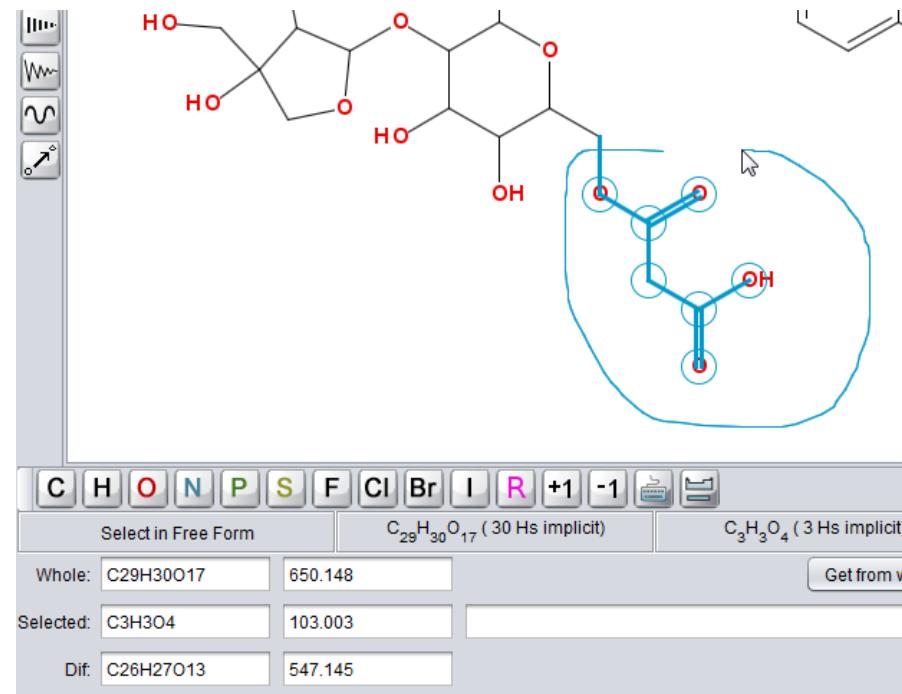


※データベースによつては、構造式が表示されないものもあります

範囲選択ツール、または投げ縄ツールを選択します



画面上の元素を囲むと、選択部分がハイライトされます。選択部分および、残った部分の組成式および精密質量が、画面の左下に表示されます



参考： 化合物データベース

KEGG	www.genome.jp/kegg/	京大、金久研がつくるデータベース。ゲノム、遺伝子、タンパク質、パスウェイが統合されている。
KNApSAcK	kanaya.naist.jp/KNApSAcK/	奈良先端大、金谷研がつくる、天然物-生物情報を軸とした情報データベース。しっかりした文献情報に基づくのが特徴
DNP	dnp.chemnetbase.com/	CRC出版の天然物のデータベース。詳細を見るには有料
UNPD	pkuxxj.pku.edu.cn/UNPD/	北京大学がつくる天然物のデータベース。件数が多いが出典が不明なものも。
ChEBI	www.ebi.ac.uk/chebi/	欧州バイオインフォマティクス研究所（EBI）がつくる化合物分類データベース。化学寄り。
PubChem	pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	米国NHIがつくる化合物データベース。合成物質なども含み登録件数が多い。
ChemSpider	www.chemspider.com/	400を越える化合物データベースを串刺し検索できるサイト。データの更新が遅め。
HMDB	www.hmdb.ca/	カナダ、アルバータ大がつくるヒトのメタボロームデータベース
ECMDB	www.ecmdb.ca/	同、 <i>E. coli</i> のメタボロームデータベース
YMDB	www.ymdb.ca/	同、酵母のメタボロームデータベース
DrugBank	www.drugbank.ca/	同、薬物のデータベース
LIPIDMAPS	www.lipidmaps.org/	脂質のデータベース。ポリフェノール類なども含む。
Flavonoid Viewer	metabolomics.jp/wiki/Category:FL	フラボノイドのデータベース。

参考： 解析ツール

MS/MS解析

MassBank	www.massbank.jp/	実測のMSnスペクトルのデータベース
mzCloud	www.mzcloud.org/	Thermo社が自社のMSで取得したスペクトルのデータベース
METLIN	metlin.scripps.edu/	MSnスペクトルのデータベース
MetFrag	msbi.ipb-halle.de/MetFrag/	MS2から化合物を予測するツール
CFM-ID	cfmid.wishartlab.com/	MS2から化合物を予測するツール
FingerID	research.ics.aalto.fi/kepaco/fingerid/	MS2から化合物を予測するツール
MAGMa	www.emetabolomics.org/	多段階MSから化合物を予測するツール
Sirius	http://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/	同位体パターンと多段階MSから組成式を正確に予測するツール

ポータルサイト・情報

KOMICS	www.kazusa.or.jp/komics/ja/	かずさ研のツール・データベースポータル
PRIMe	prime.psc.riken.jp/	理研のツール・データベースポータル
OmicsTools	omictools.com/	いろんなオミクス関係のツール、データベースを紹介するポータル
Fiehn-Lab	fiehnlab.ucdavis.edu/	UC DavisのO. Fiehnのラボページ。有用な情報が多数。
ESI友の会	sites.google.com/site/esitomonokai/home	日本の若手メタボロミクス研究者がつくる情報発信サイト

参考： レポジトリ

実際に分析した質量分析データの公開

MassBase	webs2.kazusa.or.jp/massbase/	かずさ研の生データ公開サイト。公開数最大級
MetaboLights	www.ebi.ac.uk/metabolights/	EUが作るレポジトリ。標準化を目指している
Metabolome Express	www.metabolome-express.org/	オーストラリアのサイト。GC-MS中心
Metabolomics Workbench	www.metabolomicsworkbench.org/	米国NIHの。ヒトデータ中心。未公開データも多数
MetabolomeX change	metabolomexchange.org/	クロス検索サイト。MetaboLights, Metabolomics Workbenchなどが探せる