

応用講座 II

COMMENTARY

CE-MS のメタボローム解析への展開

Development of CE-MS for Metabolomics

曾 我 朋 義*

Tomoyoshi SOGA

(Received December 8, 2002; Accepted January 31, 2003)

Metabolomics, which can be defined as the measurement of the level of all intracellular metabolites, has become a powerful new tool for gaining insight into functional biology. Intercellular metabolites not only provide metabolic phenotypes but also inducers to gene expression. Thus, metabolome analysis will be as important as genome and proteome research. However, very few methods for a large-scale metabolite analysis have been reported. This paper reports a method for the direct and quantitative analysis of charged metabolite using capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry (CE-ESI-MS). Its utility is demonstrated in the determination of basal metabolic intermediates of glycolysis and the TCA cycle pathways in *Bacillus subtilis* cells, yielding new information about how changes in metabolites are related to sporulation events.

1. はじめに

ヒトゲノムをはじめさまざまな生物種のゲノム解析結果が報告され、生命科学の研究はポストゲノムといわれる次の段階に入っている。ポストゲノム研究は i) ゲノムレベルでの全遺伝子, ii) それらの遺伝子が細胞内で発現する最初の姿である mRNA の総体 (トランスクリプトーム), iii) mRNA によって生産されるタンパク質の総体 (プロテオーム) などの解明であり、現在これらの研究を行うための方法論の開発に大きな力が注がれている。

昨年、欧米科学誌が相次いで、細胞機能を解明するためには、遺伝子やタンパク質の発現のみならず、酵素タンパク質が生産する全代謝物質 (メタボローム) を網羅的に測定し、遺伝子発現や酵素活性との関係を明確にすることが必要であると報告した^{1), 2)}。細胞活動の維持に必要な物質と化学エネルギーは代謝により生産され、これらの代謝物質は、遺伝子と酵素の発現量に基づいて生産される一方、代謝物質の変動が、遺伝子発現を制御している事実が明らかにされているからである。

しかし、代謝物質を網羅的に測定するメタボローム解析の決定的手法はまだ確立されていないのが現状である。細胞内の代謝物質の多くは、イオン性が高い、UV 吸収がない、不揮発性、低濃度、性質が似ているなどの特徴を有し、さらに細胞内に 1,000 以上存在することが、代謝物質の一斉分析をより困難なものにしている。これまでガスクロマ

トグラフィー-質量分析計 (GC/MS)³⁾ や陰イオン交換液体クロマトグラフィーに電気伝導度検出器と UV 検出器を直列につないだ方法 (AELC-CD/UV)⁴⁾ を用いて細胞内代謝物質を測定した例が報告されている。

GC/MS 法は高感度、高分離であるが、代謝物質を揮発化するための誘導体化が必須であり、多くの代謝産物を誘導体化するには、いくつかの異なった誘導体化反応が必要となる。また、誘導体化できない代謝物質も多く存在するなどの問題がある。また AELC-CD/UV 法は、分離能、選択性、感度が低いため、測定可能な代謝物質が限られている。AELC に質量分析計を組み合わせれば、これらの問題を解決できるが、AELC-MS に使用できる揮発性の移動相がほとんどない。このように従来法では、細胞内のほとんどの代謝物質を一斉に測定することは極めて困難であった。

近年、ミリマス分析が可能なフーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置 (FT-ICRMS) などの高分解能 MS を用いた試料直接導入 (インフュージョン法) によるメタボローム解析も盛んに行われるようになった⁵⁾。この方法は簡便であり、瞬時に代謝物質を一斉スクリーニングできる点が大きな魅力である。しかし FT-ICRMS 法は、細胞内に多く存在する代謝物質の異性体を区別することができず、また定量性に乏しい。

筆者らは、イオン性化合物に対して高速、高分離、高感度を有するキャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) を用いて、細胞内の極性代謝物質を網羅的に定性定量分析する方法を開発した。この方法を、枯草菌中のアミノ酸などの陽イオン性代謝物質および解糖系、TCA 回路などの陰イオン性代謝物質の一斉分析に応用した。以下に、本手

* 慶應義塾大学先端生命科学研究所 (〒997-0017 鶴岡市大宝寺)

Institute for Advanced Biosciences, Keio University (Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan)

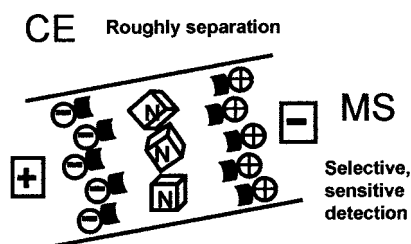


Fig. 1. Strategy for metabolome analysis by CE-MS.

法の分析原理, 測定結果, およびメタボローム解析の今後の課題を報告する。

2. キャピラリー電気泳動-質量分析計によるメタボローム測定法

キャピラリー電気泳動 (CE) は高速, 高分離, 試料消費量が少ないなどの特徴を有し, 著しい発展を遂げている分離分析法である。現在, 低分子化合物から, 分子量の大きいペプチド, タンパク質, DNA まで数多くの化合物が CE により測定されている。特に現在, ヒトをはじめとする多くの生物のゲノム解析にマルチキャピラリー電気泳動装置 (DNA キャピラリーシーケンサ) が用いられ, 生命科学の分野で大きな成果を上げている。

しかし, CE ははるかに高い分離能をもちながら, 汎用的な分離分析法である高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やガスクロマトグラフィー (GC) ほどには使用されていないのが現状である。その主な理由は, UV 検出器や UV ダイオードアレイ検出器を装備した通常の CE では, 感度および定性能力にも限界があるからであった。

近年, 高い定性能力と感度を有する質量分析計が GC や HPLC のみならず, CE にも接続できるようになった。CE-MS は CE の分離能と MS の高い感度, 選択性が組み合わされた強力な分析法であり, 上記した CE の欠点を補う新たな測定装置である。すでに CE-MS によるいくつかの化合物の測定例が報告されている^{6)~9)}。細胞内代謝物質の多くは, カルボキシル基, リン酸基, アミノ基などの極性官能基をもつイオン性化合物であり, 筆者らは CE-MS を用いてこれらの代謝物質の網羅的な測定法を開発した。Fig. 1 にそのストラテジーを示した。

CE-MS ではキャピラリーに電圧を印加すると, 陽イオン性代謝物質はすべて陰極方向に移動する。キャピラリー内で各物質はその物質の電荷と水とイオン半径の違いで分離され, 陰極に接続された質量分析計に導入される。質量分析計で各物質は, その質量数に基づき, 選択的かつ高感度で検出される。この方法の最も優れている点は, 中空のキャピラリーを用いているため, 一つの分析条件ですべての陽イオン性代謝物質を質量分析計に導入できる点である。反対に陰イオン性代謝物質を測定する場合は, 質量分析計を陽極側に接続する。したがって, CE-MS ではわずか二つの測定条件で, 細胞内代謝物質の一斉分析が可能になる。

3. 細胞内代謝物質の抽出方法

細胞内代謝物質を網羅的に測定するためには, 細胞から代謝物質を同時に抽出する必要がある。これを達成するため, 以下のいくつかの点に考慮して抽出法を開発した。i) 細胞にストレスがかかると代謝が回るため, 細胞内代謝物質濃度を正確に測定するには, 瞬時に酵素を失活する必要がある。ii) 陽および陰イオン性代謝物質を同時に抽出する。iii) 感度と定量性を向上するため, 抽出時に代謝物質の濃縮を行う。iv) CE-MS の能力を最大限引き出すため, 分析前の試料は純水に溶解する。

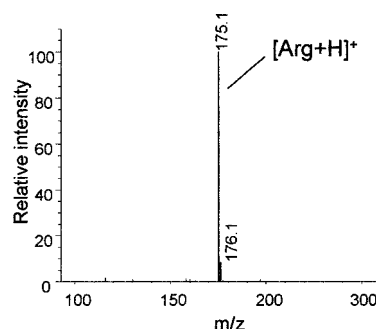
枯草菌を用いて検討した結果, メタノールを用いて代謝産物を抽出する方法を開発した。枯草菌培養液¹⁰⁾ 10 mL を 0.45 μm のフィルターを通し, フィルター上の細胞を内標が添加されているメタノールに浸し, 酵素タンパク質を失活させた。その後 Mill-Q 水およびクロロホルムを加え十分振とうした。上相の水-メタノール相を採り, 分画分子量 5 kDa の遠心限外ろ過フィルターを用いて除タンパクを行った。その後ろ液を凍結乾燥し, 測定前に 20 μL の Mill-Q 水を加えて溶解した。この方法により, 代謝物質を 500 倍濃縮することに成功した。

4. CE-MS による代謝物質の一斉分析法

使用した装置はすべて Agilent Technologies 社製を使用した。キャピラリー電気泳動装置は Agilent CE, 質量分析装置は Agilent 1100 MSD を用いた。イオン化法にはエレクトロスプレー (ESI) を用い, エレクトロスプレーニードルへのシース液の送液を Agilent 1100 アイソクラティック HPLC ポンプで行った。Agilent Chemstation ソフトウェアからすべてのシステムのコントロール, データ採取およびデータ解析を行った。

4.1 枯草菌中の陽イオン性代謝物質の一斉分析

最初に CE-MS によるアミノ酸の一斉分析条件を開発し, それを陽イオン性代謝物質の一斉分析に応用した。アミノ酸の等電点は 2.77 (Asp) から 10.76 (Arg) である。したがって, 泳動緩衝液の pH を 2.77 以下にすれば, すべてのアミノ酸が陽イオンとなり, 陰極 (MS) 方向に泳動し, 一斉分析が可能になる。そこで pH が 2.77 以下になり, かつ揮発性であるギ酸を CE-MS の泳動緩衝液に用いた。CE-MS の分離に関するギ酸の濃度の影響を検討した。

Fig. 2. Positive ion ESI mass spectrum of Arg.⁷⁾

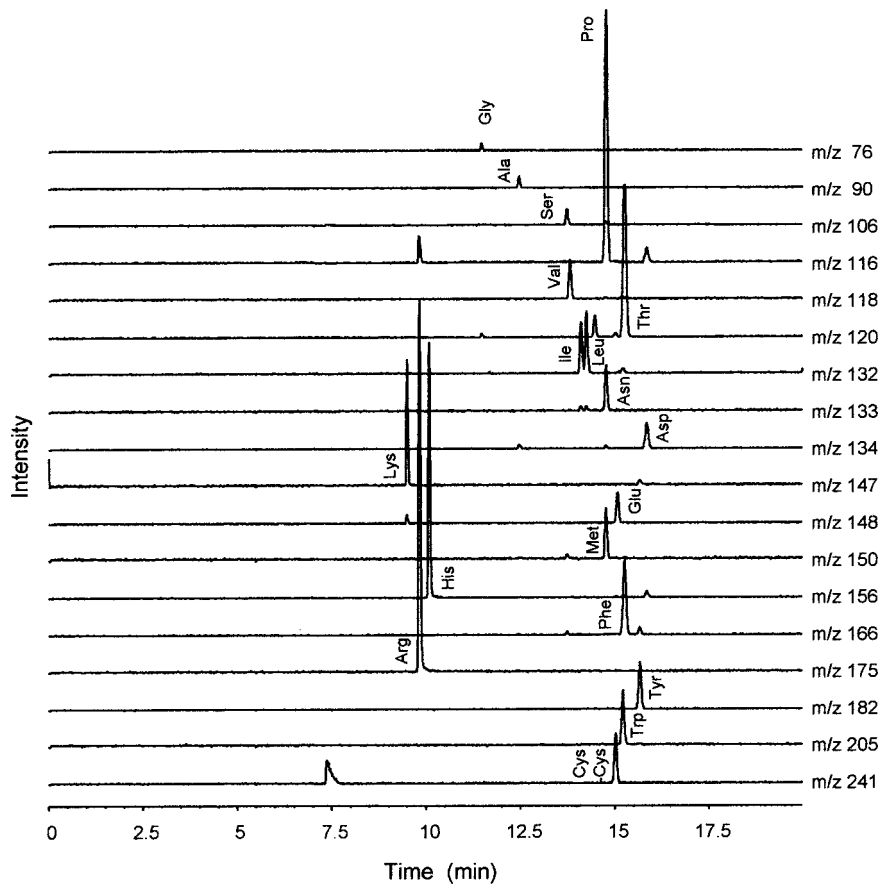


Fig. 3. CE-MS selective ion electropherograms for amino acid standards.⁷⁾

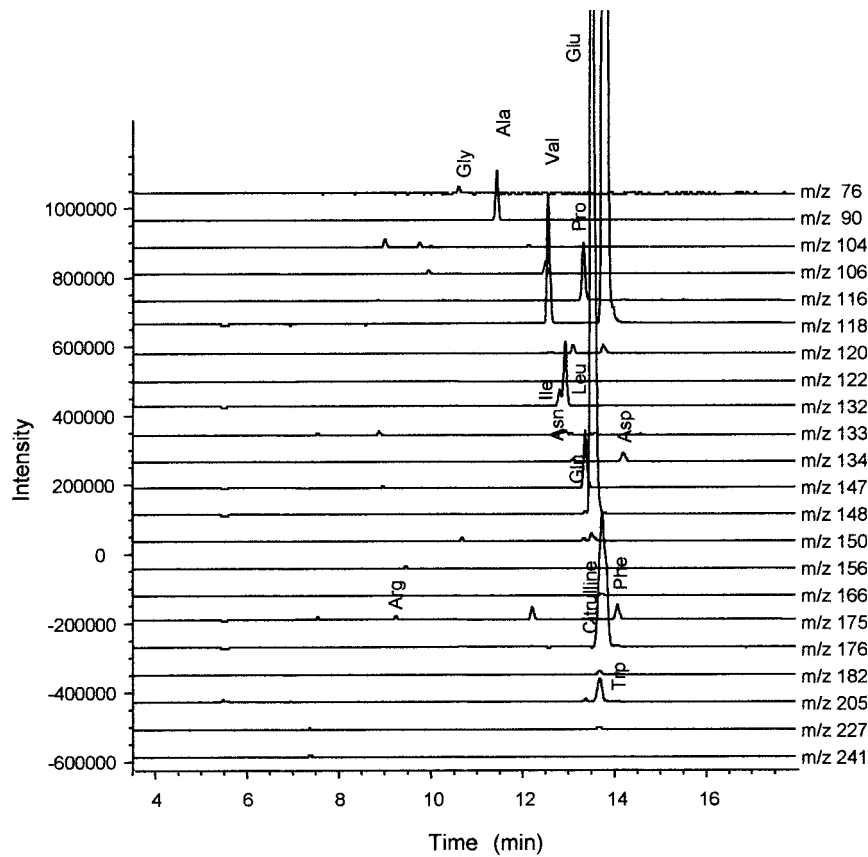


Fig. 4. Selective ion electropherograms for cationic metabolites of *B. subtilis*.

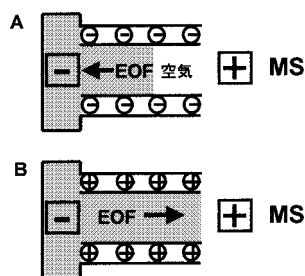


Fig. 5. Schematic of the EOF profile in CE-MS with negative mode. (A) Normal EOF, and (B) EOF reversal by SMILE(+), cationic polymer (Polybrene)-coated, capillary.

ところ、100 mM 以下 (pH 2.3 以上) になるとアミノ酸のピークが広がり、理論段数が極端に低くなった。反対にギ酸の濃度を高くすると、ピーク形状が大幅に改善され、1 M ギ酸 (pH 1.8) を用いると短時間で良好なアミノ酸の分離が得られたため、1 M ギ酸を泳動緩衝液として使用した。

CE/ESI-MS においては、シース溶液が感度のみならず分離にも影響を与える。一般には、揮発性のギ酸や酢酸のアモンニウム水溶液とメタノールの混合溶液が CE/ESI-MS に用いられている。ここではシース液の塩の種類、濃度、メタノールの混合比および流速について 19 成分のアミノ酸の CE-MS の感度 (S/N) および再現性を検討した結果、5 mM 酢酸アンモニウム-50% メタノール溶

液、流速 10 μ L/min を用いた場合が、最も良い結果を与えたため、これを至適シース液の条件とした⁷⁾。これらの CE-MS 条件を用いてアミノ酸 19 成分を測定した。Fig. 2 に Arg のマスペクトルを示した。

Arg の分子量は 174 であり、プロトンが付加した 175 のプロトン化分子 $[M+H]^+$ が観察された。他のアミノ酸についても同様に $[M+H]^+$ の分子イオンが認められ、それぞれのアミノ酸の $[M+H]^+$ を検出することで各アミノ酸を選択的に検出することができた (Fig. 3)。

この測定法によるこのアミノ酸標準液の繰返し再現性 ($n=8$) は、移動時間が 1.2% 以内、ピーク面積が Met を除いて 2.0 から 4.7% であった。また生体アミン、ポリアミンなど他の陽イオン性化合物もこの CE-MS の一つの条件で測定が可能であった⁷⁾。

本法を、枯草菌中の陽イオン性代謝物質の測定に応用した。代謝物質の抽出は前述の方法を用いて行った。Fig. 4 にリンゴ酸過乗培地で培養した対数増殖期の枯草菌の陽イオン性代謝物質の測定結果を示した。これらのアミノ酸の定量値を枯草菌 1 細胞当たり換算すると 0.1~200 a mol であった。

4.2 枯草菌中の陰イオン性代謝物質の一斉分析

CE-MS の Negative モード (MS 側が陽極) を用いた陰イオン性物質の分析法はこれまでほとんど報告されていなかった。理由は、CE-MS 装置には出口側 (MS 側) 緩衝液

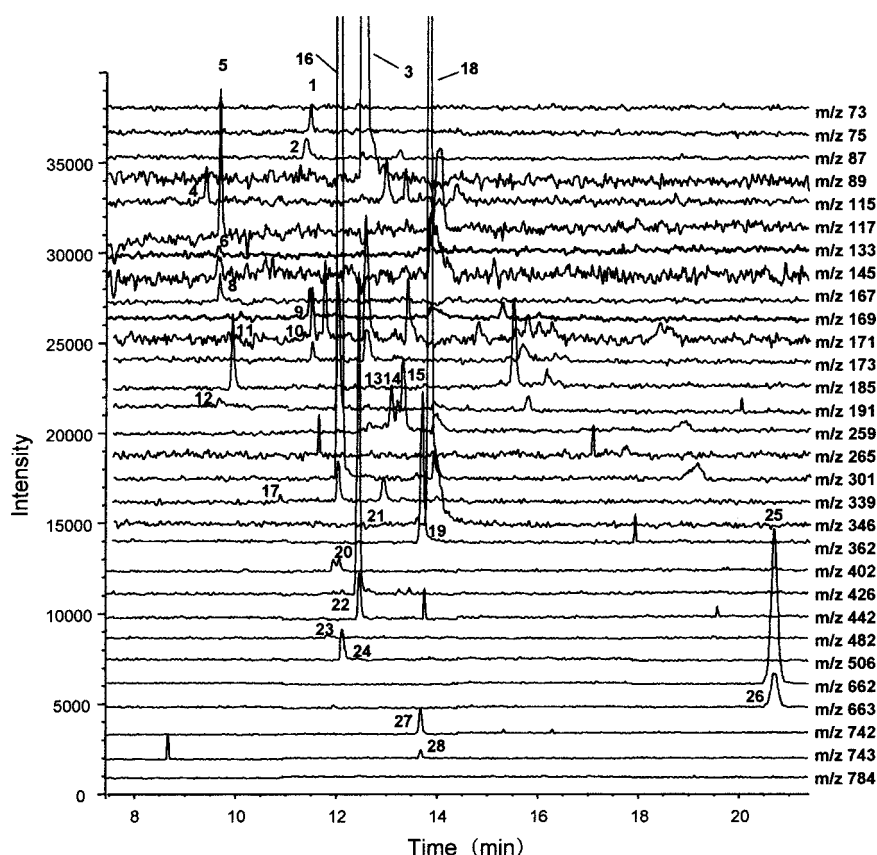


Fig. 6. Selected ion electropherograms of metabolic intermediates at the end of exponential growth of *B. subtilis*. The peak identification is 1, glycolate; 2, pyruvate; 3, lactate; 4, fumarate; 5, succinate; 6, malate; 7, 2-oxoglutarate; 8, PEP; 9, DHAP; 10, glycerol 3P; 11, 3PG; 12, citrate; 13, G1P; 14, F6P; 15, G6P; 16, PIPES (is); 17, F1,6P; 18, AMP; 19, GMP; 20, CDP; 21, ADP; 22, GDP; 23, CTP; 24, ATP; 25, NAD; 26, NADH; 27, NADP; 28.

バイアルがないからである。したがって、通常の CE-MS を用いた陰イオン分析システム (Fig. 5A) では電気浸透流 (EOF) がキャピラリーの出口 (MS 側) から入口側に流れるため、液体のない空気のゾーン (白で示した) が生じて電流が落ちる。そこで筆者らはこの問題を解決するため、Fig. 5B に示したように表面をプラスにパーマネントにコーティングしたキャピラリー¹¹⁾を用いて EOF を MS 側に反転させた。この方法の測定条件を最適化することにより連続的かつ安定な CE-MS による陰イオンの測定が可能になり、細胞内に多く存在する有機酸、リン酸化合物、糖リン酸などの陰イオン性代謝物質の一斉分析が可能になった¹²⁾。

本法を用いて、孢子形成前後の枯草菌中のエネルギー代謝に関与する解糖系、TCA 回路の代謝物質およびヌクレオチド類を一斉分析し、その定量結果を解析することにより孢子形成に関与する代謝物質の解明を試みた。Fig. 6 に孢子形成直後の枯草菌から前述の方法で抽出した陰イオン性代謝物質の測定結果を示した。

この定量結果を孢子形成 1 時間後の定量結果と比較したところ、2-オキソグルタル酸、クエン酸、コハク酸、GMP、GDP などの物質や、質量数 173 の未知成分で大きな濃度変化が観察された。これらの成分が孢子形成に関与していることが示唆され¹²⁾、文献で述べられている孢子形成時の代謝産物量の変動結果¹³⁾とよく一致していることが確認された。

5. 今後の課題

CE-MS を用いることで、細胞内の陽および陰イオン性代謝物質の高感度な網羅的測定法が可能になった。CE-MS は誘導体化を行うことなくかつ同一条件でほとんどのイオン性代謝物質を測定できる画期的な方法である。特に CE は LC では得ることのできない分解能の高さを有するため、細胞内に存在する糖代謝物のような構造異性体を多数含む代謝分子群に対しても一斉分析を可能にした。すでに筆者らは、CE-MS を用いて枯草菌内の 1,600 以上の代謝物質を検出し、そのうち 129 成分の代謝物質を同定した。

今後は、1,500 以上存在する未知代謝成分の同定がメタボローム研究の大きな課題となる。現在、筆者らはいくつかの方法を駆使してこのチャレンジングな難題に取り組もうとしている。すでに CE-MS を用いて 350 種類以上の代謝物質標準品を測定し、各代謝物質の m/z 、移動時間、面積値などをデータベースに登録している。今後、市販されているすべての代謝物質を購入後、CE-MS で測定し、代謝物質同定のための CE-MS データベースおよび検索ツールを構築する予定である。さらに、未知代謝物質を飛行時間型質量分析計、三連四重極型質量分析計で測定し、得られたミマス測定値からの組成式、MS/MS 測定による構造情報および CE-MS の測定結果から、LIGAND¹⁴⁾、Atomic Reconstruction of Metabolism (<http://www.metabolome.jp/>) データベースなどにある数千の代謝物質リストから、未知代謝物質を特定する方法を開発する予

定である。

6. おわりに

今回は CE-MS による代謝物質の網羅的な定量分析法を述べた。今後 CE-MS 法はイオン性のメタボローム解析に大きな威力を発揮すると思われる。しかし、細胞内には中性の代謝物質も数多く存在する。現在、メタボローム解析法は絶対的な方法は存在しておらず、測定対象物によって、抽出法、分離手法 (CE, LC, GC など) を考慮しなければならない。検出器としては質量分析計が不可欠であり、さらに定量分析か定性分析かによって種々のタイプの質量分析計を駆使する必要がある。

メタボローム解析法の開発は欧米でもまだ始まったばかりである。メタボローム解析は、細胞の代謝活動の全貌を明らかにし、代謝のメカニズムを解明するだけでなく、新規の有用代謝物質や多くの疾病の診断マーカーの発見を可能にする。現在のメタボローム測定法の分解能、感度、スループットは、質量分析計の性能に大きく依存しており、標準品が手に入らない未知代謝物質の同定は質量分析計なしには行うことができない。このようにメタボローム解析における質量分析計の役割はたいへん大きく、今後のさらなる発展を期待したい。

文 献

- 1) T. Ideker, V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. Eng, R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold, and L. Hood, *Science*, **292**, 929 (2001).
- 2) L. M. Raamsdonk, B. Teusink, D. Broadhurst, N. Zhang, A. Hayes, M. C. Walsh, J. A. Berden, K. M. Brindle, D. B. Kell, J. J. Rowland, H. V. Westerhoff, K. van Dam, and S. G. Oliver, *Nature Biotech.*, **19**, 45 (2001).
- 3) O. Fiehn, J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R. N. Trethewey, and L. Willmtzer, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1157 (2000).
- 4) M. Bhattacharya, L. Fuhrman, A. Ingram, K. W. Nicke-
rson, and T. Conway, *Anal. Biochem.*, **232**, 98 (1995).
- 5) A. Aharoni, C. H. R. De Vos, H. A. Verhoeven, C. A. Maillepaard, G. Kruppa, R. Bino, and D. B. Goodenowe, *OMICS*, **6**, 217 (2002).
- 6) S. K. Johnson, L. L. Houk, D. C. Johnson, and R. S. Houk, *Anal. Chim. Acta*, **389**, 1 (1999).
- 7) T. Soga and D. N. Heiger, *Anal. Chem.*, **72**, 1236 (2000).
- 8) F. Lafont, M. A. Aramendia, I. García, V. Borau, C. Jiménez, J. M. Marinas, and F. J. Urbano, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 562 (1999).
- 9) O. Schramel, B. Michalke, and A. Kettrup, *J. Chromatogr. A*, **819**, 231 (1998).
- 10) A. Fouet and A. L. Sonenshein, *J. Bacteriol.*, **172**, 835 (1990).
- 11) H. Katayama, Y. Ishihama, and Y. Asakawa, *Anal. Chem.*, **70**, 5272 (1998).
- 12) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, and T. Nishioka, *Anal. Chem.*, **74**, 2233 (2002).
- 13) D. W. Dingman, M. S. Rosenkrantz, A. Fouet, and A. L. Sonenshein, *J. Bacteriol.*, **169**, 3068 (1987).
- 14) S. Goto, Y. Okuno, M. Hattori, T. Nishioka, and M. Kanehisa, *Nucl. Acids Res.*, **30**, 402 (2002).

Keywords: Metabolomics, Capillary electrophoresis, Mass spectrometry, *Bacillus subtilis*, Sporulation