

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871136

研究課題名(和文) LC-QqQ/MSを用いたメタボロミクス研究に資するデータ解析システムの開発

研究課題名(英文) Development of a data processing system for LC-QqQ/MS based metabolomics

研究代表者

津川 裕司 (Tsugawa, Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：30647235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究では、液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析を用いた「ワイドターゲットメタボロミクス」のためのデータ解析基盤を構築した。三連四重極型質量分析装置はMultiple Reaction Monitoring法を用いることにより、高い選択性を持った代謝物の高感度分析が可能である。しかしながら、粗抽出物を分析する際得られる複雑なクロマトグラムから客観的に目的化合物を判定する基準ならびに大規模検体分析に特化したソフトウェア最適化は行われていなかった。そこで同定の信頼性を担保し、かつ本来の目的である定量メタボロミクスを円滑に実行するためのソフトウェアMRMPROBSを開発した。

研究成果の概要(英文)：We developed a data processing pipeline for widely targeted metabolomics by using the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Widely targeted metabolomics became increasingly popular in metabolomics for the simultaneous analysis of several hundred metabolites at high sensitivity and selectivity. However, the identification criterion to distinguish the target metabolites from the isomeric metabolites or background noise has not been developed. In addition, a user-friendly software to deal with the large-scale data sets is required. MRMPROBS was therefore developed for the assessment of large-scale MRM data applicable to any instrument or experimental conditions.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：メタボロミクス データ処理 化合物同定 質量分析

1. 研究開始当初の背景

生体内低分子代謝産物の微細な変動を高解像度で捉えることができるメタボロミクスの技術は、熟練官能試験者によってのみ可能であった品質管理や難病疾患の早期発見を可能にする技術として注目されている。昨今、液体クロマトグラフィーに三連四重極型質量分析を接続したハイブリッドシステム (LC/QqQ/MS) により解糖系、ペントースリン酸経路、エネルギー代謝を構成する核酸・補酵素類および脂質の分析が行われている。三連四重極型質量分析装置は、multiple reaction monitoring (MRM) 法*を用いることにより、高い選択性を持った高感度分析ができることに加え、近年のスキャンスピードの向上により一度の分析で数百もの代謝物一斉測定も可能である。

しかしながら、MRM 法は卓越した定量性がある一方、定性能力が低下することが問題点として挙げられる。その理由として、(1) 整数質量しか取得できない、(2) 定性に用いる確認用 MRM は代謝物につき (実用性を考慮して) 1-2 つほどしか設定しない、(3) MRM 法だけでは異性体の判別は困難、ということが挙げられる。また、大規模なコホート研究等により出力される膨大な MRM データセットを解析するための標準的なメタボロミクス用ソフトウェア開発が強く望まれていた。

*MRM 法とは液体クロマトグラフィーより溶出してきた代謝物イオン (プリカーサーイオン) を第一四重極 (Q1) で選択し、第二四重極 (Q2) において適切なエネルギーを与え代謝物のフラグメンテーションを誘起し、得られたプロダクトイオン群の中から目的代謝物特有のプロダクトイオンを第三四重極 (Q3) にて選択することで、バックグラウンドノイズの影響を除き、対象化合物の高感度分析を達成する方法である。また、対象化合物ごとに適切なプリカーサーイオン、エネルギー、プロダクトイオンの条件 (MRM トランジション) を決定することで、より高感度で代謝物の測定が可能である。

2. 研究の目的

当該研究では、粗抽出サンプルを分析するというメタボロミクス特有の「複雑な」、つまり同一 MRM により検出される異性体やノイズピーク群の中から目的代謝物を客観的に決定するための「同定指標」の構築に取り組む。また、LC/QqQ/MS 本来の目的である定量メタボロミクスを円滑に実行するためのソフトウェア開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 各社 MRM データを読み込むための基盤を確立する。これまで MRM データの標準フォーマットは構築されていなかったため、各質量分析メーカーより得られる分析データ

の共通フォーマットを作成し、ソフトウェアの開発環境を整備する。

(2) 化合物同定に必要な MRM データベース構築を行う。異性体が多く存在する低分子代謝物を一義的に定義するためには、定量用の MRM トランジションに加え、確認用 MRM トランジション及びその強度比、並びに代謝物の保持時間が必須と考えられる。この MRM データベースを元に、化合物同定の確からしさを評価する基準を確立する。

(3) MRM 分析により検出されたピークを客観的に評価するためのスコアリング手法を開発する。並びに、大規模データに適用可能かつデータ解析を円滑に遂行するためのソフトウェア開発を行う。

4. 研究成果

(1) 各社 MRM データを読み込むための基盤技術の構築は、ライフィクス株式会社との共同研究により行った。現在のところ、主要分析メーカーである AB Sciex, Agilent Technologies, Shimadzu, Thermo Fisher Scientific, Waters の 5 社について対応が完了している。各社データは無償提供されているファイルコンバーター (<http://www.reifycs.com/AbfConverter/index.html>) により共通フォーマットである Analysis Base File (ABF) に変換される。以下で紹介するソフトウェアは、この ABF データをインポートすることで解析を行う仕様となっている。MRM データは従来、各社メーカーに付属したソフトウェアにより解析が行われていたため、分析結果の差異はソフトウェアの性能にも依存するという問題があった。当該研究によりデータ解析基盤が統一されると期待される。

(2) MRM データベースの構築は、主に大阪大学工学研究科福崎英一郎教授の研究室の協力により行われた。現在、計 5 つの分析プラットフォームにおいて全 585 化合物の MRM 条件を構築している。これらデータベース取得にあたって用いられた分析条件、並びにデータベースは無償ダウンロード可能である (<http://prime.psc.riken.jp/>)。

(3) MRM データベースと実測データを比較し、目的代謝物を客観的に決定するための評価指標を構築した。具体的には、(a) 実測ピークの保持時間とデータベースに登録されている保持時間の比較、(b) 定量用 MRM トランジションと確認用トランジションの比率をデータベースに登録されているものと比較、(c) ピーク強度、これら 3 つを含む計 5 つの指標 (詳細は論文参照のこと) を組み合わせた統合スコアにより、同定判断基準を構築した。本スコアリング手法を用いることで、同一 MRM 条件で検出される異性体由来ピーク

もしくはバックグラウンドノイズの中から、客観的に目的代謝物を捉えることが可能となった (Tsugawa et. al. *Analytical Chemistry*, **85**, 5191-5199, 2013) .

(4) 上記アルゴリズムを搭載し、かつ本来の目的である定量メタボロミクスを円滑に実行するためのソフトウェア MRMPORBS を開発した (図 1) .



図 1. MRMPROMS のスクリーンショット

本ソフトウェアに搭載されているスコアリング手法を元に、目的代謝物を客観的かつ円滑に判断することが可能であるが、LC/Qq/MS を用いる最大の目的は「定量」である。具体的には、ピークの定量は「面積値」で行うことになるが、「ピークの開始位置」と「ピークの終了位置」を、ユーザーは「目視手作業により」修正を行わなければならない。(このようなピーク認識アルゴリズムは、また別の大きな課題でもある。)

MRMPROBS の Graphical User Interface (GUI) は、ユーザーが確認したい代謝物の MRM 分析結果を、「全サンプル一度に閲覧 (正確には 15 サンプルごとで、スクロールにより表示可能)」するように設計されている。これによりユーザーは、複数サンプルのピーク認識結果を一度に確認できることから、「ピーク認識が芳しくない」サンプルをすぐに判定でき、マニュアルでの修正を円滑に行うことが可能である (Tsugawa et. al. *Bioinformatics*, **30**, 2379-2380, 2014) . また、現在のメタボロミクス研究では、一度の分析において数百もの代謝物測定を目指したいいわゆる「ワイドターゲット分析」、そして大規模コホート研究のような数百~数千検体の分析を行う時代に突入しているが、本ソフトウェアはそのような大規模 MRM データにも対応可能である。

(5) MRMPROBS の派生ソフトウェアとして、脂質分析に特化した MRM-DIFF を開発した (Tsugawa et. al. *Frontiers in Genetics*, **5**, 471, 2014) . 低分子化合物を対象とするメタボロミクス研究の中でも、脂質はフラグメンテーションの機構が比較的良く知られており、目的脂質を捉えるための MRM 条件をコンピュータに決定することが可能である。一方、リン脂質の一種であるフォスファチジ

ルコリン (PC) 1 つに着目しただけでも、構成する脂肪酸の長さ、二重結合の数、および立体配座の違いは多岐に渡り、これらすべてを一分析で網羅的に捉えることは難しい。そこで、「側鎖情報まで正確に決定することは据え置きにし、サンプル間で差異のある脂質由来ピークを円滑に見つけだす手法」が MRM 分析データを解析するにあたって強く望まれていた (興味のあるピークに関しては、後からプロダクトイオンスキャンにより詳細を決定することを意味している) . たとえば m/z 814 の PC 38:2 [M+H]⁺ に着目したとき、フォスファチジルコリン特有に見られる 184.1 のプロダクトイオンを捉えることで、(残り 2 つのアシル基の詳細は不明だが) PC 38:2 を構成する脂質群を網羅的に捉えることが可能である。このことに着目し、多検体 MRM クロマトグラムにアライメント作業を適用し、脂質由来ピーク群の中から差異のあるピークのみを円滑に抽出するソフトウェア MRM-DIFF を開発した (図 2)

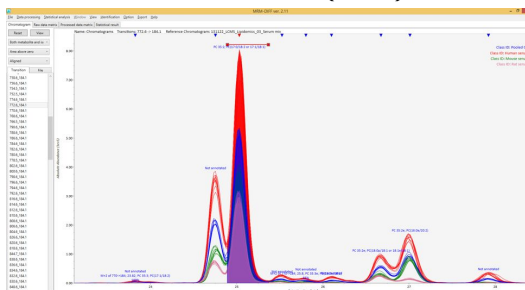


図 2 . MRM-DIFF のスクリーンショット

MRM-DIFF の GUI は、多検体のクロマトグラムをアライメント後、一度に描画させることで差異のあるピークを即座に確認できるように設計されている (一度に 200 検体ほどしか読み込めないという制約はある) . ユーザーは、脂質の保持時間ライブラリーおよび組成式情報を読み込ませることで脂質同定も可能であり、かつアイソトピックイオンの影響を考慮した定量値修正を行うことも可能である。

当該研究により開発された定量メタボロミクスのための解析プラットフォームは、親水性代謝物から脂質まで幅広い化合物に適用可能である。また、データ処理システムが標準化されることによるメタボロミクスデータの標準化にも大きく貢献するものと考えられる。また、当該研究本来の目的とは異なるが、同研究費にて研究者のグループは、対象化合物を限定しないノンターゲット解析プラットフォームである MS-DIAL を開発した (Tsugawa et. al. *Nature Methods*, **12**, 523-526, 2015) . メタボロミクス研究は「仮説生成」のためのノンターゲット解析基盤、そして「仮説検証」のためのターゲット解析基盤、これら 2 つが揃って初めて本来の威力を発揮するものである。今後の研究では、当該研究

により構築された「ターゲットメタボロミクスにつながるためのノンターゲットメタボロミクス解析基盤」を構築していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)すべて査読有

1. Hiroshi Tsugawa, Tomas Cajka, Tobias Kind, Yan Ma, Brendan Higgins, Kazutaka Ikeda, Mitsuhiro Kanazawa, Jean VanderGheynst, Oliver Fiehn, Masanori Arita. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, **12**, 523-526, 2015. doi: 10.1038/NMETH.3393
2. Hiroshi Tsugawa, Mitsuhiro Kanazawa, Atsushi Ogiwara, Masanori Arita. MRMPROBS suite for metabolomics using large-scale MRM assays. *Bioinformatics*, **30**, 2379-2380, 2014. doi: 10.1093/bioinformatics/btu203
3. Hiroshi Tsugawa, Erika Ohta, Yoshihiro Izumi, Atsushi Ogiwara, Daichi Yukihira, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Masanori Arita. MRM-DIFF: data processing strategy for differential analysis in large scale MRM-based lipidomics studies. *Frontiers in Genetics*, **5**, 471, 2014. doi: 10.3389/fgene.2014.00471
4. Hiroshi Tsugawa, Yuki Tsujimoto, Kuniyo Sugitate, Norihiro Sakui, Shin Nishiumi, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki; Highly sensitive and selective analysis of widely targeted metabolomics using gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **117**, 122-128, 2014. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.009
5. Hiroshi Tsugawa, Masanori Arita, Mitsuhiro Kanazawa, Atsushi Ogiwara, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki. MRMPROBS: a data assessment and metabolite identification tool for large-scale multiple reaction monitoring based widely targeted metabolomics. *Analytical Chemistry*, **85**, 5191-5199, 2013. doi: 10.1021/ac400515s

[学会発表](計 2 件)

1. Hiroshi Tsugawa, Tobias Kind, Tomas Cajka, Yan Ma, Kazutaka Ikeda, Mitsuhiro Kanazawa, Atsushi Ogiwara, Oliver Fiehn,

and Masanori Arita; MS DIAL: Untargeted metabolomics software for data independent LC-MS/MS and mass spectral deconvolution: application to algae metabolomics. *10th International Conference of the Metabolomics Society*, Tsuruoka, Japan, Jun. 25, 2014

2. Hiroshi Tsugawa, Masanori Arita, Mitsuhiro Kanazawa, Atsushi Ogiwara, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, MRMPROBS: data assessment and metabolite identification tool for large-scale MRM-based widely targeted metabolomics, *61st ASMS Conference on Mass Spectrometry*, Minneapolis, US, Jun. 13, 2013

[図書](計 1 件)

1. *Mass Spectrometry-Based Metabolomics: A Practical Guide*, CRC Press Chapter 4, 2014

(うち、2 つのチャプターは責任著者かつ筆頭著者)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

本業績の成果は、すべて理化学研究所 PRIME ウェブサイトの Standalone software セクションにて無償公開されている。

<http://prime.psc.riken.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

津川 裕司 (TSUGAWA, Hiroshi)

理化学研究所環境資源科学研究センター

特別研究員
研究者番号：30647235