

令和元年6月24日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18303

研究課題名(和文) 質量分析のダイナミックレンジ拡張技術の開発とメタボロミクスへの応用

研究課題名(英文) Development of high dynamic range mass spectrometry

研究代表者

中山 泰宗 (NAKAYAMA, Yasumune)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：10758832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸、アミン、核酸塩基を中心とした約80種の窒素代謝物についてSRMの最適化を行い、HDR-MS用の分析メソッドを構築した。さらにR言語を用いた解析手法を開発した。続いて標準品の希釈系列をHDR-MSで分析し、HDR-MSの性能を確認した。結果として検量線のリニアレンジが2桁ほど向上した。本方法の応用として、微生物培養上清のフットプリントを行った。Saccharomyces cerevisiaeをYPD培地で培養し、その際の培養上清の窒素代謝物の経時変化をHDR-MSを用いて包括的に解析した。結果として83代謝物中16化合物がHDR-MSで補正された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本方法により、様々な分析をより高精度でおこなうことができるようになる。例えば質量分析による高精度フットプリント(培地組成変化)や、メタボロミクス大規模コホートや疾患予測に応用することができると考えられる。また本方法は別のクロマトグラフィへも応用することが可能である。本研究によりMSの、ダイナミックレンジの制限、特にピークインテンシティの頭打ち(サチュレーション)の問題が解決されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：At first, SRM transitions of nitrogen metabolites, including amino acid, amine, nucleic acid base and so on, were optimized to develop HDR-MS method. Then, analytical method of the data was developed based on R-language. Dilution series of a standard compound were analyzed using the method. In the result, linear range of calibration curve was extended two orders. For application of this study, foot-print of culture medium of microbes was analyzed. The supernatant of YPD medium under cultivation of yeast was analyzed over the time. In the result, 16 of 83 compounds were corrected by HDR-MS.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：質量分析 HDR LC/MS クロマトグラフィ 酵母 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

メタボロミクスは高選択性・高網羅性・高感度が必要なため、主に質量分析装置 (MS) が検出器として用いられている。一方で、定量性・再現性についてはイオン導入部や検出器による問題が残っている。イオン導入部は夾雑物の影響を受けやすい問題点があるが、同位体希釈により解決できる。一方で検出器の問題は解決法がなく、“分析対象化合物の濃度により検出器の信号強度が変化する範囲”ダイナミックレンジの限界により下記の 2 点の制限を受けている。第一に、MS のダイナミックレンジよりも生体内の化合物濃度範囲の方が広いという問題がある。血液を例にとると、ホルモンなどの微量成分 (pmol/L) から糖・アミノ酸などの高濃度成分 (mmol/L) まで、およそ 9 桁の濃度範囲がある。一方、ハイエンドの MS においてもダイナミックレンジは 5 桁程度である。レンジから外れた代謝物は正確に定量できない。また富栄養培養液は化合物濃度レンジが広く、時間変動も大きいため、培養液成分の総体的な経時解析 (フットプリント) は困難である。第二に、MS のダイナミックレンジは分析バッチ (異なる装置、異なる分析日) 毎に変動し、このため大規模分析が制限される問題点がある。MS の状態はキャリブレーションのパラメータや装置の汚れ等に左右されるためである。

2. 研究の目的

本研究ではデータ解析により、ダイナミックレンジを向上させる技術を開発することを目的とした。デジタルカメラの写真解析技術である“High dynamic range imaging”(HDR)の概念を適用した“HDR-MS”解析技術を開発し、ダイナミックレンジ 2 桁以上拡張することを目標に研究を行った。また、本方法の有用性を示すために実証研究として微生物の窒素代謝を対象とした培地成分の窒素化合物経時変化を解析した。

3. 研究の方法

(a)標準試料を用いた HDR-MS の解析方法検討

本研究ではアミノ酸、アミン、核酸塩基を中心とした約 80 化合物を対象とし、装置には LCMS-8040(島津, Kyoto, Japan)、カラムにはこれら化合物の分離が良好な discovery HS F5 (Sigma-Aldrich, MO, USA) を用いた。はじめに化合物毎に、SRM (selected reaction monitoring) 分析のパラメータを最適化した。続いてカラムを接続し、各化合物の RT の確認を行った。またコリジョン電圧 (CE) の変化と検出器へ到達するイオンの関係も確認し HDR-MS を行うための基礎データを取得した。

取得したデータを元に、HDR-MS の分析パラメータを決定し標準試料を分析した。続いて得られたデータを解析した。自動化するために、検量線に使うデータ範囲(シグナル強度と RT について)、検量線の種類(線形、非線形か)、解析できるかのクライテリア(相関係数や検量線の残差、R2 など)について検討を行った。解析には Lab Solution(島津)、Excel(microsoft, WA, USA) マクロ等を用いた。大規模解析には ProteoWizard、R プログラミング等を用いた。

続いて HDR-MS と通常分析での検量線を比較し、それぞれのダイナミックレンジを確認した。

(b)HDR-MS による微生物培養液の窒素化合物変化の包括的な解析

HDR-MS が生物研究において実際に効果があるか確認した。サンプルには酵母培養で用いられる YPD (yeast peptone dextrose) 培地を用い、成分の経時変化(フットプリント)を観測した。YPD 培地は酵母で最も頻りに用いられる培地であるが、細かい成分の変化についてはこれまであまり研究されていない。また本培地は栄養豊富であり多くの成分を含み、過剰の栄養源が時間と共に枯渇してゆくの単一成分の変動幅も大きいと考えられた。したがって分析装置のダイナミックレンジの広さが重要であり、HDR-MS の性能を確認するのに適していると考えられた。

4. 研究成果

アミノ酸、アミン、核酸塩基を中心とした約 80 種の窒素代謝物について SRM の最適化を行った。続いて CE を最適値からずらしたトランジションも作成し、両トランジションを同一ランで測定する HDR-MS 用の分析メソッドを構築し標準品を分析した。得られたデータをもとに検量線を作成し(図 1-a)、検出限界を超えたピークの本来的形状を推定した(図 1-b)。得られた結果より、本方法が機能する可能性が示された。

続いて標準品の希釈系列を HDR-MS で分析し、性能の確認を行った(図 2)。両トランジションのピークが検出限界内にある範囲では、本来のピークと HDR-MS で再現したピークの結果として、一部の標準品では検量線のリニアレンジが 2 桁ほど向上した。

本方法が実際の研究に応用できるかを確認するために、夾雑物が含まれるサンプルの分析に応用した。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を YPD 培地で培養し、その際の培養上清の窒素代謝物の経時変化を HDR-MS を用いて包括的に解析した。83 代謝物を測定した結果、16 化合物が検出限界を超えており、HDR-MS で補正された。代謝物はいくつかの傾向が見られ、対数増殖期に減少するグループ、ジオーキシシフト後に減少するグループ、全体を通して緩やか

に減少するグループ 培養を通して増加するグループ ,一過的に増加するグループが得られた .
これらのグループ間の関係については現在検討中である .

以上のように HDR-MS は LC-MS の検出限界を向上させることが可能であった . 今後 , 本方法により微生物や細胞培養時のフットプリントをより高精度で行うことができるようになると期待される . また本方法は他のクロマトグラフィへの応用も可能である .

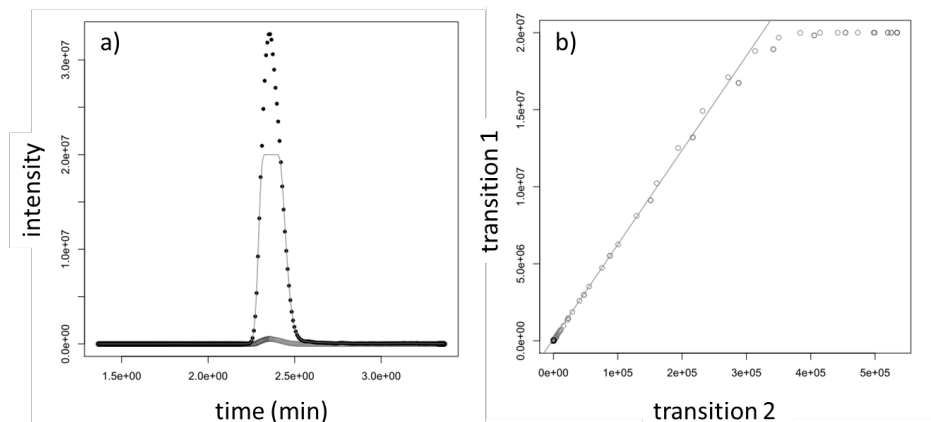


図 1 HDR-MS で取得および補正したデータ(a)と検量線(b)

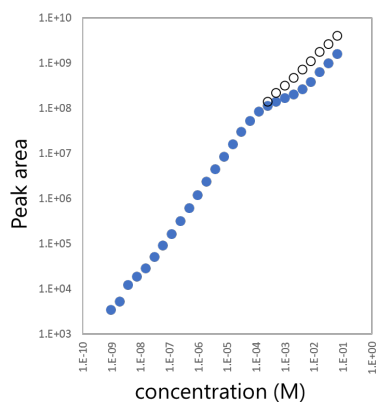


図 2 HDR-MS による検量線

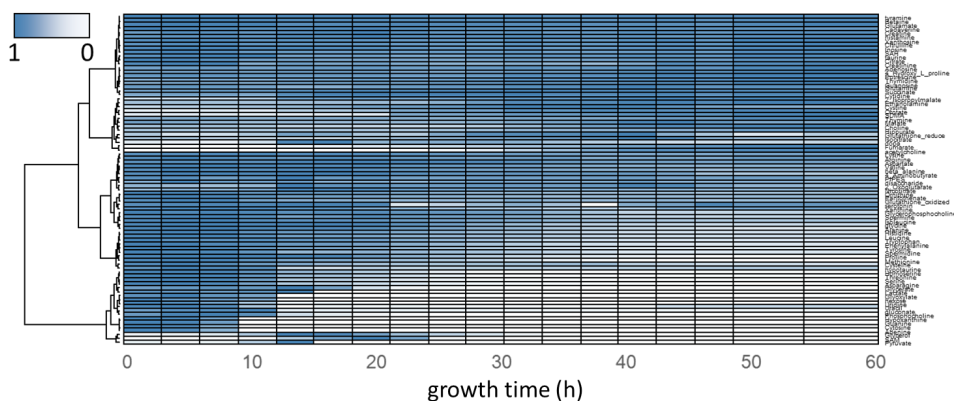


図 3 出芽酵母培養時における YPD 培地上清の成分変化

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Masatomo Takahashi, Yoshihiro Izumi, Fukumatsu Iwahashi, Yasumune Nakayama, Mitsuhiko Iwakoshi, Motonao Nakao, Seiji Yamato, Eiichiro Fukusaki, and Takeshi Bamba, Highly Accurate Detection and Identification Methodology of Xenobiotic Metabolites Using Stable Isotope Labeling, Data Mining Techniques, and Time-Dependent Profiling Based on LC/HRMS/MS, *Anal. Chem.*, 2018, **90** (15), pp 9068–9076, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01388

2. Sastia Prama Putri*, Yasumune Nakayama*, Claire Shen, Shingo Noguchi, Katsuaki Nitta, Takeshi Bamba, Sammy Pontrelli, James Liao, Eiichiro Fukusaki, Identifying metabolic elements that contribute to productivity of 1-propanol bioproduction using metabolomic analysis, *Metabolomics*, 2018, **14**: 96, doi: 10.1007/s11306-018-1386-0, *these authors are equally contributed
3. Norihisa Haraguchi, Jun Kaseda, Yasumune Nakayama, Kazuhiro Nagahama, Takahira Ogawa, Masayoshi Matsuoka, Characterization of mutants expressing thermostable D1 and D2 polypeptides of photosystem II in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *J. Biosci. Bioeng.*, 2018, in press, doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.04.015
4. Miwa Ohnishi, Aya Anegawa, Yuko Sugiyama, Kazuo Harada, Akira Oikawa, Yasumune Nakayama, Fumio Matsuda, Yukiko Nakamura, Ryosuke Sasaki, Chizuko Shichijo, Patrick G Hatcher, Hidehiro Fukaki, Shigehiko Kanaya, Koh Aoki, Mami Yamazaki, Eiichiro Fukusaki, Kazuki Saito, Tetsuro Mimura, Molecular components of Arabidopsis intact vacuoles clarified with metabolomic and proteomic analyses. *PCP*, 2018, doi:10.1093/pcp/pcy069
5. Yukiko Takeuchi, Yasumune Nakayama, Eiichiro Fukusaki, Yasuhiro Irino, Glutamate production from ammonia via glutamate dehydrogenase 2 activity supports cancer cell proliferation under glutamine depletion. *BBRC*, **495**, 2018
6. Hirofumi Nagao, Hitoshi Nishizawa, Takeshi Bamba, Yasumune Nakayama, Noriyoshi Isozumi, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, Yoshimitsu Tanaka, Shunbun Kita, Shiro Fukuda, Tohru Funahashi, Norikazu Maeda, Eiichiro Fukusaki, Iichiro Shimomura, Increased Dynamics of Tricarboxylic Acid Cycle and Glutamate Synthesis in Obese Adipose Tissue: In vivo Metabolic Turnover Analysis. *JBC*, **292**, 2017
7. 中山泰宗, 松田史生, メタボロミクスにおける動態解析—質量分析と同位体標識を用いて代謝の流れを測定する—, *日本質量分析学会*, **65**, 210-214, 2017

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 中山泰宗, 和泉自泰, 長濱一弘, 松岡正佳, 馬場健史, HDR-MS の開発と酵母の代謝フットプリントへの応用, *日本農芸化学会 2018 年度西日本支部大会(熊本)*, 2018 年, 9 月
2. 中山泰宗, 和泉自泰, 長濱一弘, 松岡正佳, 馬場健史, 質量分析のダイナミックレンジ拡張技術の開発とメタボロミクスへの応用, *第 70 回 生物工学会大会(大阪)*, 2018 年, 9 月
3. Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Development of the high-resolution data-independent acquisition of MS/MS analysis, *metabolomics 2018 @ Seattle*, 2018 年, 6 月
4. Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Black List of Metabolomics by In-Source Decay, *66th ASMS @ San Diego*, 2018 年, 6 月
5. 中山泰宗, 和泉自泰, 長濱一弘, 松岡正佳, 馬場健史, 質量分析のダイナミックレンジ拡張技術の開発とメタボロミクスへの応用, *第 11 回メタボロームシンポジウム(大阪)*, 2017 年, 11 月
6. 中山泰宗, 恐怖の誤同定, *JASIS 2017 (千葉)*, 2017 年, 9 月
7. Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Black List of Metabolomics by In-source Decay, *metabolomics 2017 @ Brisbane, Australia*, 2017 年, 6 月

8. 中山泰宗, "LC/MS のインソースフラグメントによる化合物誤同定とその回避策"(招待講演), **第10回メタボロームシンポジウム**, 2016年10月
9. Nakayama, Yasumune;, "Development of Dynamic Profiling of Metabolomics", **The 6th SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research @ Malaysia**, 2016, 8月
10. Nakayama, Yasumune; Bamba, Takeshi, Fukusaki, Eiichiro;, "Avoiding compound miss-annotation caused by MS in-source decay using data-independent acquisition", **12th International Conference of the Metabolomics Society (Metabolomics 2016)**, 2016, 6月
11. 松田史生, 中山泰宗, 馬場健史, "メタボロミクス研究におけるマトリックス効果とその対応", 第8回LCMSワークショップ, 2016, 10月

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/moja-lab/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。