

Fig. 2 Metabolome extraction procedure modified in this study. **A.** Schematic of the metabolome extraction procedure. Modified point is indicated in the green box. **B.** Cell suspension prepared by sonication of methanol.

intermediates. Actually, the intracellular level of histidine dropped rapidly within 30 min of the downshift, resulting in the activation of the histidine biosynthesis pathway. Though phosphoribosyl-ATP was not detected here, chronological accumulation profiles of the intermediates were observed. The phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) level was increased at the onset of starvation (0–15 min), and then slightly decreased in concert with the drop of histidine concentrations (30–60 min). These results are consistent with the previous observations,¹⁹ and clearly indicate the accumulation of intermediates in histidine biosynthesis. Additionally, among

the intermediates only PRPP and L-histidinol are commercially available at present, and thus the results yield important information of CE-TOFMS analysis in histidine biosynthesis.

Metabolome profiles under histidine starvation conditions

Amino acid starvation induces the accumulation of ppGpp, stimulating stringent response in cells.¹¹ Actually, ppGpp levels were significantly increased after the histidine downshift (supplementary Table 2†). This observation led us to view all the metabolite changes during histidine starvation as the stringent response. We determined the metabolome profiles including 375 metabolites belonging to classes I and II (supplementary Table 2). Of the metabolites, a total of 198 were successfully detected in cells during histidine starvation, and are depicted in the *E. coli* metabolic pathway map shown in Fig. 5 (high resolution, printable version is available as supplementary Fig. 1†). Of the metabolites detected in cells, 45 were determined based on their *m/z* values because the standard chemicals are not available. At a glance, dramatic changes were found in regional primary metabolisms, but most of the metabolites were not changed. Since the metabolic network in *E. coli* is generally robust against environmental perturbations,²² the metabolic changes found here seem to involve homeostasis of metabolic processes.

To identify the metabolic changes, we performed clustering analysis of the metabolome data using hierarchical clustering analysis (HCA), generating five significant clusters. Clustering analysis is applicable and valuable in transcriptomic analysis, since the accumulation of a specific mRNA directly shows the activation of the gene expression.²³ However, it should be noted in metabolomics that the accumulation of a metabolite does not indicate activation of the metabolic pathway, it should be estimated in combination with the change of its down- and upstream metabolites. The clusters generated here are shown in Fig. 6 and listed in Table 1. The metabolites for which levels were unchanged were excluded from HCA. Clusters 1, 2, and 3 resembled each other in the profiles and tend to be accumulated after histidine downshift (Fig. 6B). Cluster 1 metabolites were temporary accumulated during 15 to 30 min after the histidine downshift, and then decreased (Fig. 6B). Cluster 2 metabolites were rapidly accumulated at 15 min and maintained thereafter (Fig. 6B). Accumulations of cluster 3 metabolites were delayed to 60 min (Fig. 6B). Clusters 4 and 5 tended to be decreased gradually and rapidly, respectively (Fig. 6B).

During stringent responses, DNA replication, transcription, translation, and cell division are arrested in a ppGpp-dependent manner.¹¹ Actually, growth was seen to be arrested by monitoring optical density at 600 nm at the onset of histidine starvation (data not shown). High-energy carrier molecules, ATP and GTP, were accumulated slightly (cluster 2), suggesting that DNA replication, and transcription of ribosomal RNAs are stopped, as described elsewhere.¹¹ This is considered to be a reservation for further growth when *de novo* histidine biosynthesis is activated (growth cannot occur because of *hisD* disruption in the cells). The building blocks of DNA, dNTP, were maintained after histidine downshift. Amino acid levels were significantly accumulated after

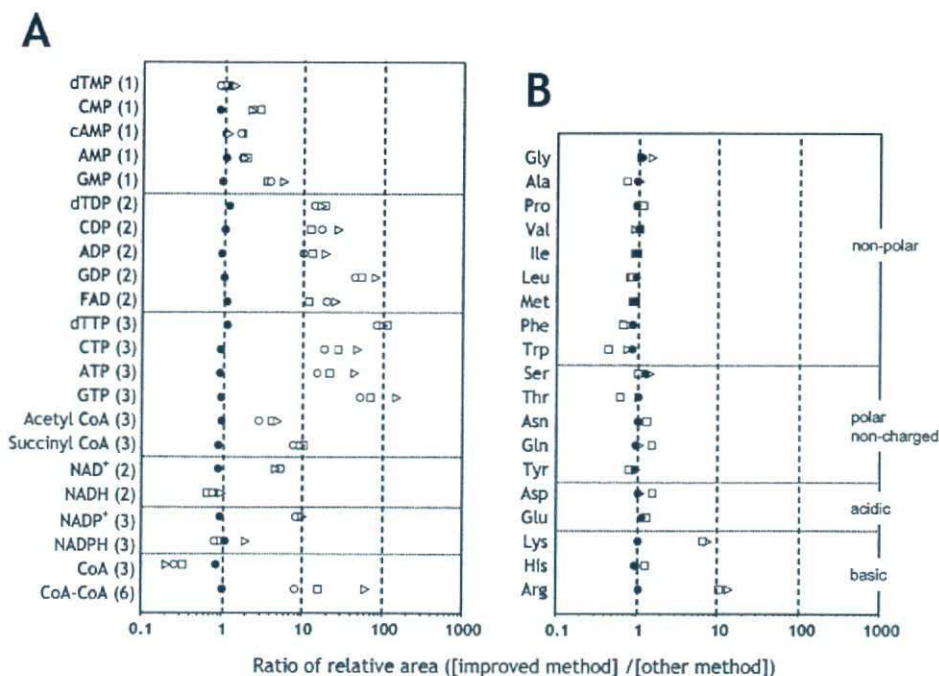


Fig. 3 Improved extraction efficiency of nucleotide metabolites by the improved method developed in this study. **A.** Comparison of the detected levels of nucleotide metabolites. The number of phosphate groups that are contained in the metabolite is shown in parentheses. **B.** Comparison of the detected levels of amino acids. ●, area ratio of [improved method (1st)] to [improved method (2nd)], that is, the reproducibility of the improved method; △, area ratio of [improved method (1st)] to [conventional method]; □, area ratio of [improved method (1st)] to [sonicated cell removal method]; ○, area ratio of [improved method (1st)] to [cold method]. See text for details of the extraction procedures.

downshift: most are distributed to clusters 2 and 3. In particular, accumulation of lysine, leucine, arginine, and phenylalanine was prominent. Of amino acids, threonine, except histidine, was assigned to cluster 5, indicating threonine was consumed after histidine-downshift. These results suggest that threonine biosynthesis from aspartic acid was shut down during starvation, resulting in the drop of isoleucine and following stimulation of valine and leucine biosynthesis.²⁴

Next, we focused on the behavior of cluster 2 metabolites which were clustered with ppGpp in order to discuss the candidate pathways under stringent control (Table 1). The first half of glycolysis, from glucose-6-phosphate (G6P) to glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) and dihydroacetonephosphate (DHAP), was accumulated in concert with the intermediates in the pentose phosphate pathway (Fig. 5, positions B-2 and C-2). This effect seems to involve increased histidine biosynthesis *via* PRPP. However, the middle of glycolysis, from 3- or 2-phosphoglyceric acid (3- or 2-PG) to phosphoenolpyruvic acid (PEP), was unchanged (Fig. 5, position C-3), while late step of glycolysis, pyruvic acid, dropped remarkably (Fig. 5, position C-3). These results suggest that the behavior of glycolysis is complicated during histidine starvation: that is, the first half is activated with the pentose phosphate pathway, but the flux is not extended to pyruvic acid synthesis. Moreover, the entire tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates were distributed into cluster 2, indicating that the TCA cycle was activated to yield precursors of downstream pathways and consumes intracellular pyruvic acid. Although we cannot exclude the possibility that the aforementioned

pathways are regulated in a ppGpp-independent manner, the results provide new insights for understanding the stringent response in bacteria. Metabolomics observations in the *relA* mutant are needed to unveil the mechanism of stringent response in metabolism.

Experimental

Preparation of *E. coli* metabolite list

Metabolites in *E. coli* were selected from the EcoCyc^{15,16,25} and KEGG^{26,27} databases. The metabolites listed in the databases were identified one by one in the literature. Finally, 727 metabolites were selected as *E. coli* metabolites (supplementary Table 1†) and then classified based on the metabolism pathways as follows. Class I metabolites belong to primary metabolisms including biosynthesis of building block metabolites of cells, energy metabolisms such as the glycolysis and TCA cycle, and other biosynthesis pathways. Class II includes the intermediates of degradation pathways of primary metabolites, *e.g.*, amino acid degradation. The metabolites in classes I and II are expected to be found in cells grown in general minimal medium. Class III involves the degradation pathways of environmental compounds which are not included in general minimal medium. Class IV includes secondary metabolism or unconventional metabolisms. Class V includes the metabolites found in *E. coli* cells previously, but the pathways are unknown. Class VI metabolites are intermediates and products of *in vitro* enzymatic reactions using putative gene products.

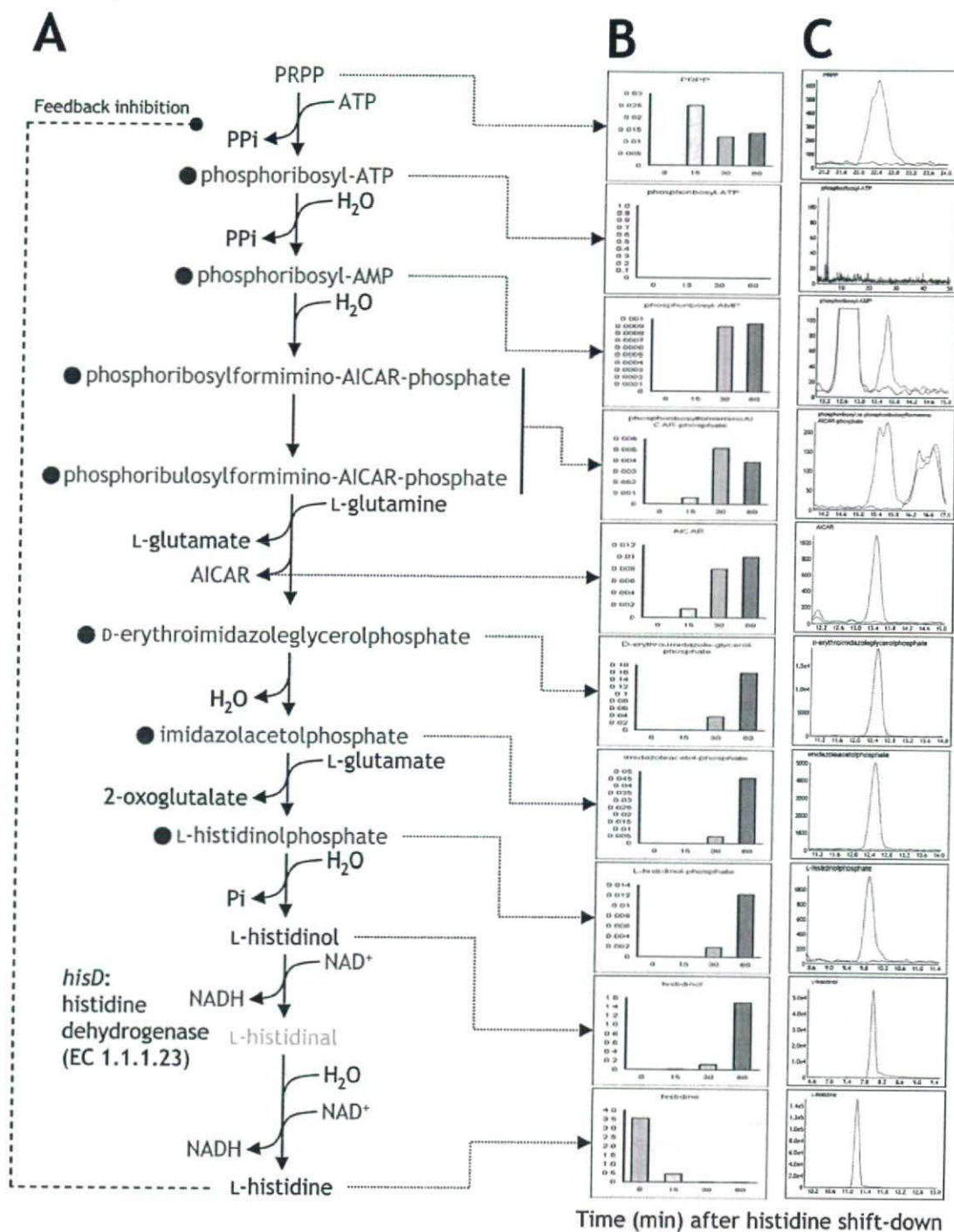


Fig. 4 Signal identification of histidine biosynthesis intermediates. **A**. Histidine biosynthesis pathway in *E. coli*. Metabolites that are detected in nucleotide mode by CE-TOFMS analysis are indicated in blue. Red circles show the metabolites for which standard chemicals are not commercially available. L-Histidinol coloured gray cannot be detected because it is not released during the overall reaction catalysed by histidine dehydrogenase.³¹ **B**. Accumulation of intermediates of histidine biosynthesis after histidine downshift. The data are indicated as the area values relative to that of internal standard. **C**. Electropherograms of the intermediates obtained by CE-TOFMS analyses. The metabolites except for L-histidinol and L-histidine were detected with nucleotide mode. The data are indicated as the signal intensities (arbitrary unit).

Bacterial strains and growth conditions

E. coli W3110 (laboratory stock) grown in Luria-Bertani (LB) liquid medium²⁸ was used for optimisation of metabolome

extraction procedure. The *hisD* deletion mutant, JW2002, was distributed from the Keio collection.²⁹ The cells were pre-grown on LB plates at 37 °C for 12 h. The fresh colonies that appeared were inoculated into M9 liquid medium²⁸ containing

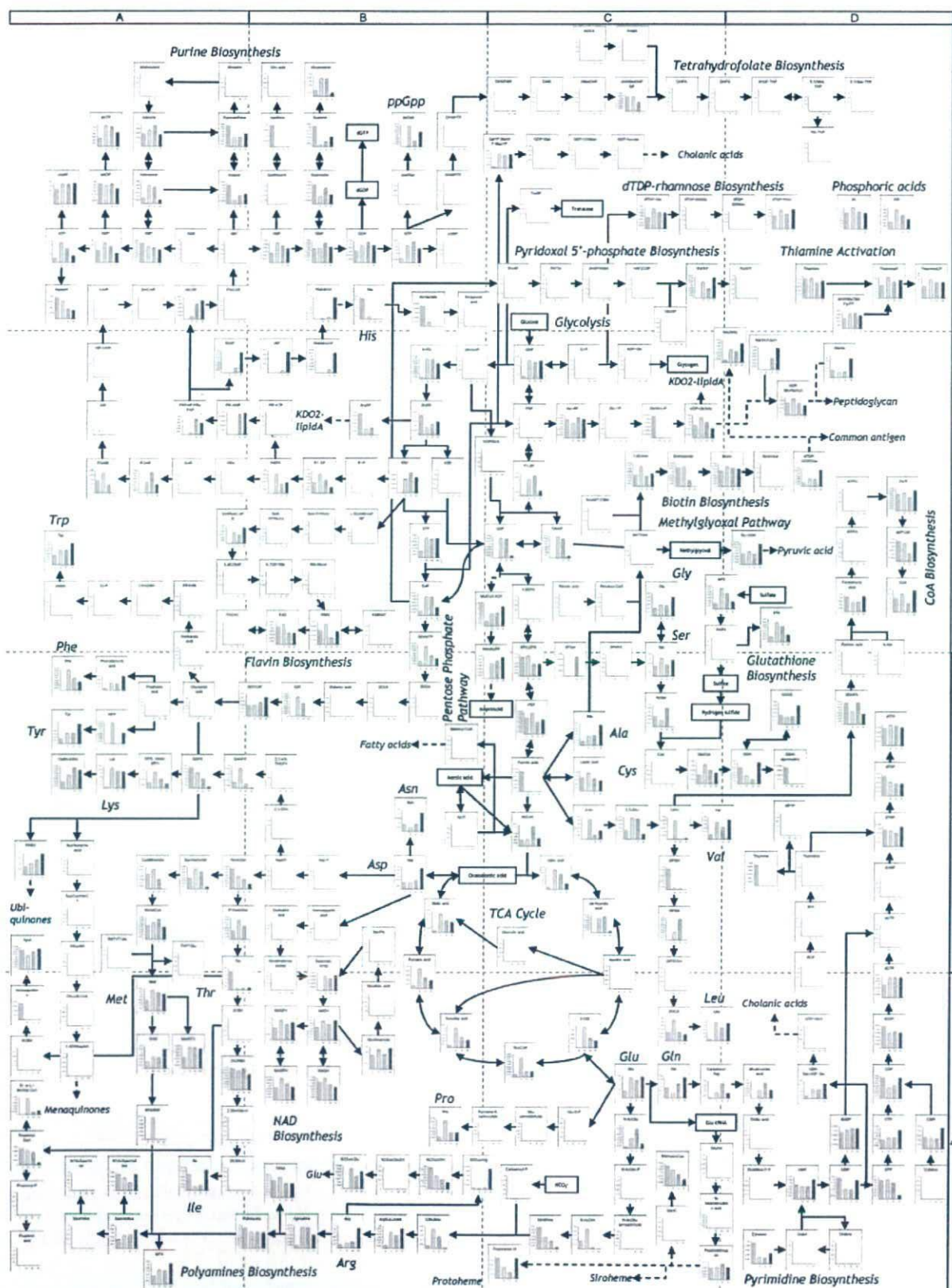


Fig. 5 Metabolic profile of *E. coli* after histidine downshift. The data of each metabolite level are summarized in supplementary Table 2. Enlarged, printable version is available as supplementary Figure 1.†

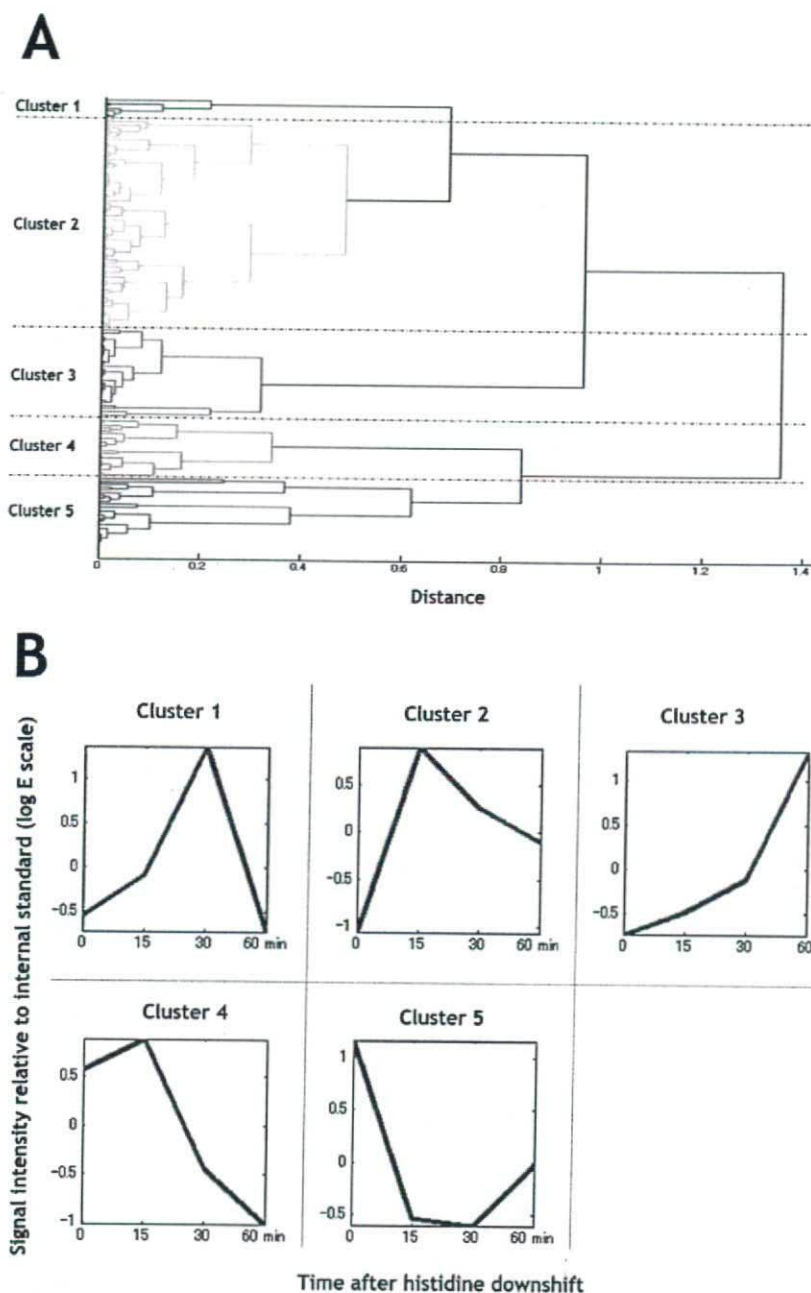


Fig. 6 Clustering analysis of metabolites for which intracellular levels were changed during histidine starvation. A. Tree view of distances between the clusters generated by HCA. B. Average view of the clusters. Signal intensities relative to that of internal standard were standardised.

50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of L-histidine, and this was followed by incubation at 37 °C with shaking. When the cells reached the middle-to-late logarithmic phase (optical density at 600 nm = 0.8), they were harvested by brief centrifugation, washed with M9 medium without histidine, and then suspended in the M9 medium. The culture was continuously shaken at 37 °C until the sampling times.

Metabolite extraction procedure

Intracellular metabolites were extracted as described previously with some modifications.⁶ Schematic of the

metabolome extraction procedure is shown in Fig. 2. Cells grown as described above were collected for metabolome analysis at indicated times. Culture including approximately 10^9 cells (calculated as optical density at 600 nm \times sampling volume of culture (ml) = 20) was filtered by a vacuum filtration system using a 0.4 μm pore size filter. The residual cells on the filter were washed twice with 5 ml of Milli-Q water. The filter was immersed in 2 ml of methanol including 5 μM each of internal standards, methionine sulfone and D-camphor-10-sulfonic acid (CSA). The dish was sonicated for 30 s using an Elma Transsonic T460/H ultrasonic syringe (not an ultrasonic

cell disrupter) (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co., Singen, Germany) to suspend the cells completely. Effects of this process on metabolite extraction efficiency are discussed in the results and discussion section. A 1.6 ml portion of the methanol cell suspension was transferred to a Falcon Blue Max Jr., 352097 centrifugal tube (15 ml) (Becton Dickinson & Co., New Jersey, USA), and mixed with 1.6 ml of chloroform and 640 μ l of Milli-Q water. After vortexing well, the mixture was centrifuged at $4600 \times g$ and 4°C for 5 min. The aqueous layer (750 μ l) was distributed to three Amicon Ultrafree-MC ultrafilter tips (Millipore Co., Massachusetts, USA) and centrifuged at $9100 \times g$ and 4°C for approximately 2 h. The filtrate was dried and preserved at -80°C until CE-MS analysis. Prior to analysis, the sample was dissolved in 25 μ l of Milli-Q water.

Instrumentation

CE-TOFMS was carried out using an Agilent CE Capillary Electrophoresis System equipped with an Agilent 6210 Time-of-Flight mass spectrometer, Agilent 1100 isocratic HPLC pump, Agilent G1603A CE-MS adapter kit, and Agilent G1607A CE-ESI-MS sprayer kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The system was controlled by Agilent G2201AA ChemStation software version B.03.01 for CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Data acquisition was performed by Analyst QS Build: 7222 software for Agilent TOF (Applied Biosystems, California, USA/MDS Sciex, Ontario, Canada).

CE-TOFMS conditions

Separations and detections of metabolites were basically performed as described previously for cationic metabolites,^{3,6} anionic metabolites,^{4,6} and nucleotides.³⁰ For cationic metabolites, capillary electrophoreses were performed using a fused silica capillary. The electrolyte was 1 M formic acid. Methanol-water (50% v/v) containing 0.5 μM reserpine (the lock mass for exact mass measurements) was delivered as the sheath liquid at $10 \mu\text{l min}^{-1}$. For anionic metabolites, a polymer coated SMILE(+) capillary (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) was used. The electrolyte was 50 mM ammonium acetate (pH 8.5). Ammonium acetate (5 mM) in 50% (v/v) methanol-water containing 1 μM reserpine was delivered as the sheath liquid at $10 \mu\text{l min}^{-1}$. For nucleotides, separations were performed using a fused silica capillary. The electrolyte was 50 mM ammonium acetate (pH 7.5). The sheath liquid for anionic metabolites was used as the electrolyte. The capillary was pretreated with preconditioning buffer including 25 mM ammonium acetate and 75 mM sodium phosphate at pH 7.5. Pressure of 50 mbar was applied to inlet capillary during run to reduce the analysis time. For all analytical modes, inner diameter and total length of capillary are 50 μm and 100 cm, respectively. The applied voltage was set at +30 kV and -30 kV for cation and anion modes and nucleotide mode, respectively.

Electrospray ionisation-TOFMS was operated in the positive ion mode (4 kV), the negative ion mode (3.5 kV), and the negative ion mode (3.5 kV) for cationic metabolites, anionic metabolites, and nucleotides, respectively. A flow rate of

heated dry nitrogen gas (heater temperature 300°C) was maintained at 10 psig. Exact mass data were acquired over a 50–1000 m/z range.

Cluster analysis

The metabolome data set was prepared by selection of metabolites based on a coefficient of variation of more than 0.2 to exclude the metabolites for which levels were unchanged. HCA was performed on the data set using MATLAB 2007a (The Math Works, Massachusetts, USA). Distances between the metabolites were calculated by the equation, correlation coefficient + 1.

Conclusion

In this study, we produced a list of previously reported *E. coli* metabolites together with analytical information for CE-TOFMS-based metabolome analysis. This list is also useful for other analytical methods using MS as a detector. The metabolome extraction method was also improved, realising quantitative analyses of phosphate-rich metabolites and other hydrophilic, charged metabolites. However, this method cannot be applied to the analysis of metabolites oxidised in the metabolome pool. Extraction methods inhibiting oxidation of the metabolites are needed to determine them. We successfully determined 198 metabolites in primary metabolisms of *E. coli* histidine-auxotroph. The metabolome profiles were analysed by mapping data to metabolic pathways and HCA, suggesting separated activation of amino acid biosynthesis pathways, glycolysis, and the TCA cycle. Although more detailed studies using the *relA* mutant is required to unveil the entire view of stringent responses mediated by ppGpp, we believe that metabolome profiling should provide new insights into bacterial adaptation to environmental changes.

Acknowledgements

We are grateful to Hirotsuda Mori, Tomoya Baba, and Kenji Nakahigashi for providing the *E. coli* mutant strain and to Masatomo Hirabayashi and Yuji Sakakibara for providing excellent technical expertise in CE-TOFMS analysis. We also thank Mineo Morohashi for helpful discussions.

References

- 1 I. Nobeli, H. Ponstingl, E. B. Krissinel and J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.*, 2003, **334**, 697–719.
- 2 M. R. Monton and T. Soga, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1168**, 237–246.
- 3 T. Soga and D. N. Heiger, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1236–1241.
- 4 T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita and T. Nishioka, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2233–2239.
- 5 T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita and T. Nishioka, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 6224–6229.
- 6 T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita and T. Nishioka, *J. Proteome Res.*, 2003, **2**, 488–494.
- 7 T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka and M. Tomita, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 16768–16776.
- 8 S. G. Villas-Bôas, J. Hojer-Pedersen, M. Åkesson, J. Smedsgaard and J. Nielsen, *Yeast*, 2005, **22**, 1155–1169.
- 9 R. P. Maharjan and T. Ferenci, *Anal. Biochem.*, 2003, **313**, 145–154.

- 10 J. D. Rabinowitz and E. Kimball, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6167–6173.
- 11 M. Cashel, D. R. Gentry, V. J. Hernandez and D. Vinella, in *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, 1992, 2nd edn.
- 12 C. Eymann, G. Homuth, C. Scharf and M. Hecker, *J. Bacteriol.*, 2002, **184**, 2500–2520.
- 13 O. Brockmann-Gretza and J. Kalinowski, *BMC Genomics*, 2006, **7**, 230.
- 14 A. Hesketh, J. Chen, J. Ryding, S. Chang and M. Bibb, *Genome Biol.*, 2007, **8**, R161.
- 15 I. M. Keseler, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, J. Ingraham, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil and P. D. Karp, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, D334–337.
- 16 <http://ecocyc.org/>.
- 17 A. Nagai, E. Ward, J. Beck, S. Tada, J. Y. Chang, A. Scheidegger and J. Ryals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, **88**, 4133–4137.
- 18 J. C. Loper and E. Adams, *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 257–268.
- 19 H. S. Moyed and M. Friedman, *Science*, 1959, **129**, 968–969.
- 20 M. E. Winkler, D. J. Roth and P. E. Hartman, *J. Bacteriol.*, 1978, **133**, 830–843.
- 21 J. C. Stephens, S. W. Artz and B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, **72**, 4389–4393.
- 22 N. Ishii, K. Nakahigashi, T. Baba, M. Robert, T. Soga, A. Kanai, T. Hirasawa, M. Naba, K. Hirai, A. Hoque, P. Y. Ho, Y. Kakazu, K. Sugawara, S. Igarashi, S. Harada, T. Masuda, N. Sugiyama, T. Togashi, M. Hasegawa, Y. Takai, K. Yugi, K. Arakawa, N. Iwata, Y. Toya, Y. Nakayama, T. Nishioka, K. Shimizu, H. Mori and M. Tomita, *Science*, 2007, **316**, 593–597.
- 23 J. Quackenbush, *Nat. Rev. Genet.*, 2001, **2**, 418–427.
- 24 H. E. Umbarger, in *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA, 1992, 2nd edn.
- 25 C. A. Ouzounis and P. D. Karp, *Genome Res.*, 2000, **10**, 568–576.
- 26 H. Ogata, S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono and M. Kanehisa, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 29–31.
- 27 <http://www.genome.jp/kegg/>.
- 28 J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989, 2nd edn.
- 29 T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori, *Mol. Syst. Biol.*, 2006, **22006.0008**.
- 30 T. Soga, T. Ishikawa, S. Igarashi, K. Sugawara, Y. Kakazu and M. Tomita, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1159**, 125–133.
- 31 A. Kheirloomoom, J. Mano, A. Nagai, A. Ogawa, G. Iwasaki and D. Ohta, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, **312**, 493–500.

[特集：最新のキャピラリー電気泳動とチップ電気泳動]

CE-MS によるメタボローム解析

曾我朋義

SUMMARY

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 cellular and physiological responses. Here we have developed a comprehensive and quantitative analysis method based on capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS). In this marriage of techniques, CE confers rapid analysis and efficient resolution, and MS provides excellent selectivity and sensitivity. Previous work in our laboratory demonstrated that CE-MS techniques were quite useful for the metabolome analysis. We applied this approach to profile liver metabolites following acetaminophen-induced hepatotoxicity and revealed ophthalmate as a sensitive indicator of reduced glutathione (GSH) depletion. Our results specifically indicate that serum ophthalmate is a sensitive indicator of hepatic GSH depletion, and may be a new biomarker for oxidative stress.

Key words: metabolomics, capillary electrophoresis mass spectrometry, drug induced hepatotoxicity, biomarker, glutathione.

緒言

メタボローム解析は細胞内の代謝産物をバイアスをかけない手法により網羅的に探索し、新規の代謝経路やこれまで解明されなかった代謝調節機構、あるいは遺伝子やタンパク質の機能やこれらの生体分子との相互作用を解き明かそうとする方法論である。メタボローム研究は、医薬分野におけるがんや代謝異常などの疾病機序の解明、病体の診断、バイオマーカー探索、発酵分野におけるアミノ酸や核酸生産用の工業用微生物の開発などの応用研究にも有効な解決策を与えるのではないかと期待されている。

ほとんどの生物が有している解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路に代表されるエネルギー代謝やアミノ酸、核酸生合成経路の代謝物の多くは、リン酸基、カルボキシル基、アミノ基等を持つイオン性物質であり、UV 吸収がない、不揮発性などの特徴を有す。さらに、物理的・化学的性質が類似している異性体から、性質が全く異なるものまで、数百種類（微生物）から数万種類（植物）の代謝

中間体が存在する。最近のメタボローム研究への関心の高まりに伴い、GC/MS, LC-MS, フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR/MS), NMR 等を用いるいくつかのメタボローム測定法が開発された。しかし、決定的なメタボロームの分析法は未だ確立されていない。

我々は、細胞内に存在する代謝物のほとんどが電荷を持っていることに着目し、イオン性化合物に対して高分離能を示すキャピラリー電気泳動 (CE) と高い選択性と感度を提供する質量分析装置 (MS) を組み合わせた CE-MS 法を開発した¹⁾。この手法により、細胞内に存在する千種類以上の代謝物質の一斉分析を可能にした¹⁾。CE-MS 法の利点は、ほとんどのイオン性物質を測定できることと、イオン抑制の影響を受けず定量性が極めて高いことである²⁾。

近年、さらに高速走査かつ高分解能を有する飛行時間型質量分析計 (TOFMS) を CE に接続させた CE-TOFMS 法を開発し³⁾、精密質量 (ミリ原子質量単位) での代謝物の一斉高感度分析を達成した。我々は、これまでに CE-MS,

Metabolome analysis by CE-MS.

Tomoyoshi Soga; 慶應義塾大学先端生命科学研究所

Correspondence address: Tomoyoshi Soga; Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 246-2 Mizukami, Kakuganji, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan.

Fax: 0235-29-0574

E-mail: soga@sfc.keio.ac.jp

(受付 2008 年 5 月 16 日, 受理 2008 年 7 月 11 日, 刊行 2008 年 9 月 15 日)

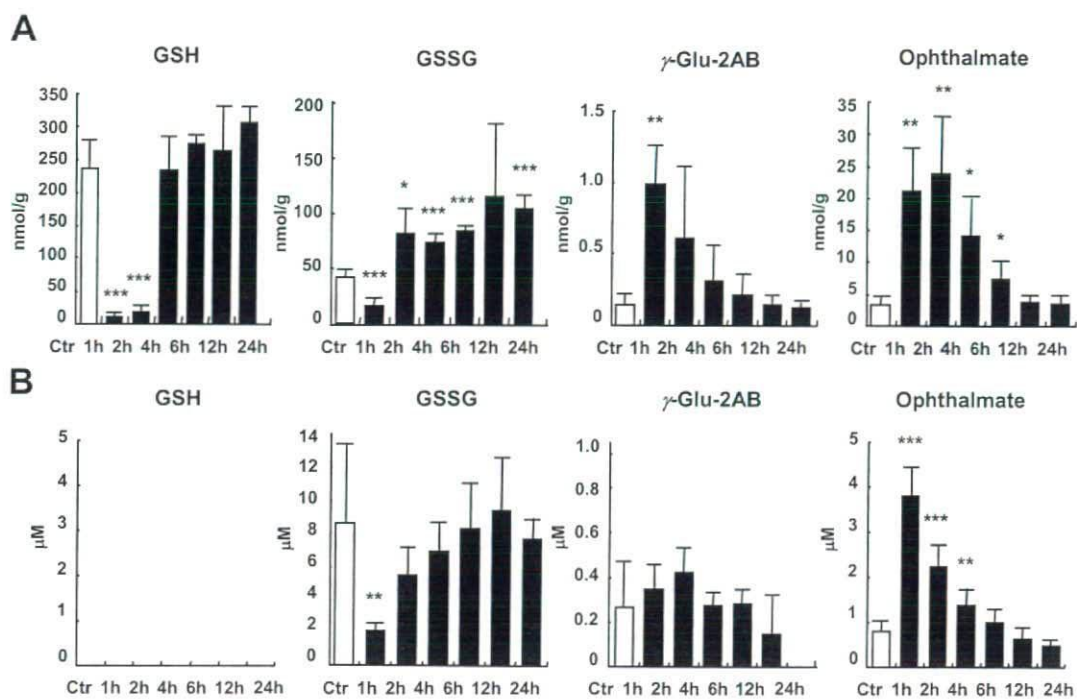


Fig. 4. Changes in metabolite levels in (A) mouse liver and (B) serum 1, 2, 4, 6, 12, and 24 h after APAP treatment (n=4). Asterisks indicate statistically significant differences (***) P <0.001, (**) P <0.01, (*) P <0.05).

謝 辞

本研究は慶應義塾大学医学部医化学教室(末松 誠教授)との共同研究の成果である。

文 献

- 1) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2003; 2:488-494.
- 2) Soga T, Ishikawa T, Igarashi S, Sugawara K, Kakazu Y, Tomita M. Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis-mass spectrometry using silanol mask technique. *J Chromatogr A* 2007;1159:125-133.
- 3) Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 2006; 281:16768-16776.
- 4) Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T,

Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M. Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science* 2007;316:593-597.

- 5) Sato S, Soga T, Nishioka T, Tomita M. Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J* 2004;40: 151-163.
- 6) Kinoshita A, Tsukada K, Soga T, Hishiki T, Ueno Y, Nakayama Y, Tomita M, Suematsu M. Roles of hemoglobin allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis. *J Biol Chem* 2007;282:10731-10741.
- 7) Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 1975;250:1422-1426.
- 8) Cuozzo JW, Kaiser CA. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol* 1999;1:130-135.
- 9) Ballatori N, Dutcak WJ. Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem* 1994;269:19731-19737.

2

最新のメタボローム測定法の開発と生命科学への応用

曾我 朋義

1. はじめに

メタボローム(全代謝物の総称)解析は、細胞内に数百から数万種類存在する代謝物を大規模に測定し、遺伝子発現や酵素活性との相互関係を明らかにして、代謝や細胞の働きを包括的に理解しようとする方法論である。代謝制御機構、シグナル伝達経路、酵素やトランスポーターの機能解明のみならず、代謝異常やがんなどの機序解明、新規バイオマーカーの探索、疾病診断、創薬、微生物発酵による物質生産法の改善、環境変化に強い農作物の開発など、メタボローム解析は幅広い分野で有効な解決策を与えるのではないかと期待されている。

解糖系やTCA回路に代表される中心代謝経路の代謝中間体の多くはリン酸基、カルボキシル基(カルボキシ基ともいう)やアミノ基をもつイオン性物質である。イオン性が高い物質は一般に細胞膜を通過することができないため、細胞は重要な代謝物に極性官能基を与え細胞内に引き留めている。大腸菌の場合は、代謝物の8割以上が高いイオン性をもつ。それ以外にも代謝物はUV吸収がない、不揮発性、物理的・化学的性質が類似したものから、まったく異なる性質をもつものが混在するなどの特徴をもつ。このような性質をもつ化合物に対して網羅的な測定法は開発されておらず、さらに細胞内に数百から数万種類の代謝中間体が存在することが、メタボローム分析をきわめて難しくしていた。

筆者らが開発したキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)によるメタボローム分析法は、数千種類のイオン性代謝物質の一斉分析を可能にした¹⁾。これまでにCE-MS法を微生物^{1,2)}、植物³⁾、動物^{4,5)}など、さまざまな生物種に応用し、いくつかの新しい知見を得た。マウスのモデルでは、薬物によって急性肝炎が誘発された際に血液中で急増するバイオマーカーを発見し⁴⁾、赤血球のヘモグロビンが低酸素を感知して解糖系を活性化する機序を解明した⁵⁾。またメタボロームに加え、トランスクリプトーム、プロテオーム測定も駆使して数千種類の大腸菌の細胞内分子を徹底的に分析し、大腸菌が遺伝子の欠失や生育条件の変化に対して、さまざまな手段で代謝を安定化していることを実証した²⁾。



曾我 朋義(そが ともよし)先生:1959年新潟県生まれ。1984年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業。現在、慶應義塾大学環境情報学部教授、同先端生命科学研究所教授および同医学部教授(兼担)。工学博士。おもな研究テーマは「メタボローム測定法の開発、代謝の解明、バイオマーカー探索」。

メタボローム
細胞、組織中の全代謝物の総体。代謝物は最も少ない微生物で数百種類、最も多い植物で数万種類存在するといわれる。メタボロミクス(metabolomics)はメタボローム研究を示す。

CE-MS

キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis) と質量分析計 (mass spectrometry) を組み合わせた分析法。内径 50 μm 、長さ数 10m 程度の中空のキャピラリー (毛细管) に数万 V の高電圧を印加することによって、イオン性物質を電荷と水和イオン半径の比に基づいて分離後、質量分析計に導入し検出する方法。

FT-ICRMS

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry) の略。一様磁場中のイオンのサイクロトロン周波数を検出して、 m/z (質量電荷比、イオンの質量 m を電荷数 z で割った値) の異なるイオンを検出する質量分析法。

イオンサプレッション

エレクトロスプレーイオン化法の場合、イオン性の夾雑物が大量に存在するとイオンになりやすい物質が優先的にイオン化されてしまい、目的物のイオン化が妨害される現象。イオンサプレッションは、実際には目的物が存在するのに検出されないといった問題を惹起する。

エレクトロスプレーイオン化法

電気伝導性の溶液を細管を通し先端に数千 V の電圧を印加すると、帯電した均一で微細な液滴として噴霧される。その液滴に加熱した窒素ガスを吹きつけて溶媒を蒸発させることによって試料分子のイオンを生成する方法。LC-MS や CE-MS のインターフェースとして用いられる。

メタボロミクスの対象はリン酸化合物、有機酸、アミノ酸、脂質、リン脂質、多糖、複合糖質など多岐にわたるが、本稿では、筆者らが取り組んでいる CE-MS によるイオン性メタボロームの測定技術とその応用に焦点を絞って解説する。

2. CE-MS によるメタボローム測定法

2.1 なぜ CE-MS か？

メタボローム研究への関心の高まりとともに、いくつかのメタボローム測定法⁶⁻¹⁰⁾が開発された。しかし GC/MS 法は誘導体化反応が必要であり⁶⁾、また誘導体化しても測定できない代謝物も多い。NMR⁷⁾はイオン性物質の検出を得意とせず、また感度が著しく低い。FT-ICRMS 法などの高分解能の質量分析計を用いた直接注入分析法^{8,9)}は、イオンサプレッションの影響を受け定量性に乏しく、また異性体が分離しない。LC-MS¹⁰⁾はイオン性物質の分離能が低く、イオンサプレッションを受けて定量性に乏しいなど、どの方法もイオン性のメタボローム測定には問題点があった。

筆者らは、イオン性化合物に対して高い分離能をもつキャピラリー電気泳動 (CE) と高感度、高選択検出器である質量分析計 (MS) を組み合わせた CE-MS¹¹⁻¹³⁾ によるメタボローム測定法を開発した。測定原理を図 1 に示す。CE-MS に注入された各代謝物質は、電気泳動によりキャピラリー内で分離後、質量分析計で検出される。試料中の陽イオン性物質は陰極方向に、反対に陰イオン性物質は陽極方向にその物質の (電荷)/(水和イオン半径) の比に基づく速度で移動し、キャピラリー出口に接続した質量分析計によって選択的に検出される。筆者らは三種類の CE-MS 法を用いて、細胞内に存在する 1000 種類以上の代謝物の一斉分析に成功した¹¹⁾。

メタボローム測定に CE-MS を選択したもう一つの理由は、定量性の高さである。LC-MS 法では、細胞のようなイオン性化合物が大量に存在する試料は、イオンサプレッションを惹起し定量性が著しく低下する。一方、CE-MS では試料の注入量 (数~数十 nL レベル) は LC-MS に比べてきわめて少ないため、イオンサプレッションが起きにくい。最近実施した大腸菌のヌクレオチド分析における標準

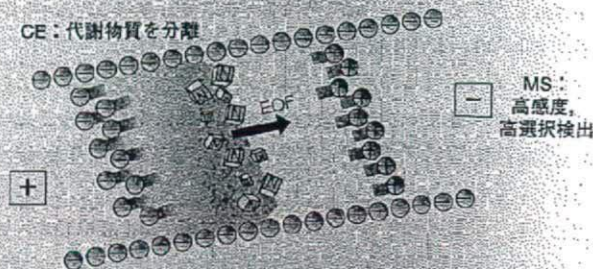


図 1 CE-MS による代謝物質一斉分析法

高電圧をキャピラリーに印加すると陽イオンは陰極へ、陰イオンは陽極へ移動しながら分離する。陰極および陽極に質量分析計を接続すれば、各イオンをその物質が固有にもつ質量数により選択的に検出できる。

物質の添加回収試験では、LC-MSではほとんどのヌクレオチドが回収率20~40%であるのに対して、CE-MSでの回収率は90~100%であった¹⁴⁾。この結果は、LC-MSではイオンサプレッションによってヌクレオチド類を正確に定量分析できないことを示す。一方、イオンサプレッションの影響を受けないCE-MSは各成分の正確な定量分析が可能である。以上の理由から、筆者らは細胞や組織のような夾雑成分の多い試料中のイオン性メタボロームの測定にはCE-MSが必須であると考えている。以下にCE-MS法によるメタボローム測定法の詳細について記す。

2.2 陽イオン性代謝物の測定法

陽イオン性代謝物の測定では、キャピラリーの出口が陰極となるよう電圧を印加する。泳動緩衝液には1Mのギ酸(pH2以下)を使用した¹¹⁾。1Mギ酸はpHが低いためアミノ基は解離し、カルボキシル基やリン酸基の解離は抑制される。したがってアミノ基をもつ代謝物は陽イオン性を帯び、高電圧の印加によって陰極方向に泳動し、質量分析計で一斉分析される。本法を用いることにより一つのCE-MS条件で、現在までに364種類の陽イオン性代謝物標準液が測定されている。

2.3 陰イオン性代謝物の測定法

解糖系、TCA回路、ペントースリン酸経路などのエネルギー代謝の代謝物質は陰イオン性をもつ。しかし通常のフューズドシリカキャピラリーを使用したCE-MS陰イオン測定システム(図2a)では、試料注入後、数分で電流が流れなくなる問題が発生する。理由は、このシステムでは電圧を印加した際に、電気浸透流と呼ばれる液流が陽極(MS側)から陰極(キャピラリーの入口側)に発生するため、

フューズドシリカ キャピラリー

溶融石英の材質からできた毛細管。一般には内径数十 μm 、外径350 μm 、長さ数十cmの中空の細長い円筒形の物がキャピラリー電気泳動の分離カラムとして使われる。

電気浸透流

キャピラリーに電解質溶液(泳動液)を満たすとキャピラリー内壁とこれに接する電解質溶液の間に電気二重層が形成される。ここに電圧を印加すると電解質溶液が溶媒を伴って移動し、電気浸透流が発生する。内表面が負に帯電するフューズドシリカキャピラリーを用いた場合は、陽極から陰極方向に電気浸透流が発生する。

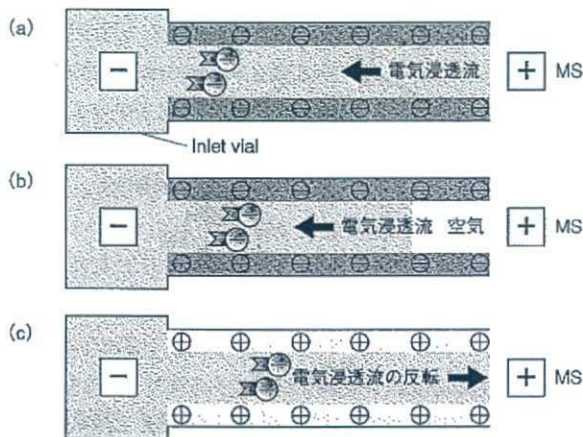


図2 CE-MSによる陰イオン性化合物の測定法

(a) 通常使用するフューズドシリカキャピラリーでは電気浸透流が陰極方向に発生し、(b) キャピラリーの出口に空気が入るため、電流が流れなくなる。これを解決するため(c) 表面が正に帯電したSMILE(+)キャピラリーを用いて電気浸透流を反転することにより、陰イオン性化合物の測定が可能になった。

SMILE(+)キャピラリー
 フェーズドシリカキャピラリーの内表面の一層目を塩基性ポリマーであるポリブレン、二層目を酸性ポリマーであるデキストラン硫酸、三層目をポリブレンでコーティングしたキャピラリー。内表面は陽イオン性を帯びており、電解質溶液を満たして電圧を印加すると陰極から陽極方向へ電気浸透流が反転する。

シラノール基
 フェーズドシリカキャピラリーの表面のSiOH基。p*K_a*は7.1であり、pHが高いとSiO⁻に解離する。

キャピラリーの出口側に空気が入るからである(図2b)¹²⁾。この問題を解決するため、筆者らは、塩基性物質を内表面にコーティングしたSMILE(+)¹³⁾キャピラリーを用いて電気浸透流を陰極から陽極に反転する方法を考案し(図2c)、連続的かつ安定した陰イオン性化合物の測定を可能にした¹²⁾。本法により277種類の陰イオン性代謝物標準液が分析できることを確認している。

2.4 ヌクレオチド類の測定法

ヌクレオチド類やCoA類は、通常のpHでは陰イオン性をもつ。しかし前述の陰イオン測定条件では、いくつかのヌクレオチドやCoAがSMILE(+)¹³⁾キャピラリーの表面に吸着し検出できなかった¹³⁾。そこで通常のフェーズドシリカキャピラリーを用いて新しい測定条件を開発した¹⁴⁾。しかしATP、GTPなどのリン酸基を多くもつヌクレオチド類はフェーズドシリカキャピラリーにも吸着した。原因はヌクレオチドのリン酸基がフェーズドシリカ表面のシラノール基と水素結合することであった。そこで、あらかじめリン酸バッファでキャピラリーを洗浄し、シラノール基をリン酸でマスクングすることで吸着を防いだ¹⁴⁾。また電気浸

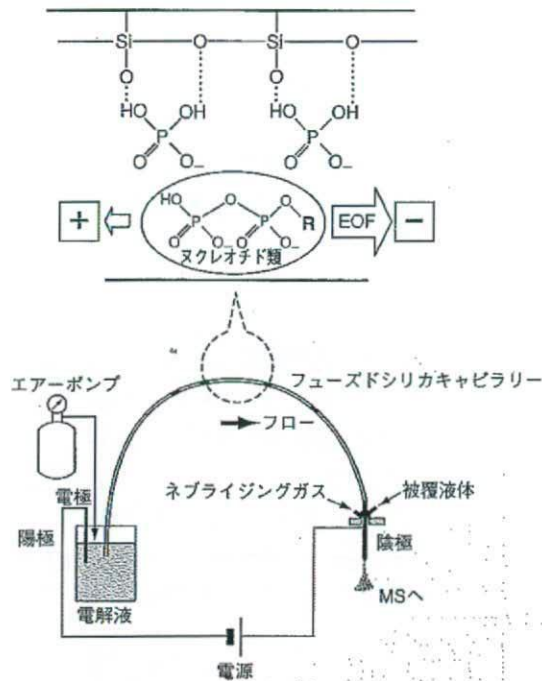


図3 Pressure-assisted CE-MSによるヌクレオチド類の測定法¹⁴⁾
 あらかじめリン酸バッファでキャピラリーを洗浄し、キャピラリー内表面のシラノール基をリン酸で覆い、シラノールへのヌクレオチドのリン酸基の吸着を防ぐ。その後試料を注入し、電気泳動を行う。ヌクレオチド自体は陰イオンなので陽極方向に泳動するが、陰極方向に発生する電気浸透流とエアープンプによる加圧によって、ヌクレオチドは陰極方向に運ばれ、陰極に接続した質量分析計によって検出される。

透流とエアープンプによる加圧によって、ヌクレオチド類、CoA 類を陰極に押し出す方法を用いることにより大幅に分析時間を短縮した(図3)¹⁴⁾。本法により、安定で定量的なヌクレオチド類、CoA 類の分析を可能にした。

2.5 CE-TOFMS 法の開発

最近、筆者らはスループット、分解能、感度を飛躍的に高めるため、従来の四重極質量分析計(QMS)より数千倍スキャンスピードが速く、高質量数範囲をカバーでき、かつミリマスユニット(整数質量の1/1000単位)の質量精度で検出できる飛行時間型質量分析計(TOFMS)をCEに接続した⁴⁾。CE-TOFMSは従来のCE-QMS法に比べ30倍のスループットの向上、ミリマスユニットの質量精度での検出を可能にした。またCE-QMS法に比べCE-TOFMS法ではほとんどの物質で数倍から数十倍の高感度検出(100 nMレベル)が可能になった⁴⁾。定量性も高いため、CE-TOFMS法は今後きわめて強力なイオン性メタボロームの測定法となるであろう。

3. 生命科学への応用

3.1 アセトアミノフェンに惹起された急性肝炎のバイオマーカーの発見

筆者らは慶應義塾大学医学部の末松誠教授らと共同で、薬物投与時にグルタチオンの低下に伴って誘発された急性肝炎の低分子バイオマーカーの発見に成功した。米国では解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン(AAP)の過剰摂取により、年間100名以上が急性肝炎で死亡する。そこでAAPをマウスに過剰投与して急性肝炎を惹起し、マウスの肝臓の代謝物質をCE-TOFMSでメタボローム測定した⁷⁾。マウスの肝臓から全部で1859成分のピークを検出し、そのなかから、急性肝炎マウス(AAP投与後1~2時間)で大きく増加する物質(成分名は未知)を発見した⁴⁾。

CE-QqTOFMSを用いて、この物質のMS/MSスペクトルを採取し解析した結果、この物質は還元型グルタチオン(GSH)のSH基がCH₃基に置換されたオフタルミン酸と推定された。オフタルミン酸の標品を入手し、マウスの肝臓サンプルに添加して、再びCE-TOFMSとCE-QqTOFMSで測定したところ、この物質とオフタルミン酸の移動時間およびMS/MSスペクトルが完全に一致したため、この物質をオフタルミン酸と特定した⁴⁾。

さらにAAPをマウスに投与し、肝臓や血清中の代謝物質の経時変化を測定した(図4)。図4(a)に示すように肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAAP投与1, 2時間後に大幅に減少した。このときにGSHの減少に反比例して肝臓内のオフタルミン酸の前駆体である γ -Glu-2ABとオフタルミン酸が急増した。図4(b)に示したように血清中でもオフタルミン酸は肝臓中と同様にAAP投与1, 2時間後に増加した。この結果は、血中のオフタルミン酸が、過剰のAAPによりGSHが低下することを表す有力なバイオマーカーであることを示す⁴⁾。

このモデルでオフタルミン酸が肝臓や血液で増加する機序も解明した。通常の還元状態(図5a)では、肝細胞内にGSHが大量に存在し、これが γ -グルタミルシステイン合成酵素をフィードバック制御するためにGSHやオフタルミン酸の生

グルタチオン

グルタチオンには還元型(GSH)と酸化型(GSSG)が存在し、細胞内の98%以上が還元型である。還元型グルタチオンは細胞内の主要な抗酸化物質であり、細胞内に高濃度で存在し、細胞をさまざまな酸化ストレスから守る役割を果たす。

QqTOFMS

ハイブリッド型のMS/MS装置。装置に導入されたイオンは四重極マスフィルターQでプリカーサーイオンとして選択後、高周波電圧のみの衝突室qで多重回衝突によって分解され、その生成イオンを真空の管中で飛行させて検出器までの到達時間によりイオンを分離する方式の質量分析計。目的物質の精密質量のMS/MSスペクトルを取得することが可能。

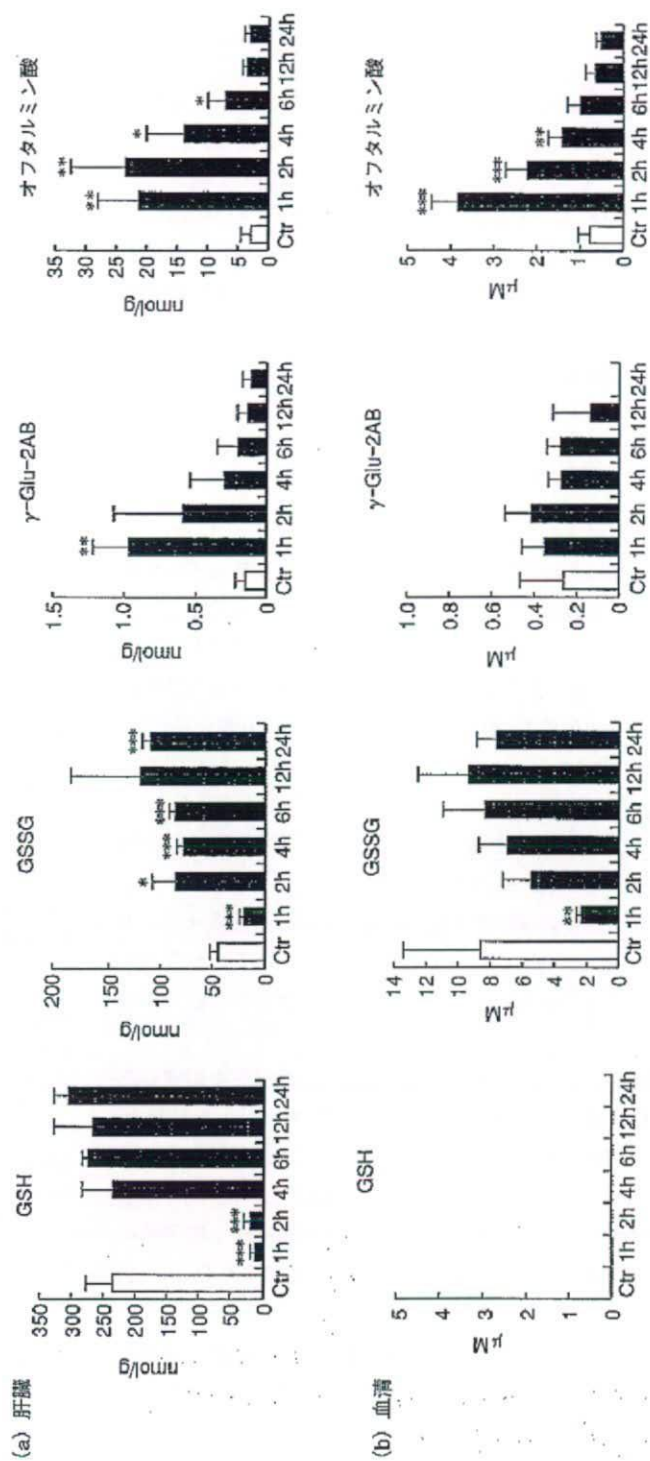


図4 AAP投与後に肝臓および血清中で変化のあった代謝物質⁴⁾ AAPをマウスに投与し、肝臓や血清中の代謝物質の経時変化を測定した。肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAAP投与1, 2時間後に大幅に減少した。このとき肝臓内および血清中のオフタルミン酸は反対に増加した。したがって血中オフタルミン酸は、薬物投与により誘発されるGSHの低下を示す低分子バイオマーカーになる。

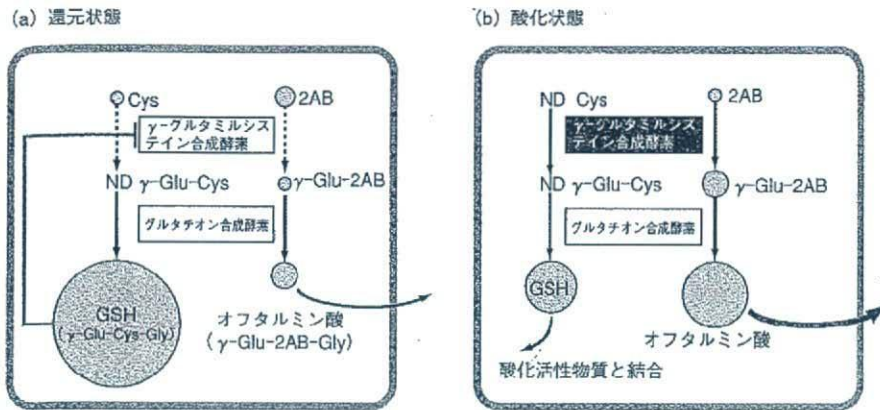


図5 肝細胞のオプタルミン酸合成経路⁴⁾

通常の還元状態では、肝細胞のGSHがγ-グルタミルシステイン合成酵素をフィードバック制御しているためGSHやオプタルミン酸の合成は阻害される。酸化状態ではGSHの消費に伴いフィードバック制御が解除され、γ-グルタミルシステイン合成酵素が活性化される。したがって肝細胞にオプタルミン酸が合成される。オプタルミン酸は肝細胞内に蓄積され、ABCトランスポーターなどで胆汁中に輸送される。

合成は阻害される^{16,17)}。しかし肝臓内で生成された酸化活性物質(NAPQI)によってGSHが消費されると(図5b)、フィードバック制御が解除され、γ-グルタミルシステイン合成酵素が活性化されるためオプタルミン酸が合成される。オプタルミン酸は肝細胞内に蓄積し、ABCトランスポーターなどで胆汁中に輸送され最終的に血液中に排泄される(図5)⁴⁾。

3.2 マルチオミクス測定による大腸菌の代謝解明

筆者が所属する慶應義塾大学先端生命科学研究所では、最新のトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム技術を駆使して、さまざまな増殖速度にある大腸菌野生株や一遺伝子破壊株の細胞内分子を徹底分析した。その結果、大腸菌細胞の内外の変動に対する代謝の頑強性に関する知見を得た。

まず4288個ある大腸菌K12株の遺伝子のうち致死となるものを除き、遺伝子の一つずつ欠失させた変異体を3984種類作成した(KEIOコレクション)¹⁸⁾。そのなかから解糖系とペントースリン酸経路にかかわる遺伝子を欠失させた大腸菌24株を選出し、野生株についてはさまざまな増殖速度で連続培養によって生育させた。これらの大腸菌の細胞内分子についてトランスクリプトーム(定量PCRおよびDNAマイクロアレイ)、プロテオーム(LC-MS/MS法および二次元電気泳動)、メタボローム(CE-TOFMS)、フラックソーム(代謝流束)を測定した²⁾。得られたデータを解析した結果、大腸菌は環境変化に応じて増殖速度を変える場合、遺伝子発現を積極的に制御し、細胞内の代謝物質レベルを安定に保っていることを見いだした。一方、一遺伝子欠損に対しては基本的に、とくに積極的な対応を行わず、代謝経路自体の頑強性(アイソザイムの存在や迂回経路の形成)によって代謝物質レベルが安定に保たれるようになっていた。この結果から、大腸菌は状況に

NAPQI

N-acetyl-*p*-benzoquinone imine の略。AAPの一部が肝臓内のシトクロムP450によって代謝され、生成された中間体、強い酸化活性物質であり、肝臓内に蓄積するとさまざまなタンパク質と反応し、肝細胞の壊死を引き起こす。

代謝流束

各代謝経路を流れる代謝物質量を単位細胞量当りの数値で表現したもの。

応じてさまざまな手段を駆使して代謝を安定化していることが示唆された²⁾。

4. おわりに

CE-MS 法や最新の CE-TOFMS 法は、細胞内に存在する数千のイオン性代謝物質の高感度かつ一斉分析を可能にした。本法はアセトアミノフェン投与マウスや大腸菌の例で示したように、細胞がダイナミックに変化する際に代謝物質の変動を一斉にかつ経時的に測定することができ、代謝の変動を解明するきわめて有効な手段である。今後、CE-MS によるメタボローム測定法がさまざまな研究分野で広く利用され、生命科学のさらなる発展に貢献することを期待したい。

参考文献

- 1) T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka, *J. Proteome Res.*, 2, 488(2003).
- 2) N. Ishii, K. Nakahigashi, T. Baba, M. Robert, T. Soga, A. Kanai, T. Hirasawa, M. Naba, K. Hirai, A. Hoque, P. Y. Ho, Y. Kakazu, K. Sugawara, S. Igarashi, S. Harada, T. Masuda, N. Sugiyama, T. Togashi, M. Hasegawa, Y. Takai, K. Yugi, K. Arakawa, N. Iwata, Y. Toya, Y. Nakayama, T. Nishioka, K. Shimizu, H. Mori, M. Tomita, *Science*, 316, 593(2007).
- 3) S. Sato, T. Soga, T. Nishioka, M. Tomita, *Plant J.*, 40, 151(2004).
- 4) T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakuragawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka, M. Tomita, *J. Biol. Chem.*, 281, 16768(2006).
- 5) A. Kinoshita, K. Tsukada, T. Soga, T. Hishiki, Y. Ueno, Y. Nakayama, M. Tomita, M. Suematsu, *J. Biol. Chem.*, 282, 10731(2007).
- 6) O. Fiehn, J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, L. Willmitzer, *Nat. Biotechnol.*, 18, 1157(2000).
- 7) N. V. Rco, *Drug Chem. Toxicol.*, 25, 375(2002).
- 8) A. Aharoni, C. H. Ric de Vos, H. A. Vcrhoeveu, C. A. Maliepaard, G. Kruppa, R. Bino, D. B. Goodenowe, *OMICS*, 6, 217(2002).
- 9) J. I. Castrillo, A. Hayes, S. Mohammed, S. J. Gaskell, S. G. Oliver, *Phytochemistry*, 62, 929(2003).
- 10) R. Plumb, J. Granger, C. Stumpf, L. D. Wilson, J. A. Evans, F. M. Lenz, *Analyst*, 128, 819(2003).
- 11) T. Soga, D. N. Hoiger, *Anal. Chem.*, 72, 1236(2000).
- 12) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, T. Nishioka, *Anal. Chem.*, 74, 2233(2002).
- 13) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, T. Nishioka, *Anal. Chem.*, 74, 6224(2002).
- 14) T. Soga, T. Ishikawa, S. Igarashi, K. Sugawara, Y. Kakazu, M. Tomita, *J. Chromatogr. A*. doi: 10.1016/j.chroma.2007.05.054.
- 15) H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, *Anal. Chem.*, 70, 5272(1998).
- 16) P. G. Richman, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, 250, 1422(1975).
- 17) J. W. Cuozzo, C. A. Kaiser, *Nat. Cell Biol.*, 1, 130(1999).
- 18) T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.*, 2(2006). doi: 10.1038/msb4100050.

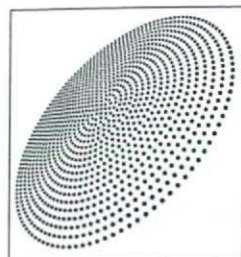
臨床化学

Vol.37 No.4 2008 別刷

特集

CE-MSによるメタボローム 測定法と生命科学への応用

曾我朋義



特集●Vol.37 No.4 メタボローム解析

CE-MSによる メタボローム測定法と 生命科学への応用

曾我朋義*

はじめに

オミクス研究は、細胞や生体内の多数の構成成分の変化をバイアスをかけない手法により網羅的に探索し、生命現象を包括的に理解しようとするものである。従来の仮説検証型の科学に対して、オミクスは網羅的なデータ解析によって背後に隠れている因子を探索する仮説発見型の研究であり、人が予想もしなかった大発見をもたらす可能性を秘める。

近年急速に進展したメタボロミクスは細胞内の代謝産物を網羅的に探索し、新規の代謝経路や不明であった代謝調節機構、未知遺伝子やタンパク質の機能、生体高分子と代謝物質の相互作用などを解き明かそうとする方法論である。さらに、メタボローム研究は、医薬分野におけるがんや疾病機序の解明、病体の診断、バイオマーカー探索、発酵分野における特定の物質を高生産する工業用微生物の開発などの応用研究にも革新的な解決策を与えるのではないかと期待されている。

ほとんどの生物が有している解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路に代表されるエネルギー代謝やアミノ酸、核酸生合成経路などの中間代謝物の多くは、リン酸基、カルボキシ

ル基、アミノ基等を持つイオン性物質であり、UV吸収がない、不揮発性などの特徴を有す。さらに、物理的・化学的性質が類似している異性体から、性質が全く異なるものまでが混在し、数百種類から数万種類の代謝物が存在する。

これまでに、GC/MS、LC-MS、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR/MS)、NMRなどを用いるいくつかのメタボローム測定法が開発された。しかし、未だに決定的なメタボローム測定法は確立されていない。本稿では、これまで筆者らが新規に開発してきたキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) 法によるメタボローム測定法の特徴と生命科学への応用例を解説したい。

1. CE-MSによるメタボローム測定法

筆者らは、細胞内の中心代謝経路に存在する代謝中間体のほとんどが電荷を持つことに着目し、イオン性物質に対して高分離能を示すキャピラリー電気泳動 (CE) と高い選択性と感度を提供する質量分析装置 (MS) を組み合わせた CE-MS 法を開発した¹⁾。CE-MS に注入された各代謝物質は、電気泳動によりキャピラリー内で分離後、質量分析計 (MS) で検出される。図 1 に示すように陽イオン性物質は陰極方向に、また陰イオンは陽極方向に移動する。各物質の移

*慶應義塾大学先端生命科学研究所

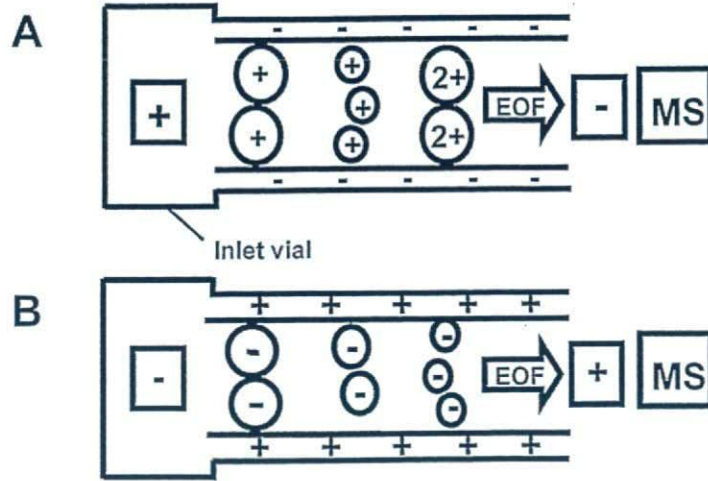


図1 CE-MSによるメタボローム測定法
Aは陽イオン性代謝物質, Bは陰イオン性代謝物質の測定法

動速度はその物質の(電荷/水和イオン半径)の比に基づくため, この比率が異なる物質はキャピラリー内で分離され, キャピラリーの出口に接続した質量分析計で, 各成分が質量に基づき選択的に検出される。CE-MS法の利点は, ほとんどのイオン性物質を測定できることと, イオンサプレッションの影響を受けず定量性が極めて高いことである²⁾。

近年, さらに高速走査かつ高分解能を有する飛行時間型質量分析計(TOFMS)をCEに接続させたCE-TOFMS法を開発し³⁾, 精密質量(ミリ原子質量単位)での代謝物の一斉高感度分析を達成した。筆者らは, これまでにCE-MS, CE-TOFMS法を微生物^{4,5)}, 植物⁶⁾, 哺乳動物^{3,7)}などの細胞, 組織のメタボローム測定に応用してきた。

2. アセトアミノフェン投与マウスのメタボローム測定

欧米では解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン(APAP)の過剰摂取により, 年間百名以上が急性肝炎で死亡する。そこでAPAPをマウスに腹腔内投与し, APAP投与後2時間で急性肝炎が惹起されたマウスとコントロール(生理食塩水投与)マウスの肝臓および血液から抽出された代謝物質をCE-TOFMSでメタボローム測定した³⁾。

二種類のCE-TOFMS条件により, マウスの肝臓から1,859種類の成分が検出された。メタボロームディファレンシャルディスプレイ³⁾によりコントロールとAPAP投与後2時間マウスの肝臓の測定結果から, 変化のあった代謝物質を探索し, APAPの代謝経路にマップした(図2)。APAPを服用すると99%は肝臓でグルクロン酸か硫酸に抱合され, 尿中に排泄される。しかし1%はチトクロムP450により代謝され, 毒性の高い親電子物質NAPQI(N-acetyl-p-benzoquinone imine)が生合成される。通常NAPQIは肝細胞内に大量に存在する還元型グルタチオン(GSH)によって抱合され, 尿中に排泄される。しかし, APAPが過剰に存在するとGSHが枯渇し, NAPQIが蓄積して様々なタンパク質と結合するため, 肝細胞の壊死を引き起こす。図2に示したように, APAP投与後2時間のマウスでは, システイン(Cys)以降のグルタチオン合成経路の代謝物質が軒並み減少していることが判明した³⁾。

3. オフタルミン酸生合成経路の発見

APAP投与によって惹起された急性肝炎のマウスで有意に増加する物質を発見した。この未知物質の移動時間はGSHの移動時間と一致していたため, 未知物質はGSHに構造が類似している可能性が高い。そこでCE-Q-TOFMS(キャ