

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

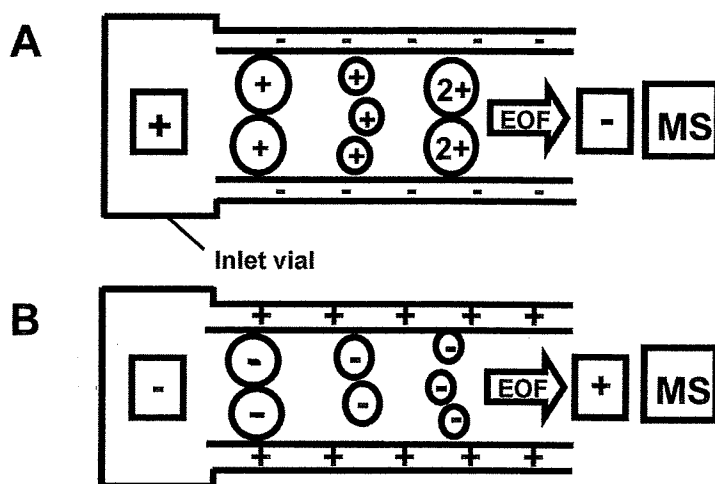


図1 CE-MSによるメタボローム測定法
Aは陽イオン性代謝物質, Bは陰イオン性代謝物質の測定法

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^{1,4,5)}, 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が硫酸に抱合され, 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

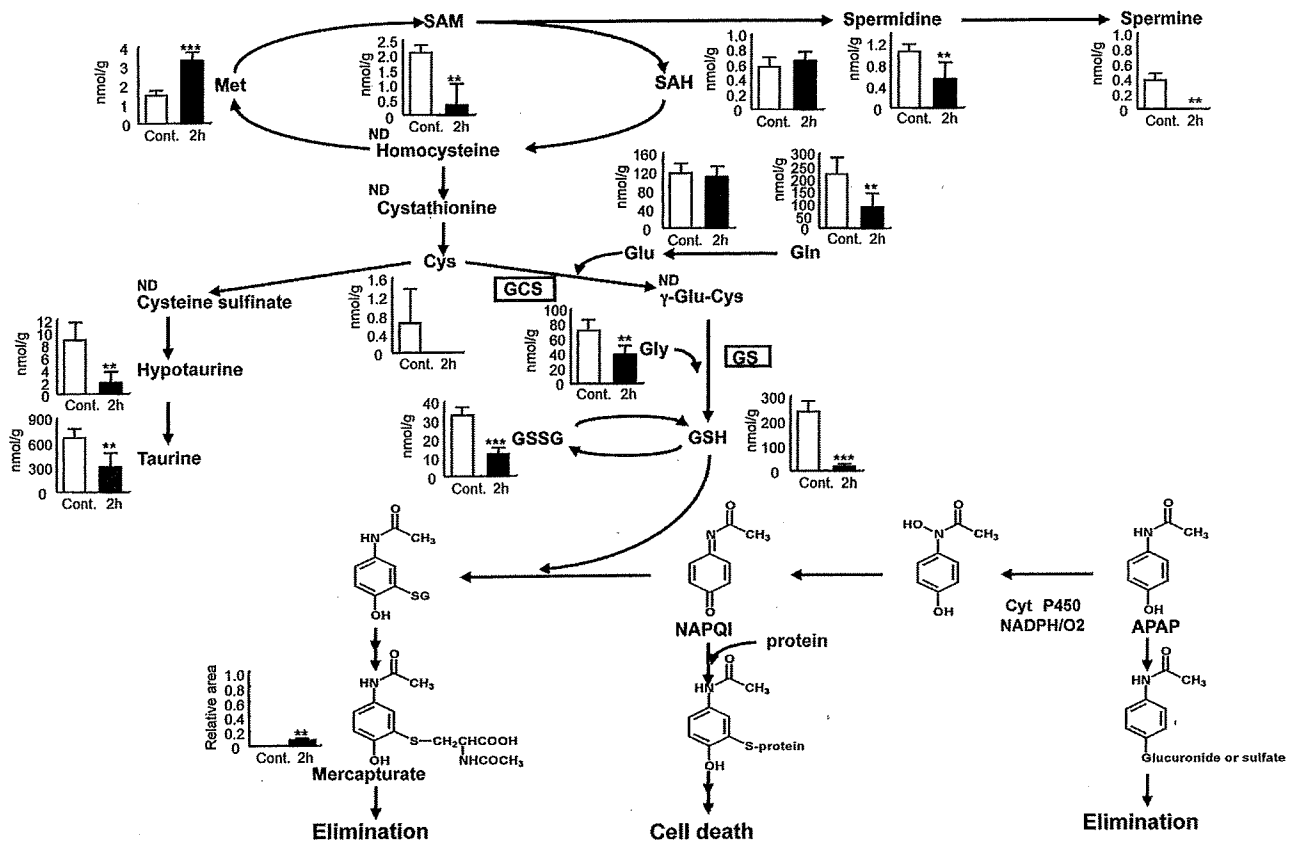


図2 アセトアミノフェン (APAP) 投与後の肝臓中のAPAP関連代謝物質の変動

APAPは大部分がグルクロン酸が硫酸抱合を受け尿中に排泄されるが、1%が毒性の高い親電子物質NAPQIに代謝される。NAPQIは通常GSHが抱合し、尿中に排泄される。しかし、APAPが過剰に存在すると、NAPQIが蓄積し肝細胞の壊死を引き起こす。APAP投与後2時間ではCys以下の代謝経路の代謝中間体が軒並み減少した。Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

ピラリー電気泳動-ハイブリッド四重極-飛行時間型質量分析計)を用いてGSHと未知物質のMS/MSスペクトルを採取した。図3に示すように未知物質の主要な4つのフラグメントイオンすべてに対して、質量が17.96Da高いフラグメントイオンがGSHに存在することがわかった。これは、GSHから質量17.96Daの官能基が外れた化合物が未知物質に近いものであることを示唆する。そこで17.96Daの質量を持つ官能基を探索した。しかし、17.96Daの質量の官能基は実存しなかった。試行錯誤した末に、17.96Daの差はSH基(32.980Da)が外れてCH₃基(15.023Da)が結合すること(32.980Da-15.023Da=17.957Da)であり、未知物質はGSHのSH基(図3)がCH₃基に置換されたオフタルミン酸(図3B)と推測された。そこで、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後、再びCE-Q-TOFMSで測定したところ、未知物質は予想ど

おりオフタルミン酸であることが確認された³⁾。

続いて、APAP投与によりオフタルミン酸が増加する機序を検討した。図4に示すようにGSH(γ-Glu-Cys-Gly)はγ-グルタミルシステインシンセターゼ(GCS)とグルタチオンシンセターゼ(GS)の二つの酵素によって、Cysから生合成されたトリペプチドである。筆者らは、オフタルミン酸(γ-Glu-2AB-Gly)はCysのSH基がCH₃基に置換された2-アミノ酪酸(2AB)からGSHと同様にGCSとGSの酵素によって生合成されるのではないかと推測した(図4)。GCSを抑制するブチオニンスルフォキシミンやGCSを活性化する親電子物質ジエチルマレイン酸をマウスに投与し、GSHおよびオフタルミン酸合成経路の代謝物質の濃度変化の解析から、オフタルミン酸合成経路の存在が正しいことを証明した³⁾。

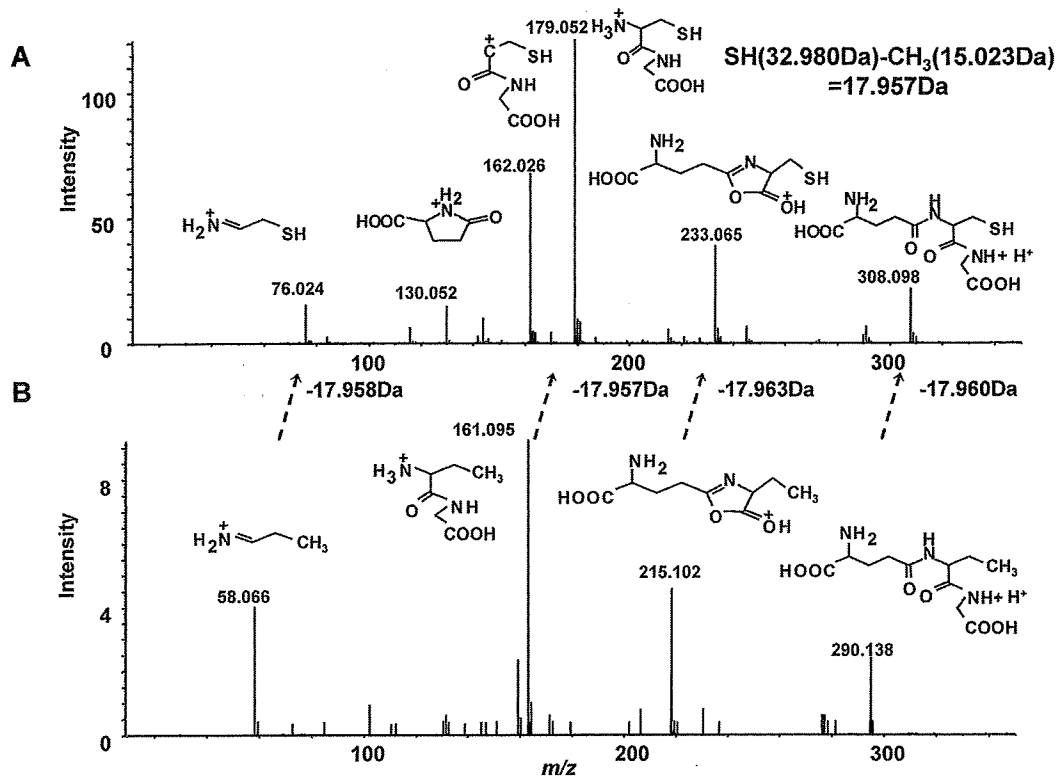


図3 GSHと未知物質のMS/MSスペクトル

AはGSH, Bは未知物質。二つの成分のMS/MSスペクトルをCE-Q-TOFMSで採取し, 比較した。未知物質の4つのスペクトル全てに対して, 質量が17.96Da高いスペクトルがGSHに存在した。17.96DaはSH基 (32.980Da) とCH₃基 (15.023Da) の差 (32.980Da-15.023Da=17.957Da) であり, 未知物質は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。

Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

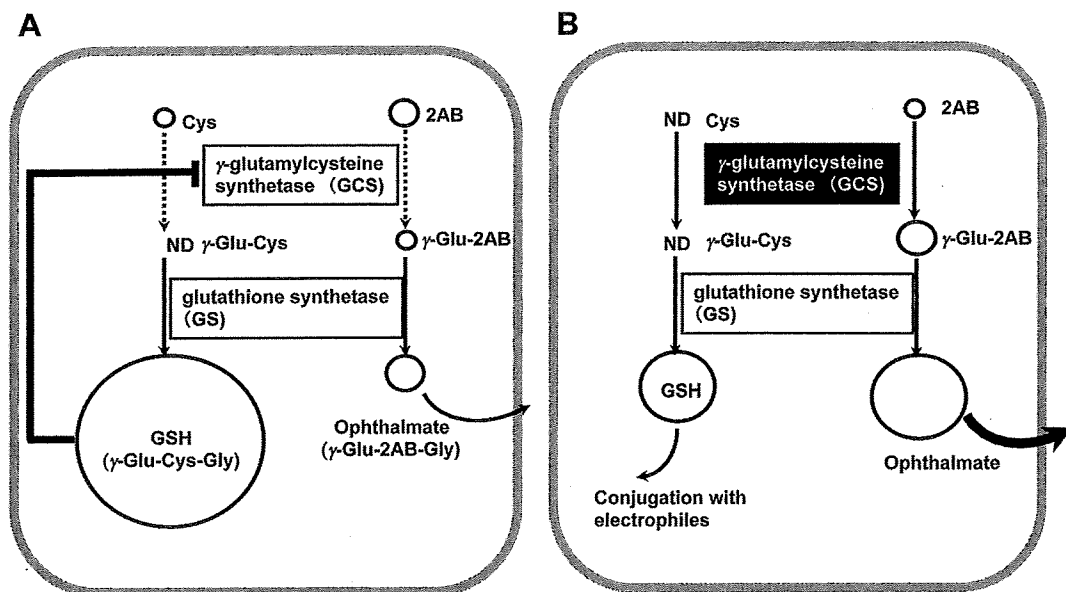


図4 肝細胞のオフタルミン酸生合成経路

Aは還元状態, Bは酸化状態。還元状態では, 大量にあるGSHによってGCSがフィードバック制御されているためGSHやオフタルミン酸の生合成は阻害される(図4A)。酸化状態ではGSHの消費に伴いGCSのフィードバック制御が解除され, GCSが活性化される。したがってオフタルミン酸が生合成される。オフタルミン酸は蓄積され, トランスポーター等で肝臓から輸送され最終的に血液に輸送される(図4B)。

Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

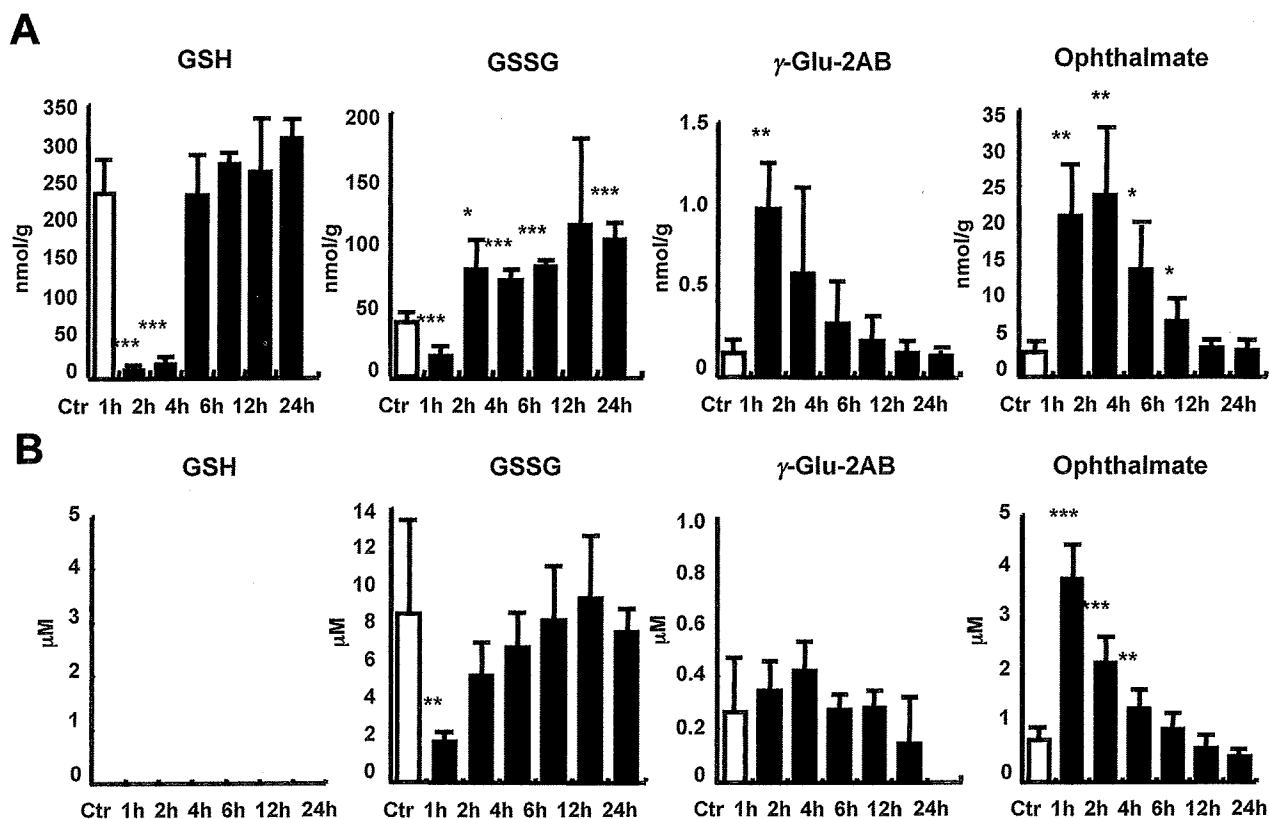


図5 APAP投与後に肝臓および血清中で変化のあった代謝物質
 Aは肝臓、Bは血清の測定結果。APAPをマウスに投与し、肝臓と血清中のGSHやオファルミン酸代謝経路の代謝物質の経時変化を測定した。肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAPAP投与1, 2時間後に大幅に減少した。反対に肝臓および血清のオファルミン酸が急増した。
 Soga T, et al: J Biol Chem, 281: 16768-16776, 2006 より改変して引用。

4. 肝臓のグルタチオン枯渇マーカーの発見

図5に示すように肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAPAP投与1, 2時間後に大幅に減少した。GSHの減少に反比例して肝臓内の γ -Glu-2AB(オファルミン酸の前駆体)とオファルミン酸は急増した(図5A)。また、血清中のオファルミン酸も肝臓中同様にAPAP投与1, 2時間後に急増した(図5B)。これらの結果は、血中オファルミン酸は肝臓のGSHが低下したことを示すバイオマーカーであることを示す³⁾。

実験結果を総括すると、通常の還元状態(図4A)では、肝細胞内にGSHが大量に存在し、これがGCSをフィードバック制御しているためGSHやオファルミン酸の生合成は阻害される^{8,9)}。しかし、APAPの代謝で生じた親電

子物質(NAPQI)の解毒のためにGSHが消費されると(図4B)、GCSに対するフィードバック制御が解除され、GCSが活性化される。したがって、オファルミン酸が生合成される。しかしオファルミン酸はSH基を有していないため、親電子物質とは反応せず肝細胞内に蓄積し、トランスポーター等で最終的に血液中に排泄される(図4)³⁾。

筆者らが知る限り、オファルミン酸の生理学的な役割はこれまで述べられていないが、オファルミン酸はABCトランスポーターによるGSHの細胞外への輸送を競争的に阻害するという報告がある¹⁰⁾。肝細胞はオファルミン酸を生合成して細胞外に排出することでGSHを細胞内に留め、親電子物質に対する防御機構を備えているのであろう。

おわりに

その後のメタボローム測定により、オフタルミン酸は、ヒトをはじめとする各哺乳動物の各組織、植物、酵母、大腸菌等にも存在することが確認された。オフタルミン酸は、グルタチオンシステムを持つ生物には必ず存在しているのかもしれない。最近のCE-TOFMSによるメタボローム解析によって、APAPの副作用マーカーであるオフタルミン酸のみならず、各種のがんや疾患の低分子バイオマーカー候補が発見されてきた。今後幅広い分野で本法が利用され、生命科学のさらなる発展に貢献することを期待したい。

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。

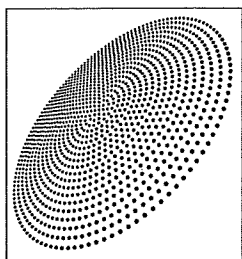
■文 献

- 1) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T: Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res*, **2**: 488-494, 2003.
- 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*, **1159**: 125-133, 2007.
- 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*, **281**: 16768-16776, 2006.
- 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*, **316**: 593-597, 2007.
- 5) Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, Tomita M, Soga T: Depiction of Metabolome Changes in Histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol BioSyst*, **4**: 135-147, 2008.
- 6) 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*, **40**: 151-163, 2004.
- 7) 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*, **282**: 10731-10741, 2007.
- 8) Richman PG, Meister A: Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem*, **250**: 1422-1426, 1975.
- 9) Cuzzo JW, Kaiser CA: Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol*, **1**: 130-135, 1991.
- 10) Ballatori N, Dutczak WJ: Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem*, **269**: 19731-19737, 1994.

Metabolome Analysis by CE-MS and Application to Biosciences

Tomoyoshi Soga*

**Institute for Advanced Biosciences, Keio University*



がんメタボロームによるエネルギー代謝の解析とがんの微小環境を標的とした治療薬の開発に向けて

紙 健次郎* 冨塚江利子**.*** 北 潔***
冨田 勝* 曾我朋義* 江角浩安**

はじめに

メタボローム解析技術は近年目覚ましい発展を遂げ、微生物や植物分野に加え臨床や薬効評価^{1,2)}そしてがん研究^{3,4)}にも活発に応用され始めている。様々な解析手法がしのぎを削る中、我々は特にキャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS)を用いたイオン性低分子化合物の網羅的測定法を確立した(CE-MSによるメタボローム解析手法の詳細については曾我の項および文献^{5,6)}を参照)。CE-MSは、現在よく使われているNMRやLC-MS, GC-MSなどでは一斉分析が難しいイオン性低分子化合物の網羅的な測定が可能であり、具体的には解糖系やペントースリン酸回路, クエン酸回路, 尿素回路, アミノ酸およびポリアミン代謝, プリン体およびピリミジン代謝経路など, エネルギー代謝に関与する物質群の一斉定量に極めて有用である。一方, がんの代謝に関する研究は古くから行われているものの, 様々な環境ストレスに曝されつつも増殖を続けることが可能ながん細胞のエネルギー代謝にはいまだ未知の部分が多い。従って,

CE-MSによる代謝物質の網羅的な解析は, がんの微小環境におけるエネルギー代謝を明らかにする上で最適である。ここではCE-MSによるメタボローム解析技術を応用したがんの微小環境における特殊なエネルギー代謝機構の解明や, その特殊な生育環境を標的とした新規抗腫瘍性物質に関する研究成果を紹介する。

1. がんの微小環境とエネルギー代謝

がん細胞が好氣的環境下でも酸化的リン酸化よりむしろ解糖系依存的にエネルギー代謝を行う現象はワーバーグ効果⁷⁾と呼ばれ, 様々ながん種において観察されている。がん細胞によるグルコースの取り込み効率が高いことを利用した近年の陽電子放射断層撮影(PET)診断⁸⁾は, まさにがんの代謝特性を利用した画期的ながんの早期発見手法である。ところが膵臓癌など一部のがん種では, 血流が乏しいために酸素およびグルコースの供給が不十分となり, がん細胞が栄養的に極めて劣悪な環境で生存・増殖していることが知られている⁹⁾。このようながんは早期発見が難しいばかりでなく, 標準的な化学療法によっても奏効率は低く再発の可能性が高い。従って, 解糖系の亢進だけでこのようながん細胞

*慶應義塾大学先端生命科学研究所

**国立がんセンター東病院臨床開発センター

***東京大学大学院医学系研究科

のエネルギー代謝を説明することは難しく、多血性で栄養的に恵まれた環境で増殖するがん種とは異なる代謝機構に依存している可能性がある。がんが高い浸潤能を有するには、がん細胞の増殖に伴い局所的に生じる慢性的な虚血状態やアシドーシスなどのストレスに対する適応性の獲得が条件であると言われて¹⁰⁾。解糖も酸化的リン酸化も制限された乏血性の微小環境におけるがん細胞は、増殖に必要なエネルギーをいったいどのように捻出しているのだろうか？我々は、CE-MSによるメタボローム解析技術を駆使し、このよ

うな乏血性がん細胞のエネルギー代謝に関するジレンマの解明を試みた。

2. 栄養飢餓状態におけるがん細胞の特殊なエネルギー代謝

2.1 グルコースおよび酸素非依存的なATP生成

極度の栄養欠乏状態におけるがん細胞のエネルギー代謝を解明する目的で、膵臓癌の培養細胞であるPanc-1およびヒト皮膚線維芽細胞であるHDFを用いて時系列メタボローム解析を行った。具体的には、グルコース欠乏か

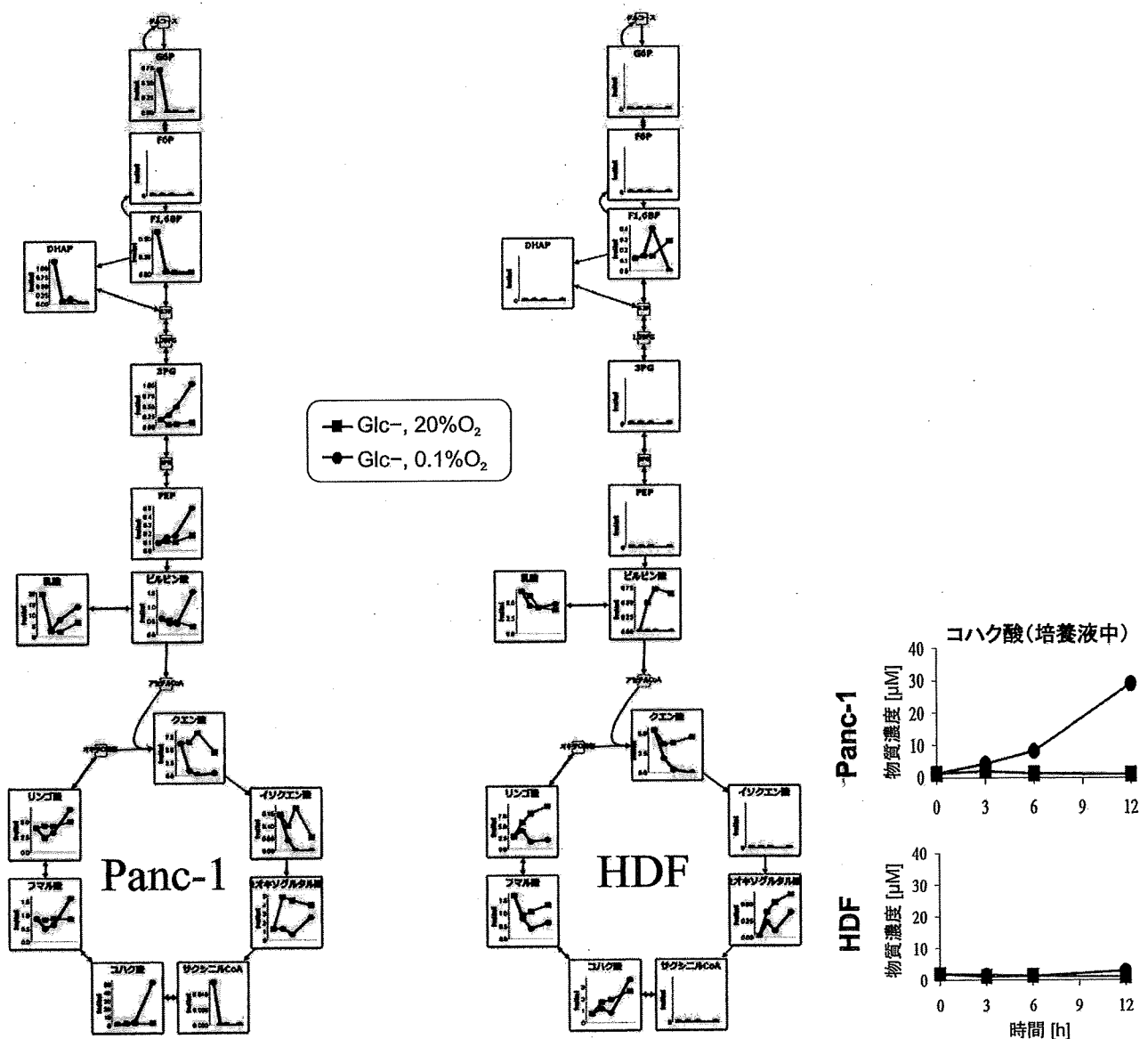


図1 栄養飢餓状態 (Glc-,20%O₂ vs Glc-,0.1%O₂) におけるPanc-1およびHDFの時系列メタボローム解析結果 (左: 解糖系およびクエン酸回路中間物質のデータのみ抜粋) および培養液中のコハク酸濃度の変化 (右)

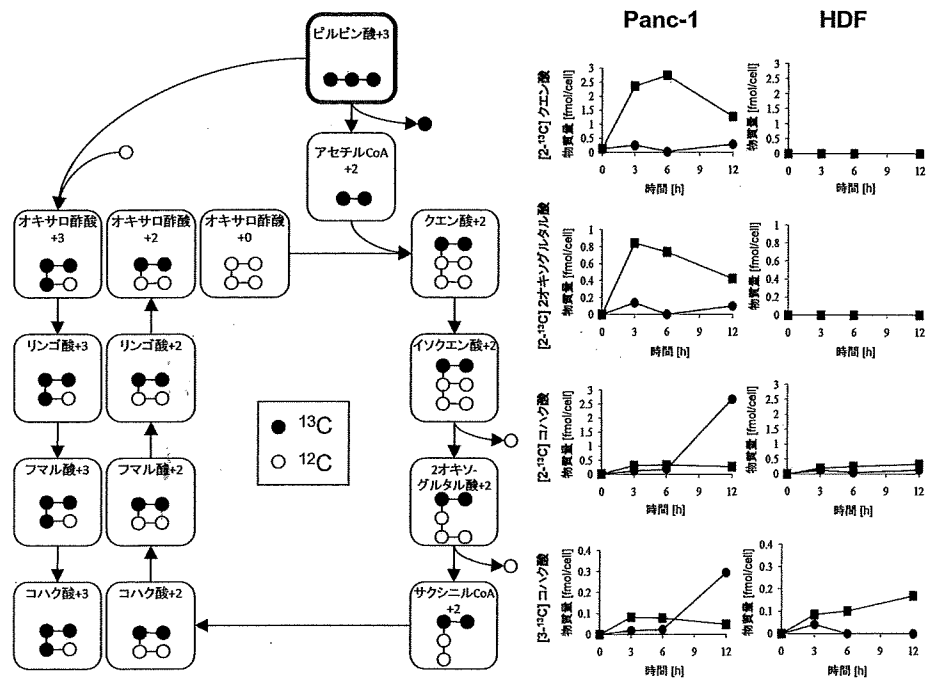


図2 U-¹³Cピルビン酸から生成されるクエン酸回路中間物質のアイソトポマー(左)および[2-¹³C]クエン酸, [2-¹³C]2オキソグルタル酸, [2-¹³C]コハク酸, および[3-¹³C]コハク酸の時系列変化(右) 物質名に続く+2および+3は, 各アイソトポマーに含まれる¹³Cの数を示す。

つ常酸素 (Glc-, ~20% O₂) またはグルコース欠乏かつ低酸素 (Glc-, 0.1% O₂) 状態にて培養したPanc-1およびHDFから細胞および培養液サンプルを経時的に採取し, CE-MSによるメタボローム測定を行い, 130種のエネルギー代謝関連物質の定量を行った。結果, グルコース欠乏かつ低酸素条件における特徴的な変化として, 解糖系およびクエン酸回路中間物質の多くが枯渇する一方で, 特にPanc-1ではコハク酸濃度が細胞内で40倍以上, 培養液中で20倍以上も増加した (図1)。また, 予め培養液中に添加した¹³C標識付ピルビン酸 (U-¹³Cピルビン酸) に由来する[2-¹³C]コハク酸および[3-¹³C]コハク酸量も増加した (図2)。これは, 培養液中から取り込まれたピルビン酸の代謝経路および代謝流束を考察する目的で行ったもので, ここから図2に示したような反応経路によりクエン酸回路中間物質などの様々なアイソトポマーが生成されることになる。特にグルコース欠乏かつ低酸素条件でのPanc-1において, [2-¹³C]クエン酸や[2-¹³C]2オキソグルタル酸がほとんど検出されない一方で, [2-¹³C]コハク酸や[3-¹³C]コハク酸が蓄積し

ているのは興味深い。また, [3-¹³C]クエン酸の蓄積は, ピルビン酸からオキサロ酢酸およびリンゴ酸を経由して, フマル酸からコハク酸を生成するコハク酸デヒドロゲナーゼによる通常とは逆向きの反応の存在可能性を示唆する結果である。クエン酸回路の停滞が予想される極度の低酸素下においてコハク酸の蓄積は一見意外である。しかしながら, 実は嫌気性微生物や回虫などの寄生虫およびある種の二枚貝は, 嫌気環境において「フマル酸呼吸」(特に寄生虫ミトコンドリアでは「NADH-フマル酸還元系」と呼ばれる特殊な代謝機構によるATP生成が可能であり, その副産物としてコハク酸を蓄積することが知られている¹¹⁾。フマル酸呼吸では, 電子伝達系における最終的な電子の受容体として酸素の代わりにフマル酸が消費され, 結果として水ではなくコハク酸が生成される (図3)。通常の酸化リン酸化に比べエネルギー効率では劣るものの, この反応により酸素無しで電子の伝達が完結することになり, ミトコンドリア膜間腔のプロトン勾配が維持されATP生成が可能となる。従って, 活発なフマル酸呼吸に伴い, リンゴ

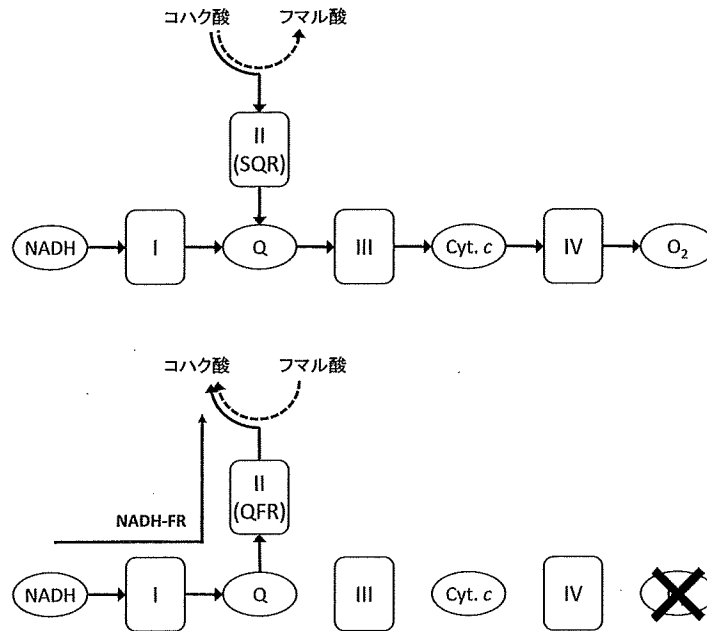


図3 酸化リン酸化における電子伝達(上)およびフマル酸呼吸における電子伝達(下) 実線は電子の流れ、破線は代謝反応を示す。I, II, III, IVはそれぞれ対応する複合体、Qはキノン、Cyt.cはシトクロムc、SQRはコハク酸-キノン還元酵素、QFRはキノール-フマル酸還元酵素を示す。また、NADH-FRは活性測定を行ったNADH-フマル酸還元経路を示す。

酸からフマル酸、そしてコハク酸へと、クエン酸回路の左半分が通常とは逆向きに半回転する代謝流束が増大し、結果としてコハク酸が蓄積することになる。しかしながら、哺乳類におけるフマル酸呼吸の存在およびフマル酸からのコハク酸の生成（つまりコハク酸デヒドロゲナーゼの逆反応）もこれまで未知であった。そこで、それぞれの細胞株からミトコンドリアを単離し、NADH存在下におけるフマル酸からコハク酸の生成、つまりフマル酸呼吸を示すミトコンドリア内膜タンパク質の逆回し活性を調べた。驚くべきことに、Panc-1およびHDFのいずれの細胞株にもフマル酸からコハク酸を生成するフマル酸還元活性（図3：NADH-FR）が確認され、さらにPanc-1におけるフマル酸還元活性がHDFのそれに比べ3倍程度も高いことが明らかとなった（論文投稿中）。

2.2 駆虫薬から抗がん剤候補物質へ

ところで以前から抗線虫薬の目的で使われてきた薬剤にはその標的がフマル酸還元酵素とされているものが多かった。しかしそれを示す直接的な証拠はなかった。そこで著者ら

は回虫ミトコンドリアを用いた実験から、抗蟯虫薬であるパモ酸ピルビニウム (Pyrvinium pamoate) が実際にフマル酸呼吸の阻害剤であることを突き止めた（論文投稿中）。そこで、グルコース飢餓かつ低酸素という極度の栄養飢餓状態においてフマル酸呼吸を阻害した場合のエネルギー代謝への影響を調べる目的で、グルコース欠乏かつ低酸素環境に暴露したPanc-1およびHDFにパモ酸ピルビニウムを添加した上で再度メタボローム解析を行った。結果、薬剤投与群ではいずれの細胞株でもコハク酸の蓄積は細胞内および培養液のいずれにおいても有意に抑えられ、さらにPanc-1においてはATPが3時間で枯渇した。すなわち栄養飢餓環境に曝されたPanc-1のATP生成におけるフマル酸呼吸の役割が、極めて重要であることが示唆されたことになる。さらに興味深いことに、パモ酸ピルビニウムはPanc-1など様々な細胞株に対しグルコース飢餓状態においてのみ顕著な毒性を発揮するというユニークな性質を備えており、ヌードマウスに移植したヒト膵臓癌モデルにおいても腫瘍の増殖抑制効果が確認されている¹²⁾。栄養飢餓状

態におけるフマル酸呼吸への依存性やパモ酸ピルビニウムの毒性が、どの程度がん細胞に特異的なものであるかは今後特に重点的に調べる必要があるが、これらの結果は薬理作用が類似した様々な駆虫薬¹¹⁾が抗がん剤として有効である可能性を示すものとして興味深い。

2.3 栄養飢餓状態におけるがん細胞のエネルギー代謝

ワーバーグ効果で知られているように、グルコースと酸素がふんだんに供給される多血性のがん細胞の多くは恐らく解糖系を中心としたエネルギー代謝を行っていると思われる。ところが、パモ酸ピルビニウムは酸素の有無に拘わらずグルコース欠乏状態で毒性を発揮

することから、グルコースの供給が途絶えると、常酸素下においても一部のATP生成をフマル酸呼吸に依存している可能性がある。さらにグルコースに加え酸素の供給まで滞ると、酸化リン酸化が機能しなくなりフマル酸呼吸への依存度が高まるはずである。フマル酸呼吸の基質となるフマル酸の供給源として、グルコース欠乏状態においては主にアミノ酸と脂肪酸が考えられるが、脂肪酸の分解産物であるアセチルCoAやその結果生じるはずのクエン酸の増加が見られないことから、アスパラギンやグルタミンなど一部のアミノ酸ではないかと思われる。また、グルコース飢餓や低酸素など極度の栄養飢餓状態ではオート

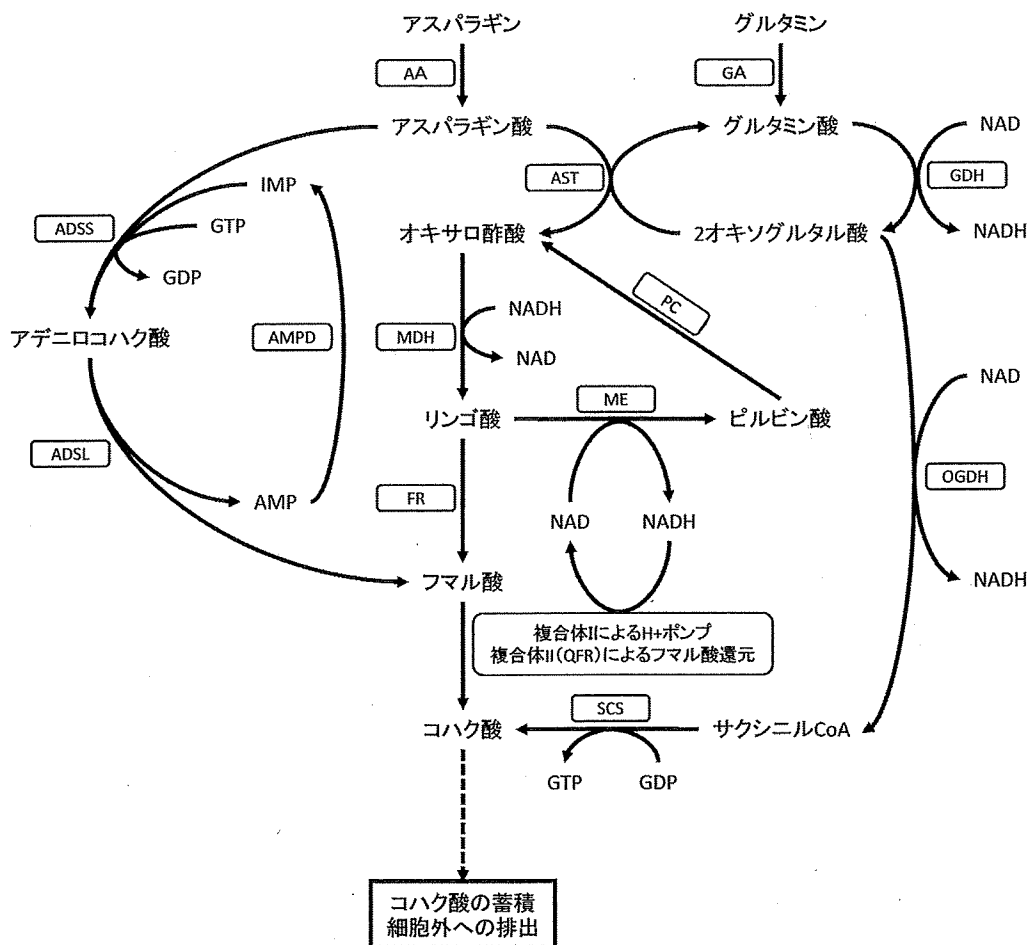


図4 栄養飢餓状態におけるがん細胞のフマル酸呼吸による仮説的なエネルギー代謝経路
各反応における酵素の略称はそれぞれ以下の酵素を示す。AA:アスパラギナーゼ, GA:グルタミンナーゼ, AST:アスパラギン酸アミノ基転移酵素, GDH:グルタミン酸デヒドロゲナーゼ, PC:ピルビン酸カルボキシラーゼ, MDH:リンゴ酸デヒドロゲナーゼ, ME:リンゴ酸酵素, FR:フマラーゼ, QFR:キノール-フマル酸還元酵素, OGDH:オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ, SCS:サクシニルCoAシンセターゼ, ADSS:アデニロコハク酸合成酵素, AMPD:AMPデアミナーゼ, ADSL:アデニロコハク酸リアーゼ

ファジーが生じやすいことが知られており¹³⁾, メタボローム解析結果からも分岐鎖アミノ酸など必須アミノ酸が増加する一方でアスパラギンなど一部のアミノ酸が顕著に減少している。さらにフマル酸呼吸は複合体Iに依存しているためNADHが必須であることやグルタミン酸が顕著に増加したことなどから, 極度の栄養飢餓状態におけるがん細胞のエネルギー代謝として図4に示したような経路が考えられる。

時系列メタボローム解析を駆使した本実験から, 哺乳類細胞ではこれまでに知られていなかった, グルコースや酸素分子に依存しないATPの生成経路の存在が強く示唆された。クエン酸回路の一部を通常とは逆向きに回転させるこのユニークな代謝経路の活性に関する制御機構や, がん細胞におけるフマル酸呼吸の普遍性の解明は今後の大きな課題であるが, CE-MSを基軸としたメタボローム解析技術が, 解糖や酸化的リン酸化といった従来のエネルギー代謝のみでは説明のつかない新たな代謝経路の発見や, がんの微小環境における特殊なエネルギー代謝を利用した全く新しいがんの治療法の開発に貢献し得ることが示された。

おわりに

本項ではイオン性低分子化合物の網羅的測定に有用で, 特に生体試料の解析に大いに威力を発揮するCE-MSによるメタボローム解析技術を駆使し, 栄養飢餓状態におけるがんの特殊なエネルギー代謝を解明したがんメタボローム研究を紹介した。著者らは他にもがん患者由来の体液(血液・尿・唾液など)のメタボローム解析による診断バイオマーカーの探索, 遺伝子改変マウスやラットの組織中のメタボローム解析によるがん関連遺伝子機能の解析やそれらのエネルギー代謝との関連性の解析, そして培養細胞を用いたメタボローム解析による発がん過程における代謝変化や, 異なる培養条件による細胞の様々な代謝適応反応の解明など, 多岐に渡るがんメタボロー

ム研究を行っている。がん細胞の増殖にはがん種や個人の遺伝子型を問わずATPが必須である。がん細胞のエネルギー代謝を読み解くことで, がん種や個人差に依存しない普遍的ながん治療の開発に貢献できれば幸いである。

文献

- 1) Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM: Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**: 653-683, 2008.
- 2) Chen C, Gonzalez FJ, Idle JR: LC-MS-based metabolomics in drug metabolism, *Drug Metab Rev*, **39**: 581-597, 2007.
- 3) Yang C, Richardson AD, Osterman A, Smith JW: Profiling of central metabolism in human cancer cells by two-dimensional NMR, GC-MS analysis, and isotopomer modeling, *Metabolomics*, **4**: 13-29, 2007.
- 4) Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss RH: A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer, *Anal Biochem*, **363**: 185-195, 2007.
- 5) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T: Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry, *J Proteome Res*, **2**: 488-494, 2003.
- 6) 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*, **281**: 16768-16776, 2006.
- 7) Warburg O: On the origin of cancer cells, *Science*, **123**: 309-314, 1956.
- 8) Gambhir SS: Molecular imaging of cancer with positron emission tomography, *Nat Rev Cancer*, **2**: 683-693, 2002.
- 9) Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H: Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy, *Cancer Res*, **60**: 6201-6207, 2000.
- 10) Gatenby RA, Gillies RJ: A microenvironmental model of carcinogenesis, *Nat Rev Cancer*, **8**: 56-61, 2008.
- 11) Kita K, Shiomi K, Omura S: Advances in drug discovery and biochemical studies, *Trends Parasitol*, **23**: 223-229, 2007.
- 12) Esumi H, Lu J, Kurashima Y, Hanaoka T:

Antitumor activity of pyrvinium pamoate, 6-(dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl]-1-methyl-quinolinium pamoate salt, showing preferential cytotoxicity during glucose starvation, *Cancer Sci*, **95**: 685-690, 2004.

- 13) Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E: Role of autophagy in cancer, *Nat Rev Cancer*, **7**: 961-967, 2007.

**Cancer Metabolomics: Toward the
Development of Novel Anticancer Therapeutics
Targeting the Energy Metabolism in Tumor
Microenvironment**

Kenjiro Kami*, Eriko Tomitsuka**,***,
Kiyoshi Kita***, Masaru Tomita*,
Tomoyoshi Soga*, Hiroyasu Esumi**

**Institute for Advanced Biosciences, Keio
University*

***Research Center for Innovative Oncology,
National Cancer Center Hospital East*

****Graduate School of Medicine, The University of
Tokyo*

● 細菌のマルチオミクス(各種網羅的測定データ)解析の最先端 複数のオミクス解析を同時実行

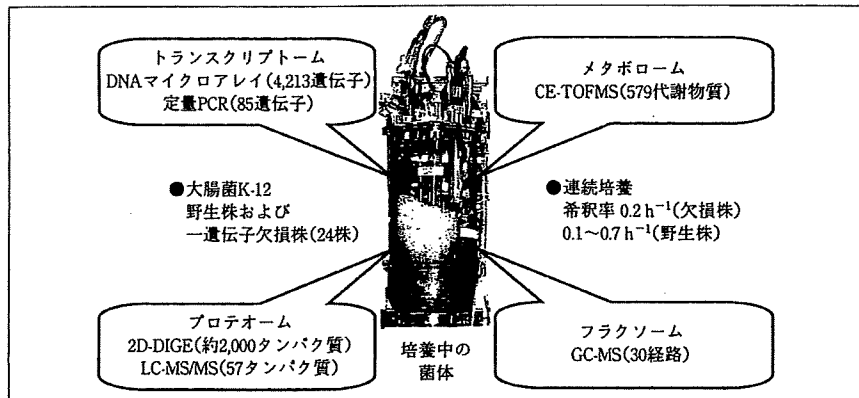
分子生物学の歴史は様々な革新で綴られてきた。今日、また新たな革新が進行しつつある。20世紀に誕生した分子生物学は基本的に、何らかの特定の物質に着目してその働きを詳細に調べあげるといった方法論をとってきた。こうした手法の有効性・重要性は現在でも依然として変わらないが、解析対象の選択が研究者の直感に恣意的に依存してしまうという限界があるのは確かだろう。また、個々の物質の機能について理解できたとしても、複数の物質の組み合わせで形成される「システム」についての洞察を得られるとは限らない。そこで、21世紀に入る頃を前後として、トランスクリプトミクス、プロテオミクスなど「オミクス⁽¹⁾」と称される解析が盛んに行なわれるようになってきた。

「オミクス」とは「網羅的測定」を意味する言葉であり、その狙いは、先述の既存手法の問題点に対応して2つあると考えられる。1つは、「まず解析対象を選び、それからその対象についてのデータを得る」のではなく、「まず大量のデータを取得し、その中から意味のありそうな対象を探す」というように解析のフローを変えることである。もう1つは、限られた少数の物質のみに着目するのではなく、多数の物質の情報を広く取得することによって細胞の「全体としての挙動」を把握することで

あろう。オミクス解析は、種々の技術革新を伴いつつ、分子生物学においてまったく新たな視点を提供し始めていると言える。

近年、著しく発達してきたオミクス技術として「メタボロミクス」、すなわち多数の代謝物質の網羅的解析法がある。キャピラリー電気泳動-質量分析計⁽²⁾(capillary electrophoresis-mass spectrometry: CE-MS)など、数百、数千種類にのぼる代謝物質を一斉に測定する技術が開発されたため、細胞機能の最も主要な要素の一つである代謝反応に関する理解が深まりつつある。また、やはり最近になって進展した技術として「フラクソミクス⁽³⁾」、すなわち大規模な代謝フラックス解析が挙げられる。代謝フラックス解析は、安定同位体でラベルした基質の利用によって、多数の経路を含む複雑な代謝系を扱えるように進歩してきており、「オミクス」技術の一つとして数えられるようになってきた。

さて、以上のように各種のオミクス解析が試みられるようになったものの、得られた網羅的データから何らかの有意義な生物学的知識を獲得するのは必ずしも容易ではないことが次第に認識されてきた。その理由の一つとしては、単一の「オミクス解析」は結局、細胞機能のある特定の階層に関するきわめて限定された情報をもつに



一遺伝子欠損株は、当研究所で作製した Keio Collection⁽⁶⁾ より得た。連続培養とは、基質溶液を連続的に供給し、同時に同じ速度で培養液を抜き取る方法である。基質流加速度を培養液体積で除算した数値は「希釈率」と呼ばれる。菌体の増殖速度は希釈率と等しい値で一定に保たれる。

図1 ■ 大腸菌のマルチオミクス解析

過ぎず、細胞の活動の全体像を把握するには必ずしも十分ではないことが挙げられる。筆者らの研究所では、このような問題意識から、複数のオミクス解析（マルチオミクス解析）を実施し、その結果を統合することで新たな知見を得ることを目指した⁽⁴⁾。具体的には、大腸菌 K-12 を対象として、遺伝的または環境的な変動に対する菌体の応答の基本的な原理を、トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム・フラクソームの関係から解明することを試みた。培養法として連続培養を採用し、一定の増殖速度で生育している菌体を取得した。遺伝的な変動は、エネルギー生産および細胞構成成分の前駆体合成に重要な役割を担う代謝経路（解糖系、ペントースリン酸経路）に関する遺伝子の欠損によって与えた。環境的な変動は、連続培養における希釈率の変更によって与えた。なお、希釈率変更は野生株についてのみ行なった。

それぞれのサンプルについてマルチオミクス解析を行なった（図1）。すなわち、トランスクリプトーム解析（DNA マイクロアレイおよび中心炭素代謝系の 85 遺伝子に関する定量 PCR）、プロテオーム解析（2次元ディフュゼンシャルゲル電気泳動および中心炭素代謝系の 57 タンパク質に関する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計を利用した定量）、メタボローム解析（キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計⁽⁵⁾ による 579 物質の定量）、フラクソーム解析（菌体構成タンパク質の加水分解物の同位体分布をガスクロマトグラフ-質量分析計で測定する手法）を同時に実施した。

この解析の結果から、大腸菌は、遺伝子欠損と環境の変化に対して異なる応答をすることが明らかとなった。

すなわち、ほとんどの遺伝子欠損株では、mRNA とタンパク質のいずれもあまり大きな変動は見られず、大腸菌は特に積極的な対応を行っていないようだった。それにもかかわらず問題なく生育できるのは、欠損遺伝子のアイソザイムの存在や迂回/逆行経路の形成によって、必要な代謝物質の供給が維持されるためと考えられる。一方、野生株で希釈率（図1参照）を変化させた場合、mRNA やタンパク質は大きく変動した。これは、希釈率変更に応じて増殖速度を変える際に、必要なエネルギーや前駆体の生産を確保するためであろう。そして、いずれの場合にも、代謝物質の細胞内レベルは全体としてあまり変動しなかった。すなわち、大腸菌は、代謝物質レベルのロバスト性（頑健性、様々な不確定の変動に対して機能を維持しようとするシステムの特性的こと）を効率よく実現するために、与えられる変動の種類によって戦略を使い分けられていると言える。

生物のもつロバスト性について、これだけ広範にわたるオミクスデータによって実証的に検討されたのは本研究が史上初めてであろう。複数のオミクス解析を同時に実行する手法は、微生物に限らず、がん細胞の代謝システムの解明など、様々な分野でも有効と考えられ、今後、多くの応用が期待される。

- 1) A. R. Joyce & B. O. Palsson : *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 7, 198 (2006).
- 2) T. Soga *et al.* : *J. Proteome Res.*, 2, 488 (2003).
- 3) W. Wiechert *et al.* : *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, 323 (2007).
- 4) N. Ishii *et al.* : *Science*, 316, 593 (2007).
- 5) T. Soga *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 281, 16768 (2006).
- 6) T. Baba *et al.* : *Mol. Syst. Biol.*, 2, 2006. 0008 (2006).

(石井伸佳, 曾我朋義, 富田 勝, 慶應義塾大学先端生命科学研究所)



Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis–mass spectrometry using silanol mask technique

Tomoyoshi Soga^{a,b,*}, Takamasa Ishikawa^b, Saori Igarashi^a,
Kaori Sugawara^a, Yuji Kakazu^a, Masaru Tomita^{a,b}

^a Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Kakuganji, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan

^b Human Metabolome Technologies Inc., Kakuganji, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan

Available online 18 May 2007

Abstract

A method for the determination of nucleotides based on pressure-assisted capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry (PACE–MS) is described. To prevent multi-phosphorylated species from adsorbing onto the fused-silica capillary, silanol groups were masked with phosphate ions by preconditioning the capillary with the background electrolyte containing phosphate. During preconditioning, nebulizer gas was turned off to avoid contamination of MS detector with phosphate ions. To detect nucleotides using the CE positive mode at a pH 7.5, it was necessary to apply air pressure to the inlet capillary during electrophoresis to supplement the electroosmotic flow (EOF) toward the cathode. Moreover, we exchanged the running electrolyte every analysis using the buffer replenishment system to obtain the required reproducibility. Under the optimized conditions, 14 phosphorylated species such as nucleotides, nicotinamide–adenine dinucleotides and coenzyme A (CoA) compounds were well determined in less than 20 min. The relative standard deviations ($n=6$) of the method were better than 0.9% for migration times and between 1.7% and 8.1% for peak areas. The detection limits for these species were between 0.5 and 1.7 $\mu\text{mol/L}$ with pressure injection of 50 mbar for 30 s (30 nL) at a signal-to-noise ratio of 3. This approach is robust and quantitative compared to the previous method, and its utility is demonstrated by the analysis of intracellular nucleotides and CoA compounds extracted from *Escherichia coli* wild type, *pfkA* and *pfkB* knockout mutants. The methodology was used to suggest that *pfkA* is the main functional enzyme.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nucleotide; CoA; Metabolomics; CE–MS; LC–MS/MS; Phosphate; Silanol mask; *Escherichia coli*; Enzyme activity

1. Introduction

Metabolites are the end products of cellular regulatory processes, and hence the measurement of the level of all intracellular metabolites can become a new tool for gaining insight into functional genomics. However, unlike other functional genomic approaches, development of metabolome analysis has been largely neglected. As the importance of metabolome analysis is recognized, several large-scale metabolite analysis methods using GC–MS [1,2], LC–MS [3], NMR [4–6], or Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICRMS) [7,8] have been developed.

Recently, CE–MS has emerged as a powerful new tool for the analysis of charged species [9–14]. In this marriage

of techniques, CE confers rapid analysis and efficient resolution, and MS provides excellent selectivity and sensitivity. The major advantages of CE–MS are that this methodology exhibits extremely high resolution for even isomers and that virtually any charged species can be infused into MS and directly determined. Previous work in our laboratory demonstrated that CE–MS techniques were quite useful for the metabolome analysis (e.g., 1692 intracellular metabolites from *Bacillus subtilis* extract were simultaneously determined, which revealed the TCA cycle were activated during *B. subtilis* sporulation [15], changes in 88 key metabolites of central metabolism of rice leaves in the daytime and nighttime were successfully quantified [16], and more recently a new biomarker that indicates acetaminophen-induced acute hepatitis has been discovered by differential metabolomics using CE–TOFMS [17]).

In CE, all cations migrate toward the cathode based on their charge and size, whereas all anions move to the opposite direction. Therefore, theoretically all charged species could be determined using two CE–MS configurations. However, there

* Corresponding author at: Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan. Tel.: +81 235 29 0528; fax: +81 235 29 0574.

E-mail address: soga@sfc.keio.ac.jp (T. Soga).

was one major difficulty that several anions such as nucleotides and CoA compounds adsorbed on the cationic-coated capillary that enabled successful anion analysis in CE-MS [18]. Cao and Moini [19] developed a pressure-assisted CE-MS (PACE-MS) method to the analysis of peptides, and the authors applied the similar a PACE-MS method using a non-charged polymer coated capillary to prevent sample adsorption [18]. Although the method enabled the simultaneous determination of nucleotides and CoA compounds, recently we have found that this approach was not ideal. Notably, the current often fluctuated during electrophoresis, caused migrating time shift of analytes. Additionally, the capillary inlet frequently clogged.

Here, we propose a new PACE-MS method for the analysis of nucleotides and CoAs using a normal fused-silica capillary where silanols are masked with phosphates to prevent nucleotides from interacting with the capillary wall. Nucleotides were driven toward the cathode by both EOF [20] and applied air pressure, followed by MS detection. This approach is reproducible, quantitative and robust and it was readily applied to the simultaneous analysis of nucleotides from *E. coli* samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals

ADP, GDP, CTP, CDP, CMP and succinyl CoA were purchased from Sigma (St. Louis, MO), and 2-morpholinoethanesulfonate (MES, internal standard) from Dojindo (Kumamoto, Japan). All other reagents were obtained from Wako (Osaka, Japan). Individual stock solutions at a concentration of 10 mM were prepared in Milli-Q water, except for AMP in 0.1 M NaOH. The working mixture standard was prepared by diluting these stock solutions with Milli-Q water just before injection. Ammonium acetate electrolyte solution was prepared with ammonium acetate and acetic acid. Ammonium borate solution was with aqueous ammonium and boric acid, and ammonium phosphate was with aqueous ammonium and potassium dihydrogen phosphate. The pH of all solutions was adjusted with aqueous ammonium. The chemicals used were of analytical or reagent grade. Water was purified with a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

E. coli BW25113 [*lacI*^q *rrnB*_{T14} Δ *lacZ*_{wJ16} *hsdR514* Δ *araBAD*_{AH33} Δ *rhaBAD*_{LD78}] and its *pfkA* (JWK 3887) and *pfkB* (JWK 5280) knockout mutants [21], were used for this study. The minimal medium was used and it contained 48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂HPO₄, 10 mM NaCl and 45 mM (NH₄)₂SO₄. The following components were sterilized separately and then added (per liter of final; medium): 1 mL of 1 M MgSO₄, 1 mL of 1 mg of vitamin B1/L (filter sterilized) and 10 mL of trace element solution containing (per liter) 0.56 g of CaCl₂, 0.8 g of FeCl₃, 0.1 g of MnCl₂·4H₂O, 0.17 g of ZnCl₂, 0.043 g of CuCl₂·2H₂O, 0.06 g of CoCl₂·6H₂O and 0.06 g Na₂MoO₄·2H₂O. Batch and chemostat cultivations were performed with 4 g/L of glucose and cultures were conducted at

37 °C in a 2 L reactor (BMJ-02 PI, ABLE Co., JAPAN) with pH controlled at 7.0 [22]. The dilution rate for chemostat culture was 0.2/h. Growth was monitored by measuring optical density (OD) at 600 nm, and cells were collected at steady state.

2.3. Metabolite extraction

The metabolite extraction procedure from *E. coli* was employed by modifying a previously described procedure [13]. An equal number of cells in culture medium were obtained for every sample based on the OD (20 OD mL) and was passed through a 0.45 μ m pore size filter. Residual *E. coli* cells on the filter were washed with Milli-Q water and then plunged into 5 mL of methanol, containing internal standards (2 μ M each trimesate and MES), to inactivate enzymes. After a 10 min incubation at room temperature, 4 mL of the methanol solution was obtained and 4 mL of chloroform and 1.6 mL of Milli-Q water were added to the solution. The mixture was thoroughly mixed with centrifugal filtration at 2300 \times g for 5 min to remove phospholipids liberated from cell membranes. The separated 4 mL methanol-water layer was centrifugally filtered through a Millipore 5-kDa-cutoff filter to remove proteins. The filtrate was lyophilized and dissolved in 50 μ L of Milli-Q water before PACE-MS analysis.

2.4. Instrumentation

All CE-ESI-MS experiments were performed using an Agilent CE Capillary Electrophoresis System equipped with air pressure pump, an Agilent 1100 series MSD quadrupole mass spectrometer, an Agilent 1100 series isocratic HPLC pump, a G1603A Agilent CE-MS adapter kit and a G1607A Agilent CE-ESI-MS sprayer kit (all Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). All system control, data acquisition and MSD data evaluation were performed via a G2201A Agilent ChemStation software for CE-MSD.

LC-MS/MS experiments were performed using an Agilent 1100 series HPLC system and an API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and data evaluation were done with the Applied Biosystems Analyst software.

2.5. CE-MS conditions

Separations were carried out on a fused-silica capillary with 50 μ m i.d. \times 100 cm total length. The electrolyte for the CE separation was 50 mM ammonium acetate solution, pH 7.5. Prior to first use, a new capillary was pretreated for 20 min with preconditioning buffer, 25 mM ammonium acetate–75 mM sodium phosphate solution, pH 7.5. Before each injection, the capillary was equilibrated for 10 min by flushing with the preconditioning buffer and subsequently for 6 min with the running electrolyte, which was replenished every run using a buffer replenishment system equipped with the Agilent CE. Sample was injected with a pressure injection of 50 mbar for 30 s (approximately 30 nL). The applied voltage was set at 30 kV and a pressure of 50 mbar was added to the inlet capillary during run. The capillary tem-

perature was thermostatted to 20 °C and the sample tray was cooled below 5 °C. The Agilent 1100 series pump equipped with 1:100 splitter was used to deliver 10 μ L/min of 5 mM ammonium acetate in 50% (v/v) methanol–water to the CE interface where it is used as a sheath liquid around the outside of the CE capillary to provide a stable electrical connection between the tip of the capillary and grounded electrospray needle.

ESI–MS was conducted in the negative ion mode and the capillary voltage was set at 3500 V. The nebulizing gas, heated dry nitrogen gas (heater temperature 300 °C), was switched off during the preconditioning step, and a pressure of 10 psi was applied 0.1 min after sample injection using the CE system's timetable. Since the nebulizing gas caused sample aspiration into the capillary inlet, switching it off during sample injection was necessary to enable reliable quantitative analysis. Monovalent deprotonated $[M - H]^-$ ions for nucleotides and nicotinamide-adenine dinucleotides and divalent deprotonated $[M - 2H]^{2-}$ ions for CoA compounds were monitored using selective ion monitoring mode.

2.6. LC–MS/MS Conditions

The column used was an Asahipak ODP-50 2D (2.0 mm i.d. \times 15 cm), (Shodex, Tokyo, Japan). The mobile phase was 5 mM ammonium acetate aqueous solution at a flow-rate of 0.2 mL/min. The temperature of the column oven was 20 °C and the sample injection volume was 1 μ L.

ESI–MS was conducted in the negative ion mode and the capillary voltage was set at 4000 V. Nebulizer gas, air curtain gas, nitrogen turbo gas temperature and ionspray voltage were set at 15, 15, 400 °C and -4000 V, respectively. MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) detection was performed to obtain sufficient selectivity and sensitivity.

3. Results and discussion

3.1. Prevention of nucleotide adsorption by masking silanols with phosphates

The choice of the background electrolyte and pH is most important in developing a CE–MS method. Oppenheimer [23] reported that the chemical stability of nicotinamide adenine dinucleotides (NAD⁺/NADH) depends on the pH conditions. The reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) is extremely labile in acidic condition, while its oxidized form (NAD⁺) is readily decomposed in dilute base solution [23,24]. Similarly, flavin adenine dinucleotide (FAD) is decomposed in alkaline solution; on the contrary, CoA is stable at high pH condition. Fortunately, both nicotinamide adenine dinucleotides and other compounds are stable in a narrow range of pH centered around physiological conditions [23]. Therefore, pH of 7.5 was selected for all the subsequent experiments.

Initially, the influence of background electrolyte on the separation of nucleotides was investigated using a fused-silica capillary and CE with diode array detection. Fig. 1 shows the results of the electropherograms of AMP, ADP and ATP obtained by using 50 mM each of ammonium acetate, ammonium borate

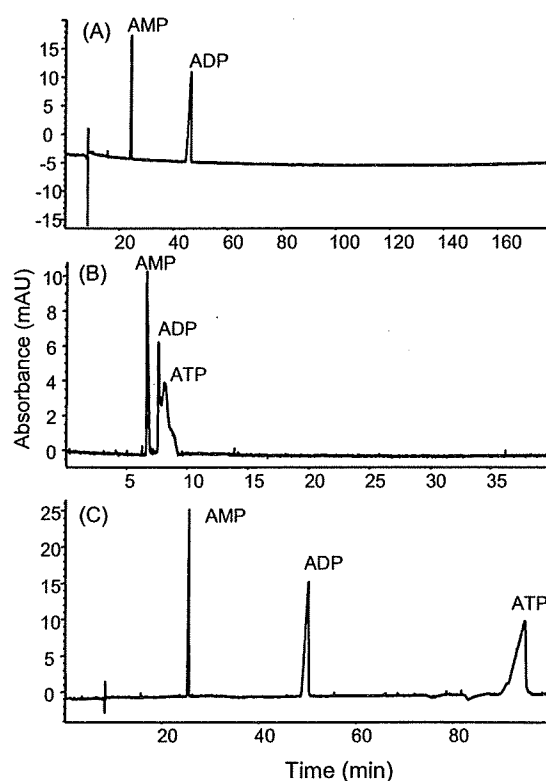


Fig. 1. Comparison of 1 mM each AMP, ADP and ATP detection in CE obtained with (A) ammonium acetate, (B) ammonium borate and (C) ammonium phosphate electrolyte. Experimental conditions: capillary, fused-silica 50 μ m i.d. \times 80.5 cm (effective length 72 cm); electrolyte, 50 mM, pH 7.5 each; applied potential, 30 kV; injection, 4 s at 50 mbar; temperature, 20 °C; detection, 200 nm.

and ammonium phosphate electrolyte at pH 7.5, respectively. When using ammonium acetate, which is a volatile buffer and commonly used for CE–MS and LC–MS, ATP was not detected within 180 min (Fig. 1A). The peak shapes of ADP and ATP were deteriorated with borate electrolyte (Fig. 1B). However, phosphate electrolyte provided a well-defined ADP and ATP peaks as well as AMP (Fig. 1C). We analyzed them three times by replacing new capillary, electrolyte and standards, and obtained the reproducible results. The equivalent phenomena were observed even when sodium borate and sodium phosphate electrolytes were used. Moreover, we analyzed GMP, GDP and GTP using ammonium acetate electrolyte and obtained considerably broadened GDP and GTP peaks. However, ammonium phosphate electrolyte, pH 7.5 provided defined peak shape of GDP and GTP. Several papers report that silanol groups show adsorptive interaction with phosphate groups based on hydrogen bonding [25,26]. Since silanol groups on bare silica are supposed to have a pK_a of 7.1 [27,28], the undissociated silanols are approximately 29% at pH 7.5, as estimated based on the Henderson–Hasselbalch equation [29,30]:

$$q = -1/(1 + 10^{pH - pK_a})$$

where q is the net charge.

We, therefore, assumed that multi-phosphorylated compounds such as ADP, ATP, GDP and GTP might adsorptively interact with undissociated silanols on the fused-silica capil-

lary. Hence, these multi-phosphorylated nucleotides were not detected or showed broadened peaks except when phosphate electrolyte was employed possibly since it was preferentially adsorbed on and masked silanols [25], which realized successful separation and detection of all nucleotides.

While separation was improved, non-volatility of phosphate electrolyte significantly reduced MS detection sensitivity. As Kim et al. [28] used phosphoric acid to block silanol groups on the silica capillary column in LC–MS analysis, we have developed a strategy that masks silanols by preconditioning with electrolyte containing phosphate ions, then subsequently analyzing nucleotides with CE–MS using phosphate-free volatile electrolyte. In this investigation, 25 mM ammonium acetate electrolytes (pH 7.5) containing three different concentrations of phosphate, i.e., 50, 75 and 100 mM, respectively, were used as the preconditioning buffer. The capillary was preconditioned using these buffers for 10 min, followed by running electrolyte (50 mM ammonium acetate, pH 7.5) for 6 min prior to sample analysis. Although slight decrease in peak areas of ATP, NAD and NADH were observed, every nucleotide exhibited better reproducibility when using 25 mM ammonium acetate (pH 7.5) containing 75 mM phosphate.

After masking silanols on the capillary with the above-mentioned preconditioning buffer followed by washing the capillary with the 50 mM ammonium acetate (pH 7.5) running electrolyte, nucleotides were separated by CE positive mode and detected by MS negative ion mode. While the nucleotides themselves migrated towards the anode (opposite the MS direction), they were driven to the cathode by electroosmotic flow (EOF) at the pH 7.5. It was also necessary to maintain constant liquid flow toward the MS by applying air pressure to the inlet capillary during electrophoresis in order to reduce analysis time (Fig. 2). This PACE–MS approach provided good resolution of every analyte, however, considerable fluctuations in migration time of all nucleotides were observed (Fig. 3A). We found that the fluctuations in migration time were caused by the decrease in the pH of the running electrolyte from 7.5 to 5.8 in eight runs. This was due to little or no buffering capacity of ammonium acetate at pH 7.5. To resolve the problem, we replenished the running electrolyte every analysis using the CE instrument's buffer replenishment system to maintain a constant pH of 7.5 of the electrolyte. This technique dramatically improved migration time fluctuation of every peak (Fig. 3B).

It was found that turning off nebulizer nitrogen gas, used to assist electrospray ionization, between runs resulted in better reproducibilities of peak areas for all nucleotides. It is assumed that stopping electrospray during preconditioning the capillary prevents contamination of the MS detector with phosphate ions contained in the preconditioning buffer.

3.2. Method validation

Fig. 4 shows selected ion electropherograms of the 14-nucleotide standard mixture including nicotinamide–adenine dinucleotides and acetyl CoA obtained by the optimized PACE–MS method. Although most of compounds were successfully detected as their monovalent deprotonated molecular

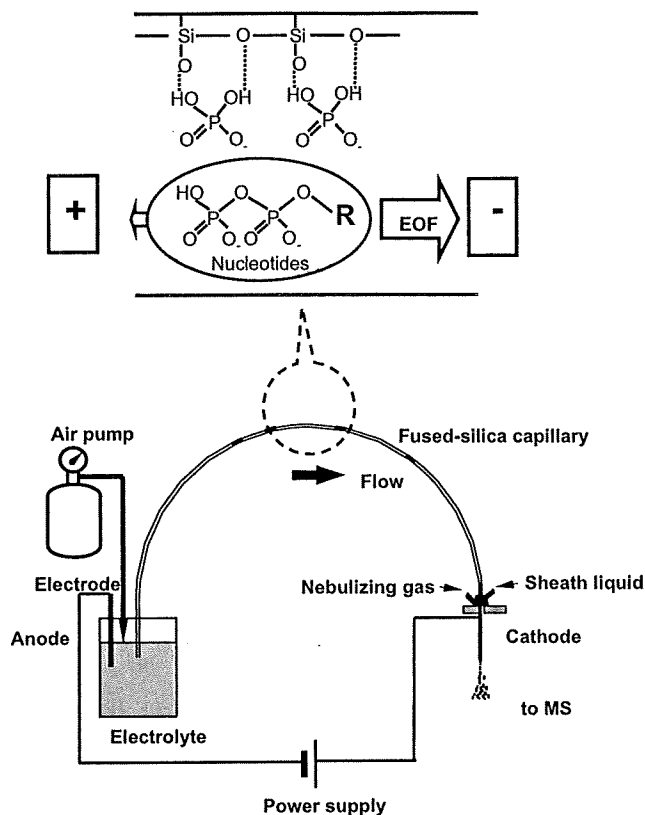


Fig. 2. Schematic of nucleotide analysis by the PACE–MS system. As shown in zoom-in-view, silanols are masked by phosphate ions prior to sample injection to prevent multi-phosphorylated species from adsorptively interacting with the fused-silica capillary. While nucleotides migrate toward the anode, they are driven to the cathode by both EOF and application of air pressure to the inlet capillary and analyzed by the MS detector.

$[M - H]^-$ ions, intensity in divalent $[M - 2H]^{2-}$ ion of acetyl CoA was higher than that in monovalent ion. The reproducibility, linearity and sensitivity of the method were investigated and data obtained by using the optimized conditions are listed in Table 1. Good reproducibility was obtained for both migration times and peak areas, as indicated in the table. The calibration curves for all species were between 0.997 and 0.999 at 10, 20, 50, 100, 200 and 500 $\mu\text{mol/L}$ with correlation coefficients. The concentration detection limits for all components were better than 1.7 $\mu\text{mol/L}$ with pressure injection of 50 mbar for 30 s (30 nL) at a signal-to-noise ratio of 3. These results indicate that the proposed method can be useful for simultaneous and quantitative analysis of nucleotides, nicotinamide–adenine dinucleotides and CoA compounds.

3.3. Analysis of nucleotides of *E. coli*

While nucleotides are well known as the building blocks of DNA and RNA, they are involved in almost all the activities of cells. Some nucleotides such as ATP, NAD, NADH function as co-substrates, and others such as cyclic AMP are regulatory compounds. The utility of the proposed PACE–MS method was demonstrated by the simultaneous analysis of nucleotides, nicotinamide–adenine dinucleotides, and

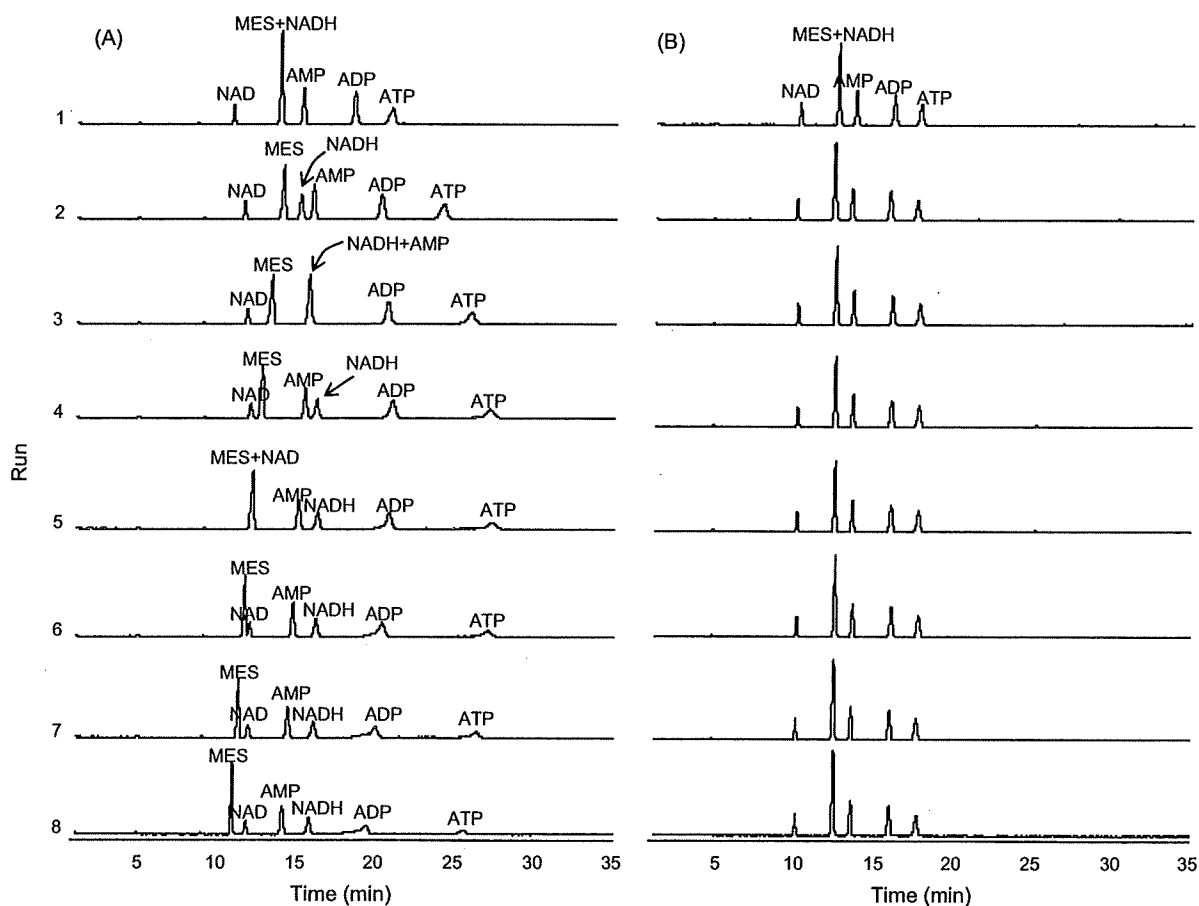


Fig. 3. Effect of buffer replenishment on reproducibility of nucleotide migration time. Nucleotide standard mixture (100 μ M each) containing MES (internal standard) were analyzed with (A) the same electrolyte and (B) the buffer replenished every run. Experimental conditions: capillary, fused-silica 50 μ m i.d. \times 100 cm; preconditioning, 25 mM ammonium acetate (pH 7.5) containing 75 mM phosphate for 10 min followed by 50 mM ammonium acetate electrolyte (pH 7.5) for 6 min; applied potential, 30 kV; applied pressure, 50 mbar; sample injection, 30 s at 50 mbar (30 nl); temperature, 20 $^{\circ}$ C; sheath liquid, 10 μ L/min of 5 mM ammonium acetate in 50% (v/v) methanol-water; MS detector polarity, negative; capillary voltage, 3500 V; fragmentor voltage, 100 V; drying gas, N_2 ; drying gas temperature, 300 $^{\circ}$ C; nebulizer gas pressure, 10 psig.

flavin adenine dinucleotides, and CoA compounds in *E. coli* extracts.

Fig. 5A shows the results for the analysis of nucleotides and CoA related compounds extracted from *E. coli* BW25113

(wild type) cells ($OD_{600\text{ nm}}=4.38$). CoA compounds such as CoA, acetyl CoA and succinyl CoA were detected at their divalent deprotonated ions. The peaks were identified by comparing their molecular weights and migration times with those

Table 1
Reproducibility, linearity and sensitivity

	RSD ($n=6$) (%)			Detection limit
	Migration time	Peak area	Linearity correlation	Concentration (μ M)
CMP	0.4	3.2	0.998	1.0
AMP	0.3	2.9	0.997	1.3
GMP	0.4	1.7	0.998	0.6
CDP	0.6	1.9	0.998	1.5
ADP	0.6	3.1	0.999	1.6
GDP	0.6	3.1	0.999	0.7
CTP	0.9	3.3	0.999	1.7
ATP	0.8	4.3	0.999	0.6
GTP	0.7	3.7	0.999	1.4
NAD	0.3	3.7	0.999	0.5
NADP	0.4	6.1	0.998	0.8
NADH	0.3	8.1	0.999	0.9
NADPH	0.7	5.8	0.997	0.9
Acetyl CoA	0.5	2.2	0.999	0.5