

- [41] M. Unger, M. Dreyer, S. Specker, S. Laung, M. Pelzing, C. Neuseiss, U. Holzgrabe, G. Bringmann, *Phytochem. Anal.* 15 (2004) 21.
- [42] K. Vuorensola, H. Siten, R. Kostainen, T. Kotiaho, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 179.
- [43] J. Ding, P. Vouros, *Anal. Chem.* 71 (1999) 378A.
- [44] J. Židková, J. Chmelfk, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 417.
- [45] J. Cabálková, J. Židková, L. Pfišbyla, J. Chmelfk, *Electrophoresis* 25 (2004) 487.
- [46] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, F. Klaus, K. Meziane, K.-R. Kim, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 271.
- [47] J.L. Edwards, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2201.
- [48] D. Arráez-Román, A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1648.
- [49] A. Carrasco-Pancorbo, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Electrophoresis* 27 (2006) 2182.
- [50] A.V. Colnaghi Simionato, C. Simó, A. Cifuentes, P. Teixeira Lacava, W.L. Araújo, J.L. Azevedo, E. Carrilho, *Electrophoresis* 27 (2006) 2567.
- [51] S. Duteil, P. Gareil, S. Girault, A. Mallet, C. Feve, L. Siret, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1889.
- [52] R. García-Villalba, S. Cortacero-Ramírez, A. Segura-Carretero, J.A. Martín-Lagos Contreras, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5400.
- [53] J. Li, A.D. Cox, D. Hood, E.R. Moxon, J.C. Richards, *Electrophoresis* 25 (2004) 2017.
- [54] T. Soga, D.N. Heiger, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1236.
- [55] L. Ge, J.W.H. Yong, S.N. Tan, E.S. Ong, *Electrophoresis* 27 (2006) 2171.
- [56] J.L. Edwards, C.N. Chisolm, J.G. Shackman, R.T. Kennedy, *J. Chromatogr. A* 1106 (2006) 80.
- [57] T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, T. Nishioka, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2233.
- [58] A. Zamfir, D.G. Seidler, E. Schönherr, H. Kresse, J. Peter-Katalinić, *Electrophoresis* 25 (2004) 2010.
- [59] C.L. Schultz, M. Moini, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1508.
- [60] R.B. Cole (Ed.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Wiley, New York, 1997.
- [61] S.L. Nilsson, C. Andersson, P.J.R. Sjöberg, D. Bylund, P. Petersson, M. Jörintén-Karlsson, K.E. Markides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2267.
- [62] Y. Takada, M. Sakairi, H. Koizumi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 488.
- [63] K. Isoo, K. Otsuka, S. Terabe, *Electrophoresis* 22 (2001) 3426.
- [64] S.J. Bos, S.M. van Leeuwen, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 85.
- [65] Y. Hsieh, K. Merkle, G. Wang, J.-M. Brisson, W.A. Korfmacher, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3122.
- [66] D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653.
- [67] K.A. Hanold, S.M. Fischer, P.H. Cormia, C.E. Miller, J.A. Syage, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2842.
- [68] J.A. Starkey, Y. Mechref, J. Muzikar, W.J. McBride, M.V. Novotny, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3342.
- [69] D.B. Robb, M.W. Blades, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8162.
- [70] R. Mol, G.J. de Jong, G.W. Somsen, *Electrophoresis* 26 (2005) 146.
- [71] R. Mol, G.J. de Jong, G.W. Somsen, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5277.
- [72] E.J. Want, A. Nordstrom, H. Morita, G. Siuzdak, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 459.
- [73] S.K. Johnson, L.L. Houk, D.C. Johnson, R.S. Houk, *Anal. Chim. Acta* 389 (1999) 1.
- [74] C.C. Liu, J.S. Huang, D.L.J. Tyrrell, N.J. Dovichi, *Electrophoresis* 26 (2005) 1424.
- [75] L. Mateus, S. Cherkaoui, P. Christen, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* 20 (1999) 3402.
- [76] N. Saito, M. Robert, S. Kitamura, R. Baran, T. Soga, H. Mori, T. Nishioka, M. Tomita, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 1979.
- [77] S. Sato, T. Soga, T. Nishioka, M. Tomita, *Plant J.* 40 (2004) 151.
- [78] T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, T. Nishioka, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6224.
- [79] T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka, *J. Proteome Res.* 2 (2003) 488.
- [80] D. Arráez-Román, S. Cortacero-Ramírez, A. Segura-Carretero, J.-A. Martín-Lagos Contreras, A. Fernández-Gutiérrez, *Electrophoresis* 27 (2006) 2197.
- [81] L. Behndahl, B. Gammelgaard, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 950.
- [82] E.L. Edwards, J.A. Rodrigues, J. Ferreira, D.M. Goodall, A.P. Rauter, J. Justino, J. Thomas-Oates, *Electrophoresis* 27 (2006) 2164.
- [83] K. Harada, E. Fukusaki, A. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng.* 101 (2006) 403.
- [84] K. Harada, E. Fukusaki, T. Bamba, F. Sato, A. Kobayashi, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 1003.
- [85] T. He, D. Quinn, E. Fu, Y.K. Wang, *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 43.
- [86] H. Hilz, L.E. de Jong, M.A. Kabel, H.A. Schols, A.G.J. Voragen, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 275.
- [87] A.V. Kühn, H.H. Rüttinger, R.H.H. Neubert, K. Raith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 576.
- [88] I. Wahby, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, F. Ligeró, J.M. Caba, A. Fernández-Gutiérrez, *Electrophoresis* 27 (2006) 2208.
- [89] U. Warnke, C. Rappel, H. Meier, C. Kloft, M. Galanski, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, U. Jaehde, *Chem. Biochem.* 5 (2004) 1543.
- [90] K.B. Presto Elgstoen, J.Y. Zhao, J.F. Anacleto, E. Jellum, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 265.
- [91] J. Hau, S. Devaud, I. Blank, *Electrophoresis* 25 (2004) 2077.
- [92] T. Soga, Y. Kakazu, M. Robert, M. Tomita, T. Nishioka, *Electrophoresis* 25 (2004) 1964.
- [93] S. Ullsten, R. Danielsson, D. Bäckström, P. Sjöberg, J. Berquist, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 87.
- [94] K. Vuorensola, J. Kokkonen, H. Sirén, R.A. Ketola, *Electrophoresis* 22 (2001) 4347.
- [95] Z.D. Peterson, M.L. Lee, S.W. Graves, *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 101.
- [96] Z.D. Peterson, D.C. Collins, C.R. Bowerbank, M.L. Lee, S.W. Graves, *J. Chromatogr. B* 776 (2002) 221.
- [97] T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishika, M. Tomita, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 16768.
- [98] M. Sugimoto, S. Kikuchi, M. Arita, T. Soga, T. Nishioka, M. Tomita, *Anal. Chem.* 77 (2005) 78.
- [99] J. Ohnesorge, C. Neuseiss, H. Wätzig, *Electrophoresis* 26 (2005) 3973.
- [100] L. Bren, *FDA Consumer Magazine* 39 (2005) 28.
- [101] G. Giddings, G. Allison, D. Brooks, A. Carter, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 1151.
- [102] R. Bhalla, K. Narasimhan, S. Swarup, *Plant Cell Rep.* 24 (2005) 562.
- [103] G. Bringmann, I. Kajahn, C. Neuseiss, M. Pelzing, S. Laug, M. Unger, U. Holzgrabe, *Electrophoresis* 26 (2005) 1513.
- [104] E. von Roepenack-Lahaye, T. Degenkolb, M. Zerjeski, M. Franz, U. Roth, L. Wessjohann, J. Schmidt, D. Scheel, S. Clemens, *Plant Physiol.* 134 (2005) 548.
- [105] H. Takahashi, M. Hayashi, F. Goto, S. Sato, T. Soga, T. Nishioka, M. Tomita, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya, *Ann. Bot.* 98 (2006) 819.
- [106] J. Li, A.D. Cox, D.W. Hood, E.L.K. Schweda, E.R. Moxon, J.C. Richards, *Mol. Biosyst.* 1 (2005) 46.
- [107] N. Tanaka, H. Takahashi, H. Kitano, M. Matsuoka, S. Akao, H. Uchimiya, S. Komatsu, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1575.
- [108] A. Itoh, Y. Ohashi, T. Soga, H. Mori, T. Nishioka, M. Tomita, *Electrophoresis* 25 (2004) 1996.
- [109] D.J. McNally, J.P.M. Hui, A.J. Aubry, K.K.K. Mui, P. Guerry, J.-R. Brisson, S.M. Logan, E.C. Soo, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 18489.



## Direct measurement of isotopomer of intracellular metabolites using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for efficient metabolic flux analysis

Yoshihiro Toya<sup>a,b</sup>, Nobuyoshi Ishii<sup>a,b</sup>, Takashi Hirasawa<sup>a</sup>, Miki Naba<sup>a</sup>, Kenta Hirai<sup>a</sup>, Kaori Sugawara<sup>a</sup>, Saori Igarashi<sup>a</sup>, Kazuyuki Shimizu<sup>a,c</sup>, Masaru Tomita<sup>a,b</sup>, Tomoyoshi Soga<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 403-1 Nipponkoku, Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan

<sup>b</sup> Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University, 5322 Endo, Fujisawa, Kanagawa 252-8520, Japan

<sup>c</sup> Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology, 680-4 Kawazu, Iizuka, Fukuoka 820-8502, Japan

Available online 13 April 2007

### Abstract

We have developed a metabolic flux analysis method that is based on <sup>13</sup>C-labeling patterns of the intracellular metabolites directly measured by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE–TOFMS). The flux distribution of the central carbon metabolism in *Escherichia coli* was determined by this new approach and the results were compared with findings obtained by conventional GC–MS analysis based on isotopomer of the proteinogenic amino acids. There were some differences in estimation results between new approach using CE–TOFMS and conventional approach using GC–MS. These were thought to be attributable to variations in measured mass distributions between amino acids and the corresponding precursors and to differences in the sensitivity of the exchange coefficients to mass distributions. However, our CE–TOFMS method facilitates high-throughput flux analysis without requiring complicated sample preparation such as hydrolysis of proteins and derivatization of amino acids.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Metabolic flux analysis; <sup>13</sup>C-labeling experiment; CE–TOFMS; GC–MS; Exchange coefficient

### 1. Introduction

Bio-oriented chemicals and fuels such as ethanol, lactate, and succinate, mainly produced by microorganisms, have recently gained attention. To increase the productivity of these useful compounds, the cell physiology and the metabolic flow and regulation involved in the synthesis of the target products must be understood. However, the complexity of metabolic networks hampers elucidation of the regulatory mechanisms of the cellular metabolism.

Metabolic flux analysis (MFA), a powerful method for the quantitative estimation of the intracellular flux for each metabolic reaction that cannot be observed directly, facilitates understanding of the cellular physiology and of metabolic regulatory mechanisms. MFA studies for the microorganisms such as bacteria, yeast, and fungi as well as plants and animal cells have been reported [1–5].

MFA that employs <sup>13</sup>C-labeling can address complex biological networks consisting of cyclic, parallel, and reversible reactions because information on the metabolism of the <sup>13</sup>C-labeled carbon source through intracellular metabolic pathways is evident from the labeling patterns of the cellular compounds. Thus, the flux distribution of the metabolic reactions can be estimated from the labeling patterns of the appropriate compounds. In the conventional MFA protocols, proteinogenic amino acids are used as the compounds to determine for the labeling patterns. After a biomass hydrolysate is obtained from cells grown in the presence of a <sup>13</sup>C-labeled carbon source, the labeled substrates incorporated into the cells are metabolized to amino acids through the metabolic pathways and the labeling patterns of proteinogenic amino acids are measured by GC–MS and/or NMR spectroscopy [6,7].

Although <sup>13</sup>C-labeling-based MFA has been employed in many applications, it presents at least two major problems. First, the method is usually applied only in steady-state continuous cultures; it cannot be applied to assess biologically or industrially important batch and fed-batch cultures. Since MFA is

\* Corresponding author. Tel.: +81 235 29 0528; fax: +81 235 29 0574.  
E-mail address: [soga@sfc.keio.ac.jp](mailto:soga@sfc.keio.ac.jp) (T. Soga).

based on the labeling patterns of proteinogenic amino acids, it is difficult to estimate the flux distribution under non-steady-state conditions [8]. Second, the method is inconvenient with respect to measurements and sample preparation for GC–MS and NMR. The low sensitivity of NMR requires a large amount of sample and optimization of measurement conditions is difficult; GC–MS, on the other hand, requires derivatization procedures prior to analysis because almost all intracellular metabolites are nonvolatile. To overcome these problems, the direct measurement of low molecular weight (MW) metabolites by LC–MS has been attempted. van Winden et al. [9] used an LC–MS method to analyze metabolites; they used a mass isotopomer to assess flux distribution in the glycolysis of yeast cells. However, as the condition settings for LC–MS strongly depend on empirical rules, increasing the measurable metabolites is a time-consuming task.

Metabolomics, which can be defined as the measurement of the level of all intracellular metabolites, is an emerging tool that can be used not only to gain insight into cellular function but also to investigate human diseases and to discover biomarkers, and in the metabolic engineering of microorganisms and plants [10–12]. Capillary electrophoresis mass spectrometry (CE–MS), a novel metabolomics technology, has become a powerful tool for the global analysis of charged metabolites. The major advantages of CE–MS are its extremely high resolution and its ability to analyze directly almost any charged species [13]. Our group has developed a new metabolome analysis method using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE–TOFMS) [10]. On average, our technique improved sensitivity several-fold; improvement was as much as 65-fold higher values obtained with conventional capillary electrophoresis quadrupole mass spectrometry. In addition, CE–TOFMS yielded high-throughput quantitative analysis and exact (milli) mass level differentiation.

Here we propose a new MFA method using CE–TOFMS for the acquisition of labeling information, i.e. the mass distribution, of intracellular low MW metabolites. Using CE–TOFMS, we obtained the labeling patterns of metabolic intermediates of the main metabolic pathways in *E. coli* including glycolysis, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, and the pentose phosphate pathway and anaplerotic pathway. Using the mass distribution data of intracellular metabolites or proteinogenic amino acids we determined the flux distribution in the investigated pathways and compared the results obtained by the two methods.

## 2. Experimental

### 2.1. *E. coli* strains, culture condition, and media

For  $^{13}\text{C}$ -labeling, we performed a glucose-limited chemostat culture of the wild-type *E. coli* BW25113 (*lacI<sup>H</sup> rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub>*) using a synthetic medium (48 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{NaCl}$ , 45 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g/l glucose) supplemented with 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mg/ml thiamine, 0.056 mg/l  $\text{CaCl}_2$ , 0.08 mg/l  $\text{FeCl}_3$ , 0.01 mg/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.017 mg/l  $\text{ZnCl}_2$ , 0.0043 mg/l  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.006 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , and 0.06 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . The dilution rates of the chemostat

culture were set at 0.1 and 0.5  $\text{h}^{-1}$ . Cultivation was carried out at 37 °C in a working volume of 1 l in a 2 l BMJ02-PI reactor (Able, Tokyo, Japan) equipped with pH, dissolved oxygen concentration, and temperature sensors. The  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  concentrations in off-gas were monitored using Offgas analyzer (DEX-2562, Able). The airflow rate was kept at 1 l/min and the pH was maintained at 7.0 by the automatic addition of HCl or NaOH throughout the cultivation.

### 2.2. $^{13}\text{C}$ -labeling

$^{13}\text{C}$ -labeling was started after confirming the steady state of the chemostat culture based on the  $\text{CO}_2$  production rate and the cell concentration. The feed medium containing 4 g/l of naturally labeled glucose was replaced with the same medium containing 0.8 g/l of [ $^{13}\text{C}$ ] glucose, 0.8 g/l of [ $^{13}\text{C}$ ] glucose and 2.4 g/l of naturally labeled glucose. Samples for CE–TOFMS analysis and biomass samples for GC–MS analysis were obtained after two residence times.

### 2.3. Measurement of extracellular metabolites concentration

To determine the extracellular fluxes, the concentration of extracellular metabolites such as ethanol, D-lactate, acetate, formate, succinate, pyruvate, and glucose was measured using an enzymatic assay kit (F-kit, Roche Diagnostics).

### 2.4. GC–MS analysis

The biomass sample obtained from 250 ml of culture was suspended in about 4 ml of 6 M HCl and then hydrolyzed at 105 °C for 16 h. After cooling, HCl was evaporated with a centrifugal evaporator (CVE-3100, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan). The dried hydrolysate was resuspended in water and then filtrated through a 0.22- $\mu\text{m}$  pore size filter (Millipore Co., USA). The filtrate was dried again and redissolved in 1.5 ml of acetonitrile. For derivatization, the resulting 80  $\mu\text{l}$  of biomass hydrolysate dissolved in acetonitrile was mixed with an equal volume of *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide and then incubated at 110 °C for 30 min. After cooling, the derivatized sample was subjected to GC–MS analysis on a TurboMass Gold mass spectrometer (Perkin-Elmer, USA). We monitored the fragment ions [ $M - 57$ ] $^+$  and [ $M - 159$ ] $^+$  of *tert*-butyldimethylsilylated (TBDMS-) amino acids (Ala, Gly, Val, Ile, Pro, Met, Phe, Asp, Glu and Tyr). The analytical conditions for GC–MS were described elsewhere [14].

### 2.5. CE–TOFMS analysis

10 ml of *E. coli* chemostat culture was passed through a 0.45- $\mu\text{m}$  pore size filter (Millipore). The *E. coli* cells on the filter were washed with 20 ml of Milli-Q water, plunged into 4 ml of methanol containing 2  $\mu\text{M}$  2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, 2  $\mu\text{M}$  trimesate, 2  $\mu\text{M}$  methionine sulfone and 2  $\mu\text{M}$  3-aminopyrrolidine as internal standard. Then, 4 ml of chloroform

and 1.6 ml of Milli-Q water were added to the solution and the mixture was thoroughly mixed. The solution was centrifuged at  $2300 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ , and the separated methanol layer was centrifugally filtered through a Millipore 5-kDa cutoff filter to remove high MW compounds. The filtrate was lyophilized and then dissolved in 20  $\mu\text{l}$  of Milli-Q water before CE–TOFMS analysis. All CE–TOFMS experiments were performed using an Agilent CE capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Germany), an Agilent G3250AA LC/MSD TOF system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), an Agilent 1100 series binary HPLC pump, the G1603A Agilent CE–MS adapter and G1607 Agilent CE–ESI–MS sprayer kit. The analytical conditions for CE–TOFMS were described elsewhere [10].

## 2.6. Metabolic flux analysis

For MFA, we constructed the stoichiometric reaction model of the main metabolic pathway including glycolysis, the pentose phosphate pathway, the TCA cycle, the anaplerotic pathway, and the glyoxylate shunt (see Appendix A).

To circumvent the difficulties involved in the numerical treatment of high exchange fluxes, non-linear mapping between the exchange flux and exchange coefficient was employed for bidirectional reactions such as,

$$v_k^{\text{exch}} = \frac{\text{exch}_k}{1 - \text{exch}_k} \times \beta \quad (1)$$

where  $v_k^{\text{exch}}$  and  $\text{exch}_k$  represent the exchange flux and exchange coefficient for reaction  $v_k$ , respectively [15]. The value of 100 was used for  $\beta$  in the present study. Flux estimation was carried out using the modified method described by Zhao and Shimizu [16]. In our MFA protocol, three free fluxes ( $v_2$ ,  $v_{10}$ ,  $v_{25}$ ), seven exchange coefficients ( $\text{exch}_2$ ,  $\text{exch}_7$ ,  $\text{exch}_{13}$ ,  $\text{exch}_{14}$ ,  $\text{exch}_{15}$ ,  $\text{exch}_{22}$ ,  $\text{exch}_{23}$ ) and extracellular fluxes were optimized by determining the mass distributions iteratively computed from the assumed fluxes as the best fit to the measured mass distributions of intracellular metabolites or amino acids, using global search algorithms such as the genetic algorithm. The optimizing function was defined as

$$\min J = \sum_{i=1}^N \left( \text{MDV}_i^{\text{measured}} - \text{MDV}_i^{\text{simulated}} \right)^2 + \sum_{j=1}^M \left( r_j^{\text{measured}} - r_j^{\text{simulated}} \right)^2 \quad (2)$$

where  $\text{MDV}_i^{\text{measured}}$  is the mass distribution of the  $i$ th measured substance,  $\text{MDV}_i^{\text{simulated}}$  the simulated mass distribution of the corresponding substance, and  $N$  the number of measured substances,  $r_j^{\text{measured}}$  the measured extracellular metabolite or biomass synthesis flux for  $j$ th reaction,  $r_j^{\text{simulated}}$  the simulated extracellular metabolite or biomass synthesis flux for corresponding reaction, and  $M$  the number of the reactions for extracellular metabolite or biomass synthesis fluxes. Biomass synthesis fluxes were obtained from specific growth rate and biomass content [17]. The overall flux distributions were calcu-

lated from the estimated free fluxes and exchange coefficients. The optimized flux was selected from the results obtained by 100 independent flux estimations using a single mass distribution data set of intracellular metabolites or amino acids, respectively, at each specific growth rate. Moreover, at the specific growth rate  $0.5 \text{ h}^{-1}$ , the glyoxylate shunt was omitted from the reaction model as its activity was previously shown to be negligible at such high growth rates [18].

In the new MFA method, we used the mass distributions of intracellular metabolites measured by CE–TOFMS. For comparison purposes, we also used the mass distributions of the proteinogenic amino acids measured by GC–MS. The mass distributions of the measured substances were corrected, according to the method of reported by van Winden et al. [19], taking the natural isotope abundances of C, H, O, N, P, S, and Si atoms into account. Additionally, further correction in mass distributions of proteinogenic amino acids was performed, to achieve isotopic steady state by the method of Dauner et al. [20]. The correction in mass distributions of intracellular metabolites for achievement of isotopic steady state is not necessary, because the pool sizes of intracellular metabolites are smaller than those of proteinogenic amino acids [20]. All calculations were carried out with MATLAB 7.1 with the Genetic Algorithm and Direct Search Toolbox 2.0.1 (Mathworks Inc., USA).

## 2.7. Sensitivity analysis for changes in the exchange coefficient

Sensitivity analysis was performed to see the different features between the conventional method and the proposed method. For exchange coefficients, one parameter was manipulated, and the others were fixed as the values estimated by each MFA method. Each manipulated exchange coefficient was varied within a range from 0 to 0.95. The CE–TOFMS-measured intermediates analyzed included glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P), fructose-1,6-bisphosphate (F16P), dihydroxyacetone phosphate (DHAP), 3-phosphoglycerate (3PG), phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate (PYR), ribulose-5-phosphate (Ru5P), ribose-5-phosphate (R5P), sedoheptulose-7-phosphate (S7P), 2-oxoglutarate ( $\alpha\text{KG}$ ), and malate (MAL); the GC–MS-measured amino acids included Ala, Asp, Met, Glu, Pro, Ser, Gly, Val, Ile, Phe and Tyr.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Measurement of mass distributions of intracellular metabolites by CE–TOFMS

Table 1 is a summary of the mass distributions of the intracellular metabolites in cells cultured at dilution rates of 0.1 and  $0.5 \text{ h}^{-1}$ . The intermediate metabolites of the central carbon metabolism are precursors of the amino acids. Therefore, we compared the mass distributions of the precursor metabolites for amino acid biosynthesis measured by CE–TOFMS with those of the fragment ion ( $[M - 57]^+$ ) of the corresponding TBDMS-amino acid measured by GC–MS (Fig. 1). In the pathways we investigated, the intact carbon skeleton of 3PG,

Table 1  
Mass distributions of the intracellular metabolites in *E. coli* measured by CE–TOFMS

Dilution rate ( $\text{h}^{-1}$ )	Metabolite	Mass distribution							
		$m_0$	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$m_4$	$m_5$	$m_6$	$m_7$
0.1	G6P	0.419	0.216	0.114	0.114	0.036	0.047	0.055	
	F6P	0.332	0.194	0.139	0.156	0.068	0.045	0.067	
	F16P	0.391	0.228	0.118	0.138	0.047	0.022	0.056	
	DHAP	0.599	0.176	0.080	0.145				
	3PG	0.643	0.155	0.068	0.135				
	PEP	0.552	0.261	0.000	0.187				
	PYR	0.627	0.210	0.041	0.123				
	S7P	0.310	0.240	0.153	0.150	0.082	0.039	0.017	0.009
	Ru5P	0.444	0.232	0.154	0.108	0.029	0.033		
	R5P	0.433	0.221	0.165	0.124	0.032	0.026		
	E4P	0.582	0.158	0.000	0.260	0.000			
	AKG	0.402	0.259	0.204	0.088	0.038	0.010		
	MAL	0.442	0.264	0.207	0.064	0.023			
	0.5	G6P	0.473	0.206	0.040	0.124	0.035	0.063	0.059
F6P		0.371	0.159	0.186	0.091	0.032	0.059	0.101	
F16P		0.385	0.222	0.127	0.131	0.082	0.053	0.000	
DHAP		0.632	0.208	0.000	0.161				
3PG		0.636	0.148	0.069	0.147				
PEP		0.612	0.164	0.083	0.141				
S7P		0.388	0.207	0.127	0.123	0.086	0.046	0.024	0.000
Ru5P		0.476	0.233	0.171	0.120	0.000	0.000		
R5P		0.455	0.199	0.224	0.122	0.000	0.000		
E4P		0.518	0.158	0.132	0.192	0.000			
MAL		0.435	0.254	0.194	0.088	0.030			

$m_n$  represents the isotopomer abundance for each metabolite in which  $n$   $^{13}\text{C}$  atoms are incorporated.

PYR, and  $\alpha\text{KG}$  is maintained in the corresponding products, Ser, Ala, and Glu, respectively. These intermediate metabolites and proteinogenic amino acids were used for comparisons. As shown in Fig. 1, the mass distribution of fragment ions of Glu was similar to that of  $\alpha\text{KG}$ . However, the  $m_0$  values of Ser and Ala were higher than those of the corresponding metabolites, 3PG and PYR. In this study, the mass distributions of proteinogenic amino acid were corrected to achieve isotopic steady state [20] as described in Section 2.6. These corrections were carried out based on the standard wash-out kinetics of a continuous stirred tank reactor (CSTR). However, this correction neglects protein turnover between proteinogenic amino acid and free amino acid pools, and transamination reactions where amino acids such as glutamate and aspartate exchange amino group via central metabolites such as  $\alpha\text{KG}$  and OAA. Grotkjaer et al. [21] demonstrated by simulation studies that protein turnover and transamination may cause large deviation of labeling kinetics from that of the simple CSTR. Furthermore, Wiechert and Nöh [8] indicated the ratios between intermediate metabolite pool size and corresponding proteinogenic amino acid pool size, not incorporated in our correction for isotopic steady state, to have critical impact on the labeling kinetics. In addition, they also pointed out that the topology of the pathway (e.g. cyclic or linear) has influence on the labeling kinetics [8]. The differences of mass distributions between proteinogenic amino acid and corresponding precursor metabolites in Fig. 1 were considered to be derived from combinations of these factors. These results suggest that the generally used correction method for isotopic steady state based on CSTR kinetics for proteinogenic amino

acids is not always enough to estimate the true labeling pattern at an isotopic steady state.

### 3.2. A new MFA based on the mass distributions of intracellular metabolites measured by CE–TOFMS

A summary of the chemostat cultures is shown in Table 2. The  $^{13}\text{C}$ -labeled intermediate metabolites and proteinogenic amino acids were obtained from the same culture samples, and the mass distributions were analyzed by CE–TOFMS and GC–MS, respectively. Fig. 2 shows the flux distributions at each dilution rate estimated by the new and the conventional method. To validate the accuracy of the each flux estimation, the mass distributions of intermediate metabolites simulated from the metabolic flux distributions were compared with the measured mass distributions (Fig. 3). We could confirm that there was high correlation between measured and simulated mass distributions

Table 2  
Summary of glucose-limited chemostat cultures of *E. coli* at various specific growth rates

Specific rate ( $\text{mmol g of dry cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Specific growth rate	
	0.1 $\text{h}^{-1}$	0.5 $\text{h}^{-1}$
Glucose uptake	1.34	6.62
Acetate production	0.00	0.49
Ethanol production	0.00	0.15
$\text{O}_2$ uptake	2.20	13.05
$\text{CO}_2$ evolution	0.31	8.95

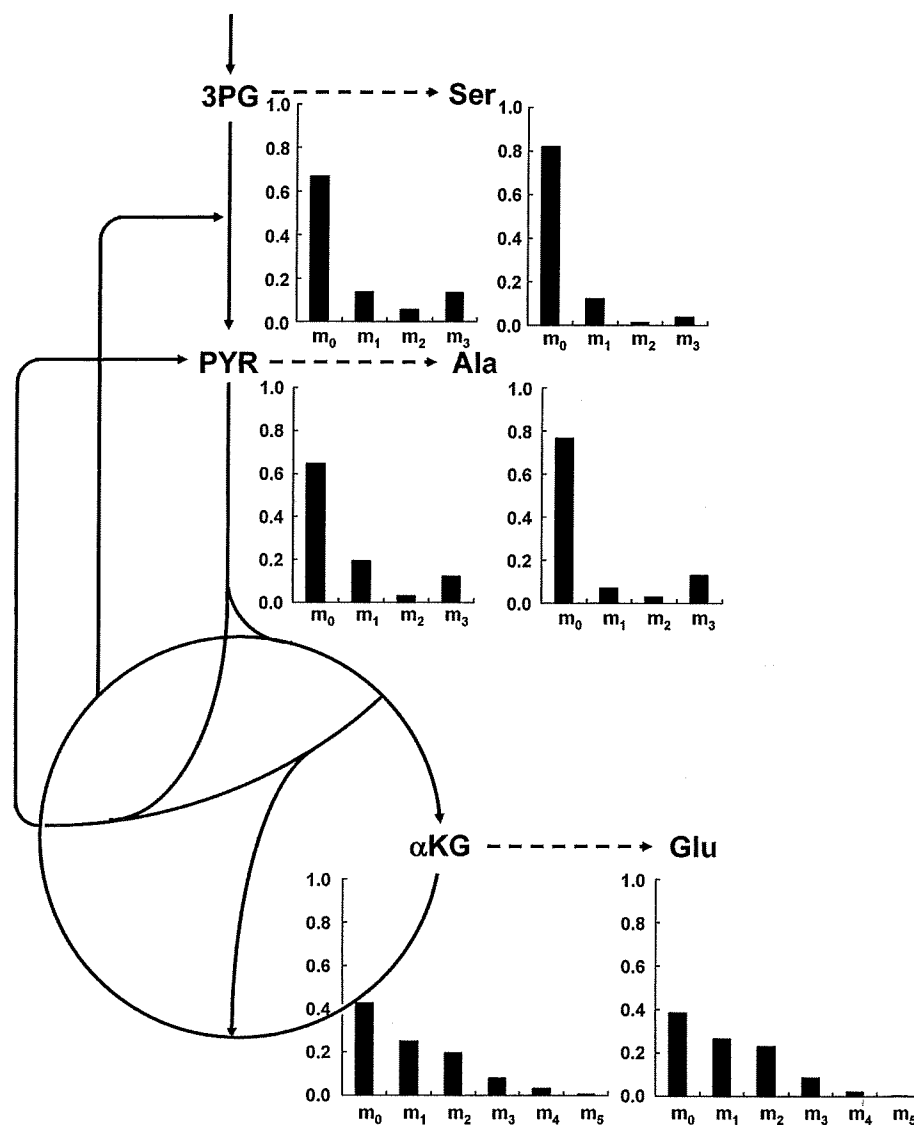


Fig. 1. Comparison between mass distributions of precursor metabolites and proteinogenic amino acids at the dilution rate of  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . The mass distributions were corrected by taking into account natural isotope abundance.

at each dilution rate. In the new MFA method, the correlation coefficients were 0.98 and 0.97 for the dilution rates of 0.1 and  $0.5 \text{ h}^{-1}$ , respectively. On the other hand, in the conventional MFA method, the correlation coefficients were 0.99 and 0.98 for the dilution rates of 0.1 and  $0.5 \text{ h}^{-1}$ , respectively. These results indicate the flux calculations by both methods can be performed successfully. The fluxes of glycolysis estimated by the new method were lower than those obtained by the conventional method, while the overall net flux distributions obtained by the two MFA methods showed good agreement. The difference in glycolytic fluxes was derived from the differences in mass distributions between precursor metabolite and corresponding amino acid in glycolysis, as described above.

Our new approach facilitates high-throughput flux analysis without requiring complicated sample preparations such as hydrolysis of proteins and derivatization of amino acids, as men-

tioned in Section 1. Thus, the sample preparation time was shortened from 2–3 days to 6 h.

### 3.3. Sensitivity analysis of the mass distributions for exchange coefficient

As shown in Fig. 2, the exchange fluxes for reversible reactions, except for  $v_2$ , were different in the two MFA methods. Thus, we made sensitivity analysis of the exchange coefficients to clarify the reason underlying the difference in the exchange coefficients. Each exchange coefficient was varied within a pre-determined range from 0 to 0.95, and following changes in the mass distributions of intracellular metabolites and amino acids were simulated. In the MFA procedure, unknown variables, including the exchange coefficient, are assumed, and mass distributions of metabolites and fluxes of extracellular metabolites

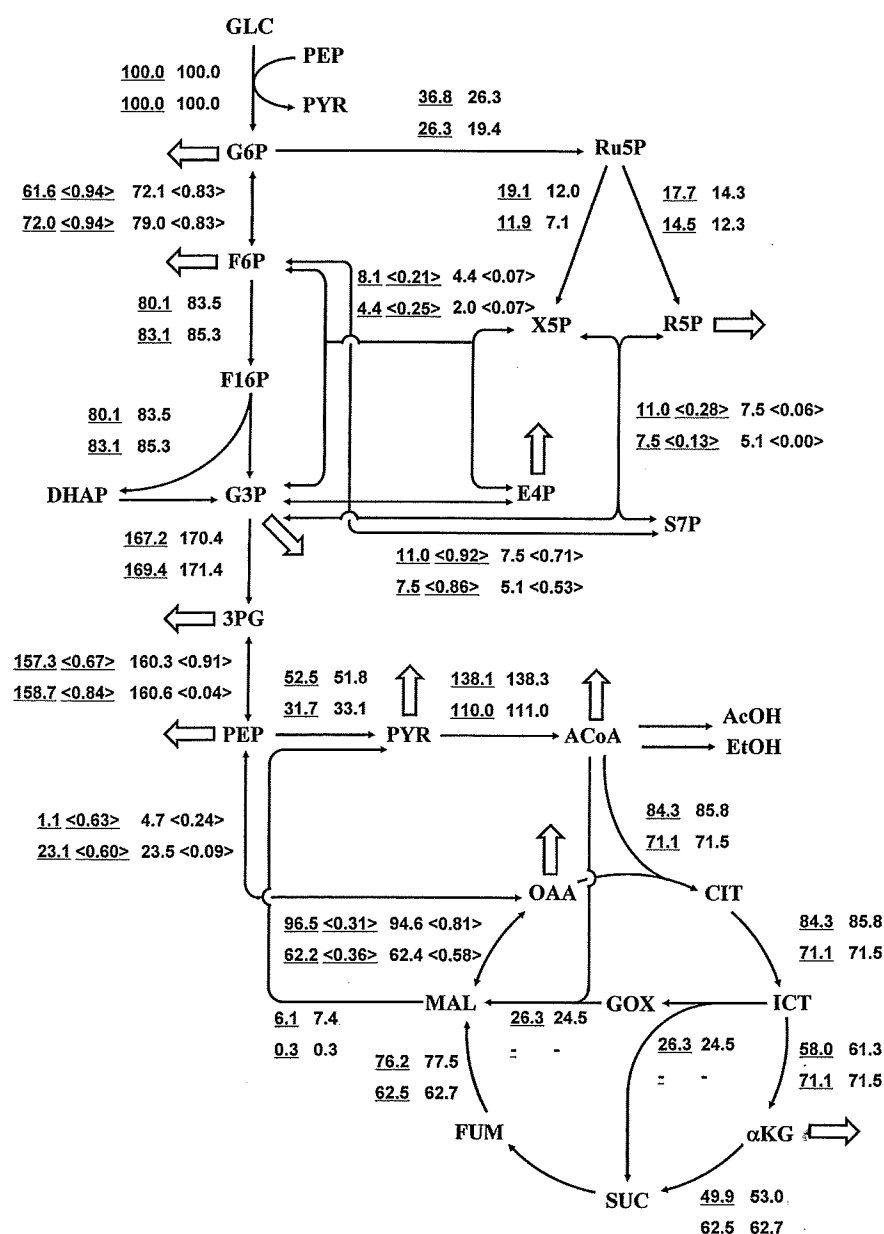


Fig. 2. Metabolic flux distributions of the central carbon metabolism in *E. coli* estimated by the new (underlined) and the conventional MFA at specific growth rates of 0.1 (upper value) and 0.5 (lower value)  $\text{h}^{-1}$ . All fluxes are given as relative values to the specific glucose consumption rate and are expressed as net fluxes. Fluxes for biomass synthesis are indicated by open arrows. GLC, glucose; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; AcCoA, acetyl-CoA; OAA, oxaloacetate; CIT, citrate; ICT, isocitrate; SUC, succinate; FUM, fumarate; GOX, glyoxylate; AcOH, acetate; EtOH, ethanol.

and biomass synthesis are simulated using the assumed variables. The simulated and measured mass distributions and fluxes of extracellular metabolites and biomass synthesis are then compared and the differences are incorporated as the fitness function  $J$ . Thus, if the mass distributions are highly sensitive to a change in the exchange coefficient, the range of fitness function becomes large, and selection of the superior solution becomes easy. The number of such sensitive metabolites is also related to the ease of flux estimation.

As shown in Fig. 4A, changes in  $\text{exch}_{13}$  affected the mass distributions of metabolites and amino acids related to the gly-

colysis and the pentose phosphate pathway. The features of  $\text{exch}_{14}$  and  $\text{exch}_{15}$  were similar to those of  $\text{exch}_{13}$ . In the compounds that were sensitive to changes in the exchange coefficient, the number of CE-TOFMS-measured metabolites was larger than the number of GC-MS-measured proteinogenic amino acids. Additionally, the changes in the mass distributions of the intermediate metabolites were larger than those of the proteinogenic amino acids. These results indicate that  $\text{exch}_{13}$ ,  $\text{exch}_{14}$ , and  $\text{exch}_{15}$  can be estimated more easily by the new MFA method than the conventional one. Furthermore, in the new MFA method, these exchange coefficients were determined

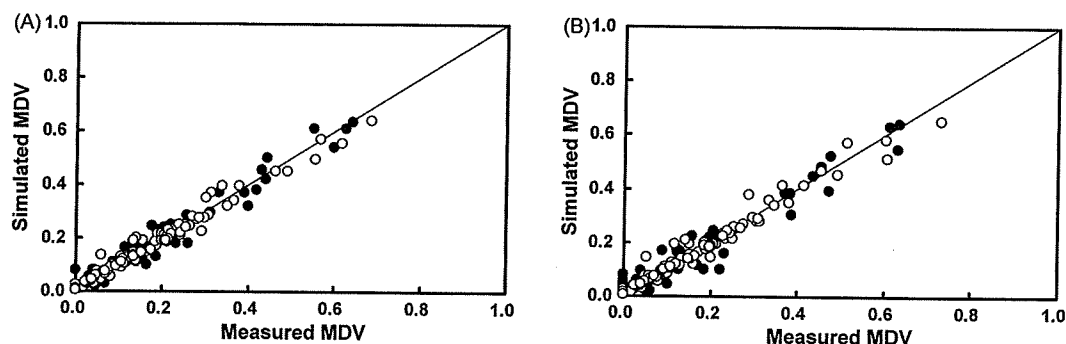


Fig. 3. Comparison of mass distributions of metabolites simulated from the estimated fluxes with those measured by CE–TOFMS or GC–MS. Comparisons at the dilution rate of  $0.1 \text{ h}^{-1}$  (A) and  $0.5 \text{ h}^{-1}$  (B) are shown. Closed circles, intermediate metabolites; open circles, proteinogenic amino acids.

by mass distributions of G6P, F6P, F16P, DHAP, 3PG, PEP, PYR, Ru5P, R5P and S7P. On the other hand, in the conventional MFA method, these exchange coefficients were determined by mass distributions of Gly and Ser, both of which are derived from 3PG. Thus, the differences in the exchange coefficient values estimated by the two methods are ascribable to the differences in labeling information obtained by two MFA.

On the other hand, as shown in Fig. 4B, changes in  $\text{exch}_{23}$  affected the mass distributions of intermediate metabolites and amino acids related to the lower part of glycolysis and the TCA cycle including 3PG, PEP, PYR,  $\alpha\text{KG}$ , MAL, Ala, Asp, Glu, Pro, Ser, Gly, Val, Phe, Tyr. We found that the mass distributions of the precursor metabolites (3PG and PYR) were different from those of the proteinogenic amino acids (Ser and Ala). Consequently, the exchange coefficients estimated by the new and

the conventional MFA methods were different. Although such differences in the exchange coefficient were observed, the estimated net flux of  $v_{23}$  matched well between the new and the conventional MFA method.

The simulation result revealed that  $\text{exch}_7$  had almost no effect to the change in mass distributions of most metabolites measured by CE–TOFMS and GC–MS (Fig. 4C). This result is consistent with the report by Zhao and Shimizu [16]; the exchange coefficient for enolase ( $\text{exch}_7$  in the present study) was not reliable because the region of confidence was extremely large. Furthermore, the feature of simulation result of  $\text{exch}_{22}$  was similar to that in  $\text{exch}_7$  (data not shown). Therefore, the  $\text{exch}_7$  and  $\text{exch}_{22}$  were not estimated in this study.

#### 4. Conclusions

We applied our new CE–TOFMS method for measuring mass distributions of intracellular metabolites in MFA. The proposed MFA method yields advantages over the conventional method. In particular, the new approach facilitates high-throughput flux analysis without requiring complicated sample preparations such as hydrolysis of proteins and derivatization of amino acids. Thus, the sample preparation time was shortened from 2–3 days to 6 h.

Additionally, because the new MFA method is based on isotope labeling patterns of intracellular free metabolites, it can be applied to cultivation using amino acid(s) as a carbon source(s). Furthermore, since the pool size of the intermediate metabolites is generally very small, there is an immediate turnover of metabolites; and in intermediate metabolites, changes in the labeling patterns of upstream metabolites are reflected quickly. Thus, a change in metabolism at the instant of an environmental change can be captured by observation of the intermediate metabolites. Therefore, the new approach proposed here can be applied to batch or fed-batch cultures. Studies are underway in our laboratory to examine the applicability of our new method under conditions where the metabolism of the cultured cells varies with the term of the culture.

#### Acknowledgments

We thank Pei Yee Ho for insightful discussions. This study was carried out as part of The Project for Development of a Tech-

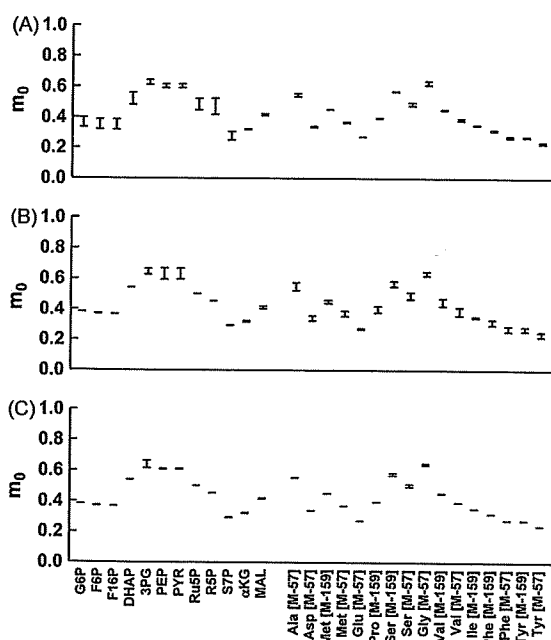


Fig. 4. Effect of changes in exchange coefficients on the mass distributions of metabolites. The effect of a change in the exchange coefficient for reversible flux on the mass distributions of metabolites was simulated using the flux at  $0.1 \text{ h}^{-1}$  calculated by the new MFA method. The simulation results for  $\text{exch}_{13}$  (A),  $\text{exch}_{23}$  (B) and  $\text{exch}_7$  (C) are shown. In this figure, the change in  $m_0$  is shown.



nological Infrastructure for Industrial Bioprocesses on R&D of New Industrial Science and Technology Frontiers of the Ministry of Economy, Trade & Industry (METI), under the auspices of the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO). This work was also made possible by research funds from the Yamagata Prefectural Government and Tsuruoka City.

#### Appendix A. Metabolic reaction model for MFA

Flux	Reaction
$v_1$	GLC + PEP $\rightarrow$ G6P + PYR
$v_2$	G6P $\leftrightarrow$ F6P
$v_3$	F6P $\rightarrow$ F16P
$v_4$	F16P $\rightarrow$ G3P + DHAP
$v_5$	DHAP $\rightarrow$ G3P
$v_6$	G3P $\rightarrow$ 3PG
$v_7$	3PG $\rightarrow$ PEP
$v_8$	PEP $\leftrightarrow$ PYR
$v_9$	PYR $\rightarrow$ ACoA + CO <sub>2</sub>
$v_{10}$	G6P $\rightarrow$ Ru5P + CO <sub>2</sub>
$v_{11}$	Ru5P $\rightarrow$ R5P
$v_{12}$	Ru5P $\rightarrow$ X5P
$v_{13}$	R5P + X5P $\leftrightarrow$ S7P + G3P
$v_{14}$	S7P + G3P $\leftrightarrow$ F6P + E4P
$v_{15}$	X5P + E4P $\leftrightarrow$ F6P + G3P
$v_{16}$	ACoA + OAA $\rightarrow$ CIT
$v_{17}$	CIT $\rightarrow$ ICT
$v_{18}$	ICT $\rightarrow$ $\alpha$ KG + CO <sub>2</sub>
$v_{19}$	$\alpha$ KG $\rightarrow$ SUC + CO <sub>2</sub>
$v_{20}$	SUC $\rightarrow$ FUM
$v_{21}$	FUM $\rightarrow$ MAL
$v_{22}$	MAL $\leftrightarrow$ OAA
$v_{23}$	PEP + CO <sub>2</sub> $\leftrightarrow$ OAA
$v_{24}$	MAL $\rightarrow$ PYR + CO <sub>2</sub>
$v_{25}$	ICT $\rightarrow$ GOX + SUC
$v_{26}$	GOX + ACoA $\rightarrow$ MAL

#### References

- [1] A. Roscher, N.J. Kruger, R.G. Ratcliffe, J. Biotechnol. 77 (2000) 81.
- [2] B.D. Follstad, R.R. Balcarcel, G. Stephanopoulos, D.I. Wang, Biotechnol. Bioeng. 63 (1999) 675.
- [3] E. Fischer, N. Zamboni, U. Sauer, Anal. Biochem. 325 (2004) 308.
- [4] T.L. Nissen, U. Schulze, J. Nielsen, J. Villadsen, Microbiology 143 (1997) 203.
- [5] B. Christensen, J. Nielsen, Metab. Eng. 1 (1999) 282.
- [6] W. Wiechert, Metab. Eng. 3 (2001) 195.
- [7] K. Shimizu, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 91 (2004) 1.
- [8] W. Wiechert, K. Nöh, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 92 (2005) 145.
- [9] W.A. van Winden, J.C. van Dam, C. Ras, R.J. Kleijn, J.L. Vinke, W.M. van Gulik, J.J. Heijnen, FEMS Yeast Res. 5 (2005) 559.
- [10] T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka, M. Tomita, J. Biol. Chem. 281 (2006) 16768.
- [11] R. Baran, H. Kochi, N. Saito, M. Suematsu, T. Soga, T. Nishioka, M. Robert, M. Tomita, BMC Bioinform. 7 (2006) 530.
- [12] A. Buchholz, J. Hurlerhaus, C. Wandrey, R. Takors, Biomol. Eng. 19 (2002) 5.
- [13] T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka, J. Proteome Res. 2 (2003) 488.
- [14] K.A. Siddiquee, M.J. Arauzo-Bravo, K. Shimizu, FEMS Microbiol. Lett. 235 (2004) 25.
- [15] W. Wiechert, C. Siefke, A.A. de Graaf, A. Marx, Biotechnol. Bioeng. 55 (1997) 118.
- [16] J. Zhao, K. Shimizu, J. Biotechnol. 101 (2003) 101.
- [17] M. Li, P.Y. Ho, S. Yao, K. Shimizu, J. Biotechnol. 122 (2006) 254.
- [18] A. Nanchen, A. Schicker, U. Sauer, Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 1162.
- [19] W.A. van Winden, C. Wittmann, E. Heinzle, J.J. Heijnen, Biotechnol. Bioeng. 80 (2002) 477.
- [20] M. Dauner, J.E. Bailey, U. Sauer, Biotechnol. Bioeng. 76 (2001) 114.
- [21] T. Grotkjaer, M. Akesson, B. Christensen, A.K. Gombert, J. Nielsen, Biotechnol. Bioeng. 86 (2004) 209.

概論

# メタボロームが解き明かす 生命のシステム

## —技術革新がもたらす生命科学の新時代

曾我朋義

### はじめに

トランスクリプトミクス, プロテオミクス, メタボロミクス等のオミクス研究は, 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, オミクス研究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見つけ出そうとする仮説発見型研究であり, 人が予想もしていなかった大発見をもたらす可能性を秘める.

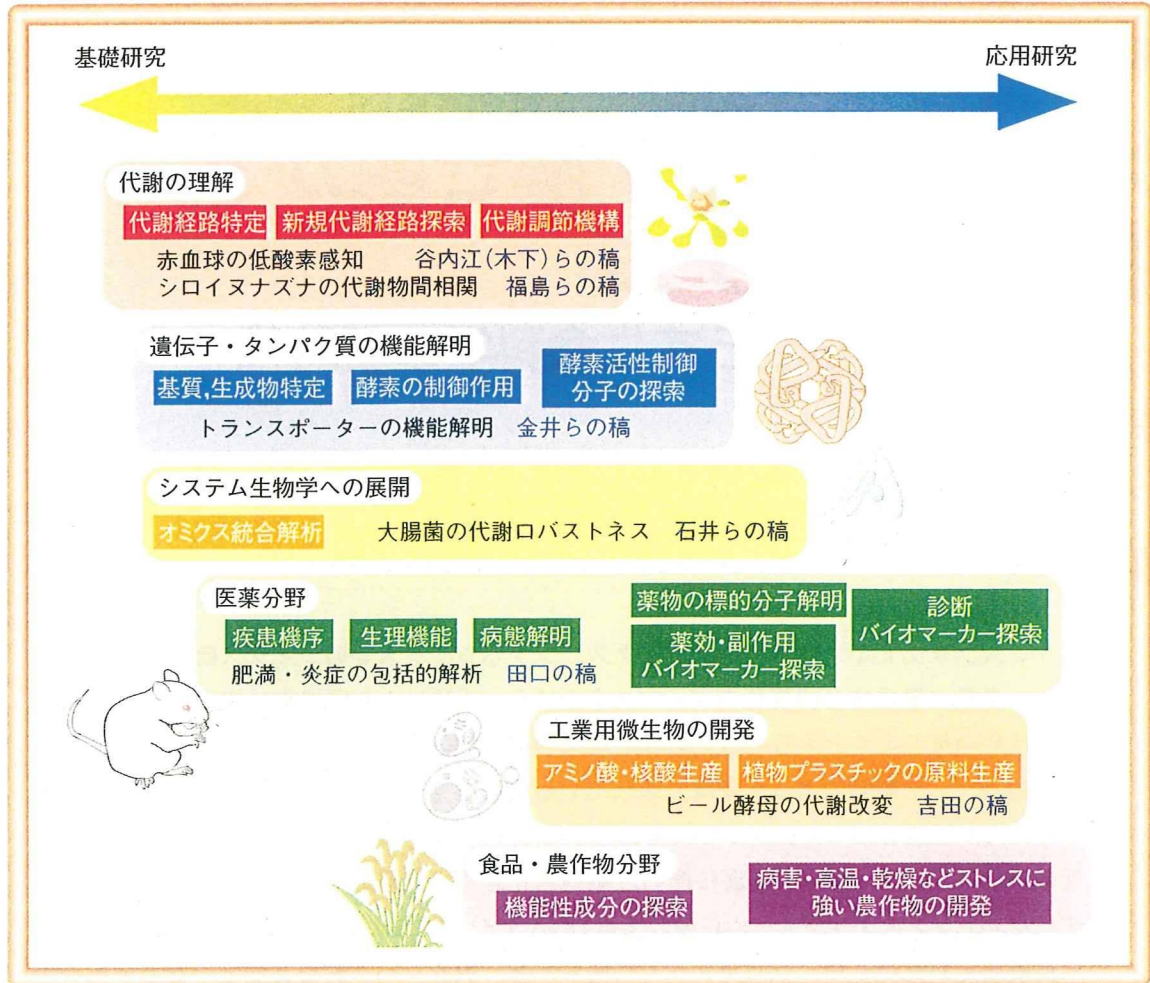
近年のポストゲノム研究の進展に伴い, 細胞内化合物の網羅的・包括的な測定法が急速に発達した. トランスクリプトームに関してはDNAマイクロアレイの登場によって遺伝子発現の大規模測定が実現した. プロテオームに関しても, 膜タンパク質など測定が難しいものが存在するものの, 高速液体クロマトグラフィー—質量分析計 (LC-MS) や二次元電気泳動法の開発によって網羅的な測定が可能になった. トランスクリプトームの測定対象である mRNA はおもに 4 種類の核酸, またプロテオームの測定対象であるタンパク質は, リン酸や糖鎖の修飾はあるものの基本的に 20 種類のアミノ酸から構成されているため, 標準物質がなくても最新の測定技術とデータベースを用いれば比較的簡単に同定することが可能である. しかし, トランスクリプトミクス, プロテオミクスでは, 分子間の相互作用やネットワークに関する情報の蓄積やデータベースはほとんどなく, それらの解析は今後の課題となっている.

全代謝物質の網羅的な解析を目指すメタボロミクスでは, 多様な代謝物質が存在し, 代謝標準物質も 20% 程度しか入手できない状況においては, 未知物質の特定がきわめて難しく, それがこの研究分野の進展の障壁となっている. 一方, 代謝経路の解明は進んでおり, KEGG (<http://kegg.jp/>), MetaCyc (<http://metacyc.org/>) 等, いくつかのデータベースがすでに構築されているため, 代謝物質間や代謝物と酵素の関係, ネットワークはかなり明らかになっている.

代謝産物には物理的・化学的性質が非常に似かよったものから全く異なるものまで多くの化合物が混在し, それらを区別してかつ同時に測定することがきわめて難しかった. 一方メタボローム研究への関心の高まりに伴い, ガスクロマトグラフィー—質量分析計 (GC-MS)<sup>1)</sup>,

### Metabolomics - a new approach to elucidating biosystems

Tomoyoshi Soga : Institute for Advanced Biosciences, Keio University (慶應義塾大学先端生命科学研究所)



概念図 各種メタボローム研究の位置付け

近年、メタボローム解析は、代謝の解明、遺伝子やタンパク質の機能解析等の基礎研究から医薬、発酵、食品、農作物分野の応用研究まで幅広く行われている

LC-MS<sup>2)</sup>、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS)<sup>3) 4)</sup>、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICRMS)<sup>5)</sup>、核磁気共鳴装置 (NMR)<sup>6)</sup> など (それぞれに測定対象、感度、定量性、網羅性、スループットに長所と短所があるが)、いくつかのメタボローム測定法が開発された。近年これらの方法論によって急速に発展したメタボローム研究が、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム情報と組み合わせられた結果、代謝調節機構の解明<sup>7) 8)</sup>、遺伝子やタンパク質の機能解明<sup>9) 10)</sup>などの基礎研究から、医薬品の副作用のメカニズムや早期検出可能なバイオマーカー探索<sup>4)</sup>、食品に含まれる機能性成分の探索、工業用微生物の育種などの産業応用に有用であることが示されてきた。本特集では、興味深い最新のメタボロミクス研究成果を第一線の研究者の方に紹介していただいた。

### 1 赤血球の酸素応答機構の解明〔谷内江 (木下) らの稿〕

谷内江 (木下) らは、メタボローム測定とコンピュータシミュレーションによって赤血球の代謝調節機構を解明した。代謝赤血球内の代謝反応ネットワークとヘモグロビンの酸素運搬



能の相互作用を勘案した赤血球代謝シミュレーションモデルを開発した。シミュレーションによる予測とCE-MSによるメタボロームの実測値から、酸素濃度と代謝状態をヘモグロビンが感知してヘモグロビンの状態遷移が起こり、赤血球膜の主要なイオン輸送タンパクであるBand3へ結合する。その結果、解糖系の酵素群が乖離し、結果として解糖系が活性化するという代謝調節機構を示した。これまでも多くの赤血球の数値モデルが発表されてきたが、ほとんどが代謝経路のネットワークそのものに興味を絞ったものでしかなかった。谷内江(木下)らは、メタボローム解析によって、網羅的な代謝物時系列変動を同一条件、短時間で計測することによりモデルを検証し、赤血球の酸素応答機構の解明に踏み込むシミュレーションモデルを構築した。

## 2 植物メタボロミクスにおける代謝物プロファイルデータの相関解析 (福島らの稿)

シロイヌナズナを用い、一次代謝に異常のある *mtol*、二次代謝に異常のある *tt4*、野生型 (Col-0) に対して、GC-TOFMSによるプロファイリングを行った。*mtol*ではメチオニンの過剰蓄積やアスパラギン酸生合成経路に属する代謝物の変化が観察されたが、*tt4*では、アミノ酸等の一次代謝物に顕著な変化はみられなかった。

代謝物間相関解析を行った結果、野生型と *tt4*は互いに似た相関パターンを示すが、*mtol*ではこれらのパターンが消失した。*mtol*の代謝システムは過剰蓄積したメチオニン生合成経路だけでなく、アスパラギン酸代謝経路およびポリアミン代謝経路に関しても相関に影響があると考えられる。

野生型と *tt4*とを比較すると、シナピン酸とリンゴ酸の存在量は変化しないにもかかわらず、両代謝物間の相関が非常に強まっていた。これはフラボノイドやアントシアニンを生合成できず、これらの物質を使った紫外線に対する防御機構を失っている *tt4*において、代替代謝物(シナピン酸エステル類等)による紫外線対策を示唆しており、どのようなバックアップ機構が存在するのか今後の展開が興味深い。

## 3 トランスポーターの機能決定と機能解析 (金井らの稿)

細胞内の恒常性を維持する役割を担うトランスポーターの遺伝子欠損によって生じる遺伝病も多く、その病態解明にはトランスポーターの役割を理解することが必要である。しかし、未だに多くの機能未同定のトランスポーターが存在しており、その生理機能の理解が望まれている。近年、トランスポーターのノックアウトマウスと野生型マウスの各組織の成分をメタボローム測定することにより、トランスポーターの基質を特定する試みが行われている。最近、腎組織におけるアミノ酸代謝におけるPepT2の新たな生理機能の発見等、従来の研究では解明できなかったトランスポーターの研究がメタボロミクスによって明らかになっている。本稿では、最新のメタボローム技術によるトランスポーターの機能解明研究を紹介していただいた。

## 4 マルチオミクス解析による大腸菌代謝ロバストネスの実証 (石井らの稿)

石井らは、大腸菌の一遺伝子欠損株および異なる環境条件で培養した野生株の数千分子をト

ランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームおよびフラクソーム（代謝物質の流れ）測定した。一遺伝子欠損株では、mRNA、タンパク質、代謝物質のいずれも大きな変動はみられなかった。野生株では、mRNAやタンパク質は細胞の増殖速度に追従して変動したが、代謝物質はあまり変動しなかった。ほとんどの一遺伝子欠損株でmRNAおよびタンパク質のレベルに大きな変化がないことは、大腸菌は一遺伝子欠損のような内部変動に対しては特に積極的な対応を行わないことを示す。それにもかかわらず代謝物質レベルが安定に保たれるのは、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ているのであろう。一方、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つと考えられる。大腸菌はさまざまな戦略を必要に応じて使い分けて、細胞内の代謝物質レベルを安定化していることが示唆された。

細胞内の数千物質を複数のオミクス手法を用いて測定した世界でもはじめての試みであり、遺伝子や環境の変化に対して、mRNA、タンパク質、代謝物の順で変動は小さくなることが確認された。大腸菌以外にも同様の傾向があるか、他の生物種の結果が待たれる。

## 5 脂質メタボロミクスによる病態解析（田口の稿）

LC-MSを用いた脂質メタボロームの包括的解析法（リピドミクス）を疾患モデルに適用した。肥満マウスでは、肥満にやや先行するかたちで、トリグリセリドで不飽和度が低い短鎖型中性脂質の割合が増加した。また、 $\omega$ -3系統（EPA, DHA）と $\omega$ -6系統（アラキドン酸等）の脂肪酸を含むリン脂質グループ間の質的および量的バランスに変動がみられ、特定の脂質分子種グループの代謝変動が肥満病態への移行に関与していることが示唆された。オボアルブミン暴露により喘息を起こさせたマウスとそのマウスにEPAを投与したマウスについて比較した結果、EPA投与による喘息の軽減は、アラキドン酸との拮抗作用以外に、EPA由来の代謝物が何らかの働きにより喘息を軽減させている可能性が推測された。

## 6 酵母における代謝経路改変による育種（吉田の稿）

これは、トランスクリプトームとメタボロームを駆使して酵母の代謝の改変に成功した話題である。ビール醸造において、高い抗酸化作用をもち鮮度の維持に重要な役割を果たす亜硫酸を増加させ、オフフレーバーの原因である硫化水素を減少させることができれば、香味安定性に優れた製品を提供できる。しかし、これらの物質は代謝経路の隣に位置しているため、培養条件等の変化では連動して増減するという問題があった。吉田は酵母の遺伝子発現、代謝物を網羅的に解析し、酵母においてO-アセチルホモセリンが亜硫酸・硫化水素生産の律速因子であることを発見した。この知見にもとづき、アスパラギン酸からO-アセチルホモセリンへの代謝流量を増大させ、同時に硫酸イオンから亜硫酸への還元経路の代謝流量を増加させることにより、亜硫酸高生産・硫化水素低生産変異株の開発に成功した。

## おわりに

これまで述べてきたようにメタボロミクスは生まれたばかりの新しい研究分野ではあるが、

基礎研究はおろか、今や産業にも大きな波及効果を与えつつある。一方で、すべての代謝物質を一度に測定できる方法論がまだ存在しておらず、未知代謝物質を同定することがきわめて難しいなど、まだまだ多くの課題が残っている。意欲的な人材がこの研究分野に参画し、新天地を切り開いてくれることを期待したい。

## 文献

- 1) Fiehn, O. et al. : Nature Biotechnol., 18 : 1157-1161, 2000
- 2) Yoshida, H. et al. : J. Agric. Food Chem., 55 : 551-550, 2007
- 3) Soga, T. et al. : J. Proteome Res., 2 : 488-494, 2003
- 4) Soga, T. et al. : J. Biol. Chem., 281 : 16768-16776, 2006
- 5) Aharoni, A. et al. : OMICS, 6 : 217-234, 2002
- 6) Reo, N. V. : Drug Chem. Toxicol., 25 : 375-382, 2002
- 7) Ishii, N. et al. : Science, 316 : 593-597, 2007
- 8) Kinoshita, A. et al. : J. Biol. Chem. 282 : 10731-10741, 2007
- 9) Hirai, M. Y. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 10205-10210, 2004
- 10) Saito, N. et al. : J. Proteome Res., 5 : 1979-1987, 2006

## Profile

### 著者プロフィール

曾我朋義：慶應義塾大学環境情報学部および同先端生命科学研究所教授，1984年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業。工学博士。横河電機（株），横河アナリティカルシステムズ（株）を経て，2001年慶應義塾大学環境情報学部および同先端生命科学研究所助教授，'06年より現職。ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ取締役（兼任）。開発したCE-MSによるメタボローム測定法によっていろいろな分野の研究者に出会えることが最大の楽しみ。



## ● 新しい局面に進むゲノム科学

## メタボロミクスの医学への応用

\*1 慶應義塾大学先端生命科学研究所 教授

\*2 ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

曾我 朋義<sup>\*1\*2</sup> Tomoyoshi Soga 大橋 由明<sup>\*2</sup> Yoshiaki Ohashi

富田 勝<sup>\*1\*2</sup> Masaru Tomita

## || 要旨 ||

メタボロミクスはゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスに続く第4のオミクスとして確立されつつある。しかし、目的物質の化学的性質が多様なため一斉分析が難しい。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) は、イオン性代謝物質に特化した極めて分解能の高い一斉分析法であり、メタボロミクスにおける技術的ブレイクスルーとなった。本稿では、CE-MS 法の手技と実際について解説する。

## はじめに

人が疾患に罹患するとは、遺伝的变化、生活習慣、感染、老化などの要因により生体内の恒常性維持機構が破綻し、正常な状態を維持できなくなることである。そこで、生体内での具体的な状態変化を探索することが、疾患の診断、治療そして予防に有益な情報を与える。近年オミクスのアプローチが可能となり、一塩基多型 (SNPs) 解析や DNA チップ、プロテオーム解析が精力的に行われ、それらを統合した大規模オミクス解析も行われるようになった<sup>1)</sup>。オミクスの目的は、

キーワード：メタボロミクス, CE-MS, オフタルミン酸,  
シミュレーション, 赤血球

予測不可能な生体内環境の変化を，バイアスをかけない手法により包括的に探索することである．この視点から，メタボローム（全代謝物質）解析という手法の開発にも期待の眼差しが注がれているのは自然の流れであろう．狭義のメタボロミクスでは，栄養源の異化資化経路中間体を中心とした低分子代謝物質の総体を標的とする．これらの代謝物質は化学的性質が多岐にわたるため，メタボロミクスは他のオミクス解析にはない技術的な困難さを内在している．

### CE-MSによるメタボローム解析

メタボロミクスを医療に応用する試みは，ここ1～2年で大幅に現実味を帯びてきた．特に血液や生検サンプルを用いた診断，治療標的の探索，予防医学への貢献が期待される．しかし，特定バイオマーカー発見への道りは険しく，成功例はまだ少ないのが現状である．原因は幾つか考えられるが，やはり測定手法の精度をいかに高く保つかが勝負になっている．

メタボロミクスでは，目的代謝物質の性質により測定法を使い分ける必要がある．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）は，イオン性代謝物質の一斉分析を行うのに適している．大腸菌の代謝物質を文献（2007年6月現在）をもとに筆者らが調べたところ，全代謝物質は792種であり，非イオン性が14%，イオン性が86%を占めていた．ヒトの場合，代謝物質の総数はこの数倍であると考えられる．CE-MSはこのように生体内の大多数を占めるイオン性代謝物質を分離する能力に秀でており，構造異性体の分離も可能なほど高い分離能を有している．通常，イオンの種類により陽イオン，陰イオン，ヌクレオチド類の3モードを設定して測定を行う<sup>2)</sup>．キャピラリーに注入されるサンプル量が微量であり，高い分離能も手伝ってイオンサプレッションが起りにくいことから定量性も極めて良好である．これが液体クロマトグラフィー（LC）にはない魅力となっている<sup>3)</sup>．検出に用いる質量分析計（MS）は，その目的により使い分ける．サンプル中の濃度がある程度高く，溶出時間など分析情報がそろっている代謝物質のルーチン解析では四重極型（QMS）を用いている．飛行時間型（TOFMS）は質量分解能が高く，またダイナ



ミックレンジも広く定量性能が良好であることから、広い質量-電荷比 ( $m/z$ ) レンジを一度にスキャンする、いわゆる“一斉分析”に用いる。さらに高感度に特定物質を検出する際は、三連四重極型 (TripleQMS) や四重極/飛行時間型 (Q-TOFMS) を用いる。この MS では、未同定物質の構造情報を得ることも可能である。

### メタボロームで用いるサンプル

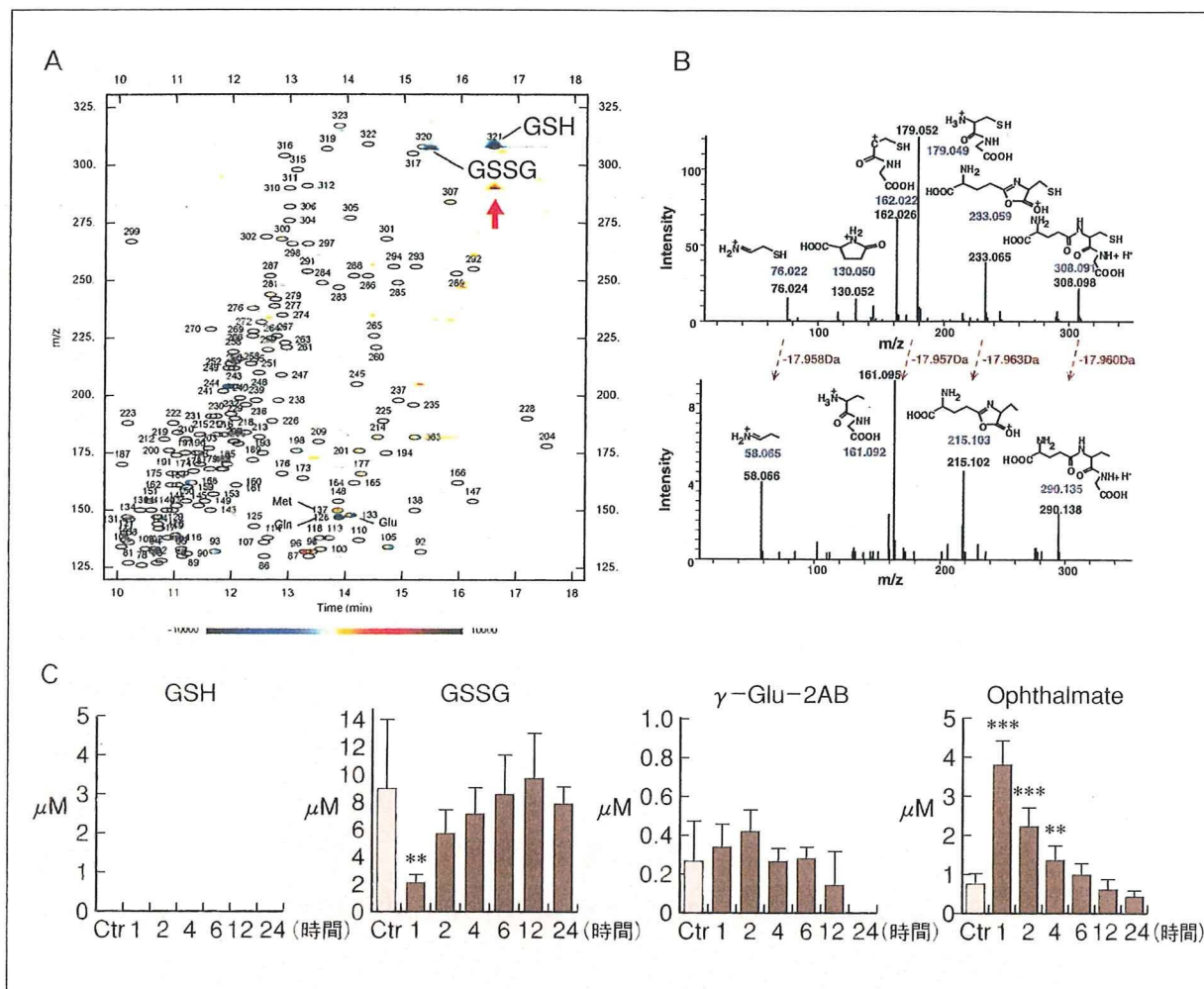
メタボロミクス解析に必要なサンプル量は、組織サンプルで 20 ~ 30 mg, 血漿ならば 100  $\mu$ l あれば十分である。ほかにも培養細胞や尿、脳髄液など適用範囲は広がっている。前処理法はメタノールおよびクロロホルムを用いて脂溶性物質を除去した後、限外濾過により除タンパク質している。サンプルの生物学的クオリティーには格別の注意が必要である。サンプル内の細胞の状態が不均一の場合、偽陽性や偽陰性データを生み出しやすい。自治医科大学の宮里らは、この現象を“細胞集団のシフト”と呼んで骨髄細胞の DNA マイクロアレイデータを例に注意を喚起している<sup>4)</sup>。同様の理由から、臓器サンプルも灌流を施したものをを用いれば血液成分の影響を排除できるが、灌流による臓器内環境の変化を考慮する必要がある。

### CE-MS を用いたメタボロミクスによるバイオマーカー探索

代謝物質を精度よく定量的に分析することがメタボロミクスの鍵である。そこで筆者らは、最近流行の核磁気共鳴 (NMR) やフーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析 (FT-ICRMS) などのスループット重視で定量性の低い機器は用いず、分離能、質量分解能および定量性の高い CE-TOFMS を用いてメタボローム測定法を開発した。ここでは CE-TOFMS を用いたバイオマーカー探索例を解説する<sup>5)</sup>。

アセトアミノフェン (AAP) は有名な非ピリン系解熱鎮痛薬だが、肝毒性があるため肝障害患者への投与は禁忌である。また、健康者であっても大量服薬により急性肝障害を誘発する。筆者らは、マウスに AAP を過剰投与し、その急性肝障害によるメタボロームプロファイルの変化を探索する実験を計画した。150 mg/kg AAP を腹腔内投与されたマウスの血清および肝臓実質を 24 時間まで経時的にサン

図1 アセトアミノフェン過剰投与により肝臓組織中で変化する代謝物質(バイオマーカー)の探索



A : AAP 過剰投与によるマウス肝臓のメタボロームプロファイル変化。薬剤投与群でレベルが上昇したバイオマーカー候補ピークを赤矢印で示した。  
 B : GSH (上) およびオファルミン酸 (下) の CE-Q-TOFMS によるフラグメントパターン。  
 C : AAP 過剰投与による血清オファルミン酸レベルの経時変化。γ-Glu-2AB はオファルミン酸の生合成中間体。  
 略語：巻末の「今号の略語」参照

リングし、イオン性代謝物質の抽出を行い、CE-TOFMSにてメタボローム測定を行った。得られたメタボロームデータを新規に開発したメタボロームディファレンシャルディスプレイ法 (MDD)<sup>6)</sup>にて解析したところ、肝臓実質にて酸化型 (GSH) および還元型グルタチオン (GSSG) レベルが顕著に低下するという結果が得られた (図1 A)。

注目すべきであったのは、陽イオン分析での測定  $m/z$  値が 290.138 を示す代謝物質のレベルが顕著に増大していたことである

(図1A). この物質は筆者らが所有している約2,000種の代謝物質とは一致しなかった. そこでCE-Q-TOFMSにて構造情報を取得したところ, フラグメント化のパターンがGSHのものによく似ており, 各フラグメントの $m/z$ 値がGSHのものに比べて17.96小さいことが判明した(図1B). これらの情報から, AAP過剰投与により肝臓実質においてレベルが顕著に増加する物質は, GSHのSH基がメチル基に置換されたオフタルミン酸であることが判明した. その後, GSH生合成酵素阻害薬やGSHの酸化誘導薬を投与したマウス肝臓でもオフタルミン酸の蓄積が起きることを証明し, オフタルミン酸はGSHと同じ生合成酵素群により合成されることが判明した. さらに, AAP投与によりGSHが消費されGSH生合成経路が活性化されるが, 基質であるシステインが枯渇し, 代わりにオフタルミン酸の生合成基質である2-アミノ酪酸が反応してオフタルミン酸の蓄積を誘導していることが判明した. この成果により, 生体内が酸化状態となったときのバイオマーカーとしてオフタルミン酸蓄積を提唱することとなった. オフタルミン酸レベルの変化は血清でも確認されたことから(図1C), 体内の酸化状態を診断するより汎用的なマーカーとなることが期待され, 今後ヒトの臨床検体を用いた実証試験を行う予定である.

### システム生物学への貢献

代謝ネットワークの挙動は, ごく単純なバクテリアでさえ直感的に理解できる範囲を超越している. ある特定の入力に対して代謝ネットワークはどのようにふるまい, そして最終的にどこに収束していくのかを予測することは難しい. しかし, 近年のシステム生物学では, 少しずつではあるがそのような代謝ネットワークの挙動を予測する手法が開発されている. 次に示す研究は, システム生物学とメタボロミクスの融合の例である<sup>7)</sup>.

末梢組織に到達した赤血球は低酸素状態にさらされ, 運搬してきた酸素を放出して末梢組織での呼吸を促進する. 酸素分子と結合したヘモグロビン(Hb)は, プロトン濃度の低下, 一酸化窒素, ATPそして2,3-ビスホスホグリセリン酸(2,3-BPG)濃度の上昇を感知し



て酸素を放出する。酸素分子が結合して弛緩状態 (R-状態) となっている Hb は、酸素分子を放出して緊張状態 (T-状態) になり、いつでも酸素分子を受け取れる状態になる。このとき解糖系を経て生成される 2, 3-BPG が R-状態の Hb に結合し、安定化させることで酸素親和性は低下し、酸素分子がミオグロビンに渡される。これまでに、赤血球において解糖系酵素 6-ホスホフルクトキナーゼ (PKF), アルドラーゼ (ALD), グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) および乳酸脱水素酵素 (LDH) が膜に存在するタンパク質 Band III (BIII) に結合し、不活化されていることが知られていた。また、これらの酵素は、T-状態の Hb が BIII に直接結合することで遊離し、活性化されると考えられた。この仮説を考慮して赤血球の持つ代謝ネットワークを E-CELL<sup>®</sup> にてモデル化したところ、低酸素状態にさらされた赤血球内部では解糖系が活性化されることが示された (図 2 A)。この現象を実際にヒト由来赤血球サンプルの CE-TOFMS 解析にて検証したところ、予測とよく一致した代謝物質プロファイルが得られた (図 2 B, C)。この結果は、低酸素状態における解糖系活性化が、BIII と T-状態の Hb との相互作用を介した上記酵素群の活性化によるものであることを裏づけている。また、ATP および 2, 3-BPG についても予測と実測値は良い一致を示した (本実験では遊離物質濃度を測定している。ただし Hb に結合した 2, 3-BPG はサンプル処理中に遊離してしまうため、全体の予測濃度変化と一致している) (図 2 D, E)。一方で、一酸化炭素 (CO) を暴露した赤血球で乳酸合成速度が増加することも確認し、末梢組織における低酸素、高 CO 環境下では解糖系が活性化され、ピルビン酸を経て乳酸が蓄積されるメカニズムが数理モデルおよびメタボロミクスにより明確に説明することができた。

#### おわりに

メタボロミクスが医学研究に取り入れられてまだ日は浅いが、着実に成果は生まれてきており、今後最も重要な分野の 1 つになるだろう。しかし、他のオミクスが直面したのと同じように、メタボロミクスにおいても医学との融合において問題は立ちはだかっている。言うまで