

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「代謝調節機構解析に基づく細胞機能
制御基盤技術」
研究課題「定量的プロテオミクスとメタボロミクスの融合」

研究終了報告書

研究期間 平成17年10月～平成22年9月

研究代表者：小田吉哉
(エーザイ(株)・バイオマーカー&パーソナライズド
メディスン機能ユニット・プレジデント)

§ 1 研究実施の概要

本研究では、細胞内の代謝産物を統合的あるいは網羅的に解析する基盤技術の確立に重点を置き、代謝産物群のプロファイリングによる細胞内の状態変化や病態の評価・分類を行うことを目指してきた。特に広く普及しており、ルーチン性に優れた HPLC や GC を主体とした分析手法の確立、そして比較解析を可能にするために信頼性が高い定量分析法の開発、エンドユーザーの利便性を考えながら、種々の装置に対応可能で、かつ差分解析を実行できるソフトウェアの作成と配布を行ってきた。特に予め想定した標的分子のみを測定する Targeted Metabolomics に加えて、標的を絞らない、幅広い分析が可能な Untargeted Metabolome 測定法開発を進め、感度向上が期待できるナノ LC/MS 部分、メタボロミクスだけでなくプロテオミクスにも応用可能なリン酸化物の分析に有用な EDTA 添加法、定量精度を上げるための安定同位体元素標識内部標準法の採用、そして前処理法に工夫を加えることで、陽イオン性代謝物、陰イオン性代謝物および脂質成分を測定可能とするシステムを確立した。この手法を作用メカニズムが明にされている抗がん剤について癌細胞を使ってメタボローム分析したところ、機知の作用機序に加えて、新たな作用メカニズムを示唆する結果を得た。そこで本システムをアルツハイマー病バイオマーカー探索に応用したところ、アルツハイマー病で変動するバイオマーカーを脳脊髄液、および血漿から見出すことに成功した。さらに学習能力や行動パターンの変化がわかる Environment Enrichment Mice を作製し、その脳成分を調べたところ、メタボロームとプロテオームで相関するデータを得ている。これと平行して種々の質量分析計から得られる生データを自由に取り扱うことができるソフトウェア、Mass++の開発と無償配布(ダウンロード)を行なっているが、特にソフトウェアのダウンロードは、1年2ヶ月で2000件を突破した。さらに JST-BIRD プロジェクトであり、メタボロームのデータベース化を進めている MassBank との連携を進め、ユーザーから Mass Bank へのデータ提供および MassBank のデータ閲覧に Mass++の機能を加えることで、Mass Bank の価値が高まり、ユーザーフレンドリーなデータベースとなっている。なお本研究で得られた成果をさらに活用するために、内閣府最先端研究開発支援プログラム田中耕一プロジェクトの一部として継続することが決まった。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

本研究では、細胞内の代謝産物を統合的あるいは網羅的に解析する基盤技術の確立に重点を置き、代謝産物群のプロファイリングによる細胞内の状態変化や病態の評価・分類を行うことを目指す。特に広く普及しており、ルーチン性に優れた HPLC や GC を主体とした分析手法の確立、そして比較解析を可能にするために信頼性が高い定量分析法の開発を目指した。

先ず前半でプロテオミクス研究にて我々が開発した、代謝的安定同位体標識法で得られる内部標準物質を利用する手法、をメタボロミクスにも応用し、網羅的かつ精度の高いメタボローム用定量解析法を構築する。同時に同じく我々が開発した石橋カラムを応用し極性代謝物に分析法を確立すると共に、微量定量のためのシステムの高感度化を目指す。

これに引き続き中期より特定官能基などに焦点を当てた特異的代謝物濃縮法を開発し、特定の代謝物群について高度な微量分析が可能となる分析系を構築する。またメタボロミクスにおける最大のボトルネックである代謝物構造を同定する検索エンジンの開発を開始する。構築したシステムの妥当性・実用性の検討としてバイオマーカーや疾患関連代謝物の探索を目的として培養細胞等から得た実サンプル測定を開始する。

研究後期では同じサンプルソースにてプロテオーム解析を実施し、メタボローム解析結果との情報統合により、代謝物群とそれを制御する酵素群の解析を可能とし、新たな代謝物(リガンド)と酵素

との関係を見出す。研究の最終段階においては実験動物におけるメタボローム情報とプロテオーム情報を解析しこれらを統合することで、生体の代謝調節制御に関する真の分子群の情報を得る。

(2)新たに追加・修正など変更した研究構想

研究中期よりエンドユーザーの利便性を考えながら、種々の装置に対応可能で、かつ差分解析を実行できるソフトウェアの作成を行うことを開始した。これをバージョンアップ毎に公開、無償配布することとした。特定の代謝物を質量分析装置で定量するためのソフトウェアは各質量分析メーカーより販売されているが、不特定多数の代謝物を解析できるソフトウェアはない。更には異なったメーカーの質量分析装置から得られたデータを同時に解析できるソフトウェアは皆無であったためである。また、膨大なメタボロミクスおよびプロテオミクスデータをデータベースとして利用する為に質量分析データマイニングソフトウェアの開発も同時期にスタートさせた。

研究後期においてメタボロミクス分析手法の確立にあたり、極性化合物に加えて生体内の重要な代謝制御に関する脂質関連物質を高感度かつ網羅的に分析しうる分析手法の開発とその応用も実施した。

研究後期において、我々が開発してきた汎用性データ解析用ソフトウェアを、JST-BIRDのMass Bankと連携させることで、Mass Bankの利便性向上に大きく貢献できるとの認識から、協力体制を取る事となった。

§ 3 研究実施体制

(1)「エーザイ」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小田 吉哉	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	プレジデント	H17.10～
青島 健	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	統括課長	H17.10～
中村 立二	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	主幹研究員	H18.10～
門脇 正史	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	主幹研究員	H19.04～
田畑 剛	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	主任研究員	H17.10～
柳町 守	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	主幹研究員	H21.07～
上杉 麻依	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	研究員	H19.04～
武藤 洋樹	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	研究員	H21.01～
松浦 健太郎	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	研究員	H21.07～
上原 泰介	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	研究員	H18.05～
佐藤 義明	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	研究員	H20.04～
Frank Bernier	エーザイ(株)バイオマーカー&パーツ ナライズドメディスン機能ユニット	課長	H21.07～

三浦 雄治	エーザイ(株)ネクストジェネレーションシステムズ機能ユニット	主任研究員	H19.04～H21.06
佐藤 俊孝	エーザイ(株)コアテクノロジー研究所	統括課長	H17.10～
河合 隆利	エーザイ(株)コアテクノロジー研究所	統括課長	H18.04～
石原 健至	エーザイ(株)安全性研究所	研究員	H17.10～H21.06
浅井 直樹	エーザイ(株)ファーマシューティカルサイエンス&テクノロジー機能ユニット	主幹研究員	H18.05～H21.06
石濱 泰	エーザイ(株)シーズ研究所、H18.04から慶応義塾大学・先端生命科学研究所所属	主幹研究員・H18.04 から 助教授	H17.10～H19.03
Khin Than Myint	エーザイ(株)バイオマーカー&パーソナライズドメディスン機能ユニット	ポスドク	H19.04～
鈴木 郁美	エーザイ(株)バイオマーカー&パーソナライズドメディスン機能ユニット	技術員	H20.04～
杉山 孝子	エーザイ(株)バイオマーカー&パーソナライズドメディスン機能ユニット	技術員	H21.07～
川端 麻紗子	エーザイ(株)バイオマーカー&パーソナライズドメディスン機能ユニット	技術員	H20.04～H21.06
田中 聡	エーザイ(株)バイオマーカー&パーソナライズドメディスン機能ユニット	業務委託	H18.04～H22.06
土屋 理紗	エーザイ(株)コアテクノロジー研究所	技術員	H18.04～H20.03
田中 直樹	エーザイ(株)シーズ研究所	ポスドク	H17.10～19.03
橋本 果林	エーザイ(株)シーズ研究所	技術員	H17.10～H.18.02

H19.04より組織改変によってシーズ研究所がコアテクノロジー研究所に、更にはH21.07よりバイオマーカー&パーソナライズドメディスン機能ユニットに変更

②研究項目

- ・「定量的プロテオミクスとメタボロミクスの融合」の全項目

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 メタボローム定量解析法の開発

(1) 研究実施内容及び成果

メタボローム解析を大別すると Targeted Analysis と Untargeted Analysis の二つに分類できる。前者は調べたい特定の代謝物があり、それについてモニターするものである。これはメタボロミクスという言葉が登場する前から広く行われていた。後者については、モニターする代謝物を限定せず、網羅的に調べる方法であり、メタボロミクスの本来の定義からすると Untargeted analysis がメタボローム解析と同義語となる。以下にそれぞれの研究実施内容および成果を記載する。

4.1-1) Quantitative Targeted Metabolome Analysis

特定の標的分子のみをモニターすることは古くからおこなわれている。またそれら標的代謝物の多くは、紫外部に吸収がない、特徴的な官能基がないなどの理由から、常に感度と特異性が問題になっていた。この問題点に対し質量分析計 (MS)、特に GC/MS や LC/MS は分析法本来が持つ高い分析選択性と高感度な特性を活かし 1970 年代ころから Targeted metabolome analysis 分野で盛んに行なわれるようになった。近年では更なる装置の進歩によって同時に 100 種類程度の分子をモニターすることが可能になっている。測定法を確立することにおいて常に課題となるのが、高感度化と定量精度の確保である。前者については対象物質を誘導体化したり、前処理での回収率を向上させたり、LC/MS をナノ化したりすることによる達成できる高感度化が一般的であり、定量については測定対象物と同じ構造を持つ安定同位体元素標識物質を内部標準物質として前処理の最初の段階から加えるという方法を利用する事でバラつきが少なく最も信頼性が高い結果が得られる。

過去の成功例の多くは対象物質が数種類であり、必要な感度を確保するために、その数種類に限定した最適化条件を見出し、個々の安定同位体元素標識物質を用意することで高精度の定量を行うことを可能にしてきた。しかし標的分子が 100 種類あるいはそれ以上となると、高感度化や定量精度の向上については、個々の分子の特性に合わせるのではなく、一般化した手法を確立する必要がある。高感度化の王道は LC/MS における LC 部分のナノ化である。これによって数倍から数十倍の高感度化が可能になる。しかしナノ化によってシステムの安定化が失われ、トラブルが増えるだけでなく、定量性も低下するため内部標準物質による補正が必要になる。しかし 100 種類ものの内部標準物質を個別に用意するのは費用の点でも試料調製の労力の点では適切ではない。

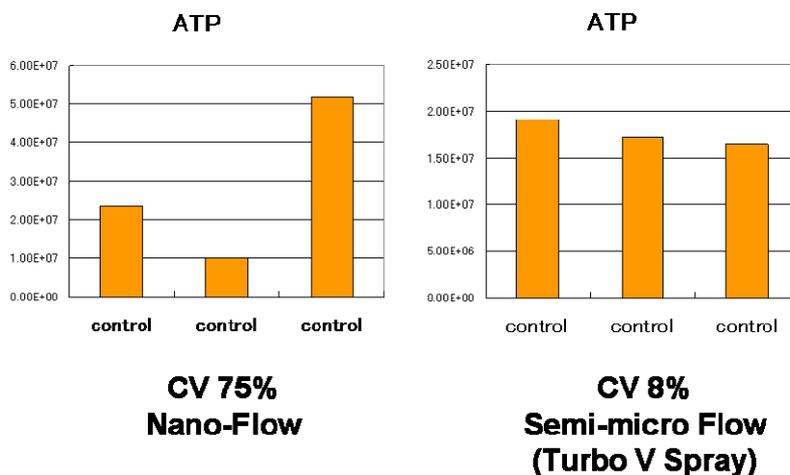
我々はプロテオミクスにおいて安定同位体元素標識細胞を用いた定量を数多く行ってきた。哺乳類細胞の場合、安定同位体元素で標識した必須アミノ酸を培地に加えておけば、その培地で培養された細胞のタンパク質が安定同位体元素で標識される。しかし内在性代謝物を網羅的に標識することは容易ではない。しかし大腸菌であれば最小培地で十分増殖させることができるので安定同位体元素標識体から構成される最小培地で大腸菌を培養することで代謝物を標識化した。またタンパク質のアミノ酸配列と違い、代謝物では大腸菌でもヒトでも構造が同じものが多い。よって標識した大腸菌を内部標準細胞として比較する二種類の哺乳類細胞試料に一定量加えて補正することで精度の高い定量法を確立した。

(下記表: LC のカラム内径を小さくして移動相の流速を遅くするほど感度 (ピーク面積や強度) が上昇する。検討した 4 種の代謝物についてナノ LC/MS とする事で 40 倍~100 倍の高感度化に成功した。)

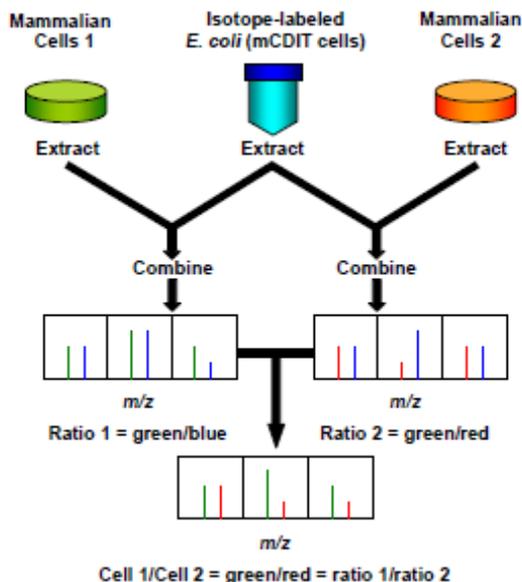
Comparison of LC-MS peak intensity between semi-micro flow LC-MS and nano flow LC-MS.

Peak area (ratio)	Flow rate (uL/min)	LC-MS Peak Area (relative value)			
		NAD ⁺	UMP	UDP	UTP
Semi-micro flow LC-MS	150	1	1	1	1
Nano flow LC-MS	0.7	95.3	105.5	41.5	59.0
LOD of nano flow LC-MS (SN=3) [†]		0.78	1.65	2.36	7.17

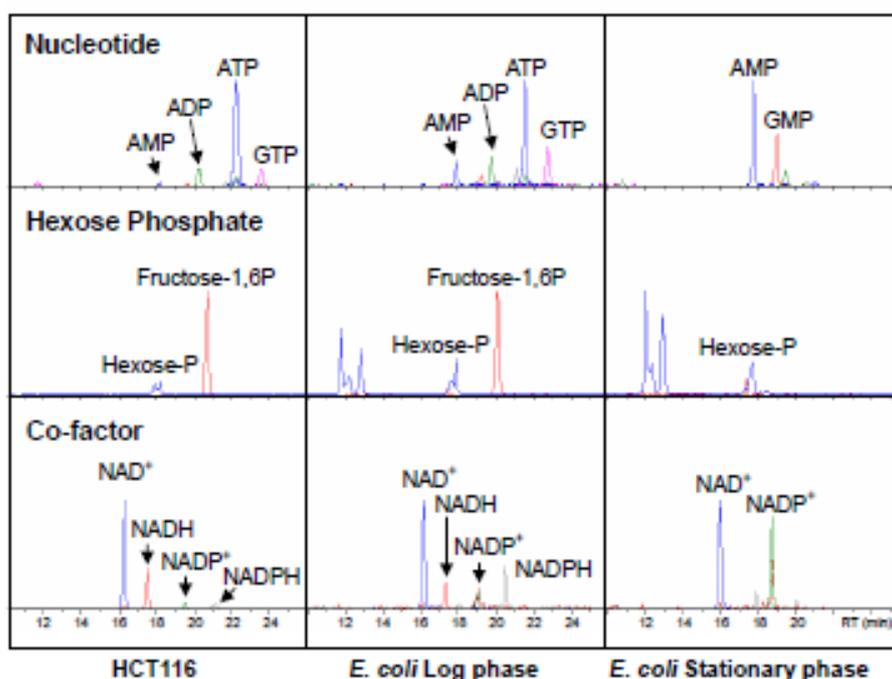
(下記図：繰り返し測定を行なったときの LC/MS のピーク強度について。LC の移動相の流速が比較的速いセミマイクロ LC では良い再現性結果であったが、流速をナノにすると再現性が著しく悪化した。つまりナノ LC/MS は高感度化に必要ではあるが、定量性が犠牲になることを意味している→高感度と定量性の両面の確保が必要)



(下記図：内部標準細胞 (CDIT) による定量概念図)



(下記図：大腸菌を培養開始後 3 時間後と 22 時間後の代謝物パターンとヒト大腸由来の細胞 HCT116 との代謝物パターンの比較。対数増殖期の大腸菌を利用したほうが多くの代謝物を得ることができる)。



(下記表：内部標準細胞＝同位体標識大腸菌を使って補正することによって、ナノ LC/MS の高感度を保ったまま、一般的な定量分析の許容範囲とされる CV 値 15%以下の再現性の良い測定法を確立する事ができた。)

Table 1. CV Values of LC/MS Quantification of Cell Metabolites with or without mCDIT

	CV (%) ^a				P-value ^b
	NAD ⁺	UMP	UDP	UTP	NAD ⁺
without mCDIT	6%	7%	28%	43%	0.007
with mCDIT	3%	9%	11%	8%	0.25

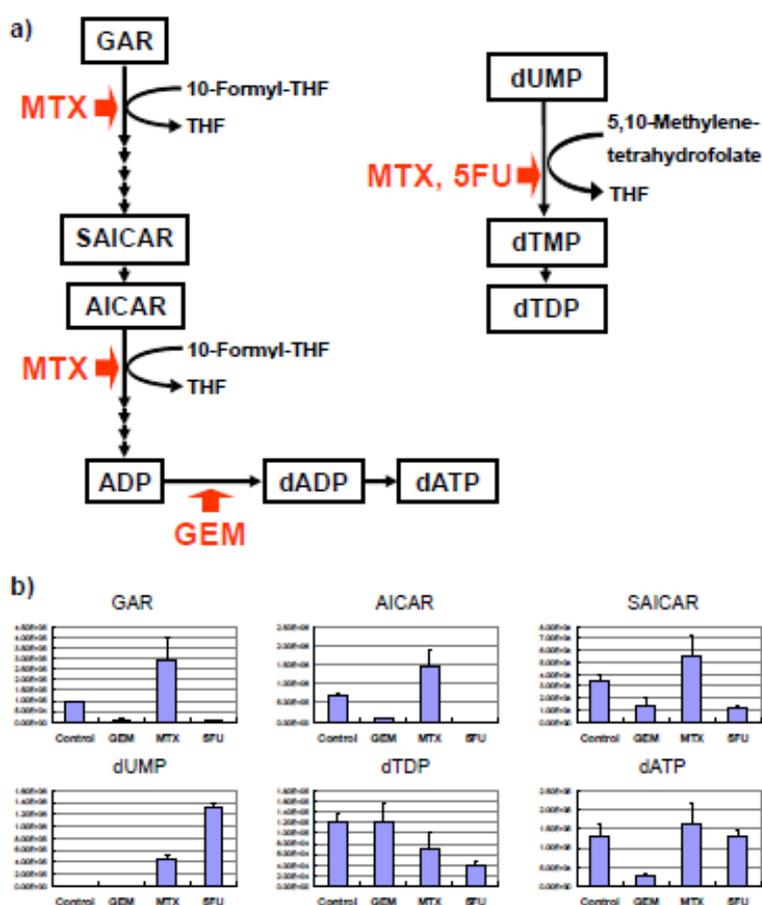
^a CV (%) was obtained from data of 10 consecutive measurements.
^b *t* test analysis of two data groups (*n* = 3) obtained before and after continuous measurement overnight. The same samples were repeatedly analyzed.

次にこの手法が実際の創薬研究現場で役に立つのか確認実験を行った。まず生体内の負イオンを有する極性代謝物のうち主たるアニオン体はカルボン酸を有する有機酸類であり、これらは通常誘導体化により GC/MS で測定している。もう一つの主な負イオンを有する極性代謝物としてリン酸化代謝物がある。これは、生体維持において極めて多様かつ重要な働きを担っており、リン酸化代謝物の挙動を測定することにより生命現象の一端を明らかにすることが期待できる。しかし、一般にリン酸化代謝物は GC 分析に不向きである。そこで Targeted metabolomics として対象をリン酸化合物に絞り、LC-MS によるリン酸化合物の微量・高感度分析を行った。高極性リン酸化代謝物を測定対象としているため、HPLC には既に使用例がある HILIC/WAX ミックスモードでの分離を、検出にはネガティブモードのエレクトロスプレー質量分析 (ESI-MS) を選択した。また標的分子をリン酸化代謝物に限定していることから、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を用いることにした。この MRM 法は Full Scan に比べ感度、定量性ともに優れている。測定条件にもよるが、MRM 分析は Full Scan と比べるとおよそ 100 倍も S/N 比が向上する。またリン

酸基を有する化合物はネガティブモードにおいて m/z 79 および m/z 97 のフラグメントイオンを与えることが知られている。このことを利用すると分子量と構造式がわかっているリン酸化代謝物においては、実サンプルが無くとも MSMS スペクトルを予想することにより MRM 条件を組むことができる (拡張的 MRM)。

以上本研究によって、極性代謝物のうち特にリン酸基を含む代謝物に対しナノ LC を用いた感度と精度の優れた分析手法を開発した。そして Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データベースからリン酸化代謝物の構造を抽出し、これら化合物の最適 MRM 条件を予測・設定し、新規に開発した分析手法を実施することで、より網羅的にリン酸化代謝物の変動を高感度でモニターできることを実証した。

(下記図：練習問題 1、Methotorexate (MTX、葉酸代謝拮抗剤)、Fluorouracil (5FU、ピリミジン代謝拮抗剤)、Gemcitabin (GEM、シチジン系代謝阻害剤)をもちいた細胞内代謝系の変動解析)

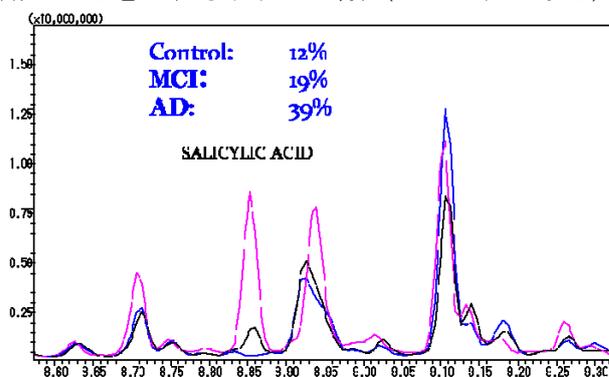


Methotorexate (MTX、葉酸代謝拮抗剤)、Fluorouracil (5FU、ピリミジン代謝拮抗剤)、および Gemcitabin (GEM、シチジン系代謝阻害剤)によって、その作用点の上流にある代謝物の蓄積が認められると同時に、下流にある代謝物が減少した。

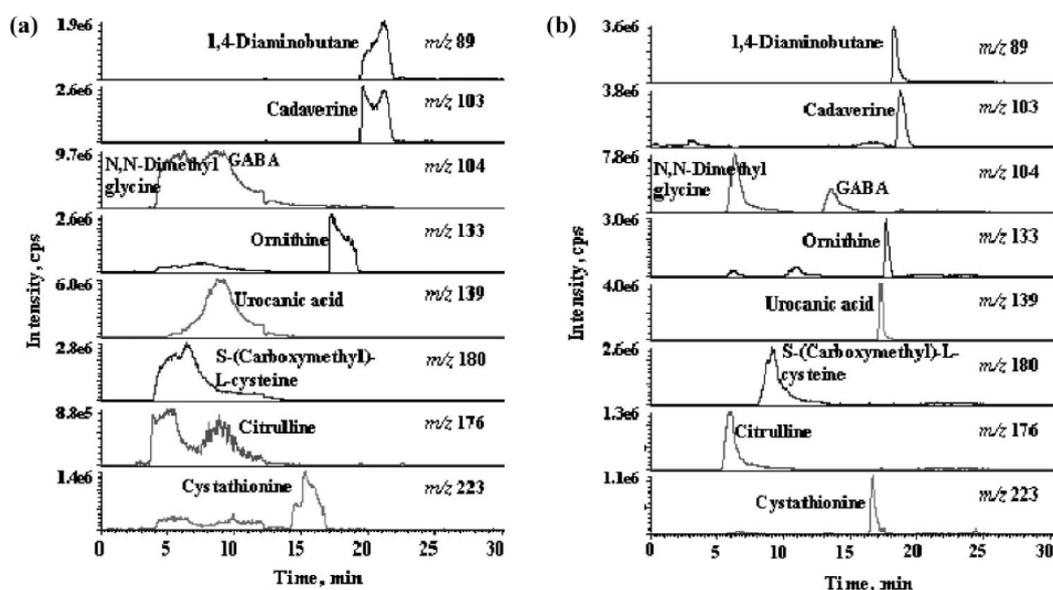
4.1-2) Quantitative Untargeted Metabolome Analysis

不特定多数の内源性代謝物を網羅的に解析する手法は、おそらく GC/MS 法が最初であろう。ブチルエステル化反応など適当な誘導体化反応を実施することで多数の代謝物を分析できる。GC/MS 法は非常に安定した完成度の高い手法であり、イオン化法として EI 法を用いて得られた MS スペクトルについてはデータベース化されており (NIST など市販品)、同定作業も自動化されている。CE/MS による網羅的解析も実施されているデータを見る限

り大変魅力的であるが普及するに至っていない手法である。(下記図：アルツハイマー病患者、軽度認知症患者、健常高齢者の血漿 188 名分について、完成度が高い手法である GC/MS 分析を行なったところ、アルツハイマー病患者血漿に比較的多く見られるピークがあった。これについて同定を行なったところ、内在性の代謝物ではなく、鎮痛・抗炎症剤として服用したと思われるサリチル酸 (アスピリンなど) のピークであった。)

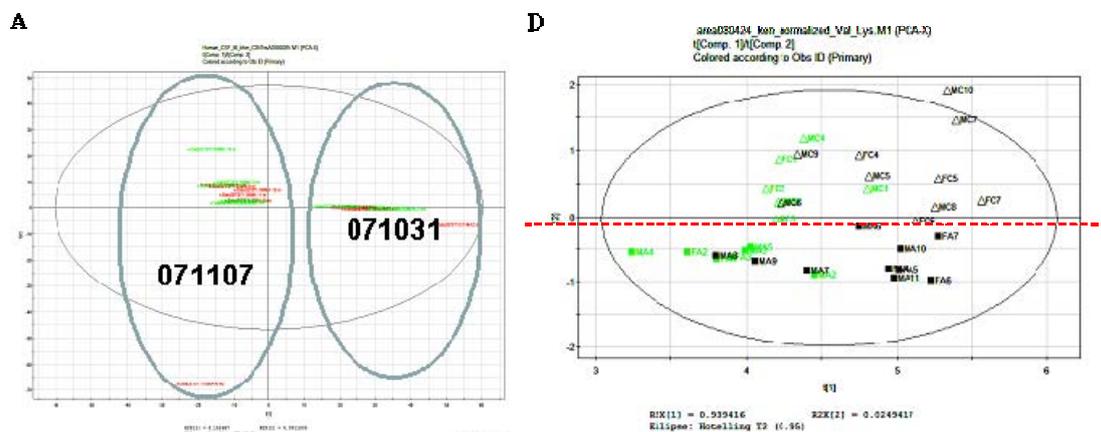


LC/MS についてはプロテオミクス分野で網羅的解析が広く実施されていて、メタボロミクス分野でも脂溶性代謝物や中極性代謝物については網羅的解析が実施されるようになってきている。しかし高極性代謝物になると LC/MS による網羅的解析例は多くない。我々はおもっても汎用され扱いやすい C18 など逆相系カラムを種々 (およそ 50 種類の HPLC カラム) 検討したが、いずれの条件においても高極性代謝物はほとんど保持されなかった。しかし逆相モードとイオン交換モードを兼ね備えたカラムを用いて、さらにキャピラリー内壁をポリエチレングリコールでコーティングすることでピーク形状が劇的に改善した。その結果、高極性代謝物を十分に保持することが可能になり、イオン化の妨げとなるフロースルー画分から分離できただけでなく、有機溶媒量が多い移動相を利用できることでナノスプレーの安定化にもつながった。(下記左は内壁処理なし、下記右:内壁処理することでピークが非常に鋭くなった)

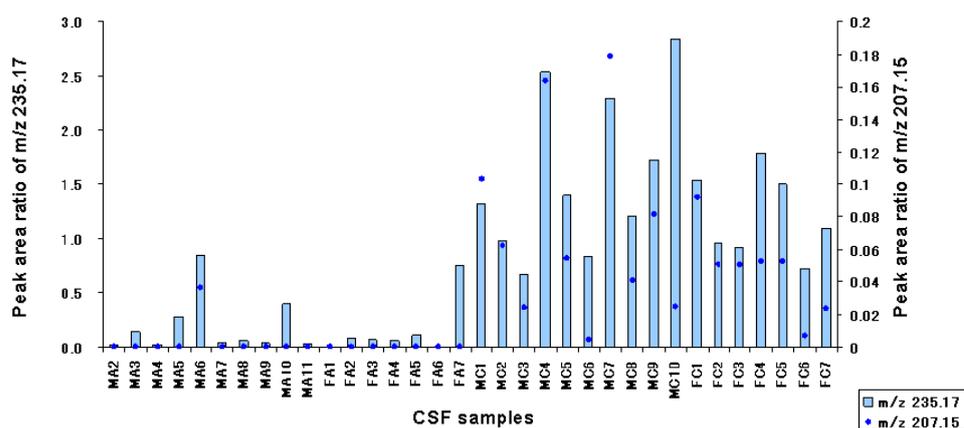


次に我々は 2 種類の内部標準物質を添加して定量性を確保しつつ、実用的な手法を確立し、それをアルツハイマー病診断マーカー探索に応用し、新たなマーカー候補を見出し

た。(下記左：内部標準物質による補正がない場合は病気の有無ではなく測定日の違いによって結果が分かれる。下記右：適切な内部標準物質を選択して補正することによって、通常老人（赤線上）とアルツハイマー病患者（赤線下）を区別することが可能）



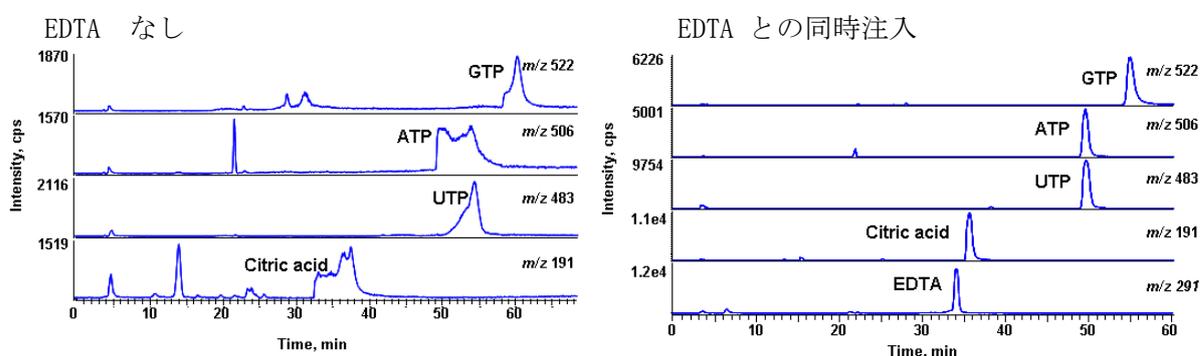
(下記図：アルツハイマー病患者および正常高齢者の脳脊髄液について、今回確立した手法を用いて、それぞれ 17 名分について測定した結果、下記のように 2 種類のピークがアルツハイマー病患者の脳脊髄液で激減していることが分かった。)



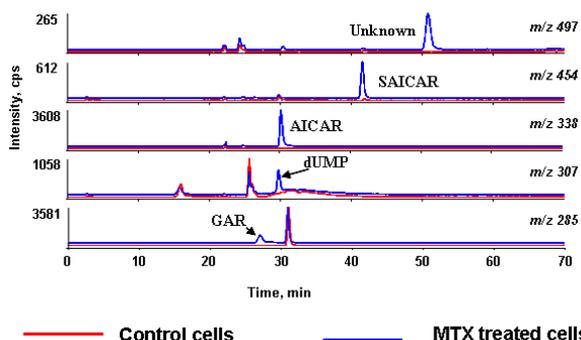
MA - male Alzheimer's disease **FA - female Alzheimer's disease**
MC - male control **FC - female control**

我々はこの現象についてさらに検討を進め、上記のごとく脳脊髄液の極性代謝物分析の結果からで優位に減少しているこのピークが、統合失調症では変動しない事を確認し同定することに成功した。この物質は驚くべきことに内在性物質ではなく、脳脊髄液を採取する際に使う局所麻酔剤リドカインであった。これは古くから使われている麻酔薬であり、我々が関わっている施設では、アメリカ、ヨーロッパ、日本の全てでリドカインを使用していた。また当然のことではあるが、AD 患者に対してのみ投与量が少ないことはなく施設内で決められたプロトコールに従って採取されている。このリドカインを脳脊髄液とインキュベーションすると AD 患者の脳液髄液中では著しく残存量が減少することがわかった。よってこのリドカイン減少の理由は酵素などによって別の物質へ分解されるのではなく、アルツハイマー病患者さんの脳脊髄液中に多く含まれるタンパク質への結合が増していくためであると推定された。そこで我々は、この結合タンパク質を同定するために、リドカインを合成し、ただしリドカインのどの部分が未知タンパク質との結合に必須なのか不明であったことから、二種類のリドカイン誘導体を合成してアフィニティーカラムに結合させた。そこに脳脊髄液を添加し、インキュベート後にアルツハイマー病患者の脳脊髄液中で多く結合したタンパク質の同定を行った。まだ再現性を確認していないが、幾つか候補タンパク質を見つける事に成功した。

生体試料中の高感度で広範な代謝物の分析法確立を目的として、上述の陽イオン性代謝物の分析手法に加えてナノ LC を利用した陰イオン性代謝物に最適な分析法を検討した。ヌクレオチドやクエン酸など複数の陰イオン電荷部位を有する非常に高い極性を有する代謝物を保持させる為に、親水性相互作用モードと陰イオン交換モードのミックスモードのカラムが適している事を見出し、更にはカラム樹脂としてポリマー系の樹脂を使用することで、広い pH 範囲でのカラム安定性と分析再現性を向上させた。更には試料中に金属イオンとの錯体を形成するエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を混合させることで、ピーク形状が安定的に改善する事を見出した(下図左: EDTA 無しでは GTP, ATP, UTP, などのポリリン酸化代謝物やクエン酸など複数の解離基を持つ酸性代謝物の分離状態が悪かった。下図右: そこでサンプルに EDTA を混合し LC/MS に同時注入する事で、これら代謝物のピーク形状が劇的に改善した。)



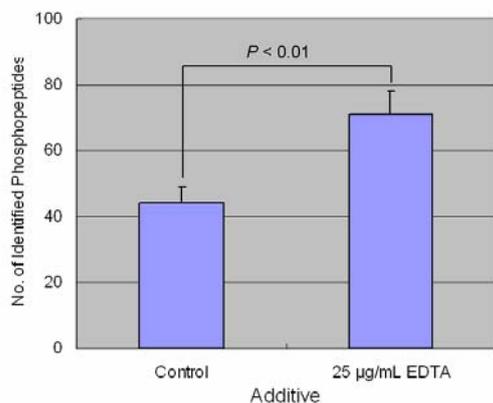
更に新たに確立したこの untargeted metabolome 分析法で、古くより作用機序解析が分っているメトトレキサート(MTX)の MOA 分析を HeLa 細胞にて実施した。予想通りの代謝物群の変動を的確に捉える事が出来たと同時に、測定データを精査する事によりこれまで報告されていない m/z 497 のピークが MTX 作用サンプルにて有意に上昇している事を見いだした(下図)。



MS/MS 解析の結果、この代謝物はメチル化 uridine 5'-triphosphate であると推定された。このように我々は、新たに確立した untargeted metabolome 分析法を利用する事で、これまで報告例のない新たな内在性代謝物が生じる事を見だし、MTX の新たな作用機序を示すことができた。

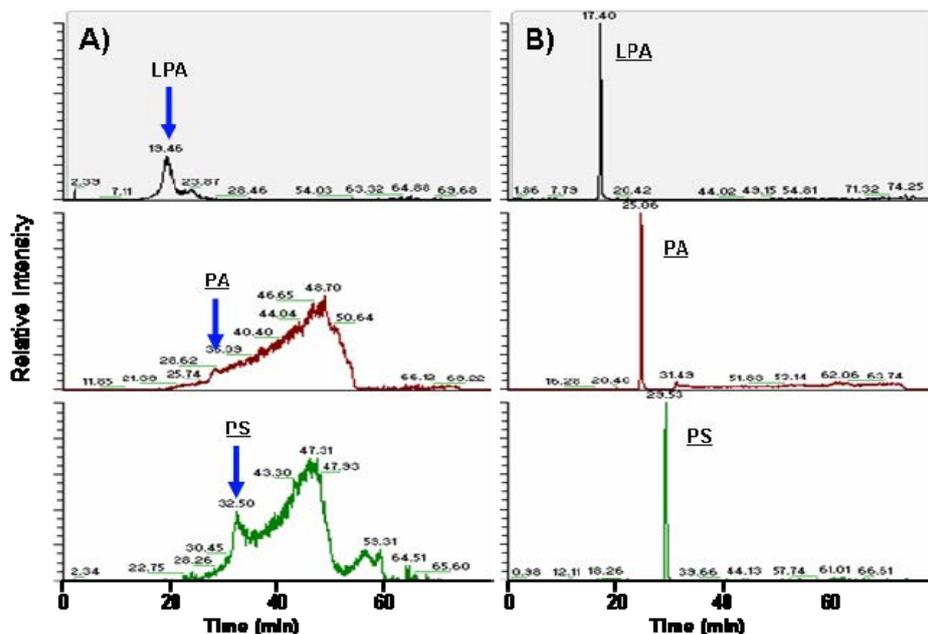
メタボローム解析法の開発に先んじてプロテオーム解析法の開発が進められている事から、両者の技術を融合する事でより効率の良い技術開発を進めるのが本研究の戦略であるが、メタボロミクス解析法の過程で見出された EDTA の試料中への混合が、プロテオミクス解析、なかでもリン酸化プロテオミクス解析にも有効な手段である事を見いだした(下記

図:EDTA をサンプルと同時に LC/MS に注入する事でリン酸化ペプチドの同定数が増加した)。



データ解析によりリン酸化ペプチド断片の LC/MS 分析においては、EDTA の混合はピーク形状には影響せず、恐らく分析における妨害物であるリン酸化されていないペプチドのイオン化効率を減じる効果によって相対的にリン酸化ペプチドの感度上昇が認められたと推定された。新たに開発されたこの手法にてマウス脳、ヒト血漿およびヒト脳脊髄液のリン酸化プロテオームおよび網羅的プロテオーム解析を試みたところ、マウス脳にて同定された全タンパク質のうち 20~25% のタンパク質がリン酸化タンパク質としても同定された。この結果は従来報告されている数値と一致しており、このことより従来困難といわれたリン酸化プロテオーム解析が、新たに開発された手法によってより実際の生体の状態を反映した結果を示す事が可能になった事が示唆された。更にアルツハイマー病 (AD) モデルマウス脳に加齢に伴うリン酸化タンパク質の量的変動を測定し、AD との関連が報告されている幾つかのリン酸化タンパク質のリン酸化状態の変動をモニターする事に成功した。

上述のごとく我々はこれまで、メタボローム解析法として極性化合物の測定にフォーカスしてきた。更に分析可能な代謝物を増やす事を目的として脂質成分の分析に有効な分析系の確立を進めた。生体内脂質分析は構造の多様性から逆相モード、あるいは順相吸着モードの各カラム単独使用では分離不十分であり、微量化合物の検出及び変動を観測することが困難である。そこで我々は、新たに固相抽出カートリッジにてスループット良くサブクラス分離を事前に行う方法を確立した。更に、分析システム中の金属への非特異的吸着によるテーリングを改善することを目的とし、EDTA 溶液等を使用することで、目的成分のピーク形状が劇的に改善することを明らかにした。(下図: カラムを EDTA にてプレ洗浄すると (B) ピーク形状が劇的にシャープになった)



次いで、本法の有用性を明らかにするために、ラット肝臓中のリン脂質の網羅的解析を実施した。その結果、従来の方法に比べてより多くの酸性リン脂質を同定可能であることが明らかになり、本法の有用性が示された（下表）。本法については文献6にて公表。

Molecular Species	Retention Time	Observed m/z	Theoretical m/z	Δ (ppm) ^{a)}	CV (%) ^{b)}	Previous Method	Molecular Species	Retention Time	Observed m/z	Theoretical m/z	Δ (ppm)	CV (%)	Previous Method	
PS	34:2	28.2	758.4983	758.4972	1.5	0.7	PA	32:0	32.0	647.4657	647.4652	0.8	5.4	
PS	36:5	26.1	780.4837	780.4815	2.8	4.7	PA	32:1	29.0	645.4502	645.4495	1.1	0.2	
PS	36:4	27.7	782.4977	782.4972	0.7	0.4	PA	32:2	26.8	643.4349	643.4339	1.6	4.6	
PS	36:3	29.4	784.5145	784.5128	2.1	1.4	PA	32:3	24.7	641.4201	641.4182	3.0	7.8	
PS	36:2	31.6	786.5298	786.5285	1.7	0.8	PA	34:0	36.5	675.4982	675.4965	2.5	3.0	
PS	36:1	34.6	788.5457	788.5442	2.0	0.4	PA	34:1	32.4	673.4814	673.4808	0.9	1.7	i.d.
PS	38:6	27.1	806.4987	806.4972	1.9	0.6	PA	34:2	29.7	671.4661	671.4652	1.4	0.2	
PS	38:5	28.0	808.5143	808.5128	1.8	1.7	PA	34:3	27.1	669.4504	669.4495	1.3	3.5	
PS	38:4	31.0	810.5292	810.5285	0.9	0.6	PA	34:4	26.4	667.4358	667.4338	2.9	5.9	
		34.9	810.5273	810.5285	-1.4	0.6								
PS	38:3	32.7	812.5448	812.5441	0.8	3.2	PA	36:1	37.0	701.5140	701.5121	2.7	0.1	
PS	38:2	35.2	814.5604	814.5598	0.7	1.5	PA	36:2	33.0	699.4975	699.4965	1.5	8.4	
PS	38:1	38.9	816.5771	816.5755	2.0	4.7			33.7	699.4976	699.4965	1.6	4.3	
PS	40:7	27.3	832.5143	832.5128	1.8	1.7	PA	36:3	29.8	697.4813	697.4808	0.7	1.9	
PS	40:5	31.4	836.5439	836.5441	-0.3	0.3	PA	36:4	29.4	695.4673	695.4651	3.1	0.9	
		32.8	836.5441	836.5441	0.0	1.1	PA	38:1	41.4	729.5451	729.5434	2.3	2.2	
PS	40:4	34.0	838.5602	838.5598	0.5	0.1	PA	38:2	37.6	727.5293	727.5278	2.1	0.6	
		35.3	838.5605	838.5598	0.9	4.0	PA	38:3	34.9	725.5129	725.5121	1.1	0.0	
PS	40:2	38.9	842.5924	842.5911	1.6	3.8	PA	38:4	33.1	723.4978	723.4964	1.9	1.0	
PS	40:1	43.4	844.6084	844.6068	2.0	10.1	PA	38:5	29.5	721.4817	721.4808	1.3	1.0	
PS	42:4	37.3	866.5923	866.5911	1.4	1.2	PA	40:1	46.0	757.5762	757.5747	2.0	0.6	
PS	42:2	43.1	870.6238	870.6224	1.6	10.4								

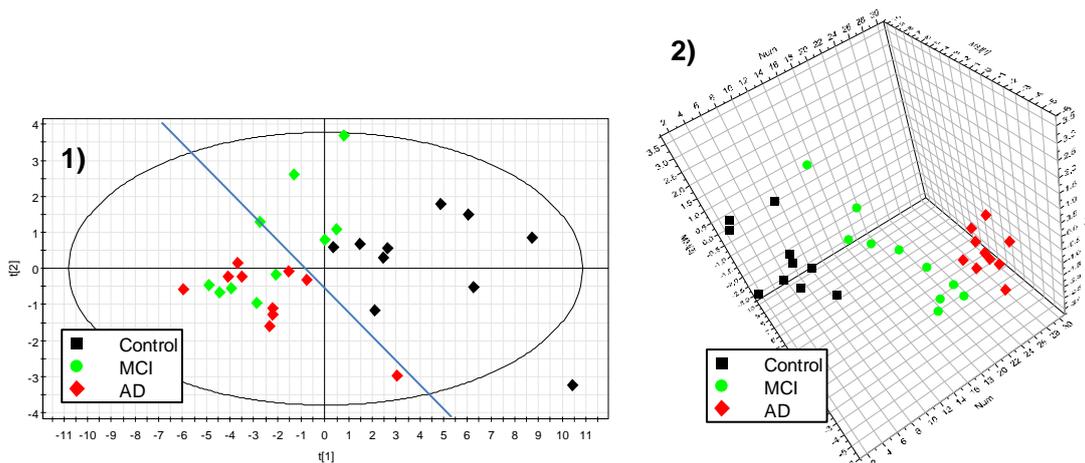
Molecular species of PS and PA detected from fraction 4 in rat liver samples with 2D-phospholipidomics.

a) the difference between theoretical m/z and observed m/z

b) the reproducibility of the peak area (n=3 studies)

c) i.d.: this molecular species were already identified in rat liver with previous method

そこで本手法をアルツハイマー病診断マーカー探索に応用し、新たなマーカー候補を見出した。本知見を論文投稿準備中である。(下図: 主成分分析の結果、コントロール、MCI、AD で明らかにグループが異なる成分があることが判明した)



(2)研究成果の今後期待される効果

LCMS 機器は CE などに比べて様々な研究機関で広く使用されている装置である。我々の開発した方法は非常に高感度かつ再現性が高いため、生物の分子システムを解き明かすツールとして様々な研究に応用可能されることが期待できる。また我々はこの方法をバイオマーカー探索およびバリデーション研究に利用し、そのバイオマーカーを利用して新薬開発のスピードアップを図っていく予定である。

4. 2 定量解析が可能なソフトウェアの開発

(1)研究実施内容及び成果

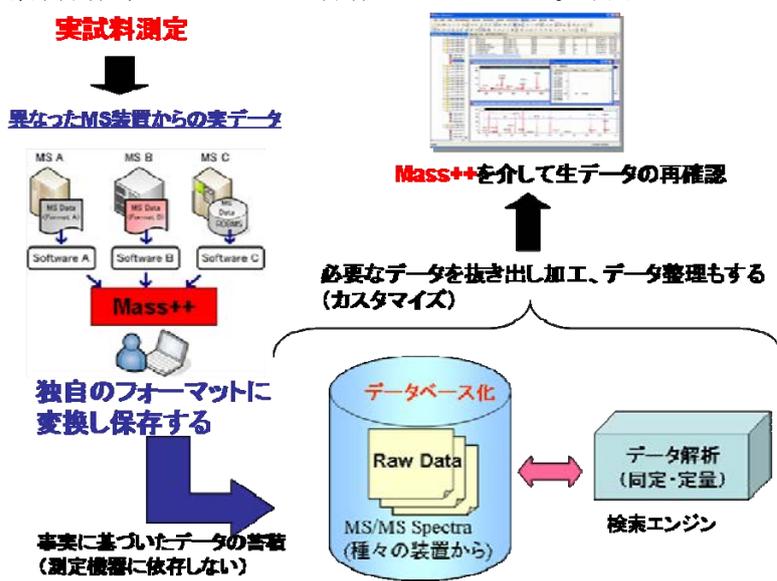
オミクス解析によって得られた膨大なデータについて世界中のバイオインフォマティシャンが新規知見を見出そうと日々格闘している。しかし現在のメタボローム解析で得られる最初の生データは m/z 、ピーク強度、保持 (溶出) 時間の 3 つの情報のみである。Target metabolomics の場合、あらかじめ標的分子が分かっているため、個々の定量値さえわかれば、あまり不自由しない。しかも質量分析計がもっとも普及している薬物動態研究、食品・残留農薬分析の際に汎用しているソフトウェアをそのまま利用できる。もちろん測定に使った質量分析装置に付随しているソフトウェアでのみ読み込み解析できるという制限があり、また自分らの使用目的に最適化しているわけではなく、多くの場合カスタマイズ対応をしてくれない。一方で Untargeted metabolomics の場合、質量分析装置が生み出す膨大なデータからいかにして自分らが必要な情報を正確かつ自動的に拾い出すかということがポイントとなる。しかしながら例えば測定時間 1 時間の LC/MS データの中のどのピークがどの程度変化し、それがどのような構造のものか応えてくれる完成度の高いソフトウェアはない。質量分析計を使った網羅的解析という点では先行しているプロテオミクスにおいても、LC/MS データについて同定まで自動的に行ってくれるソフトウェアはあるものの (ただし入力可能なデータ形式は限られている)、定量まで自動的に行って自分らにとって必要な情報を、自分らが扱いやすいデータ形式として自動出力してくれる完成度の高いソフトウェアはない。おまけに質量分析装置に付随しているソフトウェアは通常 1 つの装置に 1 ライセンスである。複数の人がデータ解析をするためには複数のライセンスを購入しなければならない。

4.2-1) 質量分析解析用ユニバーサルソフトウェア Mass++の開発

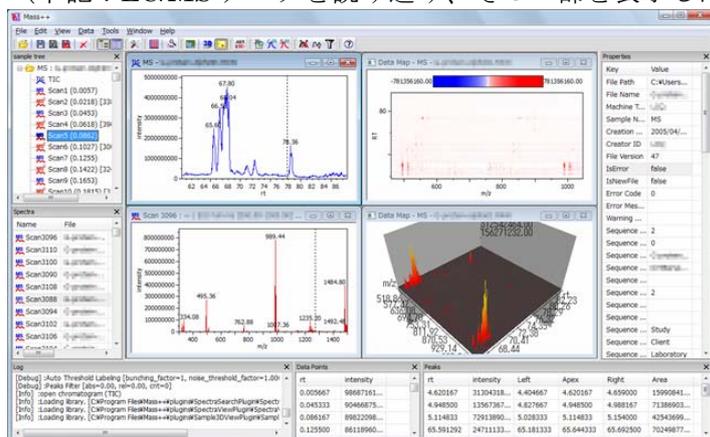
開発開始に先立ち、まず我々は日本国内の弁護士・弁理士、さらにはカリフォルニア州の弁護士とも相談し、その上で各質量分析装置メーカーの担当者と個々に話し合いを持ち、お互いに Win-Win の関係となりうることを確認してソフトウェアの開発に着手した。また開発に当たって我々はこのソフトウェアを広く普及させたいという思いから無償公開を基

本としつつ、質量分析装置メーカーにとっても不都合がなく、守秘義務など契約書を取り交わすことなく開発が進められるよう留意した。

質量分析装置があれば必ずメーカー付随のソフトウェアがある。このソフトウェアがインストールされているコンピュータ内でメーカー付随ソフトウェアの機能を利用しながら、データを Mass++ に読み込ませる。必要があれば Mass++ 独自のデータ形式に変換する。Mass++ がインストールされている PC であれば、どこでもライセンスを気にすることなく解析できる。Mass++ は質量分析データを解析するためのソフトウェアであるので、スペクトルデータやクロマトグラムデータを正確に表示することができ、そこから利用者が必要な情報のみを抽出したり、加工したりできるソフトウェアである。複数の異なった質量分析装置から得られたデータであっても同時に表示させたり解析させたりできる。現在は質量分析主要 4 メーカー (Applied Biosystems、Thermo Fisher、Waters、島津) のデータ解析が可能である。さらに mzXML, mzML 形式に対して入出力が可能である。開発環境として、使用言語は原則 C/C++、使用ライブラリとしては STL(標準ライブラリ string, vector など)、boost(次期標準ライブラリ bind など)、wxWidgets(GUI ライブラリ)、zlib(圧縮・解凍操作)、xerces(XML 操作)を用いている。(下図 : Mass++ の役割概念図)

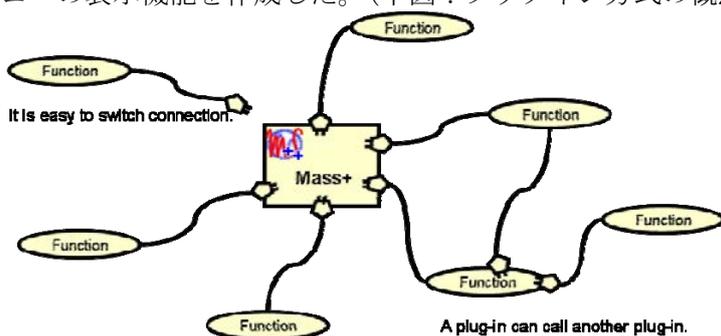


(下記 : LC/MS データを読み込み、その一部を表示した図)

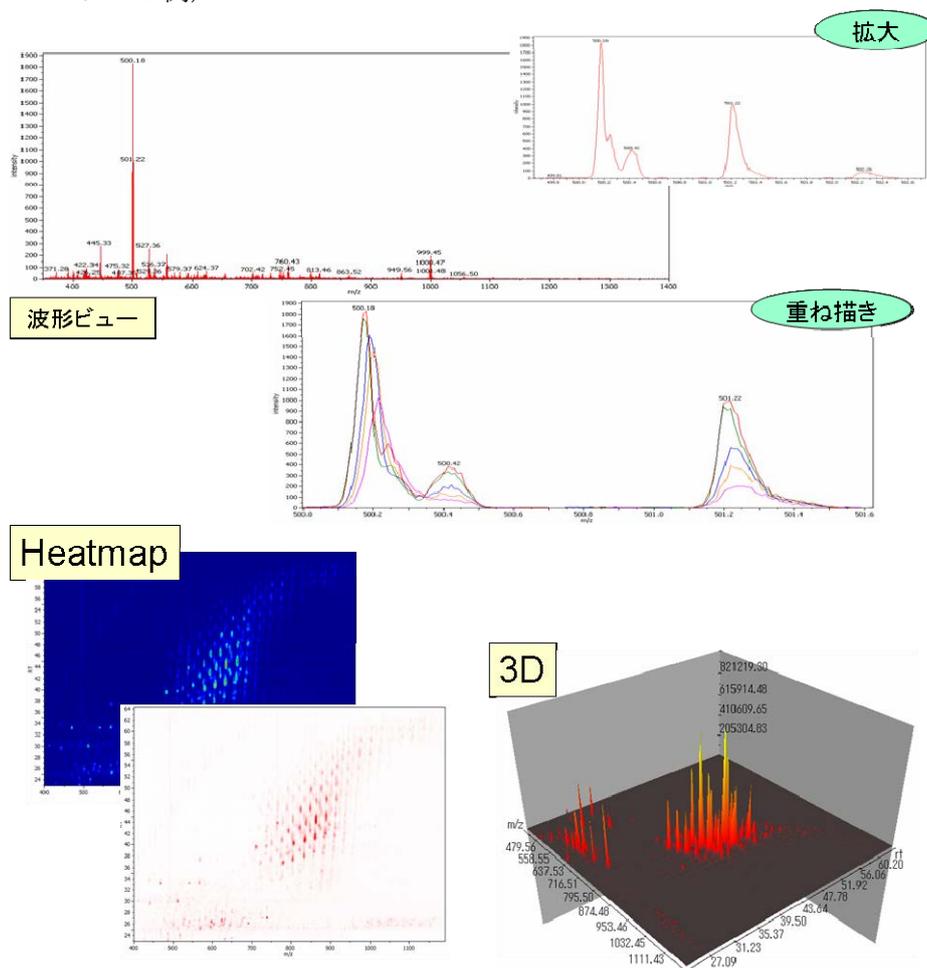


Mass++ はプラグイン方式なので各ユーザーが必要な機能を追加したり、不要な機能を削除して動作性を速くしたりすることができる。プラグインの構成ファイルは、まず

プラグイン情報は XML 形式として、関数名・メニュー情報などを記述し、動的リンクライブラリ (dll) やリソース (アイコン画像など) を使う。XML によりプラグイン情報取得するが dll は必要になるまで読み込まない。このプラグインは、C++/CLI で基本データクラスのラッパー・クラスを作成するが、Visual Basic や、Visual C#、Visual J++ でもプラグイン開発可能である。基本ライブラリーとしては CoreFunctions (基本的な関数 [C])、CoreToolkits (基本的なクラス [C++])、DataObjects (基本的なデータ)、AlgorithmTools (アルゴリズム関連)、ImageManager (描画関連)、WindowManager (GUI 関連)、XMLTools (XML 関連)、CLRManager (多言語対応の為のラッパー) の 8 つがある。データの表示についても、生データ全体の概形を表示するのにこれまで 3 次元ビューが存在しているが、これに加え縦軸に保持時間、横軸に m/z、色や濃淡で Intensity を表示したヒートマップビューの表示機能を作成した。(下図：プラグイン方式の概念図)

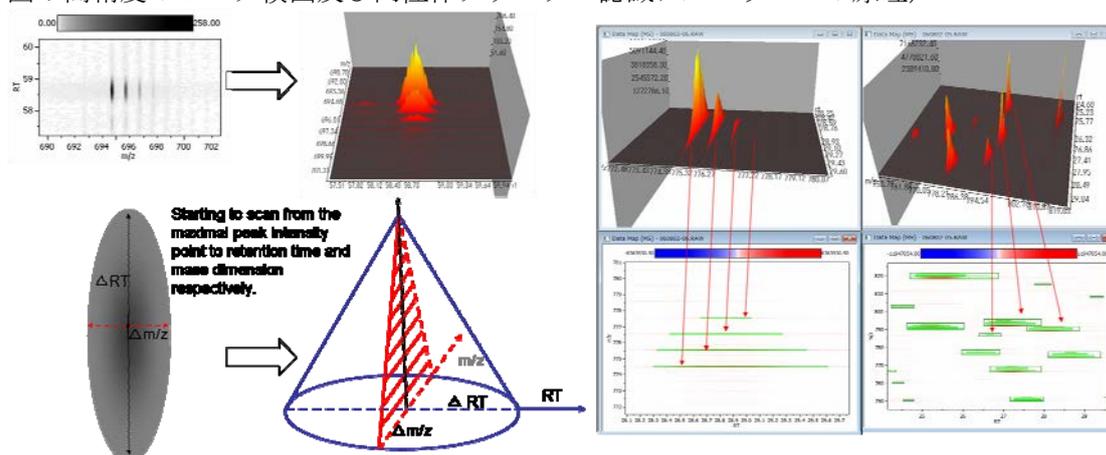


(下図：ビューワの例)



ヒートマップビューより範囲を選択して拡大・縮小を行なう事ができるが この際 3D ビューも連動して拡大・縮小が行なわれる。またピーク検出についても数種類のアルゴリズムを用意した。(下記図：我々が開発したアルゴリズムでは m/z 軸と強度軸、保持時間軸の3つの軸を使って3次元的にピーク検出を行う。そして一度ピーク検出した後、 m/z 軸にそってスキャンし、 m/z の値及びピーク強度の両方面を総合的に考慮し、クラスター認識も同時に行っている。)

これまで、LC/MS ピーク検出に関する研究は数多く報告されている。その多くは保持時間単位 (スキャン毎)、もしくは m/z 単位でピークを検出する方法である。これらの方法の利点は、ピーク検出のスピードが速いことである。しかし、このような時間単位もしくは m/z 単位のどちらか一方でのみピーク検出を行う場合、データ全体を見渡すことができないため、同じ分子由来のピークが分断されて複数のピークであるかのように扱われることが多々ある。我々はこの問題を解決するために、LC/MS の特徴を3次元的にとらえ、これまでにない高精度のピーク検出及び同位体クラスター認識アルゴリズムを開発した。次に LC/MS を利用した分析では実験毎に保持時間や m/z がズレることが知られている。このようなデータの補正手法として我々は LS/MS データの3次元的な特徴を積極的に利用すべきと考えて、アラインメントも3次元上に行うことをおそらく世界で初めて考案した。これらもプラグイン形式であるのでユーザーが必要に応じて機能の追加や削除が出来る。(下図：高精度のピーク検出及び同位体クラスター認識アルゴリズムの原理)



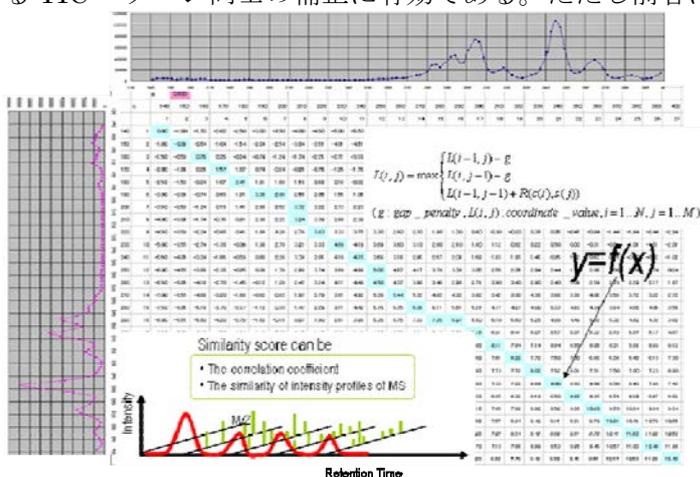
操作マニュアル記述にも力を入れ、簡易ユーザーズマニュアル、クイックマニュアル (Differential 解析、MassBank 連携) を作成し、2009 年度よりホームページの公開 (<http://masspp.jp/>) および情報提供を開始した。また このホームページはアクセス・ログを取っているが 2009 年 6 月の公開以来の Mass++ の総ダウンロード数は 2046 件、操作マニュアルのダウンロード数は 2193 件 である(2010 年 8 月 30 日現在)。 またこれまでに Windows 版のみで公開されていた Mass++ を UNIX に移植した。但し、インストーラがソース・コードを含んでおり公開するには Mass++ をオープンソースにする必要がある為まだ公開には至っていない。

4.2-2) 内部標準物質を利用しない定量解析ソフトウェアの開発

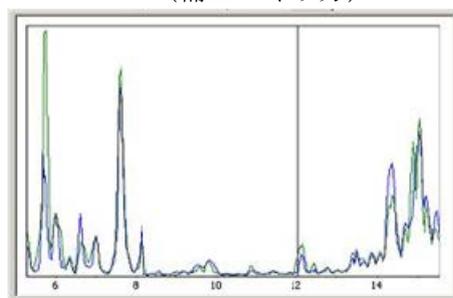
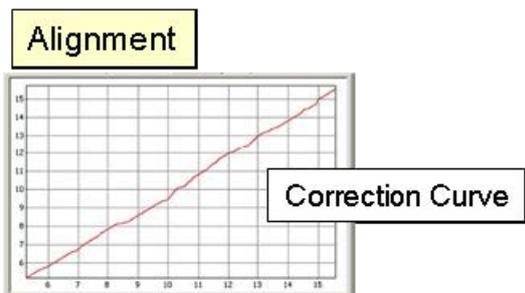
上記に記載したように今回開発したピーク検出法によって種々の MS メーカー機器から得られたより LC/MS 生データを解析した結果、われわれのアルゴリズムは非常にノイズが多いデータでも正確にピーク検出を行うことが可能であることがわかった。これによって同位体クラスターを容易に認識できるようになった。LC/MS を利用した分析では実験毎に保持時間や m/z がズレることが知られている。その原因は、機械の安定性のほか、分離

カラムの劣化や移動相組成の僅かな変化、温度などの揺らぎのためである考えられる。一般的には、あらかじめ内部標準物質を入れたウェット実験による補正する方法と、コンピュータプログラム（アルゴリズム）によるドライ的な補正方法との2つに大分類される。後者のアルゴリズムによる補正手法として線形と非線形関数（たとえば多項式）による補正法があるが、どちらも長短があり、すべてのデータに適用できる手法ではないといっても過言ではない。我々はLS/MSデータの3次元的な特徴を積極的に利用すべきと考えて、アライメントも3次元上に行うことをおそらく世界で初めて考案した。3次元アライメントアルゴリズムでは、2つのステップからなる。まず1) ダイナミックプログラミング (DP) アルゴリズムを利用した2次元上 TIC (Total Ion Chromatogram) スペクトルのアライメントによる保持時間ずれの補正。2) m/z 軸とピーク形状を考慮した3次元アライメントによるピーク形状レベルでの補正、の2段階補正である。Mass++では最初に特定の m/z を指定してクロマトグラムを取得し、そのピーク位置(保持時間)と面積を取得するプラグインを装備した。このピーク情報は異なるサンプル間で比較する事ができる。また m/z の指定は自動で行なう事ができ、MRM, SIM, Precursor といった手法を選択する事ができる。続いて異なる生データ間の保持時間のずれの補正を行なうための機能も追加した。

(下記図：LC/MS や GC/MS 測定間のズレを補正するためのアルゴリズム：まず、2本の TIC スペクトル（横と縦）をそれぞれ等分割して、相関係数を計算する。得られた値をそれぞれの升目にいれ、マトリックススコアを計算する。そして、トレースバックを行い、横と縦の2本 TIC スペクトルの相関関数はトレースバックした軌跡を用いて算出される。この相関係数について我々は2種類のアルゴリズムを開発した。1つ目は、単純に TIC ピーク形状の相関係数である。これは、薬剤投与前後に見られるような TIC スペクトルが非常に似ている場合の補正に有効で、計算スピードも速い。もう一つは MS プロファイルパターンによる相関係数の算出である。この手法は異なる組織や種間の比較のように異なる TIC パターン同士の補正に有効である。ただし前者に比べて若干スピードが落ちる。)



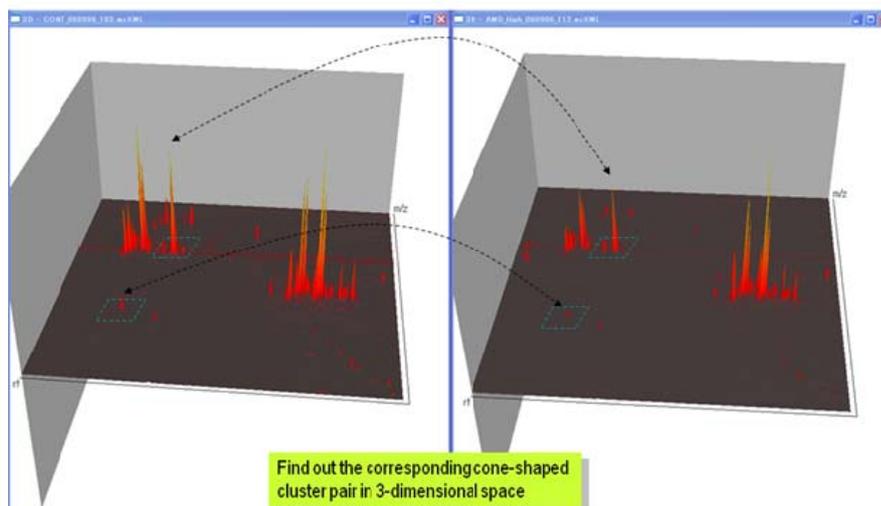
(補正のやり方)



(補正結果)

そして異なる生データをアライメントして保持時間の補正を行なった後、生データ同士

の引き算や割り算、必要に応じて足し算を行なう事ができるようにすることで、2つのサンプル間での違いを見出す機能も開発した。このような各々の演算を行なった後は先に開発したヒートマップビューや、3D ビューにより視覚化を行なう事ができる。このような種々のアルゴリズムがプラグインとなっており、新たなアラインメントアルゴリズムの追加が容易となっている。2次元アラインメントを行った後、さらに我々は3次元上におけるアラインメントを行っている。下記にその原理図を示す。

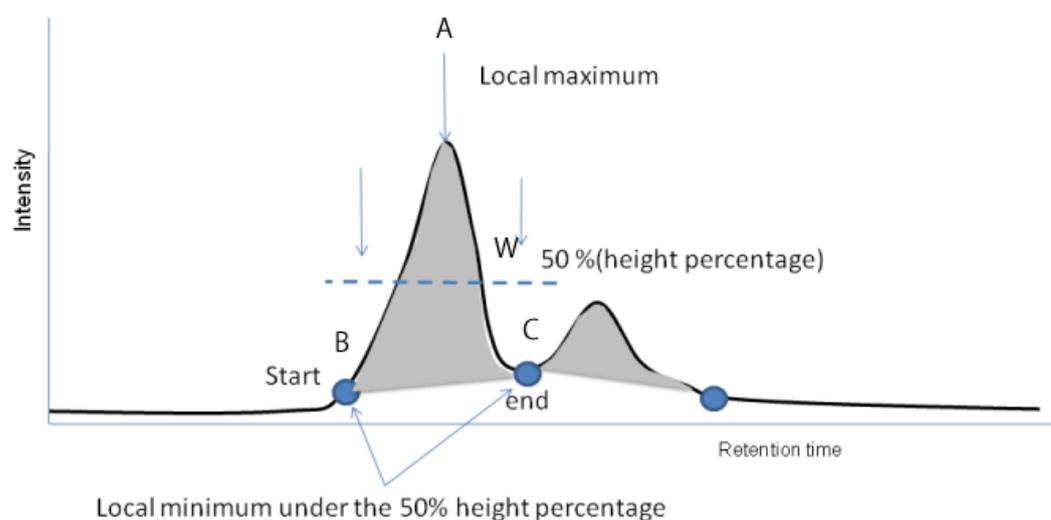


保持時間のずれを補正した後、ピーク強度とピーク形状と合わせて3次元上に補正を行う。上図に示したように、保持時間、ピーク強度及びピーク形状を考慮した補正は、左（Control）と右側（薬剤投与）のカラーコーン同士を立体的に補正することであり、われわれが世界で初めて開発したアルゴリズムである。また、3次元補正の正確さを確かめるため、我々はMass++に3次元ビューも装備した。これまで2次元ヒートマップなどで、LC/MSデータの全体像を可視化する方法はほとんどであったが、我々は3次元立体的表示の方が得られる情報が多く、視覚的にも理解しやすいであると考えて、このようなビューを開発した。

複数同時補正手法に関しては、いくつかの手法が考案されているが、我々はより高い汎用性を指すために、補正基準サンプルのデフォルト値はファーストコントロールにしているが、必要に応じてユーザーが変更できるインターフェースも開発した。全てのサンプルは基準サンプルに対して、3次元補正を行った後、マトリクス各セルに定量値を出力する。市販されている大半のソフトウェアでは、この定量値としてMSピーク強度及びピーク面積を採用しているが、我々はより高精度定量解析を目指すために、MSピーク強度及び面積の他に、Mass Chromatogramのピーク面積も定量値として採用することで、約40%の擬陽性を減らすことができた（目視確認）。これまでのコンピュータによるマーカー探索システムは、一度に数十サンプルまでを解析対象としているものが多い。その理由は、ピーク検出やサンプル間補正を行う際に、全てのピーク情報を一旦メモリ上にロードすることが必要だからである。しかしながら、コンピュータの物理メモリは限られているため、従来方式を採用する限り、より多くのサンプルを一度に解析することが困難である。そこで、我々は従来とは異なる方式を採用してシステム開発を行うことにした。つまり、ピーク情報はメモリ上に持たず、一時ファイル、保持時間の高速インデックス及びピークリストヒープ情報と組み合わせることによって、パフォーマンスと規模を両立することができ、大規模マーカー探索プロジェクトに対応したシステムの開発にも成功した。そして各種パラメータを事前に2次元および3次元ビューを利用して調整して記憶しておくことでサンプル毎に適切なパラメータを瞬間にリロードでき、ワンクリックで解析を行うことを可能にした。

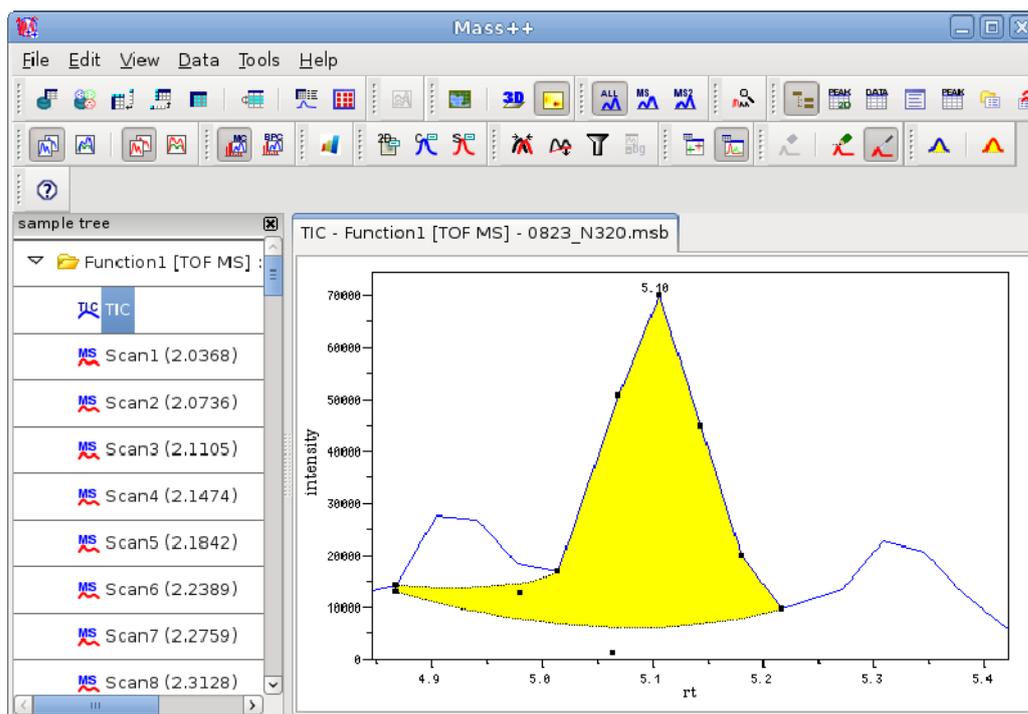
次に定量分析においては保持時間のズレの補正と共に、精度の良いピークピッキングが必須である。クロマトグラム上のピーク面積を積算する方法は古くから薬物動態試験において汎用されている。この手法はプロテオミクスおよびメタボロミクス分野においてもラベルフリーの定量法としていくつかのアルゴリズムが報告されている。しかしながら、サンプルと膨大なピーク数を正確に処理できるものはない。特にここで問題になるのはピークの開始および終了点を検出する事および複数データ間のピークアライメントが難しい事である。我々は上述の高精度ピークアライメントアルゴリズム開発に引き続きピーク形状を認識できるアルゴリズム **LWA** (combination of Local minimum and Weighted Average peak detecting algorithm) を開発した。下図には我々が開発したアルゴリズムの原理を示す。まず、局所最大値原理を利用して、最も高い強度を持つ点 (A) を見つけ、つぎに A の 50% 点 (W) において時間軸に平行した線を引き、左右とも交差があった場合は、A はピークトップ候補として用いる。ピーク面積を計算する場合には、A に対応した開始点と終了点も必要なので、さらに 50% 点 (W) より下の部分に対して再探索し A の両側にある局所最小値を見つける。すると左側の局所最小値 (B) は開始点、右側の局所最小値は終了点 (C) として用いることができる。面積値は開始点 (B)、ピークトップ (A) 及び終了点 (C) の 3 点を用いて計算される。この方法の特徴として、W 点の数値は実験系に応じて調整することが可能であるため、汎用性は高い。たとえば、MC/TIC ピーク割れがあった場合、実験系によっては一つのピークと見なす場合と別々のピークとして扱う場合が考えられる。LWA では前者の場合に対して、W 点の値を小さく (たとえば 30%)、後者の場合に対して W 点の値を大きく (たとえば 80%) 設定することによって適切なピーク検出が可能となっている。さらに、MC/TIC レベルにおけるノイズ由来ピークを判別するためのアルゴリズムやベースライン検出するアルゴリズムを実装し、種々のデータを解析した結果、われわれが開発したツールは有効であることが分かった。

LWA(combination of Local minimum and Weighted Average peak detecting algorithm)



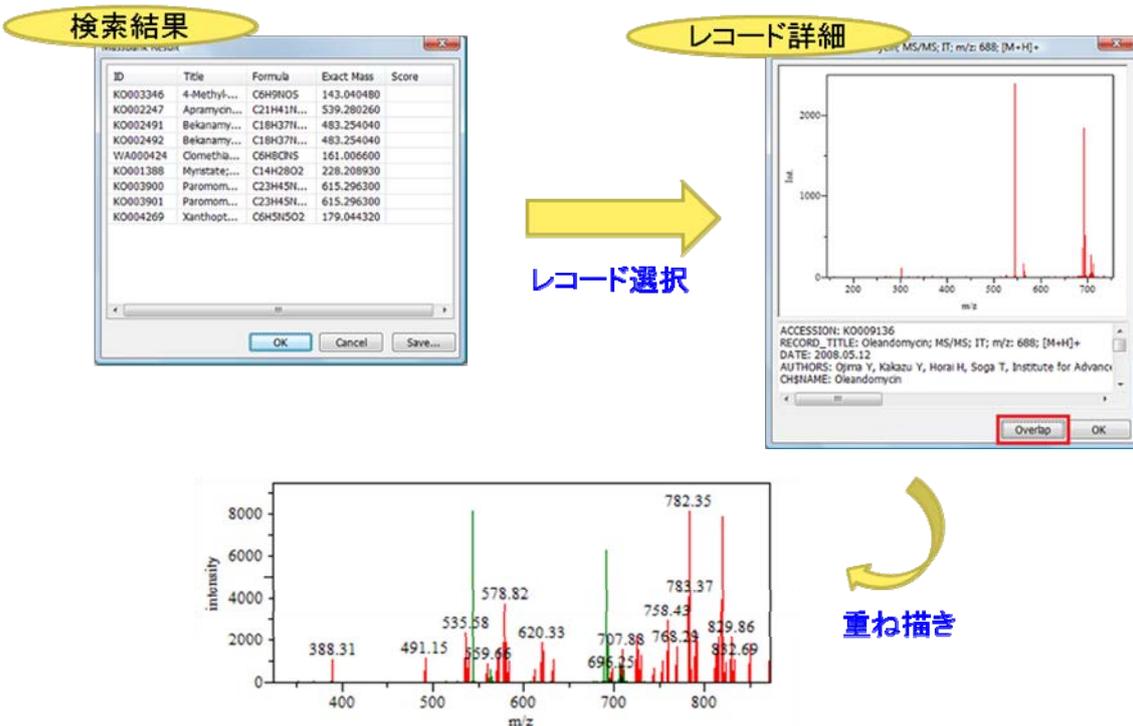
LWA アルゴリズムの原理

また我々はその後学習機能に備えたピーク情報拡張および編集機能を強化し、ピーク情報に制御点を加え、以前に比べて自由な形にピークを編集できる機能も作成した(下図)。さらにユーザーがピークを編集した際、その元の波形のピークの形を学習する機能を作成した。学習結果は逐次データベースに保存することができるだけでなく、異なるユーザーによって編集する際の学習結果をマージすることもできる。このマージされたピーク学習データベースは Mass++ 本体と一緒に公開すれば、世界中の研究者によってピーク編集の学習結果を共有できる。しかし、学習結果を利用したアルゴリズムはまだ試作段階であり、今後特徴量の抽出及び分離器アルゴリズムの開発を継続していく予定である。



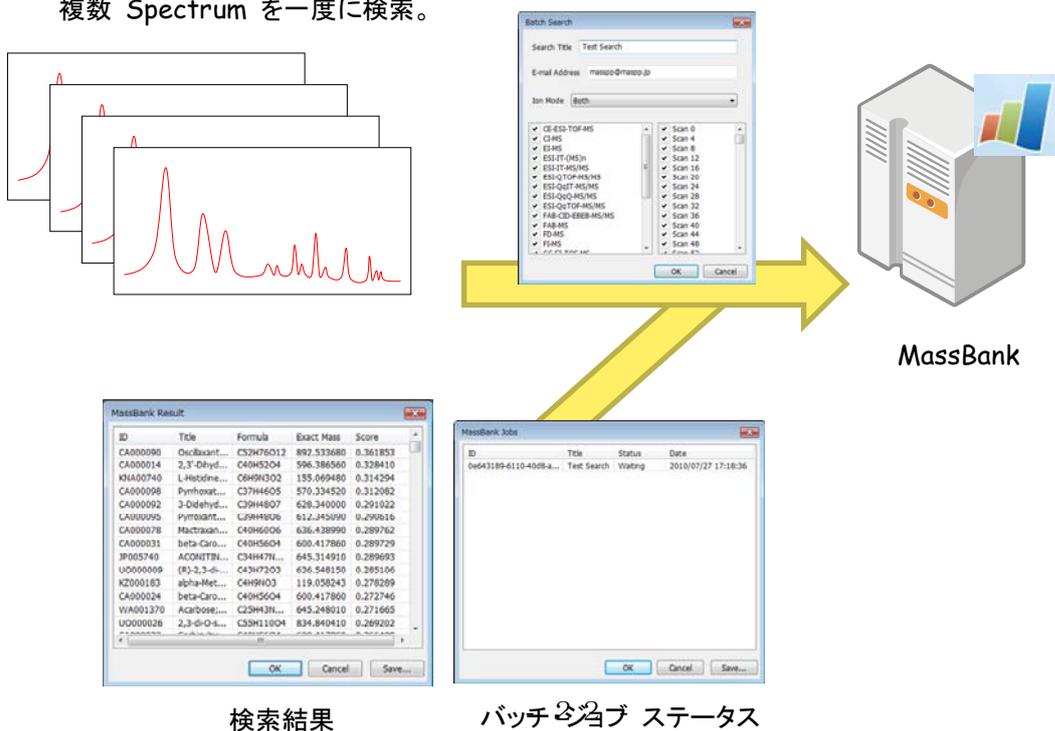
4.2-3) Mass Bank 開発チーム (JST-BIRD プロジェクト) との連携

Mass++の開発を進めていくうち、メタボロームデータベースの構築と無償公開を目指している Mass Bank チームと連携する事でお互い Win-Win の関係になれるとの認識から協力体制を取る事となった。以前から MassBank では登録用のレコードの作成に手間がかかるという問題を抱えていたが、Mass++ ではその支援を行なう機能を実装しレコードの作成を簡単に行なう事ができる仕様にした。また MassBank 開発チームから提供された検索用の API (Application Programming Interface) を利用する事により Mass++ 上から MassBank の検索機能を使用する事ができる仕様にした。この事によりブラウザを介する事なく生データから直接検索が行えるようになった。さらに、この検索結果から得られたピークリストを生データの波形に重ね描きを行なう事もできるので、容易にスペクトルの比較が可能となった (下図)。



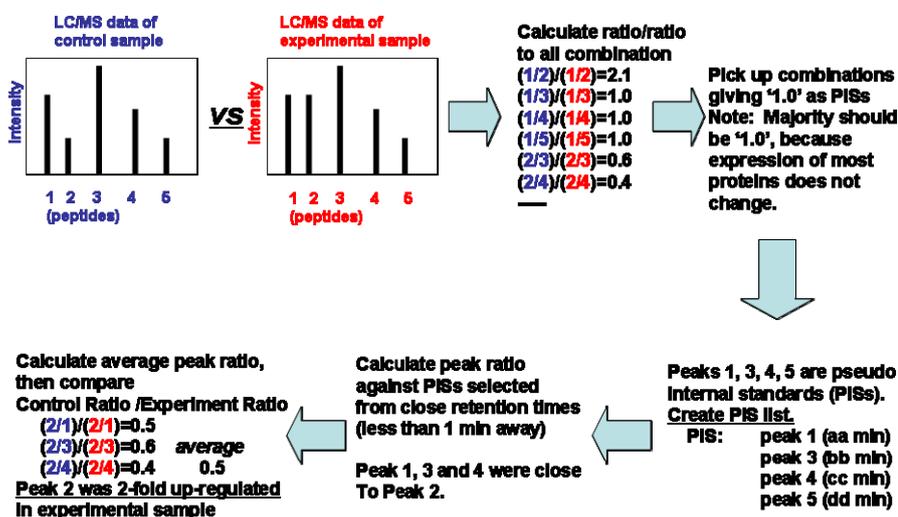
また MassBank では生データから似たスペクトルを検索する際、Spectrum を1つ1つ選んで検索する必要があった。そこで今回 慶応大学が複数の Spectrum を一括検索できる Batch Search の API を開発した事を受け Mass++ 側でも それを利用する機能を作成した。流したバッチ・ジョブは Mass++ 内部のデータベースに保存されており、後から結果を参照する事ができる仕様となった。

複数 Spectrum を一度に検索。



4.2-4) 内部標準物質を使わないセミ定量法の開発

LC/MS を使った網羅的解析から変動幅が比較的大きい分子を見出す探索段階の場合、内部標準物質を使わない簡便な定量法も有効である。しかし先に述べたように質量分析特にナノ LC/MS は再現性を犠牲にして感度を向上させていることからセミ定量としても精度が悪い。ところでこれまでに報告されているオミクスデータや我々が行ってきたデータから、例えば正常と病態の比較において変動する分子は一部であり、多くの分子は変動しない。このことは変動しない分子を疑似内部標準物質とすれば定量値を補正できることを意味している。課題は変動しない分子をどうやって見出すかという点である。ハウスキーピング分子でさえも変動する可能性があることから、まず LC/MS によって網羅的解析データを取得し、各々のピークの強度比を計算する。次に比較するサンプル間で、これらピーク強度比の比を計算する。観測された全てのピークの比を計算し、その値ごとに分布を調べ、もっとも分布が多いところが変動しない分子の集合体である（多くの分子は変動しないため）。これらを疑似内部標準物質とした。そして実際の定量値を算出する際には、目的のピークと HPLC の溶出時間が近い複数の疑似内部標準物質を選び、それぞれ定量値を計算して、それらの平均値を最終値とした。



今回は自動解析ソフトの充実度と我々の開発した疑似内部標準法の確からしきの確認のため、既に種々の定量法が確立されているプロテオームデータを使って仮説の検証を行った。本法は質量分析一般に当てはまることから、自動ソフトウェアが充実さえすればメタボロミクスにも即座に利用できる。

(2)研究成果の今後期待される効果

我々が開発してきた定量ソフトウェアは無償公開を基本とし、質量分析各社のデータを扱う事ができるので、定量的メタボローム解析およびプロテオーム解析を実施する研究機関にとって有益なツールとなると確信している。わかりやすい情報提供、マニュアルの整備によって、より普及し研究速度のスピードアップに貢献できるものと思われる。

4. 3 代謝パスウェイ検索ソフトウェアの開発

(1)研究実施内容及び成果

現在のメタボローム解析では同定定量できる分子の数がごく限られているため、代謝マップのごく一部の分子の動きしか把握できない。しかしトランスクリプトミクスやプロテオミクスと異なり、メタボロミクスでは分子の構造情報、つまり元素数など原子レベルで各分子の因果関係を類推することができる。このように限られた情報を最大限に活かす

ために世界で最もデータが充実していると言われている京都大学のKEGGの情報を使うことになる。しかし現在KEGGが提供している解析ソフトウェアでは間違っ代謝パスウェイを導き出すことも多い。そこで我々はKEGGの情報を利用して、より精度の高い解析ソフトウェア REACH: kegg REAction searCH engine の開発を開始した。例えばKEGGのソフトウェアを使うとグリシンから Phosphoribosyl-glycinamine (GAR)に至るパスウェイ検索をすると、Pathway DB に登録されているごく限られた種類の代謝物情報のみを用いて検索するため、遠回り、かつ現実的でないパスウェイを表示する。そこで我々は、最短のパスウェイを検索することが基本となるように、代謝反応に関わる全低分子を考慮する検索エンジンを設計した。その結果従来のKEGGよりも、メタボローム研究を実施するに当たり、より直感的に理解しやすい現実的なパスウェイを表示する事を可能とした。

(下記：現在のKEGGのソフトウェアによる検索結果)

Result of Path Computation

Organism : Reference pathway (Reaction)
 Initial substrate : C00037 Glycine
 Final product : C03030 5'-Phosphoribosylglycinamide

Glycine → NH₃ → Glutamine → GAR

4 C00037 <R01221> C00014 <R00253> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R03425> C01242 <R01125> C00014 <R00253> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R03425> C00011 <R01145> C00169 <R00575> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R06416> C01517 <R01335> C00025 <R00253> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R06416> C01517 <R01145> C00014 <R00253> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R06497> C00051 <R01494> C00025 <R00253> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R01221> C00014 <R01579> C00019 <R00579> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R01221> C00014 <R01149> C00019 <R00575> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]
 5 C00037 <R01221> C00014 <R00248> C00025 <R00253> C00064 <R01072> C03090 <R04144> C03030 [Known pathways] [Show compound structures]

(下記：我々が開発した REACH の入力画面)

REACH
 KEGG REAction searCH engine

Search Reaction
 Find shortest route of the reaction pathway between 2 compounds.

Start metabolite → Start - End Compound KEGG ← End metabolite

Limit 2 ← The maximum reaction number

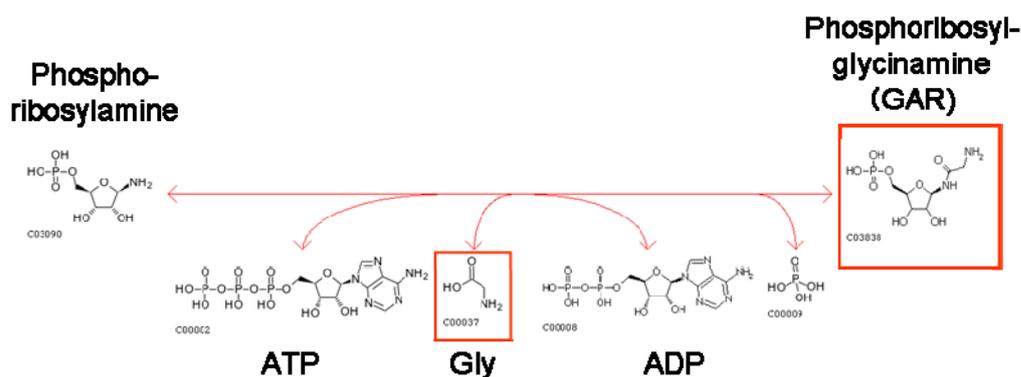
Organism ← Organisms

Exclude compounds
 C00001,C00002,C00003,C00007,C00080
 ↑ Excluding pathways with assigned metabolites

Search

Copyright © 2008 Elab Co., Ltd. All rights reserved.

(下記：検索結果、KEGGが出した結果よりも現実的な経路を表示)



(2)研究成果の今後期待される効果

我々が開発した代謝パスウェイ検索ソフトウェア REACH はメタボローム研究における膨大な解析結果を研究者が確認および理解するうえで非常に有用なツールとなり得る。このソフトウェアを公開することで、メタボローム研究法を基盤とした代謝調節機能に関する研究全体のスピードアップが期待できる。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌0件、国際(欧文)誌6件)

1. Tsuyoshi Tabata, Takatoshi Sato, Junro, Kuromitsu and Yoshiya. Oda, Pseudo Internal Standard Approach for Label-Free Quantitative Proteomics, Anal Chem, 79(22), 8440-8445 (2007)
2. Khin Than Myint, Ken Aoshima, Satoshi Tanaka, Tatsuji Nakamura and Yoshiya Oda, Simple quantitative profiling of polar cationic metabolites in human cerebrospinal fluid by reversed-phase nano-liquid chromatography/mass spectrometry, Anal. Chem., 81(3), 1121-1129, 2009
3. Taisuke Uehara, Akira Yoko, Ken Aoshima, Satoshi Tanaka, Tadashi Kadowaki, Masayuki Tanaka and Yoshiya Oda, Quantitative phosphorus metabolomics using nano-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry and culture-derived comprehensive global internal standards, Anal Chem, 81(10), 3836-3842, 2009
4. Khin Than Myint, Taisuke Uehara, Ken Aoshima and Yoshiya Oda, Polar Anionic Metabolome Analysis by Nano-LC/MS with a Metal Chelating Agent, Anal. Chem., 81(18), 7766-7772, 2009
5. Tatsuji Nakamura, Khin Than Myint and Yoshiya Oda, Ethylenediaminetetraacetic Acid Increases Identification Rate of Phosphoproteomics in Real Biological Samples, J. Proteome Res., 9(3), 1385-1391, 2010
6. Yoshiaki Sato, Tatsuji Nakamura, Ken Aoshima and Yoshiya Oda, Quantitative and wide-ranging profiling of phospholipids in human plasma by two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, Anal. Chem., 82(23), 9858-9864, 2010.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

- ① 遺伝子医学MOOK 14号 (ISBN: 978-4-944157-44-0)
次世代創薬テクノロジー 実践: インシリコ創薬の最前線
・ケミカルプロテオミクスによるタンパク質-化合物相互作用とタンパク質間相互作用の解析 <青島 健>
- ② 遺伝子医学MOOK 16号 (ISBN: 978-4-944157-46-4)
メタボロミクス: その解析技術と臨床・創薬応用研究の最前線
・生体試料を対象にしたLC/MSによる極性代謝物の分析 <Khin Than Myint>
・質量分析データを解析するための定量手法 AB3D および Mass++の開発 <青島 健>
・創薬への応用薬理作用機序研究におけるメタボロミクス <上原 泰介>
- ③ Practical metabolomics in drug discovery, Wilcoxon, Keith M, Uehara, Taisuke, Myint, Khin Than, Sato, Yoshiaki, Oda, Yoshiya, Expert Opinion on Drug Discovery, 5(3) pp. 249-263(15) 2010, ISSN 1746-0441

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議9件、国際会議4件)

1. 小田 吉哉 (エーザイ株)、「MSによるオミクス解析~ドライ部分を中心に~」、Metabolome Informatics ワークショップ、慶應義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス、2007年7月28日
2. Yoshiya Oda (Eisai Co.) , “Technical challenges of MS-based Omics for stimulating medicinal chemists and enhancing signal transduction researches”, International Workshop on Future Challenges for System Biology(FCSB 2008) : A paradigm shift in medicine, Tokyo International Forum, 6th February 2008
3. 小田 吉哉 (エーザイ株)、「質量分析によるオミクス解析~創薬標的探索とバイオマーカー探索~」、先端機器分析と知識発見~メタボロミクスソリューションを中心に~、九州大学バイオアーキテクチャーセンター (九州大学医学部百年講堂、福岡)、2008年05月27日
4. Yoshiya Oda (Eisai Co.), “Proteomics/Metabolomics as tools to elucidate compounds potentialities and kinase signaling pathways”, Surrey Workshop on Systems Biology (Guildford, UK), University of Surrey, Management School Building Room 39MS02, 7th July 2008
5. 小田 吉哉 (エーザイ株)、「プロテオミクスとメタボロミクスで創薬にどこまで貢献できるか」、ワークショップ「大規模オミクス・データの利用と展望」、明治大学・生田キャンパス・中央校舎メディアホール、2008年09月08日
6. 青島 健 (エーザイ株)、「高精度・大規模バイオマーカー探索手法及びその創薬研究への応用」、第三回メタボロームシンポジウム: セッション2 基盤技術-インフォマティクス、慶應義塾大学先端生命科学研究所 (鶴岡、山形)、2008年10月30日

7. Yoshiya Oda (Eisai Co.), “Methodology or Technologies of Human Proteome Analysis”, BIT’ 2nd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon 2009) : Track 1-4, COEX convention center, Seoul, South Korea, 2009/04/04
 8. 小田 吉哉 (エーザイ株)、「質量分析データ解析用ソフトウェア Mass++の開発」、ワークショップ「マスペクトルを日本発のツールで解析、整理しよう」第 57 回質量分析総合討論会(大阪)、2009 年 5 月 13 日～5 月 15 日
 9. Yoshiya Oda (Eisai Co.), “Quantitative Proteomics/Metabolomics is a Tool for Investigating Drug Targets and Biological Phenomena”, IBC’s Targets in Context (IBC Life Science) 「Linking Targets to Disease」 (World Trade Center Boston, MA USA), 2009/08/05
 10. 小田 吉哉 (エーザイ株)、「メタボロミクスによる薬理作用機序の解明とアルツハイマー病マーカー探索について」、第 34 回日本医用マスペクトル学会年会：シンポジウム 4：「健康と疾患のためのメタボロミクス」(東大阪市近畿大学 E キャンパス B 館、大阪)、2009/09/11
 11. 小田 吉哉 (エーザイ株)、「定量的メタボロミクスとプロテオミクスの融合」、第 61 回日本生物工学会大会：シンポジウム S4 ポストトランスクリプトミクス研究の最前線 (メタボロミクス研究部会共催：名古屋大学東山キャンパス全学教育棟本館)、2009/09/25
 12. 田中 聡 (エーザイ株)、「Mass++ を MassBank のクライアントとして利用する」、第 132 回 日本質量分析学会 関東談話会、2009 年 9 月 29 日
 13. 青島健 (エーザイ株)、「MassBank へのデータ入力インターフェースやメタボローム 解析によるバイオマーカー探索について」、第 311 回 CBI 学会研究講演会、2010 年 7 月 28 日
- ② 口頭発表 (国内会議 4 件、国際会議 1 件)
1. 青島 健(エーザイ株)、「メタボロームインフォマティクスへの道」、第二回メタボロームシンポジウム –生理機能の理解と病態解析に向けて–、東京大学本郷キャンパス医学部教育研究棟 鉄門記念講堂、2007 年 11 月 5 日～6 日
 2. 上原 泰介(エーザイ株)、「リン酸化メタボロミクスと抗癌剤作用機序研究への応用」、第二回メタボロームシンポジウム –生理機能の理解と病態解析に向けて–、東京大学本郷キャンパス医学部教育研究棟 鉄門記念講堂、2007 年 11 月 5 日～6 日
 3. 上原 泰介(エーザイ株)、「リン酸化メタボロミクスの検討と応用」、第 209 回 液体クロマトグラフィー研究懇談会例会、東京理科大学薬学部(千葉県野田市)、2007 年 12 月 18 日
 4. 佐藤 義明(エーザイ株)、「網羅的リン脂質測定法とその応用」、第 22 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、エーザイ川島工園(岐阜)2009 年 7 月 15 日～17 日
 5. Ken Aoshima (Eisai Co.),” Protein Complex Discovery Using Chemical

Proteomics”, HUPO2009 World Congress, Toronto Canada, September 28th.

③ ポスター発表 (国内会議 9 件、国際会議 11 件)

1. 田中 聡(エーザイ(株))、「質量分析用プラグイン型万能ソフトウェア Mass++ の開発」、第二回メタボロームシンポジウム –生理機能の理解と病態解析に向けて–、東京大学本郷キャンパス医学部教育研究棟 鉄門記念講堂、2007 年 11 月 5 日～6 日
2. Khin Than Myint (エーザイ(株))、「Capillary LC/MS for cationic metabolites」、第 13 回 LC テクノプラザ、東京理科大学薬学部 (野田市)、2008 年 1 月 31 日～2 月 1 日
3. Khin Than Myint (エーザイ(株))、「LC/MS によるヒト CSF 中塩基性代謝物のプロファイリング」、第 56 回質量分析総合討論会、つくば国際会議場エポカル (つくば市)、2008 年 5 月 14 日～16 日
4. 上原 泰介 (エーザイ(株))、「大腸菌由来安定同位体標識代謝物を利用した定量的メタボローム解析法の検討」、第 56 回質量分析総合討論会、つくば国際会議場エポカル (つくば市)、2008 年 5 月 14 日～16 日
5. 青島 健 (エーザイ (株))、「疾病の診断、創薬研究に向けた 3 次元アライメントによるマーカー探索手法(AB3D)」、第 56 回質量分析総合討論会、つくば国際会議場エポカル (つくば市)、2008 年 5 月 14 日～16 日
6. 田中 聡 (エーザイ (株))、「質量分析用プラグイン型万能ソフトウェア Mass++ の開発」、第 56 回質量分析総合討論会、つくば国際会議場エポカル (つくば市)、2008 年 5 月 14 日～16 日
7. Satoshi Tanaka (Eisai Co), “Mass++: universal & plug-in style software for mass spectrometer”, The 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, June 1st -5th, 2008
8. Khin Than Myint (Eisai Co), “Profiling of cationic metabolites in human CSF by LC/MS”, The 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, June 1st -5th, 2008
9. Ken Aoshima (Eisai Co), ” AB3D: A suite of Algorithms for Biomarker Discovery in Diagnostics and Drug Development using LC-MS”, The 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, June 1st -5th, 2008
10. Ken Aoshima (Eisai Co), “Systems Biology For Compound Classification, And Interaction Mapping”, HUPO 2008 7th World Congress, Amsterdam, The Netherlands, August 16th -20th 2008
11. Taisuke Uehara (Eisai Co), ” Quantitative phosphorus metabolomics using nano-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry and culture-derived comprehensive global internal standards”, 57th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia, PA, USA, May 31st - June 4th, 2009

- 1 2. Khin Than Myint (Eisai Co), "Metal chelating agent enhances polar anionic metabolome analysis in nano-LC/MS", 57th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia, PA, USA, May 31st - June 4th, 2009
- 1 3. Tatsuji Nakamura (Eisai Co), "Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) assists phosphoproteomics", 57th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia, PA, USA, May 31st - June 4th, 2009
- 1 4. Ken Aoshima (Eisai Co), "Novel Label-Free Quantitation Algorithms to Analyze Large Numbers of Proteome/Metabolome Samples", 57th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia, PA, USA, May 31st - June 4th, 2009
- 1 5. Satoshi Tanaka (Eisai Co), "Mass++ is a plug-in type universal freeware for viewing and manipulating large scale LC/MS data", 57th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia, PA, USA, May 31st - June 4th, 2009
- 1 6. 田中 聡 (エーザイ (株)), 「質量分析用プラグイン形万能ソフトウェア Mass++ 開発の現状」、第 57 回質量分析総合討論会、大阪国際交流センター (大阪市)、2009 年 5 月 13 日～5 月 15 日
- 1 7. Taisuke Uehara (Eisai Co), "Database driven MS fragment prediction and structure elucidation for identification of endogenous metabolites", 58th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, UT, USA, May 23rd - May 27th, 2010
- 1 8. Yoshiaki Sato (Eisai Co), "Development of global and high sensitive 2D-phospholipidomics", 58th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, UT, USA, May 23rd - May 27th, 2010
- 1 9. Khin Than Myint (エーザイ (株)), 「Sequential isolation and extraction of extensive metabolites for nano-LC/MS analysis」、第 58 回質量分析総合討論会、つくば国際会議場エポカル (つくば市)、2010 年 6 月 15 日～6 月 18 日
- 2 0. 佐藤 義明 (エーザイ (株)), 「Metabolomics 技術を用いるアルツハイマー病の新たなバイオマーカー探索」、第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、ホテル松島大観荘(宮城県)、2010 年 7 月 21 日～23 日

(4)知財出願

①国内出願 (1件)

1. ≪アルツハイマー病の検査方法、Khin Than Myint、小田吉哉、浅井直樹、エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント会社(識別番号 506137147)、2009年6月11日、PCT/JP2009/060655≫

②海外出願 (0件)

(5)受賞・報道等

①受賞

第56回質量分析総合討論会(つくば)ポスター賞受賞

3P-41 青島健 (エーザイ(株))

疾病の診断、創薬研究に向けた3次元アライメントによるマーカー探索手法 (AB3D)

3P-44 田中聡 (エーザイ(株))

質量分析用プラグイン型万能ソフトウェア Mass++の開発

②マスコミ(新聞・TV等)報道

該当無し

③その他

新しい定量法のニュースとして: Anal. Chem. 79(23), 8827 (2007) by Jeffrey M. Perkel

新しい定量法のニュースとして: J. Proteome Res. 6(12), 4541(2007)

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

開発した Mass++ソフトウェアは 2009 年度にホームページを公開 (<http://masspp.jp/>)

また JST-BIRD の Mass Bank と連携が開始され、今後も継続

Mass++は内閣府主導の最先端科学技術プロジェクトの中の田中耕一プロジェクトにて開発継続

②社会還元的な展開活動

該当無し

§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

該当無し

§ 7 結び

我々の提案はメタボロミクスに必要な基盤技術開発であったが、途中もっと応用を、つまり生物学的な研究をするようにと指示された。しかしチーム内に生物学者や薬理研究者がいないため、アドバイスを充分活かせなかったかもしれない。それでも分析手法についてはハード・ソフト両面で大きく進歩したと自負している。本プロジェクトの開始時には鈴木統括より「バーチャルラボ構想」を言われ、本研究領域の他のグループへもっと貢献できたかもしれないが、横のつながりが充分でなく、一部の先生を除いては全く連携することができなかった。社会貢献としては、本成果が患者さんの幸福につながるまでの道のりはまだ遠いものの、本研究を始めるまで、社内にメタボロミクスの基盤はなく、専任社員はゼロであったが、メタボロミクスの重要性を会社として認識するようになり、正規社員として4名の雇用につながり、本予算とは別に、大型装置や多額の試薬・物品など、本研究でいただいた予算の数倍の予算を会社から獲得し使用することで、少ないながら景気対策になったと思っている。

国の予算を企業の利益のために使うのは良くないとの声もあるが、メタボロミクスが利益につながるかはまだ未知数であり、むしろ人件費や装置の購入など投資段階である。結果として会社の利益が上がるなら、そのときには患者さんへの貢献になっているはずと考えている。論文を出すことのみを最終成果とするならば、それは社会への還元とは言えないと思われるものの、論文発表を透明性の確保と考えるならば恥ずかしながら不十分であった。一般に企業では論文を書くことについて社内の理解を得ることは難しく、むしろ悪と見ている雰囲気すらあるが、企業内研究を世の中の人に積極的に見せることも企業の重要な使命だと考えている。よって少しずつではあるが、外から見える企業研究となるように、環境を少しずつ変えて、遅ればせながら、何報かの論文投稿に向けて作業を進めている。