

多変量解析を用いた機器分析データの処理方法： 質量分析によるメタボロミクスと植物の「におい」 表現

著者	竹本 裕之
雑誌名	技術報告
巻	18
ページ	7-10
発行年	2013-03-12
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00007100

多変量解析を用いた機器分析データの処理方法: 質量分析によるメタボロミクスと植物の「におい」表現

竹本裕之

静岡大学技術部教育研究支援部門、静岡大学機器分析センター

1. はじめに

質量分析は近年盛んに行われている生物の代謝物の総体を解析するメタボロミクス（メタボローム解析）において利用される重要な手法である。メタボロミクスは生物の遺伝情報の総体を解析するゲノミクスから派生した遺伝情報に基づく総体解析（オミクス）のひとつであり、mRNAを対象とするトランスクリプトミクス、タンパク質を対象とするプロテオミクス、等と並んで代謝物を対象とする総体解析である。メタボロミクスに用いられる分析機器には、ガスクロマトグラフ-質量分析計、高速液体クロマトグラフ-質量分析計、キャピラリー電気泳動-質量分析計、核磁気共鳴装置などがある[1,2]。本報告では特に質量分析機器によるメタボロミクスについて、著者の専門分野である植物を対象とするメタボロミクスおよび植物揮発物質の解析を中心にまとめた。

2. 植物メタボロミクスの概要、対象代謝物、分析機器

植物メタボロミクスの一般的なワークフローを図1に示した。植物メタボロミクスで解析の対象とする代謝物は、糖、アミノ酸、有機酸、ペプチド、脂肪酸、ビタミン類、油脂類、揮発物質、など幅広い[3-5]。代謝物総体の解析といっても現在の段階では代謝物全てを一斉分析できる方法はなく、調査研究の興味の対象となる代謝物によって、最適な前処理、および測定方法の最適化を行う必要がある。そのような状況でも、より網羅的に解析する方法（discovery metabolomics, finger printing）の推奨される方法もいくつか報告されてきている[ex. 6,7]。

一般的な方法では、まず対象となる代謝物が存在する器官、組織をサンプリングする。採集された組織は液体窒素下で摩砕し、抽出まで-80℃で保存する。凍結乾燥処理を行えば、より長い期間の貯蔵が可能である。次に対象とする代謝物によって最適な方法で抽出を行う。抽出の際には内部標準物質を添加する必要がある。GC-MSを用いたフィンガープリンティングの場合はリビトールなど[5]、対象物を絞った解析の場合は、対象化合物の安定同位体標識を行った標準物質を用いる[8,9]。液-液抽出やカラムによって対象物を含む画分を分離し、分析を行う機器での検出を可能にする、あるいは検出感度を向上させるための誘導体化を行う[10]。糖や有機酸などを対象にGC-MSによる分析を行う場合にはTMS誘導体化を行うのが一般的である[ex. 7,9,11,12]。

質量分析をベースとしたメタボロミクスの代表的なものは、ガスクロマトグラフまたは高速液体クロマトグラフを用いたものである。GC-MSは揮発性のある試料を対象としており、キャピラリーカラムの理論段数が多いため分離が良く、また高感度であるほか、分離に関与する要因が少なく

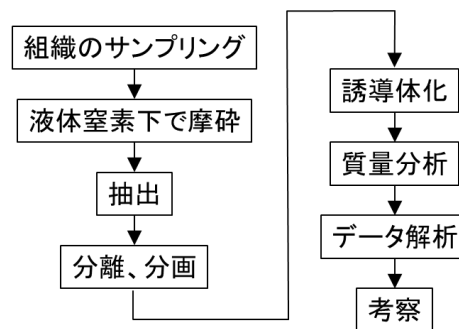


図 1. 植物メタボロミクスの一般的なワークフロー

条件検討が容易という特徴がある。一方 HPLC は試料の適用範囲が広く、不揮発性の試料や誘導体化を行うことができない試料も分析を行うことができる。GC-MS では EI イオン化法を用いればマススペクトルのフラグメントパターンから化合物の構造に関する情報が得られる。フラグメントパターンを National Institute of Standards and Technology (NIST) のマススペクトルライブラリ、NIST が提供する AMDIS[13] を利用した登録化合物と比較することによって化合物の予測を行うことができる。

LC-MS の場合はイオン化がエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法などのソフトイオン化法により行われ、イオンのフラグメンテーションがほとんど起こらない。試料分子の分子量を求めるための精密質量測定など、分子イオンピークを検出したい場合に適したイオン化法である。分子の構造に関する情報については、本装置のようにイオントラップ型の質量分析計を備える場合には、指定した質量電荷比のイオンをトラップして再度開裂させる多段階タンデム質量分析 (MSⁿ 分析) により詳細に得ることができる。例えばフラボノイド配糖体のアグリコンの同定は配糖体イオンを選択した MSⁿ 分析によって達成される[14]。

静岡大学機器分析センターにはガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 (GC-TOFMS) (日本電子 JMS T100GCv)、および高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (HPLC-MS/MS) (サーモフィッシャーサイエンティフィック LTQ Orbitrap Discovery) が設置されている。LTQ Orbitrap Discovery の質量分析部はフーリエ変換—リニアイオントラップ—ハイブリッド質量分析計である。両方の装置が高分解能質量分析を行うことができる装置であり、標的イオンの精密質量を測定することができる。

3. メタボロミクスにおける多変量解析

メタボロミクスにおける機器分析で得られるデータには、化合物の同定のための定性的なデータと、各成分の量を示す定量的なデータがある。成分の量は検量線による定量、および内部標準物質による標準化によって得られる。メタボロミクスに限らず定量的なデータが得られる調査研究においては、得られたデータを統計モデルにより解析することが重要である。統計解析のうち、複数の説明変数を用いて解析を行うものを多変量解析という[15]。代謝物が関与する生命現象の多くは複数の成分が関与する混合系であり、メタボロミクスによる成分のプロファイリングにおいては多くの成分の定量結果を多変量解析によって視覚的に表現することが有効である。

メタボロミクスにおける多変量解析の中でも主成分分析はもっとも頻繁に目にする解析方法のひとつである。主成分分析は理論がわかりやすく、統計の初心者でも比較的容易に実施することができる。主成分分析は各サンプルにおける多成分の測定値データをもとに、多次元空間にプロットされる各サンプルのデータセットの分布を最もよく説明する合成変数 (主成分) を計算によって導き出し、2つか3つの主成分を新たな軸とする2次元 (または3次元) で表現する方法である[15]。2次元でプロットしたグラフで多変量データによる各サンプルの差異を視覚的に表現できる。あらゆる統計解析ソフトに標準で組み込まれており、例えば無料で使用できるソフトの R でも、少ないスクリプトで容易に実施することができる。図2は主成分分析による多成分の差異解析結果のイメージである。図中の●、○、△はそれぞれ異なる処理を行った植物抽出物サンプルの多変量データを示しており、スコアプロットの異なる位置に表現されている成分 (変量) A~J の寄与 (矢印で表示) から、各サンプルに特徴的な成分を予想することができる。

その他のよく用いられる多変量解析手法には、判別分析、クラスター分析、階層的主成分分析、階層的クラスター分析、正準（カノニカル）相関解析、正準（カノニカル）判別分析などがある[16]。

4. 植物の「におい」表現

筆者はこれまで植物の揮発物質（におい）の生物間コミュニケーションにおける生態学的機能と昆虫によるにおいの学習について研究を行ってきた。植物のにおいは分子量 300 程度までの揮発性の有機化合物の混合物である。植物のにおいは生物間の相互作用においてコミュニ

ケーションに使われる等の生態学的な機能があり、人間社会においては食品科学、医学薬学分野において我々の感覚器官と相互作用し、様々な重要な役割を担

っている。においは嗅覚器官における多成分の受容に基づいて脳内にある時空間的なパターンで神経細胞の活性化が起こり、そのパターンが感覚として読み取られる[17,18]。そのため、においは多成分の総体として解析されることが必要である。植物のにおいの分析の一般的な方法は、ガラス容器等に植物体を入れ、容器内の空気を吸着担体に 1 時間など一定時間暴露して捕集し、捕集した化合物を GC-MS に供して行われる。さらに検出された個々の成分を 1 つの変量として多変量解析を行い、においの差異を解析する。実際にはにおいは受け手の感覚器での受容と脳内での情報処理を経て機能するため、同じにおいでも生物種や生物個体、個体の状態等が異なると機能や感覚は異なる。そのためにおい成分の機能を理解するためには、受け手となる生物における感覚、行動、神経レベルでの解析が必要となる。におい分析は植物の二次代謝物質である揮発物質の捕集と機器分析、統計解析によって行われるメタボロミクスであり、においの特徴を理解する上で強力な手法である。

5. おわりに

メタボロミクスの応用的展開の例では、植物科学の例では遺伝子組み換え植物を用いたストレス化におけるマーカーの探索やストレス抵抗性の高い植物系統や作物品種におけるストレス下での代謝物の応答解析[19-22]、医学分野では代謝物のプロファイリングによる病気の新規診断法の開発[23]、食品分野では成分プロファイリングと官能評価による食品の品質評価予測モデルの作成[24]などがある。メタボロミクスはゲノム情報のみでは知り得ない遺伝子の機能をより詳細に明らかにすることができ、機能ゲノミクス分野において重要な手法である。また遺伝情報の明らかでない材料を用いても独立に行うことができる点でゲノミクスやトランスクリプトミクスに比べて汎用性が高い。解析の具体的な方法についても論文、書籍やウェブサイト等で得ることができる有用な情報も増加しているため、今後さらに応用的展開が進むと考えられる。

引用文献

- [1] Y. Okazaki, K. Saito, Plant Biotechnology Reports 6 (2012) 1.
- [2] S.G. Villas-Boas, S. Mas, M. Akesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen, Mass Spectrometry Reviews 24 (2005) 613.

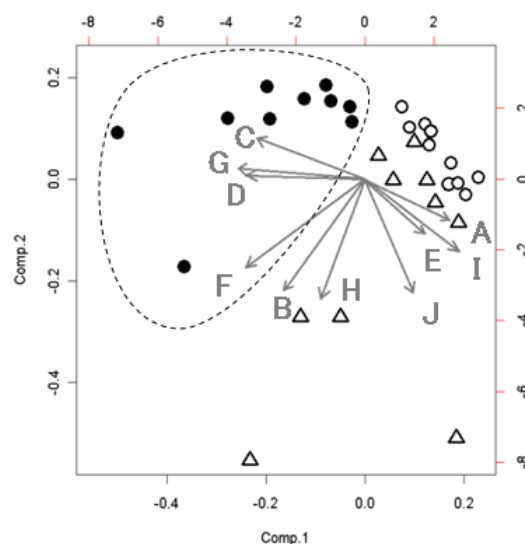


図 2. 主成分分析による多成分の差異解析結果のイメージ

- [3] A. Lytovchenko, R. Beleggia, N. Schauer, T. Isaacson, J.E. Leuendorf, H. Hellmann, J.K.C. Rose, A.R. Fernie, *Plant Methods* 5 (2009).
- [4] C. Bicchi, M. Maffei, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 918 (2012) 289.
- [5] A. Miyagi, H. Takahashi, K. Takahara, T. Hirabayashi, Y. Nishimura, T. Tezuka, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya, *Metabolomics* 6 (2009) 146.
- [6] X. Pan, R. Welti, X. Wang, *Nature protocols* 5 (2010) 986.
- [7] J. Lisec, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer, A.R. Fernie, *Nature protocols* 1 (2006) 387.
- [8] R.H. Liu, D.L. Lin, W.T. Chang, C.R. Liu, W.I. Tsay, J.H. Li, T.L. Kuo, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 618A.
- [9] N. Stamp, *Quarterly Review of Biology* 78 (2003) 23.
- [10] 小川 茂, *ぶんせき*, 7 (2008) 332.
- [11] J. Zhang, X. Sun, Z. Zhang, Y. Ni, Q. Zhang, X. Liang, H. Xiao, J. Chen, J.G. Tokuhisa, *Phytochemistry* 72 (2011) 1767.
- [12] B. Ebert, D. Zöllner, A. Erban, I. Fehrle, J. Hartmann, A. Niehl, J. Kopka, J. Fisahn, *Journal of experimental botany* 61 (2010) 1321.
- [13] <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>
- [14] E. de Rijke, P. Out, W.M.a. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U.a.T. Brinkman, *Journal of chromatography. A* 1112 (2006) 31.
- [15] 菅 民郎, *初心者がらくらく読める : 多変量解析の実践*, 現代数学社, 京都, 1993.
- [16] H.A. Gad, S.H. El-Ahmady, M.I. Abou-Shoer, M.M. Al-Azizi, *Phytochemical Analysis* 24 (2013) 1.
- [17] G. Laurent, M. Stopfer, R.W. Friedrich, M.I. Rabinovich, A. Volkovskii, H.D.I. Abarbanel, *Annual Review of Neuroscience* 24 (2001) 263.
- [18] K. Touhara, L.B. Vosshall, *Annual Review of Physiology* 71 (2009) 307.
- [19] U. Roessner, A. Bacic, *Australian Biochemist* 40 (2009) 9.
- [20] G. Glauser, J. Bocard, S. Rudaz, J.-L. Wolfender, *Phytochemical Analysis* 21 (2010) 95.
- [21] T. Obata, A.R. Fernie, *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (2012) 3225.
- [22] A. Genga, M. Mattana, I. Coraggio, F. Locatelli, P. Piffanelli, R. Consonni, in A. Shanker (Editor), *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, InTech, 2011.
- [23] S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida, *Metabolomics* 6 (2010) 518.
- [24] W. Pongsuwan, E. Fukusaki, T. Bamba, T. Yonetani, T. Yamahara, A. Kobayashi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 231.