

# 代謝物同定システム SpinAssign を用いた網羅的メタボローム計測へ向けた戦略

<sup>1</sup>理研PSC、<sup>2</sup>横浜市院国際総合、<sup>3</sup>名古屋大院生命農  
○近山英輔<sup>1</sup>、春名英明<sup>2</sup>、菊地淳<sup>1, 2, 3</sup>

## Toward NMR-based comprehensive metabolomic analysis with SpinAssign

<sup>1</sup>RIKEN PSC, <sup>2</sup>International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, <sup>3</sup>Graduate School of Bioagri. Sci., Nagoya University

Toward comprehensive metabolite identification by NMR, we have been developing SpinAssign, an NMR spectrum analysis system, and an HSQC-based metabolite chemical shift database. Currently, we have detected more than 600 peaks derived from metabolites in a <sup>13</sup>C-HSQC spectrum, which is one of the most comprehensive detection in the world, by using SpinAssign, the database, a stable isotope labeling technique, and refined protocols. Further, we have been integrating several relating methodologies including SpinAssign LIMS and HalMol toward the method of the most comprehensive identification of metabolites by NMR.

<はじめに> メタボローム解析における NMR は質量分析計 (MS) に比べ感度が低いという欠点があるものの、分解能の高さ、サンプル計測時の非侵襲性の利点が高い。後者は特に *in vivo* 計測を可能とし、NMR によるメタボローム計測は現在の分子論的オミクス技術の中で唯一、生きた細胞内のオームデータを非破壊で計測することのできる技術であり、完全な初期条件の再現性が難しい複雑な生命システムを理解するための貴重な方法論として今後の更なる発展が期待される。

<代謝物同定システム SpinAssign の機能拡張> NMR による代謝物の網羅的同定に向けて、我々はこれまで <sup>13</sup>C-HSQC ベースの代謝物化学シフトデータベース (CSDB) と Windows 上で動作する Java ソフトウェア SpinAssign を開発してきた。CSDB は我々自身が計測し蓄積している標品の化学シフトデータベースであり、溶媒と測定条件を一定にすることで高精度の CSDB の構築を目指している。SpinAssign はメタボロミクス用 NMR スペクトル解析ソフトウェアで、現在 1D/2D/3D スペクトルに対応しており、CSDB とそれを用いた生体抽出物の <sup>13</sup>C-HSQC スペクトルの解析が主機能である。複数のスペクトル上で複数のクロスヘアを同期して対話的に解析することに優れているため、<sup>13</sup>C-HSQC スペクトル上で CSDB によって代謝物候補をアノテートされたピークを他の異種核多次元相関スペクトルで結合し高信頼の代謝物同定を達成することに特に優れている。我々はさらに NMR によるメタボローム解析を一般利用可能とするために我々の CSDB と SpinAssign の簡易機能をウェブ上に実装した SpinAssign WEB を構築した。これは PRIME (<http://prime.psc.riken.jp>) 上で無料利用可能である。現在ユーザーの抽出物 <sup>13</sup>C-HSQC クエリーピーク (リン酸緩衝液、pH 7、298 K) に対し約 80 代謝物のアノテーションが可能となっており、今後は 300 代謝物に増強予定である。我々は上記システムを用いて、生物サンプルからの代謝混合物の一斉検出を目指している。現在、細胞への安定同位体標識技術、NMR サンプル条件の最適化によりを

---

キーワード: メタボローム、LIMS、データベース、代謝物、ウェブ

ちかやま えいすけ、はるな ひであき、きくち じゅん

クライオプローブを装備した 700MHzマシンによる $^{13}\text{C}$ -HSQCスペクトルの長時間測定で、*Arabidopsis* T87 培養細胞粗抽出物から細胞内代謝物由来の 600 以上という世界最高レベルの $^{13}\text{C}$ -HSQCピーク数を検出することが可能となった。このうち約 40%がCSDBと一致し、78 個の代謝物の検出が確認された。未同定ピークを含めると全体で 150~200 代謝物程度の検出が達成されていると見積もられた。我々はさらなる低濃度物質の一斉検出に向けて、NMRサンプル調製と計測/解析方法論の開発を進めている。

<CSDB構築の高効率化:HalMolソフトウェアとLIMS開発> 一方、自然界には数十万以上の代謝物が存在すると考えられているため、CSDBの対象化合物をランダムに選択し計測することは極めて非効率的である。従って、実際に研究対象としているサンプル中すでに検出されている代謝物を優先的に同定しデータベース化することが望ましい。そこで我々は検出されているがデータベースに存在しない未同定ピークに対して候補化合物を予測するHalMolシステムを構築した。さらに新規開発中のSpinAssign LIMS (LIMS)と組み合わせ標品計測ルーチンに組み込むことで効率的な薬品リソースとNMRリソースの運用が可能となりつつある(Fig. 1)。このLIMSは代謝物情報とNMRデータを蓄積するサーバ側とデータ閲覧と化学シフト登録部分を持つクライアント側より成る。サーバ側は、関係データベース(RDB)上に代謝物データとNMRスペクトル/ピーク、原子アサイン、計測ステータス、ユーザーアカウントなどをテーブル化し実装した。RDBにはKEGGから約 12000 の代謝物情報をインポートした。クライアント部からは複数のNMR計測者による $^{13}\text{C}$ -HSQCスペクトルからの化学シフトの蓄積を容易にする。このシステムは化学シフトの入力エラー発見をサポートする自動機能が複数実装されており、データベースのキュレーションに役立っている。我々はこれらのシステムを統合し世界最高の網羅的一斉同定法の達成を目指す。

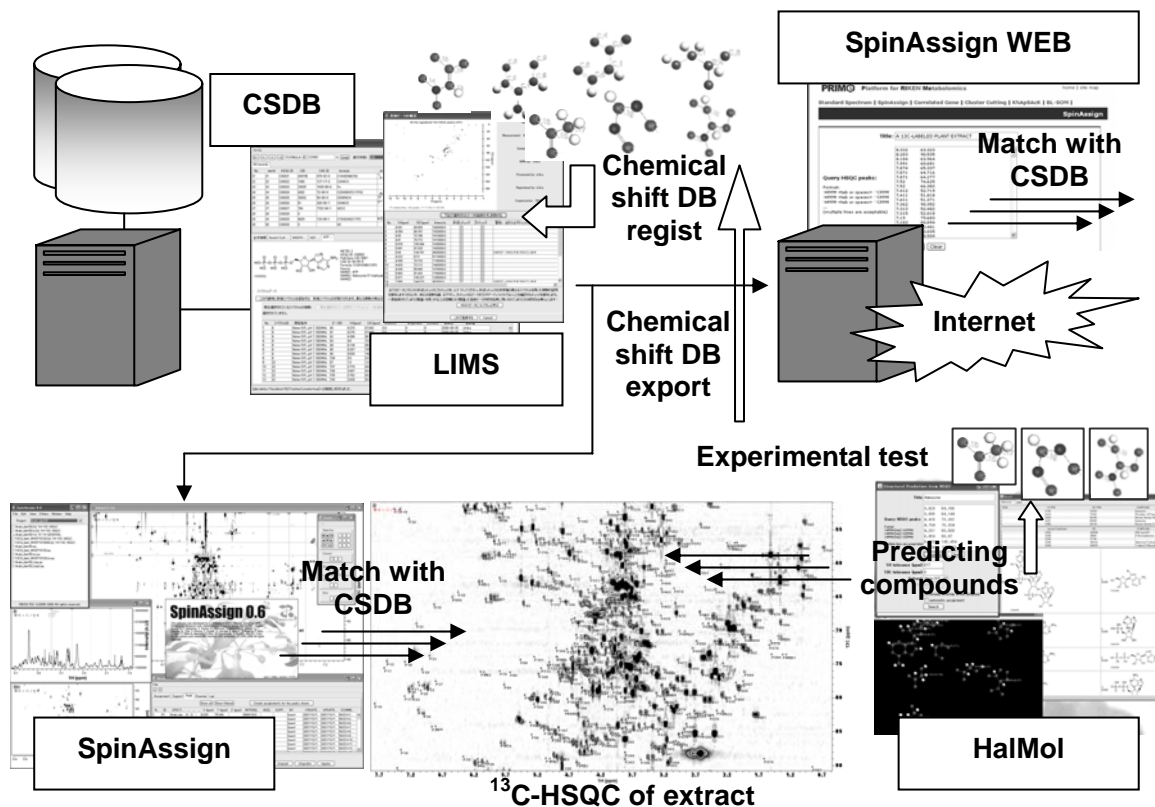


Fig. 1 Integration of metabolite identification resources