

## 別紙 研究内容

### 研究課題名

高速液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計を用いた環境化学物質・低分子代謝物スクリーニング分析およびデータ解析のための知見共有

### 代表者

千葉大学予防医学センター 江口 哲史

### 共同研究者

愛媛大学沿岸環境科学研究センター 野見山 桂

### 研究目的

化学物質曝露影響の分析・解析手法確立には分析・解析技術の共有が不可欠であり、知見を蓄積・共有し、分析・解析技術を向上する必要がある。

申請者らはこれまでヒト、野生生物に残留する化学物質やその代謝物の濃度データおよび、それらの曝露により変動すると予想されるメタボロームの変動をはじめとするオミクスデータの解析を進めてきた。しかしながら申請者がこれまで行っていたメタボロームの測定はターゲットを定めた測定が中心であり、未知物質の探索やターゲット外の低分子代謝物・環境化学物質などは測定対象外であった。

これらの分析に力を発揮しているのが、高速液体クロマトグラフ-飛行時間型タンデム質量分析計 (LC-QToFMS) である。LC-QToFMS により、網羅性の高い測定データが得られるようになりつつあるが、未知化合物や代謝物を含む大規模データの分析については、未だゴールドスタンダードとなる分析・解析手法は存在しない。

本申請では愛媛大学・千葉大学双方に導入された LC-QToFMS を各機関で運用し、知見を共有することで試料の前処理や分析手法、データ解析手法を高度化することを目的とした。

## 研究概要

本年度は親水性相互作用クロマトグラフィ (HILIC) カラムおよび LC-QToFMS をもちいたメタボロームの計測手法を立ち上げ、愛媛大学との手法共有を行った。また、ピークアノテーションのためのスペクトルライブラリの作成・共有、解析ソフトウェアへのデータ読み込み手法を共有した。

また、愛媛大学と共同研究を進めていた、ビスフェノール A 曝露による子ラット肝臓中の脂質・トランスクリプトーム組成の変化に関する研究が、国際誌に投稿・受理された。

## 研究内容

### 背景

申請者はこれまで、ターゲットを定めてメタボロームの分析を行っており、未知物質の探索やターゲット外の低分子代謝物・環境化学物質などは測定対象外であった。しかしながら、測定対象外の化合物中にも曝露に関連する物質が含まれている可能性があるため、網羅的なワイドターゲット・ノンターゲット分析法が期待されている。これらの分析に力を発揮しているのが、高速液体クロマトグラフ-飛行時間型タンデム質量分析計 (LC-QToFMS) である。本機器を用いたワイドターゲット・ノンターゲット分析法は、質量分析計で検出されたすべての化合物を解析対象とする手法である。

本手法は膨大なデータを試料から得ることができる点がメリットである反面、得られるデータのサイズが巨大化しやすく、ピークの検出、検出されたピークのアノテーションや溶出時間のアラインメントなどデータのハンドリングも容易ではない。このため本年度はノンターゲット・ワイドターゲット分析のための測定条件を確立・共有することを目的とした。

### 手法

まず HILIC カラムおよび LC-QToFMS を用いた分析法の確立を試みた。HPLC 装置は SCIEX 社製 ExionLC AD UPLC system、検出器は SCIEX 社製 X500R QToFMS を用いた。分析法は既報を参考に、Positive モードの測定には ZIC-HILIC カラム (2.1mm, 100mm, 3.5 $\mu$ m) を用い、移動相は A 0.1%ギ酸水溶液, B 0.1%ギ酸アセトニトリルと

した。Negativeモードの測定にはZIC-pHILICカラム (2.1mm, 100mm, 5 $\mu$ m) を用い、移動相は A20mM 重炭酸アンモニウム水溶液, B アセトニトリルとした。流速はいずれも 0.2 ml/min とし、グラジエント条件は B 95%から 40%B に 6分間で組成を線形に変化させた後、6-9分にかけて 10%B に組成を線形に変化させた。その後 10% B で 2分間保持した後、初期条件に組成を戻した後 7分間コンディショニングを行った。質量範囲は 50-800 m/z とし、25Da 幅の SWATH モードで測定を行った。

また、Massbank North America, Human metabolome database, RIKEN データベースから公開されている LC-MS 用の質量分析ライブラリを取得し、解析に用いるためのインハウスライブラリとして統合した (表 1)。Human metabolome database に関しては、データの形式が他と異なるため、変換プログラムを実行し、共通のライブラリ形式である MSP ファイルに変換した。ピークピッキング・アラインメントおよびアノテーションなどのデータ整形には、MS-DIAL を用いた。また、新規のピークピッキングおよびアノテーションに関わるソフトウェアとして、Hermes の検討を試みた。

## 結果・考察

上記の通り分析法を確立した。本分析法における HPLC の条件は流速が遅くカラムの粒径も比較的大きいため、背圧を 20-30MPa 程度に抑えることができる。このため、汎用的な HPLC でも運用できる点はメリットである。

また、血清や尿を対象にメタボロームの分析を行い、統合ライブラリを用いてアノテーションを実施した場合には、Metabolomics Standards Initiative (MSI) が定めた高分解能タンデム質量分析計による MS1, MS2 双方のスペクトルパターン一致による MSI level 2 の一致により、200-300 物質がアノテーションできることが確認された。

追加で検討した Hermes は試料中に存在する可能性がある化合物のリストに基づいて有力なピークをピックアップするソフトウェアである。本ソフトウェアは化合物リストを切り替えることができる。このため、メタボロミクスのデータ解析にとどまらず、NORMAN Substance Database などの化学物質リストを利用することで、環境化学物質のスクリーニング分析にも利用できることが期待される。一方、データ読み込みのために測定データの形式を、共通のフォーマットである mzML に

変換する必要があるため、データのサイズが大きくなりやすいことや、統計解析をしやすい形にデータを整形するためのプログラムが少し複雑になる点は注意が必要である。

本年度はこれらの分析法や化合物アノテーション、データクリーニングまでの流れについて、共通する機器を利用している愛媛大学と共有することができたため、共通の手法により得られたデータを共有し、互いに知見を交換できることが期待される。

## 引用文献

- Giné, R., Capellades, J., Badia, J. M., Vughs, D., Schwaiger-Haber, M., Alexandrov, T., ... & Yanes, O. (2021). HERMES: a molecular-formula-oriented method to target the metabolome. *Nature methods*, 18(11), 1370-1376.
- Merged NORMAN Suspect List: SusDat. <https://www.norman-network.com/nds/>
- Saigusa, D., Okamura, Y., Motoike, I. N., Katoh, Y., Kurosawa, Y., Saijyo, R., ... & Yamamoto, M. (2016). Establishment of protocols for global metabolomics by LC-MS for biomarker discovery. *PLoS One*, 11(8), e0160555.
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence.
- Tsugawa, H., Ikeda, K., Takahashi, M., Satoh, A., Mori, Y., Uchino, H., ... & Arita, M. (2020). A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nature biotechnology*, 38(10), 1159-1163.
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., ... & Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1), D608-D617.
- Zhang, T., Creek, D. J., Barrett, M. P., Blackburn, G., & Watson, D. G. (2012). Evaluation of coupling reversed phase, aqueous normal phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with Orbitrap mass spectrometry for metabolomic studies of human urine. *Analytical chemistry*, 84(4), 1994-2001.

## 成果発表

Nguyen, H.T., Li, L., Eguchi, A., Agusa, T., Yamamoto, K., Kannan, K., Kim, E.Y. & Iwata, H. (2022). Effects of Gestational Exposure to Bisphenol a on the Hepatic Transcriptome and Lipidome of Rat Dams: Intergenerational Comparison of Effects in the Offspring. *Science of The Total Environment*, 153990