

# LC-MS を基盤とした天然物メタボロミクスにおけるベンチマーク型 包括的品質管理評価指標混合物の開発

## Establishment of a quality control mixture for benchmarking LC-MS based dereplication protocols in natural product research

徳島文理大学	堂上 (久保) 美和
派遣期間	2016年9月1日～2018年3月31日
研究機関	School of Pharmaceutical Sciences, EPGL, University of Geneva Rue Michel-Servet, CH-1211 Geneva 4, Switzerland
研究指導者	Prof. Jean-Luc Wolfender

In natural products research, recent dereplication workflows are usually based on the treatment of data obtained from generic untargeted metabolite profiling by UHPLC-HRMS/MS of crude extracts. When applied on large collection of complex NPs extracts, the amount of information generated by such approaches is extremely important and requires to finely tune the acquisition parameters. Additionally, various computational solutions, each presenting a great numbers of parametrical options, exists to mine the generated data. In order to assess the overall quality of the NPs profiling and dereplication workflows I propose to use a well-defined Quality Control sample mixture prepared from the combination of 5 extensively described plants of the European Pharmacopeia for which extensive phytochemical studies have been performed. Plants were selected by mapping the chemical space of their constituents against the space occupied by all NPs known to date for the best coverage and extended polarity range. This mixture was analyzed in different conditions and MS/MS acquisition modes on different MS platforms. The quality of automated annotations was also assessed in various chromatographic regions. The results suggested that this plant mixture easily generable in any laboratory could become a universal QC for the quality evaluation of NPs profiling and annotation workflows.

### 研究目的

世界で市販されている医薬品の 80 % 以上は何らかの形で天然物の骨格および情報が反映されている。有用な植物から活性成分を明らかにする場合、複数の精製方法を組合せ、活性を指標にして活性成分を単離し、構造決定する戦略が従来一般的な戦略である。この手法は、確実に構造を決定出来るという長所はあるものの、膨大な時間と労力と共に溶媒やシリカゲルなどのコストがかかる医薬品の開発を行うためには、各テーマに合った生理活性を有し基本となる構造を持ったリード化合物の探索が不可欠であるが、様々な化合物の混合物である天然物から独自のリード化合物の探索する際に大きな労力を費やしているのが既知物質の同定過程である。苦労して単離した化合物がごくありふれた物質であったとい

う話はよくあることである。効率良く新規骨格、構造を有するリード化合物を見つけ出すために生まれたのが Dereplication である。Dereplication とは「迅速、かつ効率的な既知物質の同定」ということである。特に最近では LC-MS や UPLC-MS2 を利用した dereplication が開発されている。中でも Molecular networking (MN) は MS2 データを活用し、MS フラグメント情報から類似構造を有する物質をクラスター化させ、データベースに基づいて既知物質を単離することなく同定できる手法である。<sup>1</sup>この手法は生理活性情報を組み合わせることも可能であるため、植物エキスの MS2 データから目的とする物質を単離することなく迅速に予測することも可能であると同時に、標的物質だけを狙って単離することが可能である。このように、MS を基盤とした天然物の迅速

速な単離、同定過程を天然物メタボロミクスという。天然物メタボロミクスの先駆者の一人であるジュネーブ大学 Jean-Luc Wolfender 教授のグループは、化合物の annotation 方法の 1 つとして *in silico* データベースを構築し、MN と組み合わせることによって、より多くの植物 2 次代謝産物を同定できる方法 (ISDB) を確立している。<sup>2</sup> MN は天然物化学における有用化合物の強力な探索ツールとなることは間違いないと言える。しかし、複雑な混合物である植物エキスの dereplication は容易ではない。化合物の構造によって MS におけるイオン化のパターンは異なるため、それぞれの化合物の特性に合った MS のパラメータ設定などの条件を細かく設定する必要がある。また、得られた MS 情報を様々な解析ソフトを用いて化合物の annotation を行う過程においても、それぞれの化合物に応じてパラメータを調整しなければならない。得られた MS 情報だけを頼りに化合物を同定する dereplication 作業にとって、これらの条件設定は非常に重要なことであるが、各段階の作業が正確に行われているか品質を評価するための基準が必要となる。そこで、私は分析条件と化合物同定段階を評価できるベンチマーク型品質管理 (QC) 混合物を開発することとした。

## 研究経過

QC として適切な条件として、誰もが入手可能で、かつ既に広範な植物化学的組成研究が行われているものが良いと考えられる。そこで、欧州薬局方に記載された数種類の植物エキスの組み合わせから調製された品質管理 (QC) サンプル混合物を基準として使用することを提案することとした。まずは、テルペノイド、アルカロイド、フラボノイド、脂肪酸、糖類など疎水性から親水性化合物を含む 5 種類の植物を選択した。天然物化学データベースから、これら植物から単離報告されている化学成分を抜き出し、chemical space mapping を行ったところ、ほとんどの空間を広範囲に網羅していることが確認できた。続いて、QC 混合物を異なる LC 条件及び MS/MS 条件下で分析した。UPLC-MS の条件検討を繰り返し行って条件を最適化し、測定時間の異なる最適条件を 2 つ決定した。それぞれの条件で測定したデータから得られたピークキャパシティは 300~500 となり、こ

の値は一般的な UPLC 分析で得られる値と同等である。また、MSMS イオンピーク数は、1500~3000 個であり、例えば、MS-DIAL を用いて解析すると、測定時間が 2 分ずつ変化させると MSMS イオン数が 2~15% の範囲で変わることがわかった。(Fig. 1)

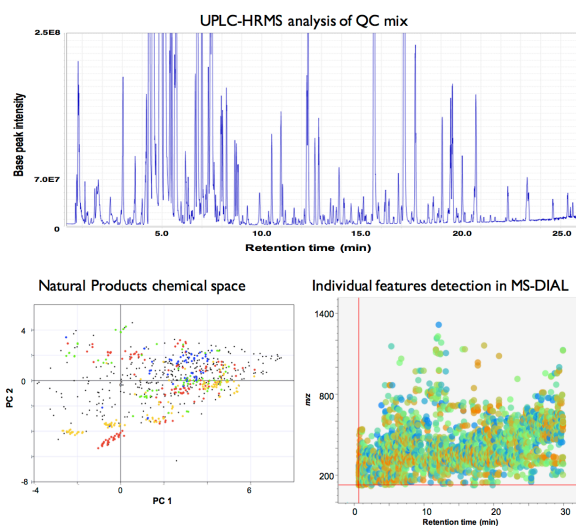


Fig.1 Profiling of QC mixture

確立した条件を使って約 15000 種類からなる植物エキ斯拉イブラリーのプロファイリングにおける QC として使用した。96well プレートに 2.5mg/mL DMSO 溶液の各植物エキスを、1 プレートの 1 列には QC 混合溶液を必ず加えることとし、慎重にサンプルプレートを調整した。現段階で 20 プレート、1600 種類の植物エキスの測定を終えた。得られた MS2 データは数百万スペクトルにも及ぶ膨大なデータ数となった。このような膨大なデータの処理を迅速かつ容易に行うためのツールを開発する必要性が課題として残ってはいるが、まずは 6 プレート分、約 500 種の MN 解析を行ったところ、23000 node からなる MN を作成することができた。まず、QC 混合物の MS/MS スペクトルデータは先の結果とほぼ一致していることから、LC 分析は適切に測定できていると判断した。また、QC 由来のクラスター分析を行ったところ、同定できた化合物群は先の解析結果とほぼ一致し、得られた MN は信頼できるものであると評価した。植物の科目ごとにグループマッピングを作成して色分けをすることによって、各々のクラスターのケモタキシノミーも一気に確認すること

ができ、例えば、1色からなるクラスターは、この植物特有の成分であると判断することができる。得られたMNからISDBによる推定構造を抜き出し、Scaffold-Hunter<sup>3</sup>などの解析ソフトを用いて、化学構造類似性を元にグループ化させたケミカルツリーを作成し、グループ内の化合物の共通部分構造を見出した。現在、このファーマコフォア情報をもとに活性化合物の探索研究を進めている。

一方、化合物を同定する方法として、実測マススペクトルデータベースの活用、*in silico*マススペクトルデータベース、代謝物データベース検索とComputational mass fragmentation法の活用などがある。本QCmixのベンチマークとしての機能を検証するため、QCに含まれる化学成分の同定を上記手法を用いて試みた。用いたソフトウェアは主にMS-FINDER、<sup>3</sup>SIRIUS、<sup>4</sup>MetFrag<sup>5</sup>など未知化合物の組成式の決定とComputational mass fragmentation法の両方法を兼ね備えた構造推定能力が高いと評価されているもの及びISDBを用いた。QCに含まれている植物はすでに十分な化学成分研究が行われているものであることから、文献情報をもとにソフトウェアが提案した候補化合物を検証していくと、いくつか問題点が浮かび上がってきた。そこで、スペクトル類似性、植物学的分類、構造類似性、物理化学的性質の4つをスコア化して統合したメタスコアを提唱し、これを組み込んだオリジナルのアプリケーションの開発を目指すこととした。まずは、各アプリケーションからexportされた結果を手作業で解析していたが、それぞれのアプリケーションに対応したスクリプトを作成し、結果解析を自動化できるようにした。現在、アプリケーション開発を目指して、スクリプトの統合、プログラミングを進めているところである。

## 考察

本研究では、5つの植物からなる品質管理混合物QC mixを開発した。これは、誰もが容易に調整可能であり、NPプロファイリングおよびメタボロミクスにおける構造推定ワークフローの品質評価のための普遍的なQCとなり得ることを示唆した。また、複雑

な解析作業が必要とされる膨大な植物抽出物ライブラリーのモレキュラーネットワーキングと、生理活性評価を組み合わせた創薬指向型モレキュラーネットワーキングプロファイリング構築の例は私の知る限り知られおらず、チャレンジングな課題であり、その手法は今後の天然物メタボロミクスの発展に大きく貢献するものと期待できる。質量分析を基盤とするメタボロミクス研究、特に天然物メタボロミクスは、近年急速に発展してきているものの、プロテオミクス研究などと比較して決定的かつもっとも遅れているのが検出されたピークからの化合物推定であり、大きな研究領域となっている。最大の問題点は天然物化合物の最大の魅力である物理化学的性質の多様性である。課題は山積みではあるものの、天然物化学の領域においてメタボロミクスは間違いなく必要な技術であり、将来主流となる手法である。本研究がこれからメタボロミクスを始めようとする多くの研究者の一助になることを期待する。

## 参考文献

1. Wang, M. et al., *Nat. Biotechnol.* **2016**, 828.
2. Allard, PM. et al., *Anal Chem.*, **2016**, 88, 3317.
3. Till S. et al., *J. Cheminform.* **2017**, 9.
4. Tsugawa, H. et al., *Anal Chem.*, **2016**, 88, 7946.
5. Kai Dührkop et al., *Proc. Natl Acad Sci*, **2015**, 112, 12580.
6. Ruttkies C., et al., *J. Cheminform.*, **2016**, 803.

## 研究の発表

口頭発表

1. Miwa Kubo, Pierre-Marie Allard, Jean-Luc Wolfender, 65th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Basel, Switzerland, September 2017.
2. Miwa Kubo, Pierre-Marie Allard, Jean-Luc Wolfender, Swiss Group for Mass Spectrometry 2017, Beatnburg, Switzerland, November 2017.