

氏 名 田中 弥

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2010 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Physicochemical Prediction of Metabolite Fragmentation in
Electrospray Tandem Mass Spectrometry

論文審査委員 主 査 教授 前島 一博
教授 宮城島 進也
教授 木村 暁
教授 中村 保一
チームリーダー 平井 優美 理化学研究所
環境自然科学研究センター

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

The word ‘metabolome’ means the whole set of metabolites existing in an organism. To diagnose disease, examine influence of drugs and diets, or elucidate functions of genes, metabolome in human and other organisms have been measured in various studies. One of the major techniques to measure metabolome is mass spectrometry (MS). MS distinguishes metabolites according to their mass. To obtain detailed structural information of metabolites, tandem mass spectrometry (MS/MS) is utilized. Each metabolite is decomposed into fragments which correspond to its substructures. Mass and abundance of each fragment is described as an MS/MS spectrum. As the fragmentation pattern depends on the metabolite structure, matching of the measured MS/MS spectrum with a standard one in databases is an important criterion to identify metabolites.

Current bottleneck of metabolite identification is insufficiency of MS/MS spectral databases. In a metabolome measurement, usually only up to ~ 20% of detected metabolites are identified because of absent matching standard MS/MS spectra. Since the standard spectra are measured from purified metabolites, there are limitations to obtain MS/MS spectra of all existing metabolites by experimental measurements.

To overcome that, many research groups have tried to build a theoretical MS/MS spectral library independent of the measurements. Several groups, including us, have achieved that, but mechanisms of metabolite fragmentation are not fully clarified. Without mechanistic insights, prediction of general metabolite fragmentation will not be realized. To achieve the mechanistic prediction, I will discuss utilization of physicochemical calculation. The aim of the present study is to construct a physicochemical strategy to predict metabolite fragmentation in MS/MS.

At first, I examine ability of physicochemical calculation to determine fragment structures. The subjects are putative substructures annotated on peaks of MS/MS spectra with matching compositional formulae. The compositional formulae count in movement of hydrogen atoms along the fragmentation, which is formalized as hydrogen rearrangement rules. Comparison of enthalpy calculated with computational chemistry between bound and fragmented state provides evidence that the putative fragments indeed arise in experimental measurements with feasibly low energy. Furthermore, several putative fragments which have unusual electronic structure are proved sufficiently stabilized by broadly distributed electronic structures confirmed by the calculation. The physicochemical calculation reveals energetic stability of fragments and the origin of the stability by elucidating electronic structures on metabolites.

As an extension of the energetic analyses, I will present metabolite identification without standard MS/MS spectra. The metabolite to identify is a lipid, β -hydroxyl ceramide. It has structural isomers including an α -hydroxyl ceramide. Since the β -hydroxyl ceramide has no authentic standards, its standard MS/MS spectrum is not available in any database. Chromatographic separation and supportive MS/MS measurement discriminate the β -hydroxyl ceramide from most of its structural isomers. However, another isomer, γ -hydroxyl ceramide, remains unseparated. The problem is whether β - and γ -hydroxyl ceramides can produce the

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

diagnostic fragment experimentally measured in MS/MS. I simulate the entire fragmentation processes of the ceramides by computational chemistry. The simulation reveals that the β -hydroxyl ceramide smoothly produces the measured fragment, while the γ -hydroxyl ceramide hardly produces it because of the high-energy barrier. From that, I identify the metabolite as the β -hydroxyl ceramide without standard spectra.

The investigation stated above uncovers the energetic influence of chemical groups for bond cleavage. A chemical group next to the cleaved bond fairly lowers the energy barrier of the fragmentation.

Finally, I integrate the effects of chemical groups into spectral prediction as bonding pattern assignment. Each chemical bond composing a metabolite is assigned a bonding pattern which consists of two bound atoms and neighboring chemical groups. Precise cleavage activation energy of the bonding pattern is calculated with physicochemical simulation of its fragmentation process. By tracing low-energy cleavage steps, a theoretical MS/MS spectrum is predicted. On a dipeptide molecule, its experimental standard MS/MS spectrum is successfully reproduced by this strategy. Physicochemical calculation is proved promising to predict MS/MS spectra only from metabolite structures. Details of the prediction as well as several improvements suggested by another molecule will be discussed in this dissertation.

To build a theoretical MS/MS spectral library which can cope with the enormous variety of metabolites, activation energy of all bonding patterns need to be pre-computed and stored in a form of library. With the library, each bond composing a metabolite can be assigned its cleavage activation energy with its bonding pattern recognized. Then fragmentation of the metabolite is predicted by tracing low-energy cleavage to produce a theoretical MS/MS spectrum. Remaining problems to realize that will be discussed at the end of this dissertation.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

生体内には核酸やタンパク質のほか、糖、有機酸、アミノ酸など多くの代謝産物が存在する。これらの代謝産物の多くは、生体の代謝活動によって産み出されたものであり、生体の働きを理解するためには包括的な解析が必須である。近年開発されたメタボローム解析は生体内のさまざまな代謝産物を定量的に明らかにすることができる。タンデム質量分析計を用いたメタボローム解析で最も重要なのが、得られる MS/MS スペクトルの情報に基づいて代謝産物を同定することである。このため、 10^7 種類と予想される膨大な代謝産物の MS/MS スペクトルライブラリーの作製が必要であるが、スペクトルを取得するための標準化合物全てを用意するのは実質的に不可能であり、現状では 10^4 種類程度の代謝産物についてのライブラリーしか存在していない。田中さんは理論化学的計算によってエレクトロスプレーイオン化法による代謝産物の化学結合の切断を予想し、このライブラリーを整備・拡張することを最終目標として研究をおこない、主に以下のことを見出した。

1. 代謝産物のエネルギー計算をおこなうことにより、断片構造のエネルギー安定性の観点から断片化のメカニズムをある程度明らかにすることができた。そして従来の経験則では構造予測が難しい断片を産み出すことが分かっていた 5 つの代謝産物 (2'-deoxycytidine 5'-diphosphate, 3-indoxyl sulfate, phosphocholine, kaempferide, isoprotruron) についてエネルギー計算をおこない、実験による断片化と一致する結果を得ることに成功した。
2. 代謝産物のエネルギー計算方法をセラミドに適用し、従来の経験則では構造が決定できなかった β -hydroxyl ceramide と γ -hydroxyl ceramide を計算によって、 β 型と決定できた。このことによってセラミドの断片ライブラリーが完成した。このライブラリーを使ってヒト・マウスのセラミドを含むスフィンゴ脂質の構造が決定できるようになった。
3. 上記の計算過程で、代謝産物の切断点周辺の官能基が断片化に影響を与えていることを見出した。このため、化学結合の最近接の原子により化学結合をパターン化 (bonding pattern) し、それぞれの結合パターンの活性化エネルギーを求めれば、代謝産物の断片化がある程度予測できることを、アミノ酸が 2 つ連結した代謝産物である glycyleucine などを例に示した。

最近接の原子のみを考慮した化学結合パターンは 578 パターンと見積もられている。田中さんは、そのすべてのパターンの活性化エネルギーをあらかじめ計算しておけば、ある程度の代謝産物の断片化の予測ができることを示した。これは代謝産物断片ライブラリーの理論化学的計算による整備・拡張の可能性を強く示唆するものである。得られた成果は代謝産物の断片化メカニズムの理解を深め、メタボローム解析の発展に寄与する学術上の優れた研究である。以上のことから田中さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。