

植物科学最先端研究拠点ネットワーク  
「ワイドターゲットメタボローム分析」支援について (ver. 1.2)

理化学研究所  
PSC 代謝システム解析チーム

## 主旨

この文章は、効率的に研究支援を行うための手引きです。

## 研究支援の流れ

- ① 研究支援の事前連絡（貴研究室→当チーム）：目的、対象、サンプル数
- ② 事前打ち合わせ：必要情報、納期の確認など
- ③ 利用申請書提出（貴研究室→事務局）
- ④ 採択の連絡（事務局→貴研究室）、支援開始
- ⑤ プレサンプルおよびサンプル提供（貴研究室→当チーム）：新規の場合はプレサンプル必須
- ⑥ 測定結果（当チーム→貴研究室）：定性データ（検出対象の Area 値）  
\*定量データ（サンプルあたりの mol 換算値）  
\*内部標準物質が提供されれば対応可能な場合があります。
- ⑦ 結果の解釈（貴研究室→当チーム）：データの解釈のフィードバック、論文化の相談
- ⑧ データ公開（貴研究室、当チーム）

## ワイドターゲットメタボローム分析の流れ（詳細は後述）

1. サンプル培養
2. サンプリング
3. 破碎・抽出
4. 分析：UPLC-タンデム四重極 MS を用いたターゲット分析
5. データ解析
6. 結果の解釈
7. データ公開

## 注意点

- 1, 2：当チームではサポート不可。また同一シリーズでは条件をそろえてください。可能であれば当チームの方法に合わせてください。
- 2-6：別紙参照。

4-6：処理区の間で代謝産物の蓄積量に5-10倍の差がある場合は再現性が高い。そうでない場合、解析が難しいです（要相談）。

同一処理区内でも、サンプル間の代謝産物量には数倍程度のばらつきがあることが、経験的にわかっています。当チームにとって新規の実験デザインである場合、分析上のエラーとの区別が付かないため、マージンを広く取って、確実に再現する代謝産物のデータのみを解析対象としています。（後述）

### 測定が難しいサンプル

物理的な理由：硬いまたは大きいサンプル。水に不溶または揮発性の代謝産物。

再現性が低い：通常5-10倍程度の差でないと再現性は低い。

測定時間上の理由：サンプル数が多い（100以上）。抽出以降が自動化できないもの。

研究支援に不向き：論文化できない、大規模スクリーニング、目的が明確でないなど。

### 費用負担

サンプリングチューブとサンプル破砕用のビーズ(後述)はご購入くださいますようお願いいたします。また、サンプル数に応じて溶媒等の購入をお願いすることがあります。別途高額な試薬等が必要な場合はご相談ください。

### Authorship

成果発表の際には、共著でお願いいたします。また、Acknowledgments等に以下の内容の文章の記載をお願いいたします。

(例) This research was supported by Japan Advanced Plant Science Network.

### 納期

既存の系で測定可能な化合物：1-2週程度で結果（Excelファイル）を返却。

測定可能な化合物リスト（後述）に存在しない化合物：測定可能であれば1-2ヶ月程度。

納期は、機器の故障およびサンプルの混雑状況によって異なります。大幅に遅れる場合は事前に連絡します。

### 支援開始の時期

H23年5月中旬より支援開始の予定ですが、技術改良は継続して行っています。

以上の項目をご理解いただきましたら、次項以降を参照の上、

研究目的（知りたいこと）

サンプル情報とサンプルリスト（サンプル数）

をお送りくださいますようお願いいたします。

**連絡先**    [myhirai@psc.riken.jp](mailto:myhirai@psc.riken.jp) 平井優美（代謝システム解析チーム チームリーダー）  
             [ysawada@psc.riken.jp](mailto:ysawada@psc.riken.jp) 澤田有司（代謝システム解析チーム 研究員）

★★ワイドターゲットメタボローム分析の方法：当チームのプロトコールを参考に★★

測定可能なサンプル

- 生重量で 20-100mg 程度植物組織および種子
- Mixer mill で破碎可能な物
- 最大 100 個程度/回 (計画的な予備実験は推奨しますが、スクリーニングは原則不可)
- 測定経験のない対象の場合プレサンプルが必須 (8-16 サンプル程度が理想ですが、数は要相談)。

※これら以外のサンプルは多段階の検討が必要であるため、要相談

測定可能な化合物 (2011 年 2 月現在)

約 700 化合物。リストはウェブサイト DROP Met を参照。

[http://prime.psc.riken.jp/?action=drop\\_index](http://prime.psc.riken.jp/?action=drop_index)

理研PSCメタボローム基盤研究グループのPRIMEプロジェクトで収集した、植物中に存在すると思われる、かつ市販品が入手できたものが中心。

上記にない化合物にご興味がある場合、標準化合物をご提供頂ければ分析条件を検討して分析できる場合があります (要相談)。

**1. サンプル培養**

添付資料参照。

サンプルシリーズ内で一定であれば基本的に任意 (完全な一定条件はありえない)。

**2. サンプルリング**

1 サンプル 20-100mgFW を、下記のサンプルリングチューブに、下記のジルコニアビーズ 1 個とともに入れる。

2 ml tube : Assist 2ml サンプルリングチューブ (セーフシール) Cat.No. 72.695

5 mm ジルコニアビーズ : アズワン 品番 5-4060-13 型番 YTZ-5 直径 5 mm

製品はこれに固定している : 組み合わせを変えると破碎中にチューブが破裂する。

しかるべき方法でサンプルリング後、直ちに秤量。

(チューブに予めビーズを入れて風袋除去、試料を入れて秤量する)

↓

秤量後直ちに液体窒素で凍結、-80 度で保存。

↓

送付の場合は、ドライアイスを入れてクール便で送付。

※完熟種子の場合は、液体窒素での凍結不要。室温でお送りください。

※シロイヌナズナ完熟種子の場合、シロイヌナズナ種子専用分注スプーン”シードスプーン” (<http://www.bmsci.com/system/plant/seed.php>) で1チューブあたり200粒を入れてください。これを3チューブ以上ご用意ください (n>=3で分析)。

※形質転換植物の種子の場合は搬入搬出に別途手続きが必要です。

※以下の破碎・抽出は当方で行います。

### 3. 破碎・抽出

液体窒素で凍結状態のまま Beads mixer (Mixer mill) で 25Hz 2min で破碎。

↓

抽出溶媒 80% MeOH 0.1% HCOOH を加える。Volume で 400 uL 以上。

↓

以降は自動分注機で全自動サンプル調整 (動画はウェブサイト PRIME で公開予定)

Sample transfer → dry-up → resolution → filtration

ウェブサイト PRIME: <http://prime.psc.riken.jp/>

### 4. 分析 および 5. 解析

Xevo TQ-S (Waters 社) を使用、MRM mode で約 700 化合物検出可能<sup>\*1</sup>

参考文献 : Sawada Y, Akiyama K, Sakata A, Kuwahara A, Otsuki H, Sakurai T, Saito K, Hirai MY. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. *Plant Cell Physiol.* 2009 Jan;50(1):37-47.

プレサンプルを用い、約 700 化合物すべてを検出可能な分析条件で予備分析 (分析時間: 1時間/サンプル<sup>\*1</sup>)

↓

プレサンプルで検出された化合物 (経験的に約 100-200 化合物程度)<sup>\*2</sup> のみを検出する分析条件で、本サンプル<sup>\*3</sup> を定量的に分析 (所要時間: 10-30 分/サンプル)。

↓

定量データをエクセルファイルで返却

\*1 予め、標品化合物を用いて、各化合物に対して「リテンションタイム」と「特異的プレカーサーイオン」「特異的フラグメントイオン」を決定しておき、これをモニターします (Multiple reaction monitoring:MRM)。

サンプルの1インジェクション(3分間のラン)でモニターできるのは約40化合物なので、約700化合物(全セット)の検出のための分析は:

$$(\text{約 } 700 \text{ 化合物}) = (40 \text{ 化合物/injection}) \times (20 \text{ injection})$$

$$(20 \text{ injection}) \times (3 \text{ 分/injection}) = (60 \text{ 分})$$

で1時間かかります。

\*2 実際の植物サンプルでは検出されない化合物が多く、これをモニターすることはサンプル量・分析時間の両方のロスとなります。ですので、測定対象で検出される化合物(=代謝産物サブセット)をプレサンプルで決定してから、本実験を行います。

プレサンプルの数は、理想的には8-16くらいです。自動分注機で扱える液量の問題で、2サンプルずつを混ぜて4-8ウェル(96穴または384穴プレートでハンドリング)に入れて分析します。化合物の検出頻度を調べ、全てのウェルで検出できた化合物のみをサブセットとします。

\*3 本サンプル:代謝産物サブセットの化合物数に応じて、数個から最大100サンプル程度を本サンプルとして分析します。この数を超えると、他の研究計画を圧迫しますので、現状ではお引き受けできません(要相談)。

## 6. 結果の解釈

お返しするデータは、基本的に検出化合物の濃度(生重量あたり)ですが、生物学的な差異が見えているのか、分析上の問題で差があるように見えてしまっているのかを判断するために、サンプルの詳細(栽培条件、遺伝学的バックグラウンド、処理法など)と予想される差異(研究で明らかにしたいこと)とを必ずお知らせください。いただいた情報を元に、当チームでも下記の検定を行うことがあります。

コントロールとの比較: *t*-test

多グループ間で比較: ANOVA

各サンプルに特徴的な化合物の抽出: PCA, PLS, BL-SOM, HCA

分析上の問題があるかどうかを明確にするため、結果の生物学的な解釈はぜひ当チームにフィードバックしてください。

## 7. データ公開

ご要望がない限りは、すべてのデータは最終的に公開して下さるようお願いします。

(1) 結果とその解釈: 論文

(2) 生データ、加工データ：論文が in press になった時点で、当チームのウェブサイト PRIME から公開する。

特に、公共性の高いリソース（NBRP のバイオリソースなど）はデータベース化し一般ユーザーが利用可能な Web application として公開する予定です。

## 8. 添付するエクセルファイルについて

### 基本仕様

Excel 2007 ファイル 1 個（ワークシート 3 枚）

#### Sheet 1: Project 番号\_IS

各分析のぶれを示しています。

Relative standard deviation (RSD) <5-15%程度ならば OK

明らかに低い値の場合は分析が失敗している場合があります。

#### Sheet 2: Data\_Area

行ごとに化合物、列ごとにサンプルを示して値は Area 値です。

サンプルには連番、生重量（シロイヌナズナ種子の場合は粒数）、グループ名が付いています。

注意：解析時に Area 値で閾値を決める場合は自己責任でお願いします。

特に決まっているルールは有りません。

#### Sheet 3: Data\_IS

IS は Internal standard の略で、インジェクション毎の誤差を補正するために各サンプルのインジェクション毎に必ず測定しています。

$\text{Data\_Area} / \text{Data\_IS} = \text{補正值}$ です。

注意：補正值を使う方が理論上は正しいが、実質的に間違える場合があります。

例

補正後増えた！ → IS 値が少ないのでは？

補正後減った！ → IS 値が多いのでは？

補正值を使う場合は以上の点をご確認ください。

★★サンプルに付加していただきたいデータ★★

① サンプルリスト

生重量データは、エクセルファイルでリストにしてお送りください。

サンプルについて気の付いた点も付記して頂くと、分析のエラーかどうかのよい判断材料になります。

例)

No.	Name	F.W.	comment
1	WT	10	
2	KO	20	
3	OE	30	
4	WT	10	かびてる
5	KO	20	色が変わ
6	OE	30	

② メタデータ：照度、ライトサイクル、湿度、温度、栄養または給水頻度（土植え）

例)

**寒天培地**

培地ID	名称	組成
1	MS	1xMS Salts, 1xMS vitamins, 0.05% MES, 1% Sucrose, 0.8% Agar, pH5.8 with 1M KOH
2	1/2MS	1/2xMS Salts, 1xMS vitamins, 0.05% MES, 1% Sucrose, 0.8% Agar, pH5.8 with 1M KOH
3	GM	MS Salts, 1xGM vitamins, 0.05% MES, 1% Sucrose, 0.8% Agar, pH5.8 with 1M KOH
4	Fox	1xMS Salts, 1xMS vitamins, 1% Sucrose, 0.8% Agar, pH5.8 with 1M KOH

**使用試薬**

MS Salts	ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(和光純薬)
MS vitamins	1000xMurasige and Skoog vitamin sol. (SIGMA)
GM vitamins	1000xGamborg's vitamin sol. (SIGMA)
MES	MES (同仁化学、和光純薬)
Sucrose	Sucrose (和光純薬)
Agar	INA AGAR (伊那食品工業、フナコシ)

**シャーレ類**

シャーレID	名称	規格
1	9cm丸型	IWAKI 深型 90x20mm ポリスチレン
2	15cm丸型	CORNING 150x25mm ポリスチレン
3	角型	EIKEN 2号角シャーレ

**栽培土壌**

**混合土調整法**

PRO-MIXとパーミキュライトを2:1の割合で混合し、1000倍希釈のハイポネックスで湿らせ、粒肥2~3粒を入れたアラシシステムのバスケット最上部まで詰める。

**培養土、肥料**

PRO-MIX	PRO-MIX(PREMIER HORTICULTURE INC)
パーミキュライト	ブイエス科工株式会社
ハイポネックス	ハイポネックスジャパン
粒肥	東商 花と野菜の化成肥料

**栽培用ポット**

アラシシステム Arasystem (Betatech bvba)

**使用栄養**

以下の栄養を週二回与える。

栄養ID	名称	組成
1	純水	RO水
2	水耕液	1xstock solution No.1, 1x stock solution No.2, 1xstock solution No.3, 1xstock solution No.4
3	1/2水耕液	1/2xstock solution No.1, 1/2x stock solution No.2, 1/2xstock solution No.3, 1/2xstock solution No.4

**stock solution No.**

	total miliQ up to 1L
1	200xPi 36g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·Anhydrous (和光純薬), 7.1g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·Anhydrous(和光純薬), A/C
2	200xCa K N 94.4g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (和光純薬), 60.7g KNO <sub>3</sub> (和光純薬), A/C
3	200xMgSO <sub>4</sub> 74.0g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (和光純薬), A/C
4	200xMicro 4.35g Na <sub>2</sub> ·EDTA·2H <sub>2</sub> O (ナカライテスク), 732.7mg NaFeEDTA·3H <sub>2</sub> O(FeIII)(同仁化学、和光純薬), 407.7mg MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O(ナカライテスク), 27.53mg ZnCl <sub>2</sub> (和光純薬), 32.73mg CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (和光純薬), 370.98mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (和光純薬), 5.93mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O(和光純薬), 6.19mg CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O(和光純薬), filtration