

代謝中間産物の細胞内動態の網羅的化学分析法の開発

●西岡 孝明¹⁾ ◆寺部 茂²⁾

1) 京都大学大学院農学研究科 2) 兵庫県立大学大学院物質理学研究科

〈研究の目的と進め方〉

研究の背景

多くの生物種についてゲノム配列の解析がおこなわれるとともに、マイクロアレイやプロテオーム解析など omics と呼ばれる測定技術が開発された。それらによってゲノム情報の流れに沿って、遺伝子発現や蛋白質相互作用を網羅的に測定することが可能になった。これに対して、ゲノム情報の下流にあって、表現型の物質的基礎ともいべき代謝物質はあまり研究者の興味を引かなかった。その原因として次の2つを挙げることができる。

第一に、代謝物質の測定に適した化学分析法がなかったことを挙げることができる。従来の化学分析法は、気化しやすい、あるいは、中性の代謝物質を分離するガスクロマトグラフィー (GC) や液体クロマトグラフィー (LC) を用いていた。これらは生理活性を有する天然物などの2次代謝物質の分析に適していた。これに対して、グルコースなどを出発原料として、化学エネルギーを産み出し、アミノ酸や核酸を生合成する代謝中間体は、リン酸基やカルボキシル基、アミノ基を有するイオン性物質であるので、GC や LC などの分離には適していない。そのため、これらの中間体を網羅的に化学分析する方法がなかった。

第二に、ゲノムには代謝物質に関する情報がコードされていないことを挙げることができる。代謝物質は酵素蛋白質の触媒による化学反応の産物であり、細胞内で多くの化学反応が同時に進行し、化学反応どうしが代謝反応ネットワークと呼ばれる複雑なネットワークを形成している。このために、代謝物質を遺伝子と1:1に関連付けることは難しい。

これらの原因のうち2番目は KEGG をはじめとする代謝と遺伝子を関係づけるデータの収集、統合によって、ゲノムと代謝物質との関係は明瞭になってきたことから、障害は取り除かれつつある。化学分析法の開発だけが残された課題であった。

研究の目的

細胞内に存在する代謝物質の同定と定量をおこなう最適な化学分析法を開発し、これを用いて環境やの変動や遺伝子の変異など、生物がおかれている内外の環境変動がどのように代謝物質に影響するのかを測定することを目的とする。それによって、DNAマイクロアレイなどポストゲノム科学の網羅的な測定データと組み合わせて代謝活動を総合的に理解することを可能にする。

〈研究開始時の研究計画〉

細胞の維持と増殖に必須な物質とエネルギーを供給しているエネルギー代謝 (解糖系、ペントースリン酸経路、TCA回路) の代謝中間産物は、糖リン酸化物やジカルボン酸などいずれもイオン性物質である。エネルギー代謝はその重要性にもかかわらず、イオン性物質のために従来用いられている化学分析法 GC や HPLC では容易に定量ができないので、代謝に関する研究が遅れていた。

そこで、エネルギー代謝に含まれる代謝中間体ほか300代謝物質の同定・定量を最初の到達目標とした。その分析法として、イオン性物質の分離法であるキャピラリー電気泳動法 (CE) に着目した。しかし、CE を代謝物質の分析に利用するためには、「CE/MS の実用化」と「高分離、高感度分析法の開発」が不可欠であった。

さらに、代謝物質を細胞から抽出する方法の開発も大きな検討課題であった。細胞内にある代謝物質の化学分析には、酵素反応を瞬時に停止し、さまざまな物性を有している代謝物質を細胞内プロファイルを保存したまま抽出する方法の開発も不可欠であった。

〈研究期間の成果〉

研究成果は化学分析法の開発と、それを用いて明らかにした細胞内代謝に関する知見の2つに分けることができる。

1. 化学分析法の開発

1-1. 代謝物質の数と物性

はじめに細胞内にはどのような代謝物質があるのか推定した。Dictionary of Natural Products (Chapman and Hall, 2005 年版) には約 19 万化合物が収録されている。この化合物数は、これまでにさまざまな生物種から単離・化学構造が明らかにされた天然物、すなわち代謝物質、の総合計である。それでは、1生物種にはどれくらいの種類の代謝物質があるのだろうか?ゲノムにコードされている酵素遺伝子からその酵素反応の基質や生成物を代謝物質として推定すると、大腸菌やシロイヌナズナではそれぞれ約 800, 1,000 化合物である。これらはいずれも1次代謝物質であり、生理的条件下でイオンになる、あるいは高い極性の官能基を含む化合物が約9割を占めている。未同定遺伝子を考慮して、分子量 1,000 程度までの代謝物質は生物種あたり 1,000 から 3,000 化合物ぐらいと予想した。

一般に化学分析は、分離をおこなうクロマトグラフィーと、同定・定量をおこなう質量分析 (MS) を組み合わせでおこなう。これまで代謝物質の分離にはGCとLCが用いられてきた。GC は分析試料を気化して分離するので、分析試料の蒸気圧が高くなければならない。イオンに解離する、あるいは高い極性の官能基が分子内にあると蒸気圧が低いので、これらの官能基をあらかじめ非極性基に変換する化学誘導体化をおこなってGCで分離している。しかし、化学誘導体化には測定の再現性や定量性が低い、代謝物質の同定が困難などの問題がある。例えば、ジャガイモなどの植物組織をGC/MSで分析した結果では、約6200のピークを検出したものの同定や定量に利用できたものは300-500ピークにすぎなかったという報告がある。また、イオン交換 HPLC はイオン性物質の分離に利用できるが、分離性能が低いことや泳動緩衝液の組成が非揮発性成分であるので検出にMSを利用できない、という問題がある。

そこで、イオン性および高極性代謝中間体をそのまま

分離できる CE に注目した1)。

1-2. アニオン性代謝物質の CE/MS による分析法の実用化

CE と MS を組み合わせた CE/MS は本研究課題のスタート時には実用化されていなかった。2 年度から市販の CE/MS が利用できることになった。しかし、代謝中間体の測定をおこなうためには、解決しなければならない難問題があった。すなわち、CE/MS を用いたカチオンの分析法は容易に実現できたが、アニオンの分析は未だできなかったからである。

ここでまず、アニオンの泳動について説明しよう (図 1)。

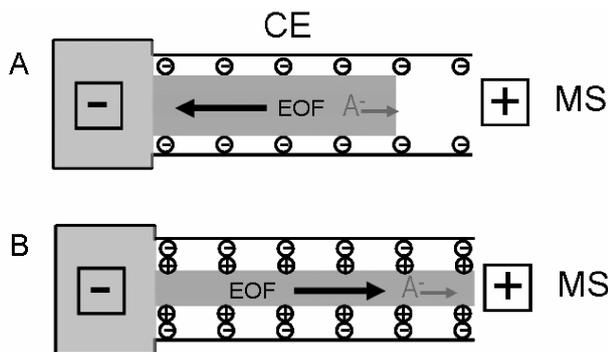


図 1. CE/MS におけるアニオンの泳動。A. 電気浸透流 (EOF) は MS と反対方向であるので、CE と MS との接続部分でギャップを生じている。B. 逆浸透流法ではギャップを生じない

アニオンを MS の方向へと泳動するためには、CE に MS との接続部分を + 極にして加電圧する。このとき電気浸透流 (EOF) は MS と反対方向 (- 極) へ泳動するので、CE に導入した分析試料が流れ出すことになる。さらに、CE と MS との接続部分は低気圧になっているので、泳動液が途切れて、ギャップを生じ、泳動することができなくなる。

そこで、キャピラリーの内壁を塩基性ポリマーでコーティングした SMILE(+) キャピラリーを用いて、電気浸透流を逆方向へと流す逆電気浸透流法を採用することによって、アニオン性代謝物質の CE/MS による分析を実現した2)。

しかし、ポリマーコーティングしたキャピラリーを用いることによってもう 1 つ別の問題を生じた。アニオン性代謝物質のうち、Succinyl-CoA などの CoA 誘導体や、ATP などのヌクレオチド化合物は、大きな疎水性基を有しているのでポリマーに吸着した。吸着によって定量性や感度が著しく損なわれた。そこで、ポリマーコーティングしないキャピラリーを用いて、キャピラリー端を加圧することによって泳動液を MS 方向へと流した。これによって定量性や感度を損なうことなく分析することができた3)。

以上のように、カチオン性代謝物質、アニオン性代謝物質、ヌクレオチド化合物、という 3 つ分離法を併用することによってイオン性および高極性の代謝中間体を CE/MS でほぼ網羅的に分析することができることがわかった。

1-3. データの再現性

代謝中間体の同定と定量をおこなうために、標準物質を用いて、泳動時間の測定と検量線の作成をおこなった。アニオン、カチオンそれぞれの泳動には、それぞれ 1 つあるいは 2 つの内部標準物質を添加して泳動時間の補正と MS ピーク面積の補正をおこなった。MS スペクトル

の測定は quadrupole 型 MS を用いて、一回の泳動で 30 の異なる m/z 値でイオンを測定する single ion monitoring (SIM) モードでおこなったので、 m/z 70 から 1000 までの代謝中間体を測定するためには、31 回の繰り返し泳動を必要とした。後に、質量分析計を time-of-flight MS (TOF-MS) を用いることによって、一回の泳動で m/z 70 から 1000 までの代謝中間体の定量分析をすることができるようになった。

CE の泳動は極めて再現性が高く、代謝中間体の移動時間の誤差は 1-0.5% であった。また、MS のピーク面積の誤差は約 5-3% であった。これらは、移動時間と分子質量の 2 つのパラメータで代謝物質の同定と定量ができることを意味している。

このようにして、CE による移動時間と MS ピーク面積を約 850 代謝中間体について測定し、検量線を作成した。

2. CE の高分離、高感度分析法の開発

2-1. ジカルボン酸の分離条件の設定

エネルギー代謝系とりわけ TCA サイクルにはクエン酸をはじめコハク酸やリンゴ酸など、ジカルボン酸が多い。これらを先に設定した標準的な分析条件で CE/MS 分析したところ、他のアニオン性代謝物質と比べて著しくジカルボン酸の検出感度や再現性が低かった。詳細に検討した結果、これは泳動液中に超微量で存在する金属イオンがジカルボン酸に配位することが原因であることを突き止めた。超純水を用いて泳動液を調製することによってこの問題を解決した。

2-2. 異性体の分離条件の設定

代謝中間体には異性体が数多く存在する。例えば、glucose-1-phosphate、glucose-6-phosphate、fructose-6-phosphate は分子質量がまったく同じで、しかも互いに物性がよく似ているので、CE の移動時間がほとんど同じである。分子質量が同じであるので MS では互いに識別することができないので、それぞれの異性体を定量しようとする CE で分離しておかなければならない。他にも citrate と isocitrate のようにジカルボン酸でも異性体があるので、さまざまな化学的組成を有する異性体を同時に分離する泳動条件の設定が要求された。泳動液の pH をはじめ、緩衝液成分の組成をいろいろ試して、さまざまな異性体が同時に分離する泳動液の組成を決定した3)。(図 2)

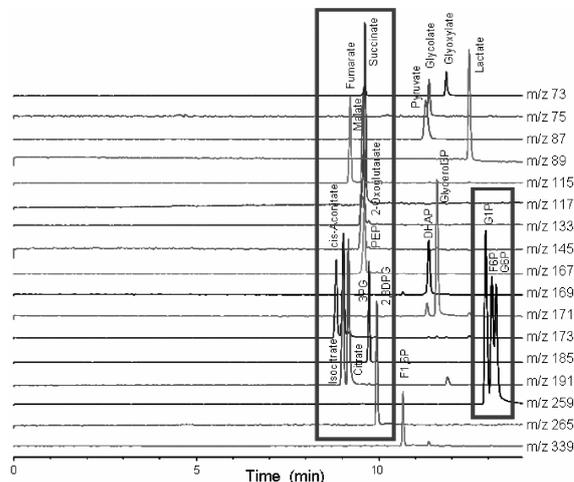


図 2. 代謝中間体の異性体 (四角で囲む) も分離

2-3. オンライン濃縮法による高感度検出法の開発

レーザー励起蛍光検出とオンライン試料濃縮法とを組み合わせて、リボフラビン、FMN、FAD 3 種の高感度分析法を確立した。pH ジャンクションとスウィーピングを組み合わせたオンライン試料濃縮法を開発し、これら補酵素の高感度分離検出を可能とした。検出にアルゴンレーザー(488 nm)を、泳動液に 100 mM SDS を含む 140 mM ホウ酸塩緩衝液(pH 8.5)、試料溶媒には SDS を含まない 75 mM リン酸塩緩衝液(pH 6.0)を用いると、3 種の化合物の検出限界は 10 pM 以下と高感度であった。この方法を枯草菌抽出液中の FMN と FAD の分析に適用した。グルコース培地とリンゴ酸培地で濃度はやや異なるが、FMN、FAD とともに 10⁻⁷ M レベルであった^{5, 6)}。リボフラビンは検出されなかった。

オンライン試料濃縮法としてホウ酸錯体生成反応を利用したスウィーピング法をピリジン及びアデニンヌクレオチドの分析に応用した。紫外吸光検出器を用いても検出感度 2×10^{-8} M が得られた。この方法により枯草菌抽出液中のこれらヌクレオチド類の分析が可能であった。還元型のヌクレオチドは検出できなかった。グルコース培地とリンゴ酸培地での濃度が異なるが、 1×10^{-6} ~ 8×10^{-5} M であり、リンゴ酸培地の方が数倍高濃度であった⁷⁻¹³⁾。

2-4. LC-CE 2 次元分離法の開発

マイクロ液体クロマトグラフィー(m-LC)とキャピラリー電気泳動(CE)とを組み合わせた二次元分析法の開発を行った。試料に代謝中間体と予想される化合物の標準試料 54 種の混合物を用いて条件検討を行った。1 次元目の m-LC には内径 200 mm, 長さ 25 cm のオクタデシルシリル修飾(ODS)シリカモノリスカラムを用いた。溶出にはメタノール-水のグラジエント溶離を行い、溶出液 2 ml づつ(1 分毎)分取し、溶出液を蒸発乾固し、残渣を CE 分離に適した溶媒に再溶解した。分取した各成分を 2 次元目の CE によりそれぞれオンライン試料濃縮後分離した。m-LC からの速い溶出成分は極性化合物なので、ダイナミック pH ジャンクション法と組み合わせたキャピラリーゾーン電気泳動により、溶出の遅い成分は疎水性の強い成分なので、スウィーピングと組み合わせたミセル動電クロマトグラフィーにより分離した。m-LC のみで全成分を分離するのは無理であるが、2 次元分離法により 54 種の標準化合物全部が分離できた。この方法を枯草菌細胞抽出液の分離にも適用し、多くの成分を分離した¹⁴⁾。

3. 代謝中間体の抽出法の開発

3-1. 抽出操作の影響

代謝物質の抽出操作に伴う環境変動が代謝中間体のプロファイルに影響を与えることは容易に想像できる。抽出操作に伴う影響として次の 2 つの要因について検討した。

代謝反応は環境の変化によって速やかに応答して、代謝物質のプロファイルを変更することが知られている。例えば、大腸菌や枯草菌をフラスコ振とう法で好氣的条件下で培養しているとしよう。細胞内代謝物質の分析を行うために、集菌しようとするれば、振とうを停止しなければならないが、停止すると増殖した細胞の呼吸によって培養液中の酸素濃度が低下し、たちまち嫌気的環境になる(環境の変動 1)。さらに、フィルターを用いて培養液から集菌すると、細胞の周りから培養液が除かれ、細胞はたちまち栄養飢餓状態になってしまう(環境の変動

2)。

そこで、集菌操作の各ステップを秒単位で定めるとおりに操作するように何回も練習した。これによって、集菌操作を 10 秒で行うことができ、実験データの再現性は格段に向上した。

3-2. 抽出溶媒の選択

細胞内にある代謝中間体はさまざまな物性をしてるので、それらのプロファイルを損なわないように抽出溶媒を選ぶ必要がある。さらに、無細胞抽出液では代謝中間体物質と酵素タンパク質が共存することになるので、酵素タンパク質を変性・失活させて、代謝反応を停止する必要がある。このような条件を満たす抽出溶媒として、文献ではメタノール、エタノールをはじめギ酸などが用いられている。

代謝中間体がイオン性あるいは高極性物質であることを考慮して極性が高い有機溶媒であるメタノールと、細胞抽出効率が高い抽出溶媒とされているギ酸、について抽出効率と再現性を調べた。その後、ギ酸中では ATP などトリリン酸ヌクレオチド類が加水分解することがわかったので、メタノールを用いて抽出条件を検討した。

氷冷、室温、沸騰メタノールについて抽出効率を調べた。これらの条件間では、抽出効率に有意な差は見られなかった。

イオン性あるいは高極性代謝中間体といえども官能基を除くと疎水性が高いことや、抽出操作の簡便さを考慮して、室温メタノールを抽出溶媒として選んだ。

3-3. 抽出後の処理

キャピラリーは細いために、細胞抽出液に含まれるタンパク質、核酸、多糖類、脂質などが吸着すると、分離効率や感度が損なわれる。そこで、メタノール抽出液に含まれるこれら生体高分子をメンブレンフィルターを用いて、脂質をクロロフォルム分配によって除去した。

これら抽出後の操作における代謝中間体の損失を補正するために、あらかじめ抽出溶媒であるメタノールに内部標準物質を添加しておくことにした。

4. 代謝中間体の化学分析による研究成果

本研究課題で開発した代謝中間体の抽出法と CE/MS 分析法を用いて主に枯草菌の代謝中間体を化学分析した研究成果について紹介する。いずれも振とう培養し、対数増殖期に集菌し、細胞から代謝中間体を抽出したものである。

細胞増殖(細胞分裂)の速度は栄養源の取り込み速度に比例する。言い換えると、代謝反応ネットワークを流れる炭素源の速度(フラックス)に比例する。しかし、本研究での測定はフラックスではなく、すべてある一瞬における細胞内の物質質量、すなわち「代謝中間体のスナップショット」である。

4-1. 枯草菌の全代謝物質の検出

枯草菌をグルコースを炭素源として培養し、菌体を収集した。代謝物質を抽出し、蛋白質や脂質を除いた後、カチオン性代謝物質、アニオン性代謝物質およびモノヌクレオチド類代謝物質のそれぞれに分離条件を最適化した 3 つの CE/MS システムを利用して化学分析をおこなった。あらかじめ 176 カチオン性代謝物質、125 アニオン性代謝物質、41 モノヌクレオチド、合計 352 代謝物質について移動度の測定と MS ピーク面積の測定をおこない検量線を作成した。m/z = 70 から 1027 のスキャン範囲

で、1054 カチオンと 638 アニオン（モノヌクレオチドを含む）の合計 1692 のピークを検出した⁴⁾。それらのうち、標準物質の CE 移動時間と MS ピークの m/z がともに一致したものは（すなわち同定・定量することができた代謝物質）は 150 であった。細胞 1 個あたりに存在する代謝物質量を計算すると、アデニン 40 zeptomole、グルタミン 350 atomole であった。ピーク面積や CE 移動時間の再現性を 63 代謝物質について計算した結果、CE/MS を用いた分析は実用に十分な測定精度と再現性を保っていることがわかった。検量線を作成していないために同定・定量ができなかった残り 1,542 ピークについてはそれらの質量に一致する代謝候補化合物を KEGG COMPOUND データベースから検索した。分析条件や移動度、同位体ピーク比などを考慮して絞込みをおこなって 83 ピークについて代謝物質を推定した。残りのピークには代謝中間体以外のペプチド断片、オリゴ糖、核酸の断片が含まれていると思われる。

4-2. 恒常性と代謝物質プロファイル

生物は環境が変化しても細胞増殖の速度を一定に保とうとする、恒常性 (homeostasis) を有している。この性質が代謝中間体の量にどのような性質となって現れるのか、調べた。

枯草菌は、グルコースやフルクトースを炭素源として培養するが、それ以外の有機化合物も炭素源として生育することが知られている。そこで、グリセロール、グルコン酸、ピルビン酸、リンゴ酸もそれぞれ炭素源として培養した。細胞増殖曲線はグルコース、フルクトース、リンゴ酸を炭素源とした時と、グリセロール、グルコン酸を炭素源とした時は、倍数時間（増殖曲線の形）は同じであったが、立ち上がりの時間が後者では 2 時間ほど遅れた。ピルビン酸を炭素源とした場合には、倍数時間と立ち上がり時間がともに遅れた（図 3）。

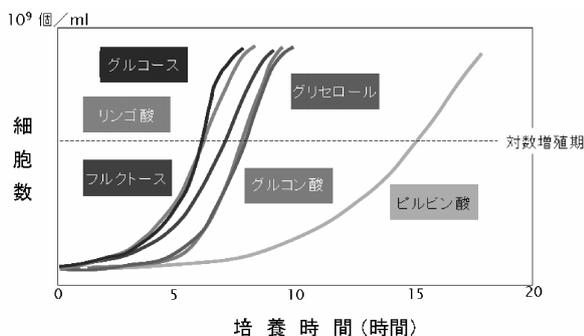


図 3. 6つの異なる炭素源で培養した時の枯草菌の増殖曲線

このようにして培養した枯草菌を、それぞれ対数増殖期 (OD600 = 1.0) に集菌し、速やかに代謝中間体をメタノールで抽出して CE/MS 分析した。

分析した代謝物質の細胞内相対量を代謝反応ネットワーク上で表現したものが「代謝物質プロファイル」である（図 4）。このプロファイルは炭素源が異なっても、ほとんど同じであった。すなわち、環境が変化しても（すなわち、この例では炭素源が異なっても）、枯草菌は代謝物質プロファイルを一定に保つように代謝を調節、制御して、増殖速度を最大に維持していることになる。これらを総合すると、恒常性とは「代謝物質プロファイルを一定に保つこと」と表現できる。

しかし、枯草菌が図 4 に示したプロファイルをとったとしても、増殖速度がいつも最大になるとは限らない。例えば、ピルビン酸で培養すると代謝物質は図 4 のプロフ

ファイルをとっているにもかかわらず、図 3 で示したように増殖速度は遅い。おそらく、ピルビン酸の細胞内への取り込み速度（フラックス）が遅いため増殖速度も遅いのであろう。

このように図 4 に示したプロファイルは細胞増殖をおこなうための必要条件を表していると解釈できる。ところで、対数増殖期において大腸菌は枯草菌とは異なる代謝物質プロファイルをしている。おそらく各生物種は対数増殖期において、それぞれ種特異的な代謝物質プロファイルを有していると考えられる。生育環境やゲノム情報の違いによってプロファイルが異なっても当然かもしれない。

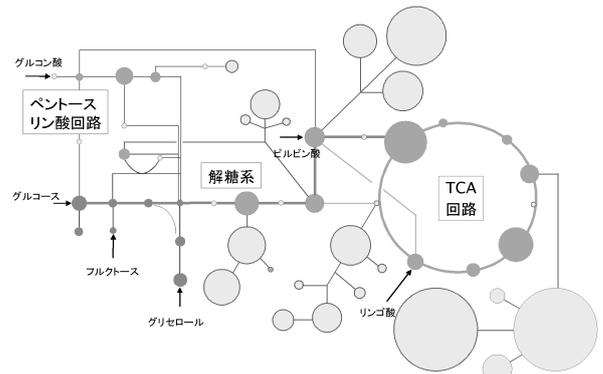


図 4. 枯草菌の代謝物質プロファイル：代謝物質の量を円の大ききで表現してある。薄く塗りつぶした円はアミノ酸を表す

図 4 で示した枯草菌の代謝物質プロファイルには次のような特徴がある。分析した代謝物質の中で最も多量に存在していたのはグルタミンとグルタミン酸であった。その他のアミノ酸も細胞内量が多い（薄く塗りつぶした円）。乳酸が多いのは酸素供給が不足して培養が嫌気的になった影響もあると推定される。

エネルギー代謝系である解糖系、TCA 回路やペントースリン酸回路の代謝中間体は、アミノ酸と比べて量が少ない。これらエネルギー代謝系はもっともフラックスが大きいとされているので、これら中間体の細胞内プールが小さく、後述するように培地中の炭素源の濃度が欠乏するとその影響を受け易いことを予想させる。

ここで、環境変動に対して代謝物質プロファイルは「ほぼ同じ」、と結論したことについて補足説明しておく。グリセロール、グルコン酸、リンゴ酸、ピルビン酸を炭素源としたときは、それぞれ細胞内のグリセロール 3-リン酸、グルコン酸、リンゴ酸、ピルビン酸量が、他の培養に比べて多かった。このように炭素源の違いに応じて、代謝物質プロファイルは局所的に異なっていた。

4-3. 恒常性の破綻に対する生き延び戦略

上で示したように、枯草菌は環境の変化に抗して代謝制御によってプロファイルをほぼ一定に保っていることがわかった。しかし、環境変動が大きく、恒常性を維持できない場合に、枯草菌はどのような戦略をとっているのか、代謝物質プロファイルの視点から解析した⁴⁾。

枯草菌をグルコースを炭素源として培養し、細胞数が増加すると、培養液中のグルコースが消費されて減少してくる。そうすると、(4.2. 恒常性と代謝物質プロファイル) で考察したように解糖系の代謝中間体の細胞内量が、グルコースに近いほうから減少しはじめる。さらに培養を続けると、エネルギー代謝系の代謝中間体が、いくつかの中間体を除いて、対数増殖初期の約 1/5 から 1/10 へ

と減少してしまい、胞子形成の代謝物質プロファイルへと切り替わる。そのとき、枯草菌は胞子形成をはじめ。すなわち、恒常性を維持できなくなると、その環境変動に対応した別の代謝物質プロファイルへと切り替えることによって生き延びていることがわかる（プロファイル切り替え戦略）。

以上をまとめると、メタボロームプロファイルは「恒常性」という言葉に含まれる生化学的意義を具体的かつ明瞭に表現していることがわかる。

4-4. 遺伝子発現と代謝物質プロファイル

代謝中間体の化学分析から、環境変動に対して増殖速度を最大にする（恒常性を保つ）する化学的基礎として、枯草菌は環境変動に抗して増殖に最適な代謝プロファイルを代謝調節によって一定に保っていることがわかった。

枯草菌の代謝調節には、代謝経路の最終産物が上流の酵素活性をアロステリック効果によってフィードバック調節するローカルな調節と、ゲノムにコードされている数多くの遺伝子について発現を制御するグローバルな制御があることが知られている。後者の例は、大腸菌や枯草菌においてグルコースが他の炭素源の資化酵素の発現を抑制するカタボライト抑制が知られている。この場合には数百の遺伝子発現がグローバルに調節されている。

これまでに、遺伝子発現は DNA マイクロアレイを用いて測定されているが、酵素遺伝子の発現が活性化あるいは抑制されることによって、それらの基質や生成物である代謝中間体の量がどのように変動しているのか、という関係については、全く測定されていない。

そこで、「4-2. 恒常性と代謝物質プロファイル」の実験において、枯草菌の代謝物質の抽出と同時に mRNA を抽出し、枯草菌の約 4,600 遺伝子をスポットした DNA マイクロアレイをもちいて発現変化を測定した。グルコースを炭素源として培養したときの遺伝子発現量を基準として、他の異なる炭素源で培養したときの遺伝子発現量の相対的変動を調べた。なお、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の測定は、本特定領域研究「ゲノム生物学」計画研究班代表である福山大学生命工学部・藤田泰太郎教授によるものである。

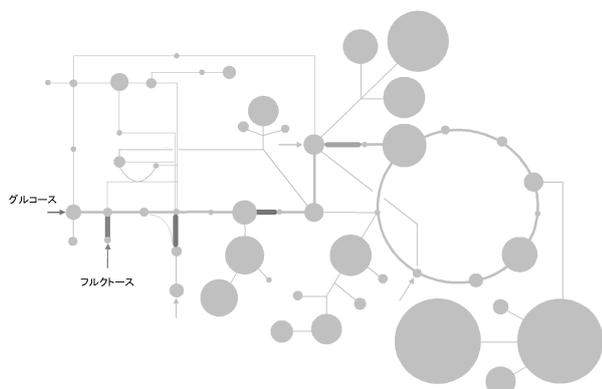


図5. 枯草菌をフルクトースを炭素源として培養したときの遺伝子発現を、グルコースを炭素源として培養したときの発現と比較した。太線部分が変化したところ。取込以外はほとんど違いは見られない。

炭素源としてのフルクトースの資化反応は、グルコースとほとんど同じであり、4-2 で述べたように代謝物質

プロファイルはフルクトースとグルコースは全く同じであった。細胞内への取込み機構はいずれも、phosphotransferase system (PTS) を利用していて、エネルギー代謝系へのエントリーはわずか 4 段階の酵素反応が異なるだけである。

DNA マイクロアレイの結果はこのような資化反応経路の類似性を反映して、互いに極めてよく似たものであった。フルクトースで培養すると、グルコース取込み PTS 遺伝子の発現が減少し、フルクトース取込み PTS 遺伝子の発現が上昇した。資化される代謝経路はこれ以外は全く同じであるので、他の酵素遺伝子の発現などは、2つの炭素源でほとんど違いはない（図5）。

これに対して、枯草菌を TCA 回路の代謝中間体であるリンゴ酸を炭素源として培養した場合と、グルコースの場合について遺伝子発現量の違いを比較した。炭素源としてのリンゴ酸が、グルコースともしっかり異なる点は、リンゴ酸は細胞内に取込まれた後、リンゴ酸からピルビン酸、あるいは oxaloacetate から phosphoenolpyruvate へという反応経路を利用して、TCA 回路から解糖系（グルコースとは逆方向に）さかのぼって糖新生をしなければならないことである。この違いが遺伝子発現でどのような違いとして現れるのか、興味あった。

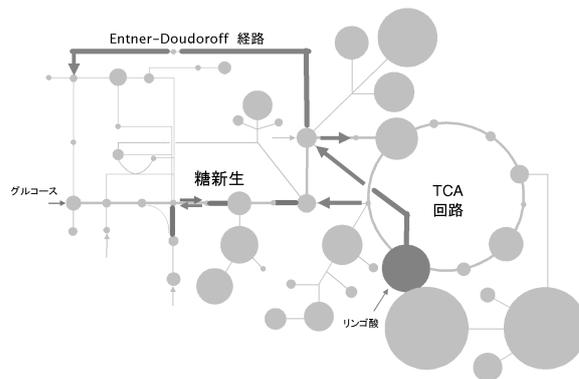


図6. 枯草菌をリンゴ酸を炭素源として培養したとき、グルコースの場合と遺伝子発現の違いをあらわした。太線部分がリンゴ酸で培養したときに遺伝子発現が増大した代謝経路。（4-2 で述べたように）リンゴ酸の細胞内の量がグルコースに比べて多くなっていることにも注目してほしい。

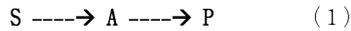
リンゴ酸を炭素源とすると、枯草菌は糖新生に必要な酵素遺伝子の発現を活性化するより、むしろピルビン酸からペントースリン酸回路の代謝中間体であるグルコン酸にいたる代謝経路を活性化していることがわかった（図6）。この代謝経路は Entner-Doudoroff 経路として知られているものである。すなわち、糖新生のために解糖系酵素遺伝子の発現量を調節するよりもむしろ、他のバイパス経路を活性化する「代謝経路の切替」戦略をとっていることがわかる。おそらく、糖新生によって解糖系代謝中間体物質のプロファイルが壊れるのを避けるため、Entner-Doudoroff 経路を経由したのであろうと推定される。

これは大変示唆に富む結果である。例えば、微生物や植物にある 2 次代謝物質を大量に発現させたい、というような代謝工学を計画したとしよう。その場合、2 次代謝物質の生合成系の酵素発現を活性化することによって生産量を増やそうという戦略をとりがちである。しかし、ほとんどの場合、酵素発現は数倍から数十倍に活性化されたものの、目的とする 2 次代謝物質の生産量はほとん

6. 代謝物質プロファイルの解釈は難しい

ある代謝物質の量が増えたとして、その原因を推定することは意外に難しい²⁰⁾。

例えば、次の反応 (1) で示すように分岐のないただ1つの代謝反応経路にある代謝物質 A の濃度が増加するのは、S から A への合成反応の活性が上昇したか、あるいは A から P への分解反応の活性が低下した、のいずれかの場合である。



しかし、実際の代謝反応では、どの酵素反応本能が代謝物質 A の濃度に影響しているのか、を決めることは難しい。

それは図 8 に示すように代謝反応ネットワークには分岐をはじめバイパス、アイソザイム、などの多重性や冗長性があるからである。また、図 8.(4) のように炭素原子と窒素原子のフラックスの方向が互いに異なる場合もある。濃度を決定している代謝反応を決定するためには、フラックス分布の測定や遺伝子を欠損した変異型生物について代謝物質プロファイルや酵素遺伝子の発現を測定しなければならない。

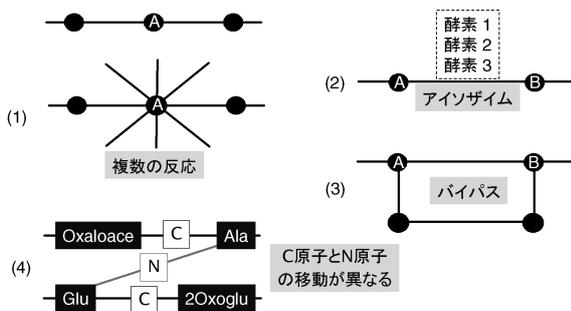


図 8. 代謝反応における多重性と冗長性があるので、代謝物質 A の濃度を決定している反応を特定することが難しい

7. 将来展望：医療への応用

代謝物質中間体の網羅的な化学分析法は病気の診断に有用である。例えば、遺伝病の多くは生合成酵素遺伝子の変異や欠損によってある特定の代謝物質が合成されないことに起因する代謝異常である。遺伝病では代謝の局所的な異常がただちに顕在化するので特徴的な症状を伴い、発見も早く、治療法もわかっている。

これに対して生活習慣病は、患者によって異なるさまざまな局所的な代謝異常が輻輳している。しかも、代謝の異常がすぐに顕在化することはないので、診断によって初期に発見することは容易ではない。このような局所的な代謝異常が蓄積して病気となって顕在化しても、それらの異常をそれぞれ特定することは困難である。

しかし、代謝物質プロファイルを測定することができれば、局所的で潜在化している代謝異常を初期に検出することができるであろう。また、複数の異常をそれぞれ検出することも期待できる。これは、4-1 から 4-6 で紹介した代謝中間体の化学分析法を応用した例からわかるように、生物個体が内外の環境変動から受ける摂動は、代謝物質プロファイルによって敏感かつ局所的に検出できるからである。

おそらく長年の生活によって蓄積してきた固体レベルの表現型では現れない(潜在的な)生理学的異常であっ

ても、代謝物質プロファイルにおいて局所的な変動や異常として顕在化する、ことが十分に予想できる。すなわち、代謝の異常が局所的であれば表現型にあらわれることは少ないが、代謝物質プロファイルにはあらわれるからである(図 9)。

診断のみならず、病因の特定や発病の分子機構に関する基礎研究にも代謝物質プロファイルは役立つものと期待される²¹⁾。

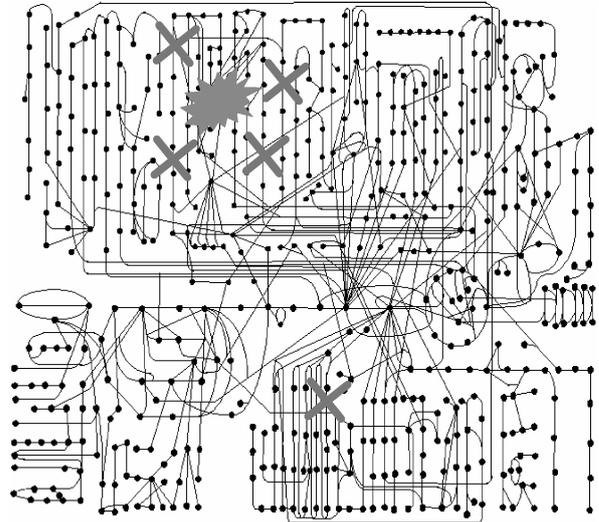


図 9. 代謝物質プロファイルは生活習慣病などの診断や発病機構の解明に有用であろう

〈国内外での成果の位置づけ〉

メタボローム解析は現実になった

これまでポストゲノム科学の特徴である omics 科学の1つとして metabolomics という言葉が 1999 年ごろから使われていたが、実体は全く伴はなかった。

2000 年にドイツ Max-Planck 研究所植物科学研究所の Fiehn が従来の分析法である GC/MS を用いて植物の 2 次代謝物質の分析をおこなって論文として報告した。その後、ドイツを中心にオランダ、英国で Arabidopsis の様々な変異体を用いて 2 次代謝物質を化学分析する metabolomics が盛んになった。しかし、彼らはエネルギー代謝系や光合成系の代謝中間体のおこなうことは困難であった。

2002 年から 2003 年にかけて本研究課題による CE/MS の実用化、測定結果が報告されると、systems biology の興隆と相まって一挙に米国でも注目されるようになった。NIH は metabolomics 関連研究に本格的にグラントをだすようになった。

2004 年には、metabolomics 研究者が国際学会を設立したのをはじめ、専門誌として Metabolocims や Cell Mitabolomics を 2005 年に創刊した。さらに 2005 年 6 月には第一回国際メタボローム会議が山形県鶴岡市の慶應義塾大学で開かれた。

このように本研究課題が研究成果を挙げるにつれて、国際的にメタボローム解析が注目された。これまでに海外の研究の後塵を拝していたゲノム科学分野のなかで、はじめて我が国が国際的なリーダーシップをとった科学分野として高く評価されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

計画研究がスタートしたときに計画した 5 年間の目標

は3年目ですべて達成した。その後の2年間は、代謝中間体の測定によって得られる新しい概念を確立するための研究を実施した。

〈今後の課題〉

本研究課題の残り2年間で着手しながら、研究期間の終了によって残された今後の課題は次の5つである。

8-1. 代謝中間体の2次元分離分析法の開発

本研究課題ではイオン性および高極性代謝中間体の分析法の開発を重点的におこなった。CE/MSの実用化によってエネルギー代謝系や光合成系など、これまで測定が困難とされていた代謝系の分析を可能にした。

しかし、細胞内で重要な生理機能を有している代謝物質には、脂質やオリゴ糖など非極性化合物あるいはCE/MS分析になじまない物質も数多くある。これらは、従来からの化学分析法であるGC/MSやLC/MSを用いることによって測定することができる。

問題は、このようにさまざまな物理化学的性質を有している代謝中間体をできるだけhigh-throughputに測定する化学分析法を開発することである。その1つとして、本研究課題では、LC-CE 2次元分離法の開発(2-4)に取り組んできた。これは非極性化合物から高極性、イオン性化合物までを1つの装置で分析しようとする試みである。LCとCEを手作業でリンクすることによって、期待どおりの分離をすることに成功したが、自動的にリンクする装置開発まではできなかった。これは分析機器メーカーとの共同開発が必要であり、本研究課題の範囲外であるので断念した。

これと密接に関連した課題であるが、CEをマイクロチップに小型化することができると、1台のMSに複数のCEを同時に接続して分析することが可能になる。すでに、DNA、RNAやペプチドの分離にはマイクロチップ化したCEが実用化され、市販されている。しかし、本研究課題のように多数の代謝中間体を、しかも異性体のように、物性が互いに極めてよく似ている化合物を分離して定量するためには、70-100 cmという長いキャピラリーを用いた泳動が不可欠である。将来、このように長い泳動流路を持ったマイクロチップが開発されることを期待したい。

8-2. 高感度MSによる分析

これまでに代謝中間体の標準物質約850化合物を用いて、CE泳動時間とMSスペクトルを測定した。しかし、枯草菌の細胞抽出物のCE/MS測定では、これらのうち実際に検出することができたのは150代謝中間体にすぎない(「4-1. 枯草菌の全代謝物質の検出」参照)。おそらく、他の代謝物質は細胞内量がMSの検出限界以下の微量で存在している、あるいは、シグナル伝達物質のように一過性で存在している、などの要因が考えられる。

本研究課題で用いたMSの検出限界は200 femtomoleであり、それほど高感度とはいえない。MSの性能は日進月歩であることから、近い将来もっと高感度なMSが開発され利用できると、多くの代謝中間体の挙動を測定することができるであろう。

8-3. 未知代謝物質の同定

枯草菌の細胞抽出液のCE/MS分析で検出した1692ピークのうち、標準物質の移動時間と分子質量とが一致したものはわずかに150ピークにすぎなかった。残り約1,500ピークは未知代謝中間体に由来するものであった

(「4-1. 枯草菌の全代謝物質の検出」参照)。この分析に用いたMSは分子質量しか測定できないタイプであったので、各ピークを与えた代謝中間体の構造情報は得られなかった。

その後、CE/MS/MS16)とCE/ITMSの実用化に成功した。この2つはそれぞれ、分子イオンをいろいろなエネルギーで壊す(collision-induced decomposition: CID)ことによって生ずるフラグメントイオンの質量分布を測定、(MS)²スペクトル、および生じたフラグメントイオンがさらに壊れて生ずる2次フラグメントイオンの質量分布の測定、(MS)³スペクトル、によって、もとの分子の化学構造情報を得るものである。

今後、化学構造と(MS)²や(MS)³スペクトルとの相関関係を収集することによって、測定したスペクトルから分子イオンの化学構造を推定することによって、未知代謝中間体の化学構造を同定することができるであろう。

また、化学構造とCE移動時間との関係を解析して、化学構造式が与えられたとき、その泳動時間をニューラルネットワークを用いて予測するツールも開発した(17)。

これら2つを併用することによって、今後、未知代謝中間体の化学構造の同定がはかどるものと期待できる。

8-4. 代謝フラックス測定法の開発

本研究課題の研究成果はいずれも細胞内にある代謝物質のある一瞬の量、すなわちスナップショット、を測定したにすぎない。しかし、細胞増殖のモデリングやシミュレーションには、代謝反応のフラックス測定が不可欠である。

エネルギー代謝系のフラックスは極めて早く、数msecぐらいでグルコースがTCA回路の中間体に変換される、と推定されている。従って、このようなフラックスを測定するためには、安定同位体で標識したグルコースを培地に加えた後、数msec以内に細胞を集めて、代謝物質を抽出する装置の開発をおこなう必要がある。このような装置の開発は当分の間、期待できない。

フラックス分布の測定には本研究課題で開発した代謝中間体の抽出法で十分に対応できる。すなわち、培地に安定同位体標識グルコースを加え、エネルギー代謝系の代謝中間体すべてについて同位体分布をCE/MSで容易に測定することができる。この同位体分布からフラックス分布を計算することができる。

従来はアミノ酸に取り込まれた同位体分布をNMRやGC/MSで測定することによって、解糖系とペントースリン酸回路のフラックス分配比を計算していた。この従来法に比べて、代謝中間体すべてについて同位体分布を測定する方法は、はるかに精度が高い。現在、この測定法の開発を進めているところである。

8-5. 1細胞を用いた代謝中間体の化学分析

キャピラリー電気泳動法の特徴は、試料がnanoliterレベルの極少量で分析できることである。これは、1細胞を用いてその代謝中間体を化学分析することも実現しうる量である。

本研究課題では枯草菌などの微生物を分析対象としてきた。微生物の細胞は極めて小さいので1細胞レベルの分析には不向きである。それに対して、動物の細胞は大きいので1細胞を用いて化学分析することは、それほど遠い夢ではない。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0303222306
Terabe, S., Markuszewski, M.J., Inoue, N., Otsuka, K. & Nishioka, T. Capillary Electrophoretic Techniques toward the Metabolome Analysis, *Pure Appl. Chem.* 73, 1563-1572 (2001).
2. 0303222313
Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M. & Nishioka, T. Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 74, 2233-2239 (2002).
3. 0303222316
Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Matsuda, K., Tomita, M. & Nishioka, T. Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions, *Anal. Chem.*, 74, 6224-6229 (2002).
4. 0404081440
Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M. & Nishioka, T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 2, 488-494 (2003).
5. 0602151357
Britz-McKibbin, P., Otsuka, K. & Terabe, S., On-Line Focusing of Flavin Derivatives Using Dynamic pH Junction-Sweeping Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection, *Anal. Chem.*, 74, 3736-3743 (2002).
6. 0303222320
Britz-McKibbin, P., Markuszewski, M.J., Iyanahi, T., Matsuda, K., Nishioka, T. & Terabe, S., Picomolar analysis of flavins in biological samples by dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Anal. Biochem.*, 313, 89-96 (2003).
7. 0303222323
Britz-McKibbin, P., Nishioka, T. & Terabe, S. Sensitive and high-throughput analyses of purine metabolites by dynamic pH junction multiplexed capillary electrophoresis: A new tool for metabolomics studies, *Anal. Sci.*, 19, 99-104 (2003).
8. 0303222327
Markuszewski, M.J., Britz-McKibbin, P., Terabe, S., Matsuda, K. & Nishioka, T. Determination of pyridine and adenine nucleotide metabolites in *Bacillus subtilis* cell extract by sweeping borate complexation capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 989, 293-301 (2003).
9. 0404081448
Markuszewski, M.J., Otsuka, K., Terabe, S., Matsuda, K. and Nishioka, T. Analysis of carboxylic acid metabolites from the tricarboxylic acid cycle in *Bacillus subtilis* cell extract by capillary electrophoresis using an indirect photometric detection method, *J. Chromatogr. A*. 1010, 113-121 (2003).
10. 0602151407
Kim, J-B., Britz-McKibbin, P., Hirokawa, T. & Terabe, S., Mechanistic Study of Analyte Focusing by Dynamic pH Junction in Capillary Electrophoresis Using Computer Simulation..*Anal. Chem.*, 75, 3986-3993 (2003).
11. 0602151422
Britz-McKibbin, P., Ichihashi, T., Tsubota, Chen, D.D.Y. & Terabe, S. Complementary On-Line Preconcentration Strategies for Steroids by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1013, 65-76 (2003).
12. 0602151427
Kim, J-B., Okamoto, Y. & Terabe, S. On-Line Sample Preconcentration of Cationic Analytes by Dynamic pH Junction in Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1018, 251-256 (2003).
13. 0602151434
Liu, B-F., Hisamoto, H. & Terabe, S. Subsecond Separation of Cellular Flavin Coenzymes by Microchip Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A*, 1021, 201-207, (2003).
14. 0404081511
Jia, L., Liu, B-F., Terabe, S. & Nishioka, T., Two-dimensional separation method for analysis of *Bacillus subtilis* metabolites via hyphenation of micro-liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 76, 1419-1428 (2004).
15. 0602151438
Sato, S., Soga, T., Nishioka, T. and Tomita, M., Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J*, 40, 151-163 (2004).
16. 0602151450
Soga, T., Kakazu, Y., Robert, M., Tomita, M. & Nishioka, T., Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Electrophoresis*, 25, 1964-1972 (2004).
17. 0602151455
Sugimoto M, Kikuchi S, Arita M, Soga T, Nishioka T, & Tomita M., Large-Scale Prediction of Cationic Metabolite Identity and Migration Time in Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry Using Artificial Neural Networks., *Anal Chem.* 77(1), 78-84 (2005).
18. 0602151506
曾我朋義, 佐藤 滋, 西岡孝明, 富田 勝, ダイナミックな生命現象のメタボローム解析技術, *細胞工学*, 22, 1337-1341 (2003).
19. 0602151510
富田 勝, 西岡孝明共編, *メタボローム研究の最前線*, シュプリンガー・フェアラーク東京, pp.222, 東京, 2003.
20. 0602151514
西岡孝明, 寺部茂, 曾我朋義, 松田敬子, 藤田泰太郎, "メタボローム ゲノム情報と環境の相互作用システム", *蛋白質・核酸・酵素*, 50(16), 2198-2203 (2005)
21. 0602151502
Tomita, M. and Nishioka, T. (Eds), "Metabolomics. The Frontier of Systems Biology", Springer-Verlag, Tokyo, 2005, pp. 256.