

メタボローム解析のための計測技術開発とそれを用いた代謝経路推定

●富田 勝^{1,2)} ◆西岡 孝明¹⁾ ◆曾我 朋義^{1,2)}

1) 慶應義塾大学 先端生命科学研究所 2) 慶應義塾大学 環境情報学部

<研究の目的と進め方>

DNA シーケンシング技術の各段の向上により、近年様々な生物種のゲノム情報が次々と明らかにされているが、ポストゲノム科学の時代においては、ゲノム解析された生物種について“omics”という言葉で表されるゲノミクス以下の階層（トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス）ごとに定量的な測定を行うことにより、生命活動を理解しモデル化することが最終目標である。特に生体内に含まれる代謝物質の包括的な理解を追究するメタボロミクスにおいては、これらの階層を互いに関連付け、統合している代謝反応ネットワークの解明が重要課題である。従って本研究課題の目的は、メタボローム解析技術を駆使した網羅的な代謝物質の測定および代謝ネットワークの構築の二点である。そこで、(1)未知代謝物質および代謝経路を同定し、(2)同定した代謝物質から生合成代謝経路を推定するために必要な測定技術の開発と、バイオインフォマティクスとケモインフォマティクスを融合した新しい物質同定法の開発が必須である。

これまで我々は、主にキャピラリー電気泳動質量分析装置（CE-MS）を用いたイオン性低分子化合物の網羅的測定法の開発に力を注いできた。また、同装置によるペプチド類の測定や液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS）およびガスクロマトグラフィー質量分析装置（GC-MS）による中性物質の測定法の開発・改良も行い、解析対象となる物質の網羅性を各段に向上させてきた。さらに未知物質の同定に欠かせないMS/MS解析や有機合成技術、インフォマティクスなどを相補的に駆使した物質同定手法を強化し、メタボローム研究における基盤技術を次々と確立した。ところが、これまでに蓄積した微生物や動植物のメタボローム解析データから、現時点で最も大規模な代謝物質データベースであるKEGGやMETACYCにさえその詳細が述べられていない物質が生体内に数多く存在することが分かり、依然として多くの代謝物質に関する未知の異化・同化経路が存在することが示唆された。そこで、これまでに確立したメタボローム解析に関する測定基盤技術および未知物質同定手法のさらなる改良に加え、トランスクリプトームやプロテオーム解析技術をも統合し、細胞によるエネルギー生成、様々な細胞ストレスに対する応答反応や堅牢性の維持、外来性物質の無毒化などに関する新規の細胞代謝経路の解明を試み、微生物や動植物細胞におけるより完全な代謝ネットワークの構築を目指している。

<2008年度の研究の当初計画>

メタボローム解析における分析技術および未知物質同定手法の向上に関する本年度の研究計画としては、(1)LTQ OrbitrapとCEの組み合わせによる組成式決定法の開発、(2)CE-MS/MS法の高感度化、(3)ニューラルネットワークを応用したCE-MSやLC-MS測定における同位体やフラグメントイオンのアノテーション法の開発、(4)生物種別の代謝物質リストの作成、(5)代謝物質のMS/MSスペクトルデータベースの構築、(6)標準物質の化学合成および生合成、を挙げており、さらにこれらの分

析基盤技術による新規代謝経路の推定に有用な解析手法として、

(7)回分培養における代謝流束測定法の開発、(8)トランスクリプトームやプロテオームなどの関連するオミクス解析の基盤技術の開発、(9)それらを統合的に応用したヒト細胞における新規代謝経路の推定、を挙げた。新規代謝経路の推定に関する応用研究として、本年度は特にがん細胞における新規エネルギー代謝経路の解明を試みた。

<2008年度の成果>

・未知物質同定手法の開発およびデータベースの構築

構造未知化合物の組成式をより正確に決定する目的で、LTQ OrbitrapをCEに接続することにより精密質量精度の向上を試みたところ、Orbitrapの優れた質量分解能により同位体の分離が可能であることが確認できた。しかし、低濃度サンプルや低分子では同位体パターンが正確に測定できないことから、この機器の組み合わせによる組成式の決定は断念せざるを得なかった。一方、未知物質の同定に有益な情報となるMSスペクトルデータベースの構築においては、ESI-QqTOF-MS/MSなどを用いて700種に上る基礎代謝物質のMS/MSスペクトルデータを取得・フォーマット化し、本研究所が主導して開発・管理を行っている高分解能MSスペクトルデータベースであるMassBank (<http://www.massbank.jp>)に登録した。

未知物質の同定および定量には、組成式の決定に加え候補物質の標準物質によるピークの検証が必要であるが、生体サンプル中に検出される未知ピークに対する候補物質の多くは標準物質として市販されていない。従って、化学合成や生合成によって膨大な数の候補物質の標準物質を効率的に合成する必要があるが、新規の合成戦略として本年度新たに「pH制御合成法」を開発した。これは、従来酸性・塩基性と二極的に考えていた反応条件をさらに細かいpH条件に割り振ることで、より精密な合成を可能とした合成法であり、これまでにN-アセチルオクトパミン、N-アセチルドーパミン、N-アセチルチラミンなどの効率的合成に成功した。これらは脳内神経伝達システムの解明、うつ病及びパーキンソン病治療への応用研究などに用いられる予定である。

近年のメタボローム解析の普及に伴い、ゲノム情報やマイクロアレイデータと同様に、今後様々な生物種の異なる条件下におけるメタボロームデータが蓄積されていくと考えられる。この観点から、生物種ごとの代謝物質データベースの作成は、包括的な代謝ネットワークの構築に向けた重要課題の一つである。そこで、これまでに蓄積したメタボロームデータより、大腸菌由来成分約100種およびヒト血漿由来成分約150種の同定を行い、データベースに登録した。また、枯草菌・乳酸菌などの微生物に加え、酵母・線虫・単細胞藻・イネ、さらにマウスやヒトにおいては尿・唾液・涙などの体液および組織種ごとのメタボロームデータも蓄えており、これらのデータベースも順次構築していく予定である。

・メタボローム解析の高感度化およびデータ処理の自動化

特に二次代謝物質の多くは生体サンプル中の濃度が極めて低いものが多く、網羅的な代謝ネットワークの構築にはCE-MS/MS

法のさらなる高感度化が必須であるが、本年度は特に ABI 社 MS 用イオン源の開発・改良を重ね、1 μ M レベルでの CE-MS/MS 測定を実現させた。さらに Agilent 社の QqTOF 装置についても分析条件の検討を重ね、同感度の測定が可能となった。

物質同定や定量には、CE-MS や LC-MS において検出される数百~数千のピークから既知物質の同位体やフラグメントイオンを同定し、アノテーション付けを行う必要があるが、このプロセスの自動化によりメタボローム解析のスループットを大幅に向上させることが可能である。この目的で、測定により得られたデータから高精度なラインメントおよびマススペクトルの自動解析を行い、さらにニューラルネットワークなどの方法で予測した泳動時間を利用することにより、本年度はこのアノテーションソフトの精度を飛躍的に向上させた。

・代謝経路推定のためのフラックス解析およびプロテオーム解析

細胞内の代謝流束を定量的に推定する手法の確立は、新規代謝経路の推定や代謝ネットワークの構築のみならず、微生物や植物による機能性成分の効率的な合成や、適切な薬剤投与量の検討・薬効評価・副作用の推定など、将来的に産業的・医学的に非常に重要なツールとなり得る。これまで、主に大腸菌の連続培養における代謝流束推定法を確立してきたが、本年度はさらに応用範囲の広い回分培養において同位体標識実験を行い、細胞内中間代謝物質の同位体標識パターンの経時変化を CE-TOFMS により測定し、増殖期から定常期までの代謝流束分布の変化を推定した。

代謝酵素に関連する遺伝子発現量やタンパク質量といった情報は、メタボロームデータから細胞代謝の変動を推定し、新規代謝経路の存在を示す上で欠かせない。そこで、本年度はプロテオーム解析において、既存の手法に比べより広い濃度オーダーで各タンパク質の正確な定量値を求めることが可能な定量法を開発した。具体的には、ショットガンプロテオミクスにおける消化ペプチド検出頻度と存在量の関係を定量化し、1回の LC-MS 測定の結果から存在量推定を行う emPAI 法を確立し、さらにこの手法の理論的な根拠を確認した。これにより、生体サンプルに含まれる数千種のタンパク質の絶対量の推定が可能となり、メタボロームデータとのより定量的な統合解析が可能となった。

・がん細胞における新規代謝経路の発見

がん細胞が好気的環境下でさえ酸化的リン酸化よりむしろ解糖系依存的にエネルギー代謝を行う現象は「ワーバーク効果」と呼ばれ、様々ながん種において確認されている。ところが膵臓癌など一部のがん種では、血流が乏しいために細胞が慢性的な虚血状態に曝され、酸素やグルコースの供給が不十分となるために、解糖系の亢進だけでこのような乏血性のがん細胞のエネルギー代謝を説明することは難しく、多血性で栄養的に恵まれたがんとは異なる代謝機構に依存している可能性がある。そこで、乏血性の微小環境を模倣したグルコース欠乏かつ低酸素状態にて培養を行った Panc-1 (膵臓癌細胞株) のメタボローム解析を行い、CE-TOFMS により細胞および培養液中に含まれる 130 種のエネルギー代謝関連物質の時系列変化を調べたところ、細胞内外にてコハク酸の顕著な蓄積が確認された。この現象の原因を探るため、¹³C の分布情報に基づき、本研究グループが開発した代謝流束解析を応用し、さらに電子伝達系複合体の酵素活性解析を行ったところ、Panc-1 が「フマル酸呼吸」に依存したエネルギー代謝を行っている可能性が示唆された。この特殊な代謝機構は、ある種の嫌気性微生物や寄生虫などにおいてのみ確認されており、ヒト細胞においては初めての例であるが、酸素やグルコースに依存しない ATP 生成を可能にするため栄養飢餓状態に曝されたがん細胞によりエネルギー代謝の切り札として用いられている可能性がある。さらに、駆虫薬として臨床的に使われているパモ酸ピルビニウムがフマル酸呼吸の阻害剤であることを突き止め、この

薬剤の投与によりコハク酸および ATP の生成が顕著に抑制されることを確認した。がんの特殊なエネルギー代謝を標的とする全く新しい抗がん剤として、フマル酸呼吸阻害剤の開発が今後期待されると共に、本研究グループが開発してきたメタボローム解析技術が、新規代謝経路の推定に応用可能であることを実証した。

<国内外での成果の位置づけ>

メタボローム解析技術は近年世界中に普及しつつあり、測定技術の向上および応用研究が盛んに行われているが、CE-TOFMS を中心としたメタボローム解析技術において、大量データの高速な自動処理を実現するアノテーションソフトウェアの開発や、700 種に上る代謝物質の標準化合物について測定した MS/MS スペクトルのデータベース構築、CE-TOFMS によるメタボロームデータを用いた大腸菌やがん細胞の代謝流束解析などは全て世界初の試みである。これらの基盤技術をフル活用し、がん細胞の新規エネルギー代謝を解明したことで、本研究グループのメタボローム解析における基盤技術の高さとその応用力を実証した。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

LTQ Orbitrap による同位体イオンの分離は確認できたが、昨年度に引き続き、組成式の決定などの用途には感度が不十分であり応用できなかった。しかしながら、既知物質の網羅的測定においては、測定条件の改良やソフトウェアの精度の向上などにより、測定精度およびスループットを劇的に高めることができた。

<今後の課題>

未知物質の同定に関しては、ハードの改良 (機器の組み合わせや測定条件の改良) およびソフトの改良 (アノテーションソフトウェアや未知物質推定アルゴリズムの強化) の両面からさらに研究開発を進める。MS/MS スペクトルデータベースを充実させ、標準物質の効率的な化学合成を引き続き行い、未知物質の同定精度を向上させる。さらに、本年度のがんの代謝研究への応用で実証したような新規代謝経路の推定を行い、トランスクリプトームやプロテオーム解析との統合化を促進し、代謝ネットワークの構築およびスタンダードな細胞モデリング技術の開発に向けて、産業的・医学的にも有用な応用研究へ結び付ける狙いである。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

- 0901081346
“Visualizing Complex Omics Information-Scientific Visualization for Genomics and Systems Biology” Arakawa, K., Yachie, N. and Tomita M. *BIOforum Europe*, 6:27-29(2008)
- 0901091419
“Time-resolved metabolomics reveals metabolic modulation in rice foliage” Shigeru Sato, Masanori Arita, Tomoyoshi Soga, Takaaki Nishioka and Masaru Tomita *BMC Systems Biology* 2:51(2008)
- 0901081330
Developing Bottom-fermenting Yeast Strains That Produce High SO₂ Levels by Integrated Metabolome and Transcriptome Analysis” Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., Soga, T., Yoshimoto, H. *Appl. Environ. Microbiol.* 2787-2796 (2008)