

生体試料

Biological Samples

メタボロミクスは動物組織、植物組織、培養細胞、細胞抽出液、大腸菌、食品、血液、尿など幅広い生体試料に応用可能である。本項では、CE-MS 解析のための試料の処理方法やメタボローム解析の応用例について、メタボローム解析の適用頻度が高い試料を中心に紹介する。

9.1 血液

試料採取時の侵襲性や簡便さから、血液試料 (全血、血清および血漿) はバイオマーカー探索において最も一般的な試料である。一般的な生化学検査の場合、検査対象は多くても数項目であり、それら数項目の安定性や定量性が担保されれば検査適用可能な試料となるが、オミクス解析の場合、対象物質は数百にまで跳ね上がる。これら全ての物質安定性を担保するのは非常に難しく、ターゲットとなる物質にフォーカスした試料の準備が必要となる。

血液のメタボロームデータは試料の処理方法の違いによって大きく異なる (6.1.4 参照)。HMT では EDTA 処理血漿および全血を推奨している。EDTA 処理した血漿では、血球破壊を回避することができ、純粋な血漿の代謝物質の情報を得ることができるだろう。一方、全血では、血球を含む血液全体の代謝物質の情報を得ることができるだろう。

9.2 尿

尿は、腎臓の機能、肝臓の薬物動態、食習慣を反映する、メタボローム解析において貴重なサンプルである。利点は、非侵襲的に収集できること、限外ろ過によって除タンパク質を行い、希釈するだけで CE-MS 測定に供することができることである。

薬剤試験等で投与された薬物のほとんどは誘導体化されるか、あるいは硫酸、グルクロン酸、グルタチオン、アミノ酸と抱合体を形成し、尿中に排出される。誘導体あるいは抱合体は水溶性で電荷を持っており、CE-MS で検出することが可能である (図 9.1)。

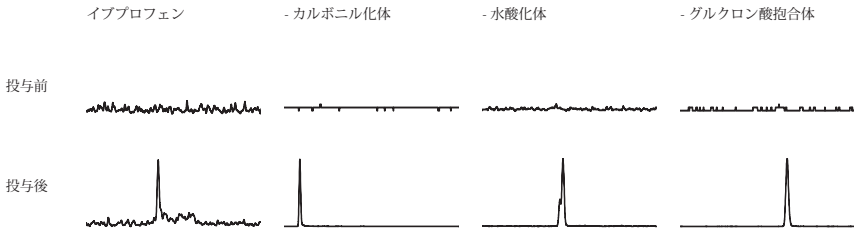


図 9.1 解熱鎮痛薬の誘導体および抱合体の尿中への排出

規定量の解熱剤投与前および投与後 2 時間の尿サンプルから検出された解熱鎮痛薬、その誘導体および抱合体のエレクトロフェログラム

薬物動態学は CE-MS メタボロミクスに非常の相性の良い分野の一つであり、薬物の誘導体を検出できるだけでなく、規定量の 100 分の 1 を投与したヒトの尿からでも誘導体が検出されており、微量薬剤投与による薬物動態を解析にも利用可能な技術であることが示されている。

9.3 動物組織 (植物組織)

9.3.1 前処理法

動物組織のメタボローム解析における前処理には、いくつかの制約がある。動物組織中の代謝物質は高温状態で不安定であり、超音波処理やホモジナイズによって分解されやすい。また、組織を分解するために用いられる界面活性剤は質量分析計による測定を妨害し、酵素による細胞溶解は予期せぬ代謝変動だけでなく、酵素試薬溶液に含まれる代謝物質の混入を誘起するため、一般的な前処理法はメタボロミクスには適さない。

これらの課題を解決するために、液体窒素で凍結し、ビーズにより細胞を破碎する方法

を採用した。この方法は、一連の手順を1本のチューブ内で行うことができるため、サンプルのロスや異物混入のリスクを最小限にすることができるという利点もある。

HMTでは、サンプル(種類・量)、ビーズ(種類・量)、チューブ(種類)、溶媒(種類・量)について諸条件を検討し、最適化したプロトコルを提供している。なお、植物組織でもビーズ破砕法を採用している。

9.3.2 標準化法の選択

標準化法の選択は、結果を解釈する際のスタートポイントとなるが、尿中物質の標準化に使われているクリアチニンや、ハウスキーピング遺伝子のようなすべての実験系に適用できる最適な方法は存在しないため、メタボロミクスにおける重要な課題である。実験系に応じた標準化法をその都度選択しているのが現状である(6.3.1 参照)。

通常、動物組織(植物組織)データの標準化には組織重量を用いる。しかし、繊維状の組織、脂肪組織、間質組織が含まれている臓器はサンプル内で不均一であり、サンプル間で含水量が異なる場合もある。このような場合にはDNA量で標準化する方法が用いられることもある。壊死部分はDNA量が少ないので、壊死した細胞を含むサンプルでは、タンパク質量による標準化が適切であろう。

どの標準化法が最適であるかを決定するのは容易ではないので、HMTでは、実験毎にPCAなどの統計解析を用いて標準化法を選択するよう推奨している。

9.4 培養細胞

9.4.1 前処理法

一般的に、*in vitro*の実験系では繊維芽細胞などの接着細胞と、血球細胞などの非接着細胞(浮遊細胞)が用いられるが、これらのタイプに応じて細胞回収方法を使い分ける必要がある。

接着細胞の場合、プロテアーゼ処理による代謝物質への影響が排除できないため、トリプシン等のプロテアーゼを用いた接着細胞回収方法は推奨されない。

HMTでは、スクレーパーを用いて物理的に剥離する回収法を推奨している。しかし、プラスチックで培養しスクレーパーを用いるのが困難な場合など、やむをえない場合においてのみプロテアーゼ処理による回収を選択することもある。

非接着細胞の場合は、遠心分離することで培養液と培養細胞は容易に分離できる。細胞ダメージを回避するために、遠心分離は低回転数で行わなければならない。

細胞洗浄液は、一般的に生理食塩水やリン酸バッファー (PBS) 等の緩衝液が使用されるが、これらの溶液は CE-MS 分析を阻害する要因となるため、HMT では、ヒトやマウスで代謝されない糖アルコール溶液を洗浄液として用いている。

9.4.2 細胞数

CE-MS 分析に必要な細胞数は、培養細胞の種類や実験条件に依存する。主要代謝物質の定量データを得るためには、少なくとも 2.0×10^6 個の細胞数が必要である。細胞内の存在量が少ない代謝物質を検出するためには、さらに多くの細胞数を必要とする。

9.4.3 標準化法の選択

通常、培養細胞データの標準化には細胞数を用いる。生細胞と死細胞の割合が異なる場合や、1細胞あたりの体積が異なる細胞を比較する場合には、DNA 量で標準化する方法が用いられる。また、タンパク質量による標準化が適切な場合もある。使用する細胞や比較対象および実験目的に応じて、標準化方法を使い分けすることが望ましい。

HMT では動物組織 (植物組織) の場合と同様に、統計解析手法を用いてその都度、実験系に応じた標準化法を選択する方法を推奨している。

9.5 微生物

単細胞微生物は基礎生物学的研究だけでなく、タンパク質など有用物質の生産、醗酵食品など幅広い研究分野に用いられている。微生物のメタボローム解析では、培養液についても解析対象とすることが多い。

9.5.1 大腸菌 (*Escherichia coli*)

最もよく研究されている微生物は、グラム陰性腸内細菌の大腸菌 (*Escherichia coli*) で、遺伝子クローニング、タンパク質など有用物質の大量生産を目的として用いられることが多い。ゲノム中に 4100 個のオープンリーディングフレーム (ORF) があり、60% は機能が解明されている。細胞内代謝メカニズムについては非常によく研究されており、これまでに検出が報告されている 700 以上の代謝物のほとんどが、どの代謝経路上的の代謝物質であるか分かっている。大腸菌のような単純なシステムを持つ生物のメタボロミクスは、ヒトなどの高等生物の代謝メカニズムを解明する上で重要な知見をもたらすだろう。

9.5.2 枯草菌 (*Bacillus subtilis*)

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、グラム陽性細菌の代表的な細菌である。ゲノム中に約 4000 個の ORF がある。CE-MS を用いた微生物メタボローム解析が初めて行われたのは、枯草菌である。

枯草菌は、栄養枯渇および細胞密度の上昇などを感知し、代謝的に休止状態で、環境ストレスに耐性がある孢子を形成することができる。この現象は、微生物の分化の基本モデルとして考えられている。

メタボローム解析から、孢子形成の開始に伴い、異化代謝の抑制の重要な調節因子であるフルクトース 1,6-ビスリン酸が急激に減少し、結果として孢子形成を促進していることが分かった。また、孢子形成に伴い、TCA 回路においてアコニターゼやその下流の代謝反応に関与する酵素が連続して活性化されることも明らかにした。アコニターゼやイソクエン酸脱水素酵素をコードする遺伝子を破壊すると、孢子形成が初期で停止することは以前から知られており、孢子形成のメタボローム解析で得られた結論を支持している。

9.5.3 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)

単細胞真核生物である酵母は、パンやビールを製造する際に有用であるだけでなく、真核生物のモデル生物として、分子生物学の発展に多大に貢献してきた。実験によく用いられる酵母には、出芽で増殖する出芽酵母と動物細胞と同様に分裂で増殖する分裂酵母の 2 種類が存在する。酵母を用いたメタボローム解析は、醗酵条件の最適化や有用株の育種に有効である。

9.6 醗酵乳

ヨーグルトやチーズのような醗酵乳製品は、乳酸菌の醗酵を利用して作られる。乳酸菌は乳酸醗酵過程において糖を乳酸に変換する。乳酸菌は通常腸内細菌として生息しているが、ヨーグルトの乳酸菌は腸内定着することができない。しかし、ヨーグルトの乳酸菌由来の代謝物質は、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の菌体数を減少させ、既存の乳酸菌の増殖を助けるため、整腸作用がある。最近では、腸で働く乳酸菌が同定された。さらに、乳酸菌は抗炎症作用を有するため、プロバイオティック微生物として期待されている。

ヨーグルト中の代謝物質は食品の味や香りを決定する因子が多く含まれ、乳酸菌によるヨーグルト醗酵過程におけるメタボロームデータは、醗酵状態の最適化や乳酸菌の育種を行う上で非常に重要な知見となりうる。