

ケーススタディ

Case Studies

✕ タボロミクスを用いた肝臓グルタチオンの欠乏を示す酸化ストレス マーカーとしてオフトアルミン酸の同定

J Biol Chem. 2006 Jun 16;281(24):16768-76. Epub 2006 Apr 11.

Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption.

Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M.

Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan.

要約

鎮痛剤として最も一般的に使用されているアセトアミノフェン (AAP) を過剰に投与すると、致死的な肝炎を引き起こす可能性があり、毎年アメリカ合衆国では 100 人以上の死者が出ている。AAP は通常硫酸抱合やグルクロン酸抱合によって解毒化され、排出される^{*}。高用量投与すると、P450 シトクロームによって代謝され、活性のある代謝中間体である N-アセチル-p-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) を生成する。この物質はグルタチオンと結合することで不活性化し、排出される。それゆえ、AAP を高用量投与すると、グルタチオンレベルが急激に低下する^{**}。グルタチオンが欠乏すると、活性の高い NAPQI が毒性やタンパク質修飾を引き起こし、結果として細胞死や組織傷害になる。

筆者らはキャピラリー電気泳動飛行空間型質量分析計 (CE-TOF MS) を用いたメタボローム解析によって、AAP 投与したマウスの肝臓と血清の代謝物レベルの変動を解析した。その結果、肝臓毒性に伴う代謝経路の乱れを明らかにし、急性肝臓損傷のバイオマーカーを同定した。

結果と考察

コントロールマウスと比較して 2 時間 AAP 処理したマウスの肝臓では、GSH と GSSG の著しい減少が認められた (論文 Fig. 1.)。もう一つの特徴として、AAP 処理したマウス肝臓では、*m/z* 290.135、溶出時間 16.5 分の未同定陽イオン性代謝物質が増加していた。

CE-Q-TOF MS を用いて、GSH と未同定物質の MS/MS スペクトルを取得し、比較した。GSH と未同定陽イオン性代謝物のフラグメントパターンは似ていたが、4 つの主要なピークについて 17.96 Da の質量差が見られた (論文 Fig. 6. の点線矢印)。この情報に基づいて解析すると、グルタチオンのシステインの SH 基が CH₃ 基に置換され、未同定陽イオン性はオフトアルミン酸であることが同定された。

BSO や DEM 処理により肝臓中の GSH 量を低下させることで、オフトアルミン酸代謝を調

* N.P. Vermeulen *et al. Drug Metab Rev*, 24(3): 367-407, 1992.

** G. Vendemiale *et al. Biochem Pharmacol*, 52(8): 1147-1154, 1996.

べた。BSOはグルタミン酸システイン合成酵素を阻害することが知られている^{***}。DEMは、グルタチオンのSH基を酸化する。グルタミン酸システイン合成酵素阻害マウスでは、肝臓および血清においてもGSHとオフタルミン酸は非常に少量であった。DEM処理のマウスでは、オフタルミン酸レベルの著しい増加が見られた。AAP投与と同様にDEM投与により酸化ストレスが生じ、グルタチオンが減少する。このグルタチオンの減少によりグルタミン酸システイン合成酵素が活性化し、オフタルミン酸が増加すると推測できる。この現象は、AAPやDEM処理特異的なものではなく、酸化ストレスに対する一般的な細胞応答を反映していると考えられる。

AAP投与1、2、4、6、12、24時間後の肝臓および血清の代謝物を測定した。肝臓で検出された代謝物のほとんどは血清でも存在していた。AAP投与による代謝物の変動は、肝臓と比べて血清では大きな変化は見られなかった。血清ではGSHは検出されず、GSSGではAAP投与後1時間後のみ顕著な減少が認められた(論文Fig. 7.)。しかしながら、AAP処理マウスにおいて、肝臓GSH欠乏に伴う血清オフタルミン酸レベルの上昇は検出することができた。

結論

メタボローム解析を用いることによって、酸化ストレスによる肝臓GSHの欠乏のバイオマーカーとして血清オフタルミン酸を同定することができた。オフタルミン酸測定によって、肝臓内のレドックス状態を感知することができ、肝臓における酸化ストレスの早期発見につながると思われる。このバイオマーカーは、薬剤投与において治療リスク、効果および薬効の評価に役立つと共に、酸化ストレスに伴い引き起こされるいくつかの疾患の早期発見にも貢献できる。

*** O. W. Griffith *et al.* *J Biol Chem*, 254(4) : 1205-1210, 1979.

乳酸菌による乳酸酵のメタボローム解析

大橋由明¹、牧野梓¹、井元淳¹

¹ ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社、² 慶應義塾先端生命科学研究所

要約

乳酸酵は、乳酸菌の働きによって成し遂げられる複雑なプロセスである。乳酸酵の過程において、乳酸菌はミルク中のタンパク質を消化し、分解産物を利用し、共生的に生存し、乳酸を蓄積し、最終的に溶菌する。メタボローム解析は、酵過程の神秘を明確にし、乳酸菌の特性や乳製品の酵条件の最適化を理解するための有用な情報を提供することができる。

序論

ヨーグルトやチーズに代表されるような酵乳製品は、ずっと以前から健康改善のために食生活に取り入れられている。これらの乳製品は、ピフィズ菌や乳酸桿菌に属する乳酸菌によって酵されている。これらの菌は、ギリシャ語の「生命に有益な」という語を意味する、“プロバイオティック”細菌と一般的に呼ばれ、ヨーグルト酵過程において、共生的に生存している乳酸菌間で複雑な物質のやり取りが行われている。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

ミルク中の主なタンパク質であるカゼインは乳酸菌によって遊離アミノ酸に分解され、他の種類の乳酸菌の生育に利用される。ギ酸、二酸化炭素、他の代謝物も、共生の媒介物であると提唱されてきている^{*}。乳酸酵の過程で、GABAのような健康促進物質も生成され、健康食品としての価値を上げている。乳酸酵は代謝相互作用の影響を受けて非常に複雑であるため、乳酸酵のメカニズムの理解や乳製品の酵法の開発にはメタボロームを用いたアプローチが最も効果的であると筆者らは考えている。

結果と考察

実験条件と分析条件

Lactobacillus gasseri OLL2716 を含んでいる明治乳業の商品の明治プロビオヨーグルト LG21 を、酵開始時に殺菌された 10% スキムミルクに添加した。そのミルクを 40°C でインキュベーションし、植菌後、0、4、12、24、48 時間後にサンプリングした。それぞれのサンプリング時のミルクから代謝物質を抽出し、CE-TOF MS で分析した。生菌数は、BCP プレートカウントアガーを用いて計測した。

* J. E. Auclair and A. Portmann. *Nature*, 179(4563): 782-783, 1957.

スキムミルク中の乳酸菌の生育

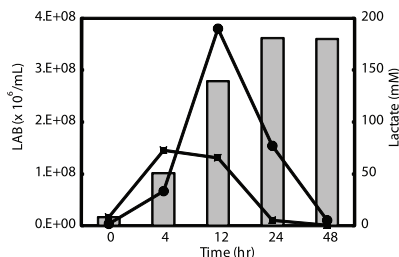


図 10.1 ヨーグルト醱酵過程における乳酸菌の生育および乳酸の蓄積

乳酸菌の生育は図 10.1 に示されている。BCP プレート上では、*Lactobacillus gasseri* と予測される桿菌と、球菌を観察することができた。球菌に対する桿菌の比率が開始時に約 0.2 であったのに対して、12 時間後には 2.9 まで増加した。その後、生菌数は減少した。乳酸の蓄積は 24 時間後まで続き、濃度は 180 mM(酸性度は 1.6%) まで達する。これらの結果からは、乳酸菌の生育速度は種によって異なり、桿菌は球菌よりも生育が速い。また、

醱酵後期になると乳酸菌の溶菌が見られる。

醱酵過程における連続的な代謝物の変動

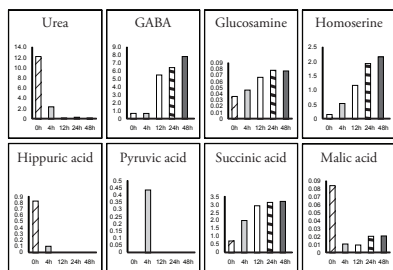


図 10.2 ヨーグルト醱酵過程で特徴的な変動を示した代謝物質群

縦軸は相対面積値、横軸はインキュベーション時間を表す。

を示している^{**}。図 10.2 は醱酵過程において、特徴的な変化を示す代謝物質である。神経系で抑制性の神経伝達物質として働いている GABA は、健康・栄養成分として知られている。GABA は乳酸菌生育の後期に生成される。アミンや有機酸類にも醱酵過程で大きな変化を示すものもある。

以上の結果から、メタボロミクスは、乳製品の醱酵のメカニズムの解明や乳製品の製造プロセスの開発に有効であると考えられる。

醱酵過程において、ミルク中のカゼインは *Lactobasillus sp.* が生成する細胞外プロテアーゼによって分解される。ほとんどのアミノ酸はインキュベーション時間に比例して蓄積しているのに対して、グルタミン酸、グリシン、アラニンは 12 時間後まで減少し、その後増加した。この結果は、乳酸菌は生育段階ではこれらのアミノ酸を主に利用していることを示唆している。一般的に、乳酸菌は複雑なアミノ酸要求性を示すが、2-オキソグルタル酸を生成するイソクエン酸脱水素酵素を持っていない乳酸菌では、グルタミン酸栄養要求性を

** T. Morishita and M. Yajima. *Biosci Biotech Biochem*, 59(2): 251-255, 1995.

胞子形成枯草菌におけるモデルに基づいた細胞集団の不均一性の定義と代謝に及ぼす影響

J Biochem. 2007 Aug;142(2):183-91. Epub 2007 Jun 1.

Model-based definition of population heterogeneity and its effects on metabolism in sporulating *Bacillus subtilis*.

Morohashi M, Ohashi Y, Tani S, Ishii K, Itaya M, Nanamiya H, Kawamura F, Tomita M, Soga T.

Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan.

要約

土壌細菌である枯草菌は、飢餓状態で生存を保障する戦略として、代謝が休止し、ストレス耐性に強い胞子を形成する。しかしながら、野生株で胞子形成を誘導しても、胞子形成を開始する細胞密度に違いが見られるため、胞子を形成している細胞と胞子を形成していない細胞集団が混在している。

筆者らは、この不均一性を生み出す原因となるメカニズムを決定するために、胞子形成の鍵となるシグナル伝達について数学的モデルを考案し、シミュレーションを行った。シミュレーションの結果は、実験的にも確認している。

不均一性は主に負のフィードバック回路によって調節されており、胞子を形成している細胞と胞子を形成していない細胞の双安定状態となる。同様の実験系でメタボローム解析も行われた。胞子形成が開始に関係なく、あるいは株間の違いによって、特徴的な代謝プロファイルを示した。胞子形成における細胞の不均一性に着目した今回のメタボローム解析の結果は、着目していなかった先行研究とは異なっていた。

以上の結果から、不均一性がある細胞から得られた実験データの解釈には十分な精査が必要であることが示唆された。

結果と考察

筆者らは初めに、不均一性(胞子形成する細胞集団と胞子形成しない細胞集団)を生み出す原因となるメカニズムを決定するために、シミュレーションと実験的研究を行った。その結果、Spo0Eによる負のフィードバックはシステム全体の挙動を調節していることが明らかになった。BEST2131(野生型)、BEST12022(*spo0E102*)、BEST12033(*spo0E::cat*)の*spo0E*アレルを持つ3株を用いて実験的にも確認した。

胞子形成細胞集団と胞子形成していない細胞集団の代謝プロファイルを調べるために、上記の3株についてメタボローム解析を行った。メタボロームデータにおいて、株間や対数増殖期終了に対する相対時間($T_{0.5}$ 、 T_0 、 $T_{1.5}$ 、 T_3)の変動による違いを調べるために主成分分析を行った(論文 Fig. 5. (A))。対数増殖期から胞子形成への移行におけるメタボローム

データの変化は、3次元の主成分分析の結果によって、明確に区別することができた。興味深いことに、BEST12033(*spo0E*-)では $T_{0.5}$ と T_0 を明確に区別することができなかった。この結果は、BEST12033(*spo0E*-)では対数増殖期と胞子形成への移行期の間では代謝状態に変化が見られないことを表している。

さらにBEST12022(*spo0E102*)とBEST12033(*spo0E::cat*)のメタボリックプロファイリングを比較した。フルクトース 1,6-ニリン酸とアセチル CoA は胞子形成の開始後減少した。この結果は、増殖期にグルコースを著しく利用し、解糖系が活性化していることを示しており、曾我らの報告と一致している*。二種類の *spo0E* 株において、TCA 回路のクエン酸は T_0 までは増加しないが、 T_0 以降劇的に増加した。TCA 回路は対数増殖期では代謝的に不活性で、環境中のグルコースが枯渇している増殖静止期に活性化されることを示唆している。クエン酸の下流の代謝経路の挙動は二種類の株間で異なっていて、2-オキソグルタル酸は胞子形成するBEST12033で非常に蓄積されている。これらの結果は、TCA 回路の2-オキソグルタル酸付近の代謝調節は胞子形成に必要であることを示している。

胞子形成細胞であるBEST12033(*spo0E*-)では、 $T_{1.5}$ 以降ATPの顕著な増加が見られるのに対して、胞子形成をしない細胞であるBEST12022(*spo0E++*)ではATPの減少が見られた(論文 Fig. 6. ATP)。この結果は、胞子形成期ではATP合成酵素の発現が強く誘導されることを示したゴンザレス-パストールらのデータを支持している**。胞子形成期にはATPレベルは一定であるという報告があるが、この実験では、野生株を用いたことにより胞子形成した細胞と胞子形成していない細胞が不均一な状態となっているため、ATPが一定であるという結論が導かれている。先行研究では、胞子形成した細胞集団と胞子形成していない細胞集団の平均の結果を示しており、本研究からは、胞子形成している細胞と胞子形成していない細胞の影響をそれぞれ相殺していることが明らかになった。

結論

筆者らは枯草菌の胞子形成における不均一性のメカニズムについて研究を行った。シミュレーションとモデル化によって、負のフィードバックが胞子形成の双安定性における主要な調節因子であり、これは *spo0E* 遺伝子の影響を直接受けていることを明らかにした。胞子形成期と胞子形成していない時期の特徴を調べるために、上記の変異株 (BEST12033、BEST12022) を用いて代謝物質レベルの変動を比較したところ、胞子形成の有無にかかわらず、初期状態で代謝が大きく異なることが明らかになった。さらに、株間でも代謝プロファイルに大きな違いが見られた。以上の結果から、不均一集団の細胞から得られたデータの解釈には、精査が必要であることが明らかになった。

* T. Soga et al. *J Proteome Res*, 2(5): 488-494, 2003.

** J. E. Gonzalez-Pastor et al. *Science*, 301(5632): 510-513, 2003.

マルチハイスループットオミクスを用いた遺伝的および環境的变化に対する大腸菌の応答の解析

Science. 2007 Apr 27;316(5824):593-7. Epub 2007 Mar 22.

Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations.

Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T, Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M.

Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan.

要約

細胞機能に関わる異なる階層間の生物学的情報の複雑な関係は、それぞれの階層における大規模解析の測定結果を組み合わせるることによってのみ捉えることができる。DNA マイクロアレイやショットガンプロテオミクスのような現在の大規模解析は、細胞内物質を正確に定量するよりも細胞内構成分子の組成を詳細に調べることを目的としている。定量 RT-PCR やフラックス解析のような定量性をより重視した分析方法は、ターゲット解析に適しており、遺伝的および環境的変動に応答したわずかな変化を検出するのに不可欠である。本研究では、遺伝的および環境的变化に対する大腸菌 (*Escherichia coli* K12) の応答を、遺伝子発現、タンパク質、代謝物レベルで詳細に解析した。

結果と考察

細胞応答を包括的に調べるために、遺伝子発現とタンパク質の相対定量を DNA マイクロアレイと 2 次元ディファレンシャル電気泳動を用いて行った。より詳細に解析するために、定量 RT-PCR やフラックス解析に加えて、キャピラリー電気泳動飛行空間型質量分析計を用いたメタボローム解析^{**}と液体クロマトグラフィータンデム質量分析計を用いた包括的なタンパク質の絶対定量を行った。

我々は、野生株 (*Escherichia coli* K12) と慶應コレクションから選択した 24 種類の解糖系やペントースリン酸回路関連代謝酵素の一遺伝子破壊株を用いてマルチハイスループットオミクスを行い^{***}、データを集積した (論文 Fig. 1)。mRNA やタンパク質においては、成育速度の変化の効果は顕著で、ほとんどの遺伝子破壊の効果よりも大きいように見えた。それに対して、代謝物の変化は明確なパターンを示さず、様々な変動に対する代謝物変化は、mRNA やタンパク質と異なることが示唆された。

論文 Fig. 1. で見られた効果の大きさを捉えるために、それぞれの因子について発現指標の平均 (AEI) を計算して、サンプル間で比較した (論文 Fig. 2. (C))。mRNA とタンパク質の

* A. R. Joyce and B. O. Palsson. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(3): 198-210, 2006.

** Soga et al. *J Biol Chem*, 281(24): 16768-16776, 2006.

*** Baba et al. *Mol Syst Biol*, 2: 2006. 0008, 2006.

AEI 値は、生育速度が高くなると、徐々に増加する。この結果は、大腸菌は増加する代謝要求を満たすために遺伝子発現とタンパク質レベルで活発に調節することを示唆している。しかしながら、代謝物の AEI 値は生育速度に応じた変動は小さかった。代謝物レベルにおける相対的な安定性の高さは、酵素レベルの調節の結果かもしれない。

一方、ほとんどの遺伝子破壊株では、中心炭素代謝の mRNA とタンパク質の AEI はわずかな変動しか見せなかった。これらの発見は、補償的なメカニズムが働いているために、中心炭素代謝の酵素の欠損に対して顕著に応答しないことを示唆している。いくつかの代謝物質が高い AEI 値を示す *rpe* 遺伝子破壊株では、数個の関連代謝物質のレベルが大きく増加した (論文 Fig. 3. (A))。しかしこれらの局所的な変化は、この遺伝子破壊株において多くの代謝物質の AEI が高い値を示すまでには至っていない。また、たとえ局所的な代謝ネットワークが乱れたとしても、代謝物質レベルの全体的な安定性はほとんどの遺伝子破壊株でも維持されている。この代謝物レベルの安定性は、代謝ネットワークの構造的なロバスト性によって達成されているようである****。

**** Gu *et al. Nature*, 421(6918): 63-66, 2003.

ヒ スチジン欠乏下における大腸菌のメタボローム解析

Mol Biosyst. 2008 Feb;4(2):135-47. Epub 2007 Nov 15.

Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS.

Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, Tomita M, Soga T.

Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan.

要約

ヒスチジン栄養要求性である大腸菌のヒスチジン欠乏に応答した代謝物質変動を CE-TOFMS を用いて解析した。

筆者らはまず文献を調査して大腸菌に含まれる代謝物のリスト (727 代謝物質) を作成した。次に、代謝物質の抽出方法を検討し、ATP や GTP のようなリン酸基を多く含む代謝物質の抽出効率を改善した。さらに一次代謝において電荷を持ち親水性の 375 の代謝物質について CE-TOFMS 測定し、198 の代謝物について定量データを得た。

その結果、ヒスチジン欠乏下では、ヒスチジンの低下に応答して、ヒスチジン生合成経路の代謝中間体が急速に蓄積していることが明らかになった。また、解糖系、酸化的ペントースリン酸回路、TCA 回路、アミノ酸代謝、核酸代謝は、ヒスチジン欠乏に応答して、緻密に代謝制御されていた。

序論

栄養欠乏下では、染色体複製、細胞分裂、転写、翻訳、代謝が停止することが知られており、この応答は緊縮応答と呼ばれている。アミノ酸の欠乏によって翻訳が停止すると、RelA タンパク質を活性化し、結果として ppGpp を蓄積する。ppGpp はシグナル因子として緊縮応答を制御している。

緊縮応答についてトランスクリプトームおよびプロテオーム解析はすでに行われており、それらの結果からアミノ酸欠乏による緊縮応答下で代謝が大きく変動していることが明らかになっている。しかし、アミノ酸欠乏による代謝変動について、メタボローム解析は行われていなかった。

結果と考察

大腸菌代謝物の調査

データベースと文献に基づいて、大腸菌に含まれる代謝物質を探索した結果、727 代謝物がリストアップされた。その中で 453 代謝物が一次代謝産物およびその分解物に相当し、うち 375 代謝物が CE-TOF MS 分析で測定可能である。

サンプル前処理手法の最適化

メタボローム解析のサンプル前処理法では、ATP や GTP のようなリン酸基を多く含む代謝物質の抽出効率が低下する欠点があった。超音波処理、クロロホルム添加前に遠心法による細胞の除去、メタノール懸濁液で -80℃、12 時間インキュベーションによる代謝物質の抽出効率の検討を行った。

超音波処理をすることにより、GTP では 130 倍抽出効率が上昇した。また、ATP、ADP、AMP については 39 倍、17 倍、1.6 倍抽出効率が改善した。抽出効率の改善は、リン酸基の個数に依存していた。リシンおよびアルギニンでは超音波処理をすることによる抽出効率の改善は見られたが、同じ塩基性のアミノ酸であるヒスチジンでは抽出効率の変動は見られなかった。おそらく、アルギニンやリシンはリン脂質のリン酸基と相互作用するため、超音波処理をすることによる抽出効率の改善が見られたと考えられる。他のアミノ酸については、遠心法による細胞の除去や -80℃ インキュベーションによる抽出効率の改善は見られなかった。

超音波処理によって細胞のクロロホルムとの接触効率が高まり、抽出効率が上昇したと考えられる。

ヒスチジン代謝中間体のピークの同定

ヒスチジン生合成代謝中間体の多くは市販されていないため、標準試薬を入手できず、標準試薬を基にピークを同定することができない。本研究では、ヒスチジン脱水素酵素遺伝子にヌル変異がある大腸菌を用いて、ヒスチジン入りの培地からヒスチジンなしの培地に移して、ヒスチジン生合成代謝中間体の蓄積を誘導し、ヒスチジンなしの培地で蓄積されていることと m/z の情報を基に、ヒスチジン生合成の代謝中間体の CE-TOF MS のデータのピークを同定した。

ヒスチジン欠乏下の代謝変動

ヒスチジン欠乏下では、アミノ酸代謝、解糖系、酸化のペントースリン酸回路、TCA 回路、核酸代謝経路で顕著な変動が観察された。アミノ酸欠乏下における DNA 複製、転写、翻訳および細胞分裂の停止などの緊縮応答は、ppGpp 依存的に制御されていることが知られており、ppGpp 依存的な緊縮応答の調節に関わる RelA の遺伝子破壊株を用いてメタボローム解析を行えば、緊縮応答と代謝変動の間の関係に新たな知見を提供できると考えられる。

チオール基特異的誘導体化による大腸菌由来含チオール代謝化合物の高感度測定

榊原裕仁[†], 上野由紀[†], 大橋由明[†]

[†]ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

序論

チオール基 (-SH) は、システインやその誘導体を含む多くの代謝物質に含有されている。これら含チオール基代謝物質の多くは、抗酸化ストレス因子、メチル基運搬体、あるいはタンパク質の構成要素として生体内で重要な役割を担っている。一方、チオール基は非常に高い反応性をもつため、生体試料から代謝物質を抽出する過程で、含チオール基代謝物質の2量体形成反応、あるいは混在する他の反応性化合物や金属イオンとの反応が生じやすい。このため、従来の代謝分子抽出法では、含チオール基代謝物質の正確な定量を行うことは困難であった。一方で生体メカニズムの解明を目的とした多くのメタボローム解析では、含チオール基代謝物質の定量は非常に有効なアプローチであるため、その分析法の確立が求められてきた。本研究では、チオール基の保護試薬として *N*-エチルマレイミド (NEM) を用いることで、含チオール基代謝物質の定量に適した前処理法を確立した。

実験条件

SHの保護試薬として複数の誘導体試薬を検討した結果、既存のメタボローム前処法に適用可能な条件で最も安定した誘導体化反応が得られる *N*-エチルマレイミド (NEM)^{*} が選択

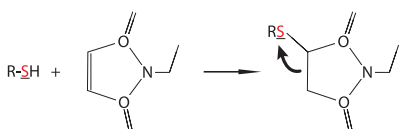


図 10.3 NEMの構造式、およびチオール基との反応様式

された (図 10.3)。なお、NEM 誘導体化反応は、過去にも大腸菌などの生体試料に適用され、その有効性が報告されている^{**}。含チオール基代謝物質を含む代謝物質の抽出は以下の手順で行った。栄養培地で培養した大腸菌 (*E. coli*) 細胞 (約 10^9 個) を、フィルトレーションにより洗浄・回収し、500 μ L NEM、100 μ L

EDTA、および内部標準を含んだメタノール溶液に投入した。その際、添加回収率を検証するサンプルには、任意の濃度に調製した標準試薬 (システイン (Cys)、グルタチオン、補酵素 A (CoA)) を含む MOPS 溶液 (50 mM、pH 6.0) を添加した。上記メタノール溶液について、超音波破碎を行い、室温で 5 分間静置した後、図 8.1 で示した手順に従って、測定サンプルの調製を行った。

* 「SH 基の定量法 生物化学実験法 10」松本博、国則登代 著、学会出版センター、pp77-80.

** Ellis, R. J., *Nature*, 211(5055):1266-1268, 1966.

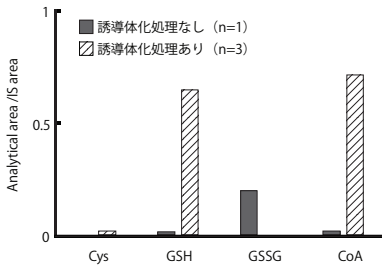


図 10.4 大腸菌由来の含チオール基代謝分子の誘導体化による検出値

大腸菌から抽出された、含チオール代謝物質の NEM 誘導体分子の検出値を図 10.4 に示す。標準試薬を添加しなかったサンプルについて、誘導体化処理を行わなかった場合は Cys が検出されなかったのに対し、誘導体化処理が行われた場合は、CE-TOF MS のカチオンモードで NEM 誘導体化 Cys が微量ながら検出された。還元型グルタチオン (GSH) および CoA に関しては、誘導体化処理を行わない場合と比較して、誘導体化処理を行った場合には検出量が 50 倍程度増加した。また、グルタチオンに関しては、誘導体化反応を行うことで、GSH のチオール酸化による酸化型 2 量体 (GSSG) の形成が著しく抑制された。

以上の結果から、今回の条件で前処理過程における誘導体化反応が十分に起こり、その結果、標的の含チオール基代謝物質の検出感度が著しく向上したことが示された。

大腸菌由来抽出物における含チオール基代謝分子の添加回収率を表 10.1 に示す。Cys、GSH、CoA の回収率はそれぞれ、53%、81%、76% であった。また、GSSG の回収率はほぼ 100% であった。Cys に関しては添加回収率が不十分であり、絶対定量には適していない。

表 10.1 含チオール基代謝分子の NEM 誘導体化の添加回収率

Add'l STD	Cys		GSSG		GSH		CoA	
	Msm. Conc. (μM)		Msm. Conc. (μM)		Msm. Conc. (μM)		Msm. Conc. (μM)	
	Conc. (μM)	Mean \pm S.D.	Rec. (%)	Mean \pm S.D.	Rec. (%)	Mean \pm S.D.	Rec. (%)	Mean \pm S.D.
0	10.0 \pm 0.368	-	N.D.	-	71.2 \pm 22.4	-	82.1 \pm 26.4	-
20	20.6 \pm 0.0918	53.0	19.3 \pm 0.405	96.5	93.8 \pm 14.4	113.0	98.3 \pm 175	81.0
50	35.7 \pm 0.717	51.4	47.3 \pm 2.20	94.6	103 \pm 3.37	63.6	118 \pm 17.0	71.8
100	62.6 \pm 0.981	52.6	99.8 \pm 4.56	99.8	133 \pm 4.00	61.8	151 \pm 13.8	68.9
200	113 \pm 3.25	51.5	195 \pm 4.76	97.5	222 \pm 2.54	75.4	252 \pm 7.05	85.0
500	284 \pm 3.71	54.8	486 \pm 30.8	97.2	513 \pm 29.1	88.4	457 \pm 121	75.0

しかし、全ての標的分子について、添加試薬検出量の検量線における直線性が確認されている (図 10.5)。このことから、この手法が生体試料中の含チオール基代謝物質の相対的な変化量を見積る目的に適した分析法であることが示された。

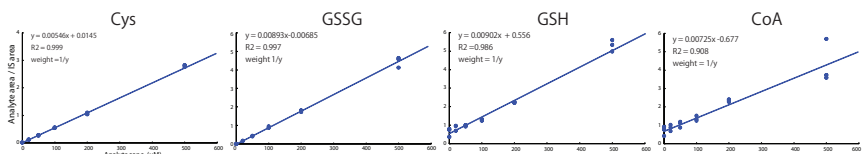


図 10.5 含チオール基代謝分子の添加試薬に関する検出値の直線性

赤ワイン中の代謝物プロファイリング

佐々木一謙[†]、山本博之[†]、赤松博美[‡]

[†]ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社、[‡]庄内たがわ農業協同組合月山ワイン山ぶどう研究所

序論

ワイン中の化学物質は、ワインの品質を決定する重要な要素の一つである。ワイン中の物質は原料となるブドウに由来するが、醸造過程の中で大きく変化する。ワインの醸造過程の中で、醱酵は最も重要な過程の一つである。ワイン醸造における醱酵過程は2種類存在し、一つは酵母によるアルコール醱酵であり、もう一つは乳酸菌によるマロラクティック醱酵である。一般的にマロラクティック醱酵はアルコール醱酵後に行われ、その主な目的はワイン中に含まれるリンゴ酸を乳酸と二酸化炭素に変換することによる減酸である。また、副反応としてジアセチルやアセトインなどの香気成分も付与されることが知られている。しかし、実際にはマロラクティック醱酵の過程において乳酸菌によりワイン中の様々な物質が代謝され、それらがワインの品質に影響を与えていると考えられる。そこで、マロラクティック醱酵の有無によるワインの代謝物プロファイルを比較することにより、マロラクティック醱酵において特徴的に変動する物質を調べた。

試料および手法

試料として、原料が山形県鶴岡市朝日地区で栽培された山ソービニヨンである庄内たがわ農業協同組合にて醸造された赤ワインを用いた。醸造された年代は2000、01、04、05、06、07年である。2004年以降に醸造されたワインはマロラクティック醱酵を行っており、2001年以前に醸造されたワインはマロラクティック醱酵を行っていない。ワイン試料は希釈した後、限外ろ過を行い、CE-MS及びLC-MSにてそれぞれ測定を行った。

結果と考察

04～07年に醸造されたワイン中のリンゴ酸はほぼ枯渇しており、00、01年に製造されたワイン中の乳酸は04～07年に醸造されたワイン中の乳酸と比較し明らかに少ない。また、マロラクティック醱酵における副反応に関連したクエン酸やピルビン酸も04～07年に醸造されたワイン中ではほぼ枯渇していた(図10.6)。これらの代謝物の変化は、04～07年に醸造されたワインではマロラクティック醱酵が非常に進んでいたことを示している。クエン酸やピルビン酸は乳酸との相関はよく、乳酸と相関がよい他の物質はマロラクティック醱酵により変動した物質であると考えられる(表10.2)。例えばメバロン酸($R=0.96$)は乳

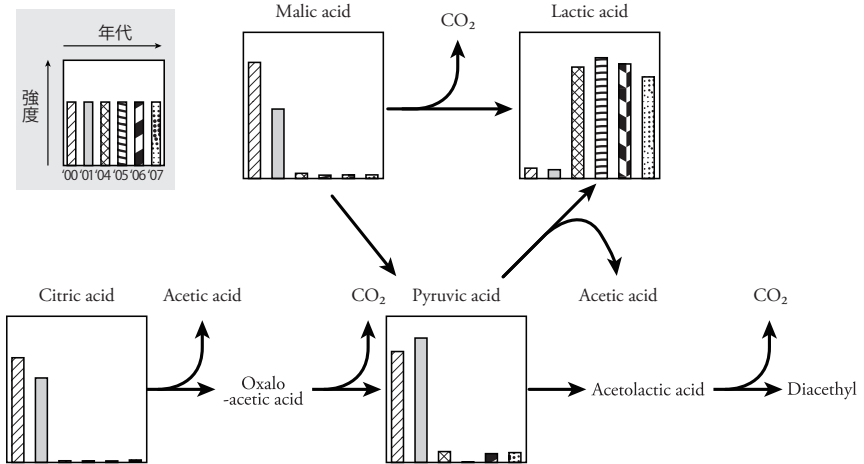


図 10.6 マロラクティック醗酵および乳酸菌によるクエン酸代謝経路中の代謝物の変動

酸菌の栄養源となることが知られており、マロラクティック醗酵の過程で乳酸菌に消費されたものと考えられる。また、マロラクティック醗酵を経ることにより、各種アミノ酸 (Pro; R=0.96, Gly; R=0.92 など) が増加するという報告とも一致した結果が得られた。以上の結果から、ワイン中の代謝物プロファイルを求めることにより、マロラクティック醗酵において特徴的に変動する物質を捉えることができたと考えられる。

表 10.2 乳酸と相関がよい物質 (相関係数 >0.9、相関係数 <-0.9)

代謝物質	R	代謝物質	R
β -Ala	0.99	N-Ethylglycine	0.92
N-Acetylhistidine	0.99	5-Aminovaleric acid	0.92
5-Amino-4-oxovaleric acid	0.98	Cytidine	0.92
3-Aminopropane-1,2-diol	0.98	Homovanillic acid	0.92
Indole-3-ethanol	0.97	N-Acetyl- β -alanine	0.91
S-Sulfocysteine	0.96	Glucaric acid	0.90
3-Methylbutanoic acid	0.96	3-Hydroxypropionic acid	-0.92
Homoserine	0.96	Fumaric acid	-0.92
Ribavirin	0.96	4-Methyl-2-oxopentanoic acid	-0.93
Pro	0.96	Malic acid	-0.94
Isobutyric acid	0.95	Dyphylline	-0.94
N-Methyl-Arg	0.95	2-Isopropylmalic acid	-0.95
Malonic acid	0.95	Glucosamine 6-phosphate	-0.96
Thymidine	0.95	Mevalonic acid	-0.96
Histidinol	0.95	Oxypurinol	-0.98
Isoamylamine	0.93	Citric acid	-0.98
N-Acetylglutamic acid	0.93	3-Methyladenine	-0.99
Gly	0.93	2-Oxoadipic acid	-0.99

メタボロミクスによる新奇酵素活性の探索

J Biol Chem. 2009 Jun 5;284(23):15549-56. Epub 2009 Apr 3.

Degradation of ppGpp by nudix pyrophosphatase modulates the transition of growth phase in the bacterium *Thermus thermophilus*.

Ooga T, Ohashi Y, Kuramitsu S, Koyama Y, Tomita M, Soga T, Masui R.

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan.

序論

ゲノム情報の蓄積により、様々な酵素活性を配列相同性から予想することが可能になりつつある。しかし一方で、触媒作用や基質分子が同定されていない「機能未知酵素」の発見も増えている。このような酵素活性を解明する上で、細胞内代謝プールの変化を広範囲に観察できるメタボローム解析は、強力なツールとして活用することが出来る。

Nudix タンパク質は、様々なヌクレオチド関連分子を分解する酵素ファミリーであることが報告されているが、基質分子、あるいはその活性の生物学的役割が不明な酵素が多く存在する^{*}。高度好熱菌 (*Thermus thermophilus* HB8) 由来 Nudix タンパク質の Ndx8 は、ヌクレオチド 2 リン酸 ((d)NDP) 特異的な分解活性を持つが、その活性が細胞内で担う役割は不明であった。今回、メタボローム解析による *in vivo* 基質スクリーニングを行うことで、Ndx8 がシグナル分子であるグアノシン 4 リン酸 (ppGpp) を分解し、その活性により栄養センサーとして細胞増殖を制御することを発見した。

実験条件

遺伝子組み換えにより得られた高度好熱菌の *ndx8* 遺伝子破壊株 (*ndx8*⁻)、及び野生株は、栄養制限合成培地を用い、70°C で振盪を行い (好気条件) 培養された^{**}。高度好熱菌の場合、通常の代謝分子抽出法ではヌクレオチド類の検出レベルが低い傾向があったため、ギ酸とフェノールを用いた代謝分子の抽出を行った。すなわち、遠心分離により得られた菌体ペレットに内部標準を含む 1.0M ギ酸を加えて懸濁し、引き続き、氷上でフェノール (H₂O 飽和) を添加・混和して、細胞膜の破壊と酵素反応停止を行った。これを遠心分離した後、上清画分の凍結乾燥により得られた抽出物を milli-Q 水に再溶解し、測定サンプルとした。メタボローム測定には CE-TOF MS を用いて、アニオンモードとカチオンモードの測定を行い^{***}、遺伝子破壊株と野生株の比較で細胞内レベルが有意に異なる候補化合物を Student の *t* 検定により探索した。また、得られた基質分子に対する *in vitro* での活性確認として、遺伝子組み

* McLennan, A. G. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**: 123-143, 2006

** Hashimoto, Y., *et al.*, *FEBS Lett.*, **506**: 231-234, 2001

*** Soga, T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**(24): 16768-16776, 2006

換えにより大腸菌が生産した Ndx8 を用いて、標準試薬に対する分解活性を HPLC で検出した。

結果と考察

ndx8⁻ は、栄養制限条件下の対数増殖期に於いて、細胞同士の凝集形成という表現型を示した。DNA マイクロアレイの解析結果から、*ndx8⁻* では細胞増殖に関わる複数の転写制御が変化していることが判明し、このことから、Ndx8 の活性消失による基質分子の蓄積は転写制御を誘導するシグナルとなり得ると予想された。

このような基質分子を同定するため、*ndx8⁻* が細胞凝集を形成する直前に、*ndx8⁻* と野生株の細胞内代謝分子量を比較し、*ndx8⁻* に蓄積する基質候補化合物の探索を行った。その結果、既知の基質候補である (d)NDP を含め、ヌクレオチドを中心とする 10 個の化合物が抽出された。

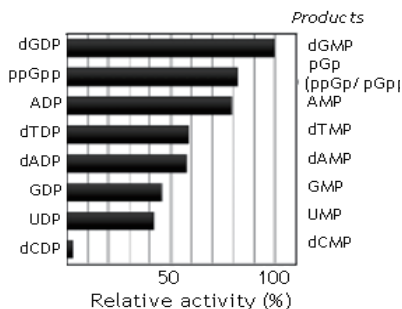


図 10.7 組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の活性確認

それぞれの基質に対する分解活性の kapp 比。Products は各反応で生じた生成物を表す。

これらに対する Ndx8 の分解活性を *in vitro* の反応系で検証した結果、Ndx8 は原核生物のシグナル分子である ppGpp の 2 つのリン酸結合を加水分解するという新奇活性を示した (図 10.7)。

ppGpp は、アミノ酸などの栄養制限環境で細胞に蓄積して転写制御の変化を引き起こす (緊縮応答) シグナル分子であり****、高度好熱菌では、RelA/SpoT により合成される。この酵素遺伝子 (*relA*) を破壊した ppGpp 非生産株では、*ndx8* を重ねて破壊しても栄養制限条件で特徴的に見られた細胞凝集が観察されなかった。

以上の結果から、Ndx8 は細胞内で ppGpp を分解除去する活性を持ち、またその活性は栄養環境に応じた細胞増殖制御に重要な役割を担うことが証明された。

**** Cashel, M., et al., The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella*, Frederick, C. N. et al., (ed) pp1458-1496. Washington: ASM press, 1996

解剖学的メタボローム解析による生活習慣病モデルの病態観察

Mol Biosyst. 2011 Apr;7(4):1217-23. Epub 2011 Jan 24.

Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia.

Ooga T, Sato H, Nagashima A, Sasaki K, Tomita M, Soga T, Ohashi Y.

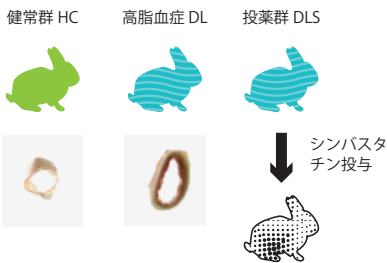
Human Metabolome Technologies, Inc, 246-2 Mizukami, Kakuganji, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan.

序論

高脂血症は最も多い生活習慣病の一つであり、その病態の把握や治療を目的とした、疾患メカニズムの解明が望まれている^{*}。高脂血症のうち、特に LDL 受容体の遺伝子変異による家族性高コレステロール血症については、動物モデルとして Watanabe Heritable Hyper Lipidemic (WHHL) ウサギが確立され、多くの研究で活用されている。しかし、その病態の代謝異常に関しては、主に血中脂質循環についての検討がなされており、基礎代謝を含む多くに関する知見は部分的にしか得られていない^{**}。

本論文では、WHHL ウサギの全身組織を対象としたメタボローム解析を実施することにより、高脂血症に付随した各組織、特に、肝臓での酸化ストレスによる代謝異常を観察した。また、この病態特異的な代謝プロファイルの一部は、高脂血症治療薬であるシンバスタチンの経口投与により緩和することが確認された。

実験条件



高脂血症病態モデルとして WHHL ウサギ (DL: n=3) を、対照として日本白色ウサギ (HC: n=3) を用いた。また、投薬群として 30 mg/kg のシンバスタチンを 10 日間経口投与した WHHL ウサギ (DLS: n=3) を用いた。ネブター麻酔処置後、1mM MOPS(pH 7.0) による全身灌流を行い、EDTA 血漿、及び肝臓、心臓、大脳、心臓動脈を採取した。100 μ L 血漿、及び

50 mg 各組織から代謝分子を抽出し (図 8.1)、CE-TOF MS により、アニオンモードとカチオンモードの測定を行った。候補化合物が同定された検出ピークの相対面積値は、さらにサンプル量 (血漿: 体積、組織: 重量) で補正され、群間で比較された。

* Genest, J., *et al.*, *J Inherit Metab Dis.*, 26:267-287, 2003.

** Shiomu, M., *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:1239-1244, 2003.

結果と考察

各組織中に於ける病態に伴う (DL/HC)、または投薬による (DL/DLS) 代謝分子プロファイルの変化が論文 Fig. 2 に示されている。最も顕著な変化は肝臓で観察され、その中でも以下三点の代謝変化が顕著であった (論文 Fig. 4)。病態群の肝臓では、①ヌクレオチド異化産物の尿酸が蓄積しており、活性酸素種 (ROS) の発生源であるキサンチンオキシダーゼ (XO) の活性化が示唆された。

このことから RT-PCR による発現解析を行ったところ、DL 群では HC 群と比較して、肝臓における XO の mRNA レベルが高くなっていることが確認された。一方、②抗酸化作用を持つ還元型グルタチオン (GSH) レベルは顕著に低下し、その生合成副産物であるオフタルミン酸のレベルが上昇していた。これと同様の代謝異常はマウスの薬剤肝障害モデルで観察され、酸化ストレスへの応答であることが報告されている^{***}。

さらに、病態群では③リン脂質異化経路下流のベタイン、*N,N*-ジメチルグリシン (DMG)、サルコシンが蓄積しており、葉酸の枯渇による一連の脱メチル反応の阻害が示唆された。葉酸の枯渇は、オフタルミン酸と同様に酸化ストレス条件下で報告されており、以上の代謝異常から、高脂血症病態の肝臓では著しい酸化ストレス障害があることが提示された。

また、病態群で対照群と違いが観察された代謝物質レベルの多くは、投薬後には対照群に近づくことが観察された。スタチンの主作用はコレステロール合成の抑制であるが、その他の多面的効果があることも報告されており、今回の結果は短期間の経口投与が酸化ストレスにより乱された低分子代謝プールの回復に寄与することを示唆している。

このような代謝物質レベルの変化は、血漿でもその一部が観察されており、血液検体による病態の酸化ストレス、及び投薬効果の評価に活用しうる可能性が提示された。

*** T. Soga *et al.* *J Proteome Res*, 2(5): 488-494, 2003.

メタボロームおよびリン酸化プロテオーム解析による膵がん、前立腺がん、肺がんの代謝調節の解析

藤森玉輝¹、大橋由明¹、佐藤基¹、山本博之¹、石濱泰¹、曾我朋義²、富田勝³、江角浩安⁵

¹ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社、²慶應義塾先端生命科学研究所、³国立がんセンター

要約

膵臓、前立腺、肺では、血流の違いなどにより臓器毎に栄養状態が非常に異なっている。腫瘍組織の代謝調節は、がん遺伝子によるシグナル伝達だけでなく、臓器の栄養状態の影響も受けている。我々は、臓器の違いによる腫瘍組織の代謝調節を明らかにするために、膵臓、前立腺、肺の腫瘍組織および正常組織を用いてメタボロームおよびリン酸化プロテオーム解析を行った。

メタボローム解析により、エネルギーチャージ、TCA 回路、アミノ酸代謝において、膵臓および肺の腫瘍組織で全く逆の代謝調節を行っていることが、リン酸化プロテオーム解析により、臓器特異的な代謝酵素のリン酸化プロファイルが示された。さらにメタボロームデータとリン酸化プロテオームデータの統合から、肺腫瘍組織の解糖系では、代謝酵素のリン酸化によって代謝物質が変動していることが明らかになった。

以上の結果から、メタボロームおよびリン酸化プロテオーム解析は、腫瘍組織の代謝調節を解明するには非常に有効な手法で、抗腫瘍薬のターゲット探索にも応用できる可能性が示唆された。

結果と考察

エネルギーチャージは生命活動に重要な因子の一つで、その増減は解糖系の活性化にも影響を与えるため、精密なメカニズムによって調節されている。以前の報告では、アデニル酸エネルギーチャージは胃および大腸の腫瘍組織で維持されていた。

本研究のメタボローム解析により、膵臓の腫瘍組織ではアデニル酸エネルギーチャージは増加したが、逆に肺の腫瘍組織では減少していることが明らかになった。一方で前立腺の腫瘍組織ではこのエネルギーチャージは変動しなかった。この結果から、エネルギーチャージに関して、膵臓と肺の腫瘍組織では異なる挙動を示していることが明らかになった。

腫瘍組織ではワーバーク効果が観察され、解糖系が活性化し乳酸が蓄積されることが知られている。肺の腫瘍組織では著しい乳酸の蓄積が見られ、膵臓の腫瘍組織においてもやや乳酸の蓄積が見られた。しかし前立腺では乳酸は検出されなかった。TCA 回路でも、コハク酸、フマル酸およびリンゴ酸が肺腫瘍組織で増加し、膵臓腫瘍組織で減少しており、膵と膵臓で逆の代謝変動が観察された。

アミノ酸代謝においても、膵臓腫瘍組織と肺腫瘍組織では全く逆の効果が見られた。膵

臓腫瘍組織では、正常組織と比較して、グリシン、アスパラギン、アラニン、リシンで有意に減少した。一方、肺腫瘍組織では、アスパラギン、トリプトファン、アラニン、イソロイシン、グルタミン、ヒスチジン、バリンが有意に増加した。前立腺腫瘍組織では正常組織と比較してアミノ酸量に違いは見られなかった。

以上より、膵臓の腫瘍組織と肺の腫瘍組織では、血流による栄養環境の違いにより逆の代謝調節を行っていることが明らかになった。前立腺の腫瘍組織は、膵臓と肺の間の特徴を示していた。

一方リン酸化プロテオームからは、正常組織と腫瘍組織の間の代謝酵素のリン酸化状態の変動は、臓器毎に異なっていることが明らかになった。メタボローム解析により、肺では正常組織においてフルクトース 6-リン酸からフルクトース 1,6-ビスリン酸への反応とホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への反応が抑制され、肺の腫瘍組織ではその抑制が解除されているように見えるが、リン酸化プロテオームによりそれぞれの反応を担う酵素が腫瘍組織でリン酸化されていることが明らかになった。

これらの結果を総合すると、肺の腫瘍組織の代謝変動は代謝酵素のリン酸化によって調節されている可能性が示唆された。

結論

栄養状態の異なる臓器の腫瘍組織のメタボロームおよびリン酸化プロテオームを行い、それぞれの臓器に特異的な代謝物およびリン酸化の変動を明らかにすることができた。メタボロームおよびリン酸化プロテオーム解析は、臓器毎の腫瘍組織の創薬のターゲット探索には非常に有効なアプローチであると考えられる。

本研究の肺の腫瘍組織の代謝変動は、これまでに報告されている胃および大腸の腫瘍組織の代謝変動と同様の傾向を示した。しかし、血流が悪い膵臓と血流がよい肺の腫瘍組織では全く逆の代謝調節を行っていた。つまり、血流の悪い膵臓の腫瘍組織では、これまで知られていなかった新規の代謝調節メカニズムが働いていると考えられる。

Rubisco 量の変動がイネメタボロームに及ぼす影響のメタボローム解析

鈴木雄二[†], 藤森玉輝[‡], 牧野周[†]

[†]東北大学大学院農学研究科, [‡]ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

要約

高等植物では、二酸化炭素を固定する酵素である Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase(Rubisco) の活性は現在の気象条件下における光合成速度の律速因子の一つであると考えられている。光合成増強を目的として、Rubisco の小サブユニット遺伝子 *RBCS* を過剰発現させることによって、遺伝子組み換えイネの作製が行われてきた。

しかしながら、それらの組み換えイネでは、Rubisco 量の増加は見られるが、光合成改善は認められず、Rubisco 量を増加させても光合成活性が増強しない根拠について明確になっていなかった。

本研究では、Rubisco 量を増減させたイネを用いて、メタボローム解析を行った。この結果、Rubisco 量の増加による代謝変動が解明され、光合成活性の増強に向けた糸口を見出すことができた。

結果と考察

本研究では、コントロールイネの展開葉 (W)、Rubisco センスイネ (過剰発現植物体) の展開葉 (S) および老化葉 (SS)、Rubisco アンチセンスイネ (発現抑制植物体) の展開葉 (A) を用いて、解析を行った。

コントロールイネの展開葉と比較して、Rubisco センスイネの展開葉では、Rubisco 量は約 1.5 倍に増加しており、Rubisco アンチセンスイネの展開葉では約 0.5 倍程度に減少した。一方 Rubisco センスイネの老化葉では、過剰発現による Rubisco 量の増加は見られなかった。

光合成活性に関しては、コントロールイネの展開葉、Rubisco センスイネの展開葉および老化葉では差は見られず、Rubisco アンチセンスイネの展開葉で約 0.5 倍に抑制されていた。Rubisco 過剰発現による展開葉および老化葉での Rubisco 量、光合成活性に関しては以前の報告と一致していた*。

また、これらの植物体の葉を用いて、メタボローム解析も行った。Rubisco はカルビンサイクルでリブロース 1,5- ニリン酸から二分子の 3- ホスホグリセリン酸を生成する反応を担っている。コントロールイネの展開葉と比較して Rubisco センスイネの展開葉では Rubisco の反応産物である 3- ホスホグリセリン酸の量が増加し、Rubisco アンチセンスイネの展開葉では減少していた。また、Rubisco センスイネの老化葉では違いは見られなかった。Rubisco の反応基質であるリブロース 1,5- ニリン酸は、Rubisco アンチセンスイネの展開葉

* Suzuki, Y. et. al., *Plant Cell Environ.* **32**(4):417-27, 2009

で大きく増加し、Rubisco 量の低下により反応基質が余剰状態になっていることを示唆している。これらの結果は、Rubisco の反応基質と反応産物においては Rubisco 量の増減の影響が認められた。

カルビンサイクルでは、反応が一回転する時、ATP が ADP に変換され、NADPH が NADP⁺ に変換される。そのため ATP や NADPH が欠乏すると、カルビンサイクルの活性が抑制される可能性が考えられる。コントロールイネの展開葉と比較して、Rubisco センスイネの展開葉では、ATP、NADPH 共に差は見られなかった。この結果は、Rubisco センスイネの展開葉では、Rubisco 量が増加しているにもかかわらず、光合成活性が上昇しないのは、ATP あるいは NADPH の欠乏によるのではないことを示している。

カルビンサイクルの代謝中間体で、3-ホスホグリセリン酸以外で、Rubisco センスイネで増加したのはセドヘプツロース 7-リン酸であった。セドヘプツロース 7-リン酸の下流経路の代謝物であるリポース 5-リン酸などは差が見られなかったことから、セドヘプツロース 7-リン酸を反応基質とするトランスケトラーゼ反応が律速になっている可能性がある。

結論

これまで Rubisco の量を増強しても光合成活性が上昇しない現象については知られていたが、その根拠については解明されていなかった。本研究で、Rubisco 量の増加がカルビンサイクル代謝中間体に及ぼす影響を解析し、Rubisco 量を増加することによって律速段階が Rubisco 反応からトランスケトラーゼ反応に移ることを明確にした。Rubisco とトランスケトラーゼ量を増加させた植物を作製すれば光合成活性を増強できる可能性が示唆され、本研究は今後イネの生産量を上げる研究の礎になると考えられる。

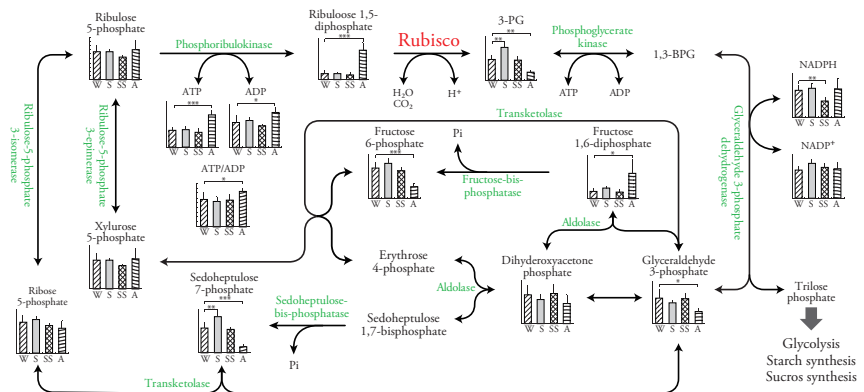


図 10.8 Rubisco を増減させた植物体におけるカルビンサイクルの代謝マップ

コントロールイネの展開葉 (W)、Rubisco センスイネの展開葉 (S)、Rubisco センスイネの老化葉 (SS)、Rubisco アンチセンスイネの展開葉 (A)。Ribulose 5-phosphate と Xylulose 5-phosphate はピーク分離できないので、それぞれ 2 物質の合計量を示している。縦軸は相対量である。