

メタボロミクスの 応用と実用

Applied Metabolomics

7.1 医学・薬学分野

7.1.1 疾病関連メタボリック・プロファイリング

代謝疾患としてのがん

“他のすべての疾病に比べ、がんには数えきれないほどの二次的な原因がある。しかし、がんにおいても、主要な原因はただひとつである。少ない言葉でまとめるならば、がんの主要な原因は、糖酵酵により通常細胞における酸素呼吸が変換されることである”

—オットー・H・ワールブルク 1966年
リンダウ・ノーベル賞受賞者会議にて¹³⁷

現在、がんは遺伝子変異が原因となって引き起こされるという考え方が主流である。事実、慢性骨髄性白血病（CML）におけるフィラデルフィア染色体（22番と9番染色体の転座により *c-abl* と *bcrl* 遺伝子が融合する）¹³⁸ が古くから知られ、また多くのがん遺伝子（増殖シグナル伝達に関係する遺伝子で、変異により無秩序な増殖を引き起こす）、がん抑制遺伝子（がんの発生を抑制する遺伝子）が発見されている^{139,140}。これらの遺伝子による増殖シグナル異常を正常化するために開発されているのが分子標的治療薬である。CML治療に用いられるイマチニブ（グリベック[®]）は、慢性期での寛解率は第II相試験で94.5%（日本国内は92.3%）ときわめて高く、大規模な第III相試験でも87.1%に達した¹⁴¹。一方、非小細胞肺

がん (NSCLC) 治療に用いられるエルロチニブ (タルセバ[®]) は、第 III 相試験での延命効果が化学療法で 4.6 ヶ月であったのに対し、エルロチニブでは 13.1 ヶ月であった¹⁴²。このように、遺伝子変異によるシグナル伝達抑制を狙う分子標的治療は、一定の効果を発揮しているが、がんの種類や臓器により効果が大きく異なる。

そこで見直されているのが、"代謝異常症"としてのがんである (Cancer as a metabolic disease¹⁴³ がとくに詳しい)。がん細胞の異常性の定義は、2000 年にハナハンとワインベルクにより提唱された "6 つの特徴" が広く受け入れられている¹⁴⁴。すなわち、1) 増殖シグナルの過剰状態、2) 増殖抑制シグナルへの非感受性、3) アポトーシスの回避、4) 無限の複製能、5) 持続的な血管新生、6) 組織浸潤性と転移能である。さらに最近 10 年間の知見を鑑み、彼らはさらに 7) エネルギー代謝のリプログラミング、8) 免疫破壊の回避の "2 つの特徴" を 2011 年に補足している¹⁴⁵。がん細胞におけるエネルギー代謝の異常は、1960 年代にオート・ワールブルクが提唱した "ワールブルク効果"¹³⁷ として広く知られている。ワールブルク効果とは、がん細胞ではミトコンドリアで行われる好氣的エネルギー生産 (酸化的リン酸化) が減弱し、嫌氣的エネルギー生産 (解糖系) が亢進していることを指し、酵母の "クラプトリー効果" (グルコース添加により酸素消費量が低下する効果) と類似である。この性質は好気条件下でも維持されることから、がん細胞では "パスツール効果" (酸素によりピルビン酸の醗酵が阻害される効果) が起こらないことも示された。このようにがん細胞で起きている代謝変化は不可逆であり、遺伝子変異によるシグナル伝達異常と密接な関係がある。

がん研究 (診断バイオマーカー開発を除く) におけるメタボロミクスの利用は、まだ少数を数える程度であるが、今後重要度を増していくと考えられている¹⁴⁶。慶應義塾大学の曾我のグループは、大腸がんおよび胃がん患者から外科的に切除した腫瘍組織と非腫瘍組織のメタボリック・プロファイリングを、CE-MS によるメタボローム解析で比較した¹⁴⁷。その結果、解糖系、クエン酸回路およびアミノ酸レベルに特徴的な変化が観察された。グルコースレベルは腫瘍組織で顕著に低下しており、がん細胞がグルコースを著しく消費していることが伺えた。また乳酸レベルは顕著に増加しており、ワールブルク効果を確認した。クエン酸回路では、腫瘍組織でアセチル CoA やクエン酸が低く、またコハク酸、リンゴ酸、フマル酸が顕著に増加していた。これは、嫌気性微生物や回虫で知られているフマル酸呼吸 (複合体 II において、フマル酸から高エネルギープロトン 2 つとコハク酸を生じる) ががん細胞でも起きていることを示唆し、江角らによる知見^{148/149} と一致している。また、がん細胞ではアミノ酸レベルは、グルタミンを除くすべてのアミノ酸について腫瘍組織で高度に蓄積しており、グルタミンが利用されていることが予想された。

7.1.2 バイオマーカー探索と臨床検査

生体をひとつのシステムとして捉えたとき、ホメオスタシスが生命の維持に重要な役割を担っていることが知られている。例えば、ヒトの血糖値はおおよそ 90 mg/dl であるし、体温は 37℃前後に保たれている。遺伝的变化、感染、老化などによりこの恒常性維持機構に破綻が生じ、正常な状態が維持できない状態になったとき、疾病に罹患したという。そこで、罹患した生体内での具体的な状態変化を探索することが、疾病の診断、治療、そして予防に有益な情報を与える。メタボロミクスは、これまでの知識からは予測不能な生体内代謝物質レベルの変化を、バイアスをかけない手法で包括的に探索することに他ならない。そして、バイオマーカーとは、ある特定の疾病や生物学的変化を特徴づける生物学的指標であり、とくに体液中の代謝物質レベル変化を把握することは、疾病の診断や治療効果の評価に直結するだけでなく、ときに疾病そのものの定義になることもある。

疾病バイオマーカーの開発は、オミクス研究以前から精力的に行われ、多くの疾病診断法の確立に寄与してきた。そして、オミクス全盛の昨今においては、診断が困難な疾病のバイオマーカー探索法としてのオミクス技術に過大な期待がかけられている。しかし、オミクス技術は標的分子の網羅性がひとつの性能評価指標であることから、ときに感度の不足が問題になり、さらなる技術革新を待たなければならない状態にある。実際、プロテオミクスにおいては、疾病バイオマーカーを発見するには現在の液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) では感度不足であることが指摘されている¹⁵⁰。これまでに発見され、実用化されている低分子バイオマーカーは、現在のメタボロミクス技術でほとんどが解析可能であり、血液を試料としたバイオマーカー探索にはメタボロミクスが有効であることを示している。このように、メタボロミクスはバイオマーカー探索にとって現在望みうる最高の解析手法のひとつである。

7.1.3 前立腺がんバイオマーカー

前立腺がんは、男性生殖器の一部で前立腺液を分泌する前立腺に発生するがんで、現在は血清中の前立腺特異抗原 (PSA) の上昇により健康診断などでスクリーニングに利用されている¹⁵¹。しかし、PSA によるスクリーニング効果に疑問の声も上がっている¹⁵²。米ミシガン大学のアルル・M・シナイヤンのグループは、前立腺がんではアンドロゲン感受性が増加し、グリシン *N*-メチル転移酵素が誘導されてサルコシン (*N*-メチルグリシン) が腫瘍組織内で蓄積することを、LC-MS による尿のメタボローム解析により見出した¹⁰⁰。さらに培養した前立腺上皮細胞をサルコシンや前駆体のグリシンに曝露したところ、浸潤性が高くなったことから、サルコシンは前立腺がんの悪性度の原因になっている可能性をも示した。サルコシンが前立腺を診断するマーカーとなるかどうかの結論は出ていないが、現在のとこ

る残念ながら診断性能は PSA と同レベルかそれ以下のような¹⁵³。その他の前立腺がんバイオマーカーについてはレビュー¹⁵⁴によくまとまっている。

7.1.4 糖尿病のリスク評価バイオマーカー

糖尿病の罹患リスクを測定する手法として、現在はボディマス指数 (BMI) や空腹時血糖値が用いられているが¹⁵⁵、より信頼性の高い、早期の糖尿病リスク診断が求められている。米マサチューセッツ総合病院 (MGH) およびハーバード大学のトーマス・J・ワンとロバート・E・ジャーツテンのグループは、フラミンガム・オクスプリング・スタディにて収集した 2,422 名の非糖尿病被験者を 12 年間追跡し、糖尿病を発症した 201 名と発症しなかった被験者の LC-MS/MS による血液メタボロミクスを行った¹⁵⁶。その結果、イソロイシン、ロイシン、バリンの 3 種の分岐鎖アミノ酸とチロシン、フェニルアラニンの 2 種の芳香族アミノ酸において糖尿病発症群で有意差が見つかり、とくにイソロイシン、チロシン、フェニルアラニンの 3 アミノ酸を組み合わせた回帰モデルにより得られたリスクは、上位 25% のハイリスク群で約 5 倍となった。

7.1.5 肝臓疾患バイオマーカー

肝臓に関する主な疾病は、脂肪肝、ウィルス性肝炎 (A 型、B 型および C 型)、薬剤性肝障害、アルコール性肝炎、非アルコール性肝炎 (NASH)、そして肝がんである。これらの疾病の診断では、超音波や CT 検査も行われるが、スクリーニングとしては、肝臓に多く存在するアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) やアラニントランスアミナーゼ (ALT) の血清中濃度上昇、血小板数 (PLT) 減少、ヒアルロン酸の上昇、総ビリルビン上昇などを総合的に判断する。しかし、肝臓疾患に罹患してもこれらの数値に変化が生じないこともあり、次世代のマーカー探索が行われている。肝臓は血流量が多く (重量の半分は血液と言われる)、また解毒や脂肪代謝など多くの代謝系が活性化されていることから、メタボロミクスによる疾病バイオマーカー探索の標的臓器として注目されてきた。

慶應義塾大学の曾我のグループは、最近 CE-MS によるメタボロミクスを用い、薬剤惹起性肝障害、B 型肝炎ウィルス保持、B 型肝炎、C 型肝炎 (ALT 正常値)、C 型肝炎、肝硬変、肝がんの患者血清中の γ -グルタミルジペプチド類が上昇することを発見した¹⁵⁷。この一群の代謝物質は、グルタミン酸の γ -カルボキシル基とアミノ酸の α -アミノ基が脱水縮合したジペプチドで、グルタチオン (L- γ -グルタミル-L-システイニル-L-グリシン) 生合成経路により合成される。同様の経路で合成されるオフトアルミン酸 (L- γ -グルタミル-L-アミノプテニル-L-グリシン) が、これより前に薬剤惹起性肝障害マーカーとして報告されている¹⁵⁸。また、ベルン大学 (スイス) のフランク・J・ゴンザレスのグループは、アルコール性

肝炎 (ALD) を発症したマウス尿では、トリプトファン代謝物であるインドール-3-酢酸およびフェニル酢酸のレベルが上昇することを見出し、アルコール摂取による脂肪肝によりこれらの代謝が活性化し、尿への排泄量が増加していると説明している¹⁵⁹。

7.1.6 心血管イベントバイオマーカー

心筋梗塞など心血管イベントの予測や病理学的知見を得るため、近年メタボロミクスが適用されるようになってきている¹⁶⁰¹⁶¹。非 ST 上昇型冠症候群 (NSTEMI) 患者の血漿成分を GC-MS により解析したメタボリック・フィンガープリンティングでは、4-ヒドロキシプロリン (4OH-Pro) の低下が観察されている¹⁶²。血液循環している 4OH-Pro は、血管壁において蓄積したりポタンパク質への低比重リポタンパク質 (LDL) の結合を阻害し、動脈硬化部位から LDL を除去する働きがあると考えられており、この結果は興味深い。また、CE-MS による冠動脈疾患 (CAD) 患者の尿中ペプチド分析では、コラーゲン α -I 由来ペプチドが増加しており、コラーゲンの動脈硬化形成への関与が考えられた¹⁶³。

7.1.7 腎疾患バイオマーカー

腎臓は、血液中の成分を尿に排泄するフィルターであり、障害を受けると尿毒症の原因となるため、腎不全患者は人工血液透析を受けなければならない。現在の腎障害診断基準は、尿中マイクロアルブミンの上昇であるが、基準値を超えたときには早期腎症に罹患しており、さらに早期で患者を発見できるマーカーが求められている。最近、尿シスタチン C¹⁶⁴¹⁶⁵ や L 型脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP)¹⁶⁶ が注目されているが、本来の腎機能を反映する低分子マーカーが有望視されている¹⁶⁷。

東北大学の阿部のグループは、CE-MS による慢性腎炎 (CKD) 患者血漿のメタボローム解析を行い、eGFR (推算糸球体濾過量) の低下とともに血漿に蓄積する 52 物質 (新規物質 36)、減少する 12 物質 (新規物質 7) を見出した¹⁶⁸。これまでに 110 種類の尿毒症物質が見つかった¹⁶⁹が、この研究により新たに 43 種の物質が尿毒症物質の候補となった。またそれらの中で、早期 CKD 診断のマーカー候補として、1-メチルアデノシン、*N*-アセチルグルコサミン、 γ -ブチロバチン、セバシン酸、*cis*-アコニット酸、ホモバニリン酸が挙げられた。薬物投与による腎毒性マーカーも、早くから探索されている。免疫抑制剤シクロスポリン A 投与によるげっ歯類腎毒性モデルでは、NMR を用いたメタボローム解析により、尿中トリメチルアミン-*N*-オキシド (TMAO) レベルが低下することが見つかった¹⁷⁰¹⁷¹。また、グルコース、酢酸、トリメチルアミンの上昇も見られる。抗生物質ゲンタマイシン投与による腎毒性においても尿中 TMAO レベルは低下する¹⁷²。また尿中グルコースも上昇するが、これは腎性糖尿と呼ばれる現象で、腎毒性マーカーとして提唱されている¹⁷²

¹⁷³。ゲンタマイシンによる腎障害では、独立に尿中 6-ヒドロキシメラトニンの上昇が報告されている¹⁷⁴。この物質は抗酸化物質であるメラトニンの酸化副産物であり、実際メラトニンサプリメントによりゲンタマイシンや塩化水銀による腎障害を防ぐことができる^{175 176}。また、ゲンタマイシン、抗がん剤であるシスプラチン、抗生物質トブラマイシンの腎毒性メタボローム解析で、尿中のポリアミンやアミノ酸が上昇することも報告されている¹⁷⁷。

7.2 醗酵生産分野

7.2.1 醗酵食品と食品添加物生産

醗酵とは微生物などに目的の物質を効率よく生産させることであり、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などを用いて食品添加物から色素類、医薬品、抗体など幅広い分野で物質生産法として利用されている。また、食品を原料として醗酵させたものは、醗酵食品として毎日の食卓に並ぶ。狭義の醗酵とは、細胞が酸化的リン酸化に頼らずに嫌気条件下で行うエネルギー獲得代謝を指し、呼吸や光合成と明確に区別される。例えば、酵母のアルコール醗酵では嫌気状態で解糖系（エムデン - マイヤーホフ経路）が活性化され、グルコース 1 分子からピルビン酸 2 分子がつくられ、その際 ATP 2 分子が生成する。さらにピルビン酸はアセトアルデヒドを経てメタノールを生成し、同時に NADH を酸化する。広義の醗酵とは、上記の他にエネルギー代謝と直接関係をもたない特定物質や食品を生産することを含む。このように、醗酵とは代謝そのものであり、その効率化や改変を行う際にメタボロミクスが大いに役立つ。

キリンホールディングスの吉田のグループは、ビール醗酵の際に抗酸化剤である亜硫酸 (SO_2) を増加させながら、臭み成分である硫化水素 (H_2S) を減少させることを目的として、メタボロミクスとトランスクリプトミクスを駆使してビール酵母の育種に成功した¹⁷⁸。

H_2S は SO_2 から 1 段階で生成されるが、重要なアミノ酸であるメチオニン合成の基質でもあり、本代謝経路を遮断することはできない。そこで、 SO_2 レベルを維持しつつ、 H_2S から下流の代謝を活性化させることが求められる。ビール酵母 (SO_2 、 H_2S ともに高生産する) とパン酵母 (両代謝物質の生産性が低い) のメタボリック・プロファイルを CE-MS 分析にて比較したところ、パン酵母ではホモシステイン (メチオニン前駆体) 前駆体である *o*-アセチルホモセリンが蓄積しており、これが H_2S レベルの律速因子であることが判明した。また、トランスクリプトーム解析から、*o*-アセチルホモセリン合成およびメチオニン合成経路の遺伝子発現が低下していることが観測された。そこで、*o*-アセチルホモセリン合成経路とメチオニン合成経路を活性化することで、 SO_2 の増産と H_2S の低下を実現するという仮説を立て、酵母の育種を行った。*o*-アセチルホモセリン合成経路活性化はス

レオニン類似体への耐性株を得ることで、またメチオニン生合成経路活性化はメチオニン類似体への耐性株を得ることで取得したところ、SO₂生産量は約3倍、H₂S生産量は約3分の2となる株を育種することができた。

7.2.2 食品の機能性および品質評価

メタボロミクスを用いた食品や食品原料の品質や機能性の評価は、近年注目されており、フード・メタボロミクスと呼ばれることもある¹⁷⁹。とくに酒類や茶など、熟練した専門家の官能試験による評価に頼っている分野では客観的な品質評価法が求められており、メタボロミクスを適用した例が報告されている。大阪大学の福崎のグループは、熟練者による日本茶の評価とGC-MSによるプロファイリングを比較し、メタボロミクスによる評価モデルを作成した^{112 180}。そして高級茶にはテアニン、キナ酸、リボース、アラビノースが多く含まれており、低級茶にはフルクトース、マンノース、スクロースなどの糖類が多いことが判明した。また、同グループはLC-MS分析も行い、エピガロカテキンやエピガロカテキンガラート、エピカテキンガラートが高級茶のマーカーであることを示している¹⁸¹。

日本酒でもCE-MSを用いた解析で同様の試みがなされている¹⁸²。慶應義塾大学の杉本らは、日本の東北地方の純米、特別純米、純米吟醸酒49銘柄の官能試験とCE-MSによるメタボローム解析を実施した。その結果、検出された100種類以上の低分子成分の中で、アミノ酸類が雑味（不快でクリアでない味）と高い相関を示すことが判明した。とくに分岐鎖アミノ酸が多いと雑味を呈する。この研究は、“雑味”と言う曖昧さを含む評価基準について、化学的根拠を提唱している点で興味深い。

ワインにおいては、フェデリコ・サンタ・マリア工科大学（チリ）のグループがC18カラムを用いたUPLC-MSによるメタボローム解析を行っている¹⁸³。この研究では、2004年から2006年に醸造されたチリ産赤ワイン合計216種（カルメネール72種、カベルネ・ソーヴィニヨン72種、メルロー36種、シラー36種）の成分を解析した。トータルイオンクロマトグラムは、一見してブドウ品種に依存した特徴を示した。また、全検出シグナルのうち、すべてのブドウで共通に検出されたものは9%に留まり、主成分分析（PCA）による解析でもブドウ品種ごとに明確な分離を示した。また、同一ブドウ品種内でも、醸造年によりPCAでの明確な分離が確認された。しかし、ワインのグレードにおいては、PCAでは明確な分離が得られなかったため、線形判別分析（LDA）による学習でグレード予測モデルを構築している。

7.3 植物の基礎研究

7.3.1 栄養添加及び欠乏下における代謝変動

植物は、生育に必要な生体構成物合成の材料等に利用するために、環境中から無機物を取り込み、有機物に変換している。炭素源として大気中の二酸化炭素を取り込み、窒素源及び硫黄源として土壤中から硝酸イオン、硫酸イオンを取り込み、3-ホスホグリセリン酸、グルタミン酸、システイン等の有機物に変換している。これらの無機物から有機物への変換経路は、それぞれ炭酸同化経路、窒素同化経路、硫黄同化経路と呼ばれている。植物は生長と物質生産を調節するために、生体内の炭素量、窒素量、硫黄量を厳密にコントロールしている。それゆえ、それぞれの同化経路は協調的に制御されていると考えられている。栄養添加及び栄養欠乏下という環境変化に対して、それぞれの同化経路がどのように調節されているかについての理解を深めるためには、メタボロミクスを用いた植物の代謝研究が必須である。

マックスプランク研究所(ドイツ)のスティットのグループは、シロイヌナズナに栄養源を与えた時に起こるダイナミックな代謝変動を、トランスクリプトミクスと共に LC-MS、GC-MS、HPLC によるメタボロミクスを用いて経時的に調べている。窒素源として硝酸イオンを与え、経時変化を観察することで、窒素同化経路の活性化だけでなく窒素同化を行う際にアミノ基を付加する炭素骨格を供給する経路、硫黄同化経路も活性化することが明らかになった¹⁸⁴。さらに炭素源としてスクロースを与えると、解糖系だけでなく、窒素同化経路、シキミ酸経路、脂肪酸代謝が活性化され¹⁸⁵、無機リン酸イオンを添加すると、糖リン酸代謝、有機酸、アミノ酸代謝が変動を受ける¹⁸⁶。また、同研究所のヘーフゲンのグループは、シロイヌナズナを硫黄欠乏下に曝した場合の代謝について LC-MS によるメタボロミクスを用いて調べ、硫黄同化経路の抑制だけでなく、アミノ酸代謝、フラボノイド代謝、脂質代謝を調節することで、硫黄欠乏下における生存応答を行っていることを明らかにしている¹⁸⁷。

理化学研究所の平井および斉藤のグループは、窒素欠乏及び硫黄欠乏における植物の代謝応答を、トランスクリプトミクスおよび FT-MS、CE、HPLC を用いたメタボロミクスを行い、窒素、硫黄欠乏で、共通の変動、各栄養欠乏特異的な変動を示す代謝経路が明らかになった¹⁸⁸。また、それに伴い二次代謝経路の1つであるグルコシノレート代謝も影響を受け、一次代謝内だけでなく、一次代謝と二次代謝の相互調節も観察された。

栄養源の添加および欠乏による代謝変動についてメタボロミクスを行った一連の研究により、ある1つの代謝経路が調節を受けると、他の代謝経路も協調的に制御を受けることが明確になった。そのため、代謝経路間の協調的な調節メカニズム(例えば、シグナルとなる代謝物質、律速反応等)を解明することができれば、植物の代謝全体について代謝工学を用いて活性化できる可能性がある。

7.3.2 遺伝子組み換え植物の評価

メタボロミクスは、遺伝子過剰発現植物体あるいは遺伝子破壊植物体の代謝を評価するためにも用いられている。

東京大学の内宮のグループは、葉緑体で使われる補酵素 NADP プールが代謝に及ぼす影響を、CE-MS を用いたメタボロミクスにより調べている。植物の細胞質では NAD および NADH が補酵素として用いられている一方、葉緑体では NADP および NADPH が用いられている。NAD から NADP への変換酵素は、NAD キナーゼである。シロイヌナズナの NAD キナーゼ遺伝子を過剰発現させた植物体および遺伝子破壊植物体のメタボロミクス¹⁸⁹ から、葉緑体の NADP プールの増大により、炭素代謝および窒素代謝が活性化することが明らかになっている。同様に、NAD キナーゼ遺伝子過剰発現イネでは、アミノ酸、リブロース 1,5-二リン酸、グルタチオンの増加が見られており¹⁹⁰、シロイヌナズナと同様にイネにおいても、葉緑体の NADP のプールの増大により、代謝が活性化することを示している。

九州大学の射場のグループは、高二酸化炭素濃度でも気孔が閉じない変異体を単離して、原因遺伝子が S 型アニオンチャネルをコードしていることを明らかにした。さらに、野生型植物体と変異植物体の孔辺細胞の代謝物質を CE-MS メタボロミクスにより、このアニオンチャネルの基質を突き止めた¹⁹¹。

理化学研究所の斉藤のグループは、概日リズムに異常を示す遺伝子破壊植物体のトランスクリプトミクスと GC-MS メタボロミクスにより概日リズムの調節と代謝の関係を明らかにした¹⁹²。概日リズムに異常を示す植物体では、TCA 回路の代謝中間体、植物ホルモン、糖類、抗酸化物質の濃度が影響を受けていた。これらの代謝変動のデータは、遺伝子発現レベルの結果によってもサポートされていた。この結果は、概日リズムの異常が多くの代謝経路に影響を及ぼしている可能性を示唆している。

葉緑体局在のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子のノックダウンイネは、硝酸イオンを窒素源とした時は成育遅延はみられないが、アンモニウムイオンを窒素源とすると成育の遅延が見られる。農業生物資源研究所の宮尾のグループは、アンモニウムイオンを窒素源とした野生型イネとノックダウンイネを GC-MS を用いたメタボロミクスにより比較し、当該酵素の機能解明を試みている¹⁹³。ノックダウンイネでは、TCA サイクル中間体、グルタミン酸、アスパラギン酸が減少しており、これらの代謝変動がアンモニアを窒素源とした時の生育遅延に関連している可能性が示唆された。

7.3.3 ストレス応答下における代謝変動

植物は、環境変化に対して代謝を調節することによって、耐性を高めていることが知られている。これまで、環境ストレスにさらされた植物について、DNA マイクロアレイを用

いた遺伝子発現解析から、どの代謝経路が変動しているか、代謝経路全体として遺伝子発現レベルでは明らかになっていった。しかし、どのストレス下でその代謝経路のどの代謝物が蓄積されるかについては明確になっていなかった。そこで、野生型植物体、ストレス耐性植物体、ストレス感受性植物体等を用いて、ストレスに応答した代謝変動についてメタボロミクスを用いて調べられた。

東京大学の篠崎のグループは、ストレス耐性を付与する転写因子が代謝に及ぼす影響について、CE-MS、LC-MS、GC-MSによるメタボロミクスを用いて調べた¹⁹⁴。DREB1A転写因子の過剰発現植物体では、凍結および脱水ストレス耐性が高まり、活性型DREB2A転写因子の過剰発現植物体では、脱水ストレス耐性が高まった。これらの過剰発現植物体のメタボローム解析により、単糖類、二糖類、三糖類及び糖アルコールの蓄積が凍結ストレス耐性を高めることを明らかにした。

理化学研究所の篠崎のグループは、乾燥ストレスにおいてアブシジン酸の蓄積が代謝に与える影響を、トランスクリプトミクスと共にCE-MS、GC-MSによるメタボロミクスを用いて解明した¹⁹⁵。乾燥ストレス下でアブシジン酸を蓄積して、乾燥耐性を高めていることが知られているが、アブシジン酸の蓄積が乾燥ストレス下で代謝変動に及ぼす影響は知られていない。そこで、野生型植物体とアブシジン酸生成酵素変異植物体を用いて、乾燥ストレス下で変動する代謝物質を調べた。その結果、乾燥ストレス下で、アブシジン酸依存的に変動する代謝物質と非依存的に変動する代謝物質に分類することができた。また、これらの代謝変動は遺伝子発現レベルで調節されていることが分かった。

7.3.4 新規代謝酵素遺伝子の機能解明

理化学研究所の齊藤のグループは、トランスクリプトミクスとメタボロミクスを用いることで、植物の新規代謝酵素の機能解明に成功している。ここでは、2つの研究を紹介する。

シロイヌナズナの葉緑体の脂質であるスルホキノボシルジアシルグリセロールは、グルコース 1-リン酸と UTP から 3段階の反応によって生成される。2段階目、3段階目の反応を担う酵素として SQD1 と SQD2 は同定されていたが、1段階目のグルコース 1-リン酸と UTP から UDP-グルコースが生成される反応を担う酵素は同定されていなかった。同じ代謝経路の酵素反応を担う酵素遺伝子は共通のメカニズムで遺伝子発現が調節され、発現パターンは類似している可能性が高い。理化学研究所のウェブサイトでは、シロイヌナズナマイクロアレイデータを用いて類似した発現パターンを示す遺伝子を探索できる。このプログラムを用いて SQD1 遺伝子と SQD2 遺伝子と類似した発現パターンを示す遺伝子群を選抜き、さらに LC-MS、GC-MS 等によるメタボローム解析を行うことで、スルホキノボシルジアシルグリセロール生合成の 1段階目の反応を担うのは UGP3 遺伝子がコードする酵素であることを明らかにした¹⁹⁶。

また遺伝子破壊植物体と野生型植物体のメタボロミクスからも、新規代謝酵素遺伝子の働きを明らかにしている。PAP1 遺伝子を過剰発現させるとアントシアニンの蓄積が増大することから、PAP1 がアントシアニン生成経路の遺伝子発現を調節していると予想された。PAP1 遺伝子過剰発現植物体では、アントシアニン生成経路の既知の代謝酵素遺伝子だけでなく、推定上のグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子2種の発現が上昇したことから、これらの2遺伝子は、アントシアニン生成経路の反応を担う酵素をコードしている可能性があると考えられた。そこでLC-MS およびFT-MS によるメタボローム解析を行ったところ、これら2種類の新規代謝酵素遺伝子の機能が明らかになった¹⁹⁷。

7.4 微生物

7.4.1 微生物メタボロミクスのトレンド

微生物は代謝研究のモデル生物として数多くの研究が行われており、メタボロミクスにおいてもその黎明期からの主要な研究対象である。“メタボローム”という単語が定義された1998年には、大腸菌の細胞内に存在する約70の代謝物質を薄層クロマトグラフィー(TLC)により分離・検出し、増殖速度の違いや遺伝子変異に伴う代謝プロファイルの変化が報告されている¹⁹⁸。2000年からは、MSやNMR等の測定技術の飛躍的な発展に伴い観察可能な範囲が広がり、今日では大腸菌の一次代謝を構成する200以上の代謝物質を一斉に測定することができる¹⁰。またオミクス解析が一般的に用いられ、“ポストゲノム時代”とも呼ばれる現在では、メタボロミクスを他のオミクスと組み合わせて多層的システムの一部として代謝を捉えるアプローチが行われている。この例として、大腸菌遺伝子株のマルチオミクス解析から、代謝プールの“恒常性”がmRNAやタンパク質のそれよりも強いことを提示した研究がある¹⁹⁹。また、遺伝子機能の探索研究においてもメタボロームが活用されており、例えば、酵母の遺伝子機能スクリーニングにおいて従来の指標では遺伝子変異の影響が観察し難い“潜在的表現型”を特徴づける指標として代謝プロファイリングが行われている²⁰⁰。最新の研究では、海洋微生物群²⁰¹や腸内細菌叢²⁰²、あるいは口腔常在菌叢²⁰³など、複数種の微生物が形成する菌叢(=社会集団)がメタボロームの単位として扱われており、今後は従来の生物単位に捉われない視点からのメタボロミクスも注目されている。

7.4.2 微生物の表現型としての代謝プロファイリング

微生物の表現型を特徴付ける指標として、一般的にはコロニーや顕微鏡観察による外観、あるいは栄養要求性などの増殖条件などが多く用いられる。しかし、微生物のシステムは高

等生物と比較して単純である分、これらの指標には顕れ難い表現型も多く“潜在的表現型”などと呼ばれる。このような対象に関する細胞内外の代謝プロファイリングは、表現型を特徴付ける新たな指標として、細胞外からは観察できない差を、または代謝プール全体を俯瞰することで初めて見える特徴を浮かび上がらせる。

例えば、大腸菌の有機酸代謝に関わる遺伝子を欠損させた株では、増殖速度やグルコース消費に顕著な変化は得られなかった一方で、細胞内の代謝は野生株と異なることが明らかになった²⁰⁴。また、トランスポゾンを用いたランダム変異株のスクリーニングにおいては細胞外代謝プールの測定から代謝プロファイルに大きな影響を受けた変異株の分離に成功している²⁰⁵。

一方、栄養源やストレスに応じた微生物の表現型の変化、即ち環境に対する適応を把握する上でもメタボロミクスによる代謝プロファイリングが活用される。栄養適応のモデルとしては、炭素源としてグルコースを用いた研究が多く、例えばブドウ球菌のグルコース枯渇をモデルとしたプロテオミクスとメタボロミクスのマルチオミクス解析からは、代謝活性(酵素)と代謝プール(代謝物)が関連しながら経時的に変化する様子が捉えられている²⁰⁶。また、環境ストレスへの適応例としては、温度²⁰⁷、pH²⁰⁸、塩²⁰⁹に対する代謝の応答が調べられている。

7.4.3 システムとして微生物の代謝を読み解く

微生物は代謝研究における基本モデルであり、古くからの生化学研究を通じて多くの現象が明らかにされている。しかし、メタボロミクスという包括的な視野を導入することで、システムとしての代謝の新たな一面が発見されている。

例えば、大腸菌の窒素同化はよく知られた現象であるが、メタボロームの変化からは、ごく一部の酵素活性や代謝分子量が変化することで全体的な恒常性が保たれるという側面が明らかになった²¹⁰。またエネルギー代謝に関しては、コリネ型細菌のリン枯渇への応答を解明する中でリンの有無によって異なる炭素源がエネルギー代謝に投入されていることが発見されている²¹¹。微生物がエネルギーを生産する場合、一般的には資化されやすい糖源から逐次的に消費される。しかし、最近行われた結核菌のメタボローム解析からは、複数の炭素源が同時に消費されること、またその際には炭素源に応じて異なる代謝経路を経るという代謝システムのコンパートメント化が発見されている²¹²。

一方、メタボロミクスの結果からシステムの中で働くキープファクターを抽出して微生物の代謝システムを理解することも可能となった。大腸菌ではRNA分解酵素の活性が中心糖代謝に制御される現象が知られていたが、メタボローム解析を通じて制御因子が酵素に結合して活性を阻害するクエン酸であることが証明された²¹³。また、昆虫病原性菌の一種である *Photorhabdus luminescens* は宿主が線虫から昆虫に変わると、殺虫性毒素や抗生物質を生

産することが知られている。このような代謝の変動を誘起する制御因子の探索を目的としたメタボロミクススクリーニングの結果、宿主体液中のL-プロリンがその役割を担っていることが明らかになった²¹⁴。

7.4.4 動物と微生物の代謝 —腸内細菌叢に関するメタボロミクス—

近年、プロバイオティクスに代表されるように腸内細菌の役割が注目され、またその研究におけるメタボロミクスの活用が期待されている²¹⁵。腸内細菌そのものを対象とする場合は糞便やその抽出液が試料として用いられる^{216,217}。一方、腸内細菌の代謝が宿主に与える影響を評価するという意味では、宿主である動物の血液や組織も解析対象となる。実際、無菌マウスの血液中の代謝プロファイルは通常マウスと異なり、その薬物代謝にも影響を受けることが報告されている²¹⁸。また、乳酸菌を投与したマウスの体液や組織のメタボロミクスによりプロバイオティクス処置で肝臓のエネルギー代謝が変化することも報告されている²¹⁹。さらに近年では、ヒトの疾患に対する腸内細菌の影響に関する研究でもメタボロミクスから成果が得られている。例えば、過敏性腸炎(IBS)の患者では、血液中の糖やアミノ酸の一部が異常値を示し、またプロバイオティクス処置により IBS 症状が緩和したケースではこれらの血中濃度が正常値に戻ることが発見された²²⁰。さらにメタボローム解析から得られた循環器疾患の血中マーカーの代謝に腸内細菌が関与しており、疾患の重症化に腸内細菌の存在が関与するとの報告がなされている²²¹。これまで腸内細菌を観察する手法は培養スクリーニングやメタゲノムのアプローチが主であったが、メタボロミクスの活用により、腸内細菌自身の、またさらには腸内細菌と宿主のクロストークについても研究の発展が期待されている。

7.4.5 現在の技術的課題 —微生物の代謝を " 正しく " 観察する—

微生物の細胞内外に存在する代謝プールを測定するためには、適切なサンプリング方法が求められる。とくに微生物の代謝はサンプリング中の環境変化に影響されやすいため、研究の内容や目的に応じて集菌方法、クエンチング溶媒、細胞洗浄法などが検討されるべきである^{222,223,224}。また菌の種類や性質によっても各サンプリング法に対する適性は異なり^{225,226}、特にバイオフィームを形成する菌株などにおいては、実験手法だけではなく、試料形態に応じた検出値の補正も考慮する必要がある²²⁷。近年では様々な菌種に適したサンプリング法の報告があり、また迅速な集菌を行うためのシステムも考案されているが、一方ですべての試料種に適した汎用的なサンプリング法は確立されていないのが現状である²²⁸。

7.4.6 今後の微生物メタボロミクス

今後期待される応用研究のひとつに、安定同位体ラベルを用いた新規代謝物質及び代謝経路の探索が挙げられる。このような実験は昔から代謝経路の確定手法として行われているが、メタボロミクスによるノンターゲットな探索を行うことで、既存の知見では予想が困難な新規物質や経路の発見に繋がる^{229,230}。また、安定同位体をメタボロームの測定法で追跡することで広範な代謝経路の流量を測る、即ちフラックス解析を行うことが可能であり、とくに NMR を用いることで微生物の代謝を非侵襲的に " 生きたまま " 観察することができる。腸内細菌が有毒脂肪酸を無毒化する過程の観察では、対象分子種が限定されているものの、中間体を含めた代謝物質の変遷がはっきりと観察されている²³¹。また、近年では代謝プールの大きさ、すなわち各代謝物質の濃度情報の重要性が認識されつつある。大腸菌細胞内に存在する代謝物質の濃度を測定すると、総量の大部分を一部の代謝物質が占めていた。また各代謝物質の濃度とそれらを基質とする酵素の結合親和性 (K_m) を比較すると、一部の基質 - 酵素ペアで大きな解離があり、代謝というシステムに存在する " 偏り " が発見されている²³²。現在のメタボロミクス測定は、一般的に相対定量であり、また前述したサンプリングにおける問題点など、対象試料中の全体濃度を測定することには限界がある。しかし、今後のマルチオミクスにメタボロームの情報を生かす意味でも、様々な種・条件下の微生物細胞内外の代謝プールの大きさを把握しておくことは重要であろう²³³。

7.5 新規酵素機能の探索

これまでに多くの生物種でゲノム配列が解読され、それらにコードされているタンパク質の存在が明らかとなっている。しかし、最も初期に解読された大腸菌ゲノムに見出された 4,149 遺伝子のうち、機能が明らかとなっているものは 60% に留まり、その他の遺伝子は実験的に機能が証明されていない²³⁴。酵素タンパク質に限っても、全酵素のうちの 30 ~ 40% は未だ機能が同定されていないとされる²³⁵。新規の酵素機能の同定は、酵素反応の基質、産物の決定を意味する。これまでは、1) 遺伝学的手法により、特定の代謝物質の反応系に関与する遺伝子を同定し、クローン化した酵素の機能を同定する方法、2) 酵素化学的手法により、活性を指標として細胞粗抽出液からタンパク質を精製画分し、酵素およびその遺伝子を同定する方法が用いられてきたが、いずれの手法も代謝物質を事前に想定しなければならない。メタボロミクスを用いた酵素基質探索法は、機能未知の酵素もしくは遺伝子を出発点として基質探索を行う実際的な手法であり^{236,237}、主に 2 つのアプローチが存在する。第 1 のアプローチは、目的遺伝子を破壊した細胞や個体を作製し (破壊できない場合は温度感受性細胞などを作製する)、メタボローム解析を実施することで基質分子 (細胞内で蓄積するだろう) と産物分子 (細胞内で減少するだろう) を探索する。この手法は Activity-based

Protein Profiling (ABPP) と呼ばれる²³⁸。第2のアプローチは、精製された目的遺伝子産物(酵素)を用意し、代謝物質カクテル(細胞抽出液や試薬の混合物など)に混合して反応させ、反応液のメタボローム解析を実施することで基質分子(反応液中で減少するだろう)と産物分子(細胞内で蓄積するだろう)を探索する。

第1のアプローチによる最初の例は、スクリプス研究所(米)のベンジャミン・クラバット III のグループによる脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) の基質探索であろう²³⁹。彼らは脳内脂質メディエーターを分解する FAAH 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製し、LC-MS による脳組織の脂肪酸メタボローム解析を実施した。その結果、既知の基質分子であるアナンダミド (アラキドニルエタノールアミン) の他に、脂肪酸のタウリン抱合体も FAAH の基質となることを見出した。その他に、LC-MS によるマウスジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP4) の基質探索によるプロリンペプチド代謝の発見²⁴⁰、CE-MS による好熱真性細菌 *Thermus thermophilus* のヌクレオチドホルモン ppGpp 分解酵素 (Ndx8) の発見²⁴¹、シロイヌナズナの二次代謝物質であるグルコシノール酸合成におけるメチオニン側鎖伸長酵素基質の探索²⁴² などの成果が見られる。

第2のアプローチとしては、慶應義塾大学の曾我のグループによる CE-MS を用いた酵素機能スクリーニングシステムの開発が知られている²⁴³。彼らは、代謝物質カクテルとして酵母抽出液を用い、さらに14種類の基本的な補因子 (NAD⁺、NADH、NADP⁺、NADP、チアミン三リン酸、ピリドキサル 5'-リン酸、SAM、CoA、FMN、FAD、アセチル CoA、ATP、GTP) を加えることで効率的な基質探索を可能にした。この手法により、大腸菌の機能未知酵素 YbhA および YbiV の基質を明らかにした。また、同様の手法にて大腸菌の新規酵素 4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼをも同定した²⁴⁴。

機能未知酵素の機能同定法としては、上記メタボロミクスによる手法以外にも、タンパク質チップ²⁴⁵、化学プローブ²⁴⁶などの手法が開発されている。しかし、これらの手法は特殊な試薬類を必要とし、また特定の酵素グループに特化したシステムであるので、潜在的なバイアスがかかっている。それに対し、メタボロミクスによる手法はバイアスが少なく、先入観のない探索が可能である点で優れている。

