

能の相互作用を勘案した赤血球代謝シミュレーションモデルを開発した。シミュレーションによる予測とCE-MSによるメタボロームの実測値から、酸素濃度と代謝状態をヘモグロビンが感知してヘモグロビンの状態遷移が起こり、赤血球膜の主要なイオン輸送タンパクであるBand3へ結合する。その結果、解糖系の酵素群が乖離し、結果として解糖系が活性化するという代謝調節機構を示した。これまでに多くの赤血球の数理モデルが発表されてきたが、ほとんどが代謝経路のネットワークそのものに興味を絞ったものでしかなかった。谷内江(木下)らは、メタボローム解析によって、網羅的な代謝物時系列変動を同一条件、短時間で計測することによりモデルを検証し、赤血球の酸素応答機構の解明に踏み込むシミュレーションモデルを構築した。

2 植物メタボロミクスにおける代謝物プロファイルデータの相関解析 (福島らの稿)

シロイヌナズナを用い、一次代謝に異常のある *mtol*、二次代謝に異常のある *tt4*、野生型 (Col-0) に対して、GC-TOFMSによるプロファイリングを行った。*mtol*ではメチオニンの過剰蓄積やアスパラギン酸生合成経路に属する代謝物の変化が観察されたが、*tt4*では、アミノ酸等の一次代謝物に顕著な変化はみられなかった。

代謝物間相関解析を行った結果、野生型と *tt4*は互いに似た相関パターンを示すが、*mtol*ではこれらのパターンが消失した。*mtol*の代謝システムは過剰蓄積したメチオニン生合成経路だけでなく、アスパラギン酸代謝経路およびポリアミン代謝経路に関しても相関に影響があると考えられる。

野生型と *tt4*とを比較すると、シナピン酸とリンゴ酸の存在量は変化しないにもかかわらず、両代謝物間の相関が非常に強まっていた。これはフラボノイドやアントシアニンを生合成できず、これらの物質を使った紫外線に対する防御機構を失っている *tt4*において、代替代謝物(シナピン酸エステル類等)による紫外線対策を示唆しており、どのようなバックアップ機構が存在するのか今後の展開が興味深い。

3 トランスポーターの機能決定と機能解析 (金井らの稿)

細胞内の恒常性を維持する役割を担うトランスポーターの遺伝子欠損によって生じる遺伝病も多く、その病態解明にはトランスポーターの役割を理解することが必要である。しかし、未だに多くの機能未同定のトランスポーターが存在しており、その生理機能の理解が望まれている。近年、トランスポーターのノックアウトマウスと野生型マウスの各組織の成分をメタボローム測定することにより、トランスポーターの基質を特定する試みが行われている。最近、腎組織におけるアミノ酸代謝におけるPepT2の新たな生理機能の発見等、従来の研究では解明できなかったトランスポーターの研究がメタボロミクスによって明らかになっている。本稿では、最新のメタボローム技術によるトランスポーターの機能解明研究を紹介していただいた。

4 マルチオミクス解析による大腸菌代謝ロバストネスの実証 (石井らの稿)

石井らは、大腸菌の一遺伝子欠損株および異なる環境条件で培養した野生株の数千分子をト

ランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームおよびフラクソーム（代謝物質の流れ）測定した。一遺伝子欠損株では、mRNA、タンパク質、代謝物質のいずれも大きな変動はみられなかった。野生株では、mRNAやタンパク質は細胞の増殖速度に追従して変動したが、代謝物質はあまり変動しなかった。ほとんどの一遺伝子欠損株でmRNAおよびタンパク質のレベルに大きな変化がないことは、大腸菌は一遺伝子欠損のような内部変動に対しては特に積極的な対応を行わないことを示す。それにもかかわらず代謝物質レベルが安定に保たれるのは、欠損遺伝子のアイソザイムの存在や迂回・逆行経路の形成によって、必要な代謝物質の供給が維持されているのであろう。一方、大腸菌は環境変化に応じて増殖速度を変える場合、遺伝子発現を積極的に制御し細胞内の代謝物質レベルを安定に保つと考えられる。大腸菌はさまざまな戦略を必要に応じて使い分けて、細胞内の代謝物質レベルを安定化していることが示唆された。

細胞内の数千物質を複数のオミクス手法を用いて測定した世界でもはじめての試みであり、遺伝子や環境の変化に対して、mRNA、タンパク質、代謝物の順で変動は小さくなることが確認された。大腸菌以外にも同様の傾向があるか、他の生物種の結果が待たれる。

5 脂質メタボロミクスによる病態解析（田口の稿）

LC-MSを用いた脂質メタボロームの包括的解析法（リピドミクス）を疾患モデルに適用した。肥満マウスでは、肥満にやや先行するかたちで、トリグリセリドで不飽和度が低い短鎖型中性脂質の割合が増加した。また、 ω -3系統（EPA、DHA）と ω -6系統（アラキドン酸等）の脂肪酸を含むリン脂質グループ間の質的および量的バランスに変動がみられ、特定の脂質分子種グループの代謝変動が肥満病態への移行に関与していることが示唆された。オゾアルブミン暴露により喘息を起こさせたマウスとそのマウスにEPAを投与したマウスについて比較した結果、EPA投与による喘息の軽減は、アラキドン酸との拮抗作用以外に、EPA由来の代謝物が何らかの働きにより喘息を軽減させている可能性が推測された。

6 酵母における代謝経路改変による育種（吉田の稿）

これは、トランスクリプトームとメタボロームを駆使して酵母の代謝の改変に成功した話題である。ビール醸造において、高い抗酸化作用をもち鮮度の維持に重要な役割を果たす亜硫酸を増加させ、オフフレーバーの原因である硫化水素を減少させることができれば、香味安定性に優れた製品を提供できる。しかし、これらの物質は代謝経路の隣に位置しているため、培養条件等の変化では連動して増減するという問題があった。吉田は酵母の遺伝子発現、代謝物を網羅的に解析し、酵母においてO-アセチルホモセリンが亜硫酸・硫化水素生産の律速因子であることを発見した。この知見にもとづき、アスパラギン酸からO-アセチルホモセリンへの代謝流量を増大させ、同時に硫酸イオンから亜硫酸への還元経路の代謝流量を増加させることにより、亜硫酸高生産・硫化水素低生産変異株の開発に成功した。

おわりに

これまで述べてきたようにメタボロミクスは生まれたばかりの新しい研究分野ではあるが、

基礎研究はおろか、今や産業にも大きな波及効果を与えつつある。一方で、すべての代謝物質を一度に測定できる方法論がまだ存在しておらず、未知代謝物質を同定することがきわめて難しいなど、まだまだ多くの課題が残っている。意欲的な人材がこの研究分野に参画し、新天地を切り開いてくれることを期待したい。

文献

- 1) Fiehn, O. et al.: Nature Biotechnol., 18 : 1157-1161, 2000
- 2) Yoshida, H. et al.: J. Agric. Food Chem., 55 : 551-550, 2007
- 3) Soga, T. et al.: J. Proteome Res., 2 : 488-494, 2003
- 4) Soga, T. et al.: J. Biol. Chem., 281 : 16768-16776, 2006
- 5) Aharoni, A. et al.: OMICS, 6 : 217-234, 2002
- 6) Reo, N. V.: Drug Chem. Toxicol., 25 : 375-382, 2002
- 7) Ishii, N. et al.: Science, 316 : 593-597, 2007
- 8) Kinoshita, A. et al.: J. Biol. Chem., 282 : 10731-10741, 2007
- 9) Hirai, M. Y. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 10205-10210, 2004
- 10) Saito, N. et al.: J. Proteome Res., 5 : 1979-1987, 2006

Profile

著者プロフィール

曾我朋義：慶應義塾大学環境情報学部および同先端生命科学研究所教授、1984年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業、工学博士、横河電機（株）、横河アナリティカルシステムズ（株）を経て、2001年慶應義塾大学環境情報学部および同先端生命科学研究所助教授、'06年より現職、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ取締役（兼任）、開発したCE-MSによるメタボローム測定法によっていろいろな分野の研究者に出会えることが最大の楽しみ。

実験医学 別冊
リアルタイムPCRをもっと使いこなそう!
発行 羊土社

原理からよくわかる

リアルタイム PCR 実験ガイド

基本からより効率的な解析まで
必要な機器・試薬と実験プロトコール

編集／北條浩彦



新刊



- リアルタイムPCRによる遺伝子の発現解析や定量の原理をわかりやすく解説した、**初心者にも安心の実験プロトコール!**
- リアルタイムPCRを利用した各種解析の最新プロトコールを、**実際の実験で使用されている機器やキットを挙げながら説明!**

■ 定価(本体4,200円+税)
 ■ B5判 ■ 194頁
 ■ ISBN978-4-7581-0172-1

最新医学・2007年・9月増刊号（別刷）

臨床遺伝子学'07

ーゲノム科学の臨床へのインパクトー

メタボロミクスの医学への応用

曾我朋義 大橋由明
富田 勝

最新医学社

● 新しい局面に進むゲノム科学

メタボロミクスの医学への応用

*1 慶應義塾大学先端生命科学研究所 教授

*2 ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

曾我 朋義*1*2 Tomoyoshi Soga 大橋 由明*2 Yoshiaki Ohashi

富田 勝*1*2 Masaru Tomita

|| 要旨 ||

メタボロミクスはゲノミクス, トランスクリプトミクス, プロテオミクスに続く第4のオミクスとして確立されつつある。しかし, 目的物質の化学的性質が多様なため一斉分析が難しい。筆者らが開発したキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) は, イオン性代謝物質に特化した極めて分解能の高い一斉分析法であり, メタボロミクスにおける技術的ブレイクスルーとなった。本稿では, CE-MS 法の手技と実際について解説する。

はじめに

人が疾患に罹患するとは, 遺伝的変化, 生活習慣, 感染, 老化などの要因により生体内の恒常性維持機構が破綻し, 正常な状態を維持できなくなることである。そこで, 生体内での具体的な状態変化を探索することが, 疾患の診断, 治療そして予防に有益な情報を与える。近年オミクスのアプローチが可能となり, 一塩基多型 (SNPs) 解析や DNA チップ, プロテオーム解析が精力的に行われ, それらを統合した大規模オミクス解析も行われるようになった¹⁾。オミクスの目的は,

キーワード: メタボロミクス, CE-MS, オフタルミン酸, シミュレーション, 赤血球

予測不可能な生体内環境の変化を、バイアスをかけない手法により包括的に探索することである。この視点から、メタボローム（全代謝物質）解析という手法の開発にも期待の眼差しが注がれているのは自然の流れであろう。狭義のメタボロミクスでは、栄養源の異化資化経路中間体を中心とした低分子代謝物質の総体を標的とする。これらの代謝物質は化学的性質が多岐にわたるため、メタボロミクスは他のオミクス解析にはない技術的な困難さを内在している。

CE-MSによるメタボローム解析

メタボロミクスを医療に応用する試みは、ここ1~2年で大幅に現実味を帯びてきた。特に血液や生検サンプルを用いた診断、治療標的の探索、予防医学への貢献が期待される。しかし、特定バイオマーカー発見への道のりは険しく、成功例はまだ少ないのが現状である。原因は幾つか考えられるが、やはり測定手法の精度をいかに高く保つかが勝負になっている。

メタボロミクスでは、目的代謝物質の性質により測定法を使い分ける必要がある。筆者らが開発したキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)は、イオン性代謝物質の一斉分析を行うのに適している。大腸菌の代謝物質を文献(2007年6月現在)をもとに筆者らが調べたところ、全代謝物質は792種であり、非イオン性が14%、イオン性が86%を占めていた。ヒトの場合、代謝物質の総数はこの数倍であると考えられる。CE-MSはこのように生体内の大多数を占めるイオン性代謝物質を分離する能力に秀でており、構造異性体の分離も可能なほど高い分離能を有している。通常、イオンの種類により陽イオン、陰イオン、ヌクレオチド類の3モードを設定して測定を行う²⁾。キャピラリーに注入されるサンプル量が微量であり、高い分離能も手伝ってイオンサプレッションが起りにくいことから定量性も極めて良好である。これが液体クロマトグラフィー(LC)にはない魅力となっている³⁾。検出に用いる質量分析計(MS)は、その目的により使い分ける。サンプル中の濃度がある程度高く、溶出時間など分析情報がそろっている代謝物質のルーチン解析では四重極型(QMS)を用いている。飛行時間型(TOFMS)は質量分解能が高く、またダイナ

ミックレンジも広く定量性能が良好であることから、広い質量-電荷比 (m/z) レンジを一度にスキャンする、いわゆる“一斉分析”に用いる。さらに高感度に特定物質を検出する際は、三連四重極型 (TripleQMS) や四重極/飛行時間型 (Q-TOFMS) を用いる。この MS では、未同定物質の構造情報を得ることも可能である。

メタボロームで用いるサンプル

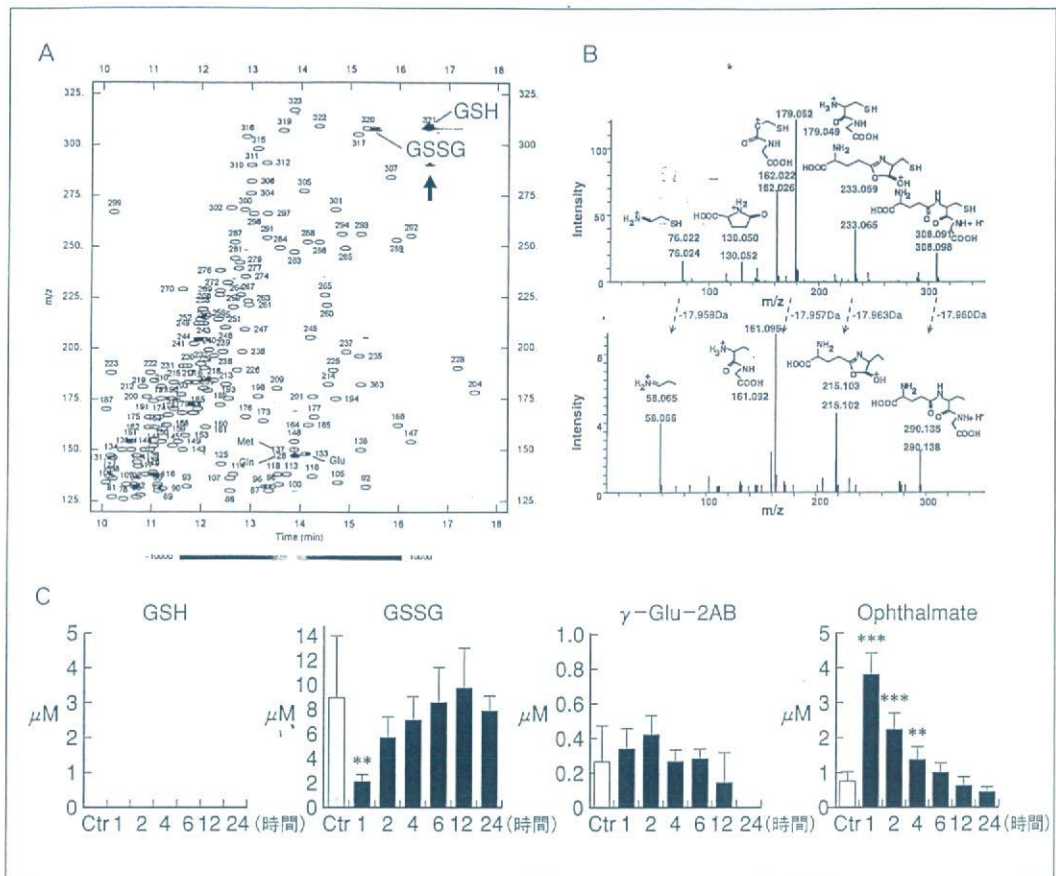
メタボロミクス解析に必要なサンプル量は、組織サンプルで 20 ~ 30 mg, 血漿ならば 100 μ l あれば十分である。ほかにも培養細胞や尿、脳髄液など適用範囲は広がっている。前処理法はメタノールおよびクロロホルムを用いて脂溶性物質を除去した後、限外濾過により除タンパク質している。サンプルの生物学的クオリティーには格別の注意が必要である。サンプル内の細胞の状態が不均一の場合、偽陽性や偽陰性データを生み出しやすい。自治医科大学の宮里らは、この現象を“細胞集団のシフト”と呼んで骨髓細胞の DNA マイクロアレイデータを例に注意を喚起している⁹⁾。同様の理由から、臓器サンプルも灌流を施したものをいれば血液成分の影響を排除できるが、灌流による臓器内環境の変化を考慮する必要がある。

CE-MS を用いたメタボロミクスによるバイオマーカー探索

代謝物質を精度よく定量的に分析することがメタボロミクスの鍵である。そこで筆者らは、最近流行の核磁気共鳴 (NMR) やフーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析 (FT-ICRMS) などのスループット重視で定量性の低い機器は用いず、分離能、質量分解能および定量性の高い CE-TOFMS を用いてメタボローム測定法を開発した。ここでは CE-TOFMS を用いたバイオマーカー探索例を解説する⁹⁾。

アセトアミノフェン (AAP) は有名な非ピリン系解熱鎮痛薬だが、肝毒性があるため肝障害患者への投与は禁忌である。また、健康者であっても大量服薬により急性肝障害を誘発する。筆者らは、マウスに AAP を過剰投与し、その急性肝障害によるメタボロームプロファイルの変化を探索する実験を計画した。150 mg/kg AAP を腹腔内投与されたマウスの血清および肝臓実質を 24 時間まで経時的にサン

図1 アセトアミノフェン過剰投与により肝臓組織中で変化する代謝物質(バイオマーカー)の探索



A: AAP 過剰投与によるマウス肝臓のメタボロームプロファイル変化。薬剤投与群でレベルが上昇したバイオマーカー候補ピークを赤矢印で示した。

B: GSH (上) およびオphthalmate (下) の CE-Q-TOFMS によるフラグメントパターン。

C: AAP 過剰投与による血清オphthalmateレベルの経時変化。γ-Glu-2AB はオphthalmateの生合成中間体。略語: 巻末の「今号の略語」参照

リングし、イオン性代謝物質の抽出を行い、CE-TOFMSにてメタボローム測定を行った。得られたメタボロームデータを新規に開発したメタボロームディファレンシャルディスプレイ法(MDD)⁶⁾にて解析したところ、肝臓実質にて酸化型(GSH)および還元型グルタチオン(GSSG)レベルが顕著に低下するという結果が得られた(図1A)。

注目すべきであったのは、陽イオン分析での測定 m/z 値が 290.138 を示す代謝物質のレベルが顕著に増大していたことである

(図1A). この物質は筆者らが所有している約2,000種の代謝物質とは一致しなかった. そこで CE-Q-TOFMS にて構造情報を取得したところ, フラグメント化のパターンが GSH のものによく似ており, 各フラグメントの m/z 値が GSH のものに比べて 17.96 小さいことが判明した (図1B). これらの情報から, AAP 過剰投与により肝臓実質においてレベルが顕著に増加する物質は, GSH の SH 基がメチル基に置換されたオフタルミン酸であることが判明した. その後, GSH 生合成酵素阻害薬や GSH の酸化誘導薬を投与したマウス肝臓でもオフタルミン酸の蓄積が起きることを証明し, オフタルミン酸は GSH と同じ生合成酵素群により合成されることが判明した. さらに, AAP 投与により GSH が消費され GSH 生合成経路が活性化されるが, 基質であるシステインが枯渇し, 代わりにオフタルミン酸の生合成基質である 2-アミノ酪酸が反応してオフタルミン酸の蓄積を誘導していることが判明した. この成果により, 生体内が酸化状態となったときのバイオマーカーとしてオフタルミン酸蓄積を提唱することとなった. オフタルミン酸レベルの変化は血清でも確認されたことから (図1C), 体内の酸化状態を診断するより汎用的なマーカーとなることが期待され, 今後ヒトの臨床検体を用いた実証試験を行う予定である.

システム生物学への貢献

代謝ネットワークの挙動は, ごく単純なバクテリアでさえ直感的に理解できる範囲を超越している. ある特定の入力に対して代謝ネットワークはどのようにふるまい, そして最終的にどこに収束していくのかを予測することは難しい. しかし, 近年のシステム生物学では, 少しずつではあるがそのような代謝ネットワークの挙動を予測する手法が開発されている. 次に示す研究は, システム生物学とメタボロミクスの融合の例である⁷⁾.

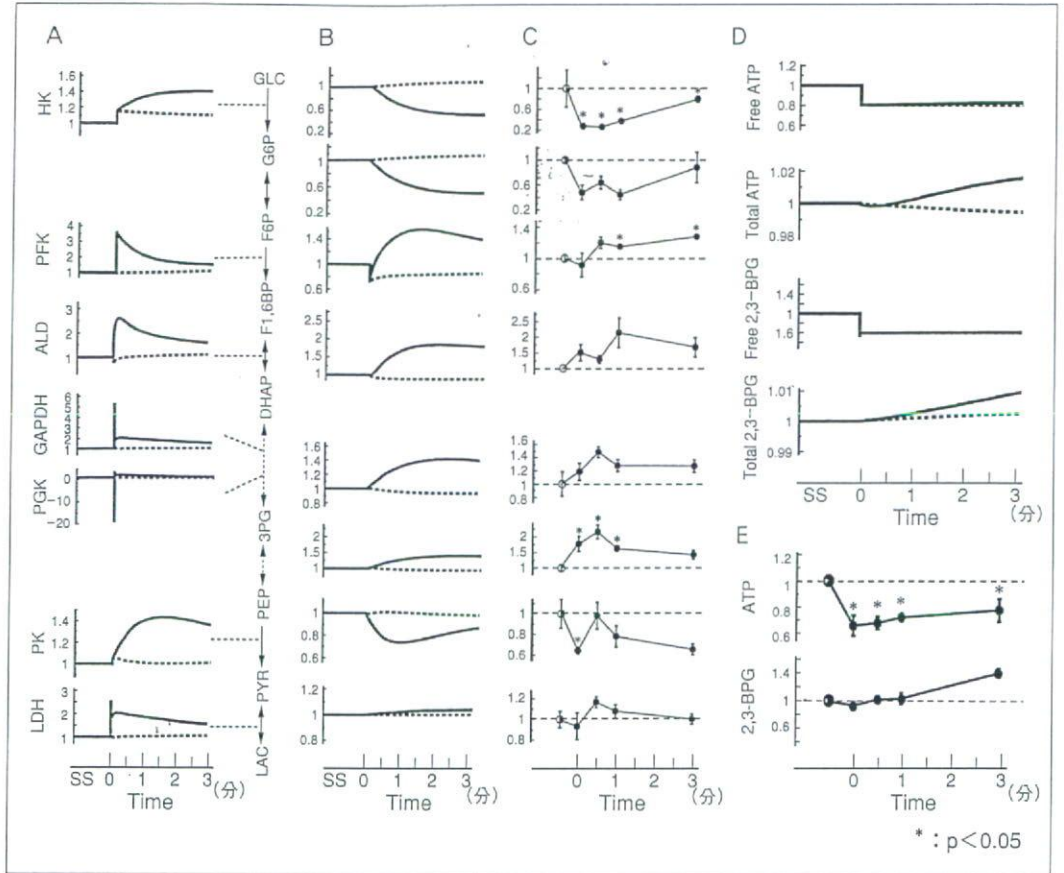
末梢組織に到達した赤血球は低酸素状態にさらされ, 運搬してきた酸素を放出して末梢組織での呼吸を促進する. 酸素分子と結合したヘモグロビン (Hb) は, プロトン濃度の低下, 一酸化窒素, ATP そして 2, 3-ビスホスホグリセリン酸 (2, 3-BPG) 濃度の上昇を感知し

て酸素を放出する。酸素分子が結合して弛緩状態 (R-状態) となっている Hb は、酸素分子を放出して緊張状態 (T-状態) になり、いつでも酸素分子を受け取れる状態になる。このとき解糖系を経て生成される 2, 3-BPG が R-状態の Hb に結合し、安定化させることで酸素親和性は低下し、酸素分子がミオグロビンに渡される。これまでに、赤血球において解糖系酵素 6-ホスホフルクトキナーゼ (PKF), アルドラーゼ (ALD), グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) および乳酸脱水素酵素 (LDH) が膜に存在するタンパク質 Band III (BIII) に結合し、不活化されていることが知られていた。また、これらの酵素は、T-状態の Hb が BIII に直接結合することで遊離し、活性化されると考えられた。この仮説を考慮して赤血球の持つ代謝ネットワークを E-CELL[®] にてモデル化したところ、低酸素状態にさらされた赤血球内部では解糖系が活性化されることが示された (図 2 A)。この現象を実際にヒト由来赤血球サンプルの CE-TOFMS 解析にて検証したところ、予測とよく一致した代謝物質プロファイルが得られた (図 2 B, C)。この結果は、低酸素状態における解糖系活性化が、BIII と T-状態の Hb との相互作用を介した上記酵素群の活性化によるものであることを裏づけている。また、ATP および 2, 3-BPG についても予測と実測値は良い一致を示した (本実験では遊離物質濃度を測定している。ただし Hb に結合した 2, 3-BPG はサンプル処理中に遊離してしまうため、全体の予測濃度変化と一致している) (図 2 D, E)。一方で、一酸化炭素 (CO) を暴露した赤血球で乳酸合成速度が増加することも確認し、末梢組織における低酸素、高 CO 環境下では解糖系が活性化され、ピルビン酸を経て乳酸が蓄積されるメカニズムが数理モデルおよびメタボロミクスにより明確に説明することができた。

おわりに

メタボロミクスが医学研究に取り入れられてまだ日は浅いが、着実に成果は生まれてきており、今後最も重要な分野の 1 つになるだろう。しかし、他のオミクスが直面したのと同じように、メタボロミクスにおいても医学との融合において問題は立ちはだかっている。言うまで

図2 低酸素状態での赤血球解糖系シミュレーションとCE-TOFMSによる実測データ



A：低酸素状態による解糖系の活性化シミュレーション。赤は BIII-Hb 相互作用を考慮した場合，青は考慮しない場合を示す。
 B：解糖系中間体の蓄積シミュレーション。C：CE-TOFMS 測定による解糖系中間体の濃度変化。
 D：2,3-BPG および ATP の蓄積シミュレーション。遊離しているもの，および全体の物質濃度変化を示した。
 E：CE-TOFMS による 2,3-BPG および ATP の濃度変化。
 略語：巻末の「今号の略語」参照

もないが，それはメタボロミクスに適した実験系をいかにうまく計画するかである。目的設定と結果の予想，技術に関する理解が重要である。オミクスですべてが分かるわけではない。実験系に関する深い洞察が今後のメタボロミクスの行方を左右するであろう。

文 献

1) Ishii N, et al: Multiple highthroughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science* 316 (5824): 593-597, 2007.

- 2) Soga T, et al: Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2 (5): 488-494, 2003.
- 3) Soga T, et al: Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis-mass spectrometry using silanol mask technique. *J Chromatogr A* doi 10: 1016/j.chroma.2007.05.054, 2007.
- 4) Miyazato A, et al: Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98 (2): 422-427, 2001.
- 5) Soga T, et al: Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 281 (24): 16768-16776, 2006.
- 6) Baran R, et al: MathDAMP: a package for differential analysis of metabolome profiles. *BMC Bioinformatics* 7: 530, 2006.
- 7) Kinoshita A, et al: Roles of hemoglobin allosteric in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocyte. *J Biol Chem* 282 (14): 10731-10741, 2007.
- 8) Tomita M, et al: E-CELL: software environment for whole-cell simulation. *Bioinformatics* 15 (1): 72-84, 1999.

特集 **メタボロミクス**
包括的代謝物質解析の医学・バイオサイエンスへの応用

CE-MSによるメタボローム解析とバイオマーカーの探索

曾我朋義

別刷

秀潤社
細胞工学
CELL TECHNOLOGY
Vol.25 No.12 2006

特集 メタボロミクス：包括的代謝物質解析の医学・バイオサイエンスへの応用

CE-MSによるメタボローム解析とバイオマーカーの探索

A New CE-MS Method for Metabolome Analysis and Biomarker Discovery

曾我朋義

Tomoyoshi Soga

なぜメタボロームの一斉分析ができないのだろうか？細胞内には物理的・化学的性質が似かよったものからまったく異なった代謝物質が数多く混在するため、それらを区別してかつ同時に測定することがきわめて難しいからである。最近開発されたキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)法はイオン性代謝物質の高感度一斉分析を可能にした。本手法により、薬物投与時にグルタチオンの低下に伴って誘発される急性肝炎の低分子バイオマーカーの発見およびそのバイオマーカーの生合成経路の解明に成功した。詳細について解説する。

key words

メタボローム、キャピラリー電気泳動、質量分析計、バイオマーカー、オフタルミン酸、アセトアミノフェン

曾我朋義 慶應義塾大学先端生命科学研究所 E-mail: soga@stc.keio.ac.jp URL: http://www.iab.keio.ac.jp/
1984年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業、工学博士、横河電機、横河アナリティカルシステムズ、慶應義塾大学先端生命科学研究所助教授を経て、2006年より現所属、教授、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ取締役(兼任)、メタボローム測定法の開発、細胞の代謝機序の解明、新規バイオマーカーの探索。

はじめに

ほとんどの生物が有している解糖系、TCA回路に代表されるエネルギー代謝やアミノ酸、核酸生合成経路の代謝産物の多くは、リン酸基、カルボキシル基、アミノ基を持つイオン性物質であり、紫外線吸収がない、不揮発性、物理的・化学的性質が類似しているなどの特徴を有する。さらに細胞内に数百種類(微生物)から数万種類(植物)の代謝中間体が存在することが、メタボローム分析をきわめて難しくしていた。

最近のメタボローム研究への関心の高まりに伴い、いくつかのメタボローム測定法^{1)~4)}が開発された。その中でも、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)によるメタボローム分析法は、ほとんどのイオン性代謝物質を直接かつ定量的に測定できる方法として注目されている。筆者らのグループでは、CEに四重極質量分析計(QMS)を接続したCE-QMS法により枯草菌中に存在する1,692成分の代謝物質を世界に先駆けて検出した⁵⁾。また、CE-QMS法を植物に応用し、イネの葉に含まれる88種類の代謝物質の1日の挙動変化を一斉に測定した⁶⁾。

昨年、さらにスループット、高分解能、高感度を飛躍的に高めたキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)によるメタボローム測定法を開発した⁷⁾。この方法は従来のCE-QMS法に比べ、30倍以上のスループットの向上、ミリマスユニット(整数質量の1/1000単位)の質量精度での測定、かつ数倍から数十倍の高感度化を達成した⁷⁾。

CE-TOFMS法を用いて、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンを過剰投与し急性肝炎を発症したマウスの肝臓のメ

タボローム解析を行った。その結果、肝臓内の還元型グルタチオン(GSH)減少時にある物質が増加することを見いだした。Q-TOFMSハイブリッドタンデム質量分析計をCEに接続したCE-Q-TOFMS法によるMS/MSスペクトルから、この物質がオフタルミン酸であることを特定し、その生合成経路、機序も解明した。オフタルミン酸は肝臓内のGSH減少時に肝臓内同様に血中でも有意に増加したため、この物質は薬物投与時にグルタチオンの低下によって誘発される急性肝炎の有力なバイオマーカーになることを見いだした⁷⁾。

本稿では、CE-MS法の原理、およびCE-TOFMS法を用いた低分子バイオマーカーの探索法について詳しく解説したい。

I. CE-MSによるメタボローム測定の原理

1. CE-MSによるメタボローム測定法

筆者らは、細胞内の代謝物質のほとんどが陽イオン性か陰イオン性の低分子であることに着目し、イオン性化合物の分析に高い威力を発揮するキャピラリー電気泳動-四重極質量分析計(CE-QMS)を用いたメタボローム測定法を開発した⁵⁾。CE-MS法の最大の利点は、2種類の測定条件^{8), 9)}でほとんどのイオン性代謝物質を直接定量分析できることである。

CE-MSに注入された各代謝物質は、電気泳動によりキャピラリー内で分離後、質量分析計(MS)で検出される。試料中の陽イオン性物質は陰極方向に、また陰イオンは陽極方向に移動する。各物質の移動速度はその物質の電荷/水合イオン半径の比に基づくため、この比率が異なる物質はキャピラリー内で分離され、キャピラリーの出口に接続し

た質量分析計で、各成分を選択的に検出する。なおキャピラリー電気泳動法^{10), 11)}および質量分析法^{12), 13)}の詳細については成書が出版されているので、こちらを参考にされたい。

2. 陽イオン性代謝物質の測定法

陽イオン性代謝物質の測定では、キャピラリーの出口が陰極となるよう電圧を印加する。泳動緩衝液には、1Mのギ酸(pH2以下)を使用した。1Mのギ酸を用いた理由は、pHが低いためアミノ基を持つ多くの代謝物質が陽イオン性を帯び、陰極に泳動する。したがって、多成分の陽イオン性化合物の一斉分析が可能になる。質量分析計での検出は、各化合物の質量数にプロトンが付加したプロトン化分子[M + H]⁺で行う⁸⁾。この1つの条件で、現在までに364種類の陽イオン性代謝物標準液が測定されている。

3. 陰イオン性代謝物質の測定法

解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路などの主要代謝経路のほとんどの代謝物質は陰イオン性化合物である。しかし、通常のフューズドシリカキャピラリーを使用したCE-MS陰イオン測定システムでは、試料注入後、数分で電流が流れなくなる問題が発生した。理由は、高電圧を印加した際に、電気浸透流¹⁴⁾と呼ばれる液流が陽極(MS側)から陰極(キャピラリーの入口側)に発生するため、キャピラリーの出口側に空気が入り、電流が落ちるからであった。この問題を解決するため、塩基性物質をキャピラリー表面にコーティングしたSMILE(+)キャピラリー¹⁵⁾を用いて、電気浸透流を陰極から陽極に反転する方法を考案した⁹⁾。この方法により、連続的かつ安定した陰イオン化合物の測定が可能になり、これまでに277種類の陰イオン性代謝物標準液が一斉分析できることが確認されている。

II. CE-TOFMSによるメタボローム測定法

1. CE-QMS法の問題点

CE-MS法では、ほとんどすべてのイオン性化合物を質量分析計に導入することができる。そこで質量数1,000 m/z 以下のすべての質量数でモニターすれば、質量数1,000以下のイオン性メタボロームの一斉分析が可能である。しかし、CE-QMS法ではスキャンスピードが遅い(数百 m 秒)ため、1,000 m/z 以下の質量数範囲でモニターすると感度が著しく低下した。そこで高感度に代謝物質を検出するため、1回にモニターする質量数範囲を30 m/z に限定した⁵⁾。しかしこの方法では、質量数1,000以下のイオン性代謝物質をすべて測定するには、1つの試料を30回以上繰り返して測定する必要があった。

2. CE-TOFMS法の開発

筆者らは1回の測定で1,000 m/z 以下の質量数範囲のメタボロームを測定するため、従来のQMSより数千倍スキャンスピードが速く、高質量数範囲をカバーできるTOFMSをCEに接続した⁷⁾。通常、TOFMSはペプチドやタンパク質などの高分子を測定するために条件が設定されている。そこで低分子化合物が高感度に測定できるようにTOFMSの各パラメータの最適化を行った。TOFMSは、各物質の精密質量(ミリマス)を測定でき、目的化合物の組成式を絞りこむことができるという利点がある一方、真空度や外気温の影響を受け、得られる精密質量が変動するという欠点を合わせ持つ。そこで、CE-TOFMSのイオン化を安定化するために連続的にスプレーヤー(成分を気化状のイオンにしてMSに噴霧するためのノズル)に加えているシース液(スプレーヤーでの噴霧を安定化させるための補助液)に質量較正用の物質を加え、スキャンごとにマス軸を自動較正することで、測定された各物質の精密質量の誤差を10ppm以内にすることに成功した⁷⁾。

本CE-TOFMS法を用いて代謝物質の標準試料を測定した結果、陽イオン、陰イオン性代謝物質とも良好な移動時間、ピーク面積の再現性を得ることができた。また10~200 μ Mの範囲で良好な検量線の直線性を示した。感度の向上は顕著であり、CE-QMS法に比べCE-TOFMS法ではほとんどの物質で数倍から数十倍の高感度検出(100nMレベル)が可能になった⁷⁾。

CE-TOFMS法により、1回の測定で1,000 m/z 以下の質量数の代謝物質の高感度分析が可能になった。またミリマスレベルの高分解能を有するため、今後きわめて強力なイオン性メタボロームの測定法となるであろう。

III. メタボローム測定による低分子バイオマーカーの探索

1. CE-TOFMSによる低分子バイオマーカーの探索

バイオマーカー(生体内の生物学的変化を定量的に把握するための指標)は、臨床診断や新薬の発見、開発に欠かせないため、世界中の医薬分野の企業、研究機関がその発見に凌ぎを削っている。近年、急速に発達したDNAマイクロアレイやプロテインアレイ、二次元電気泳動、高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)などの大規模測定法は、新規バイオマーカーを一気につまびらかにするのではないかと期待された。しかし現在まで思うような成果は得られていない。一方、低分子バイオマーカーの探索は見過ごされてきた。しかし、CE-TOFMSによるメタボローム測定法は、

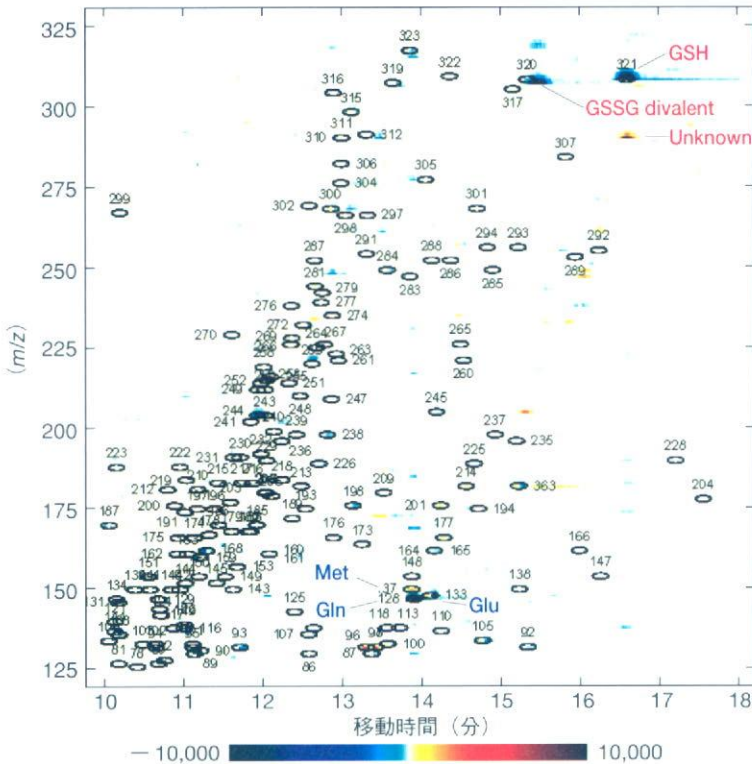


図1. コントロールとAAP投与2時間のマウス肝臓のメタボロームディファレンシャルディスプレイ

横軸は移動時間、縦軸は質量数を示す。アセトアミノフェン (AAP) 投与後2時間 (急性肝炎) で増加した物質は赤のスポット, 減少した物質は青のスポットで表示した。数字は代謝標準物質名とリンクし, その代謝物質が検出される位置を示す。Soga T, et al: J Biol Chem (2006) 281: 16768-16776 より改変。

低分子化合物を網羅的に検出できるため, 細胞や組織に存在する低分子バイオマーカーを探索する強力な手段となる。

最近, 慶應義塾大学医学部医化学教室の末松 誠教授のグループと共同で本法を用いて, 薬物投与時にグルタチオンの低下に伴って誘発された急性肝炎の低分子バイオマーカーの発見およびそのバイオマーカーの生合成経路の解明に成功したので, 詳細を報告する。

2. アセトアミノフェン投与マウスのメタボローム解析

米国では解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン (AAP) の過剰摂取により, 年間100名以上が急性肝炎で死亡している。そこでAAPをマウスに過剰投与して急性肝炎を誘発させ, マウスの肝臓の代謝物質をCE-TOFMSでメタボローム測定した⁷⁾。その結果, マウスの肝臓から全部で1,859成分のピークを検出した。図1にコントロールとAAPを投与後2時間 (急性肝炎を誘発) のマウスの肝臓中の陽イオン性代謝物 (各n=5) のメタボロームディファレンシャルディスプレイ (差分表示) 結果を示した。赤のスポットはAAPを投与後2時間で増加した物質, 青のスポットは減少した化合物を示す。1,859成分のほとんどの物質はコントロールとAAP投与後2時間で濃度差がなかったためディファレンシャルディスプレイにより消失した。図中の番号は代謝物質の標品が検出される位置であり, 各番号は代謝物質名に対応している。つまりのスポットと番号の位置が一致して

いれば, そのスポットの成分名を瞬時に特定することができる。図1から明らかなように, AAP投与によって大幅に減少した物質はグルタチオンの還元型 (GSH) とその酸化型 (GSSG) であった。またいくつかのアミノ酸の変動も見られた。一方, GSHと同じ移動時間にAAP投与によって増加した物質 (成分名は未知) が検出された。

コントロールとAAP投与後2時間マウスで変化のあった代謝物質をAAPの代謝経路にマップした (図2)。AAP代謝マップに示したようにAAPの99%はグルクロン酸か硫酸を抱合し, 尿中に排泄される。しかし, 1%はシトクロムP450によって代謝され毒性の高い酸化物質NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine) が生合成される。通常, このNAPQIは肝細胞内に大量に存在するGSHによって代謝され, 最終的にメルカプツール酸になって尿中に排泄される。しかし, AAPが過剰に存在するとGSHがすべてを解毒できなくなり, NAPQIが蓄積して様々なタンパク質を酸化するため, 肝細胞の壊死を引き起こす。図2に示したようにコントロールに比べ, AAP投与後2時間 (急性肝炎を誘発) のマウスでは, グルタチオン合成経路の代謝物質が軒並み減少していることが観察された。

3. オフタルミン酸生合成経路の発見

次に, AAP投与後2時間で最も増加した未知物質の同定を行った (図1)。この物質の移動時間はGSHと一致しているた

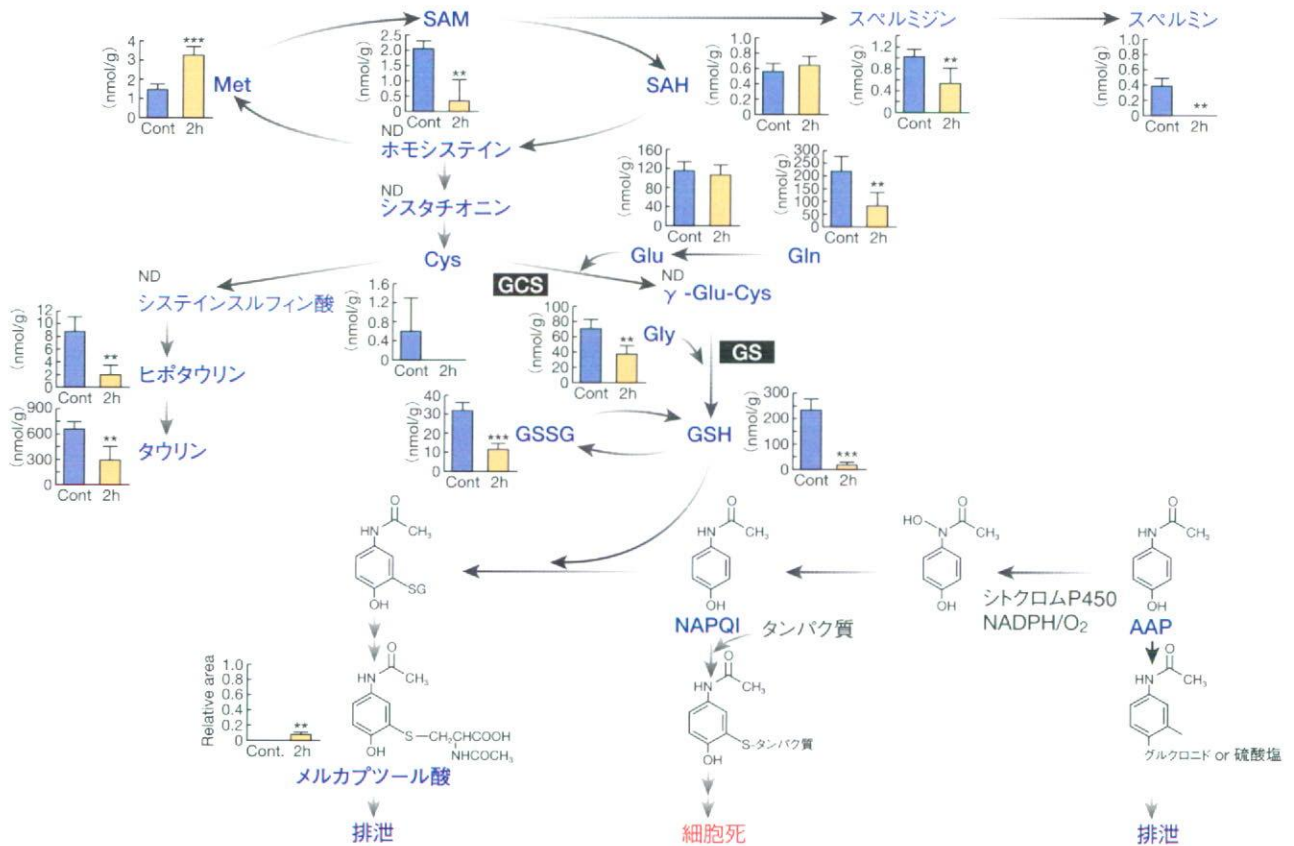


図2. AAP投与後の肝臓中のAAP関連代謝物質の変動

AAPは大部分がグルクロン酸が硫酸抱合を受け尿中に排泄される。1%がシトクロムP450によって毒性のきわめて高いNAPQIに代謝される。通常はGSHがNAPQIと反応し、メルカプツール酸に代謝して尿中に排泄する。しかし、AAPが過剰に存在すると、NAPQIが蓄積し肝細胞の壊死を引き起こす。AAP投与後2時間ではグルタチオン合成経路の代謝物質が軒並み減少した。Soga T, et al: J Biol Chem (2006) 281: 16768-16776 より改変。

め、GSHに構造が類似していることが予想された。そこでCE-Q-TOFMSを用いて、GSHと未知物質のMS/MSスペクトルを採取し比較した。図3に示すように未知物質のメインの4つのスペクトルすべてに対して、質量数が17.96Da多いスペクトルがGSHに存在することがわかった。このことは、GSHから質量数17.96Daの官能基が外れた化合物が未知物質に近いものであることを意味する。そこで17.96Daの官能基を探索した。しかし、17.96Daの官能基は実存しなかった。MS/MSスペクトルを注意深く検討した結果、17.96Daの差はSH基(32.980Da)が外れてCH₃基(15.023Da)が結合すること(32.980Da-15.023Da=17.957Da)であり、未知物質はGSHのSH基(図3)がCH₃基に置換されたオフタルミン酸(図3B)と推定した。オフタルミン酸の標品を入手し、マウスの肝臓サンプルに添加して、再びCE-TOFMSとCE-Q-TOFMSで測定したところ、未知物質とオフタルミン酸の移動時間とMS/MSスペクトルが完全に一致したため、予想通りこの物質はオフタルミン酸であると同定された⁷⁾。

続いて、AAP投与によりオフタルミン酸が増加する機序

を検討した。GSH(γ-Glu-Cys-Gly)はγ-グルタミルシステインシンターゼ(GCS)とグルタチオン合成酵素(GS)の2つの酵素によって、Cysから生合成されたトリペプチドである。筆者らは、図4に示すようにオフタルミン酸(γ-Glu-2AB-Gly)はCysのSH基がCH₃基に置換された2-アミノ酪酸(2AB)からGSHと同じようにGCSとGSの酵素によって生合成されるとの仮説を立てた。この仮説を裏付けるため、GCSを抑制するブチオニンスルフォキシミン¹⁶⁾やGSHと結合する酸化物質ジエチルマレイン酸¹⁷⁾をマウスの投与し、GSHおよびオフタルミン酸合成経路の代謝物質の濃度変化の解析から、オフタルミン酸合成経路の存在が正しいことを証明した⁷⁾。

4. 酸化ストレスを示す血中バイオマーカーの発見

さらに、もう一度AAPをマウスに投与し、肝臓内や血中のGSHやオフタルミン酸代謝経路の代謝物質がどのように変化するか経時的に測定した(図5)。図5Aに示すように肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAAP投与1, 2時間後

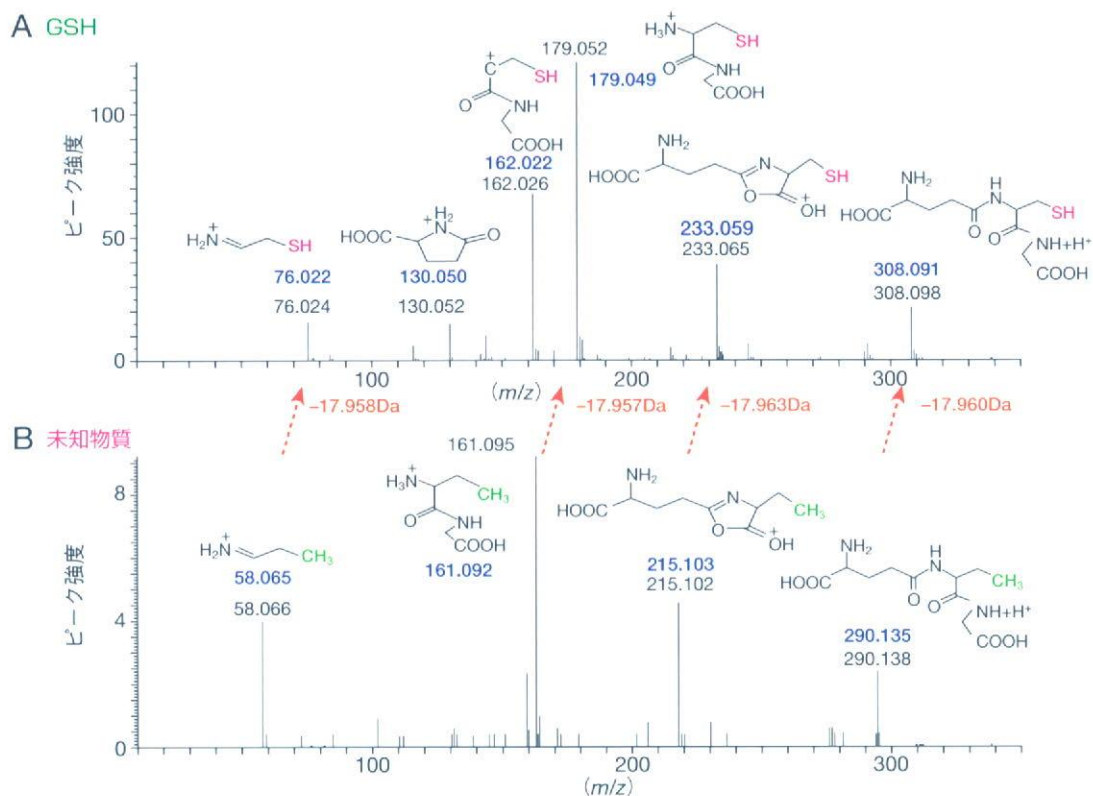
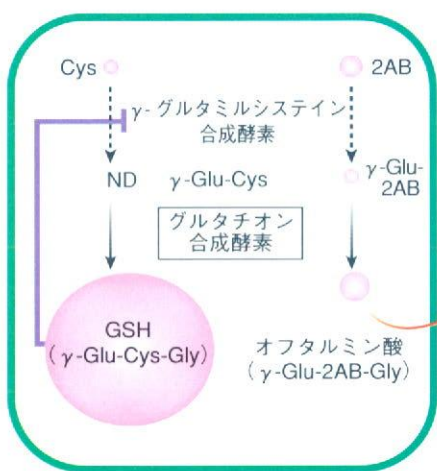


図3. GSH と未知物質のMS/MS スペクトル

AはGSH, Bは未知物質. 各ピークのMS/MS スペクトルをアジレント社のCEとアプライドバイオシステムのQstarを接続したCE-Q-TOFMSで採取した. 未知物質の4つスペクトルすべてに対して, 質量数が17.96Da多いスペクトルがGSHに存在することが観察された. 17.96DaはSH基(32.980Da)とCH₃基(15.023Da)の差(32.980Da - 15.023Da = 17.957Da)であり, 未知物質はGSHのSH基がCH₃基に置換されたオファルミン酸と推定された. Soga T, et al: J Biol Chem (2006) 281: 16768-16776 より改変.

A 還元状態



B 酸化状態

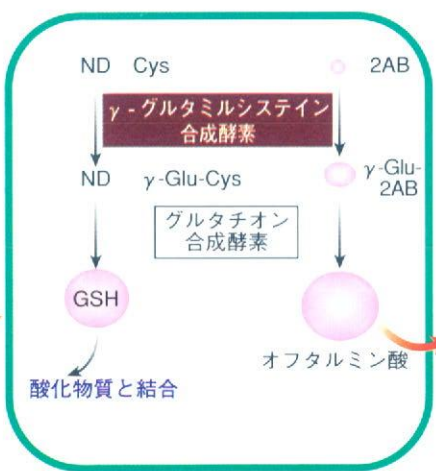


図4. 肝細胞のオファルミン酸 生合成経路

Aは還元状態, Bは酸化状態. 通常の還元状態では, 肝細胞のGSHがGCS(γ-グルタミルシステイン合成酵素)をフィードバック制御しているためGSHやオファルミン酸の生合成は抑制される. 酸化状態ではGSHの消費に伴いGCSがフィードバック制御が解除され, GCSが活性化される. したがって肝細胞にオファルミン酸が生合成される. オファルミン酸は肝細胞内に蓄積され, ABCトランスポーターなどで胆汁中に輸送される. Soga T, et al: J Biol Chem (2006) 281: 16768-16776 より改変.

に大幅に減少した. 予想通り, GSHの減少に反比例してAAP投与1, 2時間後に肝臓内のγ-Glu-2ABとオファルミン酸は急増した. 図5Bに示したように血清中のGSHは検出されなかった. これは前処理中にアルブミンなどによって

酸化されたと推測される. 血清中のγ-Glu-2ABは, AAP投与1, 2時間後に有意な増加は観察されなかった. 一方, 血清中のオファルミン酸は肝臓中同様にAAP投与1, 2時間後に急増した. このことは, 血中のオファルミン酸はAAPな

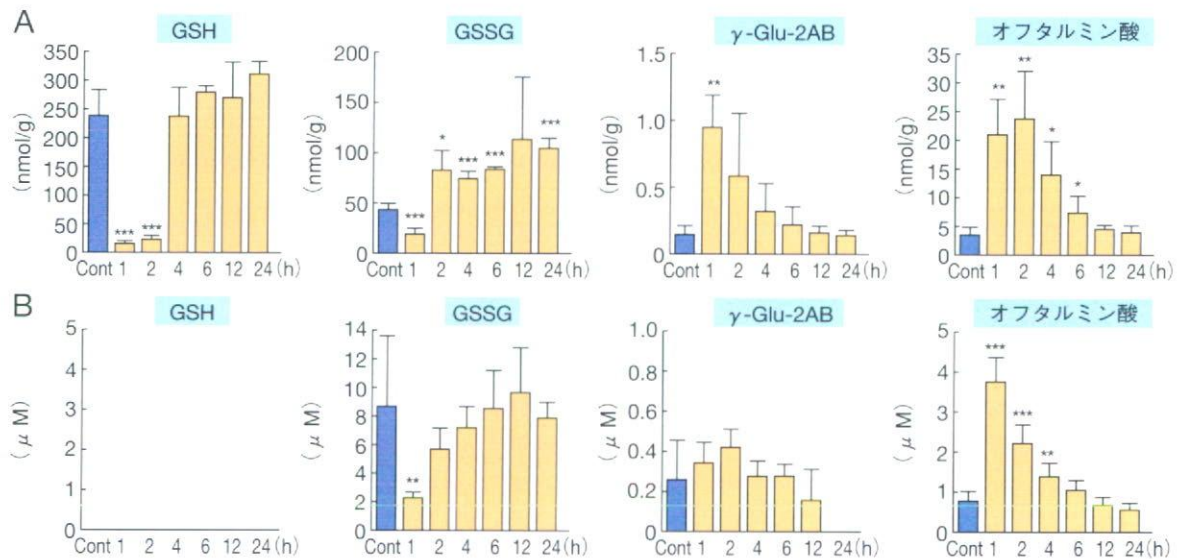


図5. AAP投与後に肝臓および血清中で変化のあった代謝物質

Aは肝臓, Bは血清. AAPをマウスに投与し, 肝臓や血清中のGSHやオフタルミン酸代謝経路の代謝物質の経時変化を測定した. 肝臓内のGSHは急性肝炎が誘発されるAAP投与1, 2時間後に大幅に減少した. このとき肝臓内のγ-Glu-2ABとオフタルミン酸は急増した. 血清中のγ-Glu-2ABは, AAP投与1, 2時間後に有意な増加は観察されなかったが, オフタルミン酸は肝臓と同様にAAP投与1, 2時間後に急増した. したがって, 血中オフタルミン酸は, 薬物投与によって誘発されるGSHの低下を示す低分子バイオマーカーになる. Soga T, et al: J Biol Chem (2006) 281: 16768-16776 より改変.

どの薬物投与によりGSHが低下することで誘発される急性肝炎の有力なバイオマーカー候補であることを示す⁷⁾.

実験結果を総括すると, 通常の状態(図4A)では, 肝細胞内にGSHが大量に存在し, これがGCSをフィードバック制御しているためGSHやオフタルミン酸の生合成は阻害される^{18), 19)}. しかし, NAPQIなどの酸化ストレスによりGSHが消費されると(図4B), GCSに対するフィードバック制御が解除され, GCSが活性化されるため肝細胞内のオフタルミン酸が生合成される. しかしオフタルミン酸はSH基を有していないため, 酸化物質とは反応せず肝細胞内に蓄積し, ABCトランスポーターなどで胆汁中に輸送され最終的に血液中に排泄される⁷⁾(図4). 筆者らが知るかぎり, オフタルミン酸の生理学的な役割はこれまで述べられていないが, オフタルミン酸はABCトランスポーターによるGSHの細胞

外への輸送を競争的に阻害するという報告がある²⁰⁾. 肝細胞はオフタルミン酸を生合成して細胞外に排出することでGSHを細胞内に留め, 酸化ストレスに対処しているのであろう.

おわりに

筆者らが開発したCE-TOFMS法により, 細胞内の陽および陰イオン性代謝物質を短時間で, 高感度, 高分離かつ一斉分析できるようになった. CE-TOFMS法は誘導体化を行うことなく, かつ2種類の測定条件でほとんどのイオン性代謝物質を測定できる点で画期的である. 本稿で報告したように, 本法はメタボロミクスの研究ばかりでなく, 低分子バイオマーカーの探索にも大変有用である. 今後, CE-TOFMSによるメタボローム測定法が, 最先端の研究分野で利用され, 生命科学のさらなる発展に貢献することを期待したい.

文献

- 1) Fiehn O, et al: Nat Biotechnol (2000) 18: 1157-1161
- 2) Reo NV: Drug Chem Toxicol (2002) 25: 375-382
- 3) Aharoni A, et al: OMICS (2002) 6: 217-234
- 4) Castrillo JI, et al: Phytochemistry (2003) 62: 929-937
- 5) Soga T, et al: J Proteome Res (2003) 2: 488-494
- 6) Sato S, et al: Plant J (2004) 40: 151-163
- 7) Soga T, et al: J Biol Chem (2006) 281: 16768-16776
- 8) Soga T, et al: Anal Chem (2000) 72: 1236-1241
- 9) Soga T, et al: Anal Chem (2002) 74: 2233-2239
- 10) Li SFY: Capillary Electrophoresis-Principles, Practice and Applications (J Chromatogr Library-Vol.52, Elsevier, Amsterdam): 1993
- 11) 本田 進ら: キャピラリー電気泳動-基礎と実際 (講談社): 1995
- 12) McLafferty FW, et al: Interpretation of Mass Spectra 4th ed (University Science Books, California): 1992
- 13) 原田健一ら: LC/MSの実際 (講談社サイエンティフィック): 1996
- 14) Lukacs KD, et al: J High Res Chromatogr (1987) 10: 622-624

- 15) Katayama H, et al: Anal Chem (1998) 70: 5272-5277
 16) Griffith OW, et al: J Biol Chem (1979) 254: 7558-7560
 17) Zalups RK, et al: Drug Metab Dispos (1997) 25: 516-523

- 18) Richman PG, et al: J Biol Chem (1975) 250: 1422-1426
 19) Cuozzo JW, et al: Nat Cell Biol (1999) 1: 130-135
 20) Ballatori N, et al: J Biol Chem (1994) 269: 19731-19737

— for beginners —

- ・「メタボローム研究の最前線」富田 勝ら 編: シュプリンガー・フェアラーク東京 (2003)
- ・“Metabolomics” Tomita T, et al eds: Springer (2005)

ゲノミクスの次はプロテオミクスだ！

最新

細胞工学別冊
実験プロトコールシリーズ

プロテオミクス 実験プロトコール



著 / 谷口 寿章 (徳島大学分子酵素学研究センター / 理化学研究所播磨研究所)

■ インターナショナル判 ■ オールカラー 200頁 ■ 定価 4,935円 (5%税込)



秀潤社

〒101-0054 東京都千代田区神田錦町3-5-1 興和一橋ビル別館3階
 TEL: 03-5281-0552 (営業部) FAX: 03-5281-0550
 E-mail: info@shujunsha.co.jp URL: http://www.shujunsha.co.jp/