

- over via autophagy : implications for metabolism. *Ann. Rev. Nutr.*, 27 : 19-40, 2007.
- 12) Medina, M. A. et al. : Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol. Cell. Biochem.*, 113 : 1-15, 1992.
- 13) Moreadith, R. W. and Lehninger, A. L. : The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD (P) + -dependent malic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 259 : 6215-6221, 1984.
- 14) Chapman, A. G. et al. : Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.*, 108 : 1072-1086, 1971.

\* \* \*

# How to 発明 PART 2

## 全国発明表彰受賞者に聞く



平成21年度 発明協会会長賞

細胞内に存在する数千種類の低分子代謝物の一斉分析が初めて可能に  
「メタボローム測定装置」の発明（特許第3341765号）

慶應義塾大学

環境情報学部 先端生命科学研究所 教授

曾我 朋義

### 1. 今回の発明に至った経緯

生命科学では、これまでは謎であった生体や細胞の働きをつまびらかにすることによって、生命を理解し、その成果として人類が直面している健康、食糧、環境、エネルギーなどの問題の解決を目指しています。

生体を構成している細胞は、外界からグルコースなどの栄養源を取り入れ、それを代謝によって他の物質に変換し、活動に必要なエネルギー（ATP）や、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質などの低分子化合物（代謝物）を生産しています。細胞には、代謝物が数百から数千種類存在しており、代謝物の総体をメタボロームと呼びます。

細胞の働きはゲノム情報に基づいており、メタボロームはゲノム情報の最終産物です。したがって、細胞の働きを担うゲノム、遺伝子、タンパク質等が変動すれば、最終産物である代謝物にも必然的に変化が生じるため、メタボローム解析によって細胞の状態や振る舞いを把握することができるのです。

近年、急速に発達したメタボ

ローム研究は、代謝調節機構、遺伝子、タンパク質の機能解明といった生命科学の基礎研究に新しい解決策を提供しています。また最近では、疾患の機序解明、バイオマーカーの探索といった医薬分野、機能性成分の探索、ストレスに強い農作物の開発といった食品、農業分野、工業用微生物、バイオ燃料の開発といった工業、環境、エネルギー分野の応用研究にメタボローム研究が幅広く用いられるようになってきました。

しかし、私がメタボローム解析に着手した2001年には、メタボローム測定の有用な方法論は存在していませんでした。

細胞には、物理的・化学的性質が非常に似通ったものから全く異なる代謝物が数百から数千種類存在しているため、これらを区別して測定することが極めて困難だったからです。

慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）のメタボロームプロジェクトに着任した私は、真っ先にメタボローム測定法の開発に取り組みました。

### 2. 技術の概要

測定法を開発するに先立って、細胞内の代謝物の構造を調べると、ほとんどがイオン性の物質でした。最大数万種類の代謝物を一度に測定するには、イオン性物質に対して高分離能を持つキャピラリー電気泳動（CE）と高感度、高選択検出器である質量分析計（MS）を組み合わせたCE-MS法（図1）しかないと直感しました。

実際には、細胞から抽出した代謝物質を、内径が50 $\mu$ m、長さが1mの中空のキャピラリー（毛細管）の一端に注入し、3万Vの電圧をキャピラリーの両端に加えました。図2に示すように、陽イオン性代謝物質は陰極方向に泳動するため、陰極にMSを接続すれば、陽イオン性物質をすべてMSに導入することができます。MSを使い、その代謝物が固有に持つ質量でモニターすることにより、陽イオン性物質を一斉に測定することが可能になりました。反対に、陰イオン性代謝物は陽極方向に泳動するため、陽極にMSを接続することによって陰イオン性代謝物の

一斉分析が可能になりました。

### 3. 技術的課題をどのように克服したか

しかし、CE-MSによるメタボローム測定法の開発は簡単ではありませんでした。当時、CE-MS法では、陰イオンの測定はできないというのが世界の常識でした。

CE-MSで陰イオンを測定すると、数分で電流値が流れなくなりました。最初は、なぜ電流が落ちるのか原因が分かりませんでした。試行錯誤した結果、図3に示すように、陽極側にMSを接続した場合に限り、電流が落ちることに気づきました。

CEで通常使用するフューズドシリカキャピラリーでは、電圧を印加すると、電気浸透流と呼ばれる液流が陽極から陰極方向に発生します(図3-①)。この影響で、数分たつと、キャピラリーの出口

(MS側)に空気が入って絶縁されていることが判明しました(図3-②)。

電流が落ちる原因が電気浸透流が陰極方向に発生することだと分かったので、電気浸透流を陽極方向に反転させようと考えました。フューズドシリカキャピラリーの表面にあるシラノールは通常の条件では、 $H^+$ が解離して負に帯電します(図3-①)。電圧を印加すると、解離した $H^+$ が陰極に一斉に移動することにより電気浸透流が陰極方向に発生します(図では $H^+$ は省略)。

電気浸透流を陽極方向に反転させるためには、キャピラリーから $OH^-$ などの陰イオンを解離させる必要があります。そこで、キャピラリーに陽イオン性ポリマーをコーティングしたキャピラリーを試しました。

陽イオン性ポリマーがコーティ

ングキャピラリーでは、 $OH^-$ が解離し(キャピラリー表面は正に帯電)、電圧を印加すると、 $OH^-$ は一斉に陽極に移動するため電気浸透流が陽極方向に発生するはずです(図3-③、 $OH^-$ は省略)。

予想どおり、このキャピラリーを使用することによって、電流が落ちることなく安定した陰イオン性物質の測定が可能になりました。本法が今回、受賞の対象となった発明です。

CE-MSによる陽イオンおよび陰イオンの分析法が完成し、イオン性物質の網羅的な測定が可能になりました。この方法を用いることによって、細胞内に存在する数千種類のイオン性代謝物の一斉分析が可能になり、メタボローム研究は飛躍的に発展しました。私たちは、現在40台のCE-MS装置を保有し(図4)、多くの研究成果が生まれています。

図1 CE-MS装置

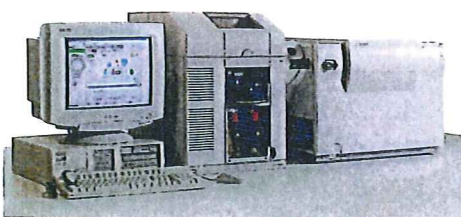


図2 CE-MSの分離の原理

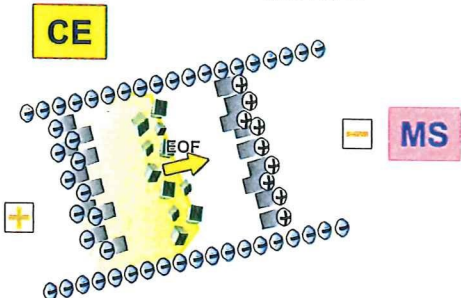
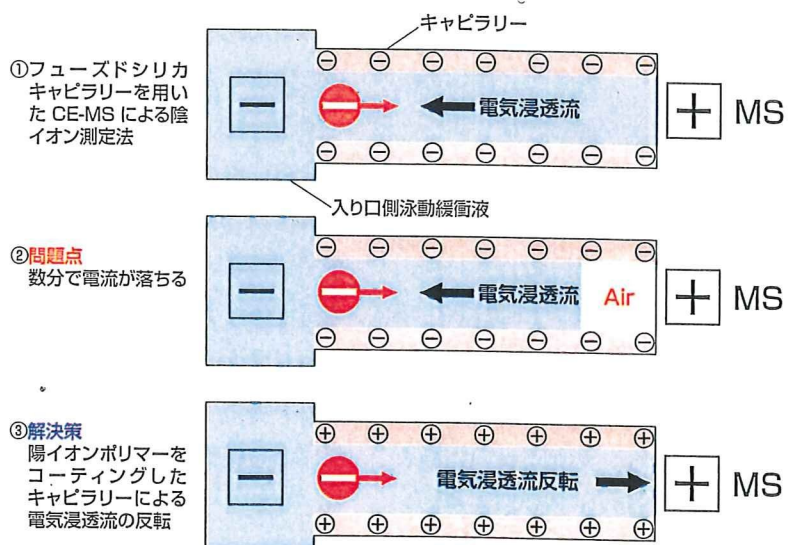


図3 CE-MSによる陰イオン性物質の測定法



この発明のポイントは2つありました。CE-MSによる陰イオンの測定で電流が流れなくなる原因の究明と、安定した電気浸透流の反転法です。

電流が落ちることなく安定した陰イオンの測定を行うには、陽イオン性物質でコーティングされたキャピラリーを使うしかないという結論に達しましたが、そのような特殊なキャピラリーは市販されていませんでした。

ところが、当時、エーザイにいた石濱泰博士（現・慶應義塾大学先端生命科学研究所准教授）が、こんな物を作ったと私に送ってくれました。それは、まさに私が欲していた陽イオン性のポリマーでコーティングされたキャピラリーでした。

#### 4. 研究・開発の“やりがい”と“心がけ”

いつも思っていることは、研究開発で行う実験が運良く成功しても、得るものは満足感以外何もないということです。実験が成功すると、人は考えることをあまりしません。

しかし、うまくいかないと何が問題だったかを真剣に考えます。仮説が間違っていたのか、実験条件や手順が悪かったのか等々。もし失敗の原因を究明し、解決できれば、それは自分だけの財産となります。

私の経験を振り返ると、自然界は偉大なもので、その実験結果はそうなるべくしてなっています。そのため、実験が思いどおりにならないということは、最初に立てた仮説が間違っている場合がほと

んどです。自然界の法則に比べれば、自分の考えはなんて浅薄なのだろうと思知らされることの連続でした。

これまで多くの研究を行ってきた、実験結果がなぜこうなるのか、分からないことがたくさんありました。しかし、その結果に関して何日も何日もあれこれ悩み考えている時間は結構楽しいものです。また、不思議なもので、朝から晩まで真剣に考えているときや夢を見ているときに、その答えが思いつくことがあります。

うまくいかない原因が分かり、その問題が解決できたときの爽快感や達成感は、何物にも代えがたいものであり、研究者冥利に尽きます。

図4 慶應義塾大学先端生命科学研究所に並ぶ40台のCE-MSメタポローム測定装置



