

メタボロミクスの応用研究

Application Studies Using Metabolomics

及川 彰^{1,*}・松田史生²・三枝大輔³Akira OIKAWA,^{1,*} Fumio MATSUDA,² and Daisuke SAIGUSA³¹山形大学農学部 Faculty of Agriculture, Yamagata University²大阪大学大学院情報科学研究科 Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University³東北大学東北メディカル・メガバンク機構 Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University

(Received July 31, 2017; Accepted August 8, 2017)

1. はじめに

メタボロミクスがターゲットとする低分子化合物は、生物の構成要素やエネルギー源として必要不可欠である。また、医薬分野においては疾病に対する直接または間接的な武器となったり、ある種の疾病を感知するための目印になったりする。さらに、農業・食品分野では、最終製品の風味や機能性などの品質を左右する重要な因子となる。そのため、メタボロミクスは基礎研究から応用研究まで、さまざまなシーンで利用可能な技術である。一方で、新技術であるため、分析装置を新規導入しても分析条件の設定から始める必要があり、また外部に受託分析を依頼する際はその高価な費用がネックとなる場合があり、まだ人口に膾炙した手法とは言いがたい。しかし近年、分析条件を確立し公開する潮流が生まれつつあり、また徐々に受託分析を行う業者が増えてきていることから、これらの問題点に解決の光が見えつつある。本稿では、これまでにメタボロミクスが応用された研究例をいくつか紹介する。

2. 基礎研究におけるメタボロミクス

ゲノム情報が明らかになるに従い、機能未知遺伝子の性状解明がさまざまな分野で進められている。多くの場合、遺伝子欠損体に現れた表現型の異常からその遺伝子の機能を推測し、異種発現系などを用いて精製したタンパク質の機能解析によって、ターゲット遺伝子の機能を明らかにしている。また、いくつかの遺伝子では、その遺伝子を欠損または過剰発現した組換え体に含まれる数種の化合物を定量することにより、ターゲット遺伝子の機能を解明することができた。しかし、表現型に異常が認められない遺伝子欠損体や、狙った数種の化合物量に変動が認められない、もしくは想定外の変動を示す遺伝子欠損または過剰発現体

においては、既存の手法ではターゲット遺伝子の機能解明に至らないことも多い。このような困難な課題に対してメタボロミクスが有効であった例もある¹⁾。モデル植物のシロイヌナズナにおける九つの *bsas* 遺伝子のうち、*bsas1-1* はシステイン生合成に関わる遺伝子であることが²⁾、*bsas1-1* 欠損体に含まれるシステインなどの数種の化合物を定量することにより明らかになった。一方、*bsas3-1* 欠損体における同様の解析では、定量した化合物の変動がほとんどなく、*bsas3-1* 遺伝子の機能解析に至らなかった。そこで遺伝子欠損体と野生株に含まれる代謝物をメタボロミクスにより網羅的に検出し比較したところ、これまでシロイヌナズナから報告のなかった化合物 (γ -グルタミル β -シアノアラニン) 量に有意な差が認められた。この結果から、*bsas3-1* 遺伝子は β -シアノアラニン生合成活性を担い、シロイヌナズナにおいては γ -グルタミル β -シアノアラニンの生合成に関わっていることが明らかになった。この研究では、メタボロミクスによって検出された数百種の化合物のうち、 γ -グルタミル β -シアノアラニンのみに含量変動が認められたため、機能未知遺伝子の機能推定を比較的容易に行うことが可能であった。一方、多くの場合では複数の化合物に変動が認められることが多いため、トランスクリプトーム解析など他のオミクスとの複合解析や、バイオインフォマティクスを用いた統合解析が必要となる。

微生物の一次代謝に対してはシステム生物学研究が活発であり、近年は細胞内濃度を正確に定量するための工夫が行われている。³⁾ ^[U-¹³C] グルコース培地で培養した菌体由来の抽出物を、安定同位体標識内部標準物質として利用する手法は広く実施されるようになってきている²⁾。また、微生物は1遺伝子破壊ライブラリーなどのリソースが整備されている。Fuhrerらは3,800以上の大腸菌1遺伝子破壊株について、インフュージョンMS法を用いて7,000以上の代謝物由来イオンの相対シグナル強度の変化を測定し、72遺伝子の機能を新たに推定した³⁾。加えて、微生物が生

*連絡先: oikawa@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

産する有用な二次代謝物の構造多様性をメタボロミックスでとらえる試みも活発化している。例えば Watrousらは、さまざまな枯草菌を平板培地上で培養したコロニーの菌体内外の代謝物を、アンビエントイオン化法の一つである nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry (nanoDESI/MS) で直接イオン化し、混合物のマスペクトルおよび、各代謝物由来シグナルのプロダクトイオンスキンスペクトルを取得している⁴⁾。得られたプロダクトイオンスキンスペクトルの類似性から、mass spectral molecular networkを作成して二次代謝物の構造多様性を可視化した。

その結果、各菌株は非常に多くの構造類縁体を生産すること、さらに生産量は培養時期およびコロニー中の場所などの時空間に依存することを明らかにした。微生物のような比較的単純な生物においては、今後の質量分析装置などの性能向上により、代謝全体をより正確に把握することが可能になるだろう。

3. 医療分野におけるメタボロミックス

従来の代謝物分析と比較して、ターゲット以外の代謝物も同時に検出するメタボロミックスでは、想定外の代謝変動を発見する可能性が高い。医療分野における一つの重要な研究テーマに、疾病に関わるバイオマーカーの発見が挙げられるが、メタボロミックスはまさにこのテーマに合致した手法であり、これまで多くの疾病に対してバイオマーカーを見いだしており、それぞれに対する総説も複数存在する^{5)~7)}。その中でも、中心代謝や一次代謝物の数百成分を同時に分析するワイドターゲットメタボロミックス解析は、ヒト臨床検体に応用した研究から、大腸がんの治療標的代謝物や、がんの進行や予後に関連する代謝物の発見に大きく貢献しており、がん研究領域における新規医療技術として大きく期待されている^{8),9)}。また、網羅的メタボロミックス解析は、疾患モデル動物や遺伝子改変動物から得られた検体による疾患予防バイオマーカーの探索に応用されており、測定から得られた数千種の成分による多変量解析から特に有意義な成分を抽出し、ヒト臨床検体を用いて評価する研究が増加してきている¹⁰⁾。すでに糖尿病、慢性腎機能障害、妊娠高血圧腎症、肺高血圧症、呼吸器疾患、緑内障、脳血管疾患、アルツハイマー病、統合失調病、肝臓がん、腎臓がん、小児神経疾患、ニーマンピック症候群などの希少疾患を含む多くの疾病におけるバイオマーカー探索研究が進められており、臨床メタボロミックス解析は、今後多くの疾患予防あるいは診断・治療評価に関連するバイオマーカーを明らかにし、創薬標的分子の解明に大きく貢献することが期待されている¹¹⁾。

また近年では、国内・外の研究機関において、コホート研究のような大規模な追跡調査にメタボロミックス解析を組み合わせた研究が実施されている¹²⁾。本国では、東北メディカル・メガバンク計画の前向きコホート研究の参加者(15万人以上)から得られた各種検体がバイオバンクに保管されており、その一部の血漿検体を用いた全ゲノム解析

およびオミックス解析が行われている。メタボロミックス解析は、オミックス解析の一環としてNMRあるいはMSにより数千人規模で実施され、得られた血漿メタボロミックス解析データは、日本人多層オミックス参照パネル (Japanese Multi Omics Reference Panel: jMorp) として広く一般公開発表されており (<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/>)、今後、ヒト血漿メタボロミックス解析における基準値として活用されることが期待されている。さらに、本プロジェクトではゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) が実施され、一塩基多形の発現に相関して変化する代謝物を明らかにすることで、ゲノム変異がもたらす表現型への影響が解明されつつある¹³⁾。加えて、大規模コホートメタボロミックス解析から得られる情報は、臨床検査情報のみならず、生活や食事などのアンケート情報と詳細に相関解析することで、生活習慣・栄養摂取バランスの改善や病気の予防に関連するバイオマーカーの開発にも貢献することが期待されている。

4. 農業・食品分野におけるメタボロミックス

農産物や食品における代謝物含量は、色などの外見、味や香りなどの風味、抗酸化活性などの機能性に直接関わる重要な要素である。従来の研究では、それぞれの品質に対して一つまたは少数の化合物量を比較定量することによって、農産物や食品の評価を行っていた。しかし、農産物や食品に含まれる化合物種は多く、また、農産物では産地や品種、食品では加工方法などによって化合物含量が異なるため、メタボロミックスによって広範囲の化合物量を明らかにすることは、農産物や食品の品質評価に有効であるといえる。これまでに日本酒¹⁴⁾やチーズ¹⁵⁾などにおいて、主に風味成分に注目したメタボロミックスが行われ、それぞれの特徴を代謝物種や含量から明らかにしている。

一方で、代謝物量に変動がないことを確かめるためのメタボロミックスも試みられている。例えば、機能性の高い農産物を品種改良などによって作成したとしても、元来の良食味を失ってしまえば、商品価値は低下する。そのため、このような場合では、ある機能性成分含量だけが増加し、その他の成分含量は維持されることが望ましい。これは遺伝子組換え食品では特に重要であり、過去にメタボロミックスを用いてその実質的同等性を確認した研究例もある¹⁶⁾。

また、近年の健康志向ブームもあり、農産物や食品の機能性の探索がさまざまな食材で行われているが、これをメタボロミックスで解決しようとする試みも行われつつある。柿は従来から「体に良い」ことが知られており、主にビタミンAなど一部の化合物にのみ焦点が当てられていた。メタボロミックスにより、柿に含まれる機能性成分を探索した結果、検出された数百化合物の中から、これまでノニ（熱帯地方で見られる植物、ノニジュースなどにして飲まれる）などに含まれることがわかっていたスコボレチンが、柿にも含まれていることを見いだした。また、このスコボレチンは樹上脱渋（収穫後に渋抜きをするのではなく、樹上に実がある段階で渋抜きを行う手法）により、その含量

が増加することも確かめられた。さらに、ラットを用いた実験で、スコポリンに血圧の上昇を抑制する効果を確認した¹⁷⁾。一方、柿に含まれる機能性成分であるGABAやシトルリン含量が、加熱により増加することも見いだした。本研究は、メタボロミクスが対象食材に含まれているこれまで注目されていなかった機能性成分を見つけ出す可能性を示したといえる。

5. おわりに

プロテオミクスなどの他のオミクス技術に比べ、メタボロミクスは非モデル生物でも容易に応用が可能であり、基礎研究だけでなく応用研究にも用いやすい。また、メタボロミクスの定義（生体内における代謝物の一斉解析）からは少し外れるが、環境分析や食品分析などの混合物分析にもメタボロミクスは利用可能である。これは、さまざまな分野におけるメタボロミクスの潜在的な可能性を示している。

一方で、ゲノミクスにおける次世代シーケンサー、トランスクリプトミクスにおけるマイクロアレイ、プロテオミクスにおける二次元電気泳動やLC-MSMSなどのような、確立された手法がメタボロミクスには依然存在しない。それは、DNAやタンパク質に比べ、化合物が多様な物理化学的特性を持っているため、同一の分析装置での同時解析が困難だからである。その中で、物理化学的特性を絞って、それぞれの化合物群に対するメタボロミクスが試みられており、脂質やイオン性化合物についてはLCやCEを質量分析装置と接続して分析する手法の有効性が確かめ

られつつある。手法が確立されれば、高価な分析装置からのデータ回収効率が向上することが期待され、より多くの研究者がメタボロミクスを用いることができる。さらに、メタボロミクスでより幅広く生体内の代謝物を解析するためには、それぞれの分析装置の性能向上とともに、これら複数の分析装置から排出されるデータの統合手法も開発される必要があるだろう。本稿で紹介したような、すでに示されつつある応用研究へのメタボロミクスの成功例が、今後のメタボロミクスのスタンダードを形作っていくことを期待したい。

文 献

- 1) M. Watanabe *et al.*, *Plant Physiol.*, **146**, 310 (2008).
- 2) S. R. Hackett *et al.*, *Science*, **354**, 6311 (2016).
- 3) T. Fuhrer *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, **13**, 907 (2017).
- 4) J. Watrous *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, E1743 (2012).
- 5) M. S. Monteiro *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, **20**, 257 (2013).
- 6) B. Hocher and J. Adamski, *Nat. Rev. Nephrol.*, **13**, 269 (2017).
- 7) R. A. Huynh and C. Mohan, *Front. Neurol.*, **8**, 102 (2017).
- 8) S. Nishiumi *et al.*, *Oncotarget*, **8**, 17115 (2017).
- 9) S. Tabata *et al.*, *Cell Rep.*, **19**, 1313 (2017).
- 10) D. Saigusa *et al.*, *PLoS ONE*, **11**, e0160555 (2016).
- 11) M. Maekawa *et al.*, *Mass Spectrom. (Tokyo)*, **5**, S0053 (2016).
- 12) W. B. Dunn *et al.*, *Metabolomics*, **11**, 9 (2015).
- 13) S. Koshiba *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 31463 (2016).
- 14) Y. Masuo *et al.*, *Electrophoresis*, **30**, 1259 (2009).
- 15) H. Ochi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 506 (2012).
- 16) C. Simó *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 18941 (2014).
- 17) C. Liu *et al.*, *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 391 (2012).