

[招待論文]

# メタボロームが解き明かす生命のシステム Metabolomics — A New Approach to Elucidating Biosystems

曾我 朋義

慶應義塾大学環境情報学部教授

Tomoyoshi Soga

Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

平山 明由

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任助教

Akiyoshi Hirayama

Project Research Associate, Graduate School of Media and Governance, Keio University

杉本 昌弘

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任准教授

Masahiro Sugimoto

Project Associate Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

**Abstract:** 生体内に数千種類存在する代謝物（メタボローム）の網羅的な解析は、生命科学の基礎研究の発展のみならず、医薬、食糧、環境、エネルギーなど人類が直面している問題に有効な解決策を齎すのではないかと期待されている。我々が開発したキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)を用いたメタボローム解析は、細胞や組織中に存在するイオン性代謝産物の一斉分析を可能にした。本法によるメタボローム解析技術と医薬研究、食品研究の応用例について概説したい。

The measurement of the level of all intracellular metabolites is rapidly becoming important for gaining insight into functional biology. Recently we have developed a new method for the analysis of most of all charged metabolites based on capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS). In this marriage of techniques, CE confers rapid analysis and efficient resolution, and MS provides high selectivity and sensitivity. This method is powerful and is readily applied to medical and food samples and new findings by this approach are discussed.

**Keywords:** メタボロミクス、システム生物学、キャピラリー電気泳動、質量分析計、がん、代謝、日本酒、枝豆

metabolomics, systems biology, capillary electrophoresis, mass spectrometry, cancer, metabolism, sake, green soybean

---

## 1 はじめに

慶應義塾大学先端生命科学研究所では、細胞や生体内に存在する分子の変化をバイアスをかけない方法で網羅的に測定し、生命現象を司る生体分子の相互作用の解明を目指すプロジェクトが進められている。このシステム生物学あるいはオミクス解析とも言われる新しい学問領域では、ゲノム解析、全遺伝子発現(トランスクリプトーム)解析、全タンパク質(プロテオーム)解析データに加えて、全代謝物(メタボローム)データも取得し、上流のゲノムから下流のメタボロームまでの分子間ネットワークを解明することによって生命現象を包括的に理解しようとする。

しかし、先端生命科学研究所が設立された2001年当時、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームについては、測定技術がほぼ確立されていたが、全ての代謝物を網羅的に測定できる方法論はなく、一部の代謝物にターゲットを絞った分析法が存在しているに過ぎなかった。そこで、筆者らは、全ての代謝物の一斉分析を目指したメタボローム測定技術の開発に取り組んだ。

## 2 メタボローム測定技術の開発

メタボローム測定技術を開発するに際して、各代謝物の構造を見ると、糖系、クエン酸回路などの中心代謝経路に存在する代謝物のほとんどすべては、正か負に帯電しているイオン性物質であった。しかし、代謝物は数千種類存在しており、なおかつ物理的・化学的な性質は多様である。これらを考慮すると、一つの分析装置で全ての代謝物を測定するのは不可能であると思われる。そこで、イオン性物質に対して高い分離能を示す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装置(MS)を組み合わせた方法を考案した(図1)。

図2のCE-MS法の測定の原理を以下に記す。細長い中空のチューブであるキャピラリーに細胞から抽出した代謝物試料を導入後、キャピラリーの両端に数万ボルトの電圧を加える。電圧が印加されると、すべての陽イオン性代謝物は陰極に、陰イオン性代謝物は反対の陽極方向に移動する。この移動の速度は、各代謝物の電荷/イオン半径の値に基づいており、この値が大きい代謝物(つまり電荷が大きく、イオン半径が小さい代謝物)は早く移動する。

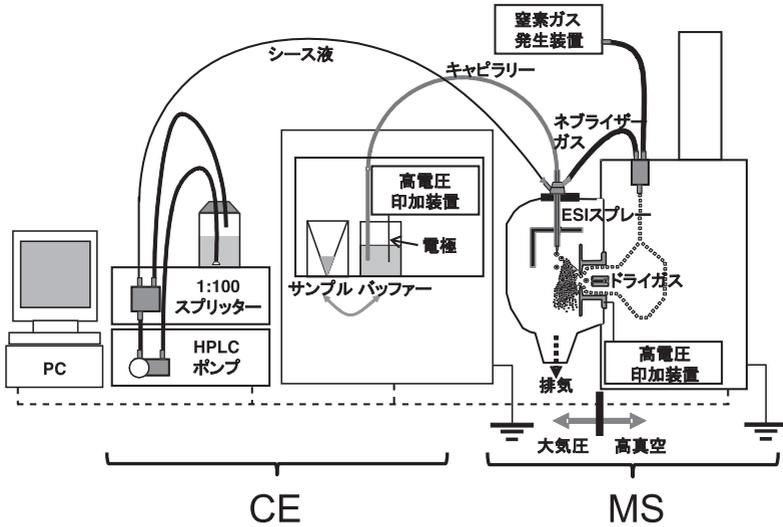


図1 CE-MSシステムの構成図

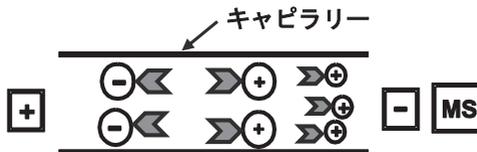


図2 CE-MSでの分離の原理

この原理によって、同じ陽イオン性代謝物でもキャピラリー内を移動する速度が異なるため、MSに到達する時間に差が生じる。MSに到達した代謝物は、順次その代謝物の質量が測定されるとともにMSに導入される代謝物の量もカウントされる。このCE-MS法によるメタボローム測定技術は、陽イオンおよび陰イオン代謝物の二種類の測定条件によって、イオン性物質を網羅的に測定することが可能である。以下にCE-MSによるメタボローム測定技術の詳細を記す。

## 2.1 陽イオン代謝物の測定法

陽イオンは、陰極方向に電気泳動するため、陽イオン性代謝物質を測定する場合は、キャピラリーの出口が陰極となるように電圧を印加し、陰極にMSを接続する(図2)。CE法の場合、重要なのはキャピラリー内を満たす電気泳動緩衝液である。pH2以下の電気泳動緩衝液を用いることで、アミノ基を持つほとんどの代謝物が陽イオンとなり、陰極方向に電気泳動し、キャピラリー出口のMSでの一斉分析が可能になった<sup>[1]</sup>。

## 2.2 陰イオン代謝物の測定法

解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路などエネルギー代謝経路に存在する代謝中間体はすべて陰イオン性化合物である。陰イオンは陽極方向に電気泳動するため、キャピラリーの出口が陽極となるように電圧を印加し、陽極にMSを接続した(図3A)。しかし、この方法では、試料を注入後、数分で電流が流れなくなるという問題が発生した。原因を検討した結果、このシステムで使用しているフューズドシリカ(熔融石英)キャピラリーは、内表面が負に帯電しており、電圧を印加した際に電気浸透流(EOF)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)に発生し、これによってキャピラリーの出口側に空気が入り、電流が流れなくなることが判明した(図3B)。この問題を解決するため、キャピラリーの内表面が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(図3C)。この方法によって、安定した陰イオン性代謝物の一斉分析が可能になった<sup>[2]</sup>。

2003年に我々は、本法によって、微生物の一種である枯草菌から1,692種類のイオン性代謝物の一斉分析に成功した<sup>[3]</sup>。これは、当時ドイツのマックスプランク研究所が発表していたメタボローム解析の一斉分析の記録(一度に362種類)をはるかに凌ぐ結果であった。この技術を様々な分野の研究および産業に応用するため、2003年に筆者の一人である曾我と慶應義塾大学先端生命科学研究所所長の富田は、ベンチャー企業ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(株)(HMT)を創業している。

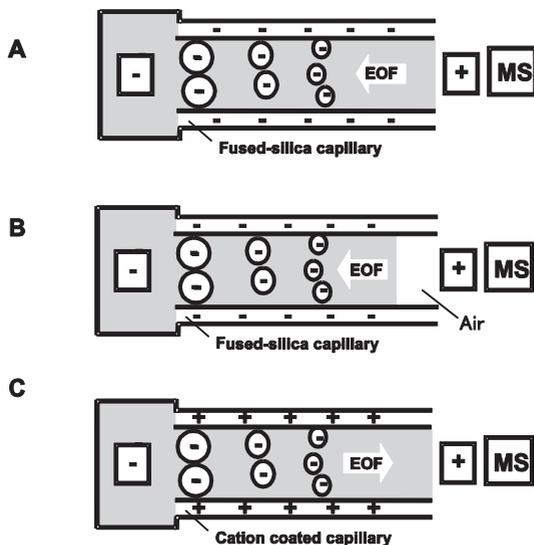


図3 CE-MSでの陰イオン性代謝物質の測定法

### 3 メタボローム解析の生命科学への応用

慶應義塾大学先端生命科学研究所では、CE-MS装置をはじめとしたメタボローム測定装置が50台以上稼動しており、世界最大のメタボローム解析能力を有している。国内外の大学、研究機関、企業と共同研究を幅広く進めており、代謝経路の特定、代謝調節機構の解明、遺伝子、タンパク質の機能解明といった基礎研究から医薬、発酵、食品、農業、工業、エネルギー、環境などの分野の応用研究にも取り組んでいる。本稿では、CE-MSメタボロミクスをがん研究および食品研究に応用した例について紹介する。

#### 3.1 がんのエネルギー代謝研究

一般に、がん細胞は増殖速度が速いために周囲の血管新生が間に合わず、腫瘍組織中は慢性的な低酸素状態になっていることが知られている。実際に様々な腫瘍組織の酸素分圧を測定すると、その酸素分圧は周囲の非腫瘍組織に比べて低いことが分かっている<sup>[4]</sup>。生化学の教科書を見ると、細胞の増殖

にはそのエネルギー源として ATP (アデノシン 3 リン酸) が必要であり、この大部分は常酸素下においては酸化リン酸化によって生合成されると書いてあるが、1926年にドイツの生理学者であったオットー・ワールブルグは、がん細胞が常酸素下においても解糖系依存的にエネルギー産生を行う現象を発見した(ワールブルグ効果)<sup>[5]</sup>。

したがって、多くの腫瘍組織に見られる低酸素はがん細胞による酸素消費の結果ではなく、腫瘍組織周辺の血流不足によるものと考えられるわけであるが、血流が不足するとグルコースの供給も不足するはずである。解糖系はエネルギー産生効率が悪いため、大量のグルコースが必要である。このような特殊な微小環境でも増殖を続けられるがん細胞には、ワールブルグ効果だけでは説明できない何か別の代謝メカニズムが存在するのではないかと考え、CE-MSを用いたメタボローム解析によってがん組織におけるエネルギー代謝のメカニズムの解明を行った<sup>[6]</sup>。

我々は、16名の大腸がん患者および12名の胃がん患者より採取した腫瘍組織と非腫瘍組織をそれぞれ前処理した後、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)を用いてメタボローム測定を行った。2つの分析条件(陽イオン測定および陰イオン測定)を合わせることにより、1検体あたり約1,000の代謝物ピークを得ることができた。その内、中心代謝経路(解糖系、ペントースリン酸経路およびTCA回路)に存在する代謝物の定量結果を図4に示す。

腫瘍組織におけるグルコース量は正常組織と比較すると、胃がんでは約1/3、大腸がんには約1/10であった。その一方、下流の解糖系の間代謝物量は非腫瘍組織と比べて同等か、一部については有意に増加していた。また、解糖系の最終産物である乳酸は、どちらのがん種においても腫瘍組織で顕著な蓄積が認められた。これは、ワールブルグ効果の存在を支持するものであり、ヒトの腫瘍組織においても解糖系が亢進していることを示している。したがって、腫瘍組織におけるグルコースの著しい枯渇は、血流不足による供給不足と解糖系の亢進による過剰消費によって引き起こされていると考えられる。

TCA回路の代謝物については、2つの特徴的な傾向が見られた。1つは、

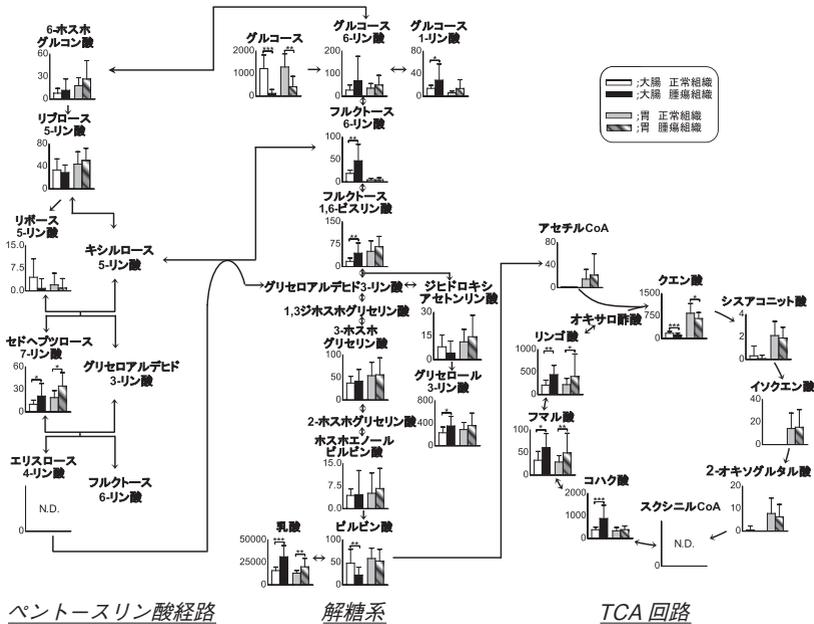


図4 解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路に関する代謝物の蓄積量

各代謝物量は臓器 1g あたりの平均 (nmol) ±標準偏差で示している。また、統計学的有意差の検定にはウィルコクソン検定を用いた。

\*、 $p < 0.05$ ；\*\*、 $p < 0.01$ ；\*\*\*、 $p < 0.001$ 。(文献6より改変)

TCA 回路前半の代謝物 (クエン酸から 2- オキソグルタル酸まで) の蓄積量が 大腸組織と胃組織と異なっていたことである。胃では、どちらの組織においてもこれらの代謝物が一定量存在していたが、大腸ではほとんどが検出限界以下であった。元々、大腸組織の酸素分圧は胃に比べて 1/5 程度であることから、大腸組織においては非腫瘍組織であっても酸化的リン酸化がほとんど行われていないのではないかと推測される。

2 つ目は、TCA 回路後半の代謝物が腫瘍組織で増加していたことである。特に大腸の腫瘍組織において、コハク酸、フマル酸およびリンゴ酸が非腫瘍組織と比べて有意に蓄積していた。この原因について、我々は腫瘍組織においては TCA 回路を一部逆回しにしてエネルギー産生を行っているのではな

いかと推測した。古くから嫌気性微生物や回虫などの寄生虫の一部において、嫌气的条件下でフマル酸呼吸と呼ばれる代謝によって ATP 産生が行われることが知られている<sup>[7, 8]</sup>。フマル酸呼吸は、電子伝達系における電子受容体として、酸素の代わりにフマル酸を用いて嫌气的に ATP を生成する反応であるが、その際にフマル酸は還元されてコハク酸になる。今回の結果においても、大腸腫瘍組織でコハク酸が多く蓄積していることから、TCA 回路を逆回しすることによって ATP を嫌气的に生成しているのではないかと考えた。

ある種の虫下し薬（パモ酸ピルピニウム）はフマル酸呼吸を阻害することが報告されていたことから、共同研究者の江角（国立がんセンター）らは膀胱がんの培養細胞にこれを添加する実験を行い、実際にがん細胞が死滅することを確認している。もし、この経路ががんの主要なエネルギー産生経路であれば、この経路は抗がん剤の新規ターゲットになるはずである。

### 3.2 食品研究

本研究のある鶴岡市を含む庄内平野は、日本海に面する山形県の西側に位置し、鳥海山や出羽三山などの山々に囲まれ、最上川などの河川が流れる肥沃な大地である。「食の理想郷」と呼ばれ、驚くほど多種多様な食材に恵まれており、穀物、野菜、果物などの農産物をはじめ、庄内浜で水揚げされる様々な地魚などを楽しむことができる。出羽三山の精進料理をはじめとした郷土料理など、古くから質の高い食文化が形成されてきた。2014年12月には、鶴岡市はユネスコの創造都市ネットワークに食文化部門の都市として加えられた。

メタボロームはアミノ酸・糖・脂質など、いわゆる味や香りを呈する分子を含む様々な代謝物を一斉に測定する方法であり、食材の品質評価や官能評価に最適な方法の一つだと考えられる。更に、ペプチドなどの機能性成分の測定や、機能性食品を取り込んだ場合人体で起きる代謝の変化を把握することもできるため、幅広く様々な研究に利用されている。例えば、良食味・高収量・抗ストレス抵抗性などの特徴を農作物にもたすためには、土壌改良や肥料・農薬の種類や量などをどのように設計すべきかなど、農業の現場で経験的に行われてきた方法を定量的で客観的な指標で評価することができ、より効率的な品質の改善に繋がられる<sup>[9]</sup>。また、加工食品の製造プロセスや

保存条件の最適化などにも活用することができる。そこで我々はメタボローム解析技術を活用して、食品の官能値と分子成分の関係<sup>[10, 11]</sup>、保存条件の最適化のための指標の開発<sup>[12]</sup>など、様々な応用研究を実施してきた。

庄内地方の特産物であるだだちゃ豆は、枝豆用として栽培される大豆の系統群である。濃厚な風味と甘みを持つことで有名であるため、庄内地方で消費されるだけでなく都心に輸送して販売する流通量も多い。このため、商品価値を高めるためには、だだちゃ豆の収穫から販売に至るまでの保存と輸送時の条件を最適化して、風味や栄養を如何に新鮮なまま届けるかが重要な課題である。そこで、東京まで輸送して販売することを想定して収穫後に、保存温度と保存時間をパラメータとして、様々な条件で保存されただだちゃ豆を準備し、官能試験による味の評価とメタボローム解析による成分変化の分析を実施した<sup>[10]</sup>。

保存の系としては、5系統を比較対象とした。まず全ての系にて収穫後8時間の予冷(5℃)、更に16時間の輸送(5℃)を行う。この後、店頭保存の条件として、48時間の間(A)10℃、または(B)25℃で保存した場合の2系統を準備した。あるいは48時間バックヤードに5℃で保存した後に48時間の間(C)10℃、(D)25℃、(E)5℃で保存した場合の3系統を準備した(図5)。官能試験は甘味、旨み、香り、総合評価をスコアリングし、どの系統でも一様に時間とともに劣化する傾向が見られた。代謝物は、時間とともに増減するパターンが大きく4つに分類される傾向にあった。甘味を呈する糖類や、うまみ

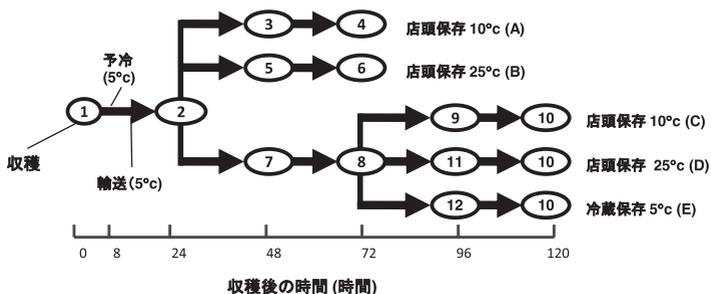


図5 だだちゃ豆の保存条件

を呈するグルタミン酸はどの保存条件でも大きな差はなく、時間とともに低下する傾向であったが、皮の硬さに影響を及ぼす可能性のある代謝物などは保存条件によってその変化が大きくことなるために、保存温度はテクスチャーへの影響が大きい可能性がある。本研究はJA 鶴岡との共同研究である。

庄内の酒造メーカーから、従来通り日本酒を作っているはずだが雑味が強い場合があり、この原因を調べてほしいとの要望を受け、日本酒の官能試験とメタボローム解析を実施した<sup>[11]</sup>。山形県内で造られている純米酒49種類に関して山形県工業技術センターで甘味、酸味、苦味、雑味を評価し、代謝物との関係を調査した。酵母や原料米の違いを単純に数種類の代謝物で説明できるような変化ではなく、日本酒ごとに独特の変化を示した。その中でも、どの日本酒でも共通して一部のアミノ酸と有機酸が雑味と高い相関を示す傾向を示した。

日本酒の別の研究として、鶴岡酒造組合との共同研究により、日本酒の熟成中の代謝物の変化を知るために、火入れと生酒の時系列的な変化も調べた<sup>[12]</sup>。火入れは、火落菌の殺菌と酵素失活を目的として行うため、熟成中に酵素による代謝物の変化が少なくなることが期待される。実際に、糖類、ペプチド、有機酸などは火入れで変化が少ない結果であったが、一方アミノ酸は火入れのほうが早く変化するという結果が得られた(図6)。糖とアミノ酸

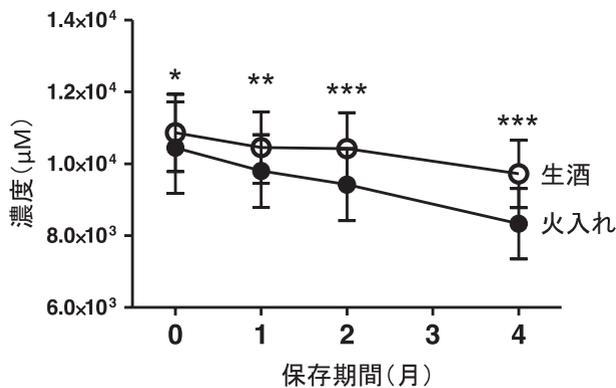


図6 日本酒におけるアミノ酸の総濃度の変化

から褐色物質を生成するメイラード反応のように非酵素的な反応が火入れでより強く起きている可能性が考えられる。

これ以外に大豆の中の特定の株だけが持つ害虫耐性のメカニズムの解明<sup>[13,14]</sup>、山形県内企業との加工食品の品質評価、在来作物の機能性評価など、様々なプロジェクトを現在も行っている。同時に官能試験の関係と多数の代謝物の値の関係を理解するために、高度なモデル化の方法も開発している。メタボロームを活用して食品のおいしさの秘密を解き明かすとともに、農産物や食品の高付加価値化に繋げて行きたいと考えている。

## 参考文献

- [1] Soga, T. and Heiger, D.N., “Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry.” *Anal. Chem.*, 72(6): 2000, pp.1236-1241.
- [2] Soga, T., *et al.*, “Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry.” *Analytical Chemistry*, 74(10), 2002, pp.2233-2239.
- [3] Soga, T., *et al.*, “Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry.” *J. Proteome Res.*, 2(5), 2003, pp.488-494.
- [4] Vaupel, P., *et al.*, “O<sub>2</sub> extraction is a key parameter determining the oxygenation status of malignant tumors and normal tissues.” *Int. J. Oncol.*, 22(4), 2003, pp.795-798.
- [5] Warburg, O., “On the Origin of Cancer Cells.” *Science*, 123(3191), 1956, pp.309-314.
- [6] Hirayama, A., *et al.*, “Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.” *Cancer Res.*, 69(11), 2009, pp.4918-4925.
- [7] Kita, K., *et al.*, “Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*.” *Biochim. Biophys. Acta*, 1553(1-2), 2002, pp.123-139.
- [8] Ullmann, R., *et al.*, “Transport of C(4)-dicarboxylates in *Wolinella succinogenes*.” *J. Bacteriol.*, 182(20), 2000, pp.5757-5764.
- [9] 及川 彰「メタボロミクスの農業・食品分野への応用」『化学と生命』51(9)、2013年、pp.615-621.
- [10] Sugimoto, M., *et al.*, “Metabolomic profiles and sensory attributes of edamame under various storage duration and temperature conditions.” *J. Agric. Food Chem.*, 58(14), 2010, pp.8418-8425.
- [11] Sugimoto, M., *et al.*, “Correlation between sensory evaluation scores of Japanese sake and metabolome profiles.” *J. Agric. Food Chem.*, 58(1), 2010, pp.374-383.
- [12] Sugimoto, M., *et al.*, “Changes in the charged metabolite and sugar profiles of pasteurized and unpasteurized Japanese sake with storage.” *J. Agric. Food Chem.*, 60(10), 2012, pp.2586-2593.
- [13] Sato, D., *et al.*, “Metabolomic profiling of the response of susceptible and resistant

- soybean strains to foxglove aphid, *Aulacorthum solani* Kalténbach.” *J. Chromatogr.B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 925, 2013, pp.95-103.
- [14] Sato, D., *et al.*, “Comparative metabolite profiling of foxglove aphids (*Aulacorthum solani* Kalténbach) on leaves of resistant and susceptible soybean strains.” *Mol. Biosyst.*, 10(4), 2014, pp.909-915.

〔受付日 2015. 1. 22〕