［招待論文：総説・レビュー論文］

# メタボローム解析のこれまでとこれから
# The Past and Future of Metabolome Analysis

平山 明由
慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科准教授
Akiyoshi Hirayama
Associate Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University
Correspondence to: hirayama@ttck.keio.ac.jp

Abstract:　メタボローム解析が本格的に実施されるようになってから約 20 年の月日が流れた。当初は、どの分析法が適しているのかという技術的な議論が主であったが、次第に様々な応用研究へ利用されるようになり、疾患機序の解明やバイオマーカーの発見など着実に成果を生みつつある。本稿では、これまで先端生命科学研究所で開発されてきたメタボローム解析技術について概説するとともに、今後どのような技術が求められるのかについて展望を述べたいと思う。

About 20 years have passed since metabolome analysis was first carried out as an earnest method of analysis. Initially, its technical suitability against other analytical methods was debated; however, metabolome analysis has gradually been implemented in various applied researches, such as the elucidation of disease mechanisms and discovery of biomarkers, steadily achieving significant results. In this review, I outline the metabolome analysis technology that has been developed at the Institute for Advanced Biosciences (IAB) and give an outlook on the technology that will be required in the future.

Keywords: メタボロミクス、キャピラリー電気泳動、質量分析、高感度化、高速分析、1 細胞分析
metabolomics, capillary electrophoresis, mass spectrometry, high sensitivity, fast analysis, single cell analysis

## 1　はじめに

生体内には多種多様な代謝経路が存在しており、代謝反応の結果として生じる代謝物質量は、例えば疾患の発症や加齢、生活環境の変化などによって変動すると言われている。代謝物の総体はメタボロームと呼ばれ、この変動を網羅的に追跡することによって、生体内で起こっている様々な生命現象を

理解しようとする方法論がメタボローム解析（メタボロミクス）である。従来から特定の生体内代謝物の測定は行われていたが、1990 年代の後半から徐々にメタボロームの概念が提唱され始めると、2000 年代には質量分析装置の発展と相まって本格的なメタボロミクス研究の時代に突入した。

先端生命科学研究所においても、システムバイオロジーにおける 1 つの階層として、設立直後からメタボローム解析グループを立ち上げた。しかしながら、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、メタボロームについては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、助教授（当時）の曽我らが中心となって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

代謝物のデータベースの 1 つである Human Metabolome Database（HMDB）の最新バージョン（2022 年 6 月時点、Ver 5.0）には、ヒトの血液中から検出された内因性の代謝物として、3,139 種類の代謝物が登録されている。この数は、ゲノム（約 22,000）、トランスクリプトーム（約 100,000）、プロテオーム（約 1,000,000）と比べても圧倒的に少ない数である。また、代謝物には生物種に対する特異性はなく、どんな生物種に対しても単一の測定法が適用可能である。

このように、一見簡単そうに見えるメタボローム解析であるが、実際に代謝物を一斉分析するためには非常に高いハードルが存在する。この最も大きな要因は、各代謝物の物理的・化学的性質の違いによるものである。図 1 に、代表的な代謝物群をその水への溶解度と極性を指標に分類したものを示す。例えば、糖リン酸やヌクレオチド類は水への溶解性が高くかつ極性も高い一方、脂肪酸類はほとんど水へ溶解せず極性も示さない。このような物理的・化学的性質の異なる代謝物群を一斉に分析可能とする決定的な分析法は残念ながら存在しない。

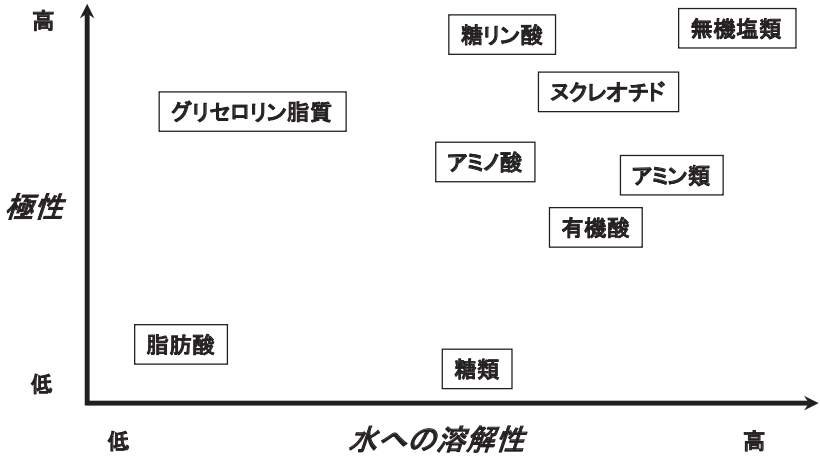


図 1　各代謝物群の物理的・化学的特性

## 3　CE-MS メタボローム測定技術の開発

全ての代謝物を同時に測定することはできないにせよ、メタボローム解析を行う上でベースとなる分析法をどれにするかは非常に重要な問題である。メタボローム測定技術を開発するにあたり、各代謝物の構造を調べてみると、生命活動を維持するために必須である、解糖系やクエン酸回路などの中心炭素代謝経路に存在する代謝中間体のほとんどは、正か負に帯電しているイオン性物質であることが分かった。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と高感度・高選択な検出器である質量分析装置を組み合わせた、キャピラリー電気泳動ー質量分析 (CE-MS) を考案した。

CE-MS に注入された試料中のイオン性代謝物は、電気泳動によってキャピラリー内で分離され、質量分析計で検出される。試料中の全ての陽イオン性代謝物は陰極方向へ、陰イオン性代謝物は陽極方向へ移動する。その際、各代謝物の移動速度 (電気泳動移動度) はその物質の電荷と水和イオン半径との比に基づくため、その比率が異なる物質はキャピラリー内で分離され、出口に接続された質量分析計で選択的に検出される。CE-MS においては、陽イオン測定モードおよび陰イオン測定モードの 2 条件でほとんど全てのイオン性代謝物が測定可能であることが特徴である。また、サンプル注入量が極少量(数

～数十 nL）であるため、量が少ない試料や希少なサンプルでも適用可能であること、さらには他のメタボローム解析においてしばしば問題となるマトリックス効果（サンプル中の夾雑成分の影響で、目的化合物のイオン化が阻害、もしくは促進される現象）の影響をほとんど受けないため、定量性に優れていることも利点である。

以下に、先端生命科学研究所で現在用いられている CE-MS 分析条件を示す。

### 3.1　陽イオン性代謝物質測定法（Soga and Heiger, 2000; Soga et al., 2003）

陽イオン性の代謝物質の測定は、内径 50μm、長さ 1m のフューズドシリカキャピラリーを用いて行っている。キャピラリー内を泳動液である 1mol/L のギ酸溶液で満たした後に、キャピラリーの出口側（MS 側）が陰極となるように両端に 30kV の電圧を印加する（図 2a）。

この条件においては泳動液の pH が低いため（約 1.8）、酸性官能基である水酸基、カルボキシル基、リン酸基などの解離が抑制され、塩基性官能基であるアミノ基が完全解離する。従って、アミノ基を持つ多くの代謝物が陽イオンとなり陰極方向へ電気泳動する。

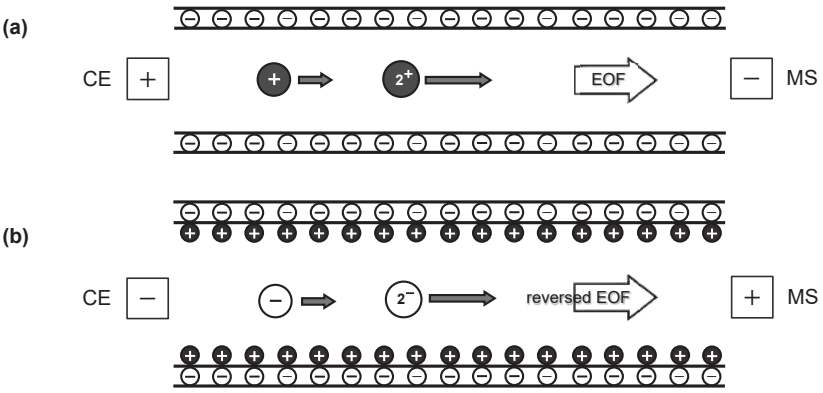


図 2　CE-MS によるメタボローム測定法
（a）陽イオン性代謝物分析　（b）陰イオン性代謝物分析

### 3.2　陰イオン性代謝物質測定法（Soga et al., 2002; Soga et al., 2009）

陰イオン性の代謝物質の測定は、塩基性化合物をキャピラリー内壁表面に化学修飾した COSMO (+) キャピラリー（ナカライテスク株式会社より販売されている）を用いて行っている。泳動液には pH8.5 の 50mmol/L 酢酸アンモニウム溶液を用い、陽イオン測定とは極性を反転させて電圧印加を行う（図2b）。COSMO (+) キャピラリーを用いることによって電気浸透流と呼ばれる液流を反転させることが可能となり、陰イオン性の代謝物質を安定に測定することができるようになった。特に陰イオン性代謝物には、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸回路といったエネルギー代謝上重要な代謝経路の中間体がほとんど含まれているため、これらを一度の測定で同時に定量できることは CE-MS の強みである。また本法では、リブロース 5 リン酸とリボース 5 リン酸、イソクエン酸とクエン酸、グルコース 1 リン酸、フルクトース 6 リン酸およびグルコース 6 リン酸などといった、生体内に複数存在する構造異性体（化学組成式は同一であるが、構造が異なる化合物）も分離することが可能である。

本技術は、がんの特異的代謝機構の解明（Hirayama et al., 2009）や様々な疾患のバイオマーカー探索（Soga et al., 2006; Hirayama et al., 2012; Tsuruoka et al., 2013）など、医学、薬学、生化学を中心に適用され、成果を挙げてきた。さらにこの技術を様々な分野の研究および産業に応用させるため、2003 年に曽我と先端生命科学研究所所長の冨田は、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）を創業した。

## 4　高感度 CE-MS の開発

通常の CE-MS においては、ネブライザーと呼ばれるスプレーの先端で、キャピラリーの中から出てくる泳動液にシース液と呼ばれる有機溶媒を含む溶液を混合し、さらにその外側より窒素ガスを噴霧することによって、電気泳動のための電圧印加とサンプル中の化合物のイオン化を行っている。このシース液の添加によって安定した測定が可能になる一方で、ネブライザーの先端でシース液による希釈が起こり、測定感度が低下する問題が指摘されていた。

そこで筆者らは、シース液を用いなくても測定可能な新規シースレス CE-MS インターフェイスを開発した（図 3）。分析用キャピラリーの出口から約 2cm 上流に小さなクラック（きず）を作成し、その真上に泳動液を入れるための容器を設置する。ここに白金電極を挿入して電圧を印加すると、このクラックを介して電子の移動が可能となり分析が開始する。クラックまで移動してきた代謝物は、電気浸透流（電圧を印加した際に自然発生する液流）と呼ばれる液の流れに乗ってキャピラリー出口まで移動し、イオン化されて質量分析計に導入される。このインターフェイスの作製方法については、日本、米国、ドイツで特許を取得した。

このインターフェイスを用いて、陽イオン性の代謝物標準溶液を測定したところ、従来法と比べて平均 4.4 倍の感度上昇を達成した（Hirayama et al., 2018）。その後も研究開発を続けており、今では約 100 倍の高感度化が達成されている。本成果を社会実装するため、筆者は 2021 年 7 月にベンチャー企業インセムズテクノロジーズ（株）を創業した。

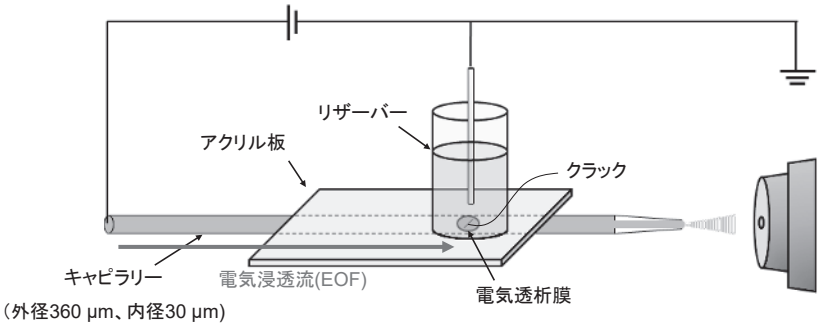


図 3　シースレス CE-MS デバイスの概略図

## 5　シングルセル CE-MS

CE-MS において、一度の分析で導入する試料量は数～数十 nL と僅かであるため、この利点を生かした 1 細胞分析への応用を目指した技術開発が行われている。イリノイ大学の研究チームは、ジャンボアメフラシの神経細胞から 1 細胞を単離し、微量サンプル測定用に自作した CE-MS を用いて約 300

の代謝物ピークを検出することに成功した (Nemes et al., 2011)。ただし、アメフラシの神経細胞は直径が約 1mm と大きく、比較的扱いやすい試料であったことは考慮しなければならない。

九州大学のグループは、シースレス CE-MS と分析キャピラリー内で試料を濃縮する方法を組み合わせて、HeLa 細胞の 1 細胞中から約 450 種類の代謝物ピークを得ることに成功している (Kawai et al., 2019)。

筆者らも、1 細胞分析を指向した新規システムの開発を行っている。現在、分析キャピラリー内へ単一細胞を直接採取する方法を開発しており、将来的にはこの技術と高感度シースレス CE-MS や高速 CE-MS を組み合わせることにより、1 細胞中に含まれる代謝物の高速分析が可能なシステムの構築を目指している。

## 6　その他のメタボローム解析手法の開発

イオン性化合物の分析には、CE 以外にもイオンクロマトグラフィー (IC) が用いられている。IC は、古くから海水や環境排水中に含まれる無機・有機イオンの定量に用いられており、イオン交換樹脂を充填したカラムを用いてサンプル中のイオン性成分を一旦カラムに保持させた後に、強酸もしくは強アルカリの溶離液の濃度を段階的に高くすることによって溶出させる。しかしながら、これまで IC がメタボローム解析に用いられることはほとんどなかった。その理由は、溶離液に用いている強酸、強アルカリの溶離液を質量分析計に導入してしまうと、内部の金属部品を汚染してしまうためであった。

一方、装置メーカーの技術開発等によって、溶離液中の高濃度の塩を効率的に除去可能なサプレッサーが開発され、これによって一気に IC と質量分析計を接続した IC-MS がメタボローム解析にも用いられるようになってきた。

筆者らは、特に高感度化を意識して、細い内径 (0.4mm) のカラムを用いるキャピラリー IC-MS をメタボローム解析に適用し、陰イオン性代謝物の一斉分析法を開発した (Hirayama et al., 2020)。本法は、高い検出感度 ($10^{-8}$ ～ $10^{-9}$ M) が特徴であり、またメタボローム解析の際に度々問題となる構造異性体の分離にも非常に適している。様々なサンプルについて、糖リン酸類を分析した結果を図 4 に示す。

このように、IC-MS はイオン性代謝物の測定に適した方法であるが、技術的な問題によって現状は陰イオン性代謝物にしか適用できない。今後は陽イオン性代謝物に関してもメソッド開発が必要である。

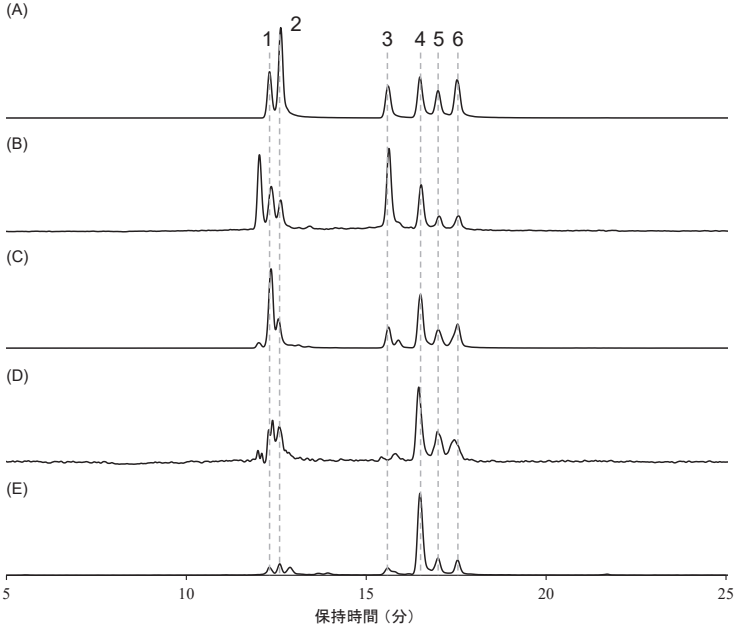


図４　キャピラリー IC-MS による糖リン酸の分離

（A）標準試料　（B）がん培養細胞　（C）肝臓組織　（D）ヒト血清　（E）糞便
1; ガラクトース１リン酸、2; マンノース１リン酸＋グルコース１リン酸、3; フルクトース１リン酸、4; フルクトース６リン酸、5; グルコース６リン酸、6; マンノース６リン酸

## 7　今後の展望

メタボロミクスの歴史はまだ浅く、技術的にも未だサンプル内の全代謝物の分析が可能になったわけではない。今後も様々なメタボローム解析法を開発し、できる限り多くの代謝物を検出しようとする努力が必要であろう。また、メタボローム解析では、得られたピークの２～３割しか同定することができないことも大きなネックである。この原因の一つは標準試薬の不足に起因す

るものであり、国家プロジェクトなどを立ち上げて標準化合物を整備する取り組みが必要であると考えている。

国内および世界のメタボロミクス分野において、これまで先端生命科学研究所の果たしてきた役割は非常に大きいものであったと確信している。これに満足することなく、引き続きこの分野の先駆的な研究所として世界をリードしていけるよう努力を続けていきたい。

## 参考文献

Hirayama, A. et al. (2009) “Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry”, *Cancer Research.* 69(11), pp. 4918-4925.

Hirayama, A. et al. (2012) “Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 404, pp. 3101-3109.

Hirayama, A. et al. (2018) “Development of a sheathless CE-ESI-MS interface”, *Electrophoresis.* 39, pp. 1382-1389.

Hirayama, A. et al. (2020) “The use of a double coaxial electrospray ionization sprayer improves the peak resolutions of anionic metabolites in capillary ion chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A.* 1619, 460914.

Kawai, T. et al. (2019) “Ultrasensitive single cell metabolomics by capillary electrophoresis-mass spectrometry with a thin-walled tapered emitter and large-volume dual sample preconcentration”, *Analytical Chemistry.* 91(16), pp. 10564-10572.

Nemes, P. et al. (2011) “Metabolic differentiation of neuronal phenotypes by single-cell capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry”, *Analytical Chemistry.* 83(17), pp. 6810-6817.

Soga, T. and Heiger, D. N. (2000) “Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry”, *Analytical Chemistry.* 72(6), pp. 1236-1241.

Soga, T. et al. (2002) “Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry”, *Analytical Chemistry.* 74(10), pp. 2233-2239.

Soga, T. et al. (2003) “Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry”, *Journal of Proteome Research.* 2(5), pp. 488-494.

Soga, T. et al. (2006) “Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption”, *Journal of Biological Chemistry.* 281(24), pp. 16768-16776.

Soga, T. et al. (2009) “Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry”, *Analytical Chemistry.* 81(15), pp. 6165-6174.

Tsuruoka, M. et al. (2013) “Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementiapatients”, *Electrophoresis.* 34(19), pp. 2865-2872.

〔受付日　2022. 7. 11〕