網羅的代謝物質解析技術（メタボロミクス）とその応用

大賀拓史*

Metabolomics; a comprehensive analysis of metabolic compounds

Takushi OOGA

大賀拓史

2003年

大阪大学理学部生物学科卒業

2008年

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻博士後期課程修了

同年

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社入社
同社のバイオマーカー・分子診断事業部、及び研究開発本部にてメタボロミクス技術開発とこれを利用した疾患診断マーカーの探索研究に従事し、現在に至る。専門：生化学・タンパク質工学。

1. はじめに

近年、生体内の代謝物質を網羅的に解析することでその挙動を把握し、その背景にある生化学的機序を理解しようとするメタボロミクスが様々な研究分野で普及しつつある。一方、多様な性質を持つ代謝物質の網羅的解析には、測定やデータ処理など高度な技術の蓄積が必要である。本稿では、現在一般的に用いられているメタボロミクスの技術と課題を紹介すると共に、その活用例として脂質異常症モデル動物の代謝プロファイリングを報告する。

2. メタボロームとは？

微生物、動物、植物など全ての生命は細胞内の化学反応により多種多様な物質を生成し、また細胞外と交換することでその機能を維持している。この代謝によって生じる産物の集団は、ゲノムに倣ってメ

タボローム、またこれらの解析はメタボロミクスと呼ばれる。なお、代謝という現象を広義に捉えた場合は、細胞が構築する蛋白質やDNA、その他のマクロ分子も代謝物質に含まれるものの、一般的なメタボロームとしては、分子量が1,000程度の有機化合物に限定されることが多い。

細胞が生み出すメタボロームの規模は生物種によって大きく異なり、ヒトをはじめとする動物では3,000種程度であるといわれている。しかし、実際の動物体内には、食事などの外部環境から摂取により生合成できない多数の代謝物質が存在している。ヒト体内の存在が報告された代謝物質が収録されたデータベース(HMDB, The Human Metabolome Database: <http://www.hmdb.ca/>)には、現在約4万種もの代謝物質が登録されている。この中には糖、アミノ酸、脂質、ビタミンなどの栄養素やシグナル分子のほか、代謝中間体や修飾分子など、一般的には知られない、あるいはその生化学的意義が不明な分子も多数含まれており、また分子構造が完全に特定されていない物質も多く残されている。これら未だ把握しきれない物質が含まれるため、「オミクス」としての完全性に疑問は残るものの、可能な限り多数の代謝物質の挙動を把握することで「代謝の全体像を理解する」という試みをメタボロミクスと称することが

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社
研究開発本部

*責任者連絡先：

〒997-0052 山形県鶴岡市覚岸寺水上246-2

TEL: 0235-25-1447, FAX: 0235-25-1450

E-mail: o-ga@humanmetabolome.com

表1 主要なメタボロミクスプラットフォームの比較

分析装置 [†]	CE-MS	GC-MS	LC-MS	FT-ICRMS	NMR 装置
標的代謝物質	イオン性物質	主に揮発性物質	主に中性物質	イオン性物質	(制限なし)
網羅性	◎	◎ (誘導体化)	△	×	○
誘導体化反応	不要	揮発性物質 以外は必要	不要	不要	不要
分離能	○ (構造異性体)	○	△	×	◎ (構造決定)
検出感度	○	○	◎	△	×

[†]表中略称は下記の分析装置を示す。

CE-MS：キャピラリー電気泳動—質量分析装置

GC-MS：ガスクロマトグラフィー—質量分析装置

LC-MS：液体クロマトグラフィー—質量分析装置

FT-ICRMS：フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置

NMR：核磁気共鳴

表中の記号(◎○△×)は各プラットフォームの一般的な優位性を示す

実際である。

ゲノムと比べた場合、メタボロームの特徴として①解析対象が物質であることから定量的な評価が可能である、②セントラルドグマの末端であることから生体の変化を反映しやすい、③生物種間を問わず共通であり、人体と環境のクロストークを介する、などが挙げられる。これらはとくに疾患研究や診断マーカー探索において大きな利点であり、従来の先天性代謝疾患スクリーニングに限らず多様な疾患においてマーカー探索とその機序解明が試みられている。近年では、癌や心血管疾患に腸内細菌が産生する代謝産物が関与することが報告されており^{1,2)}、遺伝子やタンパク質では迫ることのできない疾患の一面を明らかにしつつある。またメタボロミクスとゲノムワイド関連解析(GWAS)の統合研究も報告されており、ゲノムと代謝に関する新たな関係性の発見が期待されている³⁾。

3. 代謝物質の包括的解析技術

メタボロミクスは、①代謝物質を包括的に測定し、②得られた膨大な情報を処理する、という点で従来の代謝解析手法と異なるが、これに加えて、③測定試料の調製についても特に留意が必要である。

それぞれの点について、概要と現状における課題を述べたい。

・代謝物質の網羅的測定

メタボロミクスの測定には、主に質量分析(MS)と核磁気共鳴(NMR)が用いられており(表1)、これ以外のプラットフォームの活用は限られた専門施設で行われているのが現状である。

MSを用いた分析系では多くの場合、導入部に分離装置が接続されており、MSでさらに質量電荷比(m/z :イオン化された代謝物質の分子量に相当)で分離される。これにより、数百種類の代謝物質を一斉に分離し、各代謝物質の試料中濃度を検出強度として得ることができる。分離装置にはそれぞれ測定可能な物性があり(図1)、一つの装置で測定できる範囲が広がりつつあるものの、実際には解析対象に応じた選択、あるいは組み合わせが行われる。分離装置にはガスクロマトグラフィー(GC)や液体クロマトグラフィー(LC)が多用されているが、本邦ではキャピラリー電気泳動(CE)が盛んに利用されている⁴⁾。

CE-MSでは、緩衝液で満たされたガラス製キャピラリーの両端に電圧を印加することで、イオン化された代謝物質を電気泳動により分離する(図2)。また、この時キャピラリー内で生じる電気浸透流

図1 代謝物質の物性分類とMSプラットフォームの分析適正

図中表記は、代謝機能・経路(斜体文字)および代謝物質の分類を示す。各質量分析装置(CE-MS:キャピラリー電気泳動-質量分析装置, GC-MS:ガスクロマトグラフィー-質量分析装置, LC-MS:液体クロマトグラフィー-質量分析装置)を用いた場合の解析対象物質群を塗りつぶして、またこれら測定に必要とされる分析条件の例数を括弧書きで示す。

図2 CE-MSの測定原理

CE-MSによるカチオン(陽イオン)物質の測定原理と検出プロファイル。(上)電圧が印加されたキャピラリー内部では代謝物質イオンが電荷と分子サイズに依存した速度で陰極(右側)に移動し、MSで測定される。(下)プロット縦軸はMSでの検出 m/z , 横軸はCEでの泳動時間を示す。正電荷が大きくサイズが小さいイオンほど左下にプロットが得られる。各プロットの検出強度(またはこれを内部標準物質で標準化した数値)が測定値として得られる。

(EOF)により、イオンはサイズと電荷に依存する速度でMS装置に導出され、 m/z との2次元分離が行われる。CEではクロマトグラフィーよりも高い理論段数で分離することができ、糖リン酸など低分子の構造異性体をも分離することが可能である。原理上、CE-MSは他の分析系と比較して水溶性・イオン性物質の測定に優れており、細胞内のエネルギー代謝で中心的に働くリン酸化合物(核酸、糖リン酸、CoA誘導体)や低分子有機酸などの測定に適している。また、アミノ酸、神経伝達物質などのモノアミン、ポリアミンなど重要な生理機能を持つ物質の測定にも優位性を発揮し、多くの生物種が共有する一次代謝の大部分を網羅することが可能である。また、CE-MSでは注入試料量が非常に微量(数十ナノリットル)であることから、MSにおけるイオン化の飽和が起きにくく、幅広いダイナミクスレンジの定量が実現される。この特性は、試料種や試験条件により生体試料中の濃度が大きく変化する代謝物質の定量において大きなメリットとなる。

以上、CE-MSメタボロミックスの利点を列挙したが、一方でCE特有の課題も存在する。CEの原理上、一般的なメソッドでは脂溶性・非極性分子は分離することができないため、脂質や糖の測定には適さない。また、植物二次代謝産物や薬剤などの合成化合物にも解析対象に含まれないものが多いため、われわれはLC-MSを組み合わせることで補完している。なお、試料種や試験条件により変化するが、一般的に検出・同定される代謝物質数は、血液で200種、動物組織で300種程度である。

・データ解析

メタボロミックスにより得られる情報は膨大かつ複雑であるため、直ちに考察に用いることは困難である。他のオミクスと同様、あるいはそれ以上にデータ処理に関する技術とノウハウが必要である。

施設や装置間の差はあるものの、MSによる分析系では一度の測定で数千の検出ピークが得られる。しかし、多くの解析事例では、この中から各物質のモノアイソトピックイオンが解析対象であるため、大部分のピークはデータ処理の段階で除外されなくてはならない。この作業を全て手動で行った場合は多大な作業時間を費やすことになるため、大量のデータを扱う場合にはソフトウェアによる自動処理

が必要である⁵⁾。また、検出ピークに相当する代謝物質を同定するためには、各物質の化合物標品の測定結果を収載したデータベースや、分子構造の予測プログラムが求められる。メタボロミックスの実用化には、分析系だけではなくデータ処理のプラットフォームを確立することも重要であり、この点については、分析装置メーカーやインフォマティクス研究者による今後のソフトウェア開発に期待するところである。

データ処理により試料中濃度が明らかになった数百種類の代謝物質から、比較試料間の差を反映する、いわゆるバイオマーカーを抽出する。この過程はマーカー探索試験に限らず、代謝機序の考察を行う際にもまず行われることであり、他のオミクス解析と同様に有意差検定や多変量解析が用いられる。近年では、フリーの解析ツールによりこれらを容易に実施できる環境が用意されている⁶⁾。一方、メタボロミックスは複数の代謝物質を扱う多重検定であるため、有意差の評価には補正が求められるケースも増えている。とくにデータの分散が大きくなりやすい臨床試験では、各物質のデータ分散を考慮し、必要に応じて検体数を増やすことで、十分な検出力を確保するなどの試験設計が求められる。

有望なバイオマーカー候補が抽出された後、生化学的背景を理解し、さらに医療現場での実用化を目指すには、その物質が持つ代謝機能を明らかにする必要がある。近年では、代謝経路データベース(KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>)や先に述べたHMDBなど公的データベースから代謝物質や一般的な代謝に関する知見を得ることが可能である。一方、メタボロミックスの普及により発見された新たな代謝経路や代謝(または遺伝子や酵素も含めた)ネットワーク情報をいかに早く研究者間で共有するかという点は今後の課題として残されている。

・サンプル採取

代謝は試料を取り巻く環境変化の影響を容易に受け、また代謝物質自体がDNAやタンパク質と比較して不安定であるため、試料の調製と取扱いには留意が必要である。また臨床研究においては、個人差や日内変動といった要因が他のオミクス以上に影響することも留意が必要である。

MSによる分析系では、代謝物質を生体試料から

図3 脂質異常症モデルウサギのメタボロミクス

WHHL ウサギで観察された全身性の代謝異常と、投薬によるその変化。図中のグラフは左から、正常ウサギ(HC：緑)、病態 WHHL ウサギ(H：赤)、投薬 WHHL ウサギ(HL：青)の肝臓におけるリン脂質分解代謝中間体の濃度を示す。右ヒートマップは、脳、心筋、肝臓と血液における(左)病態—正常対照間および(右)病態—投薬間の比較を表し、病態群で高値または低値の物質行をそれぞれ赤色または青色で示す。

抽出する前処理作業が必要であり、多くの場合は有機溶媒や酸を用いた溶液処理が行われる。代謝物質の抽出効率はそれぞれ異なるため、最適な前処理法を一概に決めることが困難であり、解析対象に合わせて条件の選択しているのが現状である。実用性を考えた場合には、個々の代謝物質の抽出効率よりも操作の再現性が優先されるべきであり、とくに多施設試験では担当者間で事前にプロトコルを確認することが重要である。また、試料の保管においては個々の代謝物質の安定性に留意が必要である。高エネルギー結合を持つリン酸化合物、チオール基を有するシステイン誘導体、あるいは酸化還元補酵素などの比較的不安定な代謝物質に関しては、試料中濃度の絶対定量は困難であるものの、操作を均一化することで比較試料間の相対定量が可能である。

代謝物質の血中濃度は、ホルモンに代表されるように、年齢や性別によって異なる、周期的に増減する、または食事や睡眠などの行動による変化する、など物質種ごとに様々な交絡因子を持つ可能性が高い。実用的なマーカーとしてはこれらの影響を受けない、あるいは補正計算で無視できるものが求めら

れるが、研究段階では、被験者のマッチングを行うことで可能な限り交絡因子を除外することが望ましい。われわれがマーカー探索試験を行う場合は、まず20人程度の被験者による探索試験を行い、ここで得られたマーカー候補の性能を50～100人程度の検証試験で評価する。検証試験ではマーカー候補の交絡因子を特定すると同時に、他の物質の血中濃度と組み合わせることで、より性能の高い診断指標の確立を目指す。なお臨床組織試料を用いる場合も上記と同程度の規模で試験を設定するが、手術による試料採取から前処理(または一時的な凍結保存)までの操作で生じるばらつきが比較的大きいため、探索試験から検出力を算出して検体数を調整する。一方、試料の均一化が容易なモデル試験では検体数を少なくすることが可能であり、動物を用いる場合は5～7、培養細胞を用いる場合は3～4程度が最低限の n 数として求められる。

4. 脂質異常症モデルウサギの代謝解析

メタボロミクスによる代謝疾患の研究例として、

脂質異常症モデル動物を用いた研究を紹介する⁷⁾。

われわれは、Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL)ウサギの血液、肝臓、心筋、脳の各組織で代謝プロファイリングを行い、健常ウサギとの比較から脂質異常症に伴う一次代謝の変化を検証した。また、スタチンを投与した個体に生じる各組織の代謝変化を病態の代謝異常と比較することで、同時に投薬効果を検証した(図3)。

WHHL ウサギの病態を反映する各組織でのバイオマーカーを抽出した結果、とくに肝臓では、グルタチオンの枯渇や尿酸の蓄積など、酸化ストレスを示唆する代謝異常が観察された。このうちプリンヌクレオチドの最終異化産物である尿酸の蓄積は、合成酵素であるキサンチノキシダーゼ(XO)の発現誘導によるものであることが遺伝子発現解析により確認された。XOは反応副産物として活性酸素種(ROS)を生じることが知られており、酸化ストレスの一因となり得ることが提示された。肝臓ではこのほか、リン脂質(レシチン)分解経路におけるコリン誘導体の蓄積が観察されており、これは、酸化ストレスによる葉酸欠乏に起因するものと考えられた。これらコリン誘導体の蓄積は血漿でも観察されており、肝臓における酸化ストレスの血液診断マーカーとしての実用化が期待される。

一方、コレステロール合成阻害剤であるシンバスタチンを投与した WHHL ウサギでは、上記に挙げた肝臓中の代謝異常が短期間で緩和されており、コリン誘導体の蓄積は大部分が解除された。また、病態では血中脂質の増加と共に脂肪酸蓄積やアシルカルニチン枯渇も観察されたが、投薬後の血中TGやLDLの改善効果が十分ではない治療早期でもこれら血中濃度異常の緩和が確認された。以上の結果から、スタチンがコレステロール代謝に限らず広範囲の代謝活性に影響を及ぼし、またこの作用が血中脂質低下を介さない直接的なものであることが確認された。

5. 今後の期待

メタボロミクスは分析やデータ処理に一定の設備

が必要なため、これまで利用者は一部の施設や研究者に限られていたが、導入施設の増加により近年ではより多くの研究者が利用可能となった。また、メタボロミクスから得られたマーカーによる診断サービスの提供も行われつつあるため、個別化医療における有力な診断・予防ツールとして期待される。

著者の利益相反(COI)の開示：

ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社

文献

- 1) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N: Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* **499**: 97–101, 2013.
- 2) Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WH, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL: Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472**: 57–63, 2011.
- 3) Suhre K, Shin SY, Petersen AK, Mohny RP, Meredith D, Wägele B, Altmaier E, CARDIoGRAM, Deloukas P, Erdmann J, Grundberg E, Hammond CJ, de Angelis MH, Kastenmüller G, Köttgen A, Kronenberg F, Mangino M, Meisinger C, Meitinger T, Mewes HW, Milburn MV, Prehn C, Raffler J, Ried JS, Römisch-Margl W, Samani NJ, Small KS, Wichmann HE, Zhai G, Illig T, Spector TD, Adamski J, Soranzo N, Gieger C: Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature* **477**: 54–60, 2011.
- 4) Soga T, Ueno Y, Naraoka H, Matsuda K, Tomita M, Nishioka T: Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. *Anal Chem* **74**: 6224–6229, 2002.
- 5) Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M: Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* **281**: 16768–16776, 2006.
- 6) Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS: MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res* **40** (Web Server issue): W127–W133, 2012.
- 7) Ooga T, Sato H, Nagashima A, Sasaki K, Tomita M, Soga T, Ohashi Y: Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia. *Mol Biosyst* **7**: 1217–1223, 2011.