特集：イメージング

 ^{13}C 標識化合物を用いた, *in vivo* 代謝経路
トレースとそのイメージング法Visualization of Metabolic-Fluxes of Glucose by
Imaging Mass Spectrometry

杉浦悠毅

Yuki SUGIURA

慶應義塾大学医化学教室/JST さきがけ

背景

培養細胞 (*in vitro*) のみならず, 個体動物の臓器 (*in vivo*) からダイレクトに代謝情報を得ることは重要である. 実際 *in vitro* では一様な代謝を示す疾患モデル細胞であっても, *in vivo* においては臓器実質細胞と代謝ネットワークを巡らせ, 微小環境に応じた異なる代謝特性を示すサブポピュレーションを形成する. 例えば固形がんにおいては, 増殖の盛んながん細胞は隣接する間質細胞, さらに外側に位置する正常宿主細胞と血管新生を伴う代謝カップリングをすることで, 増殖能に見合うエネルギーを得ると考えられる. したがって, *in vivo* での疾患代謝の (不均一な) 特性を解明しなければ, その正確な理解と制御を行うことは難しい. しかし現状, 動物の“摘出臓器”における代謝物測定には, 以下三つの重大な技術課題がある.

①動物臓器を調製する間に劇的に進行する死後分解

培養細胞と異なり個体動物では, 麻酔や心停止がもたらす虚血によって, 生前の代謝が急速かつ劇的に改変される. この死後の代謝改変は, 本来疾患に由来する代謝異常の情報を埋没させてしまうほどに劇的である. 私たちは, ごく最近開発した代謝酵素の focused microwave 照射法 (FMW 法) を『死後分解を抑制するサンプル調製法』として確立した¹⁾.

②臓器の“どの細胞種”の代謝 (異常) なのか? :

責任細胞の同定技術

例えば固形がんにおいて, 腫瘍は単一タイプのがん細胞で形成されているわけではない. 創薬ターゲットとしては, 増殖や浸潤能の高いがん細胞に特異的な代謝メカニズムを知ることが重要である. しかし, 臓器をすりつぶして扱うメタボローム解析では判別が困難である. 私たちは空間的に解像されたメタボロームのデータをもたらす『イメージング質量分析』の導入により, 臓器中の細胞種に固有の代謝を明らかにできるようになった¹⁾.

③どの代謝“経路”(異常) なのか? : 安定同位体標識を活用した『*in vivo* 代謝経路トレース解析』

代謝経路はネットワークを形成しているため, 特定分子の増減のみでは, 代謝経路のどこに異常があるかを理解できない場合がある. このため, 特定経路の代謝亢進/減弱を浮き彫りにするには, 『安定同位体で標識した化合物をトレーサーとして活用した代謝“経路”解析』が必要である. 私たちはマウスに投与した $^{13}\text{C}_6$ 標識グルコースが, 動物臓器の細胞種ごとに異なる経路で代謝される様をイメージングすることに成功している¹⁾.

また, 生体の代謝フラックスは①死後分解の抑制なしには大きく改変されてしまうため, ①~③は相互にリンクしたメソッドパッケージとして機能する (図1).

上記メソッドパッケージの必要性

~それぞれの事例を踏まえて~

死後分解を抑制した動物臓器のメタボロミクス数量調製法の必要性

生体臓器の中心代謝回転は非常に高速であり, 実験動物

図1. 三つの要素技術からなる, 代謝フラックス-イメージング法の概要.

の心停止後（または臓器切除後）には血流停止に伴う酵素的代謝変化が秒オーダーで進行する。実際、脳において、熟練した技術をもって心停止後の摘出から凍結までに最低30秒を要するが、この間にATPのような高エネルギー代謝産物は生理的濃度と比べ、実に10分の1にまで激減する（図2）。このような動物死後の虚血は、生理的な代謝情報を示さないばかりか、疾患サンプルの解析においても代謝異常の情報を埋没させてしまった。この点に問題を感じた私たちは、FMW法導入により、ほぼ完全な死後分

解の停止を実現した。FMW法では標的臓器へフォーカスしたマイクロウェーブを1秒以下照射する[※]。これにより臓器酵素の瞬間的な熱失活が達成され、質量分析に供するまでの試料調製中において、ほぼ一切の死後分解の影響が排除されることを示した¹⁾。

さらにどのような代謝産物群が死後分解の影響を受けやすい、または受けにくいかをキャピラリー電気泳動（CE）-MSメタボロームにより網羅的に解析も行っている¹⁾。注目すべきことに、FMW法でのみ有意に死後分解が抑制される

図2. 異なる試料調製法で摘出したマウス脳において、ATP, ADP, AMPの濃度をCE-MSにより測定、比較した。Focused microwave (FMW) 法以外の方法では、ATP, ADPの分解が顕著に見られ、これは動物の死後30秒以内のごく短時間に起きる死後変動であることがわかった。Energy chargeと呼ばれるATP, ADP, AMPの濃度から算出される指標値は、これらがFMW処理群のみ生理的濃度に維持されていることを示した。（文献1より一部改変。）

マウス脳と肝臓から得られたアミノ酸組成

マウス脳におけるグルタミン酸の分布

図3. 脳における特徴的なグルタミン酸組成比と、その組織分布。（上）マウス脳と肝臓から得られたアミノ酸組成。それぞれの臓器を用いてCE-MSにより得られた、20種のアミノ酸組成比を示した。（下）さらに、イメージングMSで取得したグルタミン酸の局在は、代表的なグルタミン酸受容体の発現パターンと相似した分布を示した。（文献2より一部改変。）

※ 標準的には0.94秒の照射であり、実験動物が苦痛を感じる間もない短時間である。

マウス脳の $^{13}\text{C}_6$ グルコースの代謝運命

図4. マウス脳における、グルコースを原料としたグルタミン酸産生の解析. (上) ^{13}C 標識グルコースを用いた、グルコース代謝フラックス解析の例. $^{13}\text{C}_6$ -グルコースをマウスに腹腔内投与し、15分後に FMW 法を用いて脳を摘出する. グルコースから代謝生成された化合物は ^{13}C を含有し、内因性化合物よりも“重く”検出される. これを利用して、グルコースが脳内でどのような経路を経て代謝されたかを知ることができる. (下) $^{13}\text{C}_6$ 標識グルコースを用いた、グルコース代謝フラックスイメージング. 非標識グルコース投与群 (control) と標識グルコース投与群において、内因性のグルタミン酸と、これよりも 2Da “重い” $^{13}\text{C}_2$ グルタミン酸をイメージングした. マウス大脳皮質において、グルコースをグルタミン酸に変換する代謝フラックスが顕著に用いられていることがわかる. (文献1より一部改変.)

代謝物リスト中には、解糖系, TCA サイクル, ペントースリン酸経路上の代謝中間体が含まれており, FMW 法なくしては, 脳における中心代謝経路の精確な解析は困難であると考えられた.

代謝産物の局在イメージングの必要性

FMW 法確立の後, 私たちは死後分解を排した脳のメタボローム解析を進めた. 得られた結果の一部として, 図3ではマウス脳内アミノ酸の割合比を示した. 一見してわかるとおり, 脳内アミノ酸構成比は大きな偏りがあり, グルタミン酸 (Glu), グルタミン (Gln), アスパラギン酸 (Asp) の上位3種が大多数を占める. 興味深いことに, 肝臓ではこのような偏りはなく, 比較的バラエティに富んだアミノ酸組成を示した.

それでは, このように大量に Glu がマウス脳に存在することの意義は何なのであろうか. 単にタンパク質合成の原

料としてのアミノ酸プールなのであろうか. あるいは神経伝達物質として, ニューロンに貯蔵されているのであろうか. このような問いに対して, 組織をすり潰した試料からの定量情報からのみでは, 代謝産物と臓器機能とのかかわりを推察するのは難しい.

このような特定分子の生理機能を知るためには, イメージング法により得られる局在情報が有用である. 例えば, 機能未知のタンパク質の解析には, 光学顕微鏡で得られる細胞内や組織における局在情報が活用される. 同様に代謝物解析に『イメージング質量分析』を導入することで, 臓器中の位置情報と分子機能を関連づけて推察することが可能になる. 特に脳では, 特定の脳部位が固有の機能をもつために, 局在情報から代謝物の生理機能を類推することができる.

実際に, イメージングの結果, グルタミン酸は脳内にお

いて、特に海馬、大脳皮質、小脳皮質に局在が見られた。これらの脳領域では、グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質として作用し、記憶・学習などの脳高次機能に重要な役割を果たしている。さらに、これらの領域に偏在するグルタミン酸作動性ニューロンが発現するグルタミン酸受容体の発現パターンともおおむね一致することがわかる。これらの知見から、脳のグルタミン酸作動性ニューロンは、大量のグルタミン酸を神経伝達物質の（おそらくは）ストックとして保持していることが示唆される。

***in vivo*代謝経路イメージングの必要性**

それでは脳はこのような大量のグルタミン酸を、なぜ、またどのように取得／維持しているのだろうか。このような代謝制御機構を解明するには、先に示した内因性の代謝産物の多寡情報のみでなく、「外因性の安定同位体で標識した化合物」をトレーサーとして用いた臓器の代謝経路トレース解析が有用である。

代謝物は一つの分子にとどまることなく、間断なく他の分子へと変遷する。代謝分子が経路上を間断なく動き回る以上、動物臓器で特定“経路”の代謝亢進／減弱を浮き彫りにするには、安定同位体で標識した化合物をトレーサーとして活用した解析が必須である。具体的には、 ^{13}C で標識した化合物から代謝生成された化合物は、 ^{13}C を含むため、質量分析では内因性化合物と区別して定量／イメージングすることができる。この原理により、安定同位体標識したグルコースを投与した場合、グルコース代謝経路のフラックスの多寡を確定的に調べることができる。例えば ^{13}C 標識グルコースを投与し、 ^{13}C 含有乳酸を定量／イメージングすれば『解糖系がどの程度亢進したか？』『組織のどの細胞種において亢進したのか？』といった問いに確定的な解を与える。

実際に、 ^{13}C 標識グルコースを投与したマウス脳が、グ

ルコースをどのような経路を経て、どのような分子に代謝したのかを定量的に解析した（図4）。非常に興味深いことに、脳は取り込んだグルコースの多くをTCAサイクルへと流入させ、グルコースを原料にグルタミン酸を中心としたアミノ酸を新規にかつ大量に産生している。この経路の代謝は非常に活発で、実際、脳の総グルタミン酸プールの1/4程度が僅か15分間の間にグルコースから新規に産生された画分に置き換わっていた¹⁾。したがって先に示した脳の大量のグルタミン酸プールはグルコースを原料に賄われ産生されていることがわかる。

さらに、安定同位体 ^{13}C で標識されたグルタミン酸の局在をイメージングすることで、脳のどの部位で『グルコース→グルタミン酸』代謝経路が活発であるかを視覚化することが可能である。ここでも、脳部位の決定により脳のグルコース→グルタミン代謝がどのような生理的機能をもつかを類推できる。その結果、やはりこの代謝経路は特に大脳皮質において顕著に用いられていることが示された（図4下）。すなわち、大脳皮質の神経細胞が伝達物質として用いるグルタミン酸は、実は非常に早いターンオーバーで動的に新規合成され続けている。

このように安定同位体標識を用いた、特定化合物を起点とした代謝経路フラックスの解析は、疾患細胞種の代謝特性を浮き彫りにすることができる。すなわち、増減のある代謝物がどの経路亢進／減弱の帰結であるのかを、同位体標識により確定的な解釈を行うことができる。

文 献

- 1) Y. Sugiura, K. Honda, M. Kajimura, and M. Suematsu, *Proteomics* (2014). <http://www.mssj.jp/publications/pdf/jmssj/rule.pdf>
- 2) 末松 誠, 杉浦悠毅 (編), 実験医学増刊, Vol. 32, No. 15, (2014).