

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2009

課題番号：18016028

研究課題名（和文）メタボローム解析のための計測技術開発とそれを用いた代謝経路推定

研究課題名（英文）Development of Metabolomics Technology and Its Application to the Prediction of Novel Metabolic Pathways

研究代表者

富田 勝 (TOMITA MASARU)

慶應義塾大学・環境情報学部・教授

研究者番号：60227626

研究分野：システム生物学

科研費の分科・細目：生物学・細胞生物学

キーワード：メタボローム解析、バイオインフォマティクス、ケモインフォマティクス、MassBank、pH 制御合成法、プロテオーム解析、emPAI 法、代謝流束解析

### 1. 研究計画の概要

生体内に含まれる代謝物質の包括的な理解を追究するメタボロミクスにおいては、他のオミクス研究と同様に網羅的解析に関する基盤技術の開発が必須であると同時に、代謝反応ネットワークの解明が重要である。従って本研究課題の目的は、メタボローム解析による代謝物質の一斉測定技術の開発・改良および代謝ネットワークの構築の二点である。そこで、未知代謝物質を同定しそれらの代謝経路を推定するために必要な測定技術の開発と、バイオインフォマティクスとケモインフォマティクスを融合した新しい物質同定法の開発が必須である。さらに、トランスクリプトームやプロテオーム解析技術をも統合し、細胞によるエネルギー生成、様々な細胞ストレスに対する応答反応や堅牢性の維持、外来性物質の無毒化などに関する新規の細胞代謝経路の解明を試み、微生物や動植物細胞におけるより完全な代謝ネットワークの構築を目指している。

### 2. 研究の進捗状況

(1) 未知物質同定手法の開発およびデータベースの構築  
未知物質の同定に有益な情報となる MS スペクトルデータベースの構築に向け、ESI-QqTOF-MS/MS などを用い 700 種に上る基礎代謝物質の MS/MS スペクトルデータを取得し、我々が主導して開発を行っている高分解能 MS スペクトルデータベースである MassBank (<http://www.massbank.jp>) に登録した。また、これまでに蓄積したメタボロ

ームデータより大腸菌由来成分約 100 種およびヒト血漿由来成分約 150 種の同定を行いデータベースに登録した。今後は、他の微生物に加え酵母・線虫・藻・イネ、さらにマウスやヒトの尿・唾液・涙・各組織などのメタボロームデータも順次加えていく。さらに、昨年度新たに「pH 制御合成法」を開発し、化学合成による標準物質の効率的な合成を可能にし、これまでに N-アセチルオクトパミン、N-アセチルドーパミン、N-アセチルチラミンなどの効率的合成に成功した。

(2) メタボローム解析の高感度化およびデータ処理の自動化

特に二次代謝物質の多くは生体サンプル中の濃度が極めて低いものが多く、これらの測定には CE-MS/MS 法のさらなる高感度化が必須であるが、20 年度は ABI 社 MS 用イオン源および Agilent 社の QqTOF 装置についての分析条件の改良を重ね、1  $\mu\text{M}$  レベルでの CE-MS/MS 測定を実現させた。また、CE-MS や LC-MS 測定により得られたデータから高精度なアラインメントおよびマススペクトルの自動解析を行い、測定データから既知物質の同位体やフラグメントイオンを同定しアノテーションを行うソフトウェアの精度を飛躍的に向上させ、メタボローム解析のスループットを大幅に向上させた。

(3) 代謝経路推定のためのフラックス解析およびプロテオーム解析

これまで主に大腸菌の連続培養における代謝流束推定法を確立してきたが、20 年度はさらに応用範囲の広い回分培養において、同位

体標識パターンの経時変化から代謝流束を推定する手法を開発した。また、プロテオーム解析において、既存の手法に比べより広い濃度オーダーで各タンパク質の正確な定量値を求めることが可能なemPAI法を確立し、さらにこの手法の理論的な根拠を確認した。(4)がん細胞における新規代謝経路の発見  
膵臓癌など乏血性のがん種では細胞が慢性的な虚血状態に曝され酸素やグルコースの供給が不十分となるが、そのような栄養欠乏状態でのがん細胞のエネルギー代謝はよく知られていなかった。そこで、膵臓がんの培養細胞を用い細胞および培養液サンプルのメタボローム解析を行い、さらに<sup>13</sup>Cの分布情報に基づいた代謝流束解析を行ったところ、がん細胞が、これまで嫌気性微生物や一部の寄生虫においてしか確認されていなかった「フマル酸呼吸」に依存したエネルギー代謝を行っている可能性が示唆された。さらに、駆虫薬として臨床的に使われているパモ酸ピルビニウムがフマル酸呼吸の阻害剤であることを突き止め、この薬剤の毒性作用機序をメタボロミクスの観点から解明した。結果として、本研究グループが開発してきたメタボローム解析技術が、新規代謝経路の推定に応用可能であることを実証した。

### 3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。メタボローム解析技術は近年世界中に普及しつつあり、測定技術の向上および応用研究が盛んに行われているが、CE-TOFMSを中心としたメタボローム解析技術において、大量データの高速な自動処理を実現するアノテーションソフトウェアの開発や、700種に上る代謝物質の標準化合物について測定したMS/MSスペクトルのデータベース構築、CE-TOFMSによるメタボロームデータを用いた大腸菌やがん細胞の代謝流束解析などは全て世界に先駆けた成果である。これらの基盤技術をフル活用し、がん細胞の新規エネルギー代謝を解明したことで、本研究グループのメタボローム解析における基盤技術の高さとその応用力が既に実証された。

### 4. 今後の研究の推進方策

未知物質の同定に関しては、ハードの改良(機器の組み合わせや測定条件の改良)およびソフトの改良(アノテーションソフトウェアや未知物質推定アルゴリズムの強化)の両面からさらに研究開発を進める。また、MS/MSスペクトルデータベースを充実させ、標準物質の効率的な化学合成を引き続き行い、未知物質の同定精度を向上させる。さらに、21年度のがんの代謝研究への応用で実証したような新規代謝経路の推定を引き続き行い、トランスクリプトームやプロテオーム解析と

の統合化を促進し、代謝ネットワークの構築およびスタンダードな細胞モデリング技術の開発に向けて、産業的・医学的にも有用な応用研究へ結び付ける狙いである。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計18件)

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., *The Journal of biological chemistry*, 査読有, 281(24), 2006, 16768-16776

Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T, Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M, Multiple High-Throughput Analyses Monitor the Response of E.coli to Perturbations., *Science*, 査読有, 10.1126/science.1132067, 2007, DOI:10.1126/science.1132067

Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, Tomita M and Soga T, "Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS", *Mol. BioSist*, 査読有, 4, 2008, 135-147

Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y., "Aligning LC Peaks by Converting Gradient Retention Times to Retention Index of Peptides in Proteomic Experiments", *Bioinformatics*, 査読有, 24, 2008, 1590-1595

[学会発表](計29件)

木下綾子, 塚田孝祐, 曾我朋義, 菱木貴子, 西野泰子, 冨田勝, 末松誠, "低酸素に应答したヒト赤血球代謝における解糖系活性化の役割と機構の解析: コンピュータシミュレーションによる予測とメタボロームによる実証", 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 査読有, 2007年12月11日, パシフィコ横浜

[図書](計2件)