

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18216

研究課題名（和文）質量分析インフォマティクスの開拓による生薬作用分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidating the molecular mechanism of herbal medicine by the advances in computational mass spectrometry

研究代表者

津川 裕司（Tsugawa, Hiroshi）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：30647235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：質量分析インフォマティクスの技術開発を通じて統合オミクス環境を構築し、生薬甘草の薬理作用に関する分子メカニズムの解明を目指し研究を行った。具体的には、マクロファージ由来のRAW264.7細胞とリポ多糖（LPS）を用いた急性炎症モデルを用い、isoliquiritigenin（ILG）もしくは甘草抽出エキス（GU）そのものを添加した場合の抗炎症効果を評価し、その作用機序をオミクス解析で評価した。その中で、新しい親水性メタボローム解析の情報計測手法を考案し、その成果は現在投稿中である。また取得したオミクスデータの統合を行いILG特異的に変動する代謝経路およびGU特異的に変動する代謝経路を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、質量分析オミクスのデータ科学を活用し、生薬・漢方薬の効果が分子レベルでどのように発揮されるかを解明することを目指した。これにより、西洋医学と東洋医学の融合を推進する基礎的データが得られ、植物資源の価値を高めるとともに、漢方薬の品質評価や予防医学への応用が可能となる。さらに、新規生体分子の同定や生理活性の評価を通じて、創薬の新たなシーズを探るという革新的なアプローチも展開できる可能性がある。この研究は国際的な「持続可能な開発目標」（SDGs）への貢献を目指すとともに、将来的にはすべての薬用植物に適用可能な研究成果を提供し、薬学・医学研究の進展を支える基盤となり得る。

研究成果の概要（英文）：Through the technological development of mass spectrometry informatics, we aimed to establish an integrated omics environment and conducted research to elucidate the molecular mechanisms underlying the pharmacological effects of the herbal medicine licorice. Specifically, we used an acute inflammation model with macrophage-derived RAW264.7 cells and lipopolysaccharide (LPS) and evaluated the anti-inflammatory effects of adding either isoliquiritigenin (ILG) or a licorice extract (GU). In the process, we developed a new method for measuring hydrophilic metabolome and the results are currently being submitted for publication. In addition, we integrated the acquired omics data to discover pathways that vary specifically with ILG and those that vary specifically with GU.

研究分野：システムバイオロジー

キーワード：オミクス 質量分析 情報科学 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

質量分析はメタボローム・プロテオームだけでなく DNA 修飾・エピゲノム・RNA 修飾・糖鎖解析を含む全てのオミクス階層研究において必須の計測装置であるため、そのデータ科学を制することがオミクス研究ひいてはシステムバイオロジー研究を制すると言っても過言ではない。そこで代表者はこれまで、質量分析のデータ解析に着目した先駆的な研究を推進し、特にメタボローム解析に資する研究を行ってきた。しかし、生命活動の中核を成す「代謝」は多階層オミクスを構成する生体分子の協奏的な連動により構成される複雑系システムであり、自身の研究領域の更なる拡張無くして真の代謝システム研究は成し得ないという考えに至った。そこで本研究では、各オミクス科学の垣根を「質量分析インフォマティクス」という概念で総合的に捉え、各階層の解析スループットおよびアノテーション率を革新的に向上させ、代謝統合解析(トランスオミクス)を合理的かつ効率的に推進し、複雑な生命システムの解明に迫る研究を開拓するという着想に至った。また代表者は、植物科学を推進する理化学研究所(理研)CSRSと免疫疾患研究を推進する理研IMSの両方に在籍してきた経験から、以前より、これまで培ってきた知識・経験を元に植物・免疫疾患の融合研究を推進したいと考えていた。そこで、これまでのデータ科学では解決困難だった課題である「生薬がなぜ効くのか?」という学問的問いに、挑戦するという着想に至り、研究に取り組むこととした。

2. 研究の目的

生命を司る生体分子を網羅的に捉え、複雑な生命代謝システムの解明を目指すオミクス研究を今以上に躍進させるためには、新たな生体分子情報を合理的かつ効率的に抽出し、データの再利用価値を高め、真にデータ駆動型研究が推進可能な情報科学基盤の創出が必須である。しかしながら次世代シーケンサー(NGS)を用いたゲノム研究に比べ、質量分析を用いたオミクス研究(メタボロームやプロテオームなど)の情報科学は、上記目標に対して圧倒的に遅れているのが現状である。その主な理由として(1)対象分子が多様であるためデータの複雑度が極めて高く、各オミクス階層から得られるデータの特徴を十分に考慮した情報科学基盤が確立されていない、そして(2)質量データを化学構造情報へと変換するための体系化された方法論が無くアノテーション(データの注釈付け)が不完全であり、計測データの20-60%からしか生体分子情報を抽出できていないことが挙げられる。

そこで本研究では、各階層のオミクス科学を「質量分析インフォマティクス」という概念で総合的に捉え、代謝統合オミクスのスループット及びアノテーション率の革新的向上を行い、生命代謝システムの深層理解を目指す挑戦的開拓研究を遂行する。また本研究の出口として、「生薬がなぜ効くのか?」という学問的問いを設定し、100万種を超えると言われる植物界メタボローム多様性の解明、および植物代謝物とプロテオームのインタラクション及び作用点の同定に資するデータ科学研究を推進する。本課題は、質量分析インフォマティクス研究の開拓により初めて実現可能な生薬学の開拓研究でもあり、生薬・漢方薬の科学的根拠を分子レベルで解明し、植物とヒトとの関わりを紐解く代謝オミクス科学を本研究にて推進する。

3. 研究の方法

本研究では、生薬の中でも甘草に着目し、研究を行った。甘草は漢方製剤の約70%に配合されている生薬であり、様々な薬理活性に関わる植物特化代謝物を持つ。広く利用される品種である *Glycyrrhiza uralensis* は、主要成分であるグリチルリチンやリクイリチンを含む、数百種もの植物代謝物成分を合成することが知られている。しかしながら、甘草抽出液を液体クロマトグラフ

イータンデム型質量分析 (LC-MS/MS) で計測すると 1 万以上のピークが検出されており、その 84% は未同定成分となる。このような未同定成分の構造を推定し、甘草の種および部位特異的に含まれる植物特化代謝物の多様性を捉えることは、甘草の品質や薬理作用の分子メカニズムを考える上で重要な課題である。そこで本研究では、安定同位体二酸化炭素標識と MS/MS 類似度によるネットワーク解析を用いて、甘草に含まれる天然物の構造解析と種または部位特異的代謝物の構造識別に取り組んだ。本研究では、*G. uralensis* および *G. glabra* の同位体標識および非標識サンプルの根と葉由来代謝物抽出液を LC-MS/MS に供した。データ解析には我々が開発する MS-DIAL を用いて行った。スペクトルライブラリーによるアノテーションができなかったピークについて、標識・非標識サンプル間の m/z シフトから炭素数を決定した。その後、クラスターイオンやインソースフラグメントイオン等の冗長イオンを削除する等のデータクリンナップを行った。最終的に得られた代謝物ピークリストとリファレンススペクトルデータベースに基づき MS/MS ネットワーク解析を行った。これにより種・部位間での代謝物量の差異の検出、及び未知ピークに対する構造推定を行った。

甘草成分の多様性を明らかにする研究と並行して、甘草の薬理作用の科学的根拠を分子レベルで解明するために統合オミクス解析を行った。本研究では、抗炎症活性が知られている甘草由来天然物である isoliquiritigenin (ILG) と甘草抽出エキス (GU) をマクロファージ由来細胞である RAW264.7 に添加し、化合物添加の有無におけるリポ多糖 (LPS) 誘導性炎症過程を評価した。LPS 処理 24 時間の時点で ILG 添加群と GU 添加群の両方において IL-6 の有意な低下が確認できたことから、LPS 処理から 24 時間後までの時系列親水性メタボローム、リピドーム、リン酸化プロテオームデータを取得し、解析を行った。また、マルチオミクスデータをノンバイアスに統合可能な解析手法である PLS-ROG を用い、化合物添加の有無および LPS の有無における特異的な代謝変化を探索した。

4. 研究成果

甘草代謝物多様性の解析結果

炭素数と MS/MS 情報に基づき、検出イオンの 27~40% に対してアノテーション情報を付与した。比較解析では、フラボノイド骨格特異的に得られるフラグメントイオンに基づき基本骨格推定を行い、葉と根特異的に検出されるフラボノイド骨格を推定した。根にはフラバノン骨格含有フラボノイド、そして葉にはフラボン及びフラボノール骨格由来フラボノイドが多く含まれることを見出したが、これらは過去の遺伝子発現の知見と一致する結果となった。また、根特異的に検出された類似 MS/MS を持つ未知の類縁体群の詳細な解析により、新規の窒素含有化合物を発見することができた (図 1)。現在、質量分析だけでなく、NMR を用いた構造決定の準備を進めており、詳細な構造が記述できた時点で論文化を行う予定である。

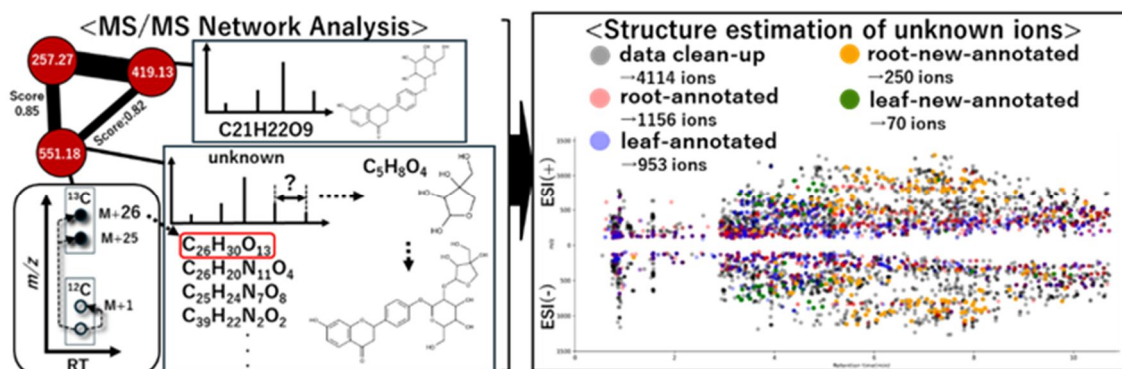


図 1. 同位体標識と MS/MS ネットワークによる構造解析の概略

RAW 264.7 細胞を用いた甘草成分添加時の代謝動態の可視化

本研究では、キャピラリー電気泳動タンデム型質量分析装置 (CE-MS/MS) を用いて親水性メタボローム解析を行った。その際、従来よりも簡便かつ網羅的に代謝物プロファイリング可能な情報計測基盤の構築を行った。この成果は現在、学術誌に投稿中であり、bioRxiv にプレプリントを公開している (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.01.17.576157v1.abstract>)。これにより、従来の標準品情報のみを利用して行われる代謝プロファイリングよりも信頼性の高いアノテーションが可能となり、マクロファージから合計で 170 代謝物種のプロファイリングに成功した。また、上述した MS/MS ネットワークと *in silico* 構造解析ツールを利用することで、世界最大のスペクトルデータベースである NIST にも含まれていない化合物である glycineamide ribonucleotide のアノテーションに成功した。また本分子の発現量は、LPS 炎症において有意に上昇することがわかった (図 2)。

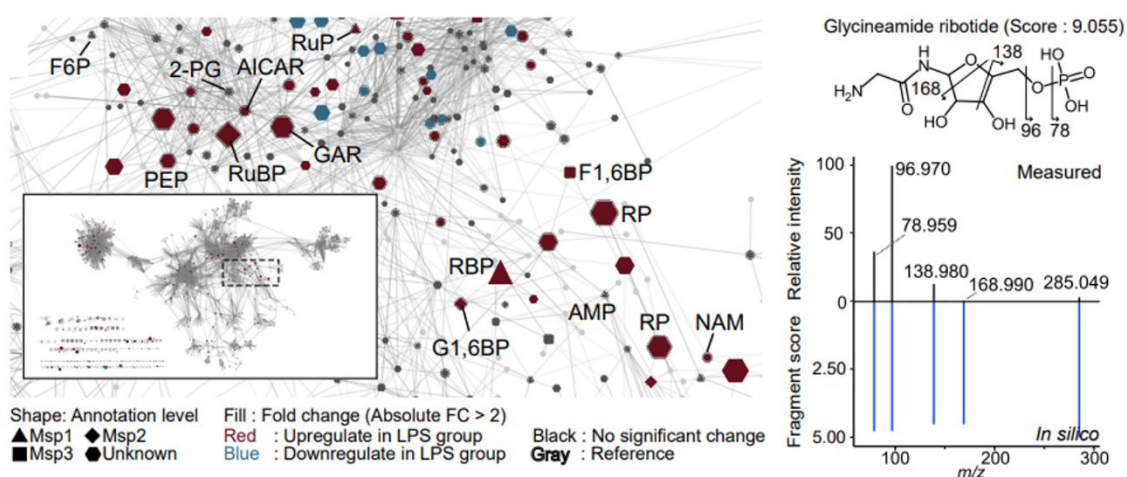


図 2 . CE-MS/MS データの MS/MS ネットワークと構造解析ツールの適用により、スペクトルライブラリーに含まれていない代謝物アノテーションを行った例 . 左は CE-MS/MS で得た代謝物の発現情報とスペクトル情報に基づき分子ネットワークを行った例を示している。赤は、LPS で発現が上昇したものを示している。中でも、LPS 炎症群において核酸代謝物の顕著な上昇がみられている。右図に示す LPS 群で発現量の有意な上昇が観察された glycineamide ribotide は、核酸代謝中間体であることから、本研究で開発した手法により生命現象の深層理解が促進されると考えられる。

リン酸化プロテオーム、親水性メタボローム、脂質メタボロームの統合解析

炎症惹起 24 時間後の LPS 群において、メタボローム解析の結果では、好氣的解糖の亢進、クエン酸サイクル障害、アルギニン代謝(一酸化窒素産生)の亢進、脂肪酸や中性脂質の蓄積など、先行研究と同様の結果が得られた。その一方で面白いことに、甘草由来天然物添加群においてこれら代謝変化は減弱され、特に ILG 添加群においてはシトルリンの顕著な減少が見られ、一酸化窒素の産生抑制を示唆する結果を得た。またリン酸化プロテオームの結果からは、LPS 刺激 15 分後において、解糖系の律速酵素である 6-phosphofructokinase のリン酸化レベルが GU および ILG 添加群で有意に低下しており、甘草天然物が解糖系亢進を抑制する分子機構が一部明らかとなった。さらに、PLS-ROG によるマルチオミクスデータの多変量解析により、細胞内の酸化還元反応を制御するニコチンアミド代謝が ILG 添加特異的に活性化していることを見出した。現在これに加え、GU 添加特異的に変化する代謝経路に着目し、「単剤ではなく生薬成分そのものを摂取する科学的意義」について調査を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tsugawa Hiroshi, Ishihara Tomoaki, Ogasa Kota, Iwanami Seigo, Hori Aya, Takahashi Mikiko, Yamada Yutaka, Satoh-Takayama Naoko, Ohno Hiroshi, Minoda Aki, Arita Makoto	4. 巻 0
2. 論文標題 A lipidome landscape of aging in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-024-00610-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Oka Takaki, Matsuzawa Yuki, Tsuneyoshi Momoka, Nakamura Yoshitaka, Aoshima Ken, Tsugawa Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Multiomics analysis to explore blood metabolite biomarkers in an Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative cohort	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-56837-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tokiyoshi Kanako, Matsuzawa Yuki, Takahashi Mikiko, Takeda Hiroaki, Hasegawa Mayu, Miyamoto Junki, Tsugawa Hiroshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Using Data-Dependent and -Independent Hybrid Acquisitions for Fast Liquid Chromatography-Based Untargeted Lipidomics	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 991 ~ 996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c04400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Hiroaki, Matsuzawa Yuki et al.	4. 巻 0
2. 論文標題 MS-DIAL 5 multimodal mass spectrometry data mining unveils lipidome complexities	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.02.07.579267	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiuchi Saki, Otoguro Yasuhiro, Nitta Tomoaki, Chung Mi Hwa, Nakaya Taiki, Matsuzawa Yuki, Oobuchi Katsuya, Sasaki Kazunori, Yamamoto Hiroyuki, Tsugawa Hiroshi	4. 巻 0
2. 論文標題 Using variable data independent acquisition for capillary electrophoresis-based untargeted metabolomics	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.01.17.576157	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ni Zhixu et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Guiding the choice of informatics software and tools for lipidomics research applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 193 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-022-01710-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uchino Haruki, Tsugawa Hiroshi, Takahashi Hidenori, Arita Makoto	4. 巻 5
2. 論文標題 Computational mass spectrometry accelerates C=C position-resolved untargeted lipidomics using oxygen attachment dissociation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-022-00778-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uesaka Kazuma, Oka Hiroya, Kato Ryuji, Kanie Kei, Kojima Takaaki, Tsugawa Hiroshi, Toda Yosuke, Horinouchi Takaaki	4. 巻 134
2. 論文標題 Bioinformatics in bioscience and bioengineering: Recent advances, applications, and perspectives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 363 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mi-ichi Fumika, Tsugawa Hiroshi, Arita Makoto, Yoshida Hiroki	4. 巻 7
2. 論文標題 Pleiotropic Roles of Cholesteryl Sulfate during Entamoeba Encystation: Involvement in Cell Rounding and Development of Membrane Impermeability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/msphere.00299-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Pei, Carlsten Christopher, Chaleckis Romanas, Hanhineva Kati, Huang Mengna, Isobe Tomohiko, Koistinen Ville M., Meister Isabel, Papazian Stefano, Sdougkou Kalliroi, Xie Hongyu, Martin Jonathan W., Rappaport Stephen M., Tsugawa Hiroshi, Walker Douglas I., Woodruff Tracey J., Wright Robert O., Wheelock Craig E.	4. 巻 8
2. 論文標題 Defining the Scope of Exposome Studies and Research Needs from a Multidisciplinary Perspective	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology Letters	6. 最初と最後の頁 839 ~ 852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.estlett.1c00648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Robin Schmid, Daniel Petras, Louis-Felix Nothias, Mingxun Wang, Allegra T Aron, Annika Jagels, Hiroshi Tsugawa et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23953-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsugawa Hiroshi, Rai Amit, Saito Kazuki, Nakabayashi Ryo	4. 巻 38
2. 論文標題 Metabolomics and complementary techniques to investigate the plant phytochemical cosmos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Reports	6. 最初と最後の頁 1729 ~ 1759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1NP00014D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 津川 裕司	4. 発行年 2022年
2. 出版社 バイオサイエンスとインダストリー（バイオインダストリー協会）	5. 総ページ数 7
3. 書名 代謝物質量分析インフォマティクスの最新の研究動向と展望	

〔産業財産権〕

〔その他〕

RIKEN computational mass spectrometry http://prime.psc.riken.jp/compms/index.html RIKEN PRIME CompMS http://prime.psc.riken.jp/compms/index.html GitHub SystemsOmic Lab HP https://github.com/systemsomicslab

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	今見 考志 (Imami Koshi) (30528344)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ ユニットリーダー (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------