

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710236

研究課題名（和文） 代謝制御の理解に向けた試験管内代謝経路の構築と動態解析

研究課題名（英文） Development of a method to analyze metabolic dynamics based on *in vitro* metabolic pathway

## 研究代表者

斎藤 菜摘（SAITO NATSUMI）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任講師

研究者番号：50287546

研究成果の概要（和文）：代謝メカニズム解明に向けた手法として、試験管内で代謝経路を選択的に駆動させる「試験管内（*in vitro*）代謝経路」を構築し、メタボロミクスを基盤とした *in vitro* 代謝解析手法を開発した。本手法を代謝フィードバックによる動態解析、および酵素エフェクター解析に応用し、大腸菌ペントースリン酸経路において、代謝物質（NADPH）による酵素アロステリック効果の同定に至った。試験管内代謝経路を用いた本法が、代謝メカニズム解明のための手法として有効なことを示した。

研究成果の概要（英文）：We developed a method to reveal metabolic mechanisms based on the *in vitro* functionalization of selected metabolic pathway in combination with metabolome analysis. The method was applied to analyze metabolic perturbation via feedback regulation and further applied to identify enzyme effectors. Screening of metabolites identified that NADPH act as an effector towards the enzymes of pentose phosphate pathway in *Escherichia coli*. These results demonstrated that our approach is applicable to analyze mechanism of metabolic regulation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：メタボロミクス、酵素エフェクター、アロステリック制御

## 1. 研究開始当初の背景

代謝は細胞内の物質を変換してエネルギーを生み出すこと、すなわち生物の生命活動そのものである。細胞の代謝は、転写、翻訳、酵素反応など異なる階層における膨大な種類の生体分子反応の相互作用で機能する。近年、DNA、RNA、タンパク質、代謝物質の生体分子を網羅的に測定することが可能となったが、これらの要素がいつ、どのように動作するのかを階層的に解析する常套手段はなく、代謝メカニズムの理解は細胞単位が単純なバクテリアにおいても決して十分と

は言えない状況である。

代謝制御メカニズムのうち、酵素活性を直接的に制御する機構は細胞の恒常性を司るシステムの一つであり、特に俊敏な細胞応答が求められるシグナル伝達、微生物の環境応答や薬剤応答などで必須の代謝制御として知られる。酵素（タンパク質）量の情報を得ることは、質量分析を用いたプロテオーム解析による定量解析で可能な一方で、酵素活性の変動をシステムティックに同定する手法が数少ないという限界により、細胞の酵素活性調節メカニズムは未知なことが多い。

細胞代謝を解明するためのツールとして、

代謝物質を一斉定量する技術であるメタボロミクスが近年技術的な発展を遂げている。申請者らはこれまでに、メタボロミクスと試験管内酵素反応の手法を組み合わせ、酵素機能を同定する手法を開発し、未知酵素機能解析に応用利用してきた。これらの研究において、メタボロミクスが酵素活性の変動をシステムティックに捉えるために有効なツールであることが示され、細胞内の酵素活性制御メカニズムを効率的に解析可能な新たな手法を提案する本研究に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞代謝メカニズムの解明を目指す研究の一環として、酵素活性制御メカニズムを解析するための技術開発を提案したものである。代謝経路を各構成単位で駆動可能な「試験管内 (*in vitro*) 代謝経路」を構築し、メタボロミクスを基盤とした *in vitro* 代謝解析手法開発を目的とした。*in vitro* 代謝経路の構築、これを利用した代謝動態解析系の確立、および細胞応答研究への応用利用を当初の研究期間内における達成目標とした。これに加え、*in vitro* 代謝解析手法の応用利用として、酵素阻害剤、または活性化剤などの低分子酵素エフェクターの探索と同定を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro* 代謝経路の構築

*in vitro* 代謝経路は、代謝の機能ユニットを構成する試験管内「ポット」を意味する。代謝経路の構築には、非選択的な酵素群を含む無細胞抽出液を使用し、制限した種類の基質と補酵素をポットに添加することで試験管内の狙った代謝経路を選択的に駆動可能にする戦略で行った。対象とした経路を駆動させるための最小限の基質と補酵素、および酵素溶液を容器内で混合し、5-60 分間反応を行った。経路内の中間体物質をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) によるメタボローム解析法にて測定を行い、基質と中間体産物の濃度変動を観察することで代謝経路が駆動したことを確認した。大腸菌中心炭素代謝経路の解糖系およびペントースリン酸経路をそれぞれ試験管内で駆動させることを試みた。解糖系には、glucose-6-phosphate (G6P)、ATP、ADP、NAD<sup>+</sup> を、ペントースリン酸経路には G6P および NADP<sup>+</sup> をそれぞれ基質と補酵素として添加し、*in vitro* 代謝経路の酵素反応の活性化を行った。

### (2) 酵素の調製

*in vitro* 代謝経路を構成する酵素群には、

大腸菌の無細胞抽出液を使用した。最少培地で培養した大腸菌を超音波破碎した抽出液から限外ろ過により代謝物質を含む低分子を除き、酵素溶液として使用した。

### (3) 代謝動態解析

代謝経路最終産物によるフィードバック制御、低分子エフェクター分子によるアロステリック制御において、酵素活性変化が引き起こす代謝動態を解析対象とした。*in vitro* 代謝経路にエフェクターとなる低分子化合物を添加し、メタボローム解析により経路内の代謝物質濃度変動を解析した。エフェクター候補分子添加で代謝摂動が観察された場合、*in vitro* 代謝経路内の酵素活性が変動したことを意味し、代謝プロファイルの解析からエフェクター分子の標的酵素を同定できる。エフェクター候補分子には、代謝物質標準物質を 10 個程度含むカクテルを作成し、計 80 個の化合物をスクリーニングに使用した。

## 4. 研究成果

### (1) *in vitro* 代謝経路の選択的駆動

*in vitro* 代謝経路に用いる酵素溶液には、大腸菌の無細胞抽出液を用いたので、培養条件下で酵素遺伝子の発現がなされた酵素群を非選択的に含む。したがって、使用した基質と補酵素のみが試験管内で駆動させる代謝経路の選択性を決定する。基質と補酵素の組み合わせと濃度を調節することで、解糖系とペントースリン酸経路を試験管内で選択的に駆動させることに成功した。解糖系では、出発の基質として添加した G6P が反応時間の経過で利用され、解糖系の最終産物であるピルビン酸までの中間体物質が合成された (図 1)。また、還元的ペントースリン酸経路の中間体産物も検出されたことより、解糖系中間体から補酵素なしに可逆的に反応が進行する還元的ペントースリン酸経路も微弱に活性化されたことが示された (図 1)。*in vitro* 解糖系で合成された中間体物質の総量を積算すると、系に基質として添加した G6P の初期濃度とほぼ一致した。これらの結果は、試験管内において解糖系のすべての酵素反応を他経路に拡散することなく活性化できたことを示す。同様の系でペントースリン酸経路の活性化を試みた。基質として G6P、および、補酵素として NAD<sup>+</sup> に代わって NADP<sup>+</sup>のみを利用することで、酸化的経路を含むペントースリン酸経路を選択的に活性化することに成功した。

### (2) 代謝フィードバック解析

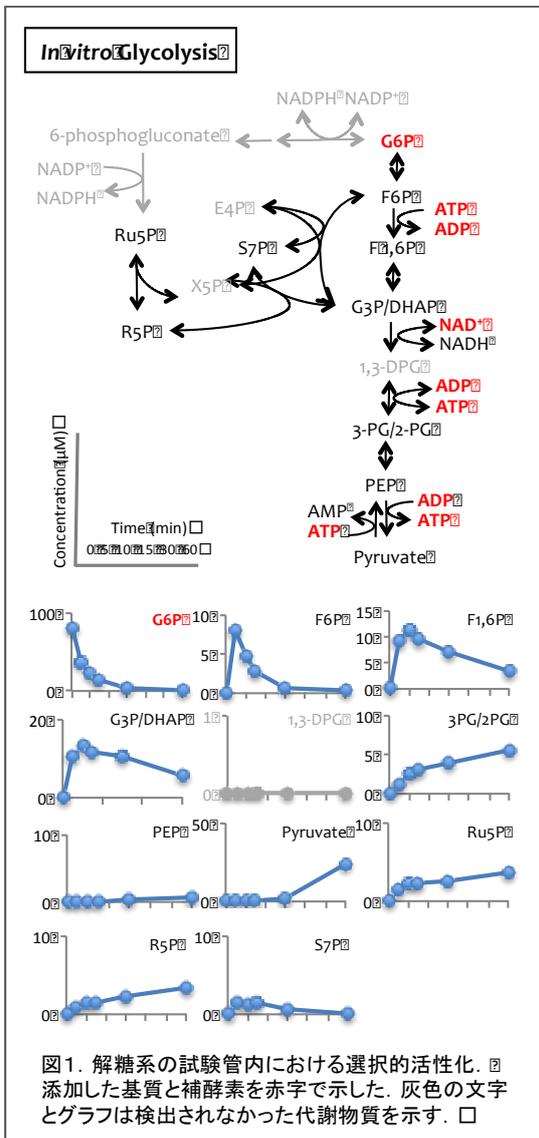


図1. 解糖系の試験管内における選択的活性化。添加した基質と補酵素を赤字で示した。灰色の文字とグラフは検出されなかった代謝物質を示す。

*in vitro* 代謝経路が代謝動態解析に利用可能なことを評価するため、代謝摂動の予測が可能な既知の代謝調節メカニズムを解析対象に用いた。アミノ酸合成経路では、経路最終産物によるフィードバック制御が起こることが一般的に知られる。大腸菌のセリン合成経路では、最終産物のセリンによる経路上流酵素 (3-phosphoglycerate dehydrogenase: 3-PGDH) の阻害機構が報告されている。大腸菌 *in vitro* セリン合成経路を構築し、フィードバック制御の解析を行った。セリン合成経路は、3-phosphoglycerate (3PG)、glutamate を基質として、NAD<sup>+</sup> を補酵素として用いることで試験管内活性化を行った。活性化した代謝経路にエフェクターとしてセリンを過剰量添加することで代謝摂動を付与した。*in vitro* セリン合成経路の代謝プロファイルは、セリンの添加が代謝経路中間体の 3-phosphoserine と 2-oxoglutarate のレベルを顕著に低下させることを示した (図2)。この代謝動態は、蓄積したセリンが代謝経路上流の酵素反応を阻害したことを意味する。以上の結果は、*in vitro* 代謝経路を利用した代謝動態解析が、フィードバック制

御で誘導される代謝摂動のメカニズム解明に有効なことを示した。

### (3) 酵素エフェクター解析

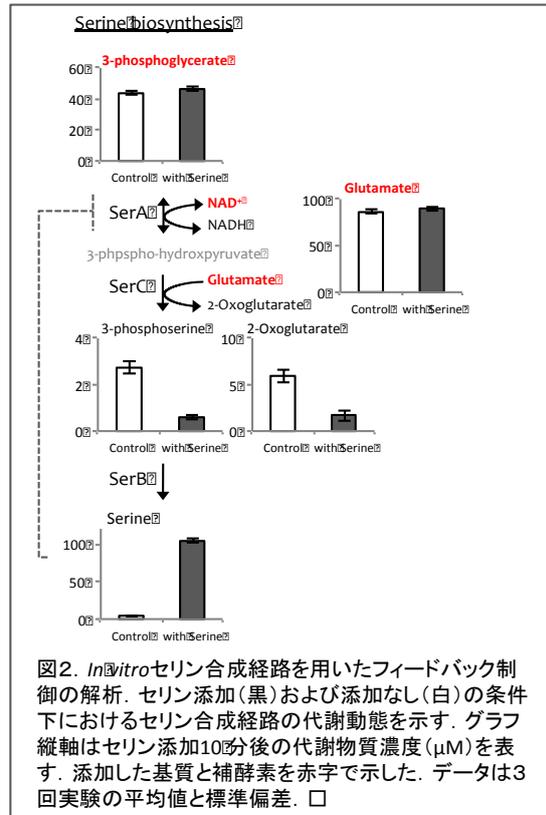


図2. *In vitro* セリン合成経路を用いたフィードバック制御の解析。セリン添加(黒)および添加なし(白)の条件下におけるセリン合成経路の代謝動態を示す。グラフ縦軸はセリン添加10分後の代謝物質濃度(μM)を表す。添加した基質と補酵素を赤字で示した。データは3回実験の平均値と標準偏差。□

次に、*in vitro* 代謝経路を用いた代謝動態解析を、未知酵素エフェクターの同定に応用した。本研究対象のエフェクターとは、酵素活性化または阻害を誘発する低分子化合物を意味する。未知エフェクターの候補には、代謝物質を用いた。細胞内代謝物質が酵素エフェクターとして作用する例は動物細胞から微生物まで数例報告があるが、多くの代謝物質の潜在的機能は未知である。代謝物質標準物質のカクテルをエフェクター候補として、成果(1)で構築した *in vitro* 解糖系、およびペントースリン酸経路に添加し、代謝プロファイルを比較することでエフェクターの作用を調べた。テストしたカクテルのうち1つ (cocktail VIII: citrate, aconitate, isocitrate, gluconate, dTMP, CMP, cAMP, AMP, IMP, GMP を含む) がペントースリン酸経路に摂動を付与した (図3A、B)。次に、cocktail VIII に含まれる化合物のうちいずれが代謝変動を引き起こしたのかを同様の系で確認したところ、isocitrate が cocktail VIII の効果に寄与することが明らかとなった (図3B)。Isocitrate の添加により、ペントースリン酸経路の基質である G6P が蓄積し、中間体産物 (Ribulose-5-phosphate: Ru5P, Ribose-5-phosphate: R5P, Sedoheptulose-7-phosphate: S7P) の合成効率が低下する挙動

が見られ、これは、酸化了的ペントースリン酸経路の G6P から Ru5P までの反応が阻害されたことを意味する。続く詳細な実験で明らかとなった isocitrate による代謝振動のメカニズムを以下に記述する。1) 試験管内でペントースリン酸経路を活性化後にエフェクター候補として添加した isocitrate が、新たに TCA 回路の反応を触媒する酵素の isocitrate dehydrogenase(ICDH)を活性化した。2) ICDH は isocitrate とペントースリン酸経路活性化のために添加した NADP<sup>+</sup>を利用して 2-oxoglutarate と NADPH を合成した。3) そこで合成された NADPH が酸化了的ペントースリン酸経路の最初のステップの酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)、および 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)の活性を阻害した。NADPH による G6PDH、および 6-PGDH の阻害作用は大腸菌でも報告されており、新規の作用ではないが、*in vitro*代謝経路を用いた代謝物質混合物のスクリーニングでエフェクターを探索可能なことを示した。

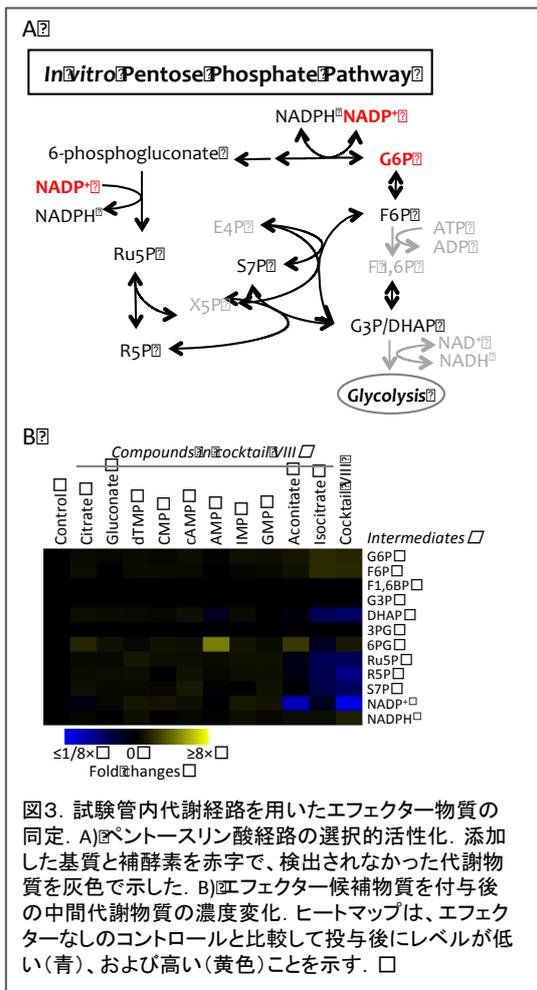


図3. 試験管内代謝経路を用いたエフェクター物質の同定。A) ペントースリン酸経路の選択的活性化。添加した基質と補酵素を赤字で、検出されなかった代謝物質を灰色で示した。B) エフェクター候補物質を付与後の中間代謝物質の濃度変化。ヒートマップは、エフェクターなしのコントロールと比較して投与後にレベルが低い(青)、および高い(黄色)ことを示す。□

#### (4) 総括

*in vitro*代謝解析法の構築と代謝動態解析への応用を行った。解糖系、ペントースリン

酸経路、およびセリン合成経路を試験管内で選択的に駆動させることで *in vitro* 代謝経路の構築を達成した。これらの *in vitro* 代謝経路を代謝フィードバックとエフェクター分子による代謝動態解析に応用した。代謝フィードバック解析では、アミノ酸によるアロステリック酵素阻害効果を同定した。エフェクター解析では、代謝物質をエフェクター候補としてスクリーニングを実施し、NADPH のペントースリン酸経路の酵素への阻害作用を同定した。細胞内外の代謝物質の多くは酵素エフェクターとしての潜在的機能を有するが、その機能のほとんどは未知である。本研究は、開発した *in vitro* 代謝経路が、代謝物質や薬物を含む低分子が酵素活性を制御する代謝メカニズムを解明するために有効な手法であることを示した。

#### 5. 主な発表論文等

(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 3 件)

1. Nakayashiki, T., N. Saito, R. Takeuchi, H. Kadokura, K. Nakahigashi, H. Mori. tRNA thiolation pathway modulates intracellular redox state in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **195**: 2039-49. 2013.
2. Koseki, T., S. Asai, N. Saito, M. Mori, Y. Sakaguchi, K. Ikeda, and Y. Shiono. Characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI:10.1007/s00253-012-4391-7. 2012.
3. 斎藤菜摘, ロベールマルタン. メタボロミクスを利用した酵素機能解析. 生化学 (ミニレビュー) **83**:1039-1043. 2011.

[学会発表] (計 11 件)

招待講演

1. 斎藤菜摘. メタボロミクスによる微生物代謝メカニズム解明に向けたアプローチ. 日本ゲノム微生物学会 第6回若手の会, 静岡, 27-28 Sep 2012.
2. 斎藤菜摘. メタボロミクスによる酵素機能と代謝メカニズム解明へのアプローチ. 日本農芸化学会 東北支部 第12回若手の会, 鶴岡, 7 Oct. 2011.

国際学会

3. Saito, N., M. Ohishi, S. Ota, T. Soga, and M. Tomita. *In vitro* metabolic pathway reveals the action of enzyme effectors. Metabolomics Society- 8th Annual International conference (Metabolomics 2012), Washington, D. C., USA, 25-28 June 2012. (口頭発表)
4. Saito, N. Hierarchical manner of metabolic

response under the stringent response in *Escherichia coli*. UK-Japan joint workshop on Microbial Systems Biology, Tsuruoka, 24-25 Oct 2011. (口頭発表)

5. **Saito, N., K. Nakahigashi, T. Masuda, A. Hirayama, T. Soga, and M. Tomita.** Metabolic shifts under the stringent response in *Escherichia coli*. Metabolomics Society- 7th Annual International conference, Cairns, Australia, 27-30 June 2011.

#### 国内学会

6. **斎藤菜摘, 曾我朋義, 富田勝.** *In vitro* 代謝経路による酵素エフェクター同定方法. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台, 25-27, March 2013. (口頭発表)
7. **斎藤菜摘, 中東憲治, 増田豪, 曾我朋義, 富田勝.** メタボロミクスによる微生物の代謝メカニズム解明. 山形分子生物学セミナー, 鶴岡, 26, Nov. 2012. (口頭発表)
8. **島田友裕, 斎藤菜摘, 田中寛.** 大腸菌をモデル生物とした細胞の代謝・増殖制御機構の解明. 第7回メタボロームシンポジウム, 鶴岡, 10-12. Oct. 2012.
9. **園元謙二, 善藤威史, 斎藤菜摘, 中東憲治, 門多真理子, 吉川博文.** 乳酸菌のキシロース代謝経路. 第7回メタボロームシンポジウム, 鶴岡, 10-12. Oct. 2012.
10. **斎藤菜摘, 中東憲治, 増田豪, 曾我朋義, 富田勝.** 階層的な代謝応答から理解する大腸菌緊縮応答の代謝メカニズム. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 23-25, March 2012. (口頭発表)
11. **乙供かな依, 斎藤菜摘, 曾我朋義, 藤田信之, 早川正幸, 大西康夫.** 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の運動性孢子におけるエネルギー代謝の解析. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 23-25, Mar. 2012.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

斎藤 菜摘 (SAITO NATSUMI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任講師

研究者番号：5 0 2 8 7 5 4 6

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし