

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658124

研究課題名(和文)メタボロミクスを基盤とする機能性食品因子の高解像度生体応答解析

研究課題名(英文)High-resolution analysis of bioresponse of functional food factor on the basis of metabolomics

研究代表者

藤村 由紀(Fujimura, Yoshinori)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：20390304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マトリックスレーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)を基盤とした微量細胞から高感度に代謝物を検出する手法の先鋭化、すなわち、高解像度代謝物解析に向けて必要不可欠な計測可能な分子種や測定感度を向上させる技術開発(MALDIイオン化機構の理解と新規合成マトリックス評価)を行った。その結果、MALDIイオン化の計算的に予測可能な方法論(QSPR：定量的構造物性相関解析)や代謝物の高感度検出可能なマトリックスの創出に成功した。また、食品成分の生体応答で最も注目される酸化ストレス応答の新たな分子機構(ミトコンドリア制御機構)の存在を明らかにすることにも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a technique and methodology, understanding of MALDI ionization rationale and synthesis of new matrix, for improvement of molecular coverage and detection sensitivity toward high-resolution metabolite analysis on the basis of MALDI-MS capable of sensitively detecting metabolites from trace amount of cells. We succeeded in newly proposing a methodology of chemometric prediction of MALDI ionization based on the quantitative structure-property relationship (QSPR) analysis and in newly generating highly sensitive matrix for metabolites. In addition, we found new molecular mechanism, mitochondrial regulation system, of oxidative stress, which is often observed in biological responses against food factors.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：メタボロミクス MALDI-MS マトリックス 質量分析イメージング 代謝物プロファイリング

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品の有効性・安全性評価や作用機序の解明に代謝物総体を解析するメタボロミクスの適用事例が飛躍的に増加し、食品機能性分野でも食品因子応答性の生体分子動態を高精度に計測可能な技術があれば、従来にない高度な食品機能性評価が可能となるだけでなく、信頼性の高い食品作用メカニズム解明に新たなブレークスルーをもたらすことが期待されている。

我々は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) により、既存の常識を覆す生体代謝物の超高感度測定法および微量細胞からの非標的型代謝物検出法の開発に成功した。また、代謝状態の違いを層別化する代謝物プロファイリング法が食品機能性評価に極めて有効であることを世界で初めて実証するとともに、本法が様々な病態の理解 (組織レベル) に役立つ表現型解析にも有用であることを見出した。

一方、我々は食品因子の生理作用発現にその特異的標的分子の存在が必須であることを報告してきたが、それらの代謝応答との関連性は未解明のままであった。

そこで、もしも、組織内超微小領域 (微量細胞レベル) の代謝動態を捉えることができれば、従来の機能性分子解析法では得られない微細な細胞応答に基づく食品機能性評価を可能にできるのではないかと仮説を考えた。

2. 研究の目的

表現型に最も近い代謝物は、“今何が起きているのか?”を最も反映した生体情報であることから、微細な生体応答解析での重要性が強く指摘されている。本研究では、独自の技術である MALDI-MS を中心とした微量細胞から高感度に代謝物を検出する手法を先鋭化し、技術的ボトルネックとなっていた計測可能な分子種の網羅性、測定感度や精度を向上させた代謝物解析法を開発する。

3. 研究の方法

質量分析における選択性と検出感度を決定づける最大の要因は対象物質のイオン化効率にある。高解像度の代謝応答解析を実現するためには、イオン化助剤 (マトリックス) の最適化 (高感度化) が第一優先課題である。このため、本研究では以下の項目を遂行した。

(1) 代謝物化学構造とイオン収率との定量的構造特性相関の検討

(2) 合成マトリックスのイオン化能の検討

以上の検討に加えて、食品因子による生体応答で現在最も注目されている酸化ストレス応答への影響を捉える新たな方法論の探索も併せて行った。

(3) 食品因子が標的とする微量動物細胞内の新奇酸化ストレス応答機構の検討

それぞれの詳細については、以下に示した。

(1) 代謝物化学構造とイオン収率との定量的構造特性相関の検討

MALDI 法では、検出可能な物質種の範囲や検出感度が使用するマトリックスの分子種に特異的である点が特徴である。しかし MALDI の機構については未だ不明な点が多いことから、マトリックスの選定は経験的に行われている。現在一般的に用いられているマトリックスにより検出可能な分子種は限られており、検出目的物質に応じたマトリックスの分子構造最適化技術が重大な課題である。そこで、我々は MALDI 法について「計算的に予測可能な」理解を目指し、イオン化の可否やイオン収率に影響を与える代謝物構造の要因を定量的構造特性相関 (QSPR) の手法により調査した。

(2) 合成マトリックスのイオン化能の検討

これまでに 9-aminoacridine (9-AA) が幅広い代謝物を同時に検出可能な極めて優秀なマトリックスであることを報告してきたが、LC-MS 等の手法と比べるとそのカバレッジは極めて乏しい。より高感度 (より幅広い) の代謝物検出を実現するために、9-AA をベースとして、有機化学的手法により誘導体を作成し、それらの代謝物に対するイオン化能を 9-AA と比較検討した。

(3) 食品因子が標的とする微量動物細胞内の新奇酸化ストレス応答機構の検討

代謝の酸化的機能不全は様々な生物学的破綻を引き起こすことが知られている。酸化ストレスにより実に多くの代謝酵素が不活化の標的となると予想されているが、現状ではストレス応答を介して制御される代謝の包括的観察法が欠如しているために、標的となり得る代謝酵素を同定することは極めて困難であった。そこで、代表的な酸化ストレスである H_2O_2 刺激により変動する細胞内代謝物 (ヒト動物細胞、HeLa 細胞など) を捉えるために、MALDI-MS に先立って、複数の分離モードを組合せた LC-MS を用いた代謝物プロファイリングを行った。

4. 研究成果

(1) 代謝物化学構造とイオン収率との定量的構造特性相関の検討

まず実験的に、主要な生体内代謝物 200 種について 9-AA をマトリックスとして MALDI-MS 分析を行い、そのイオン化の可否および検出限界濃度 (LOD) を評価した。次に各代謝物の構造情報をもとに様々な分子記述子を算出し、実験結果を予測するモデルをランダムフォレスト法により構築した。本法のスキームならびに結果は以下示した (図 1)。予測における重要度の高い記述子を評価した結果、水素結合強度および負電荷表面積がイオン化の可否を決定づける傾向が示された。また LOD 値には水素結合強度のみが影響していたことから分子表面の電子状態がイオン化の前提である可能性が示唆され、マトリックス分子との相互作用に関連していることが推察された。官能基などの構造的特徴が類似するアミノ酸のみを対象としたモデルでは代謝物分子の形状に関わる記述子の重要度が高く、分子骨格の形状あるいは柔軟性がマトリックス分子との相性を生み出している可能性が示された。以上の結果は、QSPR 法が従来にない理論的な (計算的に予測可能な) マトリックス開発戦略の新たなアプローチとなることが示唆された。本成果は世界最大の質量分析学会の機関誌 (*J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2014) の表紙を飾った。こうした新たな方法論に基づいて得られた種々の構造情報をブラックボックス化している MALDI イオン化機構の解明に活用するとともに、新たなマトリックス合成への展開につなげていく予定である。

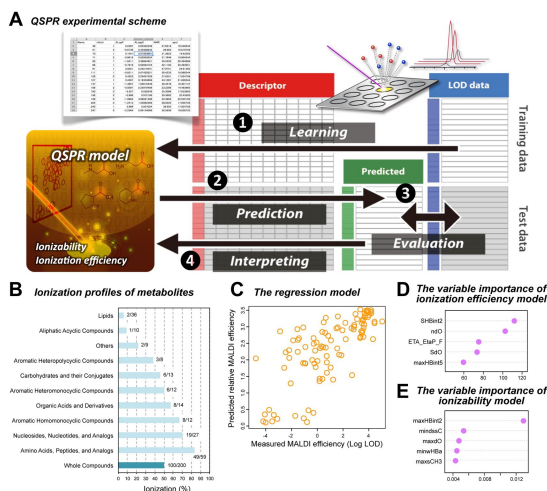


図 1 QSPR による代謝物のイオン化の可否やイオン化収率に関する構造情報の抽出

(2) 合成マトリックスのイオン化性能の検討

約 40 種類の合成マトリックスを用いて、200 種類の主要な代謝物 (最左列) に対する

イオン化性能を図 2 に示した。色がついていいるものは 9-AA よりも感度よく検出できていることを示している。その結果、9-AA では検出困難な代謝物を感度よく検出できる種々のマトリックスやより幅広い数の代謝物を同時に検出できるマトリックスが存在することが明らかとなった。この結果は、有機合成的アプローチが高感度マトリックスを創出するのに極めて有用な戦略であることを示唆している。こうしたアプローチを積み重ねることで、本研究の目的である高解像度解析に必須な高感度マトリックスの創出が可能となった。今後、本結果から得られた誘導化に基づく構造情報の重要性を反映させた合成展開を図り、更なる高性能マトリックスの創出を目指す。また、得られた合成マトリックスライブラリーを先述の QSPR へ応用し、計算化学的視点から効率的に高感度化に必要な構造情報の予測を進めていきたい。

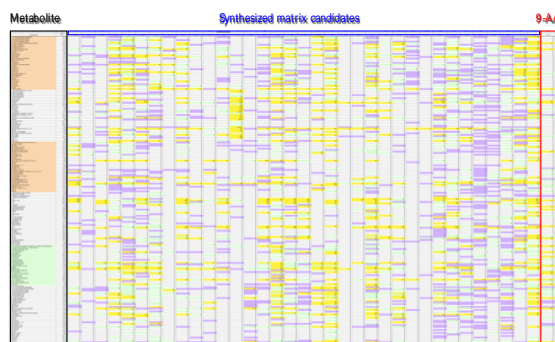


図 2 9-AA をベースとした合成マトリックスのイオン化性能

(3) 食品因子が標的とする微量動物細胞内の新奇酸化ストレス応答機構の検討

図 3 に示したように、 H_2O_2 刺激により変動する細胞内代謝物を捉えるために、異なる効果を示す濃度域の H_2O_2 刺激後の細胞抽出物を質量分析に供し、代謝物プロファイリングを行った。その結果、PCA スコアプロットにおいて、正常・分裂停止・障害性レベルに応じた (H_2O_2 濃度に応じた) クラスター形成が確認され、各濃度の代謝物のプロファイルが生物学的状態に反映していることが示唆された。

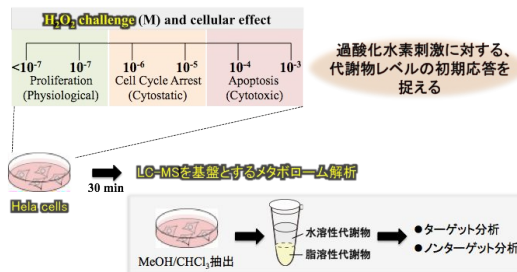


図 3 酸化ストレス応答性代謝物プロファイリングに向けた実験概要

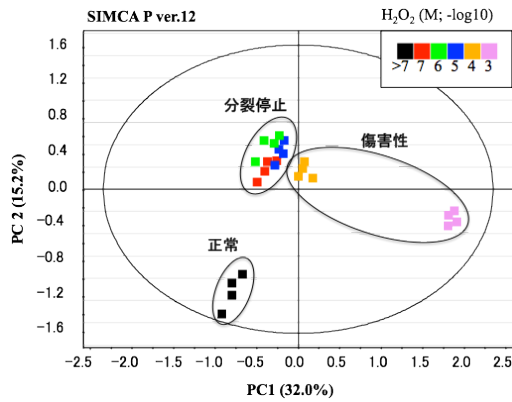


図4 H₂O₂ 応答性代謝物プロファイルの PCA スコアプロット

つぎに、正常、分裂停止、細胞障害性の層別化に寄与する代謝物を探索するために、判別分析 (OPLS-DA) を行った結果、図5に示すように減少するものおよび増加するものを含めて 5 8 種類の代謝物マーカーが得られた。

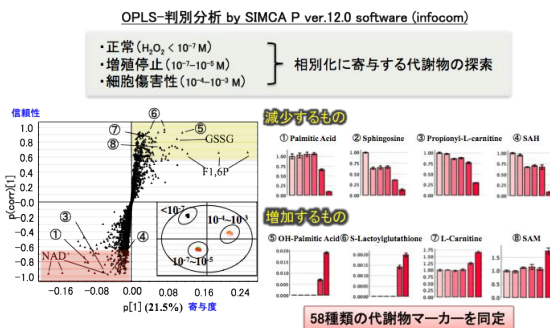


図5 判別分析による H₂O₂ 応答性代謝物の同定

さらに、これらの中から、刺激によって増大するものと減少するもののセット (基質-生成物) を酸化ストレスに脆弱な酵素によって制御される代謝物と仮定して探索した結果、脂肪酸の酸化に関わるカルニチンが同定された (図6)。

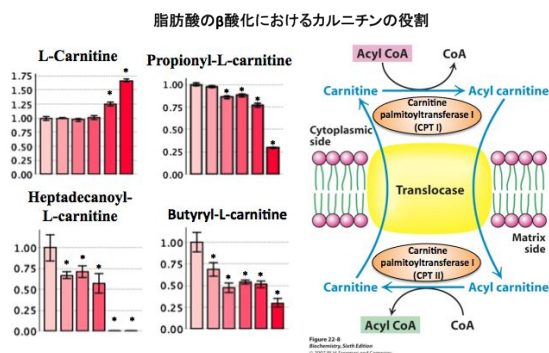


図6 H₂O₂ 応答性代謝物プロファイルの PCA スコアプロット

生化学的手法による検討で、それら代謝物の代謝変換に関わる酵素であるカルニチン-パルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT1) が H₂O₂ 刺激に対するターゲットであることが判明した (図7)。また、このような挙動は食品成分の一種でもある遊離のアラキドン酸処理においても同様に認められた。

H₂O₂ は様々な細胞内反応の副産物としてだけでなく、病原細菌や食品成分などの幅広い外来物質の侵入によっても産生される。このような H₂O₂ 分子がミトコンドリアの機能制御に関わる代謝酵素 (CPT1) をターゲットとし、酸化ストレス応答を引き起こしていたことは生物学的にもとても興味深い。また、酸化ストレス応答に関連する代謝酵素の同定に我々が提案するアプローチが有効であることも示された (*Genes Cells* 2013)。今後、こういう手法を MALDI-MS に応用することで、全く新しい視点での高解像度の生体応答解析が可能となるとと思われる。

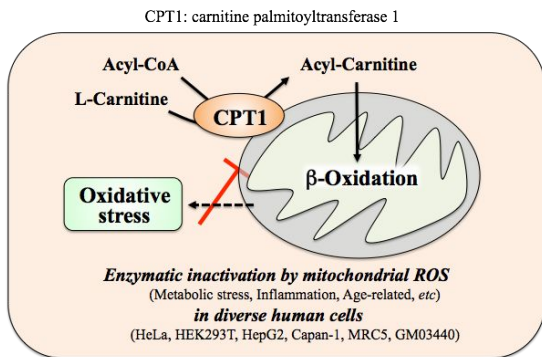


図7 CPT1 を介した新規酸化ストレス応答機構

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 2 件)

Setoyama D, Fujimura Y, Miura D. Metabolomics reveals that carnitine palmitoyltransferase-1 is a novel target for oxidative inactivation in human cells. *Genes Cells*. 査読有, 18, 2013, 1107-1119. DOI: 10.1111/gtc.12098.

Yukihira D, Miura D, Fujimura Y, Umemura Y, Yamaguchi S, Funatsu S, Yamazaki M, Ohta T, Inoue H, Shindo M, Wariishi H. MALDI efficiency of metabolites quantitatively associated with their structural properties: a quantitative structure-property relationship (QSPR) approach. *J Am Soc Mass Spectrom*. 査読有, 25, 2014, 1-5. DOI: 10.1007/s13361-013-0772-0.

〔学会発表〕(計 19 件)

藤村由紀. 緑茶の機能性を捉える低分子ケミカルセンシングに関する研究. **日本農芸化学会 2014 年度大会 (招待講演)**, 2014 年 3 月 27 日, 東京都.

Setoyama D, Fujimura Y, and Miura D. Metabolomics reveals that carnitine palmitoyltransferase-1 is a novel target for oxidative inactivation in mammalian cells. **SFRRI2014**, March 23-26, 2014, Kyoto, Japan.

Miura D, Fujimura Y, Nakamura A, Matsumoto Y, and Wariishi H. A trial for in situ label-free imaging of an orally dosed vegetable flavonoid within mammalian tissue. **SFRRI2014**, March 23-26, 2014, Kyoto, Japan.

Nakamura A, Fujimura Y, Yukihiro D, Miura D, and Wariishi H. The potential relationship between antioxidant activity and metabolic profile of Japanese green tea cultivars. **SFRRI2014**, March 23-26, 2014, Kyoto, Japan.

Fujimura Y. Metabolomics-driven chemical sensing strategy for better understanding of functions of green tea. **2014 Water-Algae-Tea Consortium for Health (WATCH) (Invited)**, March 8, 2014, Keelung, Taiwan.

新藤充, 堂籠健斗, 石井孝典, 寺井康了, 松本健司, 行平大地, 三浦大典, 藤村由紀, 割石博之. 小分子測定用 MALDI-MS マトリックスの開発. **第 8 回メタボロームシンポジウム**, 2013 年 10 月 3-4 日, 福岡市.

行平大地, 三浦大典, 藤村由紀, 梅村佳克, 山口真一, 船津慎治, 山崎真, 太田哲也, 井上裕章, 新藤充, 割石博之. MALDI-MS を用いた代謝物分析における代謝物化学構造とイオン収率との定量的構造特性相関. **第 8 回メタボロームシンポジウム**, 2013 年 10 月 3-4 日, 福岡市.

Setoyama D, Fujimura Y, and Miura D. Metabolomic screening for identifying the oxidative stress targeting enzymes. **Metabolomics2013**, July 1-4, 2013, Glasgow, Scotland.

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 低分子食品成分の組織内微小空間分布の非標識可視化法. **第 67 回日本栄養・食糧学会大会 (招待講演)**, 2013 年 5 月 25 日, 名古屋市.

Setoyama D, Fujimura Y, and Miura D. Metabolome early response to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mammalian cell. **19th Annual Meeting of SFRBM**, November 14-18, 2012, San Diego, CA.

Shindo M, Terai Y, Yukihiro D, Miura D, Fujimura Y, Matsumoto K, and Wariishi H. Design and synthesis of new efficient MALDI-MS matrices for low molecular weight metabolites in negative ionization mode. **IMSC2012**, August 15-21, 2012, Kyoto, Japan.

Setoyama D, Fujimura Y, Wariishi H, and Miura D. Untargeted Plasma Metabolomics using ¹³C-Glucose: Glycated-Metabolites as Novel Biomarkers for Aging and Diabetes. **IMSC2012**, August 15-21, 2012, Kyoto, Japan.

Yukihiro D, Fujimura Y, Shindo M, Miura D, and Wariishi H. Statistical Investigation of Metabolite Structure to Reveal the Principle for Preferred Ionization in MALDI using 9-Aminoacridine. **IMSC2012**, August 15-21, 2012, Kyoto, Japan.

Miura D, Fujimura Y, Ymaguchi S, Ojima N, Shindo M, and Wariishi H. High-throughput analysis for metabolic dynamics and in situ metabolite imaging by MALDI mass spectrometry. **IMSC2012**, August 15-21, 2012, Kyoto, Japan.

行平大地, 藤村由紀, 三浦大典, 割石博之. 相関ネットワーク構造の遷移に基づく代謝動態解析. **第 7 回メタボロームシンポジウム**, 2012 年 10 月 10-12 日, 鶴岡市.

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 食品機能性評価に向けたニュートリメタボロミクス. **第 7 回メタボロームシンポジウム (招待講演)**, 2012 年 10 月 10-12 日, 鶴岡市.

藤村由紀. 質量分析を基盤としたプロテオミクス技術のメタボローム研究への応用. **第 36 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (招待講演)**, 2012 年 9 月 8 日, 宮崎市.

藤村由紀, 三浦大典, 大和真由実, 兵藤文紀, 安川圭司, 市川和洋, 内海英雄, 割石博之, 立花宏文. レドックス関連疾患の理解とニュートリメタボロミクス. **第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会 (招待講演)**, 2012 年 6 月 7 日, 徳島市.

Yukihiro D, Miura D, Fujimura Y, Kaku M, Tomonaga N, and Wariishi H. Quantitative Structure-Property Relationship of Metabolites to Ionization Efficiency Assisted by 9-Aminoacridine in MALDI. **60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, May 20-24, 2012, Vancouver, Canada.

〔その他〕

ホームページ等

<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 由紀 (FUJIMURA, Yoshinori)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研
究拠点・准教授
研究者番号：20390304

(2) 研究分担者

瀬戸山 大樹 (SETOYAMA, Daiki)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研
究拠点・特任助教
研究者番号：30550850

(3) 研究分担者

三浦 大典 (MIURA, Daisuke)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研
究拠点・准教授
研究者番号：40532627