

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830143

研究課題名(和文) 情報基盤定量プロテオミクスで全身代謝ネットワークを可視化する

研究課題名(英文) Visualization of the whole metabolic network through absolute protein quantification

研究代表者

松崎 芙美子 (MATSUZAKI, Fumiko)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：10631773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題においては、個体レベルでの代謝ネットワークの包括的な理解を目的とし、マウス各臓器における全代謝酵素の絶対量の測定と、その定量値を用いた代謝ネットワーク特性の解析を可能にするための研究を遂行した。その成果として、マウス各臓器を対象として「情報基盤定量プロテオミクス」を行うにあたっての代謝酵素絶対定量方法の最適化や、代謝ネットワークの統合的な解析を可能にする新たな数理科学的方法論である、絶対量ベース代謝システム解析 (AMSA) の開発を達成し、マウス各臓器の代謝ネットワークの多面的な解析が可能になった。

研究成果の概要(英文)：In this project, I focused on an absolute quantification of metabolic enzymes in each mouse organ and analyzing metabolic network for a comprehensive understanding of the metabolic system in individual level. I optimized the method for absolute protein quantification with our information-based quantitative proteomics technique and developed a novel mathematical method "Absolute quantity-based metabolic systems analysis (AMSA)", which provides integrated analysis of metabolic network in each mouse organ.

研究分野：定量生物学

キーワード：定量プロテオミクス 代謝ネットワーク 絶対量ベース代謝システム解析

## 1. 研究開始当初の背景

「代謝」は全ての生命活動を営む上での基盤であり、ブドウ糖分解によるエネルギー生産から核酸・タンパク質のような生体高分子化合物の合成まで、多岐にわたる代謝反応を内包する。多種多様な代謝反応を行うために、ヒトでは約 1000 種類の代謝酵素が存在し、それぞれが異なる代謝反応を触媒している。個体レベルに視野を広げると、全身にわたって統率された代謝反応を遂行するために、各臓器がそれぞれに異なる代謝酵素のセットを有し、異なる代謝反応を分担して行っている。例えば空腹時には、肝臓はグルコース-6-ホスファターゼを用いてグリコーゲンからブドウ糖を生産するが、他の大部分の臓器には該当酵素が存在しないためにブドウ糖を生産できない。一方で脂肪組織は、ホルモン感受性リパーゼによって中性脂肪を分解するが、他の大部分の臓器では該当酵素が存在しないために中性脂肪を分解しない。このように、各臓器は特異的な代謝酵素を用いて異なる代謝反応を行っている。その上、各臓器は代謝物のやりとりやホルモン制御等によって連携して代謝反応を行っており、結果として全身で巨大で複雑な代謝ネットワークが形成されている。従って、一部の臓器の代謝が異常を来すと、その影響は全身に及ぶ。例えば脂肪組織に中性脂肪が過度に蓄積すると(肥満)、脂肪組織からアディポカインが分泌されて他の臓器でのブドウ糖の取り込みが制限されてしまい、糖尿病が誘発される。つまり、代謝ネットワークの破綻は様々な疾病を誘因し得ることから、その解析の重要性は疑う余地がない。ところが、代謝ネットワークは複雑で巨大であるが故に、その理解には全身の臓器とその中で行われている全代謝反応を網羅的に記述する必要があるが、方法論的限界から実データの取得すら成されていないのが現状である。

筆者はこれまでに質量分析計を用いた種々のプロテオミクスの技術開発を行っており、近年では「情報基盤定量プロテオミクス」法の確立を進めている。この技術は定量したいタンパク質のペプチド情報を事前に取得しておくことで、網羅的なタンパク質絶対定量を可能にする革新的技術である(特許第 5468073 号)。既に、「情報基盤定量プロテオミクス」法に必要なペプチド情報を、ヒト 18000 タンパク質について取得し、代謝酵素約 1000 種類の絶対定量に成功している。この方法を応用すれば、これまで技術的に困難だった全身の代謝反応の定量的記述が可能になり、個体レベルでの代謝ネットワーク図を作製できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者等がヒトで確立してきた「情報基盤定量プロテオミクス」法をマウ

スに拡張して、マウス個体における全身の臓器の全代謝酵素の絶対定量を行い、「代謝ボディマップ(網羅的・定量的な全身代謝ネットワーク図)」を作製するために、マウス各臓器における全代謝酵素の絶対定量に適した定量手法を開発する。加えて、取得した酵素の定量情報を用いて、各臓器の代謝ネットワークの解析を行うための数理的手法の開発を行う。

本研究により個体レベルの代謝ネットワークの全貌を解析可能にすることで、代謝異常を来す疾病や、個体レベルでの真の代謝の理解が現実可能になることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) マウス臓器を対象とした代謝酵素絶対定量方法の最適化

マウスにおける「情報基盤定量プロテオミクス」法の確立を行う。まず一部のマウスの代謝酵素について、ヒトリコンビナントタンパク質の LC-MS/MS 解析により取得したペプチド情報を用いて、質量分析時の検出感度が高いペプチドを予測する。予測されたペプチドと、対象酵素のリコンビナントタンパク質を作製し、それらをそれぞれ内部標準として用いて、QTRAP5500 (AB Sciex) で対象代謝酵素の LC-MRM 解析を試みる。両方法について、対象代謝酵素の検出感度、定量精度、総測定時間を比較し、どちらの方法がマウス各臓器における全代謝酵素測定に適しているかを決定する。また、マウス各臓器からのタンパク質抽出や抽出液の分画条件といったサンプル調製・質量分析プロトコルを最適化する。

(2) 代謝ネットワーク解析法の開発

臓器ごとの代謝酵素量を既知の代謝制御の知見と統合して、代謝ネットワーク全体の多面的な解析ができる新手法を開発する。既知の代謝ネットワーク構造として、Palsson 等の recon2 を用いる。代謝ネットワーク全体に適応できるように、計算コストがあまり大きくならず、未知のパラメータが確実に求まる方法を探索する。特に、代謝状態に大きな影響を持つ酵素の選定を行うために、独立変数(代謝酵素)に対する感度解析が可能なような手法の開発に重点を置く。さらに、取得した絶対定量値に開発手法を適用し、代謝ネットワークの特性を解析する。

## 4. 研究成果

(1) マウス臓器を対象とした代謝酵素絶対定量方法の最適化

マウス各臓器を対象として「情報基盤定量プロテオミクス」を行うにあたり、標準物質としてリコンビナントタンパク質を用いる方法と、合成ペプチドを用いる方法を比較検討し、代謝酵素の定量方法を最適化した。計

画では全てのマウス代謝酵素のリコンビナントタンパク質を作製して質量分析を行い、定量に必要なペプチド情報を取得することを第1選択としていたが、労力・コスト面において負担が大きすぎたため、ヒトのリコンビナントタンパク質を用いて得られたペプチド情報を基に、マウスを対象とした定量において有効なペプチドを選別し、定量測定に利用する方法を検討した。その結果、合成ペプチドを用いた方法は、労力・コスト面での負担が軽いだけでなく、質量分析時のスループットも非常に高いことが明らかになったことから、マウス各臓器における大規模な代謝酵素絶対量測定においては、標準物質として合成ペプチドを用いた定量方法が適している。

次に、マウス各臓器からのプロテオームサンプル調製・質量分析プロトコルを最適化した。C57BL/6 マウスより採取した各臓器(肝臓・筋肉等)を粉砕し、2% SDS 緩衝液中にて超音波処理することによりタンパク質抽出液を調製することとした。臓器プロテオームは発現の偏りが大きいため、SDS-PAGE 後高発現タンパク質を除去して、さらに 12 分画することで網羅性と定量性を向上させた。タンパク質量の網羅性を Spike-in SILAC 法で確認したところ、臓器あたり約 3000 タンパク質が同定され、代謝酵素の多くが定量可能であった。

## (2) 代謝ネットワーク解析法の開発

「情報基盤定量プロテオミクス」により取得される代謝酵素絶対量データと既知の代謝ネットワーク構造情報を活用し、各臓器の代謝ネットワーク特性を解析するために、新たな数理科学的方法論である絶対量ベース代謝システム解析 (Absolute quantity-based metabolic systems analysis (AMSA)) を開発した。この方法では、定常状態における代謝酵素と代謝物の絶対量データ、および一部の流束値を用いて、各代謝経路の定常状態流束の推定、各代謝酵素の量的変化が各代謝物濃度や流束に与える影響の推定 (感度解析)、代謝物濃度のダイナミックシミュレーション等が可能である (図)。

実際に、ヒト正常繊維芽細胞 TIG-3 において「情報基盤定量プロテオミクス」法で計測した全代謝酵素の定量値を用いて、絶対量ベース代謝システム解析を行った。まずは既知の代謝ネットワーク構造の情報と代謝酵素の検出の有無より、対象細胞における代謝ネットワーク構造を決定した。このネットワーク構造と、全代謝酵素定量値、一部の流束実測値を用いることで、各経路の流束の推定に併せて、各代謝酵素の量的変動が各代謝物濃度や流束に与える影響の推定や、その際の代謝物濃度変化のシミュレーションを行い、各代謝経路の障害が代謝ネットワークの各部位に与える影響を定量的に解析した。その結果、定常状態に影響を与える代謝酵素は全体

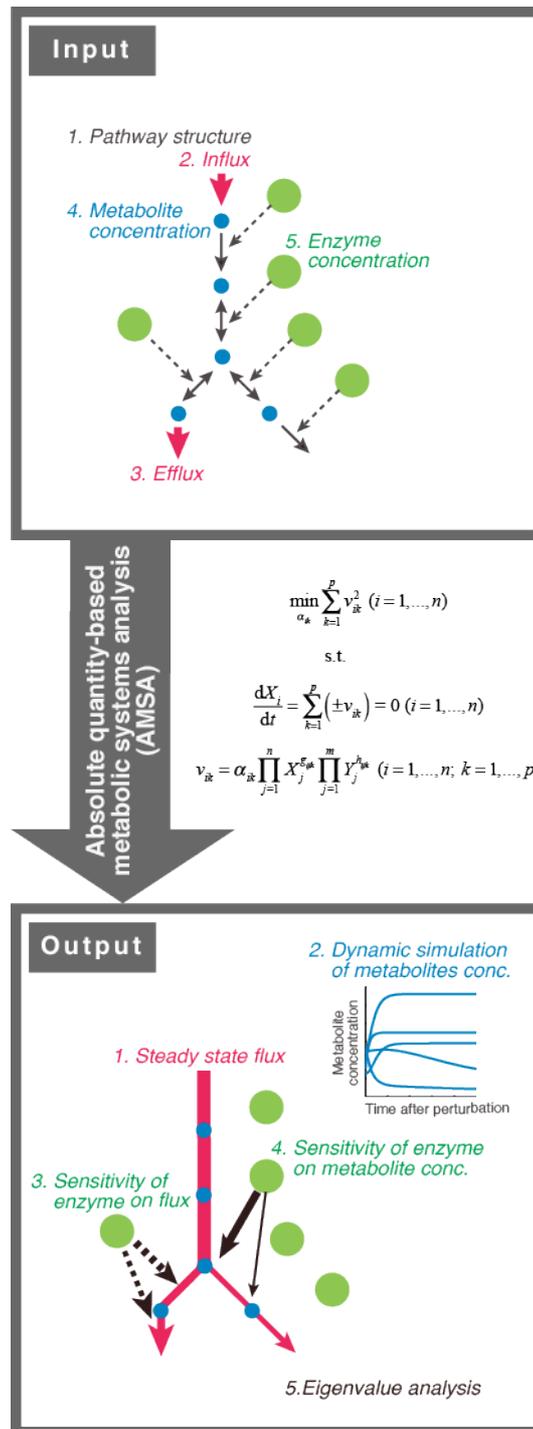


Figure. Absolute quantity-based metabolic systems analysis (AMSA)

のごく一部であることが明らかになると同時に、代謝システムに重大な影響を及ぼしうる代謝酵素が抽出された。本成果については現在論文投稿準備を進めている。

以上よりマウス臓器における代謝酵素の網羅的定量と、取得データを用いた代謝ネットワークの特性解析が可能になった。本課題で構築されたプラットフォームを用いることで、ネットワークの破綻としての疾病の理解が促進されることが期待される。

### (3) 本研究成果のインパクト

これまで各臓器の代謝反応の知見は、異なる個体から断片的に取得されてきたが、本研究で開発したマウス全身におけるスループットの高い代謝酵素の測定法と、それらを統合解析できる絶対量ベース代謝システム解析 (AMSA) によって、同一個体の統一的な全身代謝経路の情報取得とその統合的解析が可能になった。これによって、生物学のゴールの一つである包括的な代謝の理解の推進と、代謝の破綻により誘因される種々の疾病 (肥満・糖尿病等) の病態解明への貢献が期待される。

また、本課題によって獲得された代謝酵素の合成ペプチド情報は、代謝研究の基盤となる代謝酵素絶対量測定のためのリソースとしての価値が高く、今後の代謝研究へ大きく貢献することが期待される。つまり、各種疾病モデルマウスの臓器ごとの代謝の基礎的情報の取得と、その情報を基にした様々な仮説形成の起点等として利用可能であり、これまで予想もできなかった臓器や代謝経路における生物学的重要性の発見や、疾病における異常部位の発見・治療への応用が期待される。

さらに、生物・医学研究においてタンパク質絶対量の計測は必要不可欠であるが、本研究によって大規模タンパク質絶対量の技術をマウスへ展開するための目処が立った。今後この技術の普及を促すことで、代謝以外の様々な生物現象の解析や、医療応用へ向けた個体レベルでの基礎研究に、新たな角度からの知見をもたらすことが期待される。

### 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)

[学会発表] (計 11 件)

① Fumiko Matsuzaki, Masaki Matsumoto, Kiyotaka Oshikawa, Keiichi I. Nakayama, Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis, First symposium: From genes to human diseases (Fukuoka, Japan) 2015.03.17.

② Fumiko Matsuzaki, Masaki Matsumoto, Kiyotaka Oshikawa, Keiichi I. Nakayama, Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis, The Third BMIRC International Symposium for Virtual Physiological Human (Iizuka, Japan) 2015.03.06.

③ 松崎 芙美子, 松本 雅記, 押川 清孝, 中山 敬一, ヒト全代謝酵素の絶対定量と代謝システム解析, 定量生物学の会 第七回年会 (福岡) 2015.01.11.

④ Fumiko Matsuzaki, Masaki Matsumoto, Kiyotaka Oshikawa, Keiichi I. Nakayama, Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis, The 37th annual meeting of the molecular biology society of Japan (Yokohama, Japan) 2014.11.26.

⑤ 松本 雅記, 押川 清孝, 松崎 芙美子, 五島 直樹, 夏目 徹, 中山 敬一, 次世代ターゲットプロテオミクスによるヒト全代謝経路の絶対定量マッピング, 第 87 回生化学会大会 (京都) 2014.10.17.

⑥ 松崎 芙美子, 松本 雅記, 押川 清孝, 中山 敬一, ヒト全代謝酵素の絶対定量によるがん代謝ネットワークの統合解析, 第 87 回生化学会大会 (京都) 2014.10.15.

⑦ Fumiko Matsuzaki, Absolute quantification of all metabolic enzymes by information-based proteomics and computational analysis for cancer metabolism, Seminar at Kyushu University (Fukuoka, Japan) 2014.09.16.

⑧ 松崎 芙美子, 松本 雅記, 押川 清孝, 中山 敬一, ヒト全代謝酵素の絶対定量とグローバル代謝の数理解析, 第 2 回数理解析道場 (伊豆) 2014.07.26.

⑨ 松崎 芙美子, 松本 雅記, 押川 清孝, 中山 敬一, ヒト全代謝酵素の絶対定量とグローバル代謝の数理解析, 定量生物学の会 第六回年会 (大阪) 2013.11.23-24.

⑩ Fumiko Matsuzaki, Masaki Matsumoto, Kiyotaka Oshikawa, Keiichi I. Nakayama, Absolute quantification of all metabolic enzymes by information-based proteomics and computational analysis for cancer metabolism. Symposium on complex biodynamics and networks (Yamagata, Japan) 2013.11.12-13.

⑪ 松崎 芙美子, 松本 雅記, 押川 清孝, 高見 知代, 中山 敬一. タンパク質相互作用ネットワークにおける相互作用強度特性の探索. 第 10 回ネットワーク生態学シンポジウム (神戸) 2013.9.2-3.

[図書] (計 2 件)

① 松崎 芙美子, 松本 雅記, 中山 敬一, がん代謝. がん分子標的治療, 2014, 12, 175-180

② 松崎 芙美子, 今月の 150 ~ 200 字でわかる海外の注目論文, 細胞工芸, 2013, 32, 793

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 芙美子 (MATSUZAKI, Fumiko)  
九州大学・生体防御医学研究所・統合オミクス分野・助教  
研究者番号：10631773