

令和 4 年 9 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02432

研究課題名(和文)統合オミクス研究に資する質量分析インフォマティクスによる新規代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Illuminating new biological mechanisms by multiomics approach with mass spectrometry cheminformatics

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：代表者は、質量分析より得られるデータを解析するインフォマティクス研究に従事している。本研究では、この質量分析インフォマティクスにより、新規代謝物同定およびメタボロームネットワークを基軸とする統合オミクス研究を行った。その成果として、新しいIMS/MS解析法(FSEA法)を用いた植物由来天然物のメタボローム解析と、シロイヌナズナの一塩基多型(SNP)データの統合オミクス研究(Nature Methods 2019)、および脂質メタボロミクス(リポドミクス)の革新的な手法を開発したことで生命の脂質多様性を実験的に初めて明らかにすることに成功した(Nature Biotechnology 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命活動の中核である「代謝」を理解することは、喫緊の課題である環境問題を微生物の力で解決することや、感染防御の分子メカニズムの解明することによる新たな創薬研究に繋がる。一方、生命の細胞内での産生や分解過程を通じてできる「代謝物(メタボローム)」は100万種類を超えと言われており、その多様性を捉える技術を作ることが代謝の理解に直結すると言える。本研究で構築された革新的なメタボローム解析技術により、これまでよりも10倍以上の網羅性を担保した代謝物解析が可能となったことに加え、遺伝子発現データとの統合解析により、代謝物の生理学的意義を明らかにする方法論も構築した。

研究成果の概要(英文)：The researcher is engaged in informatics research to analyze the mass spectrometry data for extracting metabolite information. By using our computational mass spectrometry technique, we conduct integrated omics research based on the identification of novel metabolites and metabolome networks. The results include the development of novel metabolomics technique (FSEA method) for elucidating plant-specific natural products and the integrated omics approach of single nucleotide polymorphism (SNP) data with the metabolome in Arabidopsis thaliana (Nature Methods 2019). In addition, the innovative method for lipid metabolomics (lipidomics) to reveal the lipid diversity of living organisms has been developed (Nature Biotechnology 2020).

研究分野：システムバイオロジー

キーワード：システムバイオロジー オミクス科学 質量分析 インフォマティクス メタボロミクス リポドミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究では、遺伝子およびタンパク質の変異が生体恒常性破綻の主原因であり、低分子代謝物はその結果として位置づけされてきた。しかしながら近年、脂質メディエーターのオキシリピンに始まり、2-hydroxyglutarate (2HG)が腫瘍形成を促進するオンコメタボライトとして同定されてきたように、代謝産物が生体の恒常性維持に深く関わっていることを強く示唆する報告が相次いでいる。このことから、生命現象をより深く理解するためには、DNA・mRNA・タンパク質を生命活動の流れと定義するセントラルドグマの概念に縛られず、代謝産物(メタボローム)の情報を加味した統合的な解析が必要と考えられる。

ゲノム情報では説明できない代謝産物の複雑なネットワークを網羅的に捉えるためには、ノンターゲットメタボローム解析が必須となる。しかしながら、メタボローム解析の中核を司る質分析データの解析手法は未だ不十分と言わざるを得ない(検出可能ピークのうち、同定可能なものは2-3割程度)。さらに、得られたデータの解釈、多階層データとの統合、およびそこから得た情報を遺伝学・栄養学的手法により検証した例はほとんど無く、本学術分野をより発展させていくための創造性の高い研究が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、標準品に依存しない代謝物同定方法の開発に従事することで、メタボローム解析における網羅性を向上させることを第一の目的とした。また、新しい手法により発見された代謝物については、ゲノムやトランスクリプトーム情報との統合オミクス解析により、その代謝物の重要性を明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、理論MS/MS(タンデムマススペクトル)法を採用することで、網羅的な代謝物解析を試みた。これまでの研究において代謝物の同定は、化合物標準品(合成品)のMS/MSスペクトルをライブラリーとして登録し、それを実試料から得られたマススペクトル情報と照らし合わせることで行われてきた。しかしながら、研究者が購入できる標準品には限りがあり、1000~2000化合物が限度である。一方、自然界が創生する代謝物の多様性は100万種を超えている。また、1化合物の平均価格は1万円ほどであることを考えても、標準品非依存的な代謝物アノテーション法の確立が必要と考えられる。

そこで本研究では、「代謝物クラス特異的なフラグメントイオン」という概念に着目し、理論的なMS/MS構築を行った。たとえば、アブラナ科植物が産生するグルコシノレートと呼ばれる代謝物は、硫酸基と糖のモチーフを化合物構造に持っており、グルコシノレートのMS/MSスペクトルには、この官能基特異的なプロダクトイオン(m/z 96)やニュートラルロス(162 Da)が観測される。また、脂質クラスの1つであるホスファチジルコリン(PC)のMS/MSには、その極性基であるホスフォコリン基に由来するプロダクトイオン(m/z 184)が観測される。つまり、生物の遺伝学的な背景情報と化合物クラス特異的なフラグメントイオンの情報をデータベースとして保持することで、完全な構造同定には至らないものの、生物学的な解釈を行う上での最低限の代謝物アノテーションが可能となる。脂質の場合を例にとると、1-palmitoyl-2-linoleoyl-snglycerol-3-phosphocholineはsn1位にパルミチン酸(16:0)、sn2位にリノール酸(18:2(9Z,12Z))を保持するホスファチジルコリン(PC)であり、PC 16:0/18:2(9Z,12Z)と表記される分子である。一方、この理論MS/MS法では、その極性基と炭素数や二重結合数により算出される質量に基づいたアノテーションを行うため、PC 16:0_18:2という表記で名前付けを行う。アンダーバーは、sn1/sn2の位置が区別できておらず、18:2という表記は二重結合の位置やE体/Z体の区別はしないということを意味している。このような理論MS/MSスペクトルを植物メタボロームや脂質メタボローム解析が対象とする代謝物に対して構築することで包括的な代謝物アノテーションを行う。また、このようなアノテーション法により得た代謝物プロファイル情報と、ゲノム情報やトランスクリプトーム情報と統合的に解析することで、その代謝物の生物学的重要性を明らかにする。

4. 研究成果

本科学研究課題の最大の成果の1つは、2019年度に発表した「情報科学で生体内の多様なメタボロームを包括的に解明—質量分析インフォマティクスと安定同位体標識植物の統合解析—」(理化学研究所プレスリリースより)に関する研究と考えられるため、これについてまず詳細に記載する(Nature methods 16, 295-298, 2019)。本研究では、特に植物の二次代謝物を包括的に捉えるための質量分析インフォマティクス研究、並びに世界の各地で自生しているシロイヌナズナの自然変異体のSNPs解析データとの統合オミクス解析を行うことで、新たな代謝物—遺伝子—形質の関連を解き明かすことを目的とした。我々はまず、安定同位体で標識した二酸化炭素($^{13}C_2$)で生育させた植物体と通常条件下($^{12}C_2$)で生育させた植物体のLC-MS/MS計測データを統合し、

(1) 未知代謝物の炭素数の決定、(2) 得られた炭素数をもとにした組成式の算出、(3) 組成式と MS/MS 情報からの代謝物クラスのカテゴリ・化合物部分骨格の決定、そして (4) MS/MS スペクトルデータのネットワークによる可視化が可能なツール「MS-DIAL 3」を開発し、合計 12 植物種より 1133 種の代謝物構造情報を得ることに成功した。

まず、炭素の安定同位体標識植物を用いる利点を記載する。質量分析とは代謝物の「質量」を計測する装置であり、例えば、炭素を六つ含む化合物のグルコースを ^{13}C で置換すると、通常よりも六つ重い位置に「重くなったグルコース」が検出される。この「質量シフト」を捉えることで、未知代謝物の炭素数が決定できる。本研究では、検出できる数千イオンについて、この質量シフトを自動的に捉えるアルゴリズムを開発した。そして、得られた炭素数から組成式（例えばグルコースなら $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ）を高精度に算出するアルゴリズムも開発し、代謝物組成式を 99.8% 以上の精度で決定できる基盤を構築した。さらに、植物由来代謝物の理論 MS/MS やスペクトルネットワーク手法を駆使することで、包括的な植物天然物メタボロームのアノテーションを行うことができるプラットフォームの構築を行った。

本手法を、植物モデル生物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に適用したところ、地上部 (shoot) で 131 種、根からは 185 種の代謝物構造情報を得た。本代謝物情報をもとに、開花時間や乾燥ストレス、および窒素飢餓状態において異なる形質を示す合計 25 種類の自然変異体 (accession) の SNPs 関連解析を行った。これにより、さまざまな環境因子に関連のある代謝物 (グルコシノレートやその分解物、そしてフェノールアミドやモノリグノール硫酸抱合体など) を新たに見だし、本手法が代謝物の構造情報を決定するだけでなく、さまざまな表現型との関連解析にも適用可能な技術であることを示した。

もう一つの重要な成果としては、研究代表者らが開発した革新的なリポミクス手法に関する開発研究 (Nature Biotechnology 38, 1159-1163, 2020) を用いた、「腸内細菌叢の複雑な脂質多様性を解明する手法を開発—腸内細菌が産生する新しい脂質の同定に成功—」(理化学研究所プレスリリースより) に関する研究である (iScience 23:101841, 2020)。我々は、抗生物質カクテル投与マウスの糞便と通常条件下で生育させたマウスの糞便を対象としたリポミクスにより、腸内細菌が産生する脂質代謝物 (脂質クラス) を複数見出した。本研究で我々は、未知イオンの MS/MS を紐解くことで、新しい脂質 Acyl Alpha-Hydroxy Fatty Acid (AAHFA) の同定にも成功した。AAHFA は、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸が α 位にヒドロキシ基のある極長鎖脂肪酸とエステル結合したユニークな構造をしており、今後の生理活性研究にもつながる研究成果だと言える。

さらに、今回見いだした腸内細菌依存的に変動する脂質の産生に関わる細菌種を推定するために、特定の菌群だけを死滅させるさまざまな抗生物質を投与したマウスの糞便を用い、リポミクスとメタゲノムデータ (16S RNA 解析) の統合解析を行った。脂質分子プロファイルとメタゲノム解析から得られる細菌種の相関解析を行うことで、腸内細菌特異的だと考えられる脂質代謝物と相関の高い菌種群の存在を複数明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tada Ipputa, Tsugawa Hiroshi, Meister Isabel, Zhang Pei, Shu Rie, Katsumi Riho, Wheelock Craig E., Arita Masanori, Chaleckis Romanas	4. 巻 9
2. 論文標題 Creating a Reliable Mass Spectral-Retention Time Library for All Ion Fragmentation-Based Metabolomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 251 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo9110251	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 Nakabayashi Ryo, Mori Tetsuya, Takeda Noriko, Toyooka Kiminori, Sudo Hiroshi, Tsugawa Hiroshi, Saito Kazuki	4. 巻 92
2. 論文標題 Metabolomics with 15N Labeling for Characterizing Missing Monoterpene Indole Alkaloids in Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5670 ~ 5675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b03860	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 Naoe Satoko, Tsugawa Hiroshi, Takahashi Mikiko, Ikeda Kazutaka, Arita Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of Lipid Profiles after Dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids Using Integrated Untargeted and Targeted Lipidomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 241 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo9100241	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 Tsugawa Hiroshi, Satoh Aya, Uchino Haruki, Cajka Tomas, Arita Makoto, Arita Masanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Mass Spectrometry Data Repository Enhances Novel Metabolite Discoveries with Advances in Computational Metabolomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 119 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo9060119	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, Nakabayashi Ryo, Mori Tetsuya, Yamada Yutaka, Takahashi Mikiko, Rai Amit, Sugiyama Ryosuke, Yamamoto Hiroyuki, Nakaya Taiki, Yamazaki Mami, Kooke Rik, Bac-Molenaar Johanna A., Oztolan-Erol Nihal, Keurentjes Joost J. B., Arita Masanori, Saito Kazuki	4. 巻 16
2. 論文標題 A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 295 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-019-0358-2	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 Lai Zijuan, Tsugawa Hiroshi, Wohlgemuth Gert, Mehta Sajjan, Mueller Matthew, Zheng Yuxuan, Ogiwara Atsushi, Meissen John, Showalter Megan, Takeuchi Kohei, Kind Tobias, Beal Peter, Arita Masanori, Fiehn Oliver	4. 巻 15
2. 論文標題 Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 53 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nmeth.4512	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 Tsugawa Hiroshi	4. 巻 54
2. 論文標題 Advances in computational metabolomics and databases deepen the understanding of metabolisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Opinion in Biotechnology	6. 最初と最後の頁 10 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.copbio.2018.01.008	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 Okahashi Nobuyuki, Ueda Masahiro, Yasuda Shu, Tsugawa Hiroshi, Arita Makoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Global profiling of gut microbiota-associated lipid metabolites in antibiotic-treated mice by LC-MS/MS-based analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100492 ~ 100492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100492	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, Ikeda Kazutaka, Tsugawa Hiroshi, DeLoer Sharmina, Yoshida Hiroki, Arita Makoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Stage-Specific De Novo Synthesis of Very-Long-Chain Dihydroceramides Confers Dormancy to Entamoeba Parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00174-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00174-21	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 Matsuzawa Yuki, Higashi Yasuhiro, Takano Kouji, Takahashi Mikiko, Yamada Yutaka, Okazaki Yozo, Nakabayashi Ryo, Saito Kazuki, Tsugawa Hiroshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Food Lipidomics for 155 Agricultural Plant Products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 8981 ~ 8990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c07356	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 Rai Amit, Hirakawa Hideki, Nakabayashi Ryo, Kikuchi Shinji, Hayashi Koki, Rai Megha, Tsugawa Hiroshi, Nakaya Taiki, Mori Tetsuya, Nagasaki Hideki, Fukushi Runa, Kusuya Yoko, Takahashi Hiroki, Uchiyama Hiroshi, Toyoda Atsushi, Hikosaka Shoko, Goto Eiji, Saito Kazuki, Yamazaki Mami	4. 巻 12
2. 論文標題 Chromosome-level genome assembly of Ophiorrhiza pumila reveals the evolution of camptothecin biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20508-2	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 Yasuda Shu, Okahashi Nobuyuki, Tsugawa Hiroshi, Ogata Yusuke, Ikeda Kazutaka, Suda Wataru, Arai Hiroyuki, Hattori Masahira, Arita Makoto	4. 巻 23
2. 論文標題 Elucidation of Gut Microbiota-Associated Lipids Using LC-MS/MS and 16S rRNA Sequence Analyses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101841 ~ 101841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101841	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 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 -

1. 著者名 Tsugawa Hiroshi, Ikeda Kazutaka, Takahashi Mikiko, Satoh Aya, Mori Yoshifumi, Uchino Haruki, Okahashi Nobuyuki, Yamada Yutaka, Tada Ipputa, Bonini Paolo, Higashi Yasuhiro, Okazaki Yozo, Zhou Zhiwei, Zhu Zheng-Jiang, Koelmel Jeremy, Cajka Tomas, Fiehn Oliver, Saito Kazuki, Arita Masanori, Arita Makoto	4. 巻 38
2. 論文標題 A lipidome atlas in MS-DIAL 4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1159 ~ 1163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41587-020-0531-2	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

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Computational mass spectrometry http://prime.psc.riken.jp/compms/index.html
--

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	中林 亮 (Nakabayashi Ryo) (30586160)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員 (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
---------	---------