

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25513012

研究課題名(和文) 自然環境の時空間変動を評価するバイオマーカー探索技術の創製

研究課題名(英文) Exploring biomarker identification evaluating ecosystem fluctuation in natural samples

研究代表者

菊地 淳(Kikuchi, Jun)

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・チームリーダー

研究者番号：00321753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は着目する環境中から採取した各種生物および地理学的試料から、未精製試料を各種分析機器で得たビッグデータを統合解析し、時空間の特徴抽出を行う手法を構築してきた。河口底泥、水中プランクトン、魚類と腸内細菌叢、海藻類や、さらに水産廃棄物の再資源化手法として作物成長促進の可能性について、有機物群、無機物群および微生物群集の分析データを統合解析し地理的特性や“旬”としての季節特性を見出す手法を報告してきた。最終年度では、従来多用してきた線形的な相関関係あるいは分子および微生物ネットワークを記述する手法のみならず、機械学習手法やマーケットバスケット解析等の情報解析技術高度化も達成できた。

研究成果の概要(英文)：Natural ecosystems can be conceptually thought of as interconnected environmental and metabolic systems. Humans and their activities affect and are a part of these ecosystems. Considering a more applied perspective of human activities within ecosystems, it is important to gain an understanding of natural ecology and its metabolic processes in various environments. We have shown the challenges of analytical approaches for molecular and microbial complexity in the ecosystem. The first challenge is macromolecular complexity to analyze structure and composition of polysaccharides. The second challenge is microbial complexity, namely concerning their metabolic activity. The third challenge is integrating molecular and microbial complexity, by using multi-omics approach. Our approach provides a foundation for evaluation of systemic effects of environmental fluctuation, and a step for opening up a new window that will clear up metabolic dynamics in the ecosystem.

研究分野：生命分析科学

キーワード：NMR 環境分析 マイクロバイオーム メタボローム イオノーム データサイエンス 機械学習 共生システム

### 1. 研究開始当初の背景

生物を介した物質循環は生産者による光合成からスタートする。こうした生産者や微生物ループ中で大量に生合成される多糖類や脂質の水圏バイオマスは、動物に食された後は腸内細菌叢の共代謝システムをも経て、宿主に再吸収される反応場も有する。しかしながら、ヒトやシロアリのように栄養源のバイオマス化学資源と摂食代謝、腸内微生物組成の変動が関連付けて研究されている例は極めて少なく、例えば水生動物の場合は栄養源のバイオマスと、魚類の腸内微生物叢の共代謝システムを関連付けた報告例は殆ど耳にすることがない。本課題ではこの事実に着目し、近年申請者らが広く時空間を採取してきた自然環境由来の試料を用い、対象生物に化学プロファイルとして濃縮される環境変動の情報をデータマイニングすることとした。

### 2. 研究の目的

生態系サービスにおいては多種多様な生物種が複雑なネットワークを形成してシステムとして機能している。システム生物学の考え方を細胞から自然環境にまで拡張するには、従来の単離培養や単離精製を前提とした還元主義的アプローチから脱却し、システム全体を俯瞰する新技術の構築が望まれる。そこで本研究では、筆者らが広い時空間で採取してきた水圏環境試料を中心として、原核・真核微生物群の生物量・組成を評価する技術開発と、これらを栄養源として化学プロファイルへと濃縮する魚類および反応場を触媒する腸内微生物叢の生物量・組成を統合的に評価し、環境変動がどのように化学プロファイルと微生物叢を変動させるか統合解析することとした。

### 3. 研究の方法

自然環境は刻一刻と変動しているが、申請者らの先行研究により、例えば微生物生態系のプロファイルや、これを食する動物の化学プロファイルには時系列、あるいは空間分布の変動情報が濃縮されていることがわかってきた。本申請課題では水、底泥、藻類、魚類およびその腸内容物といったありふれた自然環境から採取した試料を対象とし、元素群や有機物群といった化学量を各種分析機器、生物量を高速シーケンサーによる一斉計測に処する。得られたデータは全て数値マトリックス化し、各種の多変量解析に処することで、採取した自然環境試料の時空間変動を特徴付けるバイオマーカー探索に値する基盤技術創製を目指すこととした。

### 4. 研究成果

我々は着目する環境中から採取した各種生物および地理学的試料から、未精製試料を各種分析機器で得たビッグデータを統合解析し、時空間の特徴抽出を行う手法を構築してき

た。河口底泥、水中プランクトン、魚類と腸内細菌叢、海藻類や、さらに水産廃棄物の再資源化手法として作物成長促進の可能性について、有機物群、無機物群および微生物群集の分析データを統合解析し地理的特性や“旬”としての季節特性を見出す手法を報告してきた。

最終年度では、従来多用してきた線形的な相関関係あるいは分子および微生物ネットワークを記述する手法のみならず、supervised/unsupervised な機械学習手法、マーケットバスケット解析等、情報解析技術高度化を達成できた。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 55 件)

- Misawa, T., Wei, F. and Kikuchi, J.\* “Application of two-dimensional nuclear magnetic resonance for signal enhancement by spectral integration using a large dataset of metabolic mixtures” *Anal. Chem.* (2016) doi:10.1021/acs.analchem.6b01495. 査読有
- Ogura, T., Date, Y., Masukujane, M., Coetzee, T., Akashi, K. and Kikuchi, J.\* “Improvement of physical, chemical, and biological properties of aridisol from Botswana by incorporation of torrefied biomass” *Sci. Rep.* 6, 28011 (2016) doi: 10.1038/srep28011. 査読有
- Vergara, F. Kikuchi, J. Breuer, C. “Artificial Autopolyploidization Modifies the Tricarboxylic Acid Cycle and GABA Shunt in Arabidopsis thaliana Col-0” *Sci. Rep.* 6, 26515 (2016) doi: 10.1038/srep26515. 査読有
- Chikayama, E., Shinbo, Y., Komatsu, K. and Kikuchi, J.\* “The effect of molecular conformation on the accuracy of theoretical <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts calculated by ab initio methods for NMR-based metabolomics databases” *J. Phys. Chem.* 120, 3479-3487 (2016) doi: 10.1021/acs.jpcc.5b12748. 査読有
- Komatsu, T., Ohishi, R., Shino, A. and Kikuchi, J.\* “Structure and metabolic flow analysis of molecular complexity in <sup>13</sup>C-labeled tree by 2D and 3D-NMR” *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 6000-6003 (2016) doi: 10.1002/anie.201600334. 査読有
- Shiokawa, Y., Misawa, T., Date, Y. and Kikuchi, J.\* “Application of Market Basket Analysis for Visualization of Transaction Data based on Human Lifestyle and Spectroscopic Measurements” *Anal. Chem.* 88, 2714-2719 (2016) doi: 10.1021/acs.analchem.5b04182. 査読有
- Ogura, T., Hoshino, R., Date, Y. and Kikuchi, J.\* “Visualization of microfloral metabolism for marine waste recycling” *Metabolites* 6, 7 (2016) doi: 10.3390/metabo6010007. 査読有
- Ito, K., Tsutsumi, Y., Date, Y. and Kikuchi, J.\* “Fragment Assembly Approach Based on Graph/Network Theory with Quantum Chemistry

- Verifications for Assigning Multidimensional NMR Signals in Metabolite Mixtures” *ACS Chem. Biol.* 11, 1030-1038 (2016) doi: 10.1021/acscchembio.5b00894. 査読有
9. Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y. and Kikuchi, J.\* “SENSI: Signal ENhancement by Spectral Integration for Analysis of Metabolic Mixtures” *Chem. Commun.* 52, 2964-2967 (2016) doi: 10.1039/c5cc09442a. 査読有
  10. Teramura, H., Sasaki, K., Oshima, T., Aikawa, S., Matsuda, F., Okamoto, M., Shirai, T., Kawaguchi, H., Ogino, C., Hirano, K., Sazuka, T., Kitano, H., Kikuchi, J. and Kondo, A.\* “Organosolv pretreatment of sorghum bagasse using a low concentration of hydrophobic solvents such as 1-butanol or 1-pentanol” *Biotech. Biofuels* 9, 27 (2016) doi: 10.1186/s13068-016-0427-z. 査読有
  11. Kikuchi, J.\* Tsuboi, Y., Komatsu, K., Gomi, M., Chikayama, E. and Date, Y. “SpinCouple: Development of web-tool for analyzing metabolite mixtures via 2D-J resolved NMR spectra” *Anal. Chem.* 88, 659-665 (2016) doi: 10.1021/acs.analchem.5b02311. 査読有
  12. Sasaki, K., Okamoto, M., Shirai, T., Tsuge, Y., Fujino, A., Sasaki, D., Morita, M., Matsuda, F., Kikuchi, J. and Kondo, A. “Toward the complete utilization of rice straw: Methane fermentation and lignin recovery by a combinational process involving mechanical milling, supporting material, and nanofiltration” *Bioresource Technol.* (in press). 査読有
  13. Kikuchi, J.\* and Komatsu, T. “Polysaccharides as major carbon sources in environmental biodiversity” *NMR in Glycoscience and Glycotechnology* (2016). 査読無
  14. 菊地淳 “メタボノミクスによる腸内微生物代謝と恒常性評価” *FOOD STYLE 21* (in press). 査読無
  15. 菊地淳 “代謝混合物複雑系の非分離構造解析” *化学* (in press). 査読無
  16. Motegi, H., Tsuboi, Y., Saga, A., Kagami, T., Inoue, M., Toki, H., Minowa, O., Noda, T. and Kikuchi, J.\* “Identification of reliable components in multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) for a data-driven approach across metabolic processes” *Sci. Rep.* 5, 15710 (2015) doi: 10.1038/srep15710. 査読有
  17. Radhika, V., Ueda, N., Tsuboi, Y., Kojima, M., Kikuchi, J., Kudo, T. and Sakakibara, H. Methylated cytokinins from phytopathogen *Rhodococcus fascians* mimic plant hormone activity” *Plant Physiol.* 169, 1118-1126 (2015) doi: 10.1104/pp.15.00787. 査読有
  18. Sasaki, K., Okamoto, M., Shirai, T., Tsuge, Y., Teramura, H., Sasaki, D., Kawaguchi, H., Hasunuma, T., Ogino, C., Matsuda, F., Kikuchi, J. and Kondo, A. “Precipitate obtained following membrane separation of hydrothermally pretreated rice straw liquid revealed by 2D NMR to have high lignin content” *Biotech. Biofuels* 8, 88 (2015) doi: 10.1186/s13068-015-0273-4. 査読有
  19. Sugahara, H., Odamaki, T., Xiao J.Z., Abe, F., Kato, T., Kikuchi, J., Fukuda, S. and Ohno, H. “*Bifidobacterium longum* BB536 induces gut luminal metabolic changes through modulation of microbial community” *Sci. Rep.* 5, 13548 (2015) doi: 10.1038/srep13548. 査読有
  20. Ogura, T., Date, Y., Tsuboi, Y. and Kikuchi, J.\* “Metabolic dynamics analysis by massive data integration: application to tsunami-affected field soils in Japan” *ACS Chem. Biol.* 10, 1908-1915 (2015). 査読有
  21. Komatsu, T., Kobayashi, T., Hatanaka, M. and Kikuchi, J.\* “Profiling planktonic biomass using element-specific, multicomponent nuclear magnetic resonance spectroscopy” *Environ. Sci. Technol.* 49, 7056-7062 (2015) doi: 10.1021/acs.est.5b00837. 査読有
  22. Teramura, H., Sasaki, K., Oshima, T., Aikawa, S., Matsuda, F., Kawaguchi, H., Ogino, C., Yamazaki, M., Shirai, T., Okamoto, M., Kikuchi, J. and Kondo, A.\* “Changes in lignin and polysaccharide components in 13 cultivars of rice straw following dilute acid pretreatment as studied by solution-state 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR” *PLoS ONE.* 10, e0128417 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0128417. 査読有
  23. Mori, T., Tsuboi, Y., Ishida, N., Nishikubo, N., Demura, T. and Kikuchi, J.\* “Multidimensional high-resolution magic angle spinning and solution-state NMR characterization of <sup>13</sup>C-labeled plant metabolites and lignocellulose” *Sci. Rep.* 5, 11848 (2015) doi: 10.1038/srep11848. 査読有
  24. Hsieh, C.-Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J. and Tsuneda, S.\* “Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*” *Physiol. Rep.* 3, e12327 (2015) doi: 10.14814/phy2.12327. 査読有
  25. Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J.\* “Pretreatment and integrated analysis of spectral data reveal seaweed similarity based on chemical diversity” *Anal. Chem.* 87, 2819-2826 (2015) doi: 10.1021/ac504211n. 査読有
  26. Misawa, T., Date, Y. and Kikuchi, J.\* “Human metabolic, mineral and microbiota fluctuations across daily nutritional intakes visualized by data-driven approach” *J. Proteome Res.* 14, 1526-1534 (2015) doi: 10.1021/pr501194k. 査読有
  27. Tsuji, Y., Vanholme, R., Tobimatsu, Y., Ishikawa, Y., Foster, C. E., Kamimura, N., Hishiyama, S., Hashimoto, S., Shino, A., Hara, H., Sato-Izawa, K., Oyarce, P., Goeminne, G., Morreel, K., Kikuchi, J., Takano, T., Fukuda, M., Katayama, Y., Boerjan, W., Ralph, J., Masai, E. and Kajita, S.\* “Introduction of chemically labile substructures in Arabidopsis lignin through the use of the Ca dehydrogenase from *Sphingobium sp.* Strain SYK-6” *Plant Biotechnol. J.* 13, 821-832 (2015) doi:

- 10.1111/pbi.12316. 査読有
28. Tomita, S., Nemoto, T., Matsuo, Y., Shoji, T., Tanaka, F., Ono, H., Kikuchi, J., Ohnishi-Kameyama, M. and Sekiyama, S.\* "A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins" *Food Chem.* 174, 163-172 (2015) doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.028. 査読有
29. Watanabe, M.\*, Ohta, Y., Sun, L., Motoyama, N. and Kikuchi, J. "Profiling contents of water-soluble metabolites and mineral nutrients to evaluate the effects of pesticides and organic and chemical fertilizers on tomato fruit quality" *Food Chem.* 169, 387-395 (2015) doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.155. 査読有
30. Komatsu, T., Oishi, R., Shino, A. Akashi, K. and Kikuchi, J.\* "Multi-spectroscopic analysis of seed quality and <sup>13</sup>C-stable-isotopologue monitoring in initial growth metabolism of *Jatropha curcas* L. using stable-isotope labeling" *Metabolites* 4, 1018-1033 (2014) doi: 10.3390/metabo4041018. 査読有
31. Ogawa, D., Moriya, S., Tsuboi, Y., Date, Y., Prieto, A., Bapista, G., Yamane, T. and Kikuchi, J.\* "Biogeochemical typing of paddy field by a data-driven approach revealing sub-systems within a complex environment –A pipeline to filtrate, organize and frame massive dataset from multi-omics analyses" *PLoS ONE* 9, e110723 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0110723. 査読有
32. Yoshida, S., Date, Y. Akama, M. and Kikuchi, J.\* "Comparative metabolomic and ionic approach for abundant fishes in estuarine environments of Japan" *Sci. Rep.* 4, 7005 (2014) doi: 10.1038/srep07005. 査読有
33. Watanabe, T., Shino, A., Akashi, K. and Kikuchi, J.\* "Chemical profiling of *Jatropha* tissues under different torrefaction conditions: application to biomass waste recovery" *PLoS ONE* 9, e106893 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0106893. 査読有
34. Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J.\* "Noninvasive analysis of metabolic changes following nutrient input into diverse fish species, as investigated by metabolic and microbial profiling approaches" *PeerJ*, e556 (2014) doi: 10.7717/peerj.550. 査読有
35. Tokuda, T., Tsuboi, Y., Kihara, K. Saito, S. Moriya, S. Lo, N. and Kikuchi, J.\* "Metabolomic profiling of <sup>13</sup>C-cellulose digestion in a lower termite: insights into symbiont function" *Proc. Royal Soc. B.* 281, 20140990 (2014) doi: 10.1098/rspb.2014.0990. 査読有
36. Asakura, T., Date, Y. and Kikuchi, J.\* Comparative analysis of chemical and microbial profiles of estuarine sediments sampled from Kanto and Tohoku regions in Japan" *Anal. Chem.* 86, 5425-5432 (2014) doi: 10.1021/ac5005037. 査読有
37. Kato, T., Fukuda, S., Fujiwara, A., Suda, W., Hattori, M., Kikuchi, J. and Ohno, H.\* "Multiple omics uncovers host-gut microbial mutualism during prebiotic fructooligosaccharide supplementation" *DNA Res.* 21, 469-480 (2014) doi: 10.1093/dnares/dsu013. 査読有
38. Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J.\* "Integrated analysis of seaweed components in seasonal fluctuation by data mining across heterogeneous chemical measurements with network visualization" *Anal. Chem.* 86, 1098-1105 (2014) doi: 10.1021/ac402869b. 査読有
39. Yamazawa, A., Iikura, T., Morioka, Y., Shino, A., Ogata, Y., Date, Y. and Kikuchi, J.\* "Cellulose digestion and metabolisms induced biocatalytic transitions in anaerobic microbial ecosystems" *Metabolites.* 4, 36-52 (2014) doi: 10.3390/metabo4010036. 査読有
40. Date, Y., Nakanishi, Y., Fukuda, S. Nuijima, Y., Kato, T., Umehara, M., Ohno, H., and Kikuchi, J.\* "In vitro evaluation method for screening of candidate prebiotic foods" *Food Chem.* 152, 251-260 (2014) doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.126. 査読有
41. Yamazawa, A., Date, Y., Ito, K. and Kikuchi, J.\* "Visualizing microbial dechlorination processes in underground ecosystem by statistical correlation and network analysis approach" *J. Biosci. Bioeng.* 117, 305-309 (2014) doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.08.010. 査読有
42. Yang, Z., Nakabayashi, R., Okazaki, Y., Mori, T., Takamatsu, S., Torizuka, K., Kitanaka, S., Kikuchi, J., Saito, K.\* "Toward better annotation in plant metabolomics: Isolation and structure elucidation of 36 specialized metabolites from *Oryza sativa* by using MS/MS and NMR analyses" *Metabolomics* 10, 543-555 (2014) doi: 10.1007/s11306-013-0619-5. 査読有
43. 菊地淳 "分子複雑系" *NMR* 5, 78-82 (2014). 査読無
44. 菊地淳 "NMRにおけるイノベーション" *生化学会誌* 92, 561 (2014). 査読無
45. 菊地淳 "食の来た道還る道" *バイオインダストリー* 31, 37-44 (2014). 査読無
46. 小松功典、菊地淳 "複雑系高分子群に挑むバイオマス NMR の世界" *細胞工学* 33, 843-849 (2014). 査読無
47. 三澤拓真、伊藤研悟、菊地淳 "NMRで挑む複雑系の分子宇宙" *生化学会誌* 92, 504-510 (2014). 査読無
48. 菊地淳 "食と代謝のメタボノミクス" *実験医学* 32, 699-705 (2014). 査読無
49. 菊地淳 "安定同位体標識による生体分子混合物ならびに代謝経路解析" *生化学会誌* 92, 100-109 (2014). 査読無
50. Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S.\*, Endo, T., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K.,

- Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K.\* and Ohno, H\* “Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells” *Nature* 504, 446-450 (2013) doi: 10.1038/nature12721. 査読有
51. Komatsu, T. and Kikuchi, J.\* “Comprehensive signal assignment of 13C-labeled lignocellulose using multidimensional solution NMR and 13C chemical shift comparison with solid-state NMR” *Anal.Chem.* 85, 8857-8865 (2013) doi: 10.1021/ac402197h. 査読有
52. Komatsu, T. and Kikuchi, J.\* “Selective signal detection in solid-state NMR using rotor synchronized dipolar dephasing for the analysis of hemicellulose in lignocellulosic biomass” *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 2279-2283 (2013) doi: 10.1021/jz400978g. 査読有
53. Ogura, T., Date, Y. and Kikuchi, J.\* “Differences in cellulosic supramolecular structure of compositionally similar rice straw affect biomass metabolism by paddy soil microbiota” *PLoS ONE* 8, e66919 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0066919. 査読有
54. Yamazawa, A., Iikura, T., Shino, A., Date, Y., and Kikuchi, J.\* “Solid, solution and gas-state NMR monitoring of 13C-cellulose degradation in an anaerobic microbial ecosystem” *Molecules.* 18, 9021-9033 (2013) doi: 10.3390/molecules18089021. 査読有
55. Yamamura, M., Noda, S., Hattori, T., Shino, A., Kikuchi, J., Takabe, K., Tagane, S., Gau, M., Uwatoko, N., Mii, M., Suzuki, S., Shibata, D. and Umezawa, T. “Characterization of lignocellulose of *Erianthus arundinaceus* in relation to enzymatic saccharification efficiency” *Plant Biotechnol.* 30, 25-35 (2013) doi: 10.5511/plantbiotechnology.12.1127a. 査読有

〔学会発表〕(計 48 件)

〔図書〕(計 3 件)

1. 菊地淳 “微生物群集およびヒト超有機体のメタボノミクス” ヒトマイクロバイオーム研究の最前線 服部正平監修 429 頁 エヌティーエス出版 69-79 (2016)
2. 菊地淳 “セルロース系材料の構造多型性解析” セルロースナノファイバーの調製、分散・複合化と製品応用 535 頁 技術情報協会 377-389 (2015).
3. 菊地淳 “糖質の分析 核磁気共鳴法” 植物細胞壁 - 基礎と応用 349 頁 講談社 294-298 (2013).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：リグニンを分解する方法  
 発明者：土田博子、松本朋子、菊地淳、松井

南  
 権利者：土田博子、松本朋子、菊地淳、松井  
 南  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：2016年3月26日  
 国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/bas/>

6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 菊地 淳 (Jun KIKUCHI)  
 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・チームリーダー  
 研究者番号：00321753