

# メタボロミクスとメタボノミクス

吉田 欣史, 久原 とみ子, 菊地 淳

本進歩総説は2006年1月から2009年1月までの進歩について記述した。

## 1 はじめに

メタボロミクス・メタボノミクスとは生命活動によって生じる特異的な内因性代謝物を網羅的に検出・解析し、生体内のメカニズムを調べる研究分野である。代謝物は遺伝子、タンパク質に比べ、表現型に直結することから近年注目度が高い。計測ターゲットは、分子量1000までの低分子化合物と言われる。具体的には、糖、アミノ酸、有機酸、ペプチド、脂肪酸などが対象となる。

近年注目を浴びている一つの指標として、多くの研究者が憧れる Nature Publishing Group, 米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 略称: PNAS) といった高インパクトファクター (I.F.) 誌に続々と報告されている事実からもうかがえる<sup>1)~6)</sup>。それらの中でも多くの反響を得ている内容は、システムバイオロジーとも呼ばれる他のオミクスとの相関解析法である。例として、ゲル変性電気泳動で得られた中国人家系の腸内細菌叢の菌体 DNA 群バンド<sup>4)</sup>、交配2世代目の123匹のラットの SNP (single nucleotide polymorphisms, 一塩基置換多型性) マーカーから得られた QTL (量的遺伝形質座) 値<sup>5)</sup>、ラット血清の二次元電気泳動から得られたタンパク質群バンド<sup>7)</sup>、ラット肝臓の発現遺伝子と尿中代謝物の相関<sup>8)</sup>が考察されている報告がある。このような動向に応じて、マイクロアレイ等の発現遺伝子とメタボロームで得られた代謝物増減量を統合的に解析するために、MetaCore のようなソフトウェア開発も進められている。

その他の応用分野として、製薬企業における新規候補化合物の毒性マーカー探索や安全性評価系の構築を始め<sup>9)</sup>、臨床研究における診断ツール<sup>9)</sup>、食糧生産性向上<sup>10)</sup>、化石資源からの転換を図るバイオリファイナ

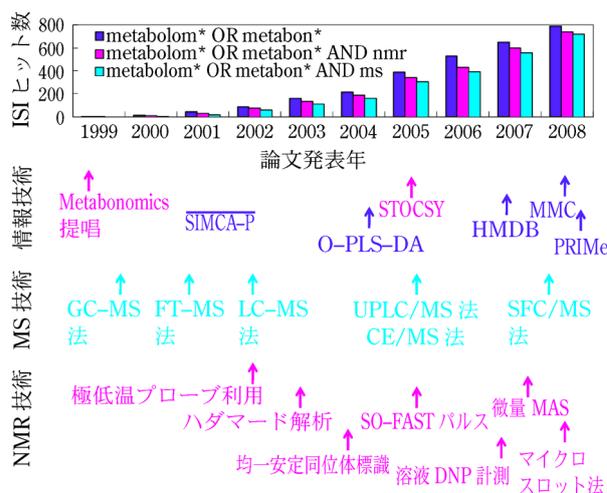


図1 引用論文-テクノロジーの年表

リー<sup>11)</sup>、地球環境評価<sup>12)</sup>など多方面で様々な用途に活用されている。図1に示すとおり、年々分析装置の改良に伴い、ISI Essential Science Indicators 論文投稿数は急増している。

## 2 メタボロミクスとメタボノミクス

一般にメタボロミクスとメタボノミクスという2通りの呼び方がある。本研究の第一人者 Dr. Jeremy. K. Nicholson は、メタボノミクスは“多細胞システムの病態生理学的刺激または遺伝子的修飾に対する多変量代謝的レスポンスの定量測定” (図1)、メタボロミクスは“代謝物の濃度および細胞内流量の測定” “単一システム内の代謝物と経路の測定およびモデル化”などに該当すると定義している<sup>13)</sup>。ここでは、代謝混合物を構成する個々の要素 (代謝産物) の同定と定量に重きをおくメタボロミクスと、系の代謝変動全体のバランス比較を中心とするメタボノミクスとの研究哲学の違いが表れている<sup>14)</sup>。

## 3 世界的な動向

メタボロミクス・メタボノミクスはここ数年で急速に様々な分野に影響を与えてきた。

医薬品開発では、米国食品医薬品局 (FDA) が2004

年に Critical Path Initiative , 2006 年に Critical Path Opportunities を発表した。この中で効率的な治療薬の創製と活用, 疾病診断への応用にバイオマーカーが非常に重要視<sup>15)</sup>されており, ゲノミクス, プロテオミクスと同様にメタボロミクス・メタボノミクスの重要性を述べた文献も FDA から提出されている<sup>16)</sup>。これに同調するように, 2002 年から欧州の大手製薬企業とインペリアルカレッジの計 6 機関で 147 化合物をラットに与え, *in vivo* での毒性スクリーニングを目的に尿の代謝変動を調べた COMET プロジェクト<sup>17)</sup>, 2006 年から遺伝子・タンパク質・代謝物の変動発現による毒性メカニズム研究を目的とした COMET II プロジェクトが実施されている<sup>15)</sup>。

臨床基礎研究では, 2007 年カナダのアルバート大学主催ヒューマンメタボロームデータベースプロジェクト (HMDB) が実施され, ヒト生体試料中に代謝物 2500, 薬品 1500, 食物由来成分 3500 に関する報告が行われた。同大学は, 2009 年 1 月現在で代謝物 6500, タンパク質 1500, 食物由来成分 2000, FDA 承認済み薬物 1500 がリンクする Human Metabolome Database (HMDB) を管理・運営している<sup>18)</sup>。植物基礎研究分野では世界的にトマトプロジェクトが実施されており, 国内ではかずさ DNA 研究所, 理化学研究所なども一部かかわっている。

2008 年に脚光を浴びた報告として, INTERMAP プロジェクト<sup>19)</sup>がある。これは米英中日の 4 か国の研究者らと 4630 人もの尿サンプルを採取し, 食事習慣と高血圧との関係を見いだした。サンプルは, 遺伝的背景, 食事習慣, 腸内細菌叢などのあらゆるパラメーターが含まれているが, 全体の代謝変動バランスを解析すると, たった 2 種の代謝物 (アラニンと馬尿酸) が, 高血圧の代謝マーカーになり得るという非常に興味深い報告がされた<sup>2)</sup>。

これ以外にも海洋分野では魚・貝類が環境変動に左右するという知見から, 環境メタボロームの国際プロジェクトが計画されている<sup>12)</sup>。

## 4 測定装置

スペクトルを取得できる装置であれば, NMR, MS, IR, Raman などが使用可能である。当初 NMR が主流であったが, 近年の傾向として NMR, LC/MS, GC/MS など複数の装置を組み合わせるケースが目立つ<sup>20)21)</sup>。国内では CE/MS も利用されている。現在一般に使用されている装置を利点・不利点を含め下記に列挙する。

### 4・1 核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance: NMR)

研究当初から用いられている装置である。利点として

NMR は高い網羅性を持ち, 短時間分析が可能である<sup>22)</sup>。NMR 法の場合は計測法が多彩であることに大きな特徴があり, 用いるプローブにより溶液 NMR, 高分解能 (hr) マジック角回転 (MAS) 法, 固体 NMR 法, 磁気共鳴イメージング (MRI) 法に大別される。この中でも組織の非侵襲計測が可能な hr-MAS 法の報告例は多い<sup>3)23)24)</sup>。観測核としては <sup>1</sup>H 核の 1D-NMR 計測が行われることが一般的であるが, 同じ試料でもパルス系列を分けて用いることにより, 運動性の高い低分子物質のみ (cpmg 法), 比較的運動性の低いタンパク質や超分子化した脂質 (diffusion-edited 法), これら両方 (presaturation, Watergate) を検出することができる。

また, 計測試料を <sup>13</sup>C 標識化することで, タンパク質の立体構造決定で用いられてきたような種々の異種核計測パルス系列を利用できる。<sup>13</sup>C-HSQC, HCCH-COSY, HCACO といった計測法がそれに値する<sup>25)</sup>。標識化の手法としては, <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 無水酢酸のような反応性の高い試薬で化学修飾するアプローチ<sup>26)</sup>と, <sup>13</sup>C<sub>6</sub> グルコースのような安価で代謝経路全体に炭素が流れる試薬を一定期間の栄養源として, 生物を飼育する手法が挙げられる<sup>27)28)</sup>。

他方, NMR 法の不利点として低感度が挙げられる。一般的な感度上昇法は高磁場化であるが<sup>29)</sup>, 予算面・汎用面で難がある。図 2 で示すように様々な改良が検討されており, ハードウェア開発に頼らずに計測時間を短縮する手法として, ハダマード法や SO-FAST パルス系列に代表される, 高速計測法が挙げられる<sup>22)</sup>。一方で, ハードウェア開発にも種々の可能性があり, 同じ磁場強度でもスプリットマグネットとソレノイドコイルの併用で世界最高感度を達成させる試みが日立製作所で進められており, プローブ素材に高温超伝導素材が採用されている<sup>30)31)</sup>。ほかにも, プローブ部分を改善する方法もある。検出システムを 20 K 程度に冷却し, 熱ノイズを抑える極低温プローブは良く流通している<sup>22)</sup>。極低温プローブの場合は更に冷却温度を落とし, 誘電損失の低い溶媒系を利用する<sup>32)</sup>, 対流やラジオ波の透過性を

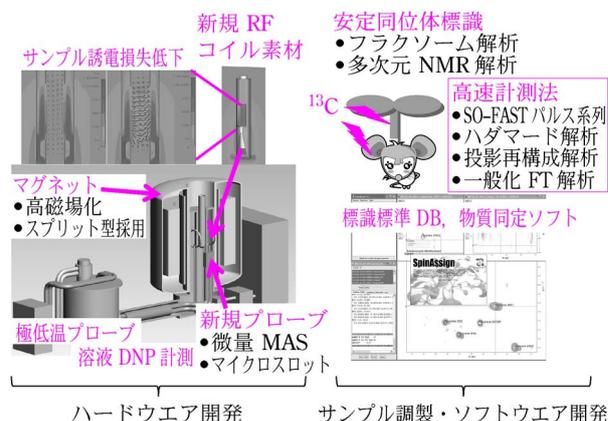


図 2 NMR 技術開発の進歩

計算して、試料管デザインを工夫する<sup>33)</sup>といった努力によっても SN 比向上が望める。

新しい取り組みとして、サンプル量低減化による微量試料検出は、ラジオ波コイルも回転させる MAS プローブの開発がある<sup>34)</sup>。また、電子スピンから核スピンへのエネルギー遷移で圧倒的な感度上昇を可能とする DNP (dynamic nuclear polarization) 法は従来は固体 NMR でしか適用されていなかったが、最近では溶液 NMR や化学シフトイメージングにも利用され始めている<sup>22)</sup>。別のプローブ開発では、マイクロスロット法という試料管を使わずに検出コイルに直接試料を添加する方法も注目される<sup>35)</sup>。これはコイルから試料へのフィリングファクターがほぼゼロなため、単位量あたりの感度が著しく向上している。将来的には多検体試料を同時計測できる可能性をも示唆されている<sup>36)</sup>。

#### 4.2 mass spectrometry (MS)

この数年、MS を用いたメタボロミクス・メタボノミクスが急速に普及した。理由は高感度分析が可能で、装置価格が NMR より比較的安価なためである。不利点としては、イオンサプレッションにより感度やイオン強度の再現性が低減する。これを回避するため、当初取り組まれていた FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance, フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴) MS による直接導入法よりも、LC (液体クロマトグラフ)、GC (ガスクロマトグラフ)、CE (キャピラリー電気泳動) などのクロマトグラフを接続した MS が一般に普及してきた。イオン化抑制の影響を反映する可能性が高い MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization)-MS は報告がほとんどない。MS の種類としては、定量・定性の両面が対応できる機種が必要となる<sup>37)</sup>。また、プロテオミクスで一般に行われる Mascot によるデータベース検索のような確立した同定法がないため、発見された化合物の精密質量が得られ、組成演算が可能で高分解能 MS が一般的に用いられる。結果的にシングル ToF (飛行時間型質量分析計) もしくは Q-ToF MS (四重極-飛行時間型質量分析計) が採用されるケースが多い<sup>37)</sup>。

#### 4.3 クロマトグラフィー

##### 4.3.1 LC/MS

近年、世界的に最も注目を浴びている分析手法の一つである。利点としては、LC は多くの文献・知見が豊富にあり、カラムを変えることで測定したい化合物の測定範囲を広げられる。不利な点としては、アミノ酸・脂肪酸・糖などを一つのカラムと一つの分析条件ですべて保持させることは難しく、網羅的にモニターするにはいくつものカラムと分析条件が必要となる。イオン化は ESI が一般的である。

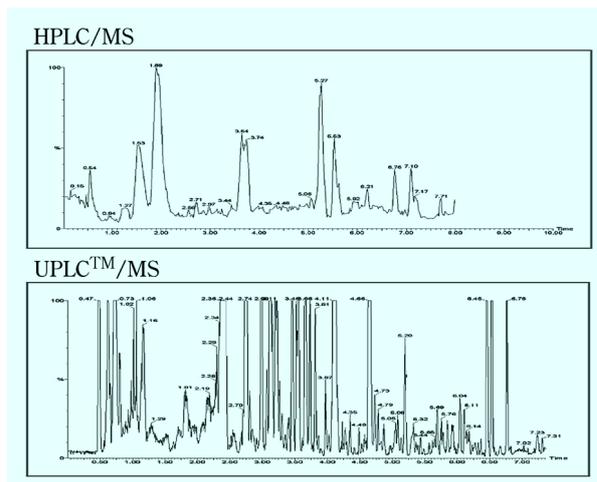


図3 HPLC/MS (上) 及び UPLC™/MS (下) 比較結果 (サンプル: ラット尿)

LC/MS の技術革新として 2004 年に ultra performance LC (UPLC) の登場が非常に大きい<sup>38)</sup><sup>39)</sup>。原理は、エチレン架橋を施した高耐圧性のハイブリッドシリカ充填剤を開発し、1.7  $\mu\text{m}$  の粒子径を高圧充填させた高理論段数カラムと高背圧に耐えうるハードウェアを合致させたテクノロジーである。結果、通常の HPLC と比べ、測定時間 1/10、高感度 3 倍、高分離能 2 倍を実現した。図 3 にも示すように MS のインレットとして使用した場合、測定時間の短縮はもとより、従来より問題とされてきたイオン化抑制を低減し、検出可能なピーク数と再現性を劇的に改善された。比較評価の例として、Jeremy K. Nicholson 氏は尿分析で 900 MHz-NMR と UPLC/MS が同等の感度との報告<sup>40)</sup>、Ian D. Wilson らはマウス尿を用いて HPLC と UPLC の比較評価を行い、劇的な感度向上を報告した<sup>41)</sup>。これらの改善などにより様々な報告がされており、UPLC/ToF MS を用いた毒性メカニズムの検証<sup>21)</sup><sup>42)</sup>、国立医薬品食品衛生研究所食品部が国内で死亡例が出たスギヒラタケ脳症の原因追究でビタミン D3 類縁体の発見<sup>43)</sup>、実用的なところでは、味の素社が病気の診断ツールとして 2002 年特許取得済みのアミノインデックス法があり、同法で醤油中の 49 種アミノ酸を含む 137 物質の報告がある<sup>44)</sup>。脂肪酸分析では二重結合の位置及び鎖長の長さにより逆相で分離が可能であり、中西氏・田口氏らは酸化ストレスによる酸化されたフォスファチジルコリン分析に UPLC/MS を利用している<sup>45)</sup>。

##### 4.3.2 GC/MS

GC/MS は 1970 年代から植物・動物を問わず、広く利用されてきた分析法である。利点は、分離能・感度・特異度に優れ、NIST (National Institute of Standards and Technology, 国立標準技術研究所) の EI (electron ionization, 電子イオン化法) ライブラリーで多くの化合物が容易に同定できる。不利な点として、一般に誘導

体化を含む前処理が必要で、トリメチルシリル化が現在も広く用いられる<sup>46)47)</sup>。GC/MSに不可欠な前処理は煩雑との印象が根強いようであるが、久原らの手法では尿や血漿、肝細胞抽出液などの前処理は30検体を2時間で完了する。1種類のカラムを用い、1回の測定でヒト尿0.1 mLから、計測条件にもよるが容易に600~1000のピークが分割できる。ただし、このような前処理によっても熱分解する化合物は測定できないため、これらの化合物についてはLC/MSなどで補完する。

GC/MSは30年前から有機酸血症と呼ばれる一群の先天性代謝異常症の確定診断に必須の手法として活用されてきた歴史があり、実用的な報告も多い。臨床応用例では、久原らが経中心静脈栄養(TPN)下における葉酸拮抗剤投与ががん患者の代謝応答についての報告<sup>48)</sup>があり、個別化医療へのメタボローム解析の有用性を示唆<sup>48)</sup>している。尿を用いた130種類の先天性・後天性代謝異常の化学診断法も全国の患者の診断支援に活用されている<sup>49)</sup>。

海外に目をむけると、GC-ToF MSを用いた血漿中の内因性代謝物の網羅解析<sup>50)</sup>や、二次元GC-ToF MSによる肥満型ネズミとやせ型ネズミの脾臓抽出液を用いた報告がある<sup>51)</sup>。

#### 4.3.3 CE/MS

世界的にはまだ実用例が比較的少ない分析手法である。富田・曾我らが立ち上げた手法であり、CE/MS法として特に国内で注目度が高い<sup>52)53)</sup>。利点は、イオン性の化合物であれば分離が可能であるという点である。生体成分中の85%はイオン性であるという報告もある。不利な点は、温度変化によりマイグレーションタイムの誤差が発生しやすく、他のクロマトグラフィーに比べ変動幅が大きい。一般的に統計解析でマーカー探索を行う場合は致命的な欠点となる。これを改善するために、曾我らは解析ツールとしてdifferential analysis of metabolome profiling (DAMP)と呼ばれるソフトウェアを開発した<sup>53)</sup>。最近では陰イオン、陽イオン、ヌクレオチド類に分析条件をわけたメソッドも開発した<sup>52)</sup>。これらの改善により、アセトアミノフェンによる急性肝炎のバイオマーカーの発見<sup>54)</sup>、大腸菌の細胞としての頑健性を証明した報告などがある<sup>55)</sup>。国内外含め今後の発展が期待される。

#### 4.3.4 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC)/MS

注目されている新しい分析手法の一つである。超臨界流体を移動相として用いるSFC<sup>56)</sup>は、開発当初、高速・高解像度の分離手段として注目されたが、その利用範囲は光学活性体の分離にとどまっていた。最近、馬場らにより各種脂質混合物の一斉分析系が構築され<sup>57)58)</sup>、脂肪酸をターゲットとしたリピドミクスへの

応用が期待されている。利点として、移動相として用いる超臨界二酸化炭素の特性により、他の分離手段では不得意な疎水性化合物の分離に特に威力を発揮する。また、SFC/MSは超臨界流体抽出との実用的なオンライン化が可能であり、通常の溶媒抽出では不安定な代謝物の分析に対応できる点も大きい。不利な点として、極性化合物の分離や質量分析計との接続が挙げられる。今後の検討により幅広い分野への利用が期待される。

## 5 サンプリング

### 5.1 サンプルの種類

研究目的により多岐に渡る。動物では尿、血液を始め、血漿・血清・脳髄液など体液だけでなく、臓器をホモジナイズ・成分抽出した例がある。植物の場合、葉・豆・茎・果実もよく取り扱われる。

### 5.2 サンプル・前処理

サンプルは回収後すぐに凍結乾燥もしくは $-80^{\circ}\text{C}$ 条件下に保管することが望ましい。必要サンプル数としては個体差が存在するため、複数個のサンプルを用意する。一般的には統計的に $n=6$ が必要といわれる。分析も装置の日間変動を防ぐために一度に分析することが望ましい。

前処理はサンプルにより若干異なる。注意すべき点としては、固層抽出法や液層分配法などを安易に用いないことである。理由は、測定対象とする化合物が取り除かれる危険性があるからである。コーヒー豆やキノコなどの場合、粉末にしてアセトニトリルで成分抽出、ビールなどの製造加工品は脱気をしてそのまま分析に用いている<sup>59)</sup>。尿・血漿など生体試料を分析する場合はアセトニトリルを加え除タンパク質の後、希釈して分析を行う。サンプルの必要量は装置により異なるが、数 $\mu\text{L}$ ~500  $\mu\text{L}$ 程度が必要とされる<sup>63)</sup>。

## 6 解析方法

測定により得られたスペクトルを解析するとき、最初膨大な情報量に直面することになる。その際、違いだけを明確に抽出する手法として統計解析を用いるケースが一般的である。一般的な流れを図4に示した。統計解析手法として、主成分分析(PCA)、部分的最小二乗法(PLS)、階層的クラスター分析(HCA)などがある。一般に事前情報なしで行え、取り扱いしやすいことからPCAを用いるケースが多い。解析ソフトウェアはwebで無料配布しているものから、ソフトウェア会社が販売しているものもある。論文引用されている代表的なソフトウェアとして、Pirouetteソフトウェア(国内販売元:GLサイエンス社)やSIMCA-P+ソフトウェア(国内販売元:インフォコム社)がある。最近ではマーカー探索においてUmetrics社が特許を持つOPLS-DA法を用

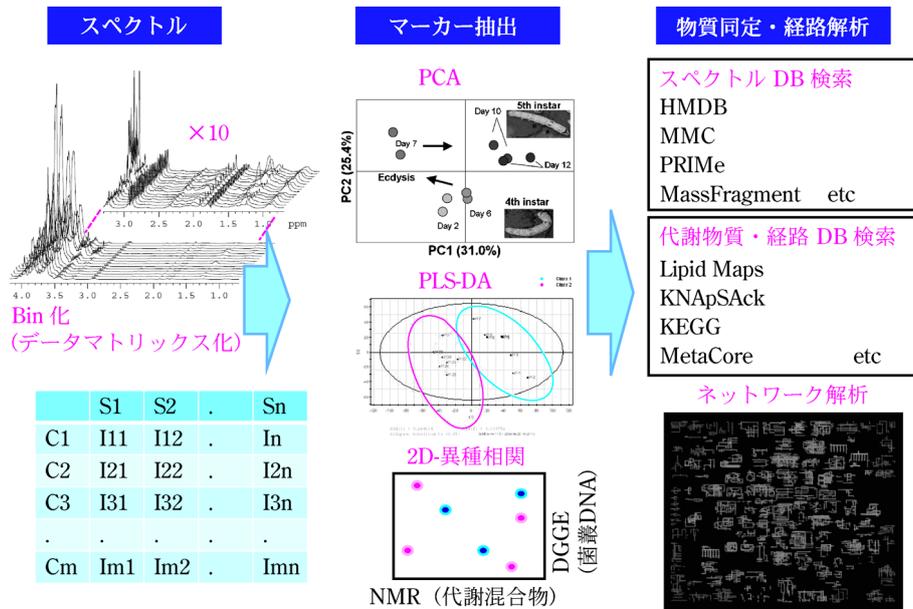


図4 スペクトルから解析の流れ～インフォマティクス～

いるケースが目立つ。この解析法は SIMCA-P+ 及び EZinfo ソフトウェアに搭載されている。

また、装置メーカーが統計解析ソフトウェアを提供しているケースもある。NMR 用 ALICE2 for Metabolome (日本電子社製), MS 用としては GeneSpringMS (アジレント社製), Profiler (フェノメノム社製), MarkerView (アプライドバイオシステム社製), MarkerLynxXS (Waters 社製) などがある。

## 7 化合物同定

化合物の同定は、メタボロミクス・メタボノミクスを行う最も大変な作業の一つである。NMR と MS を分け、順に列挙する。

NMR を用いた場合、一定物理化学条件 (pH, 温度, イオン強度) で計測すれば、標準品と同等の化学シフト値が得られる。標品データベースを参照しながらアノテーションが進められる<sup>25)60)</sup>。加えて、bin (0.04 ppm 程度の一定間隔でシグナル強度を積分した数値) 化する前の生データを見直して、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H カップリングのパターンから局所構造を推定することも重要である。さらに、大概の代謝物は 1 化合物あたり平均 2~3 個程度の <sup>1</sup>H シグナルが得られるために、これらの強度比の情報もアノテーションには利用されている<sup>61)</sup>。同じ考え方を大量スペクトルの統計的解析から行う方法が、STOCSY (statistical total correlation spectroscopy) である<sup>62)63)</sup>。メタボノミクスでは大量にサンプルを計測し、その間の変動を解析するため、同一化合物内の複数のシグナルは、全く同じ傾向で上昇、下降を繰り返すことを利用し、あたかも TOCSY (total correlation spectroscopy) の相関スペクトルのごとく、シグナル帰属を行うのである<sup>63)</sup>。

4・1 で述べたように <sup>13</sup>C 核も利用し、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC の二次元 NMR スペクトルでアノテーションを行う場合は、シグナルの分散が比較的良くアノテーションも容易になる。さらに、同一物理化学条件下で計測した <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C データベース (PRIME, HMDB, MMC が web 公開) が充実し始めてきたために<sup>18)60)64)</sup>、新規に研究者が参入しやすくなったことも特筆できる。菊地らは、動植物を含めた高等生物に対する <sup>13</sup>C 標識技術を開発している<sup>65)66)</sup>。標識率が高くなれば三次元 NMR で用いる HCCH-COSY のような実験が短時間で計測でき、二次元 NMR 上でオーバーラップしていても確度の高いシグナル帰属が可能となる<sup>25)</sup>。

MS の場合、NIST の EI ライブラリーが使用できる GC/MS は除き、ESI 及び APPI, APCI などのソフトなイオン法を用いる際は確立した方法はない。一番良い方法は、化合物を単離し、NMR により構造解析を行う方法である。残念ながら、高感度 MS で見つかる化合物は極微量であり NMR で測定可能な量を取得することが難しい。結果、MS による追加のアプローチを検討する。いくつかの手法を述べる。

一つ目に、プリカーサーイオンの精密質量情報を用いてデータベース検索を行う方法である<sup>37)</sup>。これは 1 次代謝物の場合に有効な手段である。データベースは web 上で無料アクセスできるものから、有料サイトまで様々ある。代表的なところでは、1 次代謝と代謝パスウェイがリンクしている京都大学 KEGG、脂肪酸・脂質をターゲットに登録されている Lipid Maps、ヒト代謝物を中心に登録されているアルバート大学のヒト HMDB、農産物中の成分が登録されている Food and Agriculture society、1~4 アミノ酸までの配列がすべて登録されている Peptide などがある。同規模のサイトは

世界中に散在しているが、近年、それらを取りまとめた ChemSpider と呼ばれる web サイトが登場し、この方法は行いやすくなった。測定された化合物の精密質量、測定誤差範囲を入力し検索を行う。ヒットした結果と実測スペクトルを同位体存在比まで加味させた組成演算結果を見比べて候補を減らす。通常マニュアル作業であるが、Waters 社製 MarkerLynxXS は同作業を一括自動処理が可能である。この方法は擬陽性の心配が残る。そこで MS/MS のフラグメントイオンを用いて確認が必要となる。一般には標準品を入手し開裂パターンと保持時間が一致するかどうかで判断する。

最近では、データベース等で推定された構造式と MS/MS スペクトルが合致するかどうかをソフトウェアで検証する手法も出てきた。論文に記載されている開裂パターン情報を軸に検証する ACD MassFragmenter (富士通株製) やフラグメントイオンを一度組成演算させ、推定される化合物の構造上で一致するかを自動シミュレーションさせる MassFragment (Waters 社製) がそれに該当する。このようなソフトウェアの登場は、標準品が準備できない場合にも対応可能であり、また深い専門知識が要求される MS を用いた化合物の構造解析を実用的にした良いツールである。

二つ目の手法は、MS/MS スペクトルライブラリーの活用である。国内でも慶応大学を始め、理化学研究所横浜、かずさ DNA 研などが植物・動物細胞中に含まれる化合物の MS/MS スペクトルをライブラリー化している。理研 松田氏らが発表しているモデル植物シロイナズナの 2 次代謝物 MS/MS ライブラリー (MS2T)<sup>67)</sup>、奈良先端大 金谷氏らが植物を中心に作成した KNAp-SACK, JST-BIRD から西岡氏らによる 1 次代謝・2 次代謝を中心とした MassBank などがある。MassBank には質量分析学会も一部スペクトルを提供している。ただし、基本的な問題点が二つある。一つ目に機種及び機器メーカーごとに開裂パターンが異なること、二つ目に、登録されていない代謝物・化合物が多数存在することである。

## 8 受託分析会社

世界的には世界規模の製薬メーカーとコラボレーションしている英 Metabotrix 社、米 Metabolon 社、加 Phenomenome Discoveries 社が有名である。国内では手法ごとに分類できる。NMR は東レリサーチ(株)、LC/MS はジナリス(株)・(株)JCL バイオアッセイ、CE/MS は慶応大発ベンチャー Human Metabolome Technologies 社が有名である。GC/MS は金沢医科大学 総合医学研究所 人類遺伝学研究部門 生化学で受託を行っている。各社とも受託分析結果には定評がある。

ただし、サンプルを送付すると必ずしもマーカー化合物の報告や、今まで示唆されていなかった代謝経路が明

らかになるとは限らない。最終的なメカニズムを知るためには多くの学者の見解と十分な検証及び多角的な考察から結論を出すべきであることをご留意いただきたい。

## 9 最新のトレンド・新概念

一つは代謝フラックス解析である。実際、系の時間変動や変異体との比較等はかなり細かく調べないと、実験データとして計測された代謝変動の裏に隠れる酵素の発現量といった活性変化を解析することが難しい。しかし安定同位体を追跡した代謝フラックスの情報は、こうした関連する酵素群の代謝活性情報を含んでいるために、今後益々注目されていくと考えられる<sup>28)37)</sup>。

また、タンデム MS/MS を用いたターゲットメタボロミクスも面白い。平井・澤田らは UPLC/タンデム四重極 MS を用いた約 800 化合物の一斉分析を発表した<sup>68)</sup>。網羅解析で陥りやすいゴールへの不透明感をなくし、定量分析で一般に用いられる装置で行ったことは、これから研究を始めたい方のハードルを下げた良いアプローチといえる。

## 10 まとめ

メタボロミクス・メタボノミクスは分析装置と統計解析を融合させた新しいサイエンスでありながら、深い歴史を持つ代謝、薬理、毒性、有機化学、分析化学で培われた知識・経験がそれを支えている。先駆的な研究でありながら、古い文献で裏付けを取る温故知新ともいえる研究分野である。社会が抱える様々な課題や問題に対して、創薬<sup>1)8)69)70)</sup>、医療<sup>6)9)71)72)</sup>、食生活<sup>73)~76)</sup>、食糧増産<sup>10)77)78)</sup>、地球環境<sup>79)~81)</sup>、エネルギー創製<sup>82)83)</sup>、物質生産<sup>84)~86)</sup>などへの試みが行われている。本稿で述べた新しいサイエンスがその一端を担い、より良い未来が訪れることを切に願う。

最後に、本稿を執筆するにあたり、大阪大学大学院工学研究科 馬場先生、理化学研究所メタボローム基盤研 松田先生・澤田先生をはじめ第一線で活躍されている多くの研究者の皆様にご協力をいただき深く感謝致します。

### 文 献

- 1) T. A. Clayton, J. C. Lindon, O. Cloarec, H. Antti, C. Charuel, G. Hanton, J. P. Provost, J. L. Le Net, D. Baker, R. J. Walley, J. R. Everett, J. K. Nicholson: *Nature*, **440**, 1073 (2006).
- 2) E. Holmes, R. L. Loo, J. Stalmer, M. Bictash, I. K. Yap, Q. Chan, T. Ebbels, M. De Iorio, I. J. Brown, K. A. Veselkov, M. L. Daviglus, H. Kesteloot, H. Ueshima, L. Zhao, J. K. Nicholson, P. Elliott: *Nature*, **453**, 396 (2008).
- 3) B. J. Blaise, J. Giacomotto, B. Elena, M. E. Dumas, P. Toulhoat, L. Segalat, L. Emsley: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19808 (2007).
- 4) M. Li, B. Wang, M. Zhang, M. Rantalainen, S. Wang, H. Zhou, Y. Zhang, J. Shen, X. Pang, M. Zhang, H. Wei, Y.

- Chen, H. Lu, J. Zuo, M. Su, Y. Qiu, W. Jia, C. Xiao, L. M. Smith, S. Yang, E. Holmes, H. Tang, G. Zhao, J. K. Nicholson, L. Li, L. Zhao: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2117 (2008).
- 5) M. E. Dumas, S. P. Wilder, M. T. Bihoreau, R. H. Barton, J. F. Fearnside, K. Argoud, L. D'Amato, R. H. Wallis, C. Blancher, H. C. Keun, D. Baunsgaard, J. Scott, U. G. Sidelmann, J. K. Nicholson, D. Gauguier: *Nat. Genet.*, **39**, 666 (2007).
  - 6) E. Holmes, I. D. Wilson, J. K. Nicholson: *Cell*, **134**, 714 (2008).
  - 7) M. Rantalainen, O. Cloarec, O. Beckonert, I. D. Wilson, D. Jackson, R. Tonge, R. Rowlinson, S. Rayner, J. Nickson, R. W. Wilkinson, J. D. Mills, J. Trygg, J. K. Nicholson, E. Holmes: *J. Proteome Res.*, **5**, 2642 (2006).
  - 8) E. Y. Xu, A. Perlina, H. Vu, S. P. Troth, R. J. Brennan, A. G. Aslamkhan, Q. Xu: *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 1548 (2008).
  - 9) A. Vehtari, V. P. Makinen, P. Soininen, P. Ingman, S. M. Makela, M. J. Savolainen, M. L. Hannuksela, K. Kaski, M. Ala-Korpela: *BMC Bioinform.*, **8** (Suppl 2), S8 (2007).
  - 10) R. A. Dixon, D. R. Gang, A. J. Charlton, O. Fiehn, H. A. Kuiper, T. L. Reynolds, R. S. Tjeerdema, E. H. Jeffery, J. B. German, W. P. Ridley, J. N. Seiber: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8984 (2006).
  - 11) A. J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, Jr., J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, T. Tschaplinski: *Science*, **311**, 484 (2006).
  - 12) M. R. Viant, D. W. Bearden, J. G. Bundy, I. W. Burton, T. W. Collette, D. R. Ekman, V. Ezernieks, T. K. Karakach, C. Y. Lin, S. Rochfort, J. S. De Ropp, Q. Teng, R. S. Tjeerdema, J. A. Walter, H. Wu: *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 219 (2009).
  - 13) J. K. Nicholson, J. C. Lindon, E. Holmes: *Xenobiotica.*, **29**, 1181 (1999).
  - 14) J. K. Nicholson, E. Holmes, J. C. Lindon, I. D. Wilson: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1268 (2004).
  - 15) “規制動向調査報告書 創薬プロセスの革新に向けて—医薬品におけるバイオマーカーの探索と活用” 第1章1-6, (2008), (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団).
  - 16) L. K. Schnackenberg, R. D. Beger: *Toxicology Mechanisms and Methods*, **18**, 301 (2008).
  - 17) T. M. Ebbels, H. C. Keun, O. P. Beckonert, M. E. Bollard, J. C. Lindon, E. Holmes, J. K. Nicholson: *J. Proteome Res.*, **6**, 4407 (2007).
  - 18) D. S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M. A. Coutouly, I. Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D. Block, D. D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo, Y. Zhang, G. E. Duggan, G. D. Macinnis, A. M. Weljie, R. Dowlatabadi, F. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B. D. Sykes, H. J. Vogel, L. Querengesser: *Nucleic Acids Res.*, **35**, 521 (2007).
  - 19) M. E. Dumas, E. C. Maibaum, C. Teague, H. Ueshima, B. Zhou, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, J. Stamler, P. Elliott, Q. Chan, E. Holmes: *Anal. Chem.*, **78**, 2199 (2006).
  - 20) J. Sun, L. K. Schnackenberg, R. D. Holland, T. C. Schmitt, G. H. Cantor, Y. R. Dragan, R. D. Beger: *J. Chromatogr. B*, **871**, 328 (2008).
  - 21) C. Chen, K. W. Krausz, J. R. Idle, F. J. Gonzalez: *J. Biol. Chem.*, **283**, 4543 (2008).
  - 22) 菊地 淳：“メタボロミクスの先端技術と応用”, 福崎英一郎編 p. 86 (2007), (CMC 出版).
  - 23) 菊地 淳：植物の生長調節, **43**, 144 (2008).
  - 24) 菊地 淳, 森 哲哉, 雪 真弘, 西原 崇, 佐藤 一, 甲野裕之：ブレインテクノニュース, **124**, 16 (2007).
  - 25) E. Chikayama, M. Suto, T. Nishihara, K. Shinozaki, T. Hirayama, J. Kikuchi: *PLoS ONE*, **3**, e3805 (2008).
  - 26) N. Shanaiah, M. A. Desilva, G. A. Nagana Gowda, M. A. Raftery, B. E. Hainline, D. Raftery: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11540 (2007).
  - 27) C. Tian, E. Chikayama, Y. Tsuboi, T. Kuromori, K. Shinozaki, J. Kikuchi, T. Hirayama: *J. Biol. Chem.*, **282**, 18532 (2007).
  - 28) Y. Sekiyama, J. Kikuchi: *Phytochemistry*, **68**, 2320 (2007).
  - 29) T. Kiyoshi, H. Maeda, J. Kikuchi, Y. Ito, H. Hirota, S. Yokoyama, S. Ito, T. Miki, M. Hamada, O. Ozaki, S. Hayashi, N. Kurihara, H. Suematsu, M. Yoshikawa, S. Matsumoto, A. Sato, H. Wada: *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, **14**, 1608 (2004).
  - 30) M. Okada, H. Kitaguchi: *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, **18**, 878 (2008).
  - 31) K. Maki, T. Wakuda, M. Tsuchiya, S. Kido, H. Tsukamoto, K. Takeuchi, M. Okada, H. Kitaguchi: *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, **18**, 844 (2008).
  - 32) T. Horiuchi, M. Takahashi, J. Kikuchi, S. Yokoyama, H. Maeda: *J. Magn. Reson.*, **174**, 33 (2005).
  - 33) M. W. Voehler, G. Collier, J. K. Young, M. P. Stone, M. W. Germann: *J. Magn. Reson.*, **183**, 102 (2006).
  - 34) D. Sakellariou, G. Le Goff, J. F. Jacquinet: *Nature*, **447**, 694 (2007).
  - 35) H. G. Krojanski, J. Lambert, Y. Gerikalan, D. Suter, R. Hergenroder: *Anal. Chem.*, **80**, 8668 (2008).
  - 36) Y. Maguire, I. L. Chuang, S. Zhang, N. Gershenfeld: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9198 (2007).
  - 37) K. Dettmer, P. A. Aronov, B. D. Hammock: *Mass Spectrometry Reviews*, **26**, 51 (2007).
  - 38) I. Citova, L. Havlikova, L. Urbanek, D. Solichova, L. Novakova, P. Solich: *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 675 (2007).
  - 39) P. D. Rainville, C. L. Stumpf, J. P. Shockcor, R. S. Plumb, J. K. Nicholson: *J. Proteome Res.*, **6**, 552 (2007).
  - 40) 第4回 Waters メタボロミクスフォーラム講演要旨集, J. K. Nicholson 講演資料, (2006).
  - 41) I. D. Wilson, J. K. Nicholson, J. Castro-Perez, J. H. Granger, K. A. Johnson, B. W. Smith, R. S. Plumb: *J. Proteome Res.*, **4**, 591 (2005).
  - 42) D. J. Crockford, E. Holmes, J. C. Lindon, R. S. Plumb, S. Zirah, S. J. Bruce, P. Rainville, C. L. Stumpf, J. K. Nicholson: *Anal. Chem.*, **78**, 363 (2006).
  - 43) H. Sasaki, H. Akiyama, Y. Yoshida, K. Kondo, Y. Amakura, Y. Kasahara, T. Maitani: *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **29**, 2514 (2006).
  - 44) H. Yoshida, T. Mizukoshi, K. Hirayama, H. Miyano: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 551 (2007).
  - 45) H. Nakanishi, Y. Iida, T. Shimizu, R. Taguchi: *J. Chromatogr. B*, **877**, 1366 (2009).
  - 46) T. Kuhara: *J. Chromatogr. B*, **758**, 3 (2001).
  - 47) O. Fiehn: *Trends Anal. Chem.*, **27**, 261 (2008).
  - 48) 久原とみ子：細胞工学, **25**, 1404 (2006).

- 49) T. Kuhara: *J. Chromatogr. B*, **855**, 42 (2007).
- 50) A. Jike, J. Trygg, J. Gullberg, A. I. Johansson, P. Jonsson, H. Antti, S. L. Marklund, T. Moritz: *Anal. Chem.*, **77**, 8086 (2005).
- 51) W. Welthagen, R. A. Shellie, J. Spranger, M. Ristow, R. Zimmermann, O. Fiehn: *Metabolomics*, **1**, 65 (2005).
- 52) T. Soga: *Methods Mol. Biol.*, **358**, 129 (2007).
- 53) 曾我朋義: “最新プロテオミクス・メタボロミクス” 丹羽利充編, (2007), (秀潤社).
- 54) T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka, M. Tomita: *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768 (2006).
- 55) N. Ishii, K. Nakahigashi, T. Baba, M. Robert, T. Soga, A. Kanai, T. Hirasawa, M. Naba, K. Hirai, A. Hoque, P. Y. Ho, Y. Kakazu, K. Sugawara, S. Igarashi, S. Harada, T. Masuda, N. Sugiyama, T. Togashi, M. Hasegawa, Y. Takai, K. Yugi, K. Arakawa, N. Iwata, Y. Toya, Y. Nakayama, T. Nishioka, K. Shimizu, H. Mori, M. Tomita: *Science*, **316**, 593 (2007).
- 56) R. M. Smith 著, 牧野圭祐訳 “超臨界クロマトグラフィー—基礎と応用—” (2001), (廣川書店).
- 57) T. Bamba, N. Shimonishi, A. Matsubara, K. Hirata, Y. Nakazawa, A. Kobayashi, E. Fukusaki: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 460 (2008).
- 58) 馬場健文: “メタボロミクスの先端技術と応用” 福崎英一郎編, p. 43 (2007), (CMC 出版).
- 59) 吉田欣史: “機能性食品の安全性ガイドブック” 津志田藤二郎, 梅垣敬三, 井上浩一, 村上明編, p. 468 (2007), (サイエンスフォーラム).
- 60) K. Akiyama, E. Chikayama, H. Yuasa, Y. Shimada, T. Tohge, K. Shinozaki, M. Y. Hirai, T. Sakurai, J. Kikuchi, K. Saito: *In Silico Biol.*, **8**, 339 (2008).
- 61) A. M. Weljie, J. Newton, P. Mercier, E. Carlson, C. M. Slupsky: *Anal. Chem.*, **78**, 4430 (2006).
- 62) O. Cloarec, M. E. Dumas, A. Craig, R. H. Barton, J. Trygg, J. Hudson, C. Blancher, D. Gauguier, J. C. Lindon, E. Holmes, J. Nicholson: *Anal. Chem.*, **77**, 1282 (2005).
- 63) S. Fukuda, Y. Nakanishi, E. Chikayama, H. Ohno, T. Hino, J. Kikuchi: *PLoS ONE*, (2009).
- 64) Q. Cui, I. A. Lewis, A. D. Hegeman, M. E. Anderson, J. Li, C. F. Schulte, W. M. Westler, H. R. Eghbalian, M. R. Sussman, J. L. Markley: *Nat. Biotechnol.*, **26**, 162 (2008).
- 65) K. Ohyama, M. Suzuki, J. Kikuchi, K. Saito, T. Muranaka: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 725 (2009).
- 66) H. Morita, H. Toh, S. Fukuda, H. Horikawa, K. Oshima, T. Suzuki, M. Murakami, S. Hisamatsu, Y. Kato, T. Takizawa, H. Fukuoka, T. Yoshimura, K. Itoh, D. J. O'Sullivan, L. L. McKay, H. Ohno, J. Kikuchi, T. Masaoka, M. Hattori: *DNA Res.*, **15**, 151 (2008).
- 67) F. Matsuda, K. Yonekura-Sakakibara, R. Niida, T. Kuromori, K. Shinozaki, K. Saito: *Plant J*, **57**, 555 (2009).
- 68) Y. Sawada, K. Akiyama, A. Sakata, A. Kuwahara, H. Otsuki, T. Sakurai, K. Saito, M. Y. Hirai: *Plant Cell Physiol.*, **50**, 37 (2009).
- 69) L. F. Shyur, N. S. Yang: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 66 (2008).
- 70) S. Tiziani, A. Lodi, F. L. Khanim, M. R. Viant, C. M. Bunce, U. L. Gunther: *PLoS ONE*, **4**, e4251 (2009).
- 71) J. L. Griffin, R. A. Kauppinen: *J. Proteome Res.*, **6**, 498 (2007).
- 72) J. Saric, J. V. Li, Y. Wang, J. Keiser, J. G. Bundy, E. Holmes, J. Utzinger: *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2**, e254 (2008).
- 73) M. H. Beale, J. L. Ward, J. M. Baker: *Methods Mol. Biol.*, **478**, 289 (2009).
- 74) S. Rezzi, Z. Ramadan, L. B. Fay, S. Kochhar: *J. Proteome Res.*, **6**, 513 (2007).
- 75) J. F. Fearnside, M. E. Dumas, A. R. Rothwell, S. P. Wilder, O. Cloarec, A. Toye, C. Blancher, E. Holmes, R. Tatoud, R. H. Barton, J. Scott, J. K. Nicholson, D. Gauguier: *PLoS ONE*, **3**, e1668 (2008).
- 76) V. P. Makinen, P. Soiminen, C. Forsblom, M. Parkkonen, P. Ingman, K. Kaski, P. H. Groop, M. Ala-Korpela: *Mol. Syst. Biol.*, **4**, 167 (2008).
- 77) H. C. Bertram, I. F. Duarte, A. M. Gil, K. E. Knudsen, H. N. Laerke: *Anal. Chem.*, **79**, 168 (2007).
- 78) A. Figueiredo, A. M. Fortes, S. Ferreira, M. Sebastiana, Y. H. Choi, L. Sousa, B. Acioli-Santos, F. Pessoa, R. Verpoorte, M. S. Pais: *J. Exp. Bot.*, **59**, 3371 (2008).
- 79) J. G. Bundy, H. C. Keun, J. K. Sidhu, D. J. Spurgeon, C. Svendsen, P. Kille, A. J. Morgan: *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 4458 (2007).
- 80) A. D. Southam, J. M. Easton, G. D. Stentiford, C. Ludwig, T. N. Arvanitis, M. R. Viant: *J. Proteome Res.*, **7**, 5277 (2008).
- 81) A. Hines, W. H. Yeung, J. Craft, M. Brown, J. Kennedy, J. Bignell, G. D. Stentiford, M. R. Viant: *Anal. Biochem.*, **369**, 175 (2007).
- 82) M. B. Sticklen: *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 433 (2008).
- 83) A. Mukhopadhyay, A. M. Redding, B. J. Rutherford, J. D. Keasling: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 228 (2008).
- 84) E. T. Papoutsakis: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 420 (2008).
- 85) B. Teusink, E. J. Smid: *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 46 (2006).
- 86) P. D. Majors, J. S. McLean, J. C. Scholten: *J. Magn. Reson.*, **192**, 159 (2008).

吉田欣史 (Yoshifumi YOSHIDA)



日本ウォーターズ株式会社 (〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル)。《現在の研究テーマ》質量分析計を用いた最先端アプリケーションの共同研究・広報活動。《主な著書》“機能性食品の安全性ガイドブック” (分担執筆) (サイエンスフォーラム)。

久原とみ子 (Tomiko KUHARA)



金沢医科大学総合医学研究所人類遺伝学研究部門 (〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1)。九州大学薬学部薬学科卒。薬学博士。《現在の研究テーマ》メタボリックプロファイリングのバイオマーカー探索, 個別化医療, 化学物質毒性評価への応用。《主な著書》“メタボローム研究の最前線” (分担執筆) (シュプリンガー・フェアラーク東京)。

菊地 淳 (Jun KIKUCHI)



理化学研究所植物科学研究センター (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22)。博士 (工学)。《現在の研究テーマ》混沌とした生体分子混合物からの情報抽出技術の開発。《主な著書》“メタボロミクスの先端技術と応用” (分担執筆) (CMC 出版)。