

特集 体内リズム：複雑な遺伝子発現制御のネットワークをシステムとして理解する

ダイナミックな生命現象のメタボローム解析技術

A Metabolome Method for the Analysis of Dynamic Biological Phenomena

曾我朋義 佐藤 滋 西岡孝明 富田 勝

Tomoyoshi Soga, Shigeru Sato, Takaaki Nishioka, Masaru Tomita

一部の遺伝子やタンパク質は概日リズムを刻むことが明らかになってきた。それらに対応する代謝物質も概日リズムを刻んでいるのだろうか。最近この疑問に答えを出すことが可能な細胞内の代謝物質の網羅的測定方法が開発された。本稿では、この新手法について解説する。

key words

メタボローム、キャピラリー電気泳動、質量分析計、枯草菌、イネ

i 曾我朋義 慶應義塾大学環境情報学部 先端生命科学研究所 E-mail : soga@sfc.keio.ac.jp

1984年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業、工学博士。横河電機、横河アナリティカルシステムズを経て、現所属、助教授。ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社取締役（兼任）。細胞の代謝物質をすべて検出し同定したい。

佐藤 滋 慶應義塾大学政策メディア研究科 バイオインフォマティクスプログラム

西岡孝明 京都大学大学院農学研究科

富田 勝 慶應義塾大学環境情報学部 先端生命科学研究所、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社

はじめに

解糖系やTCA回路に代表される細胞内の代謝産物の多くは、リン酸基、カルボキシル基やアミノ基を持つイオン性物質であり、紫外線(UV)吸収がない、不揮発性、物理的・化学的性質が類似しているなどの特徴を有す。これまで、このような性質を持つ化合物に対して網羅的な測定法がなく、さらに細胞内に1000種類以上の代謝中間体が存在することが、メタボローム(代謝物質の総体)分析をきわめて難しくしていた。

近年、メタボローム研究への関心の高まりとともに、いくつかのメタボローム測定法^{1)~4)}が開発された。その中でも、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)によるメタボローム分析法は、ほとんどのイオン性代謝物質を直接かつ定量的に測定できる方法として注目されている。筆者らのグループでは、CE-MS法により、枯草菌中に存在する1692成分の代謝物質の検出に成功した⁵⁾。また、イネの葉に含まれる88種類の代謝物質の1日の挙動変化をいっせいに測定した(佐藤ら;投稿中)。これらの結果より、CE-MS法を用いれば、体内リズムのようなダイナミックな生命現象におけるメタボローム測定も可能であると思われる。そこでCE-MSによるメタボローム測定法について詳しく解説する。

I. CE-MSによるメタボローム測定

1. CE-MSによるメタボローム測定法

筆者らは、細胞内の代謝物質のほとんどが陽イオン性か陰イオン性の低分子であることに着目し、イオン性化合物の分析に高い威力を発揮するCE-MS^{6)~8)}を用いたメタボローム測定法を開発した⁵⁾。CE-MS法の最大の利点は、2種類の測定条件でほとんどのイオン性代謝物質を直接定量分析できることである。

測定原理を図1に示す。CE-MSに注入された各代謝物質は、電気泳動によりキャピラリー内で分離後、質量分析計(MS)で検出される。試料中の陽イオン性物質は陰極方向に、また陰イオンは陽極方向に移動する。各物質の移動速度はその物質の電荷/水とイオン半径の比に基づくため、この比率が異なる物質はキャピラリー内で分離される。キャピラリーの出口に質量分析計を接続すれば、各成分をその物質固有の質量数で選択的に検出することが可能である。なおキャピラリー電気泳動法^{9), 10)}および質量分析法^{11), 12)}の詳細については成書が出版されているので、そちらを参考にされたい。

2. 陽イオン性代謝物質の測定法

陽イオン性代謝物質の測定では、キャピラリーの出口が陰極となるよう電圧を印加する。泳動緩衝液には、1Mのギ酸(pH2以下)を使用した。1Mのギ酸を用いた理由は、pH

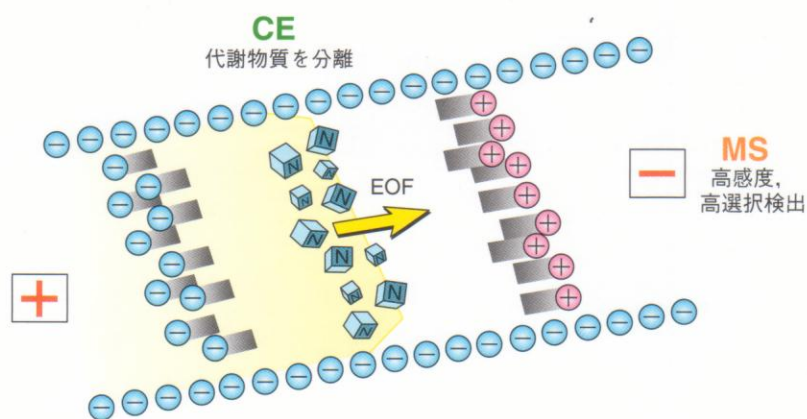


図1. CE-MSによる代謝物質一斉分析法

高電圧をキャピラリーに印加すると陽イオンは陰極へ、陰イオンは陽極へ移動しながら分離する。陰極および陽極に質量分析計（MS）を接続すれば、各イオンをその物質が固有に持つ質量数により選択的に検出することができる。NはNeutral（中性物質）、EOFはElectroosmotic Flow（電気浸透流）。

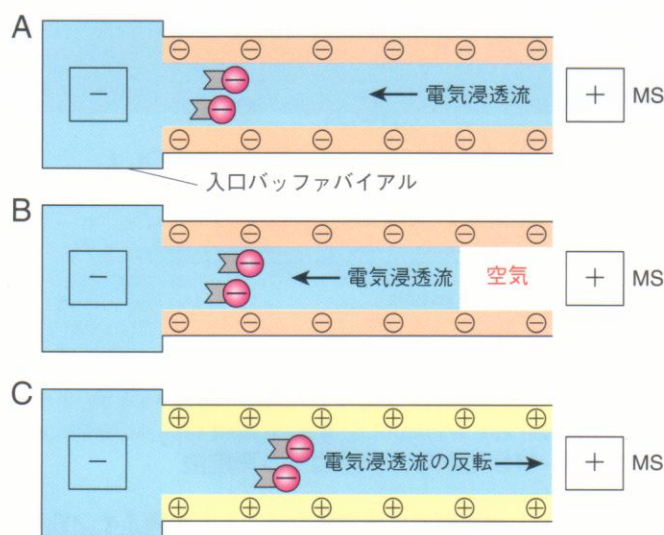


図2. CE-MSによる陰イオン化合物の測定法

通常使用するフューズドシリカキャピラリーでは電気浸透流が陰極方向に発生し（A）、キャピラリーの出口に空気が入るため、電流が流れなくなる（B）。これを解決するため、表面がプラスに帯電したSMILE（+）キャピラリーを用いて、電気浸透流を反転することにより、陰イオン性化合物の測定が可能になった（C）。

が低いため多くの代謝物質が陽イオン性を帯び、その結果多成分の陽イオンの一斉分析が可能になるからである。質量分析計での検出は、各化合物の質量数にプロトンが付加したプロトン化分子 $[M+H]^+$ で行った。この方法を用いることにより、各陽イオンを選択的に測定することが可能になった⁸⁾。このCE-MSの1つの条件で、現在までに361種類の陽イオン性代謝物標準液が測定されている。

3. 陰イオン性代謝物質の測定法

解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路などの主要代謝経路のほとんどの代謝物質は陰イオン性化合物である。しかし、通常のフューズドシリカキャピラリーを使用した

CE-MS陰イオン測定システム（図2A）では、試料注入後、数分で電流が流れなくなる問題が発生した。理由は、このシステムでは高電圧を印加した際に、電気浸透流¹³⁾と呼ばれる液流が陽極（MS側）から陰極（キャピラリーの入口側）に発生するため、キャピラリーの出口側に空気が入り、電流が落ちるからであった（図2B）。

この問題を解決するため、塩基性物質をキャピラリー表面にコーティングしたSMILE（+）キャピラリー¹⁴⁾を用いて、電気浸透流を陰極から陽極に反転する方法を考案した（図2C）。この方法により、連続的かつ安定した陰イオン化合物の測定が可能になり¹⁵⁾、これまでに277種類の陰イオン性代謝物標準液が分析できることが確認されている。

II. CE-MSによる枯草菌中のメタボローム測定

1. 細胞からの代謝物質の抽出法

細胞内の代謝物質を正確に測定するためには、細胞から代謝物質を精度良く抽出する必要がある。特に微生物の場合、細胞にストレスがかかると代謝が瞬時に廻るため、迅速に酵素を失活する必要がある。また陽イオンおよび陰イオン性代謝物質を同時に抽出し、測定感度を向上させるため抽出時に濃縮も行った。測定の妨害となる夾雑成分は除去した。さらにCE-MSの能力を最大限引き出すため、代謝物は純水などの電気伝導度の低い溶媒に溶解した。枯草菌を用いて最適化された抽出法は次のとおりである。

細胞を培養後、培養液10mlを0.45 μ mのフィルターで濾過し、フィルター上の細胞を内部標準物質が添加されているメタノールに浸し、酵素タンパク質を失活させた。その後Milli-Q水およびクロロホルムを加え十分振とうした。上相の水-メタノール相を取り、5kDaを分画する遠心限外濾過フィルターを用いて除タンパク質を行った後、濾液を凍結乾燥した。測定前に20 μ lのMilli-Q水を加えて溶解した。この方法により、抽出時に代謝物質を500倍濃縮することが可能になった。

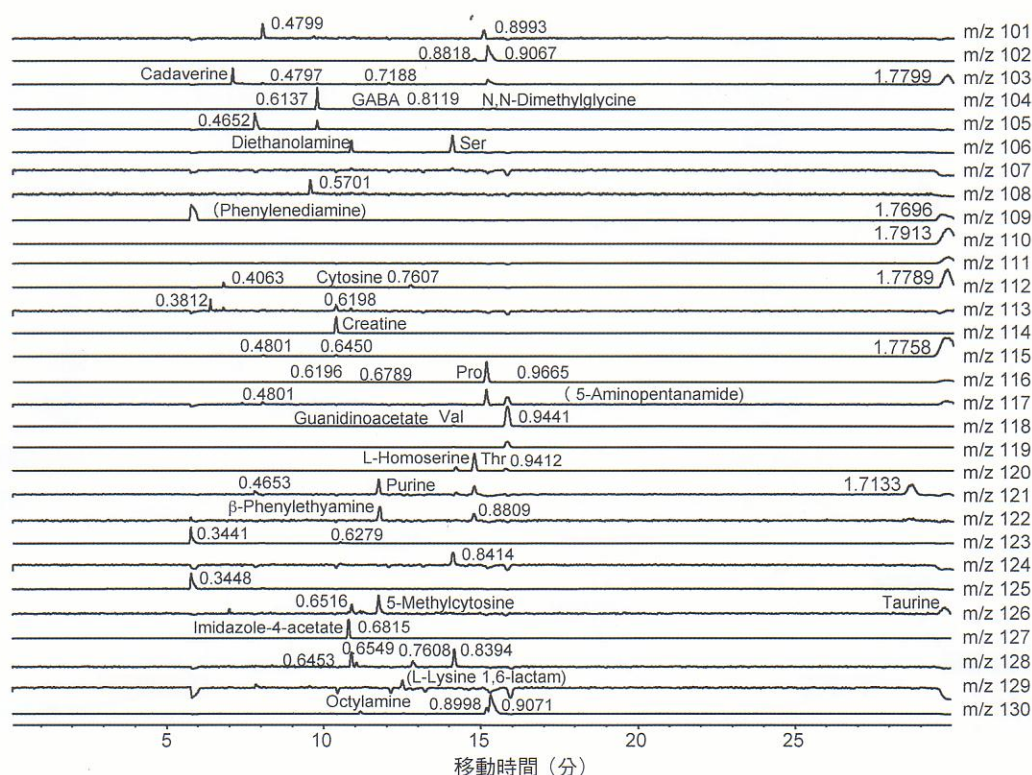


図3. CE-MSによる枯草菌168株の $T_{-0.5}$ (対数増殖期)の陽イオン性代謝物質の測定結果

101から130までの各 m/z で検出している。この方法を用いて、70から1000までの全 m/z でモニターすることにより、イオン性代謝物質の網羅的な測定が可能になった。Soga T, et al: J Proteome Res (2003) 2: 488-494より改変して引用。

2. CE-MSによる枯草菌中の全イオン性代謝物質の測定

CE-MSでは2つの測定条件で、ほとんどのイオンをMSに導入することができる。したがって、数十から1000までのすべての質量電荷比 (m/z) でモニターすれば、 m/z が1000以下のイオン性代謝物質はすべて検出することが可能である。そこで高感度検出が可能なMSの選択イオンモニタリングモード (SIM) を用いて、数十から1000までのすべてのイオン性代謝物質を検出した⁵⁾。

この方法を用いて測定した枯草菌中の陽イオン性代謝物質の分析例を図3に示した。同様に陰イオン性代謝物質も測定し、枯草菌から全部で1692成分の代謝物質を検出し、現在までに、150成分について化合物名を特定した⁵⁾。

本法は、枯草菌1細胞当たり数十zepto (10^{-21}) molの代謝物質の検出が可能であり、対数増殖期の枯草菌では1細胞内に2万分子 (アデニン) から2億分子 (グルタミン酸) の代謝物質が存在していることが明らかになった。

3. 枯草菌のメタボローム解析

枯草菌はグルコースなどの栄養源が枯渇すると胞子を形

成して休眠するが、この胞子形成は細胞の分化を解明するための基本モデルとして広く研究されている。これまで有効なメタボロームの定量法がなかったためか、胞子形成時など細胞がダイナミックに変化する際に、代謝物質質量がどのように変動するか大規模に解析されたことはなかった。ここでは、枯草菌を $T_{-0.5}$ (対数増殖期)、 T_0 (胞子形成初期) および T_2 (胞子形成初期 T_0 から2時間後) まで培養し、それぞれの代謝物質の濃度変動をCE-MS法で測定した⁵⁾。

測定結果を図4に示した。図4Aは $T_{-0.5}$ に対しての T_0 の代謝物質質量の変動結果、図4Bは $T_{-0.5}$ に対しての T_2 の代謝物質の変動結果である。図4に示したように胞子形成時には、解糖系のほとんどの代謝物質が減少していることがわかった。特にカタボライト抑制 (グルコース存在時に、代謝に関連する遺伝子の発現が抑制されること) の重要な物質であるフルクトース1,6リン酸 (F1,6P) が100倍以上減少した。F1,6Pはカタボライト抑制因子であるCcpA、CcpCタンパク質の活性をコントロールしており¹⁶⁾、F1,6Pの減少がCcpA、CcpCタンパク質を不活性化する。その結果カタボライト抑制が解除され、抑制されていた胞子形成遺伝子群の発現を促進したため、胞子形成が進行すると推測される。

DNAマイクロアレイの測定結果では、枯草菌の胞子形成

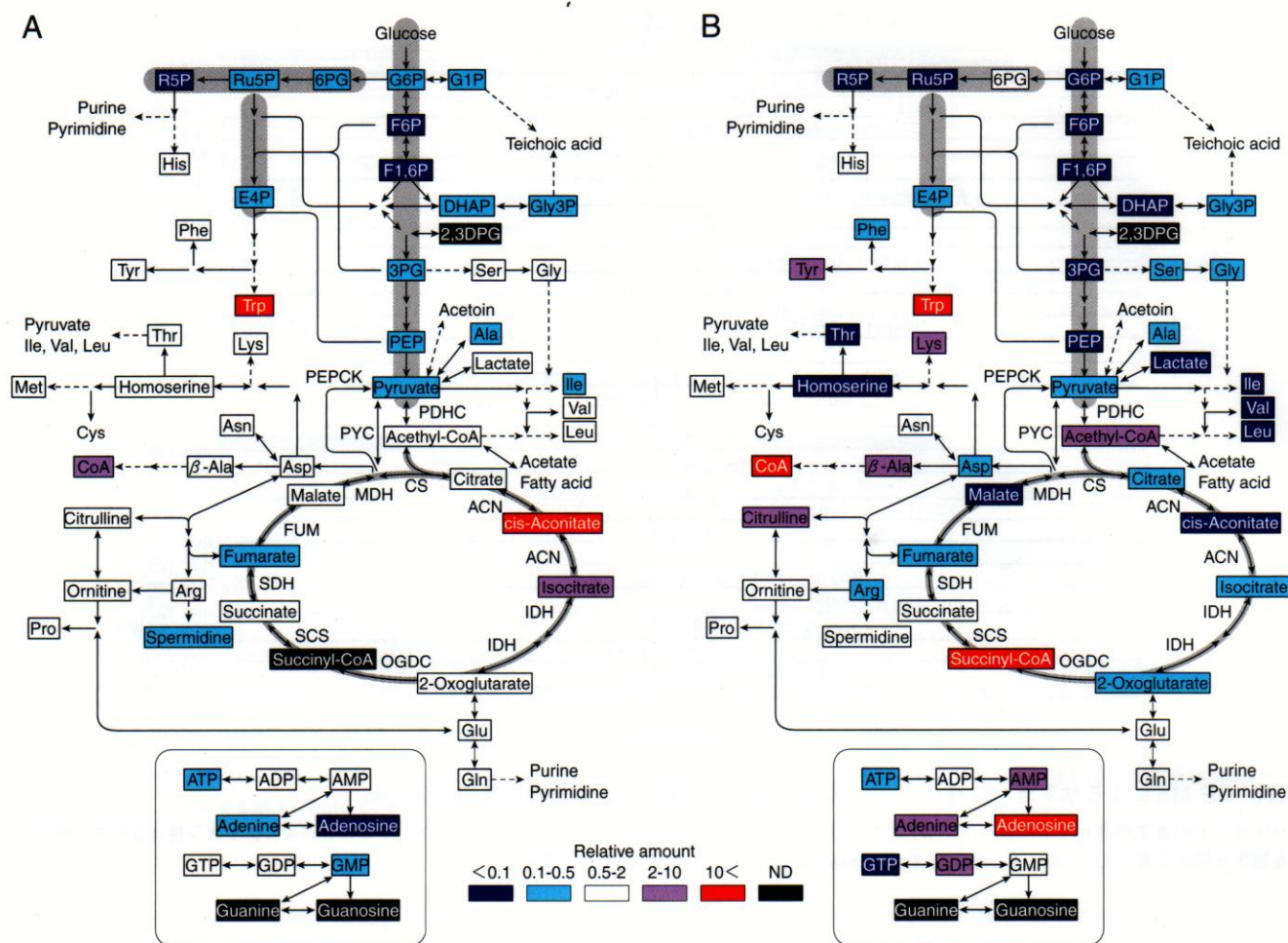


図4. 枯草菌の胞子形成期における主要代謝物質の変化量

A; T_{0.5} (対数増殖期) に対する T₀ (胞子形成初期) の代謝物質の変化量, B; T_{0.5} (対数増殖期) に対する T₂ (胞子形成初期 T₀ から2時間後) の代謝物質の変化量. 各色は代謝物質の変化量を示している. 青は0.1倍以下, 水色は0.1~0.5倍に減少, 白は0.5~2倍の変化, マゼンタは2~10倍, 赤は10倍以上の増加を表している. ND; not detected. Soga T, et al: J Proteome Res (2003) 2: 488-494 より引用.

期にはほとんどすべての遺伝子の発現は抑制されている^{17), 18)}. しかし, CE-MSで測定した代謝物質の結果では, シスアコニット酸, イソクエン酸, スクシニルCoA, アセチルCoAやCoAなどのいくつかの代謝物質が増加し, 遺伝子発現と異なる結果になった. おそらく, 代謝産物量は遺伝子発現に基づいて生産される酵素の量ではなく, 翻訳後修飾などによる酵素の活性変化の影響を直接受けているからであろう. 代謝を完全に解明するためには, 遺伝子の発現量, 酵素活性に加えて, 代謝産物量も網羅的に測定することが必要であると思われる.

Ⅲ. ダイナミックなイネの代謝物測定

CE-MSによるメタボローム測定法を用いて, イネの代謝物質の1日の変動を測定した. イネを照明付きインキュベータ中で水耕栽培で育苗し, 第3葉を採取し, 液体窒素を用い

て凍結後, 多検体細胞破砕機を用いて, 細胞壁を破碎した. メタノールを加えて酵素を失活させた後, 代謝物質を抽出した. この操作を1時間ごとに行い, その抽出物をCE-MSで分析して, 一昼夜における主要な88種類の代謝物質の濃度変化を測定した (佐藤ら; 投稿中). 図5に一例としてグルコース6リン酸 (解糖系), リンゴ酸 (TCA回路), リブロース1,5ビスリン酸 (還元的ペントースリン酸回路) およびアルギニン (アミノ酸代謝) の測定結果を示した. 図の黄色は光が照射されている時間帯, 紺は光が照射されていない時間帯を示している. 解糖系の最初の代謝物質であるグルコース6リン酸 (図5A) は, 1日のうちで大きな濃度の変化は見られなかった. これに対して, 光合成の中心基質であるリブロース1,5ビスリン酸 (図5C) は, 光が照射されているときは高濃度で存在しているが, 暗くなるにつれて濃度は減少し, 数時間で検出されなくなった. しかし光を再び照射

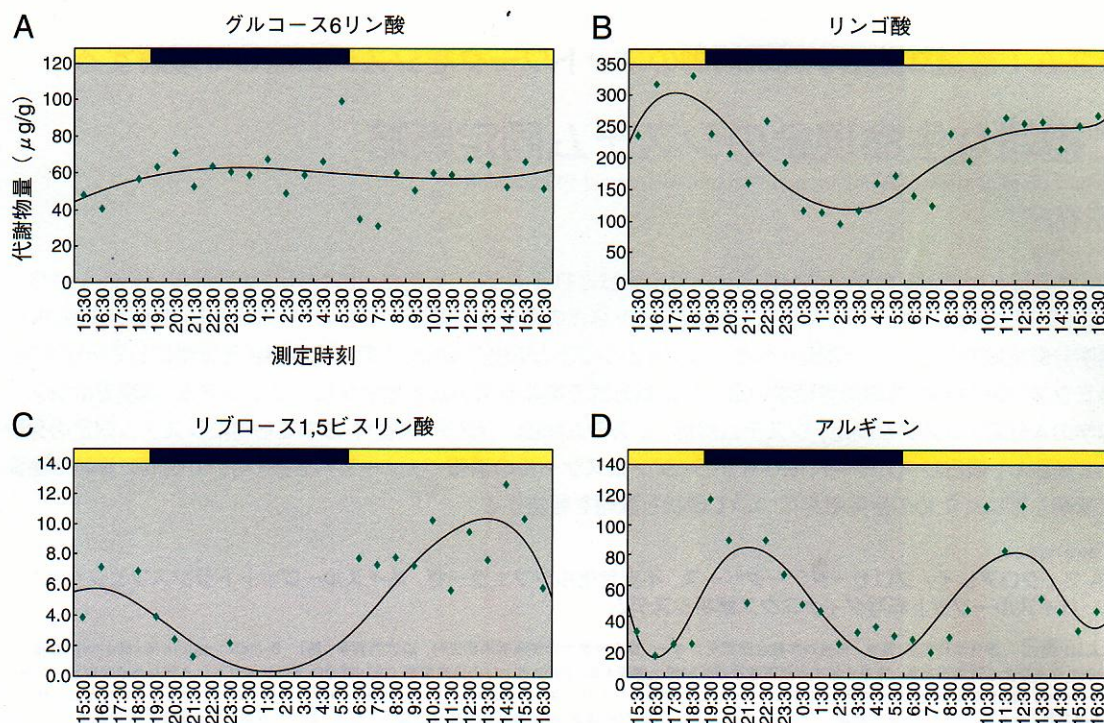


図5. イネの第三葉の代謝物質の24時間の濃度変化

A; グルコース6リン酸, B; リンゴ酸, C; リブローズ1,5ビスリン酸, D; アルギニン. グラフの上に示した黄色は光が照射されている時間帯, 紺は光が照射されていない時間帯を示す. Sato S, et al: 投稿中より引用.

するとリブローズ1,5ビスリン酸は急激に増加することが測定された. また他の代謝物質についても, それぞれ特徴的な挙動を示すことが判明した.

おわりに

CE-MSを用いることで, 細胞内の陽および陰イオン性代謝物質が高感度かつ網羅的に測定できるようになった. CE-MS法は誘導体化を行うことなく, かつ2種類の測定条件で

ほとんどのイオン性代謝物質を測定できる点で画期的である. 本法は, 枯草菌やイネの例で示したように細胞がダイナミックに変化する際に, 代謝物質を一斉にかつ経時的に測定することができ, 代謝物質の概日リズムの測定も十分可能である. 今後, CE-MSによるメタボローム測定法が, 最先端の研究分野で利用され, 生命科学のさらなる発展に貢献することを期待したい.

文献

- 1) Fiehn O, et al: Nat Biotechnol (2000) 18: 1157-1161
- 2) Reo NV: Drug Chem Toxicol (2002) 25: 375-382
- 3) Aharoni A, et al: OMICS (2002) 6: 217-234
- 4) Castrillo JI, et al: Phytochemistry (2003) 62: 929-937
- 5) Soga T, et al: J Proteome Res (2003) 2: 488-494
- 6) Johnson SK: Anal Chim Acta (1999) 389: 1-8
- 7) Cao P, et al: J Am Soc Mass Spectrom (1998) 9: 1081-1088
- 8) Soga T, et al: Anal Chem (2000) 72: 1236-1241
- 9) Li SFY: Capillary Electrophoresis-Principles, Practice and Applications (J Chromatogr Library-Vol.52, Elsevier, Amsterdam): 1993
- 10) 本田 進ら: キャピラリー電気泳動—基礎と実際 (講談社): 1995
- 11) McLafferty FW, et al: Interpretation of Mass Spectra 4th ed (University Science Books, California): 1992
- 12) 原田健一ら: LC/MSの実際 (講談社サイエンティフィック): 1996
- 13) Lukacs KD, et al: J High Res Chromatogr (1987) 10: 622-624
- 14) Katayama H, et al: Anal Chem (1998) 70: 5272-5277
- 15) Soga T, et al: Anal Chem (2002) 74: 2233-2239
- 16) Sonenshein AL, et al: *Bacillus subtilis* and its closest relatives (ASM Press, Washington, DC): pp.129-162, 2002
- 17) Fawcett P, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97: 8063-8068
- 18) Britton RA, et al: J Bacteriol (2002) 184: 4881-4890