U219-1053A

メタボロミクスを
はじめよう！

はじめまして・・・
私がメタボロ博士です。

「メタボロミクス」聞き慣れない言葉かもしれません。
「メタボロミクス」とは、病気の診断などに
応用されている研究領域です。
質量分析計を使って代謝物全体を分析し、
生命現象を理解しようという試みです。
え、難しそうって？
本冊子は、メタボロミクスの意味から分析方法、
使用する装置、さらには実際の応用例までを
網羅的にやさしく解説しています。
これを読めば、あなたもメタボロミクスの
基本を理解できます。

これから学生の
ライト君と一緒に
メタボロミクスについて
学びましょう！

著者紹介

メタボロ博士役　神戸大学大学院医学研究科・准教授
病因病態解析学分野長・消化器内科学・
質量分析総合センター
吉田　優

ライト君役　神戸大学大学院医学研究科・助教
脂質生化学分野・質量分析総合センター
入野　康宏

index

1. オミックス解析とは？ P4

2. メタボロミクスとは？ P6

3. メタボロミクスの特徴とは？ P8

4. メタボロミクスの流れ P10

5. メタボロミクスでつかう分析装置 P12

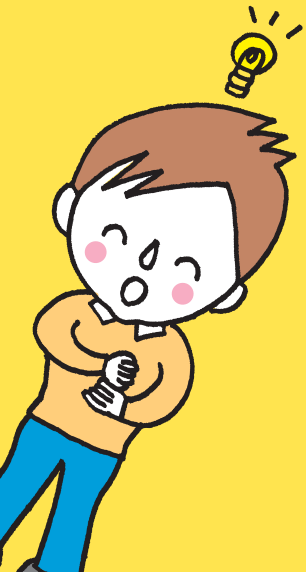
6. サンプルの前処理 P14

7. 実際の測定 P16

8. 代謝パスウェイ P18

9. 多変量解析とは？ P20

10. メタボロミクスの応用例 P22



Let's begin!
METABOLOMICS
1

オミックス解析とは？

桜が満開で心地よい春風が吹いている４月のある日。メタボロ博士の研究室に学生のライト君が配属されました。どうやらメタボロミクスに興味をもっているようです。

博士、これから先生の研究室で研究させていただきます。メタボロミクスに興味があって先生の研究室を選びました。これからよろしくお願いします。

そうですか。一緒にメタボロミクスを楽しみましょう。

まずは、何から勉強したらよいですか？

うーん、メタボロミクスを理解するために、
最初にオミックス解析という概念について勉強をしよう。

わかりました。よろしくお願いします。

オミックス解析は、生物の中にある分子全体の変動を探索し、生命現象を包括的に調べる解析手法のことだよ。ゲノム解析（ゲノミクス）とかプロテオーム解析（プロテオミクス）とか聞いたことないかな？

最近ヒトゲノム解析が完了したとニュースでみたことがあります。

ヒトゲノム解析は、オミックス研究では一番有名だね。この研究成果を生かしていろんなオミックス研究が発展してきたんだよ。他のオミックス解析としてmRNAを調べるトランスクリプトミクス解析やタンパク質を調べるプロテオミクス解析、代謝物を調べるメタボロミクス解析があるね。

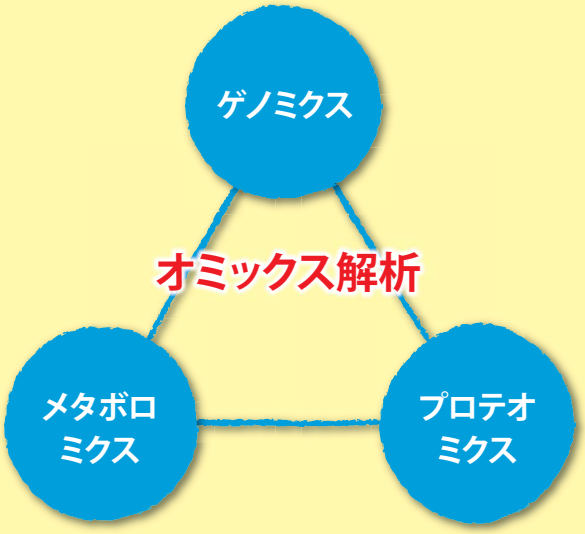
オミックス解析をするとどんな良いことがあるんですか？

そうだね、網羅的に生体分子を調べるため先入観にとらわれず予想外の生理・病理機構の発見が期待できることが利点かな。でも、網羅的に調べるからたくさんの情報を得ることができるんだけど、この情報をうまく利用することが難しいね。だから、分子同士がお互いどのように生体内で働いているのか、どのようなネットワークを形成しているのかといった情報を集めることが大切なんだ。

もしかしたら、オミックス解析で誰も考えなかった大発見ができるかもしれないですね。

その可能性は十分にあるよ。どう、おもしろそうでしょ？

Memo Note



“ 生命現象を包括的に調べることができる ”

なんかすごいかも…

Let's begin!
METABOLOMICS 2

メタボロミクスとは？

ライト君が研究室に配属されて１週間がたちました。ライト君が研究室で、論文を読んでなにやらうんうんとうなずいています。そこにメタボロ博士がやってきました。

博士、オミックス解析の概念は理解しました。オミックス解析の１つのメタボロミクスを論文でよく見かけるのですが、わかりやすく説明してください。

代謝物、すなわちメタボローム（生体に含まれる代謝物全体）を対象にしたオミックス解析のことだよ。オミックス解析の中でも最も新しい分野であり、近年注目を集めているんだ。質量分析計を使って、分子の質量(※) を測定してどのような代謝物がどのくらい存在しているのかを調べることだよ。

どうして注目を集めているんですか？

メタボロミクスを使うと、見た目に現れない細かな生命現象を調べることができるからだよ。医薬品の副作用を検証したり、病気かどうかを調べたりすることに応用されているんだ。

いろんなことができて、すごいんですね。でも、簡単にできるんですか？

うーん、そう簡単にはできないんだよ。生体内には、水に溶けやすい物質と溶けにくい物質があって、それぞれの濃度もばらばらだから、一つの方法で測定できないんだよ。それとヒトの場合はね、4,000種類の代謝物があるって考えられているんだけど、それらすべての標準品がないことも問題なんだ。

どういうことですか？

質量分析計でわかることは、分子の質量だけなんだよ。だから、生体内にある代謝物の名前をきめるためには標準品と比較することが必要なんだ。

なんだか大変そうですね。

まだまだ新しい解析方法だからね。でもね、これからメタボロミクスを使ってどんどんいろんなことがわかってくるよ。

はい、でも少し難しそうです。

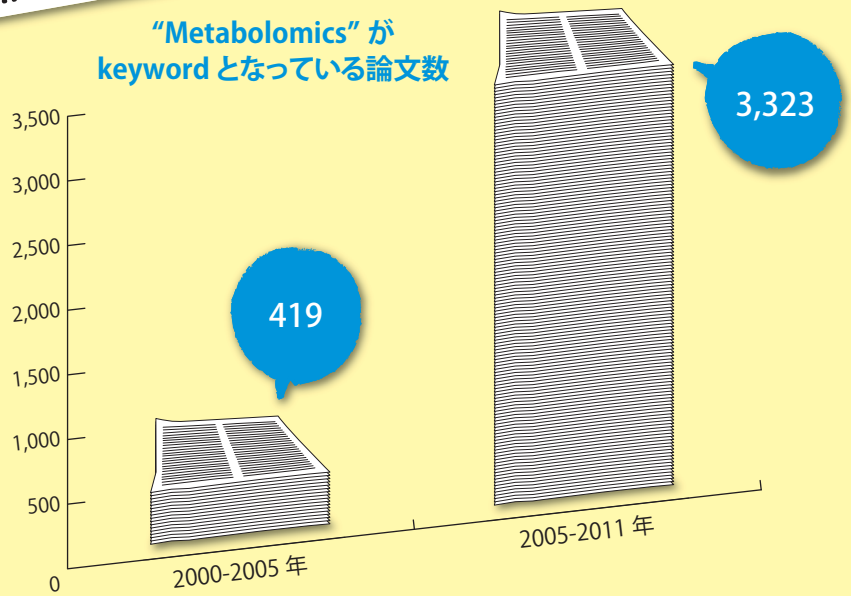
大丈夫、一緒に勉強していこう。

それはうれしいです。がんばって勉強します。

（※）正確な表現をすると、質量分析計では分子の質量を測定することはできません。正しくは、物質をイオン化させて、その質量 m と価数 z の比（*m/z*）を観測しています。メタボロミクスで扱う低分子（分子量 1,000 以下）では、電荷は 1 として考えて差し支えありません。この冊子の中では、分かりやすさを優先して、*m/z* を「分子の質量」または、単に「質量」と表現させて頂きます。

Memo Note

"Metabolomics" が keyword となっている論文数



Web of Science（Thomson Reuters）

Let's begin!
METABOLOMICS
3

メタボロミクスの特徴とは?

ライト君はメタボロミクスに本格的に興味をもったようです。なにやらいろいろ本を読んでなかなか勉強熱心です。ちょっと一息を入れようと、コーヒーを入れていたら、講義を終えた博士がやってきました。

博士はなぜ、オミックス解析の中でメタボロミクスを選んだんですか?

いい質問だね。メタボロミクスは、生体内の情報を鋭敏に包括的にとらえることができると考えたからなんだ。では、ここでメタボロミクスの特徴をまとめてみよう。

コーヒーを飲みながら、メタボロ博士のミニ講義が始まりました。

メタボロミクスは、他のオミックス解析に比べて大きく4つの特徴があるんだ。順に説明していくよ。

❶ 対象とする物質数が少ない

ヒトの場合、ゲノムは 25,000種類あるのに対してプロテオームは 100,000 種類あるので全部をまとめて解析するのは難しそうだよね。でも、メタボロームは 4,000 種類しかないんだ。この数字なら包括的に解析できそうでしょ。

❷ 対象とする物質が低分子である

それぞれの代謝物はこれまでに生化学手法などで幅広く取り扱われているから、生理学的・病理学的な意義に関する知識が蓄積されているんだ。

❸ 生体内での出来事を直接的に観察することができる

生体では、ゲノム情報に基づいたタンパク質（酵素）が生命活動の実行部隊なんだ。つまり、タンパク質の活性を観察することは、直接的に生命現象をとらえることになるよね。代謝物を網羅的に解析するということは、まさにタンパク質の活性を観察することにつながるんだ。なぜなら、代謝物とはタンパク質の働きによって生体内で作られるからね。この点が、他のオミックス解析と大きく異なる点だね。

❹ 動物種特異性がない

例えば、測定しようとする物質がアミノ酸だとしよう。代謝物としてのアミノ酸は、マウスでもヒトでも同じだよね。つまり、測定するものがマウスでもヒトでも同じ測定方法を使えるってことなんだ。ゲノムにしてもプロテオームにしてもマウスとヒトでは遺伝子、タンパク質が違うから、それぞれ別の測定方法を用意する必要があるんだけど、メタボロミクスではあまり気にしなくてもいいんだよ。

なるほど、ますますメタボロミクスの理解が進みました。博士、ありがとうございます。

Memo Note

メタボロミクス

メタボロームの変化を網羅的に観察する

→ タンパク質の活性そのもの

↓

“ 生体内の情報を包括的にとらえることができる ”

Let's begin! METABOLOMICS 4

メタボロミクスの流れ

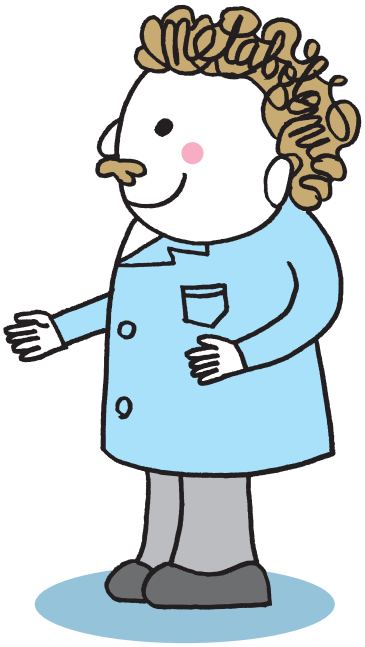
メタボロミクスをやろうと決めたライト君ですが、一連の流れがイメージできないようです。そこで、メタボロ博士に講義をお願いしました。

博士、メタボロミクスの一通りの流れを講義してください。

よし、わかったよ。メタボロミクスは大きく 5 つのプロセスに分けることができるんだ。順に説明していくよ。

❶ サンプル収集（生体材料の収集）

まずは、自分の測定したい材料（血液、組織、細胞など）を集める必要があるね。ヒトでもマウスでも動物種によって基本的に、分析方法を変えなくてもいいことは、前回学んだよね。でも、サンプルの種類によっては、全く同じ分析方法が使えるとは限らないことも注意してね。



❷ サンプル調製（抽出・前処理・誘導体化）

自分の測定したい物質の性質（水への溶けやすさ）や分析に使う機器の特性によって、サンプルの前処理を考えることが必要だね。このことは、次回詳しく説明するよ。

❸ サンプル分析

メタボロミクスは、代謝物全体を一度に網羅的に解析することなので、分析には代謝物を分離することが必要なんだ。分離するためのクロマトグラフと、分子の質量を測定する質量分析計をつなげた装置を使って、代謝物を測定するんだ。メタボロミクスでよく使われるクロマトグラフには 3 つの種類があって、それぞれ特徴が違っているんだ。この点についても後で詳しく解説するよ。

❹ データ変換

質量分析計からは分子の質量が分かるんだけど、この情報をコンピュータを使ってサンプルに含まれている代謝物の名前と存在量に変換させるんだ。この作業をするソフトウェアは、質量分析計を作っているメーカーによってそれぞれ特徴があって、その開発競争が激しいんだよ。このソフトの善し悪しが分析効率を大きく変えることになるので、メーカーにはぜひ頑張ってもらいたいところだね。

❺ データ解析

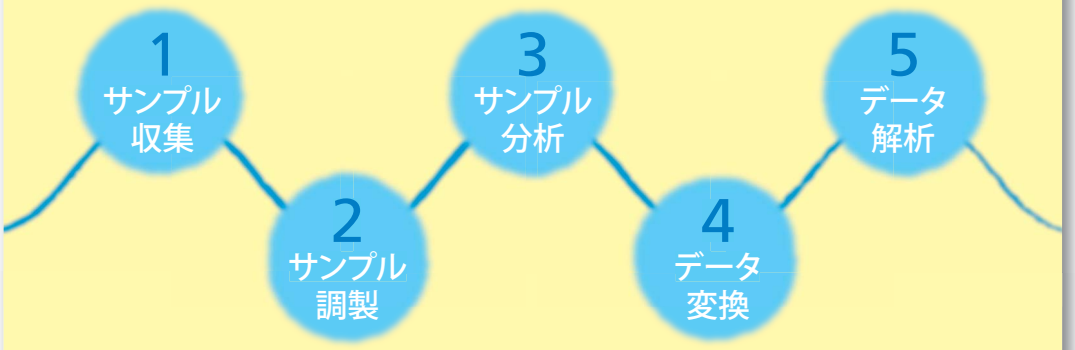
質量分析計を使って分かった代謝物の名前と存在量のデータを、代謝マップに当てはめたり、多変量解析してデータを解析するんだ。そうやって得られたデータの生物学的・医学的な意義を考えるんだ。データを正しく理解するために、データ間の補正をどうするか、どのサンプル同士を比べるのかといった研究計画をきちんと立てておかないといけないから、事前にしっかり実験計画を考えるんだよ。

博士、ありがとうございます。なんとなくイメージできました。メタボロミクスでは、最初にしっかりとした研究計画を立ててからではないと、最後に大変なことになるんですね。ご利用は計画的にですね。

え、まぁそうだね。

Memo Note

メタボロミクスの 5 つのプロセス



Let's begin!
METABOLOMICS
5

メタボロミクスでつかう分析装置

今日は、博士ご自慢の分析装置をみせてくれるということで、少し興奮気味のライト君が研究室にやってきました。

博士、おはようございます。今日を楽しみにしてました。

おはよう。早速、分析装置を見に行こう。

博士がドアを開けると、そこにはたくさんの分析装置が所狭しと並んでいます。ポンプの音でしょうか、なにやら耳慣れない音が鳴っています。ここでは少しうるさいので、静かな部屋に移って博士の講義が始まりました。

メタボロミクスで良く使われている装置には、クロマトグラフの違いによって３つのタイプがあるんだ。ひとつひとつ説明していくよ。

❶ ガスクロマトグラフ – 質量分析計（Gas Chromatograph-Mass Spectrometry: GC-MS）

気化しやすい物質しか測定できないんだ。生体内物質の糖・アミノ酸・有機酸は気化しやすいように誘導体化させて測定することになるね。歴史が古くて、簡単な操作で再現性の高いデータが出せるので人気があるよ。

❷ 液体クロマトグラフ – 質量分析計（Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry: LC-MS）

メタボロミクスでは、幅広く使われている分析装置だね。GC-MS と違って測定する物質の誘導体化が必要ないので、サンプルの準備が簡単だね。でも、扱うのが難しいのでなれるまで少し時間がかかるね。

❸ キャピラリー電気泳動 – 質量分析計（Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry: CE-MS）

サンプルに含まれるイオン性の物質の測定に適しているんだ。生体内物質だと、アミノ酸・核酸生合成経路の物質の測定が可能だよ。でも、扱いが難しく熟練した技術が必要なんだ。

よくわかりました。でも、分析装置って結構うるさいんですね。

そうだね。質量分析計ではイオンを真空中に飛ばして測定するため真空環境を準備しなくてはいけないから、ポンプの音はしょうがないんだよ。質量分析計のことがもっと知りたかったら、島津製作所の方に聞いてみるのがいいよ。

Memo Note

クロマトグラフの種類でタイプ分け 分析機器

GCMS-QP2010 Ultra

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）

LCMS-8040

それぞれに長所と短所があり用途に応じた使い分けをする必要あり

Let's begin!
METABOLOMICS

サンプルの前処理

一通りのメタボロミクスの流れをつかんだライト君は、いよいよ研究を始めることにしました。ライト君はまず自分の血液を測定し、１日の中で代謝がどのように変動するかを調べてみることにしました。しかし、実際にどうやってサンプルを調製していいかわからず、メタボロ博士に相談することにしました。

博士、自分の血液のメタボロームを調べようと思っているのですが、どうやって測定したらいいのでしょうか？

測定したい代謝物によって抽出方法を選ぶ必要があるんだ。水に溶けやすい物質（水溶性代謝物）と、溶けにくい物質（脂溶性代謝物）で大きく実験操作が分かれるんだけど、何を測定したいのかな？

はい、私は自分の血液のアミノ酸や糖類を測定したいです。ですから水溶性代謝物になります。

それでは前処理の方法を少しまとめてみよう。血液などの生体試料はタンパク質をたくさん含んでいるので、まずタンパク質を除く必要があるんだ。クロロホルム － メタノール － 水でサンプルを抽出して、サンプルを３層に分離させるんだ。上層には、水溶性代謝物が含まれていて、下層には、脂溶性代謝物が含まれているんだ。中間層にはタンパク質が含まれているから、この中間層をとらないように気をつける必要があるよ。

これって Bligh-Dyer の方法ですね。

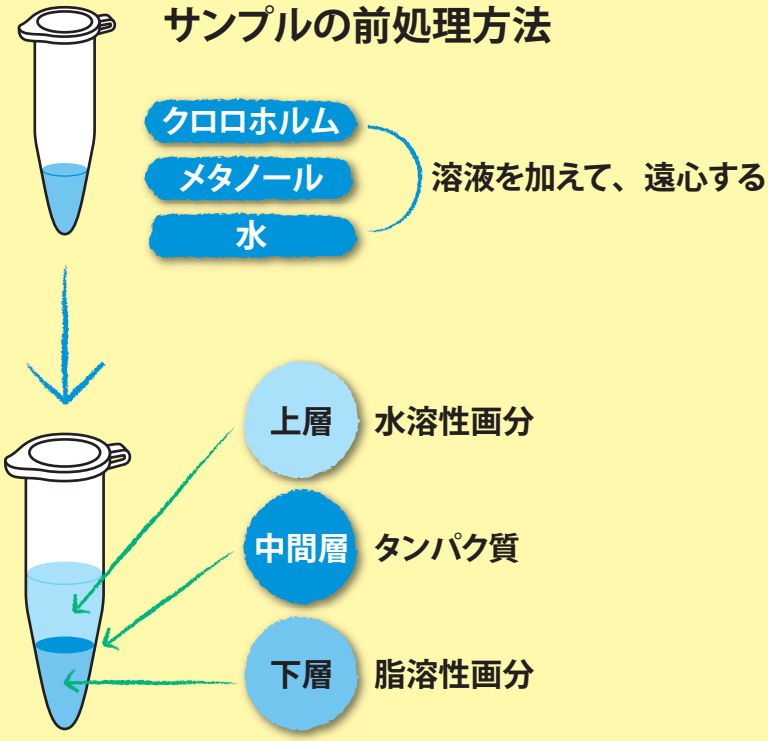
そうだよ、よく勉強しているね。今回の場合は水溶性代謝物だから、上層を回収するんだね。次の操作は、使いたい分析装置によって変わるんだけど、どの分析装置をつかうのかな？

そうですね、GC-MS を使ってみようと思います。

GC-MS の場合、気化した物質しか測定することができないんだ。アミノ酸などは気化しにくいから、誘導体化と呼ばれる化学反応を起こして、気化しやすい物質に変化させることが必要なんだ。この誘導体化について詳しい情報はいくつかの文献を参考にしてね。また、LC-MS や CE-MS で測定したいときも文献を参考にサンプル調製と前処理を考えてね。

Memo Note

サンプルの前処理方法



Let's begin! METABOLOMICS 7

実際の測定

博士に教えてもらった方法で、サンプル調製を行ったライト君はいよいよ GC-MS での測定をすることになりました。おっと、その前に博士からありがたい講義があるようです。

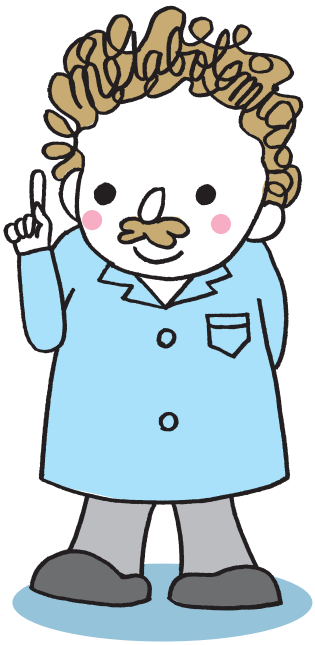
GC-MS で実際に測定する前に、GC-MS でどうやって化合物の名前を決めているのか簡単に説明していくよ。化合物の化学的な性質によって、クロマトグラフで一度分離して質量分析計で分子の質量を測定しているんだよ。GC-MS の場合、カラムを100℃から300℃まで徐々に加熱することで、サンプル内の化合物は、沸点の低い順番でカラムから出てくるんだよ。化合物によって沸点は決まっているので、サンプルの中に入っている代謝物を分けることができるんだよ。カラムから出てくる時間のことを保持時間というんだ。この用語はよく使われるからぜひ覚えてね。ここまででわからないことはある？

でも沸点が同じ物質はたくさんありそうな気がしますけど？

うん、鋭い質問だね。カラムに少し細工がしてあって、同じ沸点の物質でもカラムから出やすかったり、出にくくなったりするんだよ。GC-MS の場合 0.01 秒単位で保持時間を測定することができるんだ。

カラムから出てきた物質は、順番に質量分析計に入ってきて、質量(※) が測定されるんだよ。どの質量の分子がどれだけあるのかを、想像もできない速さで測定しているんだよ。イメージできるかな？

(※) 正しくは *m/z* です。「P6. メタボロミクスとは？」を参照。



例えば、保持時間が 5 分の時に、質量がそれぞれ 78と81と365の分子がそれぞれ 8 個、14 個、200 個ありましたという感じですか？

うんうん。質量を横軸に、分子数を縦軸にしてグラフを書いたものをマススペクトルと呼んでるよ。まとめると、それぞれの物質に対して保持時間とマススペクトルの情報を得ることができるんだ。標準品を測定してその情報を集めたものをライブラリと呼んでるんだ。そのライブラリ情報と測定したサンプルの情報を比較して、化合物の名前を決めているんだ。

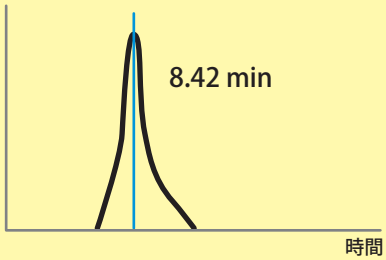
保持時間、マススペクトルにライブラリですね。

それら 3 つの用語はよくでてくるから、しっかりと覚えておいてね。

Memo Note

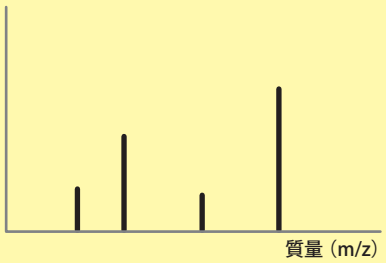
保持時間

質量分析計に入ってくる時間のこと



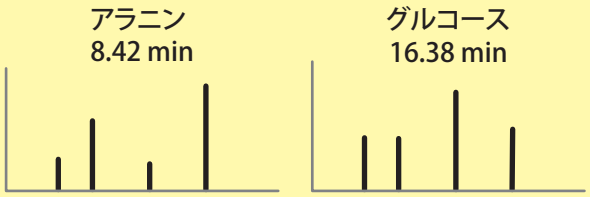
マススペクトル

質量を横軸に、分子数を縦軸にしてグラフにしたもの



ライブラリ

標準品に対する保持時間とマススペクトルの情報をまとめたもの



Let's begin!
METABOLOMICS
8

代謝パスウェイ

実際に自分の血液の水溶性代謝物を GC-MS で測定したライト君が、熱心にデータを見ています。そばに置いてある生化学の教科書とひっきりなしに見比べています。いったい何をやっているのかと、メタボロ博士は興味津々です。

いったい何をそんなに熱心に見ているのだね？ 何かおもしろいことでもあるの？

博士、助けてください。ある代謝物が朝では増えていて、夜では下がっていることがわかったんです。どういう意味があるのか調べたいんですが、代謝経路に当てはめると何かわかるんじゃないかと思ってるんですけど。

それで生化学の教科書を引っ張り出して見てるんだね。代謝経路もデータベース作りが行われていて、インターネットで見ることができるんだよ。例えば、

- KEGG（http://kegg.jp/）
- MetaCyc（http://metacyc.org/）
- ExPASy：Biochemical Pathway（http://expasy.org/tools/pathways/）

などが有名だね。これらのデータベースをみることで、代謝物同士の関係や、代謝物と酵素の関係を調べることができるよ。

それは便利ですね。

• KaPPa-Viewe4 KEGG（http://kpv.kazusa.or.jp/kpv4-kegg/）
これは測定した代謝物のデータを代謝マップに当てはめることができるんだ。代謝物の変動からどのパスウェイがおかしくなっているとか、どの酵素がおかしくなっているかを予想しやすいと思うよ。

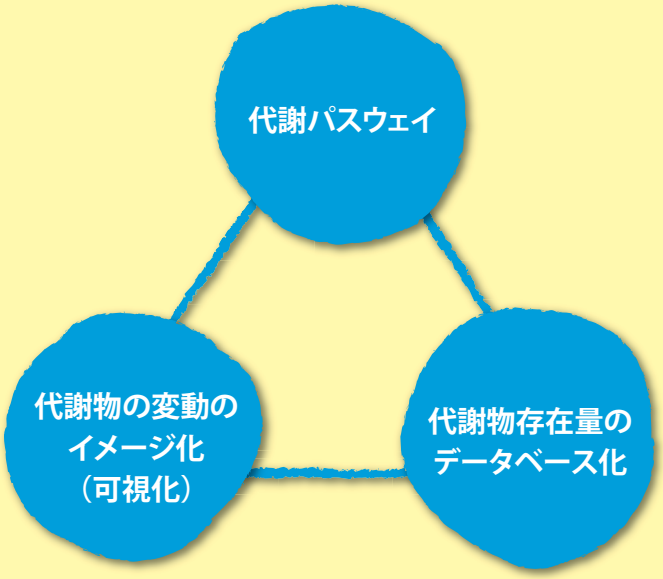
いろいろ便利なサイトがあるんですね。

• HMDB Serum Metabolome
（http://www.serummetabolome.ca/index.html）
これも便利なサイトだと思うよ。このサイト をみると、血清中にどんな代謝物があるかがわかるからね。
• MakerDb（http://www.markerdb.ca/）
これもおもしろいよ。便利なサイトを見つけたら、私に教えてね。

もちろんですとも。

Memo Note

メタボロームのデータベース化



Let's begin!
METABOLOMICS
9

多変量解析とは？

メタボロミクスについて理解を深めてきたライト君ですが、論文を読んでいてまだ分からないことがあるみたいです。そんなときは、メタボロ博士に聞いてみましょう。

博士、メタボロミクスでよくみる多変量解析って何ですか？

それはね、たくさんあるデータの中から自分のほしい情報を探し出すのに便利な方法なんだよ。

へー、具体的にはどのようなものなんですか？

例えば、異なる10 種類のお茶があって、それぞれのお茶について 100 種類の成分の量を測ったとしよう。それら100 種類の成分を個々に比べてみても、情報が多すぎてどれを比べたらいいのかよくわからないよね。

確かによくわからないですよね。

けれども、100種類の成分情報をまとめて、3つぐらいの情報で違いを説明できたらわかりやすいよね？このようにして情報をまとめて解析することを多変量解析というんだよ。

なるほど、確かに 3 つならわかりやすいですね。でも、どうやって情報をまとめるのですか？

平たくいうと、100 種類の成分の情報を組み合わせて、10 種類のお茶の違いがよく表れるような新しい指標を 3 つぐらい作るんだ。これらの指標の情報を組み合わせることで、10 種類のお茶の違いを分かりやすくするんだよ。これが、メタボロミクスでもっともよく使われる PCA（主成分分析：Principal Component Analysis）という方法なんだ。

なるほど、新しい指標を作ってサンプルを比べるわけですね。

PCA ではサンプル間の違いを見ることができて、さらにその違いの原因となっている成分を知ることができるんだよ。

他によく聞く PLS（Projections to Latent Structures）回帰法とはどういう方法ですか？

PLS 回帰法を使うと、成分情報を使ってある情報を説明することができるんだ。例えば、10 種類のお茶に 1 ～ 10 番までおいしさの順番がつけられているとしよう。100 種類の成分の情報を組み合わせて、おいしさの順に並ぶような新しい指標をつくって成分とおいしさの関係を表すことが PLS 回帰法なんだ。PLS 回帰法を使うことで、おいしさの順番と関係がある成分をうまく探し出すことができるんだよ。

なるほど。多変量解析は便利な道具になりそうですね。

でもね、道具に振り回されるんじゃなく、道具をうまく使いこなせるようにならないといけないよ。

Memo Note

多変量解析

宝物探しができる強力な方法
切れ味が鋭いので、しっかり考えて使おう

Let's begin! METABOLOMICS 10

メタボロミクスの応用例

ライト君が、メタボロミクスを始めてもうすぐ1年です。今日は、ライト君の卒業論文の発表会です。メタボロ博士も少し心配な様子です。どうやら発表が始まるみたいです。

私は、急性腸炎の動物モデルの腸組織のメタボロミクスを行いました。その結果、腸炎が起こっていると約80個の代謝物が変化することが分かりました。多変量解析の結果から、腸炎になるとグルタミンが減っていることが分かりました。そこで、グルタミンをマウスに与えたら、腸炎が収まったことも分かりました。

メタボロミクスの将来性について考えていることを教えてください。

はい。数あるオミックス解析の中で、メタボロミクスは生命現象そのものを観察することができます。今後は、代謝物同士の関係や代謝物と酵素の関係に関する情報も増えてきますし、分析方法の改良も進むと思います。メタボロミクスの技術が発達するとともに、先入観にとらわれず包括的に生命現象を知るためにはなくてはならない解析手法になると信じています。そして、わたしはこのメタボロミクスの発展に貢献していきたいと考えています。

このライト君の堂々とした受け答えを聞いて、メタボロ博士は少しはにかんだ表情をうかべ、うれしそうです。質疑応答も無事に終わり、ほっとしているライト君にメタボロ博士が話しかけています。

1 年間メタボロミクスをやってみてどうだった?

はい。最初はこれで何が分かるんだろうって思いましたが、実際に実験してみて、すごく強力な解析手法だと気づきました。

メタボロミクスの魅力を分かってくれて、うれしいよ。4月からもよろしくね。

こちらこそ、ご指導よろしくお願いします。

そうなんです。メタボロミクスを極めるために、ライト君は大学院に進学することにしたんです。ライト君が、メタボロ博士になる日もそう遠くはなさそうですね。

Memo Note

メタボロミクスの将来

生命現象を調べるための基盤技術

メタボロミクスの発展

- 分析方法の改良
- 分析機器の改良
- データベースの充実化
- 標準品の充実化

おわりに

いかがでしたか？
ライト君と一緒にメタボロミクスを学ぶことができましたでしょうか？
この冊子を手にとって「メタボロミクスってこういうものだったのか」、「おもしろそうだからちょっとやってみようかな」と思っていただくことが、私たちのなにものにも代えがたい喜びです。私たちはメタボロミクスの普及を願っております。メタボロミクスは、新しい研究領域の一つとなる可能性をもっています。私たちはメタボロ博士とともに、日々メタボロミクスをよりよいものにするために精進しております。

ご一読ありがとうございました。
またどこか（学会会場？）でメタボロ博士にあえるかもしれません。

SHIMADZU