

終了報告書（公開用要約）

研究課題	メタボロミクス：藻類の光独立・混合栄養代謝を解き明かす計算、化学資源の統合
日本側研究代表者（所属組織）	有田正規（国立遺伝学研究所）
アメリカ側研究代表者（所属組織）	オリバー・フィーン（UC Davis）

本研究プロジェクトを開始した 2011 年、大きく 3 つの目標を設定した。

1. 藻類の解析に役立つメタボロミクスのオープンアクセス資源の構築
2. 代謝物をより迅速に同定できるソフトウェアパイプラインの構築
3. 産業的に有用な藻類の代謝解析

共同研究の日本チームは有田正規（東京大学、後に国立遺伝学研究所）、金谷重彦（奈良先端科学技術大学院大学）、太田大策（大阪府立大学）の三人、米国チームはオリバー・フィーン、ジーン・ヴァンダーゲインスト、ジョン・ラバビッチ（いずれもカリフォルニア大学デイビス校）で構成した。各目標に対する成果を以下に概説する。

1. 藻類の解析に役立つメタボロミクスのオープンアクセス資源の構築

主要成果は代謝物の分子構造ライブラリ、MS/MS スペクトルライブラリーの構築と、藻類遺伝子情報ライブラリである。まず InChI キーを利用して 14 におよぶ国内外のデータベースの代謝物情報を統合し、メタボロミクス用 224,663 化合物セットを作成した。この中には、日本とドイツが連携して提供する MassBank (<http://massbank.jp/>)、本共同研究で構築した MassBank Of North America (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>)、カナダの Human Metabolome DB、カリフォルニア大学サン・ディエゴ校の GNPS が含まれ、統合したライブラリは、生体分子のセットとして情報系研究者の間で利用されている。そのうち MassBank 由来の 2098 化合物については、実測の MS/MS スペクトルを再整理した。また、23 種類のグリセロリン脂質、21 種類のスフィンゴリン脂質について、スペクトルを理論的に予測した LipidBlast ライブラリを作成、公開した

(http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/)。

その他、94 種の藻類における 96,441 代謝遺伝子の配列や機能、778 生物種における 2,356 化合物の生理活性などを整理し、KNAPSAcK データベースから公開している

(http://kanaya.naist.jp/KNAPSAcK_Family/)。

機械学習等に利用可能な代謝物構造やスペクトルのライブラリ、脂質の LipidBlast ライブラリは、メタボロミクスに携わる情報系研究者が長らく望んでいたリソースである。本共同研究では、化合物構造には InChI キー、マススペクトルには SPLASH キーという標準ハッシュコードを付与し、これらを国際会議や複数のワークショップを通じて連携研究者の間に普及させることで、情報の統合を実現した。

データの統合やプロトコル共通化を進めたことで、質量分析インフォマティクスと呼べる研究コミュニティを確立できた。成果の一つが 2017 年 3 月の湘南会議である。参加した 24 名の研究者がデータ統合や研究協力の覚書を交わした。中核メンバーは、国際メタボロミクス会議においても毎年、データ共

有とデータ標準化のワークショップを実施している。

関連情報

- データ標準化のレビュー論文 Rocca-Serra P *et al.* *Metabolomics* 12(1):14, 2016
- SPLASH ハッシュコードの論文 Wohlgemuth *et al.* *Nature Biotechnology* 34(11):1099-1101, 2016
- KNApSAcK データベースの論文
- 主催した会議等 *Metabolomics2015*(鶴岡) <http://www.metabolomics2014.org/>
Metabolomics2016 (San Francisco) <http://metabolomics2015.org/>
Shonan Meeting on Computational Metabolomics (湘南)

2. 代謝物をより迅速に同定できるソフトウェアパイプラインの構築

本共同研究における主要成果の二つ目は MS-DIAL および MS-FINDER という代謝物同定用ソフトウェアの作成である。いずれも日米スタッフの知識を動員して作成されたソフトウェアで、ユーザは世界に広がっている。特に MS-DIAL はその利用法チュートリアルが共同研究先の UC Davis だけでなく、米国ミズーリ大学の Lloyd Sumner 教授、シンガポール大学の Markus Wenk 教授のグループによっても実施されている。

MS-DIAL はもともと液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) 用に設計された。重なって溶出した代謝物 MS/MS スペクトルのピークから、元のピーク形状を分離・抽出するデコンボリューションという機能を、LC-MS/MS 向けに初めて実装している。この機能を用いて、LC-MS/MS の分析結果から個々の MS/MS スペクトルを網羅的に抽出できるようになった。

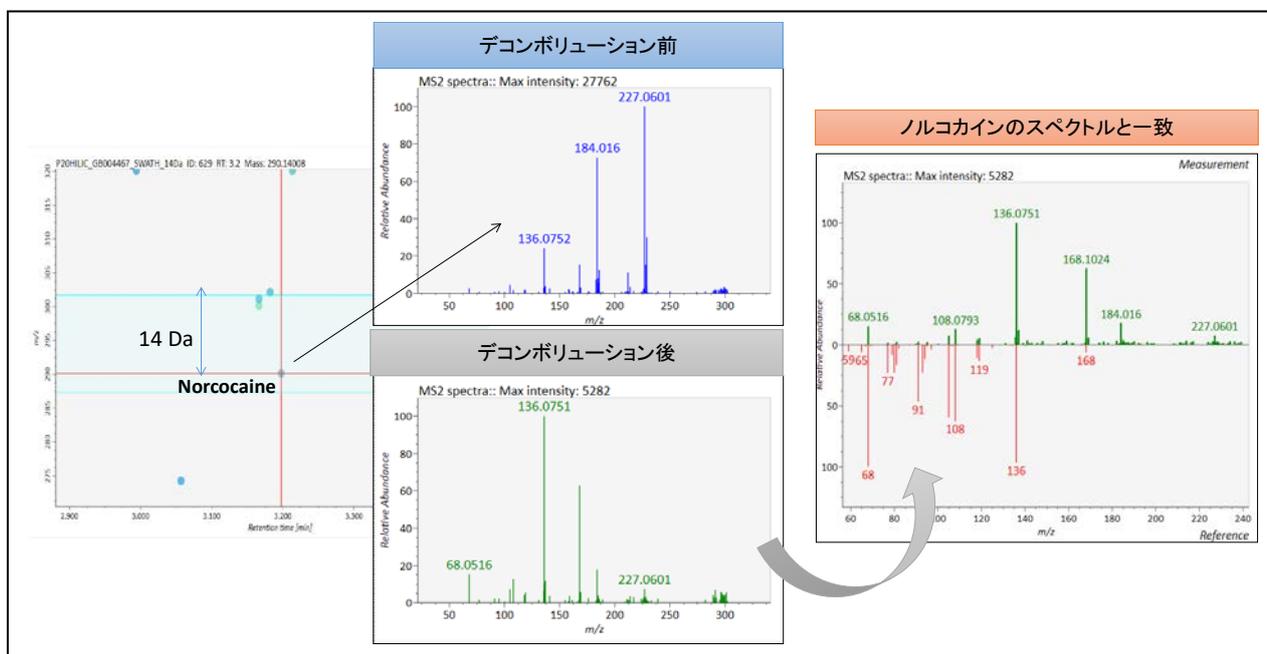


図1. ノルコカインのスペクトルを MS-DIAL によりデコンボリューションした結果。他スペクトルとの重なりを除去できている。

MS-DIAL をミドリムシ (*Euglena gracilis*) 及び 8 種の微細藻類のグリセロ脂質分析に応用した結果

が、下の系統分類である。グリセロ（リン）脂質の有無をフィンガープリントとしてクラスタリングすることで、微細藻類の系統関係を再現できた。当時は種名が不明であった UTEX2341 という藻類も、共同研究者によるゲノム解析により *Auxenochlorella protothecoides* であると判明した。

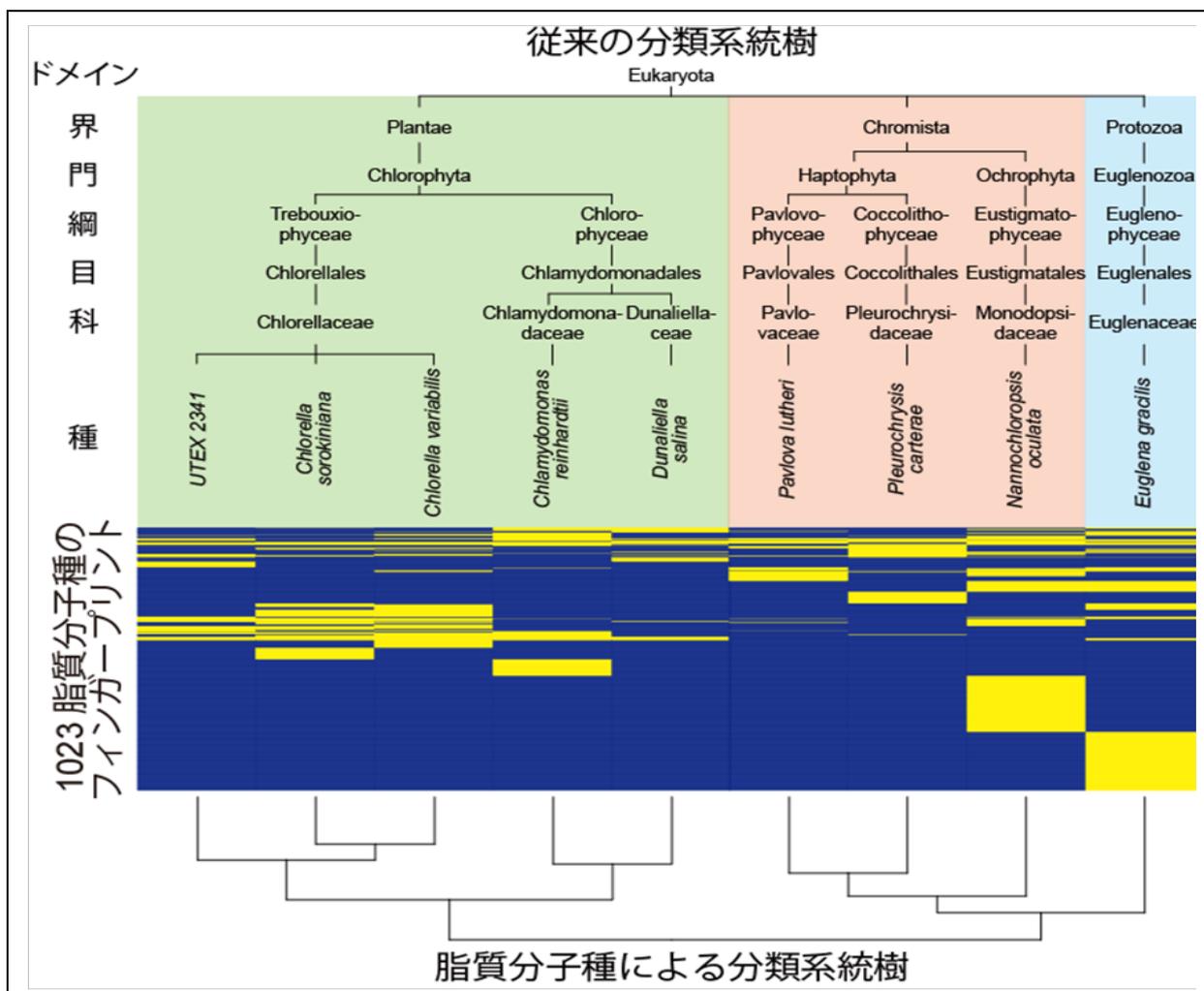


図2 (津川・有田『化学と生物』54(3), 151-153, 2016 より転載). 脂質分子種に基づいた9生物種の系統分類。上側は16S rRNAによるもの、下側は脂質分子種によるもので両者は一致する。黄色と青色はそれぞれ対象脂質の「検出」と「非検出」に相当。

もう一方の MS-FINDER は、化合物名が不明の MS/MS スペクトル情報から、候補化合物を絞り込むソフトウェアである。共同研究ではまず、前項で紹介した実測 MS/MS スペクトルを統計処理し、開裂パターンから水素再配置則と名付けた一般則を導き出した。この規則に基づいて分子構造ライブラリの各構造について開裂をシミュレーションできる。MS-DIAL が抽出した MS/MS スペクトルが新規の場合も、その類似度から化合物名を予測することが可能になった。このソフトウェアは 2016 年の CASMI 構造予測コンテストにおける「自動構造予測」分野で 1 位を獲得した。

これらのソフトウェアは現在も開発を続けており、現在はガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) の結果も処理できる統合プラットフォームとして、日米共同研究のまま進化を続けている。

関連情報

- MS-DIAL の論文 Tsugawa H et al. Nature Methods 12(6), 523-526, 2015
- MS-FINDER および水素再配置則の論文 Tsugawa H et al. Analytical Chemistry 88(16):7946-7958, 2016
- CASMI 構造予測コンテスト 2016 <https://ucdavis.pure.elsevier.com/en/publications/critical-assessment-of-small-molecule-identification-2016-automat>

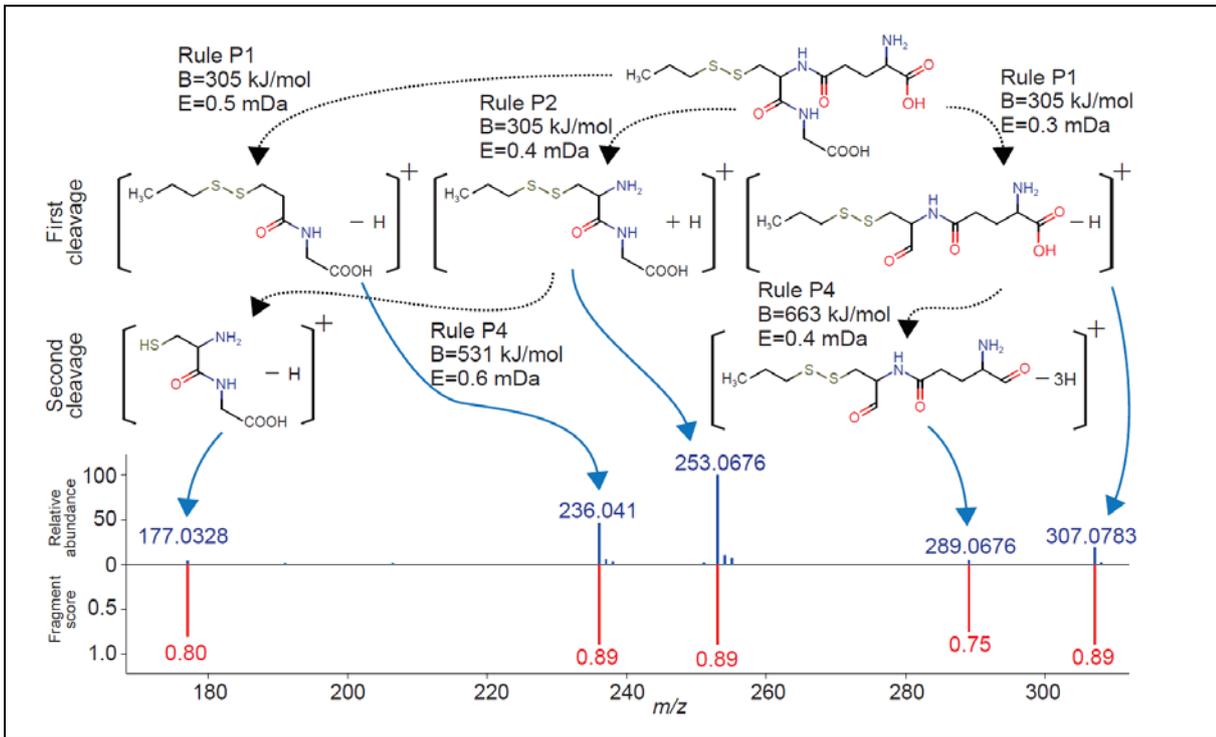


図3 (Tsugawa H et al. Analytical Chemistry 88(16):7946-7958, 2016 より転載). S-propyl-mercaptogluthathione における、水素再配置則による理論開裂パターン (赤) と、実測の MS/MS スペクトル (青) との一致。

3. 産業的に有用な藻類の代謝解析

主要成果の最後として紹介するのが、ワックスエステルを生産する鞭毛虫、ミドリムシのメタボローム解析である。ミドリムシは光合成により独立栄養的に生育でき、明条件の好気培養では大気中の CO₂ を固定してパラミロンと呼ばれる糖を蓄積する。しかし嫌気条件に移行するとパラミロンを分解してワックスエステルと ATP を産生する。

本研究ではミドリムシを瞬時に絶対嫌気条件に移行させる培養系を構築し、GC-MS と LC-MS、RNA-Seq を組合せた測定を実施した。脂質組成の同定には前出の LipidBlast を用いている。その結果、ミドリムシが好気から嫌気条件に移行した際は遺伝子発現の変化を伴わない代謝レベルのスイッチでワックス合成を進めることを明らかにした。

更に、安定同位体標識を用いた代謝フラックス測定により、酸素供給の遮断だけではワックス合成が開始されず、外部からの二酸化炭素供給が必須であることを初めて明らかにした。嫌気条件で固定され

た CO_2 は、還元的 TCA サイクルにおけるオキサロ酢酸、リンゴ酸、フマル酸を經由してコハク酸に至り、そこからワックスに入っていく。

これらの知見をもとに、遺伝子改変ではなくケミカルバイオロジー手法による藻類からの有用物質生産を試みた。超長鎖脂肪酸伸長酵素阻害剤として知られる農薬等をミドリムシの培養系に添加すると、蓄積される脂肪酸の長さが変化する。これを発展させ、様々な生理活性をもつ 426 種類の化合物を添加して培養するスクリーニング系を確立した。クエン酸や、リンゴ酸、アラニン等を蓄積させる化合物を獲得しており、現在もワックスを多く蓄積する条件調整をおこなっている。

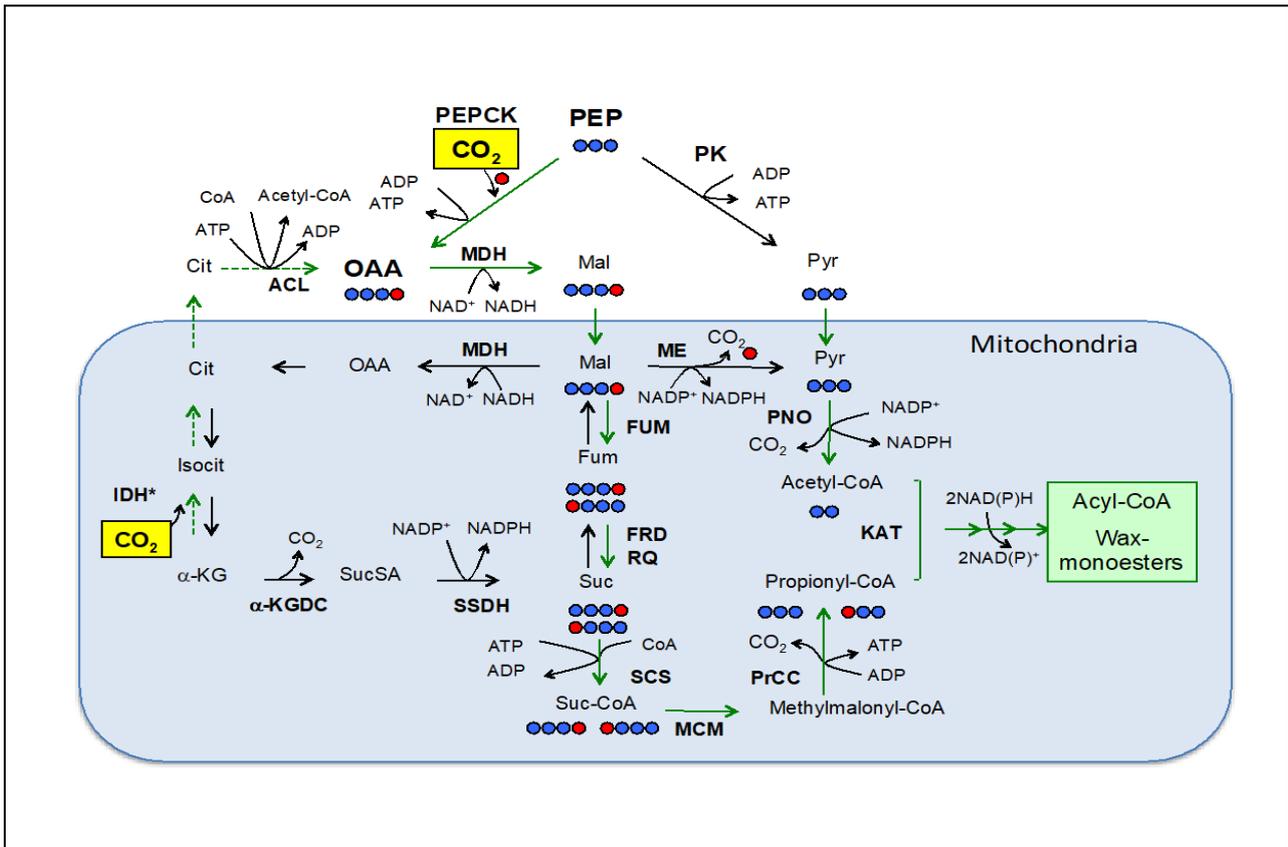


図 4 (Padermshoke A et al. *PLOS ONE* 11:e0162827, 2016 より転載). ミドリムシの嫌気培養において固定された CO_2 (赤丸) の経路。コハク酸からワックスエステル合成に利用される。

関連情報

- ミドリムシ脂質測定系の論文 Furuhashi T et al. *Metabolomics* 11, 175-183, 2015; Ogawa T et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 78:14-18, 2014; Mukaida et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 1223-1229, 2016
- ワックス合成に二酸化炭素が必須であることを示した論文 Padermshoke A et al. *PLOS ONE* 11:e0162827, 2016