

を利用した研究を紹介した。機会があったらぜひ野外で昆虫を捕まえて、その目を観察してみたい。そして、“虫の瞳”を見つけたら、それを学術的に利用した研究があったことを思い出してもらえたら、と思う。

- 1) Kirschfeld, K. & Franceschini, N. (1969) *Kybernetik*, 6, 13–22.
- 2) Lo, M.V.C. & Pak, W.L. (1981) *J. Gen. Physiol.*, 77, 155–175.
- 3) Li, B.#, Satoh, A.K.#, & Ready D.F. (#: contribute equally) (2007) *J. Cell Biol.*, 177, 659–669.
- 4) Satoh, A.K., O'Tousa, J.E., Ozaki, K., & Ready, D.F. (2005) *Development*, 132, 1487–1497.
- 5) Fujikawa, K., Satoh, A.K., Kawamura, S., & Ozaki, K. (2002) *Zool. Sci.*, 19, 981–993.
- 6) Ma, J., Plesken, H., Treisman, J.E., Edelman-Novemsky, I., & Ren, M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11652–11657.
- 7) Satoh, A.K., Li, B., Xia, H., & Ready, D.F. (2008) *Curr. Biol.*, 18, 951–955.
- 8) Liu, J., Taylor, D.W., Kremntsova, E.B., Trybus, K.M., & Taylor, K.A. (2006) *Nature*, 442, 208–211.
- 9) Thirumurugan, K., Sakamoto, T., Hammer, J.A. 3rd, Sellers, J. R., & Knight, P.J. (2006) *Nature*, 442, 212–215.
- 10) Taylor, K.A. (2007) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19, 67–74.
- 11) Akhmanova, A. & Hammer, J.A. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22, 479–487.
- 12) Wang, Z., Edwards, J.G., Riley, N., Provance, D.W. Jr., Karcher, R., Li, X.D., Davison, I.G., Ikebe, M., Mercer, J.A., Kauer, J.A., & Ehlers, M.D. (2008) *Cell*, 135, 535–548.
- 13) Wagner, W., Brenowitz, S.D., & Hammer, J.A. 3rd (2011) *Nat. Cell Biol.*, 13, 40–48.
- 14) Pashkava, N., Catlett, N.L., Novak, J.L., Wu, G., Lu, R., Cohen, R.E., & Weisman, L.S. (2005) *J. Cell Biol.*, 168, 359–364.
- 15) Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., & Hammer, J.A. 3rd (2002) *Nat. Cell Biol.*, 4, 271–278.

佐藤 明子

(名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻)

The mechanism of pigment granule migration in *Drosophila* photoreceptors

Akiko I. Satoh (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan)

Sortilin とソーティング障害, そして生活習慣病

1. はじめに

高齢化社会の到来もありアルツハイマー病や進行性認知症などの認知機能障害, 2型糖尿病や高脂血症などの生活習慣病が増加している。最近, これらの一般的に遅発性の疾患に共通の病理基盤としてVPS10P (vacuolar protein sorting 10 protein) ファミリーに属するSortilinの機能不全が関与する可能性が次々と報告されている¹⁻⁴⁾。

Sortilinは, 主にtrans-Golgi network (TGN), エンドソームと細胞膜間を行き来しながらさまざまな機能タンパク質のソーティングに関与している⁵⁾。近年ではgenome-wide association study (全ゲノム関連解析) によって生活習慣病や進行性認知症に関わるリスクファクター候補としてVPS10P受容体ファミリーメンバーが多数報告されている¹⁻³⁾。

本稿ではインスリン反応性グルコース (糖) 輸送担体 (GLUT4) の細胞内輸送制御に関わるSortilinの役割と2型糖尿病 (インスリン抵抗性病態) におけるその機能不全について主に解説しながら, 生活習慣病をソーティング障害 (sorting disorders) という新たな視点で捉えてみたい。

2. Sortilinsの構造と機能

VPS10P受容体ファミリーはI型膜タンパク質で細胞内小胞と細胞膜に存在し, その内腔側領域 (あるいは細胞膜上では細胞外領域) となるN末端には10個のβプロペラドメインからなるトンネル構造を形成するVPS10Pドメインを有している (図1)。いずれのファミリーメンバーもプロセッシング酵素furinにより前駆体型から成熟型となることによってこのVPS10Pドメインが開放され, 多種多様なリガンドタンパク質と結合できるようになる。そのリガンドとなる分子は, カテプシンDなどのリソソーム酵素, ProNGF (神経成長因子前駆体) やProgranulinなどの分泌性タンパク質にとどまらず, チロシンキナーゼ受容体のTrkA/B/CやグルコーストランスポーターのGLUT4などの膜貫通型タンパク質とも会合することができる⁴⁾。また, Sortilinの細胞外領域はTACE (TNF-α converting enzyme) によって切断 (shedding) されることが明らかにされており, 各種リガンドのソーティングはこのshedding

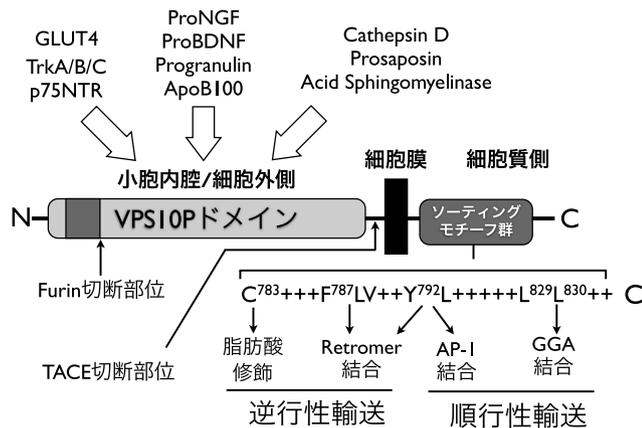


図1 Sortilinの構造と機能

SortilinのVPS10Pドメイン(内腔側)はさまざまなタンパク質と会合する能力を持っている。他方、その細胞質側には複数のソートリングモチーフが存在している。そのため、SortilinはTGNからエンドソームへの順行性輸送とその逆方向の逆行性輸送を経ながら、VPS10Pドメインに会合したタンパク質のソートリング制御に関与している。

状況によっても複合的に制御されると考えられている。哺乳類では同ファミリーメンバーとしてSortilin, Sortilin-related receptor with A-type repeats (SorLA), Sortilin-related receptor CNS (central nervous system) expressed (SorCS) 1, SorSC2, SorCS3の5種類が存在し、いずれも神経系に多く発現している。Sortilinについては神経系以外でも最終分化した細胞(特に骨格筋、脂肪細胞や肝細胞といったインスリン標的細胞)などにもその発現が認められる^{2,6,7)}。

Sortilinの細胞質側領域には細胞内小胞輸送制御に関わるいわゆるソートリングモチーフが複数存在している。これらのモチーフにはAP-1(adaptor protein-1)やGGA(Golgi-localizing, γ -adapting ear homology domain, ARF-interacting protein)を含めた小胞輸送アダプタータンパク質などが会合する。そのため、SortilinはTGNからエンドソームへの順行性輸送とエンドソームからTGNへと回帰する逆行性輸送、さらに一部は細胞膜をも経由しながら細胞内を行き来している。上述のリガンドタンパク質群は、Sortilinとの親和性環境とその積極的な輸送特性により選択的に細胞内輸送されながら適切なコンパートメントへとソートリングされていく⁵⁾。

3. インスリン作用とSortilin

① インスリン依存性糖取り込み亢進とGLUT4

インスリンによる血糖降下作用に必須の役割を果たすGLUT4は膜12回貫通型の促通拡散型糖輸送担体で、イン

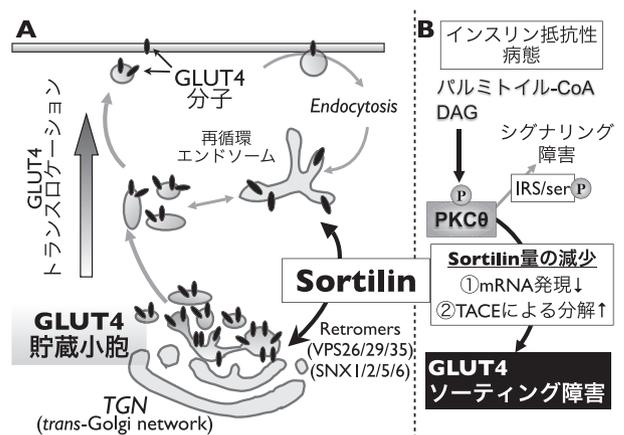


図2 SortilinによるGLUT4ソートリング(A)とインスリン抵抗性病態(ソートリング障害)の発症機序(B)

(A) インスリン反応性GLUT4トランスロケーションが正常に稼働するためには、インスリン反応性を有するGLUT4貯蔵小胞が形成されることが第一条件となる。このGLUT4貯蔵小胞の形成には、Sortilinによって誘導されるGLUT4の逆行性輸送(再循環エンドソームからTGNへのソートリング)が必須である。そして、このSortilinの逆行性輸送にはRetromerタンパク質複合体(VPS26/29/35とsorting nexin1/2/5/6から構成)が関与している。

(B) 飽和脂肪酸によって惹起されるインスリン抵抗性病態には、PKC θ を介したSortilinタンパク質量の減少と引き続くGLUT4ソートリング障害が深く関与している。

スリン刺激がない平静時にはGLUT4貯蔵小胞(再循環エンドソームとTGNから派生)に組み込まれて細胞内に貯留しており、細胞膜にはほとんど(~5%)存在していない。一方、インスリン刺激は細胞内小胞輸送系を介してそのGLUT4を細胞膜上へと移行(GLUT4トランスロケーション)させ、その結果として血糖降下作用が発揮される。血糖値が平常化してインスリンがなくなると、細胞膜表面に露呈していたGLUT4はエンドサイトーシス後に適切なソートリング(選択的分別輸送)過程を経てGLUT4貯蔵小胞へと帰還して貯留される⁸⁾(図2)。

このインスリン応答性GLUT4トランスロケーション機構にはインスリン刺激の有無に応じたGLUT4の適切なソートリング制御が不可欠であるが、この仕組みは骨格筋と脂肪細胞が分化してSortilinの発現が誘導されることによってはじめて発達していく。したがって、GLUT4だけを未分化な線維芽細胞などに外來性に発現させても、GLUT4貯蔵小胞が形成されず、細胞内シグナル伝達系を最大限に活性化したとしても、未分化細胞ではインスリン依存性GLUT4トランスロケーション(すなわちインスリン依存性糖取り込み亢進作用)がほとんど再現できな

い^{6,7,9)}.

② インスリン応答性 GLUT4 貯蔵小胞の形成と Sortilin

Kandror, K. V.らは脂肪細胞の GLUT4 含有小胞に多く含まれるタンパク質として Sortilin を同定し、その VPS10P ドメインを含む内腔領域と GLUT4 が小胞内腔で互いに会合する能力を有していること、GLUT4 とともに Sortilin を未分化な線維芽細胞（前脂肪細胞）に同時に外来発現させるとインスリン応答性 GLUT4 トランスポーズンシステムが不完全ながら一部構築されることを明らかにしている^{6,10)}。この Sortilin 作用については培養脂肪細胞において明らかにされたものであるが、骨格筋細胞においても Sortilin が GLUT4 トランスポーズンシステムの形成に必須の役割を果たすことが確認されている⁷⁾。

Sortilin がいかにしてインスリン応答性 GLUT4 貯蔵小胞の生合成を制御しているのかについては、その解析の困難さもあり未だ不明な点が多い。しかし、Sortilin の順行性輸送に関わるアダプタータンパク質 GGA1 が GLUT4 貯蔵小胞の形成（特に新合成された GLUT4 のソーティング過程）に関与する可能性が観察されている¹¹⁾。また、インスリン刺激により一旦細胞膜へと移行した GLUT4 がエンドサイトーシス後に再びその貯蔵小胞へと帰還する際には、Sortilin の逆行性輸送系とその制御に関わる Retromer タンパク質複合体との協調作業の重要性についても観察されている (Hatakeyama, H. & Kanzaki, M., *in press*)。すなわち、GLUT4 貯蔵小胞は再循環エンドソームから TGN へと GLUT4 が Sortilin の働きによって適切にソーティングされることにより生合成されているものと考えられる (図 2)。

③ インスリン受容体シグナルと GLUT4 トランスポーズン

GLUT4 トランスポーズンにはインスリン受容体チロシンキナーゼの基質となる IRSs (insulin receptor substrates) のリン酸化から phosphatidylinositol (PI)-3 キナーゼの活性化 (PI3,4,5P3 産生亢進) と、それに引き続く AKT2/PKB β のリン酸化・活性化が必須であることが確立している。さらに Rho ファミリー低分子量 G タンパク質によるアクチン細胞骨格系調節も重要な役割を果たしている⁸⁾。いずれにしても、このインスリン作用を考える上で最も重要なことは、インスリンシグナルに対して良好な応答性を所持した GLUT4 貯蔵小胞が Sortilin の働きにより適正に生合成され細胞内に貯留されていることがまず前提条件となっていることである。細胞分化によって発現誘導

される Sortilin の重要性は述べたが、後述するように骨格筋における Sortilin の発現低下がインスリン抵抗性発症の原因の一つになっている可能性が最近明らかにされた^{12,13)}。

④ インスリン抵抗性と Sortilin 機能不全

食生活の欧米化、特に飽和脂肪酸の過剰摂取は肥満の大きな原因となっているが、パルミチン酸などの飽和脂肪酸が骨格筋に過剰に取り込まれると、このインスリン依存性 GLUT4 トランスポーズンに障害（インスリン抵抗性）が生じる^{13,14)}。食事後に上昇する血糖（血中グルコース）のうち大部分（75% 程度）はインスリン刺激により GLUT4 トランスポーズンを介して骨格筋組織内へと取り込まれることから、その病態発症機序の解明は非常に重要な意義を持つ。

骨格筋細胞の場合、飽和脂肪酸の代謝産物であるジアシルグリセロール (DAG) やセラミドなどの生理活性脂質が過剰蓄積されると、PKC θ (protein kinase θ), JNK (Jun-N-terminal kinase), IKK β (I κ B kinase β) などのストレス応答性セリン・スレオニンキナーゼの活性化が起きる。これらの酵素は、インスリンシグナル伝達系において重要な IRSs が持つセリン残基のリン酸化を引き起こす。一般的に IRSs のセリン残基リン酸化はインスリン受容体チロシンキナーゼによる適正なチロシン残基リン酸化反応に対して抑制的に働くため、インスリン受容体の初期シグナル伝達系が減弱してインスリン抵抗性が惹起されていると理解されている。一方、2型糖尿病を罹患していてもこの細胞内シグナル伝達系の減弱がほとんど認められないという報告も数多くある¹⁵⁾。

筆者らは、培養骨格筋細胞内での飽和脂肪酸の過剰蓄積が上述した PKC θ 活性化を介して Sortilin の発現減少も同時に引き起こし、その結果として GLUT4 のソーティング自体にも破綻が生じていることを明らかにした¹³⁾。この比較的高濃度のパルミチン酸で惹起されたインスリン抵抗性病態では、活性化された PKC θ によって Sortilin の mRNA 発現量の低下が起きるとともに TACE 依存性の shedding も亢進しており、これら二つの機序により Sortilin タンパク質量の減少が惹起されていた。一方、パルミチン酸による病態発症を抑制する能力を有するオレイン酸などの不飽和脂肪酸と一緒に添加すると¹⁶⁾、Sortilin 量の減少は抑制され、同時にインスリン依存性 GLUT4 トランスポーズンもほとんど正常化する。さらにインスリン抵抗性の改善薬として既に臨床利用されているチアゾリジン系の薬剤を同時投与することにより Sortilin 量の回復とともに適正な

GLUT4 トランスロケーションも復活した。

これまでインスリン抵抗性を惹起する PKC θ の病態機序として初期シグナリングに対する作用だけが知られていた。しかし、このシグナリング障害にくわえ PKC θ の不正活性化は Sortilin タンパク質量を減少させて GLUT4 ソーティング障害も同時に誘発することにより強いインスリン抵抗性を惹起しているものと考えられる。シグナリング障害に比して、Sortilin 量減少による GLUT4 ソーティング障害は中長期的な、より重篤なインスリン抵抗性病態の成因となる可能性も高いため、この病態分子基盤は今後新しい治療標的としても極めて重要であると考えられる。

4. 高コレステロール血症と心筋梗塞危険因子としての Sortilin 機能障害

全ゲノム関連解析から染色体 1p13 が高コレステロール血症と心筋梗塞罹患率に強く相関することが示唆されていたが、最近、この遺伝子座に位置する Sortilin のイントロン領域に一塩基多型 (SNP) に起因した肝細胞における Sortilin 発現変動がその原因となることが明らかにされた^{1,2)}。すなわち、遺伝子多型 (minor) を運良く持っている個人では、転写因子 C/EBP 認識配列が SNP により創出され、肝細胞における Sortilin 遺伝子の転写亢進がおこり血中コレステロール値低下と心筋梗塞リスク低下が認められる。一方、多数の人がもつ配列 (major) では、功を奏する Sortilin 発現上昇は見られず、生活習慣によっては高コレステロール血症と心筋梗塞になる可能性が高くなるという²⁾。

Sortilin は肝細胞で産生されるリポタンパク質 VLDL (very low density lipoprotein) の構成タンパクである ApoB 100 と結合する能力があり、肝細胞での Sortilin の発現亢進は ApoB100 を含む VLDL の細胞内輸送系に影響して、その分泌亢進を引き起こすことが培養系において確認されている¹⁾。個体レベルでの解析結果では報告により相違もあることから^{1,2)}、その詳細な細胞内ソーティング機構については今後の研究を待つ必要がある。しかし、肝細胞における Sortilin 発現変動が ApoB100 と VLDL の細胞内ソーティングを変化させることにより血中コレステロール値を規定し、結果的に心筋梗塞リスクに深く関与するという事実は非常に重要な新知見である。

5. 神経ネットワーク維持と Sortilin

神経系における VPS10P ファミリーメンバーの重要性については多数報告されている⁵⁾。ごく最近、Sortilin による Trk 受容体 (高親和性 NGF 受容体) の細胞内ソーティン

グ機構の生理的重要性が明らかにされた⁴⁾。長い軸索突起を有する神経細胞では神経終末部位まで効率的にこれらの神経栄養因子受容体を輸送する必要があるが、Sortilin は Trk と小胞内腔において会合しながらソーティング制御してこれらのチロシンキナーゼ型受容体をシナプスまで積極的に順行性輸送している。重要なことに、この Sortilin の作用は発生初期の神経ネットワーク新規形成時には必ずしも必要ではなく、一旦構築された神経ネットワークのシナプスを増強し長期にわたり維持するために必須であることが遺伝子欠損マウスにおいて観察されている。すなわち、発生時や若年時期では、Trk 受容体の輸送効率に若干の滞りがあったとしても、NGF などの神経栄養因子群が豊富に存在するため、ある程度補償され重篤な症状を示すに至らないが、加齢とともに栄養因子濃度が低下していくにつれ Sortilin を介した効率的な Trk 受容体の順行性輸送の不可欠性が顕著になっていくのである。

6. おわりに

Sortilin を含めた VPS10P 受容体ファミリーメンバーはさまざまな機能タンパク質を「適材適所」に輸送する働きを担っている。この機能は高次な生命現象が効率的に営まれるためになくなくてはならないものであるが、その働きの重要性 (不可欠性) は、特に遅発性あるいは加齢とともに顕著になることが最近の研究から明らかにされつつある。遺伝素因、生活習慣や加齢などによりわずかな脆弱性 (バランスの崩れ) が露呈したときにこそ、この効率的な「適材適所」の意義が高まるのであろう。加齢性に発症するさまざまな生活習慣病の理解が「sorting disorders」という新概念によって大きく開けるものと思われる。

- 1) Kjolby, M., Andersen, O.M., Breiderhoff, T., Fjorback, A.W., Pedersen, K.M., Madsen, P., Jansen, P., Heeren, J., Willnow, T.E., & Nykjaer, A. (2010) *Cell Metab.*, 12, 213-223.
- 2) Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N.E., Ahfeldt, T., Sachs, K.V., Li, X., Li, H., Kuperwasser, N., Ruda, V.M., Pirruccello, J.P., Muchmore, B., Prokunina-Olsson, L., Hall, J.L., Schadt, E.E., Morales, C.R., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Wong, J., Cantley, W., Racie, T., Ejebe, K. G., Orho-Melander, M., Melander, O., Koteliensky, V., Fitzgerald, K., Krauss, R.M., Cowan, C.A., Kathiresan, S., & Rader, D.J. (2010) *Nature*, 466, 714-719.
- 3) Carrasquillo, M.M., Nicholson, A.M., Finch, N., Gibbs, J.R., Baker, M., Rutherford, N.J., Hunter, T.A., DeJesus-Hernandez, M., Bisceglia, G.D., Mackenzie, I.R., Singleton, A., Cookson, M.R., Crook, J.E., Dillman, A., Hernandez, D., Petersen, R.C., Graff-Radford, N.R., Younkin, S.G., & Rademakers, R. (2010) *Am. J. Hum. Genet.*, 87, 890-897.

- 4) Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., Lewin, G.R., Willnow, T.E., Chao, M.V., & Nykjaer, A. (2011) *Nat. Neurosci.*, **14**, 54–61.
- 5) Willnow, T.E., Petersen, C.M., & Nykjaer, A. (2008) *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 899–909.
- 6) Shi, J. & Kandrор, K.V. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 99–108.
- 7) Ariga, M., Nedachi, T., Katagiri, H., & Kanzaki, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 10208–10220.
- 8) Kanzaki, M. (2006) *Endocr. J.*, **53**, 267–293.
- 9) Fujita, H., Hatakeyama, H., Watanabe, T.M., Sato, M., Higuchi, H., & Kanzaki, M. (2010) *Mol. Biol. Cell.*, **21**, 2721–2731.
- 10) Shi, J. & Kandrор, K.V. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 9008–9016.
- 11) Watson, R.T., Khan, A.H., Furukawa, M., Hou, J.C., Li, L., Kanzaki, M., Okada, S., Kandrор, K.V., & Pessin, J.E. (2004) *Embo J.*, **23**, 2059–2070.
- 12) Kaddai, V., Jager, J., Gonzalez, T., Najem-Lendom, R., Bonnafous, S., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Tanti, J. F., & Cormont, M. (2009) *Diabetologia*, **52**, 932–940.
- 13) Tsuchiya, Y., Hatakeyama, H., Emoto, N., Wagatsuma, F., Matsushita, S., & Kanzaki, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 34371–34381.
- 14) Kadotani, A., Tsuchiya, Y., Hatakeyama, H., Katagiri, H., & Kanzaki, M. (2009) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, E1291–1303.
- 15) Storgaard, H., Jensen, C.B., Bjornholm, M., Song, X.M., Madsbad, S., Zierath, J.R., & Vaag, A.A. (2004) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 1301–1311.

神崎 展

(東北大学大学院医工学研究科病態ナノシステム研究分野)

Sortilin, sorting disorders, and life-style diseases
Makoto Kanzaki (Biomedical Nanoscience Laboratory,
Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

メタボロミクスによる酵素機能解析研究

1. はじめに

新しい酵素の探索や機能解明は、細胞の代謝プロセスの理解や薬剤標的の発掘のために重要なステップである。ゲノム解読が加速化した近年、遺伝子・タンパク質機能の系統的な解析は進展しているものの、未だ機能が同定されな

いものも少なくない。大腸菌の遺伝子、タンパク質、代謝の統合的データベース EcoCyc では、約 40% の大腸菌遺伝子機能が証明されていないと報告している¹⁾。また、生物学的、生化学的に細胞の代謝活性が認められているにもかかわらず、その反応を担当するはずの酵素に遺伝子が割り当てられていない「Orphan activities」が既知の酵素活性のうち 30–40% 存在すると報告されている²⁾。大腸菌の場合には、現在 33 個の遺伝子対応ができない酵素活性が EcoCyc にリストされている。これら同定されていない酵素の存在が代謝マップのギャップを生み、細胞の代謝研究の発展を阻む障壁となっている。

メタボロミクスは、細胞の全代謝物質（メタボローム）を網羅的に解析することを意味する。メタボローム測定技術は、この 10 年間で飛躍的な技術的発展を遂げ、現在では数百以上の代謝物質の定量的情報を一斉に取得することが可能となり、細胞の機能研究に広く利用されるようになった^{3,4)}。

本稿では、メタボロミクスを酵素機能研究に適応した筆者らのアプローチと、関連する最近の知見をまとめた。

2. メタボローム解析技術を利用した酵素機能解析

非ターゲット的な代謝物質プロファイリングを酵素機能解析に適応した最初の例は、Saghatelian らが報告した“Discovery metabolite profiling”だと認識している⁵⁾。彼らは、野生型と脂肪酸合成系の酵素を欠損したマウス組織からのメタボロームを比較することで酵素基質を特定することに成功した。この手法は、*in vivo* の酵素基質を直接的に同定できる大変優れた手法であるが、可逆的な反応やアイソザイム、バイパス経路が複数存在する一次代謝経路では、一つの酵素欠損が細胞内で必ずしも前後の代謝物質の蓄積に影響を与えないことも多いため、そのケースではうまく酵素基質を特定できない可能性もある。

筆者らは、メタボローム解析手法と *in vitro* 酵素反応を組み合わせた酵素スクリーニング手法を考案した。以下に手法の概要を述べる（図 1）。精製した酵素とメタボロームを混合した溶液中で *in vitro* 反応を行う（ステップ 1, 2）。反応後、酵素を限外ろ過で除去した代謝物質溶液をキャピラリー電気泳動（飛行時間型）質量分析計（CE-(TOF) MS）によるメタボローム解析方法で分析し、反応を行っていない（酵素を入れない）コントロールと同時に代謝物質プロファイルを取得する（ステップ 3）。各プロファイルと比較し、反応後に濃度が変化した代謝物質を比較解析ツール⁶⁾で検出する。このステップで、酵素反応に