

- 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

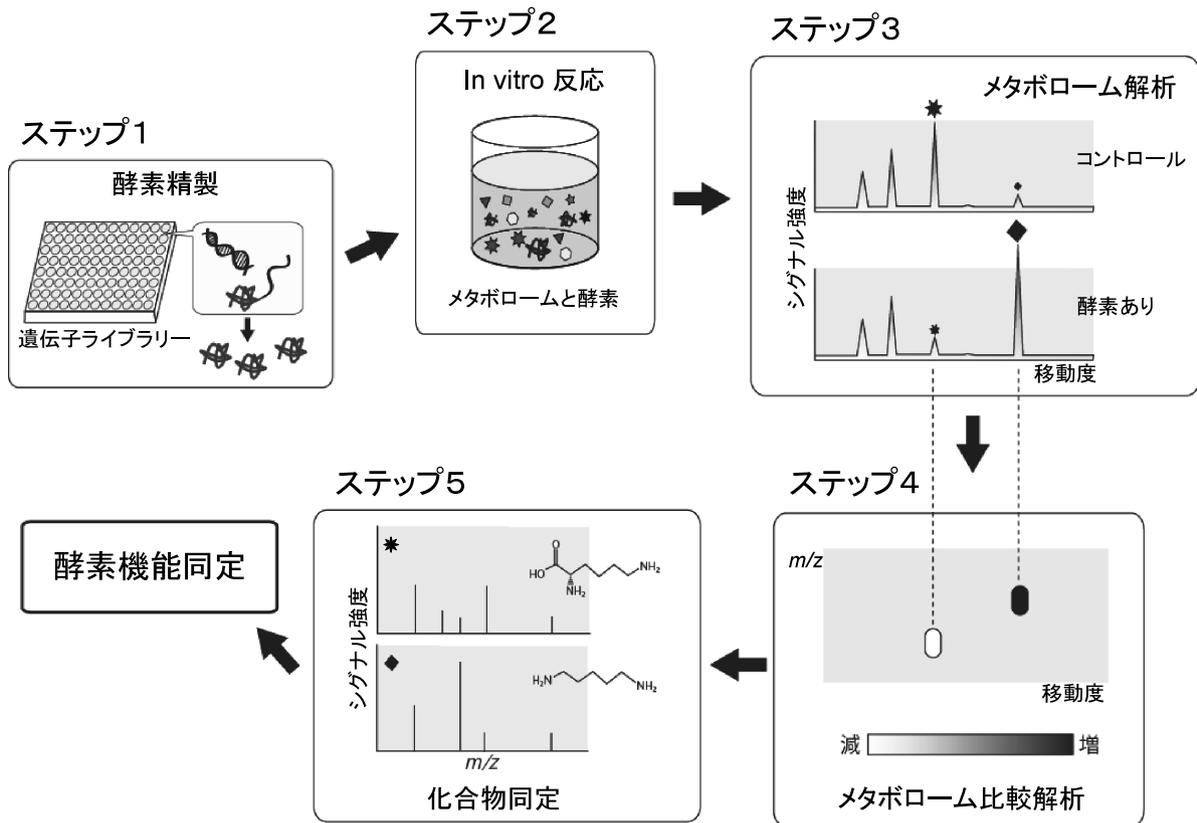


図1 メタボローム解析手法による酵素機能解析の概略

関与した化合物（基質と生成物）は測定ピークの増減として検出できるので、これらの化合物を同定することで酵素が触媒した反応を特定することが可能となる（ステップ4, 5）。以上のストラテジーを構築し、機能未知タンパク質を対象とした酵素スクリーニングを試みた。

3. スクリーニング手法の構築と評価

手法の構築と評価のための既知代謝酵素として、メチオニンアデノシル転移酵素 (EC 2.5.1.6), リボヌクレオシド加水分解酵素 (EC 3.2.2.1), アデニンデアミナーゼ (EC 3.5.4.2), アデノシンデアミナーゼ (EC 3.5.4.4), リシン脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.18) を選択し, ASKA ライブラリー (大腸菌の全 ORF を含むクローンセット)⁷⁾ から大腸菌のヒスチジンタグ付き酵素を取得して評価対象とした。また、酵素の基質候補のプールとなるメタボロームには、生体から抽出するメタボロームより容易にかつ継続的に入手することができるという理由で、いくつかの市販培地用試薬の組成をメタボローム解析と比較し、最も多種類の化合物が含まれていた Bacto yeast extract (ベクトン・ディッ

キンソン社製) から調製したものをテストケースとして使用した。それぞれ準備した酵素とメタボロームを用いて *in vitro* 反応後、反応産物を CE-MS で分析した2例を図2に示した。図はリシン脱炭酸酵素とリボヌクレオシド加水分解酵素の反応による、メタボローム中のリシンの減少 (基質) とカダベリンの増加 (生成物), およびアデノシン (基質) の減少とアデニン (生成物) の増加を検出した CE-MS のエレクトロフェログラムである。この結果は、本来の基質以外の化合物が数百種類も存在する酵母抽出物由来のメタボローム中で酵素の基質と生成物を特定し、酵素反応を同定できることを示すものであった⁸⁾。

4. 機能未知タンパク質のスクリーニング

上記の手法の評価により、酵素反応を特異的に検出できることが確認できたので、いよいよ大腸菌機能未知タンパク質を対象としてスクリーニングを開始した。基質には既知酵素の反応と同様の yeast extract から調製したメタボロームを適用したが、これには一般的な酵素反応の補酵素となる化合物が含まれていないため、18種類の補酵素類

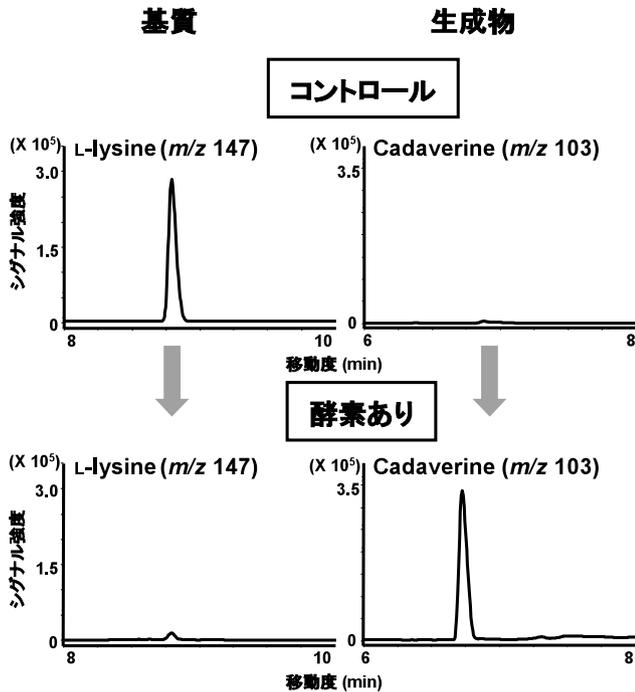
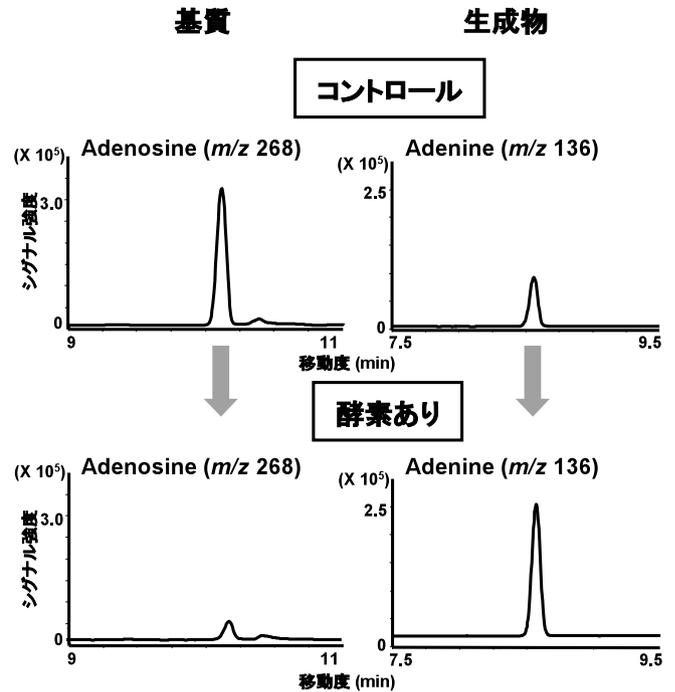
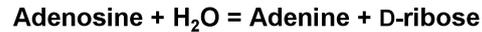
EC 4.1.1.18 Lysine decarboxylase (*cadA*)EC 3.2.2.1 Ribonucleoside hydrolase (*rihC*)

図2 既知代謝酵素を用いた手法の評価

CE-MSの選択イオンモニタリング (SIM) 法で測定して得たエレクトロフェログラム. 左がリシン脱炭酸酵素, 右がリボヌクレオシド加水分解酵素の反応. 上段は酵素なしのコントロール, 下段が酵素反応後のエレクトロフェログラム. 化合物の m/z 値は, $[M+H]^+$ イオンの質量電荷比を表す. yeast extract から調製した数百の代謝物質を含むメタボロームの中から, 酵素の基質と生成物を特異的に検出したことを示す.

(NAD(P)⁺/NAD(P)H, コエンザイム A など) を補ったメタボロームを基質プールとして使用した. このスクリーニングでは, 約 40 の大腸菌機能未知タンパク質をテストし, 三つの新しい酵素機能を見つけることができた. そのうち, 代謝経路の同定に至った一つの興味深い酵素について以下に述べる.

スクリーニングで候補として選出されたタンパク質は, 大腸菌の機能未知遺伝子 *yihU* にコードされるタンパク質 (YihU) で, アミノ酸配列の相同性検索により既知脱水素酵素に共通するモチーフを持っていることがわかっていった. YihU を基質プールと混合して *in vitro* 反応を行ったサンプルとタンパク質を含まないコントロールの間でメタボロームプロファイルに違いが認められたことで, YihU が活性をもつ代謝酵素の可能性が示唆された (図 3). YihU の反応で変化が認められた化合物は, 分子量が 102.03 と 116.01 の陰イオン性化合物で, いずれも増加, つまり酵

素反応の生成物として検出された物質であった. 既知標準物質と照合, およびタンデム質量分析によるフラグメントパターンの解析により, 分子量が 102.03 と 116.01 の陰イオン性化合物はそれぞれコハク酸セミアルデヒド (Succinic semialdehyde: SSA) とフマル酸 (Fumarate) であると同定することができた.

5. 酵素機能と代謝経路の同定

YihU の反応生成物として二つの代謝物質を見つけることができたが, 基質に相当する化合物をメタボロームの中から探索することはできなかった. 理由は, 基質の減少が微弱で変化を検出できない, 化合物の安定性の問題で定量性が悪い, などいくつか考えられるが, 後の結果からこの場合には前者であることが推察された. いずれにしても, この段階では反応生成物の手がかりしか得ることができなかったため, 反応を特定するためにさらに調べる必要が生

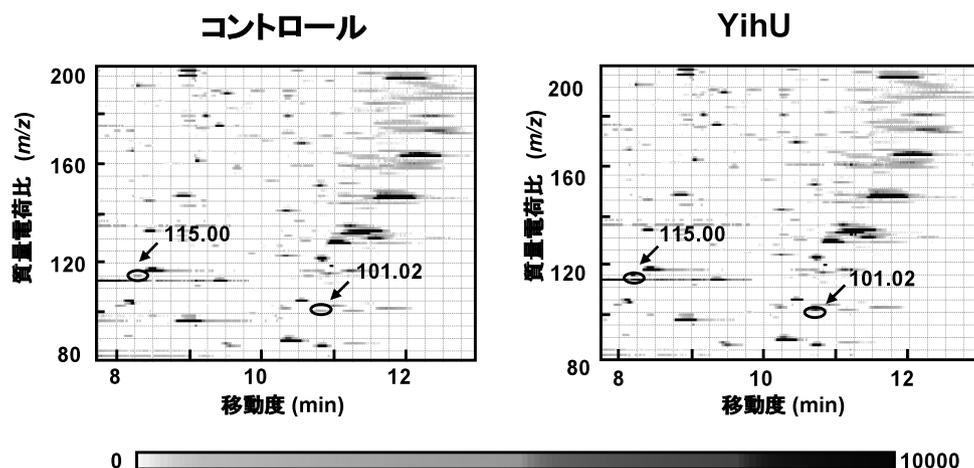


図3 YihUタンパク質の反応による代謝物質プロファイルの変化

酵素なしのコントロール（左パネル）とYihU（右パネル）の反応後に、CE-TOFMS解析で得られた代謝物質プロファイルを移動度と質量電荷比（ m/z ）の2次元プロットで表現した図。プロットの色濃淡はピークの大さを示す。スケールをパネル下に表示した。矢印で指したプロットはYihU反応後にレベルが変化した代謝物質、数字は $[M-H]^-$ イオンの質量電荷比を表す。

じた。YihUは、アミノ酸配列の情報から $NAD^+/NADH$ が必要な酸化還元反応を触媒する脱水素酵素の可能性が示唆されていたため、可逆的な反応が期待できた。そこで、スクリーニングで反応生成物として見つかったSSAとフマル酸を、逆に基質として使用して*in vitro*反応を行った。すると、SSAを基質として用いた反応において、 $NADH$ の減少と NAD^+ の増加を伴って分子量が104.05の未同定化合物を生じた。この化合物が最初のスクリーニングでSSAを生じさせた基質化合物である可能性が極めて高かった。酵素データベース（BRENDA）でSSAを利用する反応を検索したところ、分子量が104.05の物質はSSAの還元反応で生成する γ -ヒドロキシ酪酸（ γ -hydroxybutyrate：GHB）であることが示唆された。この化合物に該当する標準化合物は市販で入手不可能だったため、有機化学合成により合成したものを標準化合物として分析プロファイルの照合を行った。SSAから生成した未同定化合物と合成したGHBは、CE-TOFMSによる移動度と精密質量数、タンデム質量分析によるフラグメントパターンいずれもが、同一であるという結果を示した。以上の結果から、YihU反応でSSAから生じた化合物はGHBであると同定できた。SSA、GHBそれぞれに対するYihUの反応性を確認した結果、SSAに対する反応のほうが進行しやすいことが判明した。このことで、最初のスクリーニングではSSAがもとの基質プールに含まれていなかったためにGHBを基質とする起こりにくい逆反応の方が微

弱に起こり、その結果生じたSSAをメタボローム変化として捉えたと解釈できた。これまでの結果を総合すると、スクリーニングで発見された機能未知タンパク質YihUは、SSAとGHBの変換を可逆的に触媒する酸化還元脱水素酵素であることが明らかとなった⁹⁾。

YihUの反応が関与すると推定される代謝経路は、既知の大腸菌代謝マップには存在していなかったが、*Arabidopsis thaliana*において報告されていた¹⁰⁾。同等の代謝経路が大腸菌に存在し、さらにYihUがその経路に関与することを確かめるために、野生株大腸菌、および*yihU*遺伝子破壊株、過剰発現株を用いて、SSAの添加に対する*in vivo*代謝の挙動と耐性試験（SSAは生物毒性が知られている）など生物学的な確認を行った。結果は、大腸菌にSSAからGHBへつながる代謝経路が存在することを示し、その反応をYihUが担当することを強く示唆するものであった。

6. おわりに

本稿では、筆者らが開発したメタボローム解析技術を利用した酵素機能同定方法を中心に、酵素スクリーニングの応用例や新たに大腸菌から見つけた酵素の知見などについて述べた。類似するアプローチとして、*Mycobacteria*の機能未知酵素を同定した例が最近報告されている。筆者らが人工的な代謝抽出物を用いてスクリーニングを行ったことに対し、彼らは*Mycobacteria*からのメタボローム抽出物

を用いて *in vitro* 酵素反応を行い、液体高速クロマトグラフィ-質量分析 (LC-MS) によるメタボローム解析で基質を特定し、機能同定に成功している¹¹⁾。

紹介してきた手法は、特殊な代謝経路を持つ生物種やゲノムアノテーションが遅れている生物種などにも有効性を示すと思われる。また、機能未知酵素のスクリーニングの他、既知酵素の新しい活性や酵素阻害剤の探索などにも適応可能だろう¹²⁾。しかし、手法としていくつかの問題点もある。特にこの方法の最大のボトルネックは、化合物同定のステップと考えている。実際に筆者らのスクリーニング過程において、変化のあった物質の特定ができずに機能同定に至らず、酵素候補が放置されているような現状もある。こういったメタボロミクス自体の技術的問題点もあり、本手法や類似する方法を用いた酵素同定の例はまだ少ないが、今後のメタボローム解析技術の発展とともに、生化学の新しいツールとして普及する日がくると期待している。

謝辞

本研究は慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義教授をはじめ、多くの研究員、技術スタッフの努力により開発されたメタボローム測定技術を基盤として行われたものです。また、本研究内容の酵素スクリーニングで大きな貢献を果たした慶應義塾大学修士卒業生の河内隼太郎氏にお礼申し上げます。最後に、本研究は山形県、および鶴岡市のサポートにより行いました。県民および市民の皆様にごの場をかりて深く感謝申し上げます。

- 1) Keseler, I.M., Bonavides-Martinez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R.P., Johnson, D.A., Krummenacker, M., Nolan, L.M., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Shearer, A.G., & Karp, P.D. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, D464-470.
- 2) Chen, L. & Vitkup, D. (2007) *Trends Biotechnol.*, **25**, 343-348.
- 3) Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., & Nishioka, T. (2003) *J. Proteome Res.*, **2**, 488-494.
- 4) Ohashi, Y., Hirayama, A., Ishikawa, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Ueno, Y., Tomita, M., & Soga, T. (2008) *Mol. Biosyst.*, **4**, 135-147.
- 5) Saghatelian, A., Trauger, S.A., Want, E.J., Hawkins, E.G., Siuzdak, G., & Cravatt, B.F. (2004) *Biochemistry*, **43**, 14332-14339.
- 6) Baran, R., Kochi, H., Saito, N., Suematsu, M., Soga, T., Nishioka, T., Robert, M., & Tomita, M. (2006) *BMC Bioinformatics*, **7**, 530.
- 7) Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T.,

- Inamoto, E., Toyonaga, H., & Mori, H. (2005) *DNA Res.*, **12**, 291-299.
- 8) Saito, N., Robert, M., Kitamura, S., Baran, R., Soga, T., Mori, H., Nishioka, T., & Tomita, M. (2006) *J. Proteome Res.*, **5**, 1979-1987.
- 9) Saito, N., Robert, M., Kochi, H., Matsuo, G., Kakazu, Y., Soga, T., & Tomita, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 16442-16451.
- 10) Breitkreuz, K.E., Allan, W.L., Van Cauwenberghe, O.R., Jakobs, C., Talibi, D., Andre, B., & Shelp, B.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 41552-41556.
- 11) de Carvalho, L.P., Zhao, H., Dickinson, C.E., Arango, N.M., Lima, C.D., Fischer, S.M., Ouerfelli, O., Nathan, C., & Rhee, K.Y. (2010) *Chem. Biol.*, **17**, 323-332.
- 12) Saito, N., Ohashi, Y., Soga, T., & Tomita, M. (2010) *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 358-362.

齋藤 菜摘, ロベール マルタン
(慶應義塾大学先端生命科学研究所)

Metabolomics approach for enzyme discovery
Natsumi Saito and Martin Robert (Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 403-1 Nipponkoku, Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan)

心臓発生におけるエピジェネティックな転写制御

1. はじめに

先天性心疾患は、全出生児のおよそ1%に生じる最も発症頻度の高い先天性疾患であり、様々な内因性また外因性の要因によって生じると考えられている。遺伝学的解析によって転写因子をコードする遺伝子の変異が先天性心疾患の発症につながるということが明らかにされてきたが、これらの転写因子がどのように機能し転写を制御しているかについて不明な点が多い。最近、心臓発生において重要な転写因子がヒストンメチル化酵素と相互作用して協調的に転写制御を行うことが明らかにされ、今まで不明であった心臓発生時の転写因子の機能が明らかになり始めている。また、先天性心疾患の原因遺伝子どうしが物理的、機能的に相互作用していることから、転写因子やクロマチン制御因子が心臓発生を担う転写制御ネットワークを形成し機能していることが明らかになりつつある。心臓発生には成長因子やシグナル伝達など様々な要因も重要であるが、本稿ではエピジェネティックな転写制御機構を中心に解説する。