

機関番号：12601

領域設定期間：平成29年度～令和3年度

領域番号：3901

研究領域名（和文）代謝アダプテーションのトランスオミクス解析

研究領域名（英文）Transomic Analysis of Metabolic Adaptation

領域代表者

黒田 真也 (KURODA Shinya)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：50273850

交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,155,400,000円

研究成果の概要

生命は環境に応じてダイナミックに代謝を調整し、恒常性を維持している。糖尿病を含むメタボリックシンドローム、がん、炎症性疾患などの疾患や薬剤耐性などの病的現象で見られる特有の代謝状態は、それぞれの環境変化に対して、生体が代謝を調整してアダプテーションした結果（代謝アダプテーション）である。例えば、ヒトなどでは空腹時の血糖値は一定に維持されているが、糖尿病では血糖の恒常性が失われ持続的に高血糖となる。がん細胞では糖をエネルギーに変換する異化反応よりも、増殖に必要な材料を作り出す同化反応が亢進して高速増殖を可能にしている。これらの代謝アダプテーションは、1000種類以上の代謝物が織りなす複雑なネットワーク構造の適応であり、正常な基底状態から時間に伴って細胞の置かれた環境に対してアダプテーションして適応状態へと遷移する動的な現象である。

一方、代謝アダプテーションは、直接的な代謝物（メタボローム）の変化だけで制御されるわけではない。メタボロームの上位に位置するゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなど、複数のオミクス階層が密接に連動したトランスオミクスネットワークにより制御されている。つまり、状況に応じてトランスオミクスネットワークを動的に切り替えることにより代謝アダプテーションを実現している。代謝アダプテーションは複数のオミクス階層が密接に動的に連動して機能するため、従来の個別の代謝物や分子をターゲットとした解析をパッチワークのようにつなげるのではなく、各オミクスデータを同時に計測して、多階層のオミクスデータ間の階層をまたいで統合する技術（＝トランスオミクス解析）が必要である。

本領域では、これまで別々の分野の個別研究として扱われてきた現象を、トランスオミクスの観点から代謝アダプテーションとして統一して理解し、現象横断的な新領域を創生することを目指した。

研究分野：代謝、生活習慣病、免疫、がん、トランスオミクス

キーワード：

トランスオミクス解析：多階層のオミクスデータ間の階層をまたいで統合する解析手法

1. 研究開始当初の背景

生命は環境に応じてダイナミックに代謝を調整することによりホメオスタシスを維持している。糖尿病を含むメタボリックシンドローム、がん、炎症性疾患などの疾患や薬剤耐性などの病的現象で見られる特有の代謝状態は、それぞれの環境変化に対して、生体が代謝を調整してアダプテーションした結果（代謝アダプテーション）である（図1）。これら一連の代謝アダプテーションは、1000種類以上の代謝酵素が織りなす複雑なネットワークであり、決して静的なものではなく、正常な基底状態から時間に伴って細胞の置かれた環境に対してアダプテーションして適応状態へと遷移する動的な現象である。これまでこれらの現象は別々に解析されてきたが、共通する部分も多く代謝アダプテーションとして新しい概念でとらえることができると考えられた。

2. 研究の目的

代謝アダプテーションは、直接的な代謝物（メタボローム）の変化だけでなく、その上位に位置するゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームの各階層を介した翻訳・転写

レベルでの代謝酵素の発現量や、酵素の活性のリン酸化による制御、代謝物によるアロステリック性の制御など複数のオミクス階層が密接に連動したトランスオミクスネットワークにより制御されている。つまり、状況に応じてトランスオミクスネットワークを動的に切り替えることにより代謝アダプテーションを実現している (図1)。本研究では、さまざまな生命現象に対して、多階層オミクスデータを取得して仮説駆動型に再構築する方法と統計的な解析を主とするデータ駆動型の方法の双方を用いて解析した。これにより、これまで別々の分野の個別研究として扱われてきた現象を、トランスオミクスの観点から代謝アダプテーションとして統一して理解し、現象横断的な新領域を創生することを目指した。

3. 研究の方法

A01 代謝アダプテーション: 従来、代謝疾患やがん、細胞代謝応答、薬剤応答、代謝工学などは、それぞれ個別の分野の現象として研究されてきた。本研究では、これまで別々の分野の個別研究として扱われてきた現象を、代謝アダプテーションとして概念的に統一して理解・応用する新しい学問分野を創出した。

A02 トランスオミクス解析技術開発: 多階層オミクスを繋ぐにあたり、代謝を中心としてオミクスデータを計測した。さらに、計測したオミクスデータについて、KEGG データベースなど事前知識をベースにネットワークを再構築する方法と、統計的な解析を主とするデータ駆動型の方法の双方を用いて解析した。

4. 研究の成果

【A01】代謝アダプテーション 計画研究

トランスオミクスを測る、繋ぐ、読み解く解析手法の確立(黒田班) (Sci. Signal., 2020)
 黒田班はまずラット肝がん由来の FAO 細胞を用いて解析手法の確立した (iScience, 2018, Genes Cells, 2018)。この手法を *in vivo* に適用し、経口糖負荷時のマウス肝臓におけるメタボローム計測とトランスクリプトーム計測 (鈴木班との共同研究) を行い、事前知識と統計解析 (宇田班との共同研究) によってトランスオミクスネットワークを構築した (Sci. Signal., 2020) (図2上段)。また、臓器連環トランスオミクスネットワーク解析を行った (iScience 2021, 鈴木班との共同研究)。さらに、インスリン刺激時の脂肪細胞から代謝フラックスを求めることに成功し (iScience, 2020)、*in vivo* で同位体ラベルを用いずに代謝フラックスを推定する方法を樹立した (iScience, 2022, 鈴木班との共同研究) (図2下段)。

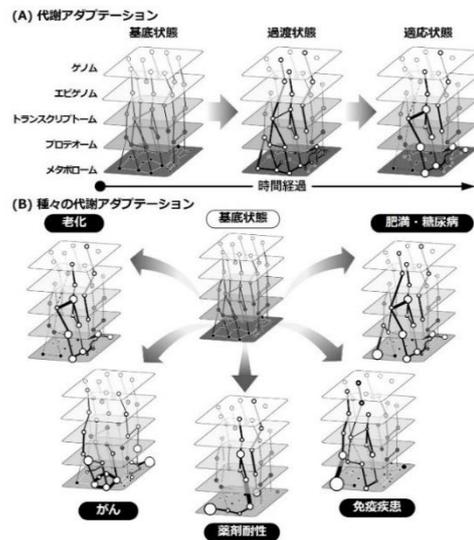


図1. 代謝アダプテーションのトランスオミクス

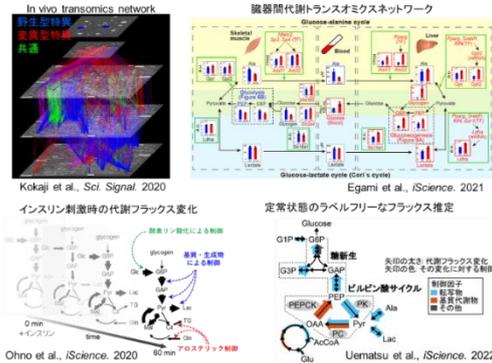


図2. 黒田班の研究成果

次世代プロテオミクスによるがん代謝の全貌解明 (中山班) (Nat. Commun., 2020)

がん代謝アダプテーションの全貌を次世代プロテオミクス技術 iMPAQT 法で解明した (図3)。その結果、がんにおける代謝シフトは、炭素ソース利用をエネルギー産生から高分子化合物合成へリモデリングする大規模な適応戦略であることが明らかとなり、約 100 年前に発見されたワールブルグ効果は、その一部を見ているに過ぎないことが判明した。さらに主要な窒素源であるグルタミン代謝も、がんでは大きくシフトしていることを発見した。われわれはこれを「第二のワールブルグ効果」と呼び、窒素代謝シフトを生じさせるキー酵素 PPAT を同定することに成功した。実際にかん細胞で PPAT を抑制すると増殖阻害が起こることが明らかとなった。

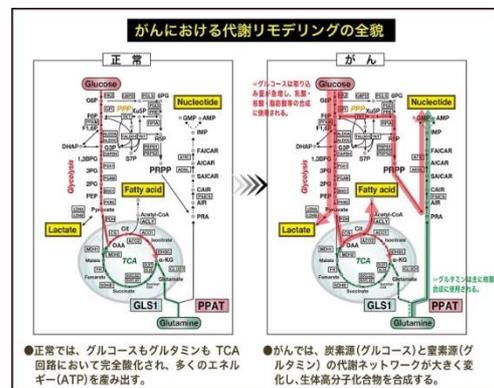


図3. 中山班の研究成果

NF- κ B による転写制御機構と細胞不均一性の解明 (岡田班) (Cell Rep., 2020, PLoS Genet., 2022)

炎症や免疫応答において NF- κ B は、多様な遺伝子発現制御を担うが、その制御機構は未だ不明な点が多い。そこで、NF- κ B に関わる遺伝子発現制御を定量的に解析し、その機能発現を明らかにすることを試みた。免疫 B 細胞のトランスクリプトーム、エピゲノム、一細胞トランスクリプトーム、一細胞エピゲノムの統合オミクス解析を進めたところ（鈴木班との共同研究）、NF- κ B による標的遺伝子の発現増強には、エンハンサー領域のクロマチンが幅広く開き、その領域に NF- κ B 分子が多数結合することが必要不可欠なことがわかった。さらに、一細胞の相関解析から、エンハンサー領域の DNA コンタクトの多さが、遺伝子ごとの細胞間の発現のばらつきを増強すること、またこのような現象に NF- κ B を介した液液相分離 (LLPS) の関与が示唆された。一方で、これまで、NF- κ B の負の制御因子として知られる I κ B が、NF- κ B による発現制御にむしろ正に働くことを明らかにした (npj Syst. Biol. Appl. 2021) (図 4)。

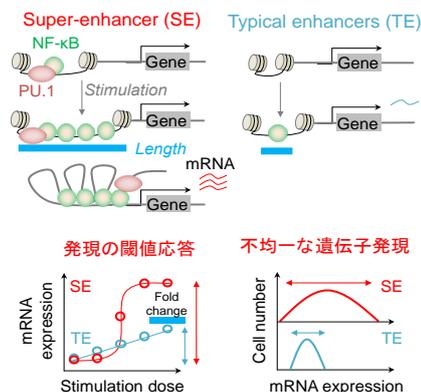


図 4. 岡田班の研究成果

トランスオミクスを測る、繋ぐ、読み解く解析手法の確立 (松田班) (Metab Eng., 2018)

オミクス階層間の非線形な関係を埋める重要なピースの一つである代謝フラックスを高精度に測定する技術(株)島津製作所と共同で開発した(図 5)。阻害剤を処理したヒトがん細胞株や出芽酵母の、短期的、長期的な代謝アダプテーションを比較解析し、酸化リン酸化と好氣的解糖による ATP 再生法の補完関係を共通点として見出した。また、ヒトがん培養細胞 11 種の代謝フラックスデータからは、酸化リン酸化の ATP 再生への寄与率は 2-7 割程度と高く、さらに ATP 再生速度と比増殖速度に全く相関がみられないという従来のイメージとは異なる結果が得られた(トランスオミクスを測る)。そこで、フラックスバランス解析法による代謝シミュレーションを行い、ヒトがん細胞株中心代謝の制約を検討した。その結果、代謝が生成できる熱量(エンタルピー変化)に上限がある。という制約をあてると、実際の代謝フラックス分布をもっとも再現した。薬剤耐性の代謝アダプテーションを制約する要因として、新たに代謝熱の関与を示唆した(BioRxiv, 2021) (トランスオミクスを繋ぐ、読み解く)。

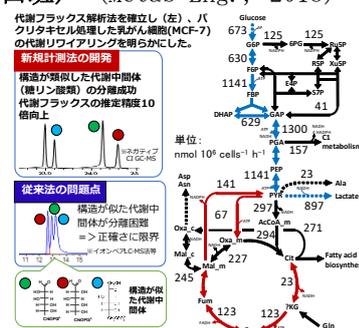


図 5. 松田班の研究成果

公募研究

特定の代謝物濃度変化が脂肪細胞分化過程に与えるエピゲノム変化について統合的解析を行うとともに 1 細胞レベルで核内の α ケトグルタル酸濃度測定を可能とするプローブ開発に成功した (Endocr. J., 2021) (稲垣班)。

がんの栄養飢餓におけるアミノ酸代謝アダプテーション機構を解明した (Cell Rep., 2019) (大澤班)。

すい臓がん培養細胞から放出されたエクソソームのメタボローム解析を行い、低酸素ストレスによるエクソソーム内の代謝プロファイルの変化を明らかにした (Metabolites, 2021) (平山班)。

松田班と共同で、植物トランスオミクス解析の基盤を確立した (Metabolites, 2020, Front. Mol. Biosci., 2022) (平井班)。

メタボロゲノミクスアプローチを確立し、①食を介した腸内環境変動がもたらす代謝アダプテーションの解析 (Int. J. Mol. Sci., 2018) および皮膚細菌叢の変動解析を行った (mSystems, 2019) (福田班)。

恐怖情動による生命保護作用における代謝アダプテーションを発見した (Commun. Biol., 2021, Nat. Commun., 2021) (小早川高班)。

大腸菌遺伝子破壊ライブラリーを用いて、遺伝子破壊が薬剤へのアダプテーション能力に及ぼす影響を網羅的に解析した (Sci. Rep., 2020) (堀之内班)。

がん起因する多臓器代謝異常に関わる新しい宿主因子を同定し、本因子による代謝アダプテーションの一端を報告した (Nat. Commun., accepted) (河岡班・馬場班・鈴木班)。

エンハンサー欠損による微小ストレスの作出法を確立し、微小ストレスに対する代謝アダプテーションを調べるための技術基盤を確立した (Nat. Commun., 2019) (河岡班・鈴木班)。

脂肪細胞の分化系において、グルコースが解糖系遺伝子の mRNA 発現を制御するという、新たな遺伝子制御機構を解明した。メカニズムとしては TCA 回路での代謝物アルファケトグルタル酸が補酵素としてヒストン脱メチル化酵素の脱メチル化制御機構を介するものであった(酒井班)。脳内のエネルギー恒常性を理解するために、アストロサイトとニューロンにおけるグルコースおよび乳酸の代謝調節機構の解析をした (Cell Chem. Biol., 2022) (坪井班)。

恐怖情動による生命保護作用が誘発する代謝アダプテーションを担う受容体および神経回路を発見した (Nat. Commun. 2021, 2 報) (小早川令子班)。

線虫の食餌で動的に変動する SAM 合成酵素遺伝子の選択的スプライシングによる発現制御が、mRNA 前駆体の塩基のメチル化による間接的な自己制御であることを明らかにした (EMBO J., 2021) (黒柳・鈴木班)。

【A02】トランスオミクス解析技術開発 計画研究

新規一本鎖 DNA 連結技術の応用による血中セルフリーDNA の解析 (伊藤班) (BMC Biol., 2021)
非侵襲的検査法 liquid biopsy として近年大きく注目されている血中セルフリーDNA(cfDNA)の解析に、ssDNA 用ライブラリー調製法を用いると転写因子結合部位などのエピゲノム情報が取得できることが Snyder ら (Cell, 2016) により報告されていた。一方、PBAT の欠点克服のために開発した TACS ligation は、従来法を遙かに凌駕する効率の一本鎖 DNA (ssDNA) 連結技術である。そこで TACS ligation の cfDNA 解析への応用を試みた。その過程で、正常人の血漿中には、通常のカラム法では回収されない~50 塩基長の ssDNA がヌクレオソームサイズの断片と同等レベル存在することを判明し、それらを cell-free short single-stranded (3S) DNA (C3D) と命名した。C3D も回収できる方法で調製した cfDNA から TACS ligation を用いて作成したライブラリーを解析したところ、C3D はゲノムにマップした際にピークを形成しない C3D^{off} とピークを形成する C3D^{on} の 2 種に大別された。C3D^{off} は Snyder らが報告した転写因子結合部位等に相当した。一方、C3D^{on} は、G-quadruplex (G4) 構造の相補鎖 (i-motif) に富む全く新しいクラスの cfDNA であった。今後、その生成機構や病態生理学的意義の解析が進むものと期待された。

がん細胞系における多層オミクス解析についてのモデル化 (鈴木班)

一方で鈴木班独自の課題として肺腺がんパネルの大規模多層オミクスでは、データセットの構築と、特に酸化還元パスウェイに関連した発現制御モジュールの制御可能性を論じた論文を発表した (Sci. Rep., 2019) (図 6)。また異なる微小管阻害剤に関連したモジュールについて、がんセンター臨床研究者とも連携し、その治療奏効性について具体的な検討を行った (Lung Cancer, 2021)。特に EGFR-TKI についてはその薬剤抵抗性の分子機構について詳細を解析した

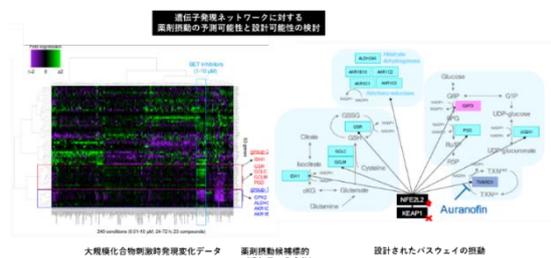


図 6. 鈴木班の研究成果

(Can. Res., 2021) 本研究班において行った一連の技術開発を含んだ総説を単行本にまとめ発行した (Suzuki edit, Nature Springer Book, 2019)。

定量メタボローム分析技術開発 (馬場班) (Nat. Commun., 2021)

メタボローム分析における定量値の取得のための各種基盤技術の構築に取り組み、各種定量メタボローム分析系の開発に成功した (図 7)。なかでも、新たな親水性代謝物分析法として提唱した親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析 (unified HILIC/AEX/MS/MS) はこれまでにない分析対象可能物のカバレッジを示したことから国内外から高い評価を得た。また、LC と各種検出器を組み合わせたアミノ酸、有機酸、糖、無機イオンの個別成分定量分析系の開発にも成功し上市した。また、絶対定量を実施する際に必要不可欠な「安定同位体ラベル化内部標準群 (SILIS)」について大腸菌を用いた生産系の構築に取り組み、主要な親水性代謝物において高い ¹³C ラベル化率の SILIS 調製法の開発に成功した。また、微量成分の高感度化・絶対定量に向けたプローブの開発にも取り組み、酸化脂質解析用プローブの開発に成功した。開発した分析技術を用いて、多くの領域内外研究者と共同研究を実施した。

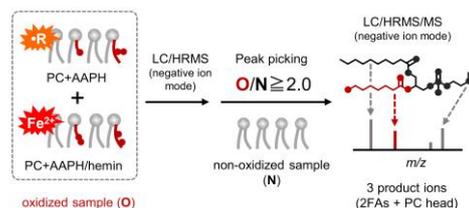


図 7. 馬場班の研究成果

ヒト・マウスオミクス解析によるアルツハイマー病遺伝子発見 (角田班) (Hum. Genet., 2018)

アルツハイマー患者の脳に Aβ を蓄積させる新規の原因遺伝子を同定するため、ヒト GWAS とマウス脳のトランスクリプトーム解析を組み合わせる独自手法を提案し、実データを用いた解析を行った (図 8 左)。その結果、統計的に有意である 5 つの遺伝子が検出された。ヒトの剖検脳を用いて、アルツハイマー病患者群と対照群との間での遺伝子発現量の差をみた結果、最終的に 2 遺伝子を特定した。また GTEX によるトランスオミクス解析により強固な知見にした。

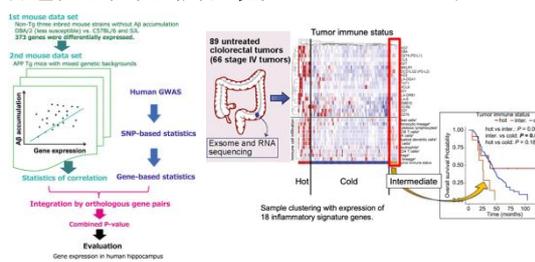


図 8. 角田班の研究成果

大腸がんの免疫学的解析による新規分類の発見と免疫編集解析 (角田班) (iScience, 2022)
トランスオミクス解析を進行性大腸がんの独自オミクスデータに適用したところ、免疫回避と

非常に悪い全生存率を特徴とする独特のがんのサブタイプを新たに発見した (図 8 右)。それを免疫編集の観点から解明したところ、腫瘍の微小環境の状態とネオ抗原の組成が、進行性大腸がんの治療計画決定に関連する可能性のある、有望な新しい予後バイオマーカーであることを示すことができた。

公募研究

ヒトキノームの *in vitro* 基質を大規模に同定し、基質データベースを構築した (Sci. Rep., 2019)。また、ゲノム情報未知な生物種に対するプロテオーム解析法を開発した (Genes Cells, 2019) (杉山班)。

単一細胞エピゲノム解析手法を確立し、(Nat. Cell Biol., 2019)、更に単一細胞から複数のエピゲノム情報取得可能な発展手法 (Nat. Protoc., 2020)、組織上の局所的な空間トランスクリプトーム解析する手法 (Nat. Commun. 2021)、組織薄切 1 枚からエピゲノム解析する手法 (Mol. Syst. Biol., 2021) を開発した (大川班)。

テンソル分解を用いた教師無し学習による変数選択法をシングルセルも含めたマルチオミックス解析にも適用できるように拡張した (BMC Med. Genomics, 2022, Genes, 2021) (田口班)。

代謝アダプテーションの分子機序を解明するための数理的アプローチを開発した (Cell Rep. Methods, 2021, BMC Genomics, 2021, Bioinformatics, 2021, BMC Bioinformatics, 2020, BMC Bioinformatics, 2019, Cell Rep., 2019, BMC Genomics, 2019, Bioinformatics, 2019, BMC Bioinformatics, 2018) (島村班)。

翻訳中の新生ポリペプチド鎖を包括的にプロファイルする技術を開発した (J. Biochem., 2020, iScience, 2022) (今見班)。

5. 主な発表論文等 (受賞等を含む)

1. Mizuno, R. et al, *Nat. Commun.*, accepted.
2. Mita, M. et al, *Cell Chem. Biol.*, 29:98-108.e4 (2022)
3. Hisano, O. et al, *BMC Biol.*, 19:225 (2021)
4. Matsuoka, Y. et al, *Nat. Commun.*, 12(1):6339 (2021)
5. Suzuki, T. et al, *Endocr. J.*, 68(12):1429-1438 (2021)
6. Hayasaka, R. et al, *Metabolites*, 11:215 (2021)
7. Matsuo, T. et al, *Nat. Commun.*, 12:2074 (2021)
8. Matsumura Y, et al, *Nat. Commun.*, 12:7045 (2021)
9. Liu, C. et al, *Nat. Commun.*, 12:2648 (2021)
10. Watabe, E. et al, *EMBO J.*, 40:e106434 (2021)
11. Minoura. K, et al, *Cell Rep. Methods.*, 1(5):100071 (2021)
12. Uchiyama, J, et al, *J. Biochem.*, 5(169):227-236 (2020)
13. Taguchi, Yh. et al, *BMC Med. Genomics*, 15:37 (2022)
14. Kokaji, T. et al, *Sci. Signal.* 13(660), eaaz1236 (2020)
15. Kodama, M. et al, *Nat. Commun.* 11:1320 (2020)
16. Michida, H. et al, *Cell Rep.* 31(9):107724 (2020)
17. Horinouchi T. et al, *Sci. Rep.*, 10:4178 (2020)
18. Siriwach, R. et al, *Metabolites*, 10:159 (2020)
19. Osawa, T, et al, *Cell Rep.*, 29:89-103 (2019)
20. Harada, A. et al, *Nat. Cell Biol.*, 21(2):287-296 (2019)
21. Suzuki, A. et al, *Sci. Rep.*, 9(1):19529 (2019)
22. Sugiyama, N. et al, *Sci. Rep.*, 9:10503 (2019)
23. Nagai, H. et al, *Metab Eng*, 47:1-9 (2018)
24. Yamaguchi-Kabata, Y. et al, *Hum. Genet.*, 137:521-533 (2018)
25. Ishii, C. et al, *Int. J. Mol. Sci.*, 19:E4079 (2018)

ホームページ等

<http://transomics.umin.jp/index.html>