

Title	腸内代謝物質を標的としたメタボローム解析のための代謝物質抽出条件の比較
Sub Title	The comparison of extraction methods for the analysis of gut luminal metabolites
Author	石井, 千晴(Ishii, Chiharu) 中西, 裕美子(Nakanishi, Yumiko) 富田, 勝(Tomita, Masaru) 福田, 真嗣(Fukuda, Shinji)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	Keio SFC journal Vol.15, No.1 (2015.) ,p.414- 430
JaLC DOI	10.14991/003.00150001-0414
Abstract	腸管内代謝物質のメタボロミクス研究は、宿主と腸内細菌叢との相互作用を理解する上で重要であるが、その分析手法は一般化されていない。本研究では、ヒト糞便から代謝物質を抽出する際の溶媒や菌体破碎の有無などが、陽イオン性代謝物質プロファイルに及ぼす影響を比較した。検出された141物質のうち溶媒の違いによって29物質、菌体破碎の有無によって7物質の濃度が有意に異なった。ヒト糞便の代謝物質プロファイルは抽出条件によって異なることが示唆されたため、目的に応じて適切な抽出手法を選択する必要があると考えられる。
Notes	特集 世界を救え：SFCバイオの挑戦#研究論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0402-1501-0414

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

[研究論文]

腸内代謝物質を標的としたメタボローム解析のための代謝物質抽出条件の比較

The Comparison of Extraction Methods for the Analysis of Gut Luminal Metabolites

石井 千晴

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科後期博士課程

Chiharu Ishii

Doctoral Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University

中西 裕美子

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科研究員

Yumiko Nakanishi

Project Researcher, Graduate School of Media and Governance, Keio University

富田 勝

慶應義塾大学環境情報学部教授

Masaru Tomita

Professor, Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

福田 真嗣

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任准教授

Shinji Fukuda

Project Associate Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

Abstract: 腸管内代謝物質のメタボロミクス研究は、宿主と腸内細菌叢との相互作用を理解する上で重要であるが、その分析手法は一般化されていない。本研究では、ヒト糞便から代謝物質を抽出する際の溶媒や菌体破碎の有無などが、陽イオン性代謝物質プロファイルに及ぼす影響を比較した。検出された141物質のうち溶媒の違いによって29物質、菌体破碎の有無によって7物質の濃度が有意に異なった。ヒト糞便の代謝物質プロファイルは抽出条件によって異なることが示唆されたため、目的に応じて適切な抽出手法を選択する必要があると考えられる。

Analyses of gut luminal metabolites are important in revealing the relationships between metabolism of intestinal microbiota and host. However, current extraction methods of fecal metabolites are not standardized. In order to understand the impact of varying extraction methods on fecal metabolite composition, we compared metabolome profiles that were obtained from methods

that are different in fraction, solvent and with or without bacterial cell disruption. From our results, a total of 141 metabolites was detected. Concentrations of 29 metabolites and 7 metabolites were significantly altered by using different solvents and treatment cell disruption, respectively. Since our results suggested that metabolome profiles can be altered by varying extraction methods, it is important to select an extraction method that is suitable for the purpose.

Keywords: 腸内代謝物質、メタボローム解析、抽出、条件検討、CE-TOFMS

gut luminal metabolite, metabolomics, sample preparation method, CE-TOFMS

1 序論

ヒトの腸管内には重さにして約 1.5 kg、数百種類以上にもおよぶ腸内細菌が棲息しており、これら腸内細菌の群衆を腸内細菌叢と呼ぶ。腸内細菌叢は難消化性多糖の分解、必須栄養素であるビタミン等の産生、免疫システムの構築、病原性菌の増殖抑制などの役割を担っており、われわれの恒常性を維持するために重要な存在である。しかし、腸内細菌叢のバランスが崩れることにより、大腸がんなどをはじめとする様々な腸疾患 (Arthur, *et al.*, 2012; Belcheva, *et al.*, 2014; Garrett, *et al.*, 2007)、2 型糖尿病などのメタボリックシンドローム (Karlsson, *et al.*, 2013; Qin, *et al.*, 2012; Vijay-Kumar, *et al.*, 2010)、肥満の発症 (Ridaura, *et al.*, 2013; Schulz, *et al.*, 2014; Turnbaugh, *et al.*, 2006) などにつながることを示唆されている。さらに、近年では偽膜性腸炎患者の腸内に健康なヒトの糞便懸濁液を移入することで、従来の抗生物質を用いた治療法よりも高い治療効果を得られたことが報告されており、バランスのよい腸内細菌叢を腸管内へ投与することによる腸内環境の改善が疾患の治療に役立つ可能性も提示されている (van Nood, *et al.*, 2013)。したがって、われわれの健康を維持するためには腸内細菌叢全体を包括的に理解し、それらのバランスを保つことが重要である。

このように腸内細菌叢とわれわれの健康との関連が指摘されているが、腸内細菌叢が人体に影響をおよぼすメカニズムについては未だに不明瞭な点が多い。近年、腸内細菌叢のメタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析により、腸内細菌叢の構成や遺伝子情報を得ることが可能になり、その生理

学的機能が明らかになりつつある。しかし、腸内細菌叢の機能をより詳細に理解するためには、遺伝子情報だけでなく、腸内に存在する代謝物質の情報を網羅的に取得することが重要である。これらの代謝物質は宿主と腸内細菌叢とのやり取りの結果として生じ、腸内細菌叢と宿主に共通して利用されると考えられる。近年の研究によってこのような腸内代謝物質の重要性は次第に明らかになっており、中でも短鎖脂肪酸や二次胆汁酸が宿主におよぼす影響が注目されている。腸内細菌が産生する酪酸は宿主の制御性 T 細胞を分化誘導することで腸管の炎症を軽減させることや (Furusawa, *et al.*, 2013)、酢酸を含む短鎖脂肪酸は全身のエネルギー代謝を活性化し、肥満を防止することが報告されている (Kimura, *et al.*, 2013)。しかしその一方で、腸内細菌が一次胆汁酸を代謝して産生する二次胆汁酸は、肝臓がんの発症を促進することが報告されている (Yoshimoto, *et al.*, 2013)。このように腸内細菌叢から産生される代謝物質には正負両面の機能があり、腸内代謝物質についてさらなる知見を得ることは腸内細菌叢—宿主間相互作用メカニズムの解明において重要である。さらに、腸内代謝物質の網羅的な解析を行うことで、腸内細菌が産生する新規機能物質の探索や、腸内代謝物質プロファイルによる腸内環境の評価が可能になると考えられ、将来的には腸炎などの治療に用いる糞便検体の選定など、多岐にわたる用途において有用であり、重要な研究課題である。

われわれはキャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析法 (CE-TOFMS : Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry) を用いて、腸内代謝物質のメタボローム解析に取り組んでいる。CE-TOFMS はイオン性の低分子化合物の測定に優れており、分離能が高く多様な代謝物質を同時に測定することができ、大腸菌においては主要な代謝物質の約 90% を測定することが可能であった (Ohashi, *et al.*, 2008)。メタボローム解析ではガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry) や液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS: Lipid Chromatography-Mass Spectrometry) が一般的に用いられるが、GC-MS は短鎖脂肪酸などの揮発性物質の測定には優れるものの一部のアミノ酸などは測定することができず、LC-MS は多様な代謝物質の測定が可能であるが、対象となる物質ご

とに最適なカラムや測定メソッドを選択する必要がある、一度の測定における網羅性では CE-TOFMS に劣る。CE-TOFMS は中性物質や脂溶性物質の測定には不向きであるものの、腸内の主要な代謝物質である短鎖脂肪酸、アミノ酸、一部のビタミン類、ポリアミンなどを同時に測定することが可能であるため、腸内代謝物質のプロファイリングに適した手法であると考えられる。しかし、CE-TOFMS を用いた腸内代謝物質の研究報告は少なく、腸内代謝物質の抽出手法は未だ確立していない。松本らは、マウスの糞便を Phosphate Buffered Saline (PBS) 溶液に溶解し、その上清を CE-TOFMS で測定しているが (Matsumoto, *et al.*, 2012)、これは糞便中に含まれる腸内細菌の細胞を破碎せず、細胞外の物質のみを分析対象とした手法である。腸内細菌叢のはたらきを包括的に理解するためには、腸内細菌叢のメタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析から得られる遺伝子情報とメタボロームデータを統合する必要があると考えられるが、そのためには細菌が産生し細胞内に蓄積している代謝物質も含めて代謝物質プロファイルを取得する必要があると考えられる。また、一般的に代謝物質を抽出する際には、代謝酵素を失活させるためにメタノールもしくは水 / メタノールの混合溶媒を用いた手法や (Dietmair, *et al.*, 2010)、クロロホルム / メタノールの混合溶媒を使用した液液分配による抽出法が用いられる (Kuwabara, *et al.*, 2013)。さらに、細菌や植物など細胞壁をもつ細胞から代謝物質を抽出する場合は、ジルコニアビーズなどを用いて細胞を物理的に破碎し、メタノールなどの溶媒で抽出する方法が用いられている (Wang, *et al.*, 2015)。このようにサンプルから代謝物質を抽出する方法には様々な選択肢が存在するため、本研究では糞便中代謝物質の抽出において、手法の違いが代謝物質プロファイルに与える影響を把握するため、様々な手法を用いて糞便中代謝物質の抽出を試み、それらを CE-TOFMS で分析した結果を比較した。

2 対象と手法

2.1 抽出条件の設定

抽出条件の検討に際し、抽出に用いる画分、溶媒、およびビーズによる細胞破碎の有無の 3 つの要素を比較する抽出方法について検討した (表 1、図 1)。

表 1 抽出条件

抽出条件	画分	抽出溶媒	破碎の有無
1	糞便懸濁液の上清	0.1 × PBS	無
2	糞便懸濁液の沈殿	50% メタノール / 超純水	有
3	糞便懸濁液	0.1 × PBS	無
4	糞便懸濁液	0.1 × PBS	有
5	糞便懸濁液	50% メタノール / 0.1 × PBS	有

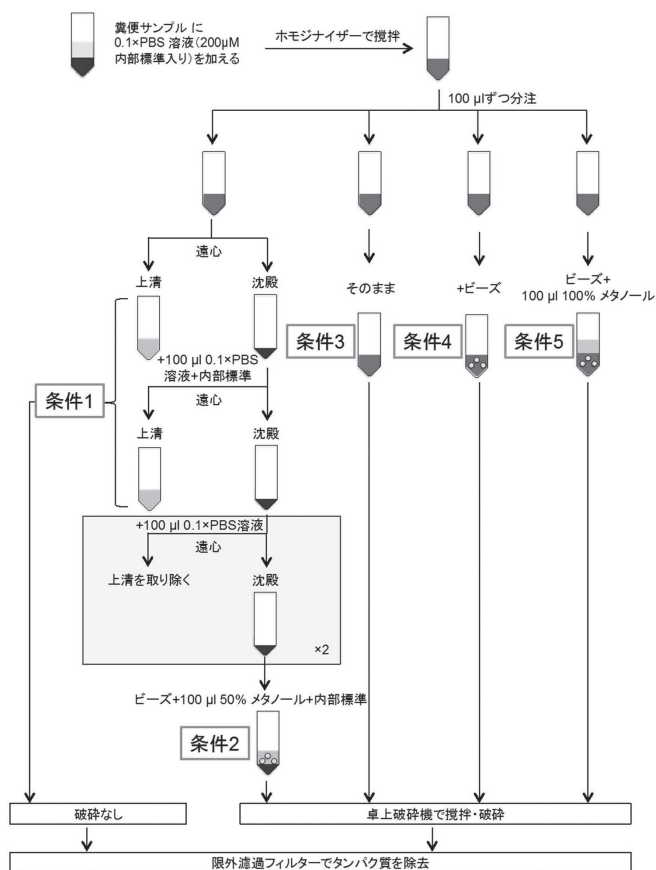


図 1 代謝物質抽出のフローチャート
図中の「ビーズ」はジルコニアビーズを示す。

条件1では菌体破碎を行わず遠心分離した上清のみを用い、腸内細菌が菌体外に放出する物質や糞便中に含まれる消化された食物由来の物質のみを抽出した。その際、上清画分に菌体は含まれていないと考えられるため、条件1ではビーズによる菌体の破碎は行わなかった。条件2では、糞便懸濁液を遠心分離して得た沈殿物を対象とした。条件2で用いた沈殿物は、洗浄工程を経て菌体外代謝物質は洗い流されていると考えられるため、ジルコニアビーズによる破碎を行い、腸内細菌の菌体内に含まれている物質を抽出した。条件3と条件4ではジルコニアビーズによる腸内細菌細胞の破碎以外の抽出条件を同一にし、菌体破碎の有無による代謝物質プロファイルの違いを比較した。その際、メタノールによって細菌の細胞膜が壊れることを防ぐため、0.1 × PBSを溶媒とした条件で比較を行った。条件5は条件4の溶媒にメタノールを添加し、抽出溶媒の違いが代謝物質プロファイルにおよぼす影響を分析した。その際、溶媒にメタノールを添加することによって菌体が溶菌されることが考えられたため、ビーズによる菌体破碎を行う条件で比較を行った。また、一般的には水/メタノールの混合溶媒を用いる方法の他に、クロロホルム/メタノールの混合溶媒を使用した液液分配による抽出法も用いられているが、本研究では菌体の破碎を伴わずに代謝物質を抽出することが可能なPBSを溶媒とした場合との比較を行うため、PBSと同様に液液分配を行わずに代謝物質を抽出することが可能な有機溶媒として50%メタノールを比較対象として選択した。なお、条件2と条件5で用いている50%メタノールは、それぞれ50%メタノール/超純水と50%メタノール/0.1 × PBSである点に違いがあるが、本研究においてPBSは菌体の溶菌を防止する目的で使用しており、条件2および条件5は共にビーズを用いた菌体の物理的破碎を行っているため、超純水とPBSの違いによって差は生じにくいと考え、おおよ同様の抽出溶媒として使用した。

2.2 代謝物質の抽出

糞便中代謝物質の抽出条件の比較を行う対象として、3つの異なる糞便を用い、それぞれの糞便から条件1～5の抽出条件で代謝物質を抽出した。糞便は健常な日本人から採取し、採取後直ちに-80℃で保存した。代謝物質の

抽出は、まず内部標準物質をそれぞれ 200 μ M 含む 0.1 \times PBS 溶液を糞便 10 mg あたり 100 μ l の割合で加え、ハンディーホモジナイザー (SIGMA 社) で全体が均一になるまで攪拌し糞便懸濁液とした。内部標準物質には methionine sulfone、D-camphor-10-sulfonic acid、2-morpholinoethanesulfonic acid を用いた。糞便懸濁液を 100 μ l ずつ 4 本のスクリーキャップチューブ (バイオメディカルサイエンス社) に分注し、図 1 および表 1 に示す条件 1 ～ 5 の抽出条件で代謝物質の抽出を行った。

条件 1) 糞便懸濁液 100 μ l を 17,800 g で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。その後、分画分子量 5 kDa の限外濾過フィルターを用いてタンパク質の除去を行った。残りの沈殿に再度 100 μ l の内部標準物質入り 0.1 \times PBS 溶液を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、17,800 g で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。その後、分画分子量 5 kDa の限外濾過フィルターを用いてタンパク質の除去を行った。濾液をそれぞれ超純水で 2 倍に希釈して測定に用いた。測定後、2 つの上清画分から得られた濃度を足し合わせた。

条件 2) 条件 1) において 2 回目の遠心分離で生じた沈殿に対し、内部標準物質を含まない 0.1 \times PBS 溶液を 100 μ l 加えてボルテックスミキサーで攪拌した後、17,800 g で 10 分間遠心分離した。その後、上清を取り除く洗浄工程を 2 度繰り返し、細胞外代謝物質と内部標準物質を除いた。50% メタノール溶液 / 超純水 (内部標準物質をそれぞれ 20 μ M の濃度で含む) を 100 μ l と 3 mm ジルコニアビーズ (TOMY 社) 3 個および 0.1 mm ジルコニアビーズ (TOMY 社) を約 0.1 g 加え、卓上型破砕機 (バイオメディカルサイエンス社) を用いて、1,500 rpm で 10 分間攪拌した。その後、17,800 g で 5 分間遠心分離し、上清を分画分子量 5 kDa の限外濾過フィルターを用いてタンパク質の除去を行った。濾液は真空乾燥機 (LABCONCO 社) で 40° C、3 時間乾固させた後、50 μ l の超純水に再溶解したものを測定に用いた。

- 条件 3) 糞便懸濁液 100 μ l にジルコニアビーズを加えず、卓上型破砕機を用いて、1,500 rpm で 10 分間攪拌した。その後、17,800 g で 5 分間遠心分離し、上清を分画分子量 5 kDa の限外濾過フィルターを用いてタンパク質の除去を行った。濾液を超純水で 2 倍に希釈して測定に用いた。
- 条件 4) 糞便懸濁液 100 μ l に 3 mm ジルコニアビーズ 3 個および 0.1 mm ジルコニアビーズ約 0.1 g を加え、卓上型破砕機を用いて、1,500 rpm で 10 分間攪拌した。17,800 g で 5 分間遠心分離し、上清を分画分子量 5 kDa の限外濾過フィルターを用いてタンパク質の除去を行った。濾液を超純水で 2 倍に希釈して測定に用いた。
- 条件 5) 糞便懸濁液 100 μ l に、100% メタノール溶液を 100 μ l、3 mm ジルコニアビーズ 3 個および 0.1 mm ジルコニアビーズ約 0.1 g を加え、卓上型破砕機を用いて、1,500 rpm で 10 分間攪拌した。17,800 g で 5 分間遠心分離し、上清を分画分子量 5 kDa の限外濾過フィルターを用いてタンパク質の除去を行った。濾液は真空乾燥機で 40°C、3 時間乾固させた後、50 μ l の超純水に再溶解したものを測定に用いた。

2.3 CE-TOFMS による代謝物質の測定および解析

代謝物質を抽出した溶液は CE-TOFMS (Agilent Technologies 社) の陽イオンモードで測定を行った。CE-TOFMS の測定条件は平山らにしたがい、測定を行った (Hirayama, *et al.*, 2009)。CE-TOFMS により測定したデータは解析ソフトウェア Master Hands (Sugimoto, *et al.*, 2010) を用いて、代謝物質の同定および濃度の算出を行った。抽出条件による代謝物質濃度の違いを比較するため、同じ糞便から 5 種の抽出条件によって得られた各代謝物質の濃度を Zスコアに変換した。その値を用いて MeV TM4 version 4.8 (Saeed, *et al.*, 2006) を使用してヒートマップを作製し、サンプル間での階層的クラスタリングおよび代謝物質の *k*-means クラスタリングを行った。階層的クラスタリングおよび *k*-means クラスタリングにおいて、クラスタリングにはユークリッド距離の群平均法を用いた。*k*-means クラスタリングのクラスター数とし

て、 $k=4$ を使用した。2 群間の代謝物質濃度の比較には対応のある t 検定を用い、Benjamini & Hochberg 法を用いて疑陽性率 (False Discovery Rate, FDR) を算出した。FDR ≤ 0.05 の場合に有意差があると表現した。

3 結果と議論

3.1 各抽出条件での代謝物質濃度の比較

各抽出条件における代謝物質濃度を比較するため、同一の糞便から 5 種の抽出条件によって得られた各代謝物質の濃度を Zスコアに変換し、その値を可視化した (図 2)。サンプル間の階層的クラスタリングの結果、抽出条件ごとにクラスターが形成された。したがって、得られる代謝物質のプロファイルは抽出手法によって異なり、CE-TOFMS でヒト糞便の測定を行う際には抽出条件に留意する必要があることが示唆された。各抽出条件における代謝物質のプロファイルの特徴をより詳細に調べるため、 k -means 法を用いて代謝物質のクラスタリングを行い、抽出条件ごとの特徴を反映したクラスター I-IV に分類した。

クラスター I に含まれる代謝物質は条件 4 において最も高濃度で検出されたものである。このクラスターには 15 種のアミノ酸や 3 種のジペプチドが含まれていた。また、クラスター I に含まれる代謝物質の多くは条件 3 と比較して条件 4 において高濃度で検出される傾向にあり、これらの代謝物質は菌体外にも存在するが、菌体内にも一定量存在しているためビーズによる菌体破碎を行うことで検出量が増加したと考えられる。さらに、これらの代謝物質は条件 5 と比較しても、条件 4 において高濃度で検出される傾向にあるため、メタノールに溶出しにくいことが示唆された。

クラスター II の代謝物質は条件 5 において特に高濃度で検出された。これらの代謝物質はビーズ破碎を行い、メタノールを添加した条件で最も高濃度で抽出される傾向にあるため、菌体内の存在量が多く、メタノールに溶解しやすい代謝物質であると考えられる。このクラスターには guanine, cysteine, adenosine などの核酸の構成要素や、thiamine, pyridoxal などのビタミンが含まれていた。

クラスター III の代謝物質は条件 2 において検出量が少なく、それ以外の

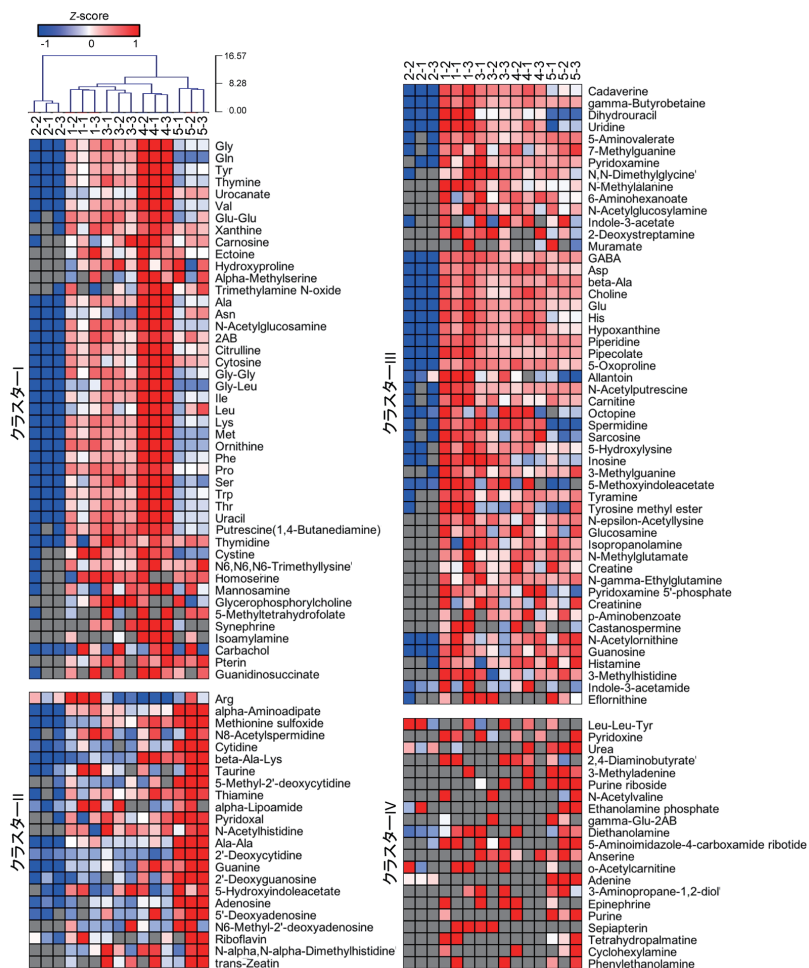


図2 各抽出条件によって得られた陽イオン性代謝物質のプロファイル

サンプルの階層的クラスタリングおよび代謝物質の *k*-means クラスタリングはユークリッド距離を用いて行った。ハイフンの前の文字列は条件を表し、ハイフンの後ろの数字は糞便の違いを表す。ヒートマップは各代謝物質のZスコアを色で表しており、赤は高濃度、青は低濃度、灰色は検出限界以下を表す。

4つの条件では同程度に検出された。条件2は主に菌体内のみに存在する代謝物質を得る手法であり、この条件で検出量が少ないことから、これらの代謝物質は菌体内よりも菌体外の存在量が多いと考えられる。また、ビーズ破碎の有無のみが異なる条件3と条件4において検出量の違いが少ないことから、これらの代謝物質は菌体内の存在量が少ないことが示唆された。また、抽出溶媒のみが異なる条件4と条件5を比較しても検出濃度に大きな差がないことから、 $0.1 \times \text{PBS}$ 溶液および50%メタノールに対して同程度に溶出する代謝物質であると考えられる。

クラスターIVの代謝物質は、いくつかの抽出条件で検出されなかったものである。したがって、これらの代謝物質に注目する際は抽出条件を慎重に検討する必要があると考えられる。

以上の結果を踏まえ、各抽出条件の特徴をサンプル間の階層的クラスタリングから比較すると、条件2ではほぼ全ての代謝物質濃度が他の抽出方法と比較して低いことが示された。これは、糞便中代謝物質の多くが菌体外に存在していることを示唆している。腸管内では常に腸内細菌の増殖や溶菌（死滅）が起こるため、腸管内や糞便中には溶菌した腸内細菌由来の代謝物質も多量に存在していると考えられる。条件2では、糞便中に存在はするが溶菌していない細菌細胞に含有されている代謝物質を検出しているが、条件2で検出される代謝物質濃度が全体的に低濃度であったことから、このような細胞に含まれる代謝物質は全体から比べると微量であると考えられる。他の抽出条件については、階層的クラスタリングの結果から条件1と条件3が類似していることが示唆された。条件1と条件3の抽出手法の違いは、条件3では攪拌を行ったのに対し、条件1は攪拌を行わなかった点のみであり、抽出溶媒などの条件は同一である。また、条件3の攪拌ではビーズを用いていないため、菌体の破碎は起こらなかったと考えられる。本研究の結果から、糞便中代謝物質は主に菌体外に存在することが示唆されているため、結果として条件1と条件3はほぼ同一の抽出条件になっていたと考えられる。条件1と条件3に次いで、類似した代謝物質プロファイルが得られた手法は条件4であった。条件3と条件4ではビーズ破碎の有無に差があるにも関わらず、クラスターIに属するアミノ酸などを除いて代謝物質プロファイルは類似し

ていた。条件5は条件1、条件3、条件4とは異なるクラスターに分類された。条件1、条件3、条件4は溶媒にメタノールを含まないが、条件5は溶媒にメタノールが含まれているため、溶媒の違いが得られる代謝物質プロファイルに影響を及ぼすことが示唆された。また、条件3と条件4はビーズによる破碎の有無が異なり、条件4と条件5はメタノール添加の有無が異なるが、条件3と条件4の差よりも条件4と条件5の差の方が大きいことを示しており、メタノール添加の有無はビーズ破碎の有無よりも大きな影響をおよぼすことが示唆された。

次に、個別の代謝物質に注目し、溶媒の違いや菌体の破碎の有無によって有意に濃度が異なる代謝物質を調べた。溶媒の違いによる影響の分析には条件4と条件5の比較を、菌体破碎の有無による影響の分析には条件3と条件4の比較を行った。

溶媒の違いの比較から、検出された141物質のうち29物質の代謝物質の濃度に有意差が認められた(表2)。そのうち14物質はアミノ酸で、いずれも0.1×PBS溶液のみを用いた条件4において有意に高濃度で検出された。アミノ酸は水溶液中では双性イオンとなり、有機溶媒よりも水に溶解しやすい性質があるため、このような結果が得られたと考えられる。また、メタノールを添加した条件5において有意に高濃度であった物質にはadenineや2'-deoxyguanosineなど核酸の構成要素が含まれていた。

ビーズによる菌体破碎の有無の比較では4種のアミノ酸を含む7物質の代謝物質の濃度に有意差が認められた(表3)。これらすべての代謝物質が菌体破碎を行った条件4において高濃度であった。

溶媒の差異やビーズによる菌体破碎の有無によって有意に濃度が異なる代謝物質の中には多数のアミノ酸が含まれていたため、条件3～5における各種アミノ酸の濃度を図3に示した。有意差がなかったアミノ酸についてもその多くが条件4で最も高濃度で検出される傾向にあった。

3.2 各抽出条件で検出された代謝物質数の比較

次に、各条件で検出された代謝物質の数を示す(図4)。条件5において検出された代謝物質の数は平均131種であり、最も多かった。これは条件1と

表 2 抽出溶媒の違いによって有意 ($FDR \leq 0.05$) に濃度が異なる代謝物質

高濃度で検出された溶媒の種類	代謝物質名	FDR
0.1 × PBS (条件 4)	Met	0.009
	Ile	0.009
	Val	0.009
	Thr	0.009
	N-Acetylglucosamine	0.014
	Gly-Leu	0.015
	Urocanate	0.015
	Pro	0.016
	Putrescine(1,4-Butanediamine)	0.017
	Ala	0.019
	Gly	0.019
	Lys	0.021
	Gln	0.024
	Trp	0.024
	Phe	0.024
	Uracil	0.024
	Tyr	0.024
	Dihydrouracil	0.025
	Glu	0.026
	Asp	0.035
	Cadaverine	0.036
	Thymine	0.037
	Hypoxanthine	0.038
	Gly-Gly	0.042
	Ornithine	0.042
50% メタノール / 0.1 × PBS (条件 5)	Adenine	0.021
	Pipicolate	0.037
	2'-Deoxyguanosine	0.042
	3-Aminopropane-1,2-diol	0.044

表 3 菌体破碎の有無によって有意 ($FDR \leq 0.05$) に濃度が異なる代謝物質

高濃度で検出された条件	代謝物質名	FDR
ビーズによる菌体破碎あり (条件 4)	Met	0.037
	Asn	0.037
	Val	0.037
	Phe	0.037
	Choline	0.037
	Citrulline	0.037
	Gly-Leu	0.050

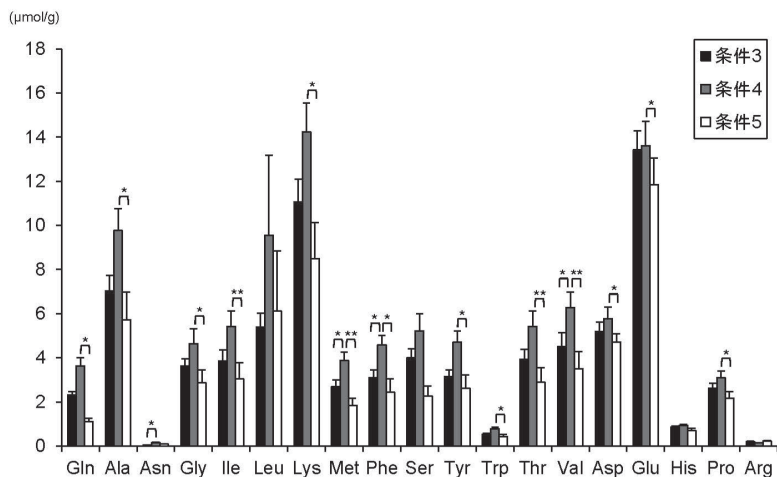


図3 条件3、条件4、条件5において検出されたアミノ酸濃度の比較

グラフは各抽出条件における各アミノ酸の濃度の平均値を示した。エラーバーは標準偏差を用いた。アミノ酸の名前は3文字表記の略号を用いた。*はFDR ≤ 0.05、**はFDR ≤ 0.01を表す。

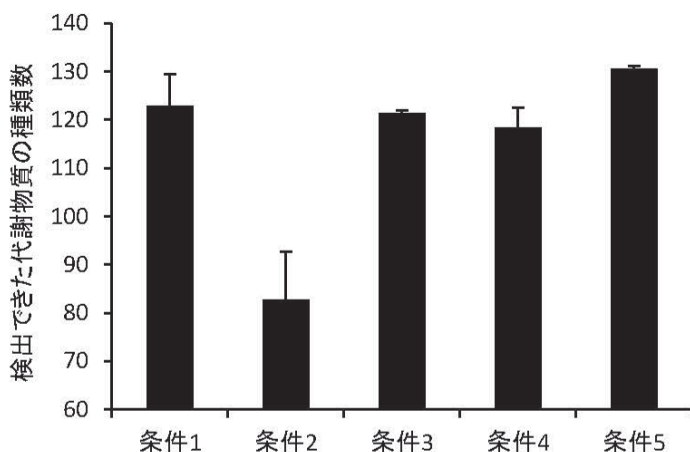


図4 各抽出条件で検出された代謝物質数

縦軸は各抽出条件で検出された代謝物質の種類数の平均値を示し、横軸は各抽出条件を表す。エラーバーは標準偏差を用いた。

条件2のように菌体と上清を分離していないことに加え、有機溶媒を用いることでPBS溶液には溶解しにくい代謝物質も抽出できたことに起因すると考えられる。また、条件2では検出された代謝物質が平均83種と最も少なかった。本研究によって菌体内の代謝物質の存在量は菌体外に比べて少ないことが示唆されているが、この結果は菌体内のみから代謝物質を得ても検出限界に満たない物質が30～40%程度存在していることを示唆している。

4 結論

本研究の結果より、CE-TOFMSによって得られる糞便中の陽イオン代謝物質プロファイルは、抽出に用いる溶媒やビーズによる菌体破碎の有無による影響を受けることが示唆された。上清画分、沈殿画分、および糞便懸濁液全体の代謝物質プロファイルの比較から、多様な代謝物質が上清画分に含有されていることが明らかとなった。本研究で比較した抽出条件では特にアミノ酸の濃度が抽出条件の影響を受けやすく、菌体破碎を行い、メタノールを添加しない条件において最も高濃度で検出される傾向にあった。また、検出可能な代謝物質の数の比較では、メタノールを添加し、ビーズを用いて菌体破碎を行った条件において最も多くの種類の代謝物質が検出された。これらの結果から、より多くの代謝物質を測定することを重要視する際には条件5、アミノ酸等に特に着目する際には条件4、菌体外に存在し、腸管内で宿主細胞と相互作用する可能性が高いような代謝物質を重要視する場合は条件1や条件3など、各々の目的に沿った抽出条件を選択することが重要であると考えられる。

謝辞

本論文を執筆するにあたりご協力頂いた村上慎之介さん（慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科）、Aw Wanping 博士（慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科）に感謝の意を表す。また、本研究は、山形研究費および笹川科学研究助成による支援を受けて行われた。

参考文献

- Arthur, J.C., *et al.*, “Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota.” *Science (New York, N.Y.)*, 338(6103), 2012, pp.120-123.
- Belcheva, A., *et al.*, “Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells.” *Cell*, 158(2), 2014, pp.288-299.
- Dietmair, S., *et al.*, “Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol.” *Analytical biochemistry*, 404(2), 2010, pp.155-164.
- Furusawa, Y., *et al.*, “Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells.” *Nature*, 504(7480), 2013, pp.446-450.
- Garrett, W.S., *et al.*, “Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system.” *Cell*, 131(1), 2007, pp.33-45.
- Hirayama, A., *et al.*, “Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.” *Cancer research*, 69(11), 2009, pp.4918-4925.
- Karlsson, F.H., *et al.*, “Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control.” *Nature*, 498(7452), 2013, pp.99-103.
- Kimura, I., *et al.*, “The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43.” *Nature communications*, 4, 2013, p.1829.
- Kuwabara, H., *et al.*, “Altered metabolites in the plasma of autism spectrum disorder: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectroscopy study.” *PloS one*, 8(9), 2013, e73814.
- Matsumoto, M., *et al.*, “Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome.” *Scientific reports*, 2, 2012, p.233.
- Ohashi, Y., *et al.*, “Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS.” *Molecular bioSystems*, 4(2), 2008, pp.135-147.
- Qin, J., *et al.*, “A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes.” *Nature*, 490(7418), 2012, pp.55-60.
- Ridaura, V.K., *et al.*, “Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice.” *Science*, 341(6150), 2013, p.1241214.
- Saeed, A.I., *et al.*, “TM4 microarray software suite.” *Methods in enzymology*, 411, 2006, pp.134-193.
- Schulz, M.D., *et al.*, “High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity.” *Nature*, 514(7523), 2014, pp.508-512.
- Sugimoto, M., *et al.*, “Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles.” *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, 6(1), 2010, pp.78-95.
- Turnbaugh, P.J., *et al.*, “An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.” *Nature*, 444(7122), 2006, pp.1027-1031.
- van Nood, E., *et al.*, “Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*.” *The New England journal of medicine*, 368(5), 2013, pp.407-415.
- Vijay-Kumar, M., *et al.*, “Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5.” *Science*, 328(5975), 2010, pp.228-231.
- Wang, X., *et al.*, “Evaluation and optimization of sample preparation methods for metabolic profiling analysis of *Escherichia coli*.” *Electrophoresis*, 0, 2015, pp.j1-8.

Yoshimoto, S., *et al.*, “Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome.” *Nature*, 499(7456), 2013, pp.97-101.

{受付日 2015. 2. 26}
{採録日 2015. 7. 27}