

2013年度 生物学奨励賞（斎藤賞）受賞



安定同位体標識による生体分子混合物 ならびに代謝経路解析

菊地 淳



Analysis of biomolecular mixture and metabolic pathway by stable isotope labeling

Jun Kikuchi (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 1-7-22, Suehiro,
Tsurumi, Yokohama 230-0045) *Seibutsu-kogaku* **92**: 100-109, 2014.

はじめに

安定同位体標識化した生物試料は対象への標識率と代謝速度に依存した追跡法があり、本報で中心とする核磁気共鳴（NMR）法は高分子バイオマスと低分子代謝物を非分離な状態で、つまりインタクトな組織や抽出混合物のまま計測できる特徴がある¹⁾。生体に多く存在する炭素・窒素の安定同位体¹³C, ¹⁵Nは放射性同位体と異なり、生物が取り込んでも無害で安全なため、試料を安定同位体標識することにより（100%標識化として）¹³Cで約100倍（¹³C=1.1%）、¹⁵Nで約250倍（¹⁵N=0.37%）の“見かけの存在量上昇”を期待できる^{1,2)}。

ところで、筆者が最初に使ったNMR装置は90 MHzの電磁石マグネット製であったが、当時の記憶媒体（128 KB）は、わずかに数回の1D-NMRデータで満杯になった。一方で当時急速に発展したタンパク質NMR解析の分野では、二重安定同位体標識化技術と、2D, 3D-NMRの導入により複雑に重複したシグナルの分離、およびアミノ酸配列特異帰属や、立体構造情報決定が可能となった。筆者は過去の研究過程で、安定同位体標識がタンパク質のNMR解析で有用であるのみならず、バイオマスのような高分子混合物³⁾、あるいは低分子代謝研究でも大量情報取得に可能性を秘めていると気づくことができた。以下に高分子から低分子混合物解析への流れで、筆者らの技術開発例を紹介したい。

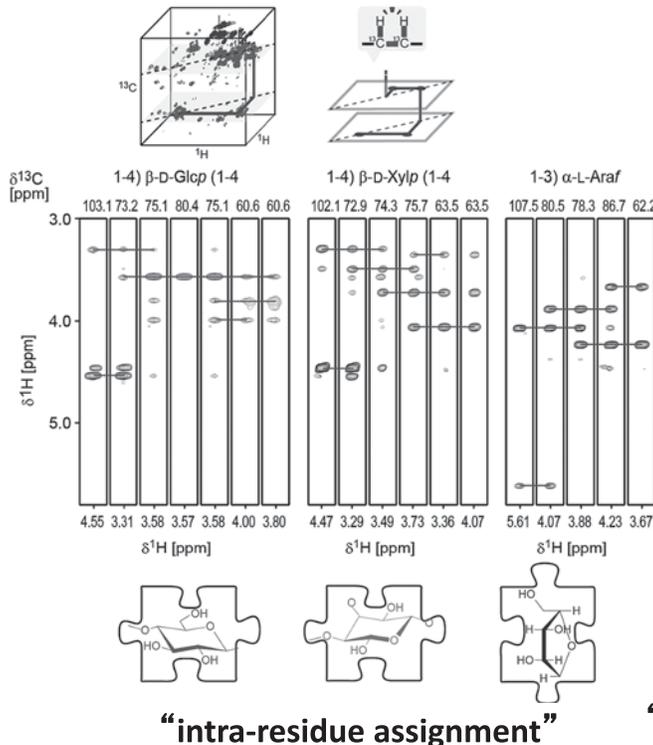
1. 高分子混合物

ゲノム情報が書き込まれた核酸が第一の生体高分子、その暗号化された情報が翻訳され、機能するタンパク質が第二の生体高分子だとしたら、バイオマスには第三の生体高分子とでも言えよう多糖と、第四の生体高分子に相当するであろうリグニンが、複雑な超分子構造体を形成し、リグノセルロースが構成されている。リグノセルロースは難溶解性かつ難分解性であるために、タンパク質や核酸ほど分子生物学的研究手法が確立されていない⁴⁾。

1-1. 種々の溶液2D, 3D-NMR法パルス系列を用いたリグノセルロースのシグナル帰属¹⁰⁾ バイオマス解析に溶液NMR法を用いる場合は、低分子成分を十分に除去した残渣画分に対して、ボールミル処理した微粉化試料をジメチルスルフォキシド（DMSO）系溶媒で可溶化した後に計測することが多い⁵⁻⁷⁾。シグナル解析を行う場合、通常はまず¹H-¹³C HSQCスペクトルを計測し、同条件で過去にシグナル帰属されたデータベースを利用しながらアノテーションを進める。筆者らはこれらの実験データベースをまとめ、なおかつユーザーが計測した¹H, ¹³Cシグナル値を入力してアノテーションを試みる事が可能なwebツールBm-Char (<https://database.riken.jp/ecomics/biomass>)を開発し、全世界に公開している^{8,9)}。

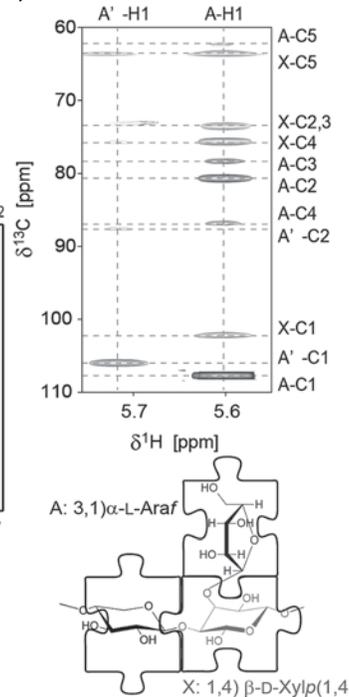
さらに、¹³C標識化リグノセルロースを用いれば検出感度が上がるのみならず、3D-HCCH-COSY法のような¹³C-¹³C磁化移動をおこなう計測プログラムが利用で

a) 3D-HCCH-COSY法の例



“intra-residue assignment”

b) 2D- ^{13}C -HSQC-NOESY法の例



“inter-residue assignment”

図1. ^{13}C リグノセルロースの2D, 3D-NMR適用例

きるようになる¹⁰⁾. 例として, ヘミセルロースの構成単位であるβ-D-xylopyranose残基およびα-L-arabinofuranose残基の帰属を示す(図1a). 一方, 残基間のつながりを解析するには, 大きなスピン結合が存在しないことから, 核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した. 図1bではグルクロノアラビノキシランのβ-D-xylopyranose残基とα-L-arabinofuranose残基間のNOEを示している. これら一連の解析から, 21の構成単位116シグナルの ^1H および ^{13}C の化学シフトを網羅的に帰属できた.

1-2. 種々の固体2D-NMR法パルス系列を用いたリグノセルロースのシグナル帰属と超分子構造評価

冒頭で述べたようにリグノセルロースは難溶性で溶解させること自体が難しく, また優れた物性は固体の超分子状態でこそ発揮される. 特にセルロース以外のヘミセルロース, リグニンやペクチンは非晶性でX線結晶構造解析のようなアプローチが難しく, こうした高分子混合物にこそ固体NMR法の技術開発が期待される. ここで, 結晶性と非晶性の成分が混在するという事は, こうした超分子構造の違いに基づく分子運動性の差(図2a)を, NMR緩和速度の違いとして分離して観測できるのではと着目した. そこで筆者らは, 緩和速度の違いをフィルターとして利用した2D-固体NMRパルスシーケンスDDF (Dipolar-Diphasing-Filtered) 法を開発した¹¹⁾.

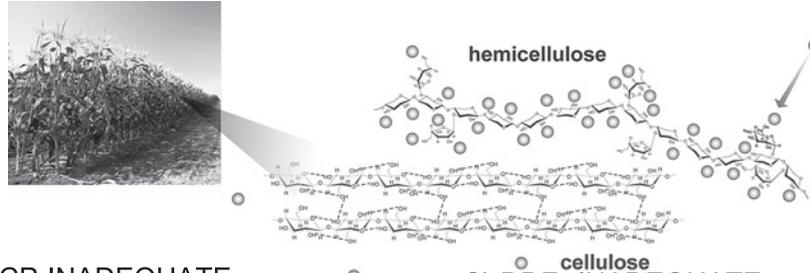
DDF法を挿入した計測法であるDDF-INADEQUATEを図2cに示す. 通常のCP-INADEQUATEではセルロースの信号が大きく他の信号の解析が困難であったが(図2b), DDFを加えることで運動性の低いセルロースの信号が減衰し, 非分離混合物のままヘミセルロースの解析が容易になった.

このように, 溶液中と固体状態の両方において, セルロースやヘミセルロースの ^{13}C 化学シフト値を得ることができた. セルロースの ^{13}C 化学シフト差は, いずれもヘミセルロースのそれより大きかった. これは, セルロースが固体中では結晶などの構造をとるためである. 筆者らは過去に, 固体NMRの実験値^{12,13)}, 分子動力学および量子化学計算から¹⁴⁾非晶セルロースに準安定構造があることを示唆している. 特に, σ 結合の回転が可能なC1, C4, およびC6位では, 化学シフトのずれが大きい傾向にあり, これは, σ 結合の回転運動が凍結されるあるいは遅くなることに由来する.

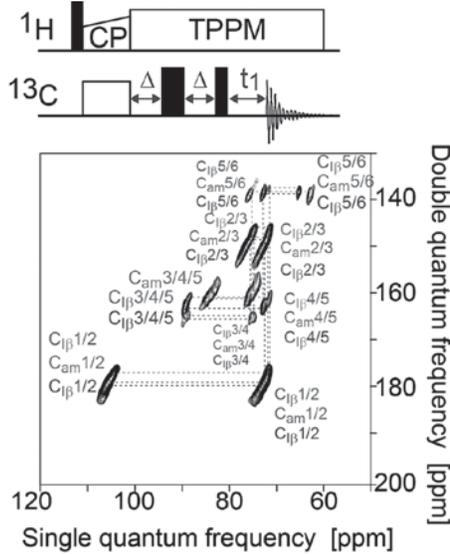
1-3. 微生物群集の複雑系中における ^{13}C セルロース分解過程の追跡^{15,16)}

前述以外にも固体NMR法で ^{13}C 標識物質のシグナルを追跡できる利点として, 種々の夾雑物が混在した状態でも, 天然存在比の ^{12}C が1.1%である事実を利用し, 混合系中にバイオマス量としては少ない ^{13}C シグナルを追跡していくことが可能な点があ

a) 植物バイオマス (糖類) の模式図



b) CP-INADEQUATE



c) DDF--INADEQUATE

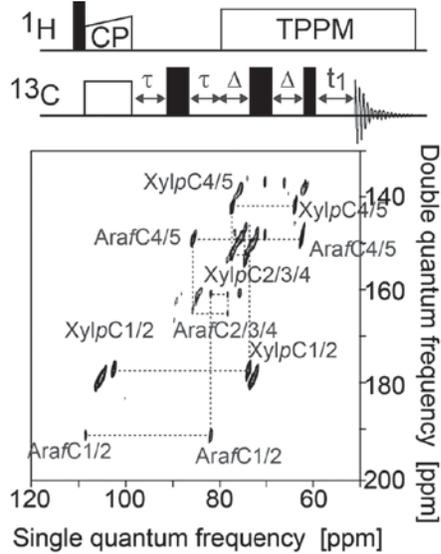


図2. ^{13}C リグノセルロースへの2D-固体NMR適用例

げられる。筆者らは世界的にもっとも普及した排水・廃棄物処理システムであり、結晶性セルロースを1日で完全分解可能なメタン発酵微生物叢の反応場解析に着手している¹⁷⁾。特に固体セルロースから溶液中に産出される分解代謝物、そして最終反応物であるメタンや二酸化炭素といった気体について、固・液・気三相の混合物をすべてNMR法で時系列追跡可能なことを示した。

さらに、汚泥からの持ち込みや菌体夾雑物が含まれる反応場から ^{13}C セルロースの構造情報を抽出し、かつ同時にサンプリングした汚泥から微生物叢のメタゲノム変遷を次世代シーケンサーで追跡することで、 ^{13}C セルロースの分解と相関するDNAシーケンス情報の抽出を試みた。ここでは ^{13}C - ^1H 固体HETCORの2Dスペクトルを、前述の筆者らが開発したECOMICS web中のFT2DBツールで数値マトリックス化し、さらに次世代シーケンス・データからCBM (糖質結合モジュール) 配列数もE-classツールで数値マトリックス化し、両者を相関解析した。

この結果、特に真核微生物で結晶性セルロースを分解していく際に重要なフラットな結合面を有するType-A

型のCBM (CBM2と3) がセルロースシグナルの分解に伴って上昇する様相が観測された (図3)。微生物由来の16S-rDNA数の時系列変化を追跡すると、*Clostridia*属が同様の変動をしており、結晶セルロースが添加されたことにもっとも強く応答して増える微生物属であった。

以上のように、従来は追跡が困難であった高分子混合物、さらには土壌や発酵槽のような夾雑物の多い反応場においても、着目したい ^{13}C 標識試料と固体および溶液NMR法の利用、さらには高速DNAシーケンサーのような他の分析手法と統合解析することで、鍵となる微生物やタンパク質の候補を絞り出せる可能性が拓けた。

2. 代謝混合物

2-1. 代謝混合物データベース整備とアノテーション web ツール SpinAssign の開発

代謝混合物の一斉解析法である代謝プロファイリング (メタボロミクス・メタボノミクス) は、幅広い産業分野に展開可能な方法論であり、対象となる生物資源は植物、動物、微生物など多岐にわたる。さらに鳥瞰すれば、生物は環境のなかで常に他者と物質のやりとりを行っており、個々の代謝は

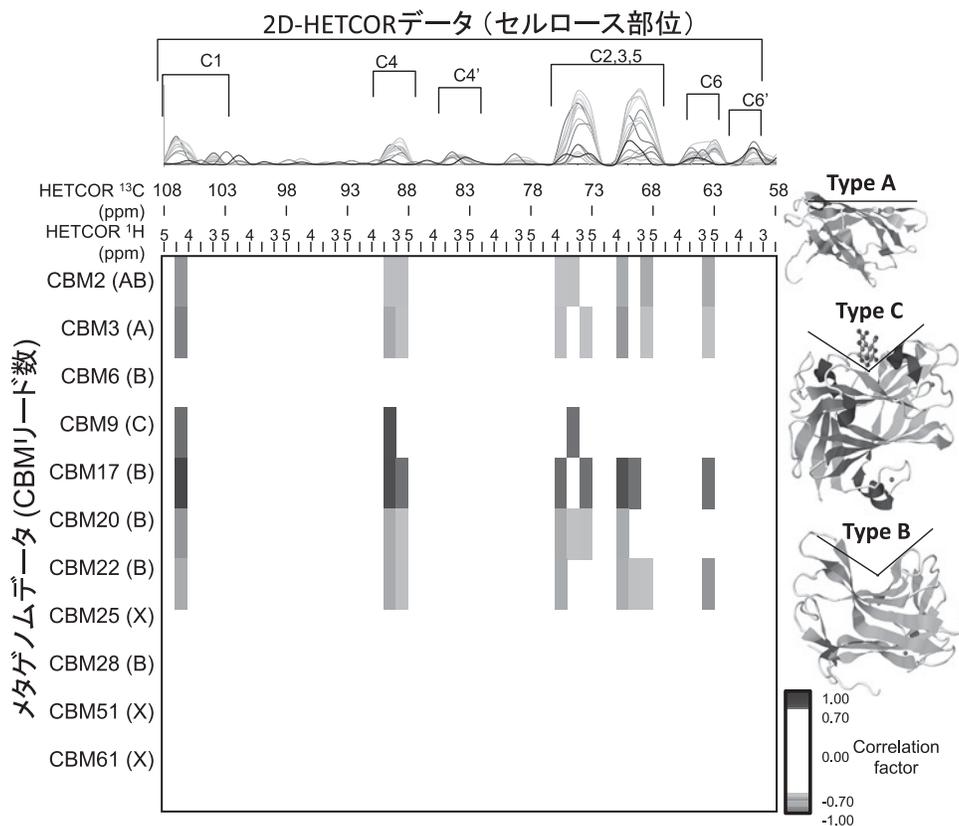


図3. ^{13}C セルロースの固体HETCORスペクトルとCBM配列リード数の時系列変動情報の相関解析

直接的あるいは間接的に関係しあいながら、地球環境下における広大な物質循環ネットワークを構成している。筆者らはこのような観点から、代謝を単一の生物の生理現象としてのみならず、幅広い生物間における物質循環の構成要素として捉え、さまざまな生物に適用可能な手法構築を検討している^{8,18,40,41}。

調べたい試料系に安定同位体標識を利用する場合、まず ^{13}C 標識したグルコースや二酸化炭素など、代謝の起点となる化合物を生体に与え、細胞内の代謝物を均一に標識する¹⁹⁻²²。これは、第一にはNMR解析の弱点である感度の低さを改善し、検出シグナル数を増やすためであるが、もっと大きなメリットは、前項の高分子混合物への固体NMR法のアプローチ同様、低分子代謝混合物においても、 ^{13}C - ^{13}C 磁化移動を含むさまざまなパルス系列を効果的に用いて、より信頼性の高いアノテーションを行えることにある。

また、検出シグナルのアノテーションのためには標品化学シフトデータベースを充実させることが重要であるが、世界規模で代謝物の化学シフトデータベースの整備が進んでいる。NMRシグナルのアノテーションではまず標品化学シフトデータベースとの照合を行うが、(1) 検出シグナルと標準化合物の化学シフト差が指定の範囲

内に収まっているか、(2) 標準化合物に必要なシグナルがすべて(1)を満たして検出されているか、などが指標となる。筆者らは、NMRシグナルのアノテーションにおいて、遺伝子の塩基配列解析やタンパク質のアミノ酸配列解析で用いられる「類似性」の概念を導入することを考えた。すなわち未知シグナルを無視するのではなく、BLASTのE-valueのような指標を与えることで、情報として活用しようということである。この考えのもと、実測シグナルとデータベースとの化学シフトのずれを、カイ二乗分布を用いた*p*-value計算に採用し、アノテーションの新しい指標として考案した²³。この*p*-value法を実装したSpinAssignは、筆者らが公開しているPRIME (<http://prime.psc.riken.jp/>) 上で公共利用が可能であり(図4)、2013年現在、一月当たり約1000件の閲覧数を記録している。

ここで重要となる標品化学シフトデータベース構築については、著者らのグループでは、水系および有機溶媒系の両方で標準化合物の化学シフトデータベースを整備しており目的に応じて使い分ける事で、幅広い解析が可能となっている²⁴。また、どんな溶媒を用いたとしても抽出しきれない不溶性代謝物は常に残渣として沈殿するものであり、これらについては高分解能マジック角回転

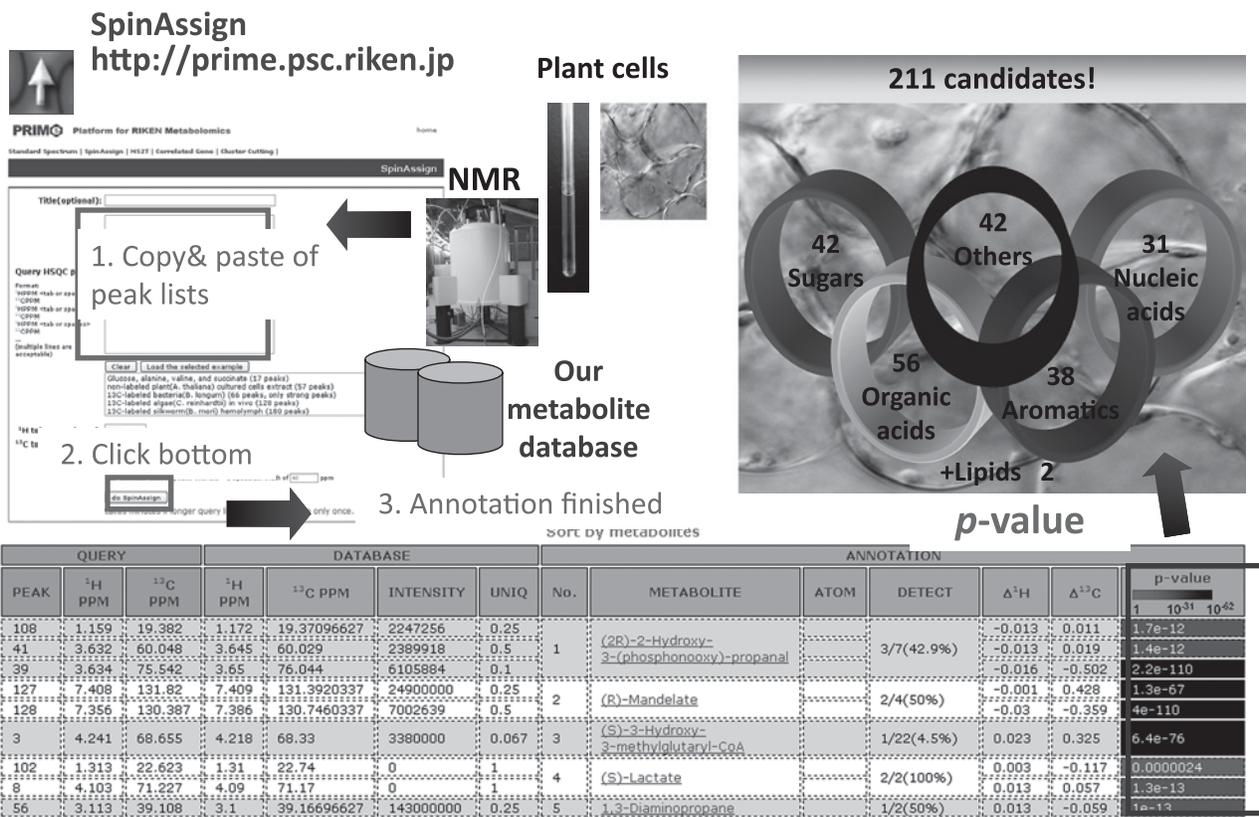


図4. 筆者ら開発した代謝物アノテーションツール・SpinAssignの適用スキーム

(HR-MAS) 法による解析が有効である。筆者らは、¹³C 標識したシロイヌナズナを MeOD と重水の組合せで繰返し抽出し、溶液 NMR および HR-MAS 法により、抽出操作にともなう代謝物の挙動を追った²⁵⁾。¹H-¹³C HSQC スペクトルを用いて代謝物のアノテーションを行い、各代謝物のシグナル強度変化を調べたところ、脂質は有機溶媒に溶解、糖や有機酸は水に溶解、といった単純な溶解性からは予想できない振る舞いが明らかとなった。

2-2. 腸内細菌叢の代謝動態解析 筆者らが生物間の相互作用に強い関心を抱いていることをすでに述べたが、複合微生物系を理解するためのもっとも重要な要因の一つに、微生物間相互作用情報を多く含むと考えられる代謝物の組成や時間的推移を解析することがあげられる。まず、微生物の代謝動態をリアルタイムに計測可能とする Real Time MetaboloTyping 法 (RT-MT 法) を紹介したい。RT-MT 法は NMR 試験管内を嫌氣的に保持しつつ微生物の代謝動態を数分おきに観測し、得られた多量の代謝物情報を多変量解析手法により解析することで特徴的な代謝変動を検出する手法である²⁶⁾。RT-MT 法と安定同位体標識技術を用いて、腸内細菌の一種であり生理活性物質である共役脂肪酸を産生する *Butyrivibrio fibrisolvens* の時間依存的な代謝動態を解析した。¹³C₁₈-

リノレン酸を用いて *B. fibrisolvens* のリノレン酸代謝動態を RT-MT 法により解析したところ、これまでに報告されていなかった新たな中間生成物を検出し、これが共役脂肪酸であることを同定した。

また筆者らは、腸管出血性大腸菌 O157 とビフィズス菌という 2 種の細菌の 1 次代謝物を介した相互作用を、この RT-NMR 法にて解析した²⁷⁾。まず、試験管に O157 とビフィズス菌両者を入れたもの、O157 だけを入れたもの、ビフィズス菌だけを入れたものの 3 種類のサンプルを作製し、それぞれ ¹³C 標識培地を用いて試験管内で培養し、細菌の増殖と代謝動態をリアルタイム計測した (図 5)。その結果、O157 とビフィズス菌の共培養下の試験管では、生存に必須なアミノ酸であるアスパラギン酸とセリンの時間変動が、単独培養のそれと有意に異なることを見いだした。

さらに、安定同位体 ¹³C で標識したアスパラギン酸とセリンを試験管に添加した実験を行い、O157 が、標識したアスパラギン酸はフマル酸を経由してコハク酸へと、さらにセリンもピルビン酸を経由して酢酸へと代謝することを見いだした。O157 代謝経路上に存在し、これらの代謝物の生合成に関わる遺伝子やタンパク質の発現量も単独培養よりも上昇していることから、O157 と

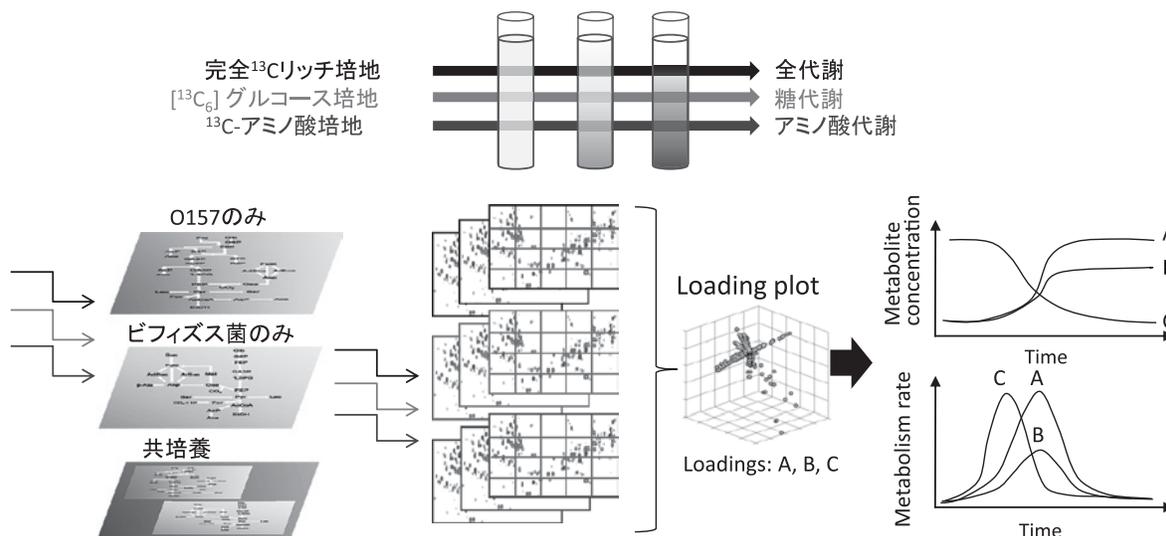


図5. ^{13}C 標識培地でのリアルタイム計測により2種の腸内細菌間の代謝動態を解析する

ビフィズス菌の共培養下では、ビフィズス菌が作ったアミノ酸をO157が有機酸に代謝することを突き止め、両者が共生関係を築いている証拠を得た。

さらに、今回用いたビフィズス菌を無菌マウスにプロバイオティクスとして用いる場合、O157による感染死を抑制できる株（予防株）とそうでない株（非予防株）が存在するメカニズム解析にも挑戦した。これらを別々に無菌マウスへ投与した動物実験群の糞便抽出物をNMR解析した結果、2種類の予防株ビフィズス菌投与群と非予防群の代謝物プロファイル明確に異なり、特に嫌気発酵産物である短鎖脂肪酸の変動が顕著であることを見いだした。さらに ^{13}C 標識培地中で各ビフィズス菌株を培養し、代謝プロファイリングを遂行してみた。すると、予防株と非予防株とで明確に区別でき、そのバイオマーカーとしてフルクトースと酢酸が含まれていることも見いだすことができた。そこでこれらの物質を基点にして免疫学的な追試調査を追加することで、酢酸の腸壁防御効果を発見したNature誌表紙掲載の成果を得ることに貢献した²⁸⁾。

2-3. 微生物群集と代謝混合物の時系列変遷 パスツール、コッホ以来の単一微生物を対象とした従来のバイオ技術では、利用可能な微生物は1%にも満たないと考えられており、地球環境には従来の純粋分離培養技術では取り扱うことのできない多くの微生物が、未利用資源として手つかずのまま取り残されている。そこで複合微生物系における微生物の機能や役割、代謝活性や代謝動態を明らかにすることは、微生物生態学者にとってもっとも大きな課題のひとつである²⁹⁾。

我々は、DNA-SIP法による基質利用微生物の特定と、

NMR法による代謝プロファイリングを組み合わせることで、標識基質を利用した微生物の代謝産物を網羅的に計測し、微生物生態系における代謝動態の変遷を詳細に解き明かすことができるSIP-NMR法を開発した(図6)³⁰⁾。この方法では、(1) 安定同位体標識した基質を利用することのできる微生物が、その基質を用いて菌体合成を行うことにより、微生物のDNAやRNAが安定同位体で標識される性質、(2) その微生物が代謝した代謝物も安定同位体で標識される性質、の二つの性質を利用しており、NMR法を用いて代謝された代謝物群を網羅的に測定することが可能である。また、時間依存的な解析を行うことにより、栄養共生関係にある微生物群の特定や、仲介物質となっている代謝物群を同定できることも、SIP-NMR法におけるメリットの一つである。我々はこの方法を、 ^{13}C 標識グルコースを用いたモデル実験系に適用し、複合微生物系における代謝動態の評価を行ったところ、(1) グルコースを利用した1次利用細菌として乳酸菌を同定し、(2) 乳酸菌はグルコースの代謝によって乳酸やピルビン酸を産生し、(3) その代謝物を利用して大腸菌や*Enterococcus* sp.などの2次利用細菌が増殖し、(4) さらにそれらの2次利用細菌が酢酸やコハク酸などを代謝したことを明らかにした。このように、グルコースの分解から始まる複合微生物生態系の代謝動態と微生物同士の栄養共生関係を詳細に明らかにすることが可能であった。

3. 代謝経路解析

安定同位体を用いて特定の原子を標識し、その変化の経過を追跡するトレーサー実験は、物質代謝、物質循環

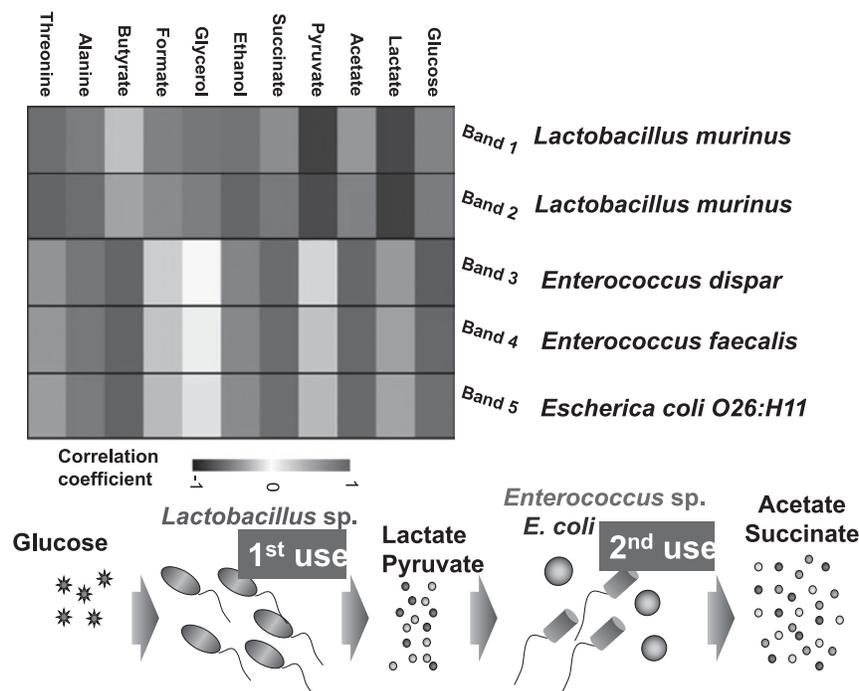


図6. SIP-NMR法による複合微生物系における¹³C基質1次利用, 2次利用菌の解析例

の解析に必須の手法である。おもな代謝研究の流れとしては、「選択的安定同位体標識とターゲット分析による生合成反応の解析」と「均一安定同位体標識による代謝ネットワーク解析」に大別できる。

従来行なわれてきた一般的なターゲット型の代謝研究では、種々の安定同位体核で選択的に標識した基質を生体に投与し、注目する代謝物(群)を分離し、機器分析により取り込まれた同位体を検出する。特にNMR法を用いる場合は、化学シフトやスピン-スピン結合定数などのパラメータから同位体の正確な位置情報および結合情報を得る事が可能であり、投与した標識と目的化合物の標識の生合成的関係を分子構造レベルで明らかにできる³¹⁾。

3-1. 均一安定同位体標識による代謝ネットワーク解析

この研究の特徴の一つは、グルコースやCO₂など一次代謝の起点あるいはハブとなる化合物の標識体を生体に投与し、安定同位体を広範な代謝物に分布させ、各代謝物における標識の分布やバランスの変化を網羅的に観測する事である。各代謝物について、同位体組成の異なる異性体をアイソトポマーと呼び、この中で特に¹³C-¹³C結合の位置が異なる異性体をボンドマーと呼ぶ。NMR法を用いる強みの一つは、分子内の各原子をそれぞれ区別して観測できる事、また、¹³C-¹³C結合定数が分子内の各結合に特徴的な値を示す事であり、したがってアイソトポマーおよびボンドマーの種類を区別する事が可能である。

以上の現状を踏まえ、我々が行なったシロイヌナズナの¹³C均一標識および、2D ¹H-¹³C HSQCスペクトルによるアイソトポマーの経時解析について簡単に紹介する³²⁾。一般的な動的解析では、定常状態にある生体に標識化合物を取り込ませ、経時的に標識率が増加していく過程を観測するケースが多い。我々は逆に、まずシロイヌナズナに[¹³C₆]グルコースを与え高度に標識し、光合成に伴う大気中の¹²CO₂の取込みによって¹³C-¹³C結合が切られていく様子を経時的に観測した(図7)。議論を単純にするために、ここでは数種類のアミノ酸のα位のみを考察する。各シグナルの¹³C-¹³Cカップリング定数を詳細に解析する事で、各アイソトポマーの割合を見積もる事ができ、その経時変化を追跡する事が可能である。培養23日目になると、セリン、グリシン、アラニンが大気中の¹²CO₂の取込みにより比較的均一に希釈され、シングルレットシグナルのみを示すのに対し、アスパラギンでは¹³C-¹³C結合の位置が異なるボンドマー(13日目:[CO-Cα-Cβ]¹³C₃, [Cα-Cβ]¹³C₂→23日目:[CO-Cα]¹³C₂)が観測された。この事は、アスパラギンの各代謝経路に対する¹²CO₂取込みの寄与が、生育の過程で明らかに他のアミノ酸とは異なっている事を示している。

3-2. ²H-¹³C選択的安定同位体標識とステロール合成経路解析

これまでに記述した高分子・低分子物質に対する解析対象が混合物および一斉解析だったのに対し、ここではステロール合成をターゲットにした精製物の

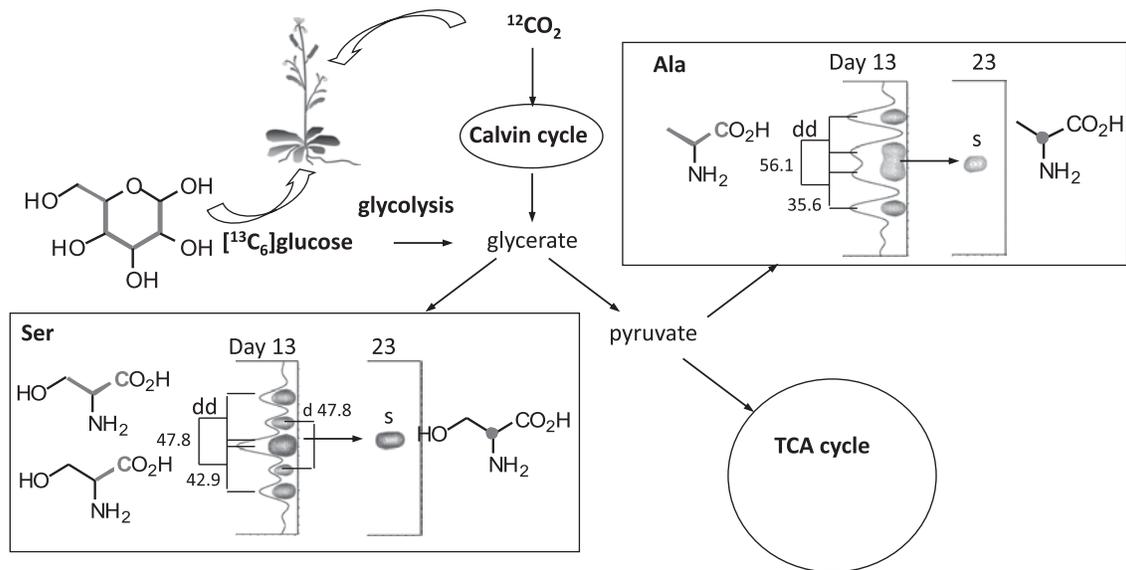


図7. ^{13}C アイソトポマーの時系列追跡による代謝解析例

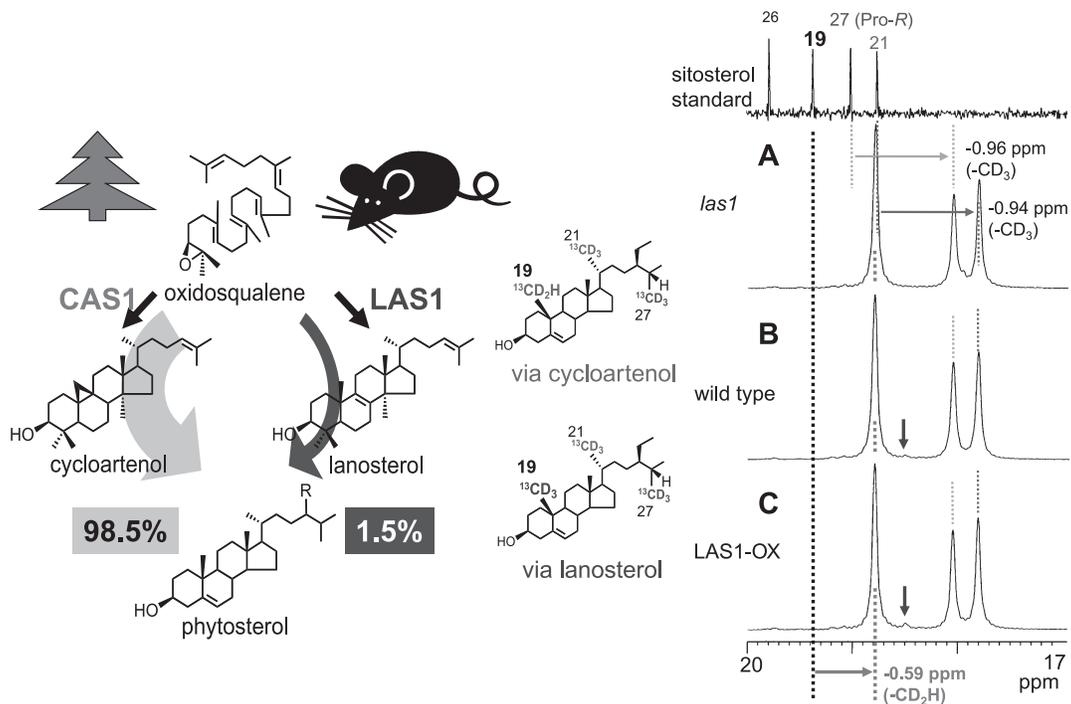


図8. $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\{^2\text{H}\}$ 三重共鳴NMR法によるステロール生合成経路解析例

ターゲット解析例について述べる. 我々はシロイヌナズナでメバロン酸の6位メチル基を重水素で標識した化合物 ($[6\text{-}^{13}\text{CD}_3]\text{MVL}$) の追跡実験を遂行した. この系ではメバロン酸の6位の炭素がステロールの19位に取り込まれる際に, シクロアルテノールを経由して生合成される経路では重水素が二つ保持されるのに対し, ラノステロールを経由して生合成される経路では重水素

が三つ保持されるという $^{13}\text{C}\text{-}^2\text{H}$ 間スピン結合の違いを, $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}\{^2\text{H}\}$ 三重共鳴NMR法により異なるシグナルとして検出した³¹⁾. 従来知られていたシクロアルテノールを経由して生合成されたことを示すシグナルとともに, 約1%のラノステロールを経由したと考えられるシグナルをも検出することに成功した(図8). そこで, 植物ステロールがシクロアルテノール経路に加えて, 動物に特

微的だと考えられてきたラノステロール経路でも生合成されることが明らかになった。この成果は、動物と植物でのステロール生合成に関する30年来の常識を覆す結果となり、PNAS誌に掲載されるとともに、権威のあるFaculty of 1000 Biologyに選ばれた。

おわりに

冒頭で述べたように生体系NMRの歴史を鳥瞰すると、ラジオ波の弱エネルギーを検出する低感度の弱点には目を塞ぎ、情報の多様性と選択性が高い点をうまく惹き出してきたと言える。たとえばタンパク質NMRの進展には、Wüthrich博士(2002年ノーベル化学賞)らの技術開発が大きい³³⁾。20年以上前に、X線回折法が主流であったタンパク質構造解析の分野に、あえて不利なNMR法で挑む無謀な挑戦者がいたからこそ、化学から生命科学の一分野へと、NMR法が入り込むことができた。前項でも述べたようにNMRを用いた代謝プロファイリングを基礎医学の分野で利用しようとする試みは、筆者らを含めてNature誌に相次ぐ報告があり、よく貢献していると言えよう³⁴⁻³⁷⁾。今世紀中盤には世界人口が90億人に達すると予想される昨今、生命科学は環境・資源の新たな問題に斬り込む役割を期待されており、こうした新分野開拓に貢献し得る分析技術開発へ、挑戦者が現われる必要があるだろう。

最初のトピックスであるリグノセルロース解析では、非晶固体を扱える固体NMR法が以前から注目されていた。近年、固体NMR法では超高速回転が可能な信号検出器が開発・販売されており³⁸⁾、必要試料量の激減とシグナル先鋭化を可能としている。一方で電磁石を利用した小型で高性能な、ベンチトップ型の低価格NMR装置も開発および販売されている。この小型装置に試料管でなく検出コイル自体を回転させるMACS技術³⁹⁾を搭載する試みも登場している。こうした装置を利用すれば試料抽出や溶媒流出が前提なクロマト分離を利用しないため、将来は食品や工業製品の製造現場での評価や、検診車や地方病院での簡易健康診断などへの導入も可能な時代が到来するかもしれない。

最後に、本研究は理化学研究所の植物科学および環境資源科学研究センターにて遂行されました。研究ユニットおよびチーム環境を提供していただいた篠崎一雄センター長、斎藤和季グループディレクター、および多くの共著者となっているスタッフの関山恭代(現食品総研)、近山英輔(現新潟国際情報大)、尾形善之(現大阪府大)、伊達康博(横市院兼務)、坪井裕理、篠阿弥宇、坂田研二氏、さらに筆者が客員教授を兼務する横市院、名大院生命農の研究室員に深く感謝します。さらに、バイオマスの共同研究には山澤 哲(株鹿島建設)、

石田亘広(株豊田中研)、志佐倫子・則武義則(トヨタ自動車株)、腸内環境の共同研究は大野博司(理研統合生命)、福田真嗣(現慶応大)、服部正平(東大新領域)、常田 聡(早大先進)、森田英利(麻布大)、ステロール代謝の共同研究は村中俊哉(現阪大工)の各先生方の多大なる協力を得ました。本研究期間内では若手研究(B)、挑戦的萌芽研究、基盤研究(A)および(C)、CREST、SATREPS、ALCA、A-STEP、BRAIN、NEDOの外部資金を代表および分担者として援助を受けながら遂行することができました。

文 献

- 1) 菊地 淳, 赤嶺健二: 分光研究, **55**, 320-331 (2006).
- 2) 菊地 淳, 関山恭代, 伊達康博: *Radioisotopes*, **59**, 637-658 (2010).
- 3) 菊地 淳: 植物の生長調節, **43**, 144-155 (2008).
- 4) Rubin, E. M.: *Nature*, **454**, 841-845 (2008).
- 5) Watanabe, T., Shino, A., Akashi, K., and Kikuchi, J.: *Plant Biotechnol.*, **29**, 163-170 (2012).
- 6) Date, Y., Sakata, K., and Kikuchi, J.: *Polymer J.*, **44**, 888-894 (2012).
- 7) Ogura, T., Date, Y., and Kikuchi, J.: *PLoS ONE*, **8**, e66919 (2013).
- 8) Kikuchi, J., Ogata, Y., and Shinozaki, K.: *J. Ecosys. Ecogr.*, **S2**, 001 (2011).
- 9) Ogata, Y., Chikayama, E., Morioka, Y., Everroad, R. C., Shino, A., Matsushima, A., Haruna, H., Moriya, S., Toyoda, T., and Kikuchi, J.: *PLoS ONE*, **7**, e30264 (2012).
- 10) Komatsu, T. and Kikuchi, J.: *Anal. Chem.*, **85**, 8857-8865 (2013).
- 11) Komatsu, T. and Kikuchi, J.: *J. Phys. Chem. Lett.*, **4**, 2279-2283 (2013).
- 12) Okushita, K., Chikayama, E., and Kikuchi, J.: *Biomacromolecules*, **13**, 1323-1330 (2012).
- 13) Okushita, K., Komatsu, T., Chikayama, E., and Kikuchi, J.: *Polymer J.*, **44**, 895-900 (2012).
- 14) Mori, T., Chikayama, E., Tsuboi, Y., Ishida, N., Shisa, N., Noritake, Y., Moriya, S., and Kikuchi, J.: *Carbohydr. Polym.*, **90**, 1197-1203 (2012).
- 15) Yamazawa, A., Iikura, T., Shino, A., Date, Y., and Kikuchi, J.: *Molecules*, **18**, 9021-9033 (2013).
- 16) Yamazawa, A., Iikura, T., Morioka, Y., Shino, A., Ogata, Y., Date, Y., and Kikuchi, J.: *Metabolites*, **4**, 36-52 (2014).
- 17) Date, Y., Iikura, T., Yamazawa, A., Moriya, S., and Kikuchi, J.: *J. Proteome Res.*, **11**, 5602-5610 (2012).
- 18) 菊地 淳, 葭田征司, 坪井裕理, 伊達康博: ケミカルエンジニアリング, **56**, 38-43 (2011).
- 19) Kikuchi, J., Shinozaki, K., and Hirayama, T.: *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1099-1104 (2004).
- 20) Kikuchi, J. and Hirayama, T.: *Methods Mol. Biol.*, **358**, 273-286 (2007).
- 21) Chikayama, E., Suto, M., Nishihara, T., Shinozaki, K., and Kikuchi, J.: *PLoS One*, **3**, e3805 (2008).
- 22) Tian, C., Chikayama, E., Tsuboi, Y., Kuromori, T., Shinozaki, K., Kikuchi, J., and Hirayama, T.: *J. Biol. Chem.*, **282**, 18532-18541 (2007).

- 23) Chikayama, E., Sekiyama, Y., Okamoto, Y., Nakanishi, Y., Tsuboi, Y., Akiyama, K., Saito, K., Shinozaki, K., and Kikuchi, J.: *Anal. Chem.*, **82**, 1653–1658 (2010).
- 24) Sekiyama, Y., Chikayama, E., and Kikuchi, J.: *Anal. Chem.*, **83**, 719–726 (2011).
- 25) Sekiyama, Y., Chikayama, E., and Kikuchi, J.: *Anal. Chem.*, **82**, 1643–1652 (2010).
- 26) Fukuda, S., Nakanishi, Y., Chikayama, E., Ohno, H., Hino, T., and Kikuchi, J.: *PLoS One*, **4**, e4893 (2009).
- 27) Nakanishi, Y., Fukuda, S., Chikayama, E., Kimura, Y., Ohno, H., and Kikuchi, J.: *J. Proteome Res.*, **10**, 824–831 (2011).
- 28) Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., and Ohno, H.: *Nature*, **469**, 543–547 (2011).
- 29) Yamazawa, A., Date, Y., Ito, K., and Kikuchi, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 305–309 (2014).
- 30) Date, Y., Nakanishi, Y., Fukuda, S., Kato, T., Tsuneda, S., Ohno, H., and Kikuchi, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 87–93 (2010).
- 31) Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K., and Muranaka, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 725–730 (2009).
- 32) Sekiyama, Y. and Kikuchi, J.: *Phytochemistry*, **68**, 2320–2329 (2007).
- 33) Wuthrich, K.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 3340–3363 (2003).
- 34) Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., and Ohno, H.: *Nature*, **504**, 446–450 (2013).
- 35) Clayton, T. A., Lindon, J. C., Cloarec, O., Antti, H., Charuel, C., Hanton, G., Provost, J. P., Le Net, J. L., Baker, D., Walley, R. J., Everett, J. R., and Nicholson, J. K.: *Nature*, **440**, 1073–1077 (2006).
- 36) Holmes, E., Loo, R. L., Stamlor, J., Bictash, M., Yap, I. K., Chan, Q., Ebbels, T., De Iorio, M., Brown, I. J., Veselkov, K. A., Daviglus, M. L., Kesteloot, H., Ueshima, H., Zhao, L., Nicholson, J. K., and Elliott, P.: *Nature*, **453**, 396–400 (2008).
- 37) Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O’Connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O’Sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., O’Connor, M., Harnedy, N., O’Connor, K., O’Mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., Stanton, C., Marchesi, J. R., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., Hill, C., Ross, R. P., and O’Toole, P. W.: *Nature*, **488**, 178–184 (2012).
- 38) Nishiyama, Y., Malon, M., Gan, Z. H., Endo, Y., and Nemoto, T.: *J. Magn. Reson.*, **230**, 160 (2013).
- 39) Sakellariou, D., Le Goff, G., and Jacquinet, J. F.: *Nature*, **447**, 694 (2007).
- 40) Ito, K., Sakata, K., Date, Y., and Kikuchi, J.: *Anal. Chem.*, **86**, 1098–1105 (2014).
- 41) Date, Y., Nakanishi, Y., Fukuda, S., Nuijima, Y., Kato, T., Umehara, M., Ohno, H., and Kikuchi, J.: *Food Chem.*, **152**, 251–260 (2014).