

2015年度 生物工学功績賞 受賞

メタボロミクス技術開発と 精密表現型解析への応用

福崎英一郎



Development of Metabolomics Technology and its application to high resolution phenotype analysis

Eiichiro FUKUSAKI (*Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan*) *Seibutsu-kogaku* **94**: 230-236, 2016.

はじめに

前世紀末に多くのモデル実験生物のゲノム配列が決定された。ゲノム情報を通じて有益な新知見が数多く得られ、世界中が解く価値のある新問題に直面した。ゲノム解読前後で、生命科学研究やバイオテクノロジー研究に対する考え方も大きく変わった。各人が色々な所感をもったのであろうが、筆者がもっとも感じたことは「ゲノム情報が分かっても意外に生命の不思議はわからないものだ」という印象である。というのも、筆者自身、ゲノム解読が進行している中で、生命体の設計図であるゲノム配列が解読されれば、生命体の仕組みが相当わかるであろうという雰囲気に期待に胸を膨らませていた一人だったからである。当然のことながら、生命体はその設計図であるゲノム情報によって定められる遺伝形質により多くの運命が決定づけられる。しかしながらゲノム情報だけで生き物のすべてが規定されるわけではない。遺伝形質の貢献は高等生物になるに従い低くなり、後天的獲得形質の影響が大きくなる。一卵性双生児であっても生活環境が異なれば時として大きく異なる健康状態になるのである。後天的獲得形質理解にはゲノムの下流のオーム情報解析が重要である。トランスクリプトームおよびプロテオームは、ゲノム情報が実行される過程のメディアの流れを表現する動的情報であり遺伝子間の発現ネットワークの理解には必須のオーム情報である。ただ、後天的獲得形質の直接理解には至らないことが多い。さ

らに下流には代謝物の総体情報であるメタボロームが位置する。メタボロームはいわゆるゲノム情報実行の結果であり、精密な定量的表現型と考えることができ、後天的獲得形質理解に特に貢献すると期待されている(図1)。

メタボロームを観測する方法に特に制限はないが、質量分析は、感度、解像度にすぐれ、代謝物の定性・定量分析の手法としてもっとも頻用されている手法である。特に種々の化合物分離手段、たとえばガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、超臨界流体クロマトグラフィーなどと組み合わせる

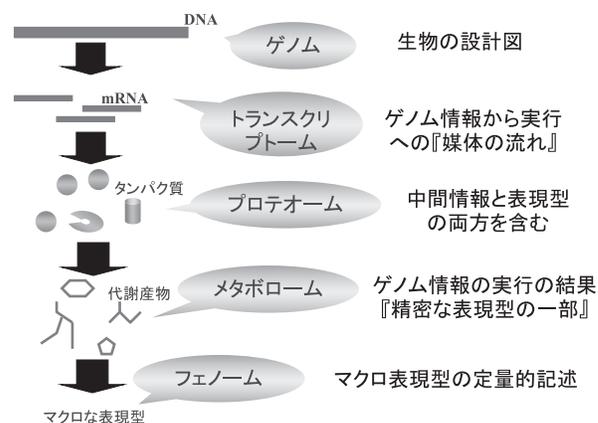


図1. ポストゲノムオーム科学におけるメタボロミクスの位置づけ

著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻(教授) E-mail: fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

ことにより、威力を発揮する。近年は、質量分析計 (MS) の感度が劇的に向上するとともに、種々のハイブリッド型質量分析計の出現により、以前には考えられなかった情報が得られるようになった。メタボロミクス研究は、観測代謝物対象を特定しないノンターゲット解析と、ある程度観測対象を特定したターゲット解析の両方の運用が行われるが、筆者は、定量性を重視したターゲットプロファイリングを実施し、得られたメタボロームと表現型の相関関係を詳細に解析することにより、表現型発現機構解明に資する代謝情報を得ることを主眼として研究を行ってきた。できるだけ網羅的に代謝物をとらえるために、通常の質量分析とはかなり異なる分析を実施する必要がある。解析方法も通常の解析では対処できないため、われわれは種々の解析方法を開発してきた。受賞研究はメタボロミクス研究において普遍的に必要な方法論の開発とそれらの一般性と拡張性の検証について与えられたものであると自覚している。本稿では開発した方法論について言及した上で、種々のアプリケーションを紹介し、今後の展望についても考察したい。

メタボロミクス研究に必要な基本的解析方法の開発

メタボロミクスにおいて通常、質量分析は何らかの分離手段との組合せで運用される場合が多いと前述した。種々の分離モードの中で、特にガスクロマトグラフィー (GC) がもっともよく用いられる。GCは誘導体化が必要である上にガス化の際の高熱でサンプルが熱分解などにより変動することが危惧される手法であり、バイオ分野では、液体クロマトグラフィー (LC) の方がなじみのある方法である。しかしながら、メタボロミクスにおいてはGCの高いピークキャパシティとイオン化サブプレッションを受けにくい電子イオン化 (EI) 法によるイオン化による高い定量性は欠点を補っても余りある長所である。しかしながら、網羅性を優先するために、必要最小限の前処理しか行わないために、生体サンプル由来の膨大な代謝物情報がGC-MS分析の生データには含まれている。バイオリジストが理解可能な代謝物データ行列を組織化するためには新しい手法の開発が必要であった。上記の背景を踏まえて、いくつかの重要な基本技術を考案・開発した。まずは、スキャンデータから代謝物ピークを抽出し、できうる限り正確に代謝物推定する汎用性の高い解析方法を開発した¹⁾。当該方法を種々の生体サンプルに適用しその一般性の高さを検証した²⁾。同じ分析を行っても分析バッチが異なれば微妙な差異を生むことは一般に知られている。解析変数が膨大であるメタボロミクスでは特に重要な問題となる。筆者は、当該問題点を指摘し、将来解決すべき重要課題である旨を記

述した論文を発表した³⁾。本問題については現在に至るまで完全解決策は得られていないが、メタボロミクスの安易な運用に警鐘を鳴らす重要な意味をもつ提案論文であると自負している。メタボロミクスはノンターゲット解析を半定量的に実施した上で、ターゲットを絞り定量性を高めて解析することにより詳細な知見が得られる。そのためには、タンデム四重極MSを用いたmultiple reaction monitoring (MRM) モードでの解析が必要となる。できる限りユーザーフレンドリーなMRMモードでのターゲット解析プラットフォームを開発した^{4,5)}。さらに、質量分析スペクトルから代謝物を推定していく過程で当該推定の確からしさをBLASTの統計理論を用いて表す方法論を開発した⁶⁾。このようにGC-MSメタボロミクスプラットフォームを開発するとともに、その有用性を示すことができた。もちろん、GC-MS以外の手法、たとえば液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) やフーリエ変換核磁気共鳴スペクトラム (FT-NMR) などの解析戦術も駆使して総合的にメタボロミクス研究を推進している。他にも近年、さまざまな解析方法が考案されている。メタボロミクス技術の進展については、総説を参照されたい⁷⁾。メタボローム情報を説明変数とした表現型解析は、実験材料に制限はほとんどない。動植物微生物のすべてが研究対象になりうる。近年の応用研究については、総説を参照されたい⁸⁾。本論文では、筆者のいくつかのトピックスを中心として、メタボロミクスの表現型解析への応用について議論したい。

メタボリックフィンガープリンティングの原理と応用

メタボロミクスがポストゲノムオーム科学に登場した当初は、メタボローム情報を上流のオーム情報、すなわち、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームといった情報理解のための一助と考える運用が主流だった。これは、一定レベルの成果を上げてきたが、どちらかというメタボロミクスは主役ではなく、補助的な戦術としてとらえられてきた。一方、メタボローム情報を説明変数として定量的表現型のレベルを解析するメタボリックフィンガープリンティングは、遺伝型の差異を解析できるだけでなく、生体のダイナミックな変動の表現方法として期待できる。メタボリックフィンガープリンティング解析は他のオーム情報 (ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム他) を必要としないことも大きな特長である (図2)。

メタボリックフィンガープリンティングの運用の例をあげる。実験動物であるゼブラフィッシュは、発生段階をメタボロームを説明変数として正確に予測することができる⁹⁾。人工授精により調整したゼブラフィッシュの

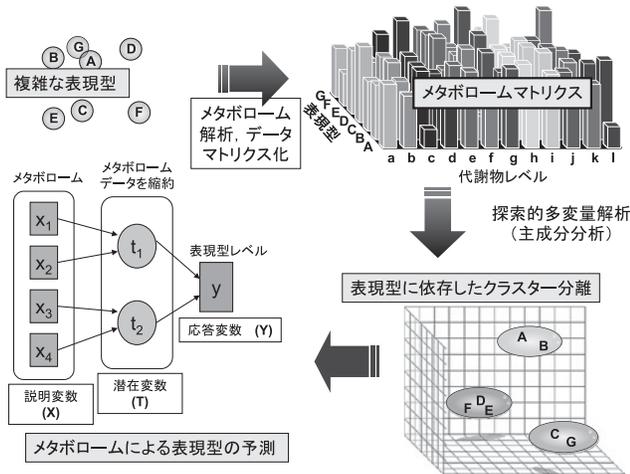


図2. メタボロミックフィンガープリンティングの概念

初期発生胚を経時的にサンプリングし、水溶性代謝物を抽出し、シリル化などの誘導体化の後、GC-MS分析に供した。得られた分析結果から代謝物テーブル行列を組織化し、主成分分析に供した。主成分スコアプロットから第1主成分が発生段階と強い相関を示していることがわかった。次に、メタボローム情報を説明変数、受精後時間を応答変数としてPLS (partial least square projection to latent structure) により回帰モデルを作成した。結果として、高い相関係数を有する予測モデルの構築に成功した(図3)。

同様の実験は他のモデル動物でも可能であり、これまで、線虫やショウジョウバエで同様の実験に成功している¹⁰⁾。本手法は、さらに発生段階に重要な役割を担うバイオマーカー探索への可能性を提示している。生体のダイナミックな状況をモニタリングできるという性能は、臨床検体(血液、尿など)をサンプルとして疾患の種類と病状レベルを推定することにもつながる。当該技術は疾患バイオマーカー探索や、疾患の早期診断システム開発への応用も期待できる。これまでに筆者らは、種々のがんの初期段階に特異的なメタボリックフィンガープリントの発見に成功しており、原理的には早期診断への応用が可能であることを示している¹¹⁻¹³⁾。

メタボロミクスを用いた酵母の寿命遺伝子の探索

メタボリックフィンガープリンティングの技術の応用範囲は広く、複数の遺伝子が関与する複雑な定量的表現型の解析にも応用可能である。我々は出芽酵母の分裂寿命を複数遺伝子関与の定量的な表現型と見做し、メタボリックフィンガープリンティングによる寿命関連遺伝子探索を試みた。まず、長寿命変異株と短寿命変異株を通常寿命株とを完全培地でそれぞれ培養し対数増殖期に

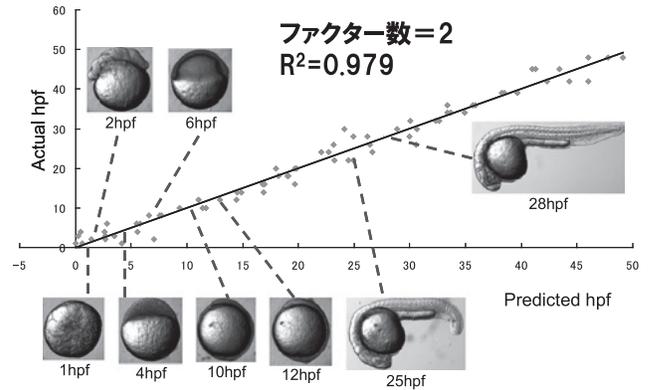


図3. メタボリックフィンガープリンティングによるゼブラフィッシュの発生ステージの予測

におけるメタボロームを観測して得られたメタボローム行列を説明変数として分裂寿命を応答変数とするOPLS (orthogonal projection to latent structure) 回帰解析を実施することで、メタボローム情報を予測変数として寿命を予測することに成功した。さらに、前述のメタボローム行列を主成分分析に供することにより、得られた主成分ベクトル負荷量の情報から寿命の長短に相関のある代謝物情報を得た。たとえば長寿命株はプロリン、グルタミン、ヒスチジンなどのグルタミン酸グループのアミノ酸のプールサイズの顕著な増加が認められた。そこで、それらのアミノ酸のプールサイズを増やすために、グルタミン酸分解を正に制御する転写調節因子であるUga3をノックアウトしたところ、寿命がコントロールと比較して75%伸びた。結果としてUga3が寿命延長遺伝子であることが確認された。同様に、長寿命株では、アスパラギン酸やメチオニンの蓄積量が大きい傾向がメタボローム解析からわかったので、二つのアミノ酸のプールサイズを上昇させるために、S03のアウトフラックスを正に制御する転写調節因子であるFzf1をノックアウトした。結果としてFzf1ノックアウト株は寿命がコントロールと比較して66%向上した。同様の戦術で、種々なレベルの寿命延長株、寿命短縮株を戦略的に作製することに成功した¹⁴⁾。当該研究の概念を図4に記す。

寿命は完全な定量的表現型であるが、さまざまな定量的レベルで変異株をそろえることは古典的な遺伝学的手法ではきわめて難しい。メタボロームを精密表現型とみなした方法を用いることにより、従来困難だった定量的表現型のラインアップが容易となった。最近、筆者は出芽酵母の変異株ライブラリーを用いて転写調節因子関連変異株と推定される一群の変異株をメタボローム解析し、ミトコンドリアのretro grade pathwayに関わる遺伝子を特定することに成功した^{15,16)}。これらの成功体験を

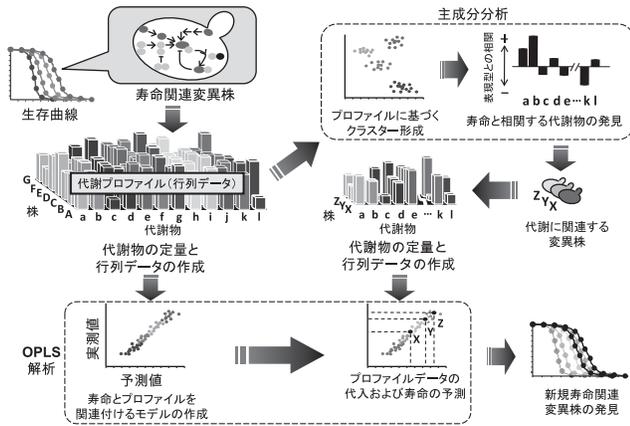


図4. メタボロミクスを用いた半合理的戦略による寿命関連遺伝子の探索

拡大解釈すれば、メタボロームにより複数遺伝子が関与する複雑な定量的表現型が表現可能である。また、複数有用形質の同時向上戦略においてメタボロームが有益なナビゲータになることを示唆している。

食品の二次機能の定量的解析への応用

食品は多成分からなる多機能コモディティであり、どの成分がどの機能に関与しているの完全解明は容易ではない。特に食品の二次機能（おいしさ）については機能性に基づく解析が困難である。食品の三次機能（生理活性機能）にしても、活性本体とおぼしき生理活性物質を標的とする要素還元研究では食品の機能を説明できない場合が多い。一方、我が国を取り巻く最近の状況から日本食は高性能ブランドを伴った輸出コモディティとして外貨獲得の手段として強く期待されつつある。そのためには、日本の食品品質管理システムの秀逸性を担保するとともに、管理システムの堅牢性、拡張性、経済性を向上することが必要となる。しかしながら、日本における食品品質管理は食品企業が個別のスペックを独自ノウハウで運用しているため、一般性に欠ける。また、二次機能（嗜好性、おいしさ）の定量化の標準化技術は普及が遅れている。メタボロミクス技術は食品二次機能解析にきわめて有用であると考えられる。食品成分と食品二次機能の関係は、前述のメタボロームと定量的表現型の関係に似ている。すなわち、メタボロミクス技術を用いて、食品成分を分析し得られたメタボロームデータを説明変数として、食品二次機能の定量的レベルを応答変数とした回帰予測モデルは原理的には構築可能である。我々は日本の代表的な飲料である緑茶を研究材料として緑茶に含まれる成分を種々の分析手法、すなわち、GC-MS, LC-MS, FT-NMR, FT-IRなどを用いて観測して得られたメタボロームを説明変数として、緑茶の鑑評会

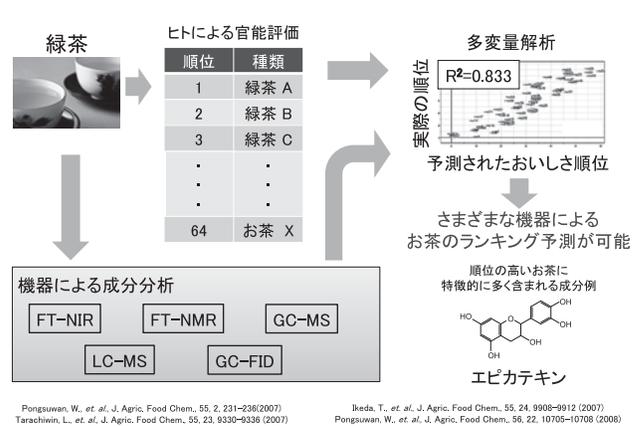


図5. メタボリックフィンガープリンティング手法を用いた緑茶の品質予測

における順位を応答変数としてPLS法により緑茶の製品品質予測モデルの構築に成功してきた¹⁷⁻²¹⁾ (図5)。

結果として、前述のいずれの測定機器を用いた場合も、説明変数の変数抽出を丁寧に実施するとともに、オーバーフィッティングを回避するための工夫をこらすことにより、満足いくレベルでの官能品質予測モデルが構築可能であることが示された。

種々の食品品質解析への応用

本手法の適用範囲は広く、筆者らのグループではこれまでに、種々の食品、たとえば、チーズ、しょうゆ、日本酒などの食品の二次機能の定量的解析に成功している (図6)。

日本においてチーズはプロセスチーズとして食されることが多い。プロセスチーズはチェダーチーズやゴータチーズなどのナチュラルチーズを原材料として、食塩存在下、乳酸菌などによる醗酵を伴う熟成プロセスを経て製造される。ナチュラルチーズは季節変動に伴い、大きく風味や価格が変動する。ゆえに、チーズ製造企業は世界中から適当なナチュラルチーズを調達し、適切な製造プロセスで同一ブランド、同一風味という困難な目標にチャレンジしている。原料品質が変動するため、製造プロセス、特に熟成プロセスが重要となるが、その工程管理は熟練者の経験と勘に依存するところが多い。筆者らは、GC-MSを用いてチーズの含有成分を分析し、得られたメタボロームを説明変数として、チーズ製造管理に重要な二次機能であるリッチフレーバーやサワーフレーバーなどを応答変数として予測モデルを構築した。モデルの情報からリッチフレーバーを追跡するために有用な少数のバイオマーカーの発見に成功した^{22,23)}。また、GC-MSのかわりにGC-FID (flame ionization detector) を用いても同様の性能のモデル構築が可能であることを



メタボロミクスはさまざまな食品や生薬に応用可能

図6. 食品・生薬の官能評価へのメタボロミクス技術の応用

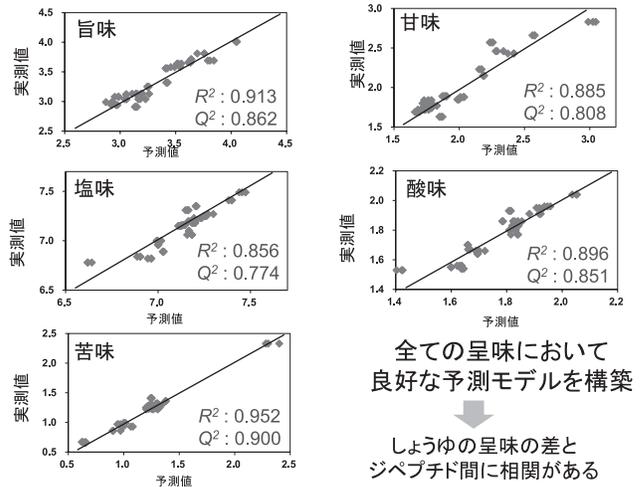


図7. OPLS回帰による呈味の差と成分の相関性解析

示した²⁴⁾。今後、製造現場での品質管理に応用されることが期待される。

しょうゆの風味は食塩とグルタミン酸ナトリウム、それと火入れによって生じるメイラード反応生成物の組合せで大まかなところは説明できる。しかしながら、原料や製造方法に基づく微妙な差異については、何が起因するかはわかっていない。筆者は観測範囲をジペプチドに広げてメタボローム解析を行ったところ、しょうゆに含まれるジペプチドが旨味の差異に大きく相関することを発見した²⁵⁻²⁷⁾ (図7)。今後、精密な製造工程管理への貢献が期待できる。日本酒は糖化と醗酵を並行して行う複雑なプロセスで製造される。結果として種々の風味を有する日本酒が製造され国内外に流通している。筆者らは、日本酒に含まれる水溶性成分と揮発性成分とをGC-MSで分析し得られたメタボローム情報を予測変数として日本酒の官能評価(QDA)を予測することに成功しており、今後の発展が期待できる²⁸⁾。メタボリックフィンガープリンティングの手法は、産地判別、品種判別などにも応用可能であり、種々の偽装に対する抑止力としての効果が期待できる。インドネシアではコーヒー果実を好んで食するジャコウネコの排泄物から回収したコーヒー豆を洗ってローストしたジャコウネココーヒー (Kopi Luwak) が生産されており、世界中のコーヒー愛好家が世界でもっとも高価なコーヒーとしてその価値を認めている。ところが、偽装品が多く流通しており問題となっている。筆者はインドネシア珈琲カカオ研究所との共同研究を実施し、メタボロミクス技術で偽装判別技術を開発した²⁹⁻³¹⁾。偽装抑止に貢献できると期待している。

生薬の品質解析への応用

日本国内では、生薬は主として漢方方剤のエキス製剤として保険適用され、処方されている。漢方方剤は中国の古典に起源を有し、通常、複数の生薬の抽出物のカク

テルとして投薬される。しかしながら、生薬に含まれるどの成分が真の薬効成分であるかは大半の場合わかっておらず、その品質保証は、善意の生薬流通業者の長年の経験と勘に基づく官能的判別に依存している。官能試験者が熟練の域に達するには通常数十年が必要であり、今後の技術の伝承がきわめて重要であるが、熟練試験者は高齢であり後継者不足も相まって、将来に大きな不安を残している。筆者らは、婦人科系の慢性疾患によく処方されるが主たる薬効成分がよくわかっていないトウキ (*Angelica acutiloba*) を実験材料として、親水性代謝物に注目し、GC-MS、LC-MS、FT-NMRを観測手法として得たメタボローム行列を説明変数として、生薬流通業者の官能得点を予測することを試みた。結果としてPLSにより満足いく精度で品質を予測することに成功した³²⁻³⁵⁾。センキュウ (*Cnidium officinale*) も前述のトウキ同様、婦人科系不定愁訴に頻用される生薬であるが、その薬効成分は不明である。筆者はメタボローム解析の手法により、センキュウの官能品質の推定に成功するとともに、栽培品種、栽培地、収穫後処理なども判別可能であることを示した^{8,36)}。このようにメタボロミクスは生薬品質解析にきわめて有用であり、将来的には生薬流通の際にもメタボロミクスによる管理が行われることが期待される。

代謝変動の動的解析システムの考案

代謝の微細な差異を定量的に表現できるという特長を利用して、メタボロミクスをバイオプロダクションの効率向上に適用する試みが近年成功を得ている。微生物で有用物質生産を試みる場合、通常、有用物質発現のために複数の外来遺伝子を導入して形質転換することが一般的である。しかしながら当初の期待どおりの形質を得る

ことは一般的に困難であり、その多くが代謝のインバランスに起因すると言われている。メタボロミクスを用いることにより複数の不都合箇所の発見、菌株改良戦略立案への寄与が期待できる。そのためには、代謝変動の動的解析が必要になる場合がある。

前述のアプリケーションは、静的観測条件における代謝物の相対量を観測して得たスナップショットをメタボローム情報としている。適当な応答変数がある場合は、きわめて有効な戦術である。しかしながら、場合によっては代謝の動的情報が求められる場合がある。微生物醗酵制御のための確立された手法として代謝フラックス解析 (MFA) がある。MFAは微生物醗酵条件の最適化などにはきわめて有用な研究戦術であるが、その運用にはさまざまな制約が存在する。まず、正確な代謝マップ情報が必ず必要である。さらに少なくとも二種類以上の異なる標識パターンを有する部分標識化合物を標識基質として用意することが必要となる。さらに、細胞の定常状態が正確な解析には求められる。ゆえに、当該戦術を直接、非定常状態の高等生物系や疾患研究に適用することは一般にきわめて困難である。何より、MFAを用いる限り、新しい代謝経路に関わる情報を得ることは、よほどの僥倖に恵まれない限りほとんど期待できない。そこで我々は、簡便な半定量的代謝動的情報解析方法として安定同位体希釈に基づく同位体標識分布の経時変動を情報とした解析戦術を考案した。原理は単純である。基質となる代謝物がある時点で安定同位体標識化合物に交換し、その後の経時的にサンプリングしてGC-MS, LC-MS, CE-MSなどに供する。アイソトポマーは多くの場合、同一リテンションタイム付近に溶出するのでイオン化サプレッションの影響は軽減される。また、質量分析によって得られた同位体元素の分布の経時的変動情報から、半定量で代謝動態を推察することができる。筆者は本方法を metabolic turnover analysis (MTA) と呼ぶ。MTAは定常状態を必要とせず、標識基質にも制限はない。ゆえに、CO₂を基質とする植物体の解析に有用である。筆者らはタバコの葉における光合成暗反応の代謝変動を¹³C標識二酸化炭素を標識源とした本法により追跡することに成功している³⁷⁾。また、筆者らは、¹⁵N安定同位体を用いた窒素化合物の動的変動解析システムも開発している³⁸⁾。

また、筆者らは代謝ターンオーバー解析 (MTA) で得られたアイソトープの分配率の時間変動をベクトルとした主成分分析を行い、スコアプロットのトポロジーから代謝距離を推定することに成功している。また、当該原理をノンターゲット分析に広げ、重要未知代謝物関連情報解析への有用性を示している^{39,40)}。

おわりに

メタボロームを説明変数とした多変量解析により種々の生体情報が明らかになる。また、食品や生薬の品質解析にも本方法が有用であることは自明である。本論文では筆者の近年の研究成果を中心としてメタボロミクスの表現型解析への応用について解説した。実験条件や観測方法、解析方法を工夫することにより、現状でも相当役に立つことが証明できたと思う。メタボロミクスの分析には感度や定性性能から質量分析が用いられることが多い。しかしながら、網羅性を優先するために大量注入などの無茶をするために、質量分析計を最高状態に保つための技術とノウハウが必要となる。今後、メタボロミクスの発展は疑う余地がない。しかしながら、観測装置のさらなる発展に加えて、ユーザーフレンドリーな技術の開発は引き続き求められる。筆者には幸いながら定年退職まであと10年あまりが残されている。今後もメタボロミクスが一般的な技術になるべく努力邁進する所存である。

謝 辞

本稿の研究成果は、多くの方々のご指導、ご援助によって達成されたものである。小職が助教時代の教授であった小林昭雄先生 (現大阪大学名誉教授)、同僚だった梶山慎一郎先生 (現近畿大学教授)、岡澤敦司先生 (現大阪府立大学准教授) にまずは感謝したい。多くの共同研究者に支えられてきたが、なかでも、10年ほど前、メタボローム情報で酵母の寿命を予測するという荒唐無稽なアイデアに快く付き合っていた以来、酵母の研究をずっと一緒に行ってきた共同研究者である向由起夫先生 (現長浜バイオ大学准教授) には特別の感謝の意を示したい。また、奈良先端科学技術大学院大学の金谷重彦教授、国立遺伝学研究所の有田正規教授、大阪大学の松田史生准教授には、大変お世話になった。この場をお借りして謝意を示したい。本研究の実験のほとんどは小職が主宰する研究室のスタッフ、学生各位との共同研究である。支えていただいた各位に謹んで謝意を示したい。特に、筆者が研究室を立ち上げる当時から二人三脚で頑張ってきた馬場健史先生 (現九州大学教授)、小野比佐好先生 (元大阪大学助教)、津川裕司先生 (現理化学研究所研究員)、中山泰宗先生 (現崇城大学准教授)、和泉自泰先生 (現九州大学准教授) には特別の謝意を示したい。

文 献

- 1) Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *BMC Bioinformatics*, **12**, 131 (2011).
- 2) Tsugawa, H., Bamba, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 292–298 (2011).
- 3) Kawase, N., Tsugawa, H., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 248–255 (2013).
- 4) Tsugawa, H., Arita, M., Kanazawa, M., Ogiwara, A.,

- Bamba, T., and Fukusaki, E.: *Anal. Chem.*, **85**, 5191–5199 (2013).
- 5) Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Sugitate, K., Sakui, N., Nishiumi, S., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 122–128 (2014).
 - 6) Matsuda, F., Tsugawa, H., and Fukusaki, E.: *Anal. Chem.*, **85**, 8291–8297 (2013).
 - 7) Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 9–16 (2013).
 - 8) Putri, S. P., Nakayama, Y., Matsuda, F., Uchikata, T., Kobayashi, S., Matsubara, A., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 579–589 (2013).
 - 9) Hayashi, S., Akiyama, S., Tamaru, Y., Takeda, Y., Fujiwara, T., Inoue, K., Kobayashi, A., Maegawa, S., and Fukusaki, E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 268–272 (2009).
 - 10) An, P. N. T., Yamaguchi, M., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *PLoS One*, **9**, e99519 (2014).
 - 11) Ikeda, A., Nishiumi, S., Shinohara, M., Yoshie, T., Hatano, N., Okuno, T., Bamba, T., Fukusaki, E., Takenawa, T., Azuma, T., and others: *Biomed. Chromatogr.*, **26**, 548–558 (2012).
 - 12) Hori, S., Nishiumi, S., Kobayashi, K., Shinohara, M., Hatakeyama, Y., Kotani, Y., Hatano, N., Maniwa, Y., Nishio, W., Bamba, T., Fukusaki, E., Azuma, T., Takenawa, T., Nishimura, Y., and Yoshida, M.: *Lung Cancer*, **74**, 284–292 (2011).
 - 13) Nishiumi, S., Shinohara, M., Ikeda, A., Yoshie, T., Hatano, N., Kakuyama, S., Mizuno, S., Sanuki, T., Kutsumi, H., Fukusaki, E., and others: *Metabolomics*, **6**, 518–528 (2010).
 - 14) Yoshida, R., Tamura, T., Takaoka, C., Harada, K., Kobayashi, A., Mukai, Y., and Fukusaki, E.: *Aging Cell*, **9**, 616–625 (2010).
 - 15) Hashim, Z., Mukai, Y., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *Metabolites*, **4**, 580–598 (2014).
 - 16) Hashim, Z., Teoh, S. T., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **966**, 83–92 (2014).
 - 17) Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 744–750 (2008).
 - 18) Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., and Kobayashi, A.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231–236 (2007).
 - 19) Tarachiwin, L., Ute, K., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9330–9336 (2007).
 - 20) Ikeda, T., Kanaya, S., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9908–9912 (2007).
 - 21) Pongsuwan, W., Bamba, T., Harada, K., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10705–10708 (2008).
 - 22) Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 751–758 (2012).
 - 23) Ochi, H., Sakai, Y., Koishihara, H., Abe, F., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Dairy Sci.*, **96**, 7427–7441 (2013).
 - 24) Ochi, H., Bamba, T., Naito, H., Iwatsuki, K., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 506–511 (2012).
 - 25) Shiga, K., Yamamoto, S., Nakajima, A., Kodama, Y., Imamura, M., Sato, T., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 7317–7322 (2014).
 - 26) Yamamoto, S., Shiga, K., Kodama, Y., Imamura, M., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 56–63 (2014).
 - 27) Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 170–175 (2012).
 - 28) Mimura, N., Isogai, A., Iwashita, K., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 406–414 (2014).
 - 29) Jumhawan, U., Putri, S. P., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, *in press* (2016).
 - 30) Jumhawan, U., Putri, S. P., Marwani, E., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 7994–8001 (2013).
 - 31) Jumhawan, U., Putri, S. P., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 555–561 (2015).
 - 32) Tianniam, S., Tarachiwin, L., Bamba, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 655–659 (2008).
 - 33) Tianniam, S., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Sep. Sci.*, **32**, 2233–2244 (2009).
 - 34) Tarachiwin, L., Katoh, A., Ute, K., and Fukusaki, E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 42–48 (2008).
 - 35) Tianniam, S., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 89–93 (2010).
 - 36) Kobayashi, S., Nagasawa, S., Yamamoto, Y., Donghyo, K., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 86–91 (2012).
 - 37) Hasunuma, T., Harada, K., Miyazawa, S-I., Kondo, A., Fukusaki, E., and Miyake, C.: *J. Exp. Bot.*, **61**, 1041–1051 (2010).
 - 38) Harada, K., Fukusaki, E., Bamba, T., Sato, F., and Kobayashi, A.: *Biotechnol. Prog.*, **22**, 1003–1011 (2006).
 - 39) Nakayama, Y., Putri, S. P., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 350–355 (2014).
 - 40) Dempo, Y., Ohta, E., Nakayama, Y., Bamba, T., and Fukusaki, E.: *Metabolites*, **4**, 499–516 (2014).