

メタボロミクス研究を支援する 代謝パスウェイ解析システムCOMPATHの開発

大日本住友製薬(株) ゲノム科学研究所 中川 博之
村山 一久
研究管理部 樋口 千洋
研究企画推進部 木村 徹

はじめに

メタボロミクス^{1),2)}はゲノミクスやプロテオミクスと同じくオミクスの一分野であり、内因性の低分子化合物(以下、代謝物)の網羅的な変動を研究対象としている。生体内代謝物は、遺伝子やタンパク質に比べて種類が少なく(Fig. 1)、構造に関する種差が無く、簡単かつ経時的に採取可能な血液や尿等の体液を用いて測定できるという利点がある。さらに、遺伝子やタンパク質と比べて最終の表現型により近いため、病態あるいは薬効や毒性と関連した分子の発見が期待され、バイオマーカー発見の有用な手段であると考えられている。このような背景から、大日本住友製薬(株)では住友化学(株)と共同でメタボロミクス解析技術を構築している³⁾。メタボロミクス解析により多数の代謝物の変動が検出できるようになった一方で、その解釈は容易ではなかった。検出された代謝物と関係が深い代謝経路(パスウェイ⁴⁾)を見出し、その上で代謝物の変動から病態や薬効を考察する“パスウェイ解析”が必要であった。しかしながら、メタボロミクスは最近発展した研究

分野であることから、代謝物に対してパスウェイ解析が可能なシステムは限られていた。しかも変動代謝物の個数に基づいて統計的に計算が行われており、生体内の現象を反映している代謝物の変動の大きさは考慮されていなかった⁵⁾。そこで著者らは、代謝物の変動の大きさを加味してパスウェイを選抜する新規な方法を考案し⁶⁾、これを具現化したシステム“COMPATH”を開発した。COMPATHにより、代謝物変動の客観的な考察が容易になるため、化合物の作用メカニズム解析あるいはバイオマーカー探索などに有効であると考えられる。今回、その概要を紹介する。

パスウェイ解析の概要と問題点

メタボロミクス解析により一度に数百種類の代謝物の変動が検出されるが、従来のパスウェイ解析では、これらの変動代謝物に関わるパスウェイがまず選抜される。次に選抜されたパスウェイにおいて、各代謝物の経時的あるいはサンプル処理の用量依存的な変動の違いが比較される。これらの検討から、生体内で起きている現象について推察が行われる。従来法では、変動代謝物が特定のパスウェイ上に集まる確率が、代謝物の個数に基づいて計算されており(Fig. 2)、代謝物の変動の大きさは考慮されていなかった。そのため物的に検出容易な代謝物が多く存在するパスウェイが優先的に選抜され易くなっていた。しかし、代謝反応は代謝物の存在量と変化量に左右される平衡反応である。従って、変動の大きさを無視して選抜されたパスウェイは、実際に生体内で起きている現象と直接は無関係である可能性が懸念される。そこで我々は、周辺代謝物の検出が困難であっても、変動の大きな代謝物を含むパスウェイが選抜されるように、代謝物の変動の大きさに基づいて“パスウェイの変動”を計算する方法を考案し、この問題を解決した。

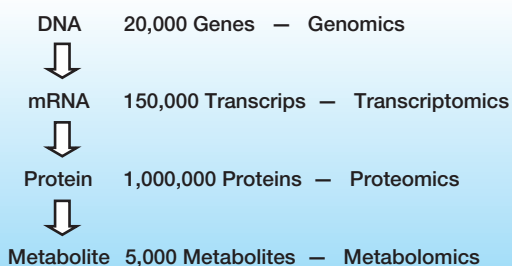


Fig. 1 Central dogma of biological molecules. Metabolomics is a kind of omics technologies that monitors the global changes of endogenous metabolites relating to biological events.

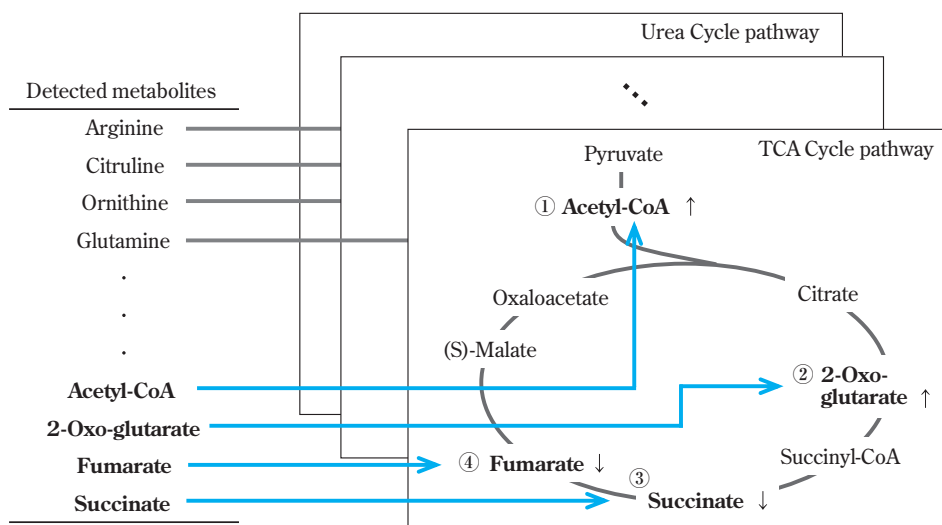


Fig. 2 Metabolic pathway analysis scheme. Step 1: the number of up- or down-regulated metabolites is counted on each pathway. Four metabolites are found on the TCA cycle pathway. Step 2: p-value of the pathway is calculated as follows: $(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!/(n!a!b!c!d!)$, where a =number of detected metabolites on the pathway, b =number of other metabolites on the pathway, c =number of detected metabolites excluding those metabolites on the pathway, and d =number of all metabolites on all pathways excluding those in the list. In this figure, $a=4$ and $b=5$.

代謝物とパスウェイの変動

パスウェイの変動は代謝物群の変動を総合したものと考えられる。しかし、代謝物の変動を眺めるだけではパスウェイとしての変動を判断することは難しく、客観的な指標が必要となる。そこで、パスウェイの変動をそのエントロピーの変化と捉えて定量化を試みた。情報理論では、情報量という名前でエントロピーが定義されている⁷⁾。単位はビット (bit) である。

$$\text{情報量} : I = -\sum \log_2 p(x) \quad (1)$$

ここで $p(x)$ は事象 x の生起確率を表す。代謝物の場合、 $p(x)$ を代謝物 x の変動確率とみなし、パスウェイ上の代謝物群の変動確率を与えれば、上式によりパスウェイの変動を表す情報量が求まる。しかし、代謝物変動の事前確率は不明であることから、変動結果から推定することにした。ここで次の二つの仮定を置いた。

仮定1: 代謝物の変動確率は変動の大きさに反比例する

仮定2: ある代謝物の実験内の変動確率の合計は1

以上の仮定に基づき、代謝物の変動の大きさの逆数に比例し、実験内の合計が1となる値を代謝物の変動確率として定義した。代謝物 x のある条件での変動を V_i 、代謝物 x の全ての条件での変動の大きさの和を S とすると、 x の変動確率は次式で表せる。

$$p(x) = V_i / \sum (S/V_i) \quad (2)$$

ここで V_i は代謝物 x のある条件間での変動量であり、代謝物 x の条件1での存在量を m_1 、条件2での存在量を m_2 とすると、 $V_i = |m_2 - m_1|$ で求まる。Table 1 および Table 2 は、二つの代謝物AおよびBが、対照に対して異なる三条件で変動した時の変動の大きさから求めた確率 (Probability) と情報量 (Entropy) の例である。この場合、情報量の合計が大きい代謝物Aの変動の方が大きい。変動の大きさの合計が等しくても、条件間での変動の差異が大きい方がより大きな情報量となるため、研究者の直感とも合致する。パスウェイ毎の情報量を比較することで、大きな変動のあったパスウェイを見出すことが可能となった。

Table 1 Entropy of Metabolite A changed by 3 different conditions.

Condition	Change	Probability	Entropy/bits
1	10	0.83	0.28
2	90	0.09	3.45
3	100	0.08	3.60
Total	200	1.00	7.32

Change: Quantitative change of a metabolite between Control (not shown) and Condition 1 or 2 or 3.

Table 2 Entropy of Metabolite B changed by 3 different conditions

Condition	Change	Probability	Entropy/bits
1	40	0.48	1.05
2	60	0.32	1.63
3	100	0.19	2.37
Total	200	1.00	5.05

Change: Quantitative change of a metabolite between Control (not shown) and Condition 1 or 2 or 3.

代謝パスウェイ解析システムCOMPATHの特徴

一般的なパスウェイ解析で採用されている手法に加え、前述のように代謝物の変動の大きさに基づく解析が可能システムCOMPATHを開発した。Fig. 3はCOMPATHによる解析結果の概略図である。例えば化合物の投与によって変動した代謝物群のデータをCOMPATHで解析すると、化合物によって大きく変動するパスウェイ、即ち化合物の作用点の有るパスウェイを見つけられる可能性がある。この他、COMPATHはパスウェイの詳細と代謝物の変動を画面に描く機能を有する。代謝物の目印の色と大きさが変わることによって変動の概要を把握でき、折線グラフおよび棒グラフで経時的あるいは用量依存的な変動を知ることができる。さらに、代謝物の目印にマウスを近づけるとその化学構造が表示され、あるパスウェイに繋がる別のパスウェイの名称をクリックすると、そのパスウェイの詳細と代謝物の変動が描かれた画面に瞬時に切り替わっている。このように簡単な操作により、変動のあったパスウェイに着目し、代謝物の変動を参照しな

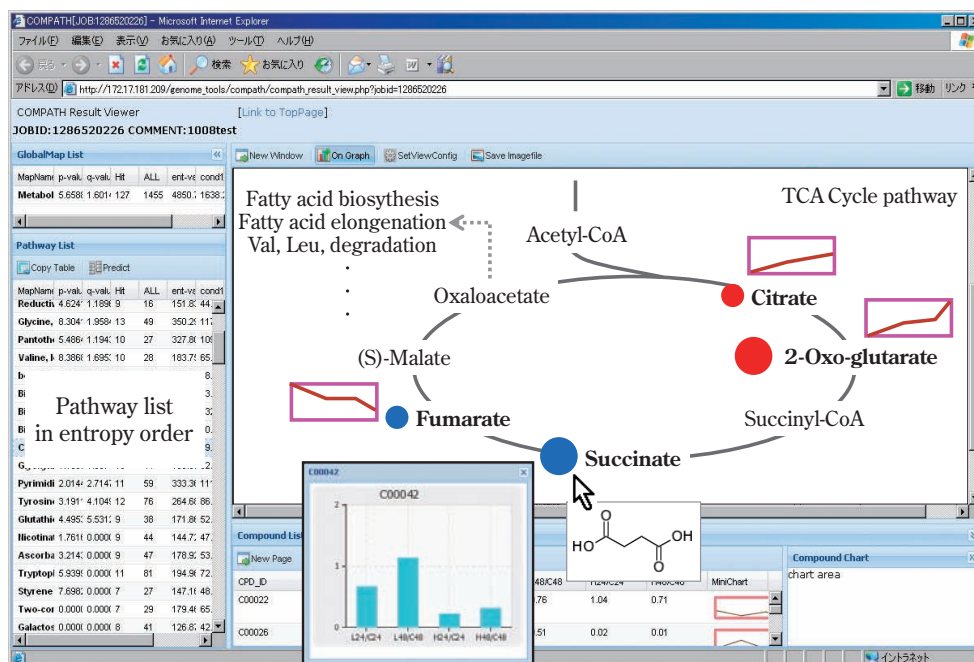


Fig. 3 A typical image of the analysis using COMPATH system. Closed circles indicate up-regulated (red) or down-regulated (blue) metabolites. Line graphs and bar chart show the profiles for quantitative change of metabolites.

がら考察することが可能である。さらにCOMPATHでは代謝物だけでなく、遺伝子やタンパク質の変動データをも解析できるように拡張されている。

おわりに

代謝物の変動の大きさから変動したパスウェイを客観的に選抜する方法を考案し、これを具現化した代謝パスウェイ解析システムCOMPATHを開発した。COMPATHによって、これまで困難であった代謝物変動データの効率的解析と客観的考察が容易になった。さらにCOMPATHは、代謝物の変動をパスウェイ上に自動的に描く機能を有している他、パスウェイ間の関係も容易に把握ができる仕組みになっている。さらに、本システムはメタボロミクスだけでなく、各種オミックスデータを統合的に解析できることから、医農薬化合物の作用メカニズム解析あるいはバイオマーカー探索に威力を発揮するものと期待している。

謝辞

COMPATHシステムの開発に当たり、三井情報(株)総合研究所システムアーキテクト牧口大旭氏に技術支援を頂いた。ここに感謝する。

引用文献

- 1) J.K. Nicholson, J.C. Lindon and E. Holmes, *Xenobiotica*, **29** (11), 1181 (1999).
- 2) D.G. Robertson, M.D.Reily, R.E. Sigler, D.F. Wells, D.A. Paterson and T.K. Braden, *Toxicol. Sci.*, **57**, 326 (2000).
- 3) 十亀 祥久, 坂東 清子, 村山 一久, 味方 和樹, 住友化学, **2010-II**, 71 (2010).
- 4) M. Kanehisa, S. Goto, M. Furumichi, M. Tanabe and M. Hirakawa, *Nucleic Acids Res.*, **38**, D355 (2009).
- 5) Alex Frolkis, Craig Knox, Emilia Lim, Timothy Jewison, Vivian Law, David D. Hau, Phillip Liu, Bijaya Gautam, Son Ly, An Chi Guo, Jianguo Xia, Yongjie Liang, Savita Shrivastava and David S. Wishart, *Nucleic Acids Res.*, **38**, D480 (2010).
- 6) 大日本住友製薬(株)・住友化学(株), 特願2009-255920.
- 7) C. E. Shannon, *The Bell System Technical Journal*, **27**, 379 (1948).