

## NMR メタボミクスの医療薬学への応用 — タウリンの作用について —

松山大学薬学部薬品分析化学研究室 明樂 一己

### 【はじめに】

メタボミクス（またはメタボロミクス）とは、生体試料の中に含まれる無数の代謝産物を一斉かつ網羅的に測定して、遺伝因子や環境因子による生体の変化を代謝の面から捉える研究方法である<sup>1)</sup>。この方法は、病態解析や診断、あるいは薬効・毒性評価への応用が期待される。また、いわゆる“バイオマーカー”を発見するために適した方法である。さらに、代謝変化のメカニズムを検討することによって、疾患の原因究明や予防法、治療法の開発につながる可能性もある。

メタボミクスがこれまでの研究方法と異なる点は、最初から測定対象物質を決めているわけではなく、代謝変化の全体像（代謝物プロファイル）を客観的に評価するところにある。したがって、予想外の代謝物や現象を発見できる可能性があり、そこから新たな研究課題が生まれることもある。似たような網羅的研究法として、ゲノミクスやプロテオミクスが知られているが、メタボミクスは代謝物の面からアプローチするため、遺伝因子だけでなく、食事や服用薬物などの外的因子や環境因子による影響を含めて評価できる点に特徴がある。

測定には主に、質量分析を基盤にした方法と核磁気共鳴（NMR）法が用いられるが、NMR法はクロマトグラフィーのような前処理を施すことなく体液をまるごと分析できることから、網羅的な測定に適した分析法といえる。また、生体情報を得るためには、一般に血液と尿が有用であるが、これらのうち尿は医療において必ずしも有効に利用されているとは言えない。そこで、当研究室では、尿のNMRメタボミクスの基盤技術の開発と医療薬学への応用に取り組んでいる。本稿では、高血圧モデルにおけるタウリンの作用に関する研究例<sup>2)</sup>を解説を交えながら紹介する。

### 【研究内容】

タウリン（ $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ）は含硫アミノ酸の一種であり、哺乳類の組織中に多量に存在している。本化合物は生体内でシステインの酸化によって合成されるが、日常的に食品（魚介類）から摂取され、健康飲料の成分としても良く知られている。タウリンは胆汁中のタウロコール酸の前駆体として重要であるが、一方では、日本薬局方収載の医薬品として、心機能や肝機能の改善のために使われている。他にも、種々の有益な生理作用を示すことが報告されているが、なかでも降圧作用は特徴的な生理作用の1つである。タウリンの摂取量を増やすと、高血圧モデル動物だけでなく高血圧患者においても、血圧が低下することが示されている<sup>3)</sup>。したがって、タウリンは高血圧をコントロールするためのサプリメントや医薬品として有望である。しかしながら、その作用機序は必ずしも明らかではない。そこで、高血圧モデルとして高血圧自然発症ラット（SHR）を用い、タウリン長期投与による降圧効果と尿中の代謝変化の関係について調べることにした。

### < 血圧変化 >

SHRは遺伝因子に基づいて高血圧を自然発症することから、本態性高血圧症の良いモデル動物であり、降圧薬の効果を調べる場合にも一般的に用いられている。SHRは生後5週齢頃から正常血圧対照ラットと比べて有意に血圧が上昇し始め、10週齢を超えると200 mmHg程度にまで血圧が上昇する。図1は、このラットに4週齢から飲水として3%タウリン水溶液を与えて飼育したときの血圧変化である（対照群、投与群ともに6匹、tail-cuff法で測定）。タウリンの投与量は週齢によって異なるが0.6～1.3 g/dayであった。図1から分かるように、8週齢以降において特に収縮期血圧を穏やかに低下させる効果がみられた。この結果はSHRに関する従来の実験と同様であった。血圧測定時に24時間尿を採取し、以下の測定と解析を行った。

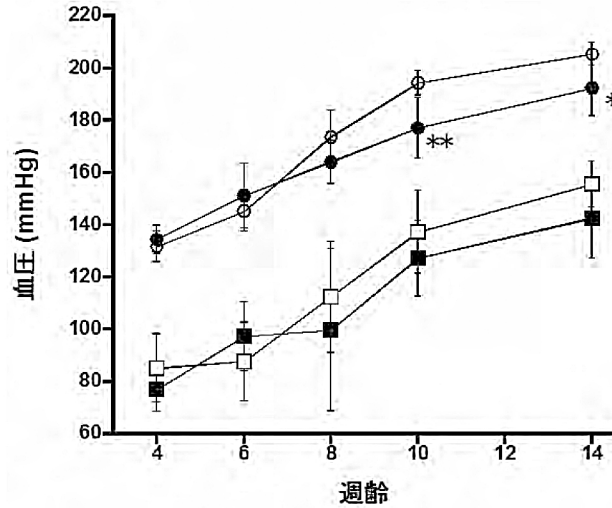


図 1. タウリンの血圧への影響

○ 収縮期血圧 (対照群) ● 収縮期血圧 (タウリン投与群)  
 □ 拡張期血圧 (対照群) ■ 拡張期血圧 (タウリン投与群)  
 \*P<0.05 \*\*P<0.01 vs. 対照群

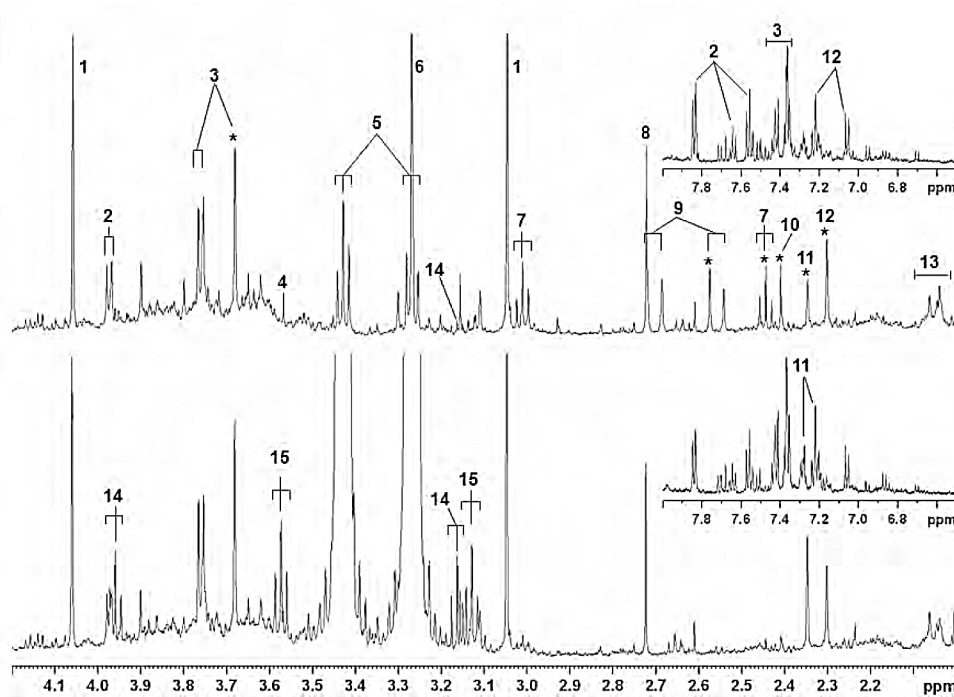


図 2. 10 週齢 SHR の尿の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (上図: 対照群, 下図: タウリン投与群)

- 1, クレアチニン; 2, 馬尿酸; 3, フェニルアセチルグリシン (PAG); 4, グリシン; 5, タウリン;  
 6, トリメチルアミン N-オキシド; 7, α-ケトグルタル酸 (KG); 8, ジメチルアミン;  
 9, クエン酸 (CA); 10, コハク酸 (SA); 11, p-クレゾールサルフェート (PCS);  
 12, p-クレゾールグルクロニド (PCG); 13, 糖タンパクの N-アセチル基;  
 14; イセチオン酸 (ISA); 15, タウリンの <sup>13</sup>C サテライトシグナル

\* 定量的評価 (有意差検定) に用いたシグナル

< <sup>1</sup>H NMR スペクトル >

尿 0.35 mL にリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 0.35 mL および少量の重水を混和し測定試料とした。この試料を外径 5 mm の試料管に入れて <sup>1</sup>H NMR (500 MHz) を数分間測定した。この場合、水に起因するシグナルを抑制する条件を用いた。図 2 は、10 週齢 (タウリン投与開始 6 週間後) における尿の <sup>1</sup>H NMR スペクトルである (高磁場領域のみ)。タウリン投与群では、タウリンの巨大なシグナル (3.2 ~ 3.5 ppm) やその <sup>13</sup>C サテライトシグナル (3.1, 3.6 ppm) がみられたが周辺の領域の解析に悪影響を及ぼすほどではなかった。また、3.2, 4.0 ppm 付近の顕著なシグナルは、標品との比較からタウリンの代謝物であるイセチオン酸 (ISA) に起因することが分かった。また、この同定実験を通じて対照群でも ISA が微量存在することが示された。一方、10 週齢と 14 週齢の全例においてクエン酸 (CA) の特徴的なシグナル (2.5 ~ 2.7 ppm) が消失していた。CA は尿中に比較的多量に排泄される代表的有機アニオンであることから、これは極めて異常な結果であった。その他のシグナルについては、対照群との違いを目視で確認することは困難であった。メタボノミクスでは、代謝物プロファイルを客観的に評価するために多変量解析が一般的に用いられている。本研究では、多変量解析のうちメタボノミクスにおいて最もよく用いられる主成分分析 (principal component analysis) を実施した。

< 多変量解析 >

まず、スペクトルを小刻み (0.04 ppm ごと) に分画し、各分画の積分値 (面積) を求めた。また、尿の濃縮度を補正するために、求めた積分値をクレアチニンシグナル (3.04 ppm) の積分値で除したものを変数とした。詳細は省くが、解析対象にできない水、尿素およびタウリンのシグナルとその周辺は除外し、1 枚のスペクトルあたり 163 個の変数を得た。こうしてスペクトルの枚数分の変数セットが得られたので、これらについて、市販のソフトウェアを用いて週齢ごとに主成分分析を行い、新たな合成変数を得た。この合成変数のことを主成分 (principal component) と呼び、情報量 (分散) の多い方から順に主成分 1、主成分 2、主成分 3・・・などと表記する。本実験の場合、いずれの週齢においても、主成分 1 と 2 で元の情報の大半を保持していたので、各スペクトルをわずか 2 個の主成分の値 (主成分スコア) で表わすことができた。図 3 は、10 週齢のデータ解析において得た主成分 1 と主成分 2 のスコアを二次元上にプロットしたものである。各点は各個体から得た尿のスペクトルを意味しており、その位置はスペクトルのパターン (代謝物プロファイル) を表している。したがって、近くに位置するスペクトルは代謝物プロファイルが類似しており、離れているほど異なることを意味する。この図から、タウリン投与群は対照群とは明らかに異なるグループを形成しており、両者には代謝の明確な違いがあることが示された。なお、群間の識別が主成分 1 によってなされたことに注目しておいてほしい。同様の識別は、投与開始後のいずれの週齢でもみられた。このように、主成分分析の特徴は、多変量をごく少数 (大抵は 2 ~ 3 個) の主成分に置き換えて、解析結果を視覚化できるところにある。

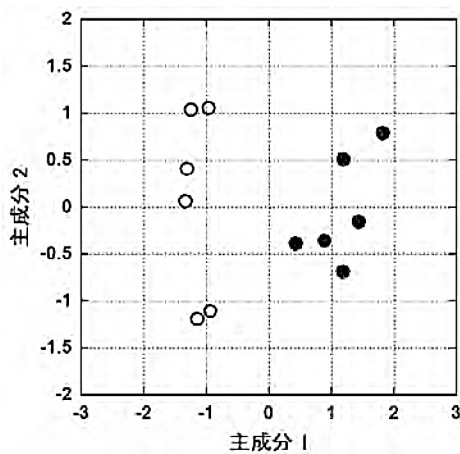


図 3. 主成分スコアプロット (10 週齢)  
○対照群 ●タウリン投与群

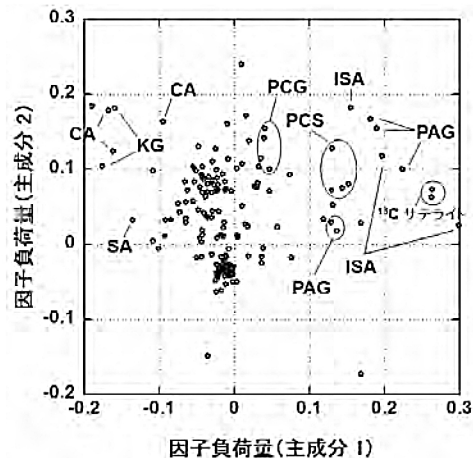


図 4. 因子負荷量プロット (10 週齢)  
略号；図 2 参照

さらに、主成分分析からは、群間の識別に寄与している主な代謝物を特定することができる。図4に、主成分分析で得られた因子負荷量プロットを示した。因子負荷量 (loading) とは、主成分スコアと元の変数との相関を表す数値である。個々の点は、163種類の元の変数である。この場合、横軸 (主成分1スコアと元の変数の相関) のみに注目してほしい。図3から分かるように投与群の主成分1スコアは大きいので、主成分1スコアと正の相関がある変数 (図4の右側の変数) は、投与群において大きい値を示し、負の相関がある変数は投与群において小さい値を示す。相関 (因子負荷量の絶対値) が大きい変数ほど、対照群と投与群の間での差が大きく、識別への寄与も大きい。そこで、スペクトルに立ち戻って、正または負の相関が大きい変数 (分画) に対応する代謝物を特定すれば、群間の識別に寄与する (タウリン投与で変化した) 主な代謝物を選び出すことができる。これらの代謝物はタウリンの生理作用に関係する代謝物であると言える。また、変数の因子負荷量の符号に基づいて、尿中排泄量の増減が分かる。本研究では、このようなプロセスを経て、種々の代謝変化を見出すことができたが、そのうち代表的なものを以下に示す。なお、代謝変化については、シグナル強度の有意差検定も行って確認した。

### <代謝変化>

#### ① TCA 回路中間体の排泄量の低下

タウリン投与群では8週齢以降において、クエン酸 (CA) だけでなく、 $\alpha$ -ケトグルタル酸 (KG) とコハク酸 (SA) の尿中排泄量も、血圧低下とともに顕著に減少した。これら中間代謝物の排泄低下は、おそらく多量のタウリン ( $pK_a=9$ ) の投与により代謝性アシドーシスが惹起された結果であると考えられる。事実、8週齢以降では、投与群の尿の pH が有意に低下していた。代謝性アシドーシスでは、これらの代謝物の腎尿細管再吸収が亢進することにより、尿中排泄が低下する。その詳細な機序については文献を参照されたい<sup>4,5)</sup>。

#### ② 腸内細菌関連代謝物の排泄量の増加

タウリン投与群において8週齢以降、フェニルアセチルグリシン (PAG)、*p*-クレゾールサルフェート (PCS) および *p*-クレゾールグルクロニド (PCG) の尿中排泄量が増加した。特に前二者の増加は顕著であった。PAG はフェニルアラニンが、PCS と PCG はチロシンが腸内細菌によって代謝され、宿主側に吸収された後、抱合反応を受けて生成したものである。したがって、これらの尿中排泄量が増加したことは、タウリンがある種の腸内細菌の増殖や活性化に関与したことを示唆している。

### 【おわりに】

本稿では、NMR メタボミクスの概要を解説しながら、タウリンの作用に関する研究例を紹介した。本研究で見出した代謝変化は降圧作用の発現とともに生じたが、両者の関係については今後の検討が待たれる。本研究結果はそのままヒトに当てはまるものではないが、腸内細菌に関連する代謝物の増加がみられたことは、タウリンの生理作用を解明するうえで興味深い。なお、種が違っても代謝物はほぼ共通しているため、動物モデルの結果をヒトに外挿しやすいことはメタボミクスの強みである。

尿は非侵襲的に採取可能であり、様々な代謝物を高濃度で含んでいることから、臨床検体として魅力的である。また、NMR の場合、そのまま測定試料にできるという利点がある。その一方で、濃縮度が検体間で大きく異なるため、NMR メタボミクスを実施するうえで、分析化学的に解決すべき課題も残されている。今後、これらの課題を解決しながら、医療現場への貢献を目指して NMR メタボミクスによる医療薬学研究を進める予定である。

### 【引用文献】

- 1) A.-H. Emwas, C. Luchinat, P. Turano, L. Tenori, R. Roy, et. al., Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review, *Metabolomics*, **11**, 872-894 (2015) .
- 2) K. Akira, H. Hichiya, M. Morita, A. Shimizu, H. Mitome, Metabonomic study on the biochemical response of spontaneously hypertensive rats to chronic taurine supplementation using <sup>1</sup>H NMR spectroscopic urinalysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **85**, 155-161 (2013) . <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.018>
- 3) W. Abebe, M.S. Mozaffari, Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies,

*Am. J. Cardiovasc. Dis.*, 1, 293-311 (2011) .

- 4) J.Z. Melnick, P.A. Srere, N.A. Elshourbagy, O.W. Moe, P.A. Preisig, R.J. Alpern, Adenosine triphosphate citrate lyase mediates hypocitraturia in rats, *J. Clin. Invest.*, 98, 2381-2387 (1996) .
- 5) K. Akira, S. Masu, M. Imachi, H. Mitome, T. Hashimoto, A metabonomic study of biochemical changes characteristic of genetically hypertensive rats based on <sup>1</sup>H NMR spectroscopic urinalysis, *Hypertension Res.*, 35, 404-412 (2012) .