

## 2022 年度杉山産業化学研究所研究助成

### 研究報告書

ヒト検体の定量メタボロミクス実現に向けた合成生物学・代謝工学研究

相馬 悠希

(九州大学 大学院農学研究院)

Key words : 定量メタボロミクス, 安定同位体希釈法, SILIS, 合成生物学, 代謝工学

#### 背景・目的

メタボロミクスは、生体内の代謝物の網羅的解析を旨とし、ライフサイエンスの様々な分野においてその活用が進んでいる。メタボロミクス分野では、各種クロマトグラフィー質量分析計が第一義的手法として採用されているが、各代謝物の絶対定量は殆ど実施されていない。その原因は、生体サンプル由来の夾雑物が測定対象化合物のイオン化効率に影響を与える「マトリックス効果」が質量分析部において生じ、定量性が損なわれるためである。この問題を解決する策として「安定同位体希釈法 (Stable Isotope Dilution Method; SIDM) 」<sup>1,2)</sup> が考案されているが、非常に高価な安定同位体異性体標品が必要であるため、代謝物の包括的解析を旨とするメタボロミクスにとって、SIDMは定量性・網羅性担保に要するコストと労力に見合わない非現実的な手法に留まっている。

本研究では、比較的安価な U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glucose を原料に、遺伝子組換え大腸菌にヒト由来代謝物を合成させることで、ヒト検体に適応可能な安定同位体標識化内部標準品群 (Stable Isotope Labeled Internal Standard mixture: SILIS) の調製法 (SILIS バイオプロダクション法) を確立し、SILIS を用いたヒト定量メタボロミクスの可能性を探索した。これにより、大規模コホート研究や国際協力研究、トランスオミクス研究など、バッチ間でのデータ統合や長期的・継続的な蓄積が必要な医科学分野・ライフサイエンス分野に寄与する次世代定量メタボロミクスの実現を目指す。

#### 方法および結果

##### 1. SILIS 生産大腸菌の構築に向けた大腸菌とヒト血漿の高解像度ワイドターゲット・メタボローム解析

同一生物種の解析のための SILIS バイオプロダクション法はこれまでも報告されているが、本研究では大腸菌由来の SILIS をヒト血漿サンプルに適用することを目指す。そのため、初めに大腸菌とヒト血漿間でのメタボロームの相違を明らかにした。SILIS 生産のために用いる大腸菌株 BW25113 と米国標準技術研究所 (NIST) が提供するヒト血漿レファレンス検体 SRM1950 を、各種液体クロマトグラフィーと高分解能質量分析 (LC/HRMS/MS 分析) を組み合わせたメタボローム解析に供し、各試料中の代謝物の違いを比較し、ヒト血漿中に含まれるが大腸菌が生産できない代謝物や、内在量の少ない代謝物を明らかにした (図 1)。これらのヒト血漿代謝物は、バイオマーカーなどとして臨床血液サンプル分析における実用性が高く、以降、大腸菌の代謝改変によって合成させる標的代謝物とした。

##### 2. 代謝改変大腸菌の構築とヒト血漿代謝物の合成試験

上述の 27 種の代謝物をヒト血漿用 SILIS 調製に必要な標的代謝物とし、これらが大腸菌内で合成させるための代謝改変に取り組んだ。BW25113 株にヒト代謝物合成酵素遺伝子をプラスミドによって導入した。まず、標的代謝物合成に必要な代謝酵素の一次構造を KEGG Database (<https://www.kegg.jp/kegg/>) から探索し、DNA 配列に変換するとともに、DNA 配列を大腸菌用にコドン最適化した。コドン最適化したヒト代謝物合成酵素遺伝子を Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導型のプロモーターである PLlacO1 プロモーター制御下に置いたミディアムコピープラスミド (複製起点 : p15A) を構築し、BW25113 株に導入した。構築した大腸菌株を SILIS 生産培養条件において培養し、標的代謝物の合成の有無を LC/HRMS/MS 分析にて確認した。その結果、現在までに L-Kynurenine, Sarcosine, Dimethylglycine, Creatinin, Cysteic acid, Cysteinesulfinic acid, N-Acetylneuraminic acid など、ヒトにおける疾患バイオマーカーを大腸菌に合成させることに成功した。

#### 4. 代謝改変大腸菌由来の SILIS を用いたヒト血漿サンプルの定量メタボローム解析

代謝改変大腸菌によるヒト血漿成分を含む SILIS の調製に成功したことから、これを用いたヒト血漿サンプルの定量メタボローム解析に取り組んだ。分析対象としたヒト血漿レファレンス検体 SRM1950 は、NIST から一部の代謝物に関して認証値（血漿中の代謝物濃度）が提供されている（図 1 黒）。本研究ではまず、ヒト血漿と大腸菌に内在的に含まれる全 20 種のアミノ酸と、大腸菌には本来含まれない L-Kynurenine を標的とした定量メタボローム解析を実施した。この際、アミノ酸に関しては商用の  $^{13}\text{C}$  化学合成標準品が入手できたことから、これを用いた安定同位体希釈法による定量も同時に実施した（図 1 黄）。その結果、NIST が提供する認証値（図 1 黒）、化学合成標準品を用いた定量値、SILIS を用いた定量値でおおよそ同等の定量結果が得られた。一部のアミノ酸（Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Trp）に関しては NIST の認証値が提供されていないものの、化学合成標準品を用いた定量結果と SILIS を用いた定量結果で同じくおおよそ同等の結果が得られた。このことから SILIS を用いた定量メタボローム解析について一定の信頼性が担保された。L-Kynurenine に関しては NIST からの認証値ならびに  $^{13}\text{C}$  化学合成標準品ともに取得できなかったため、定量値の正誤を判別できていない。ただし、血中の L-Kynurenine と L-Tryptophan (Trp) の存在比 (K/T 比) は一定の範囲に収まることが知られており、定量結果から得られる K/T 比は従来の医学的知見と矛盾しなかった<sup>5)</sup>。以上のことから、定量結果の信頼性に関する更なる検証が必要であるものの、代謝改変大腸菌由来の SILIS を用いた定量メタボロームのアプローチの有用性が示された。

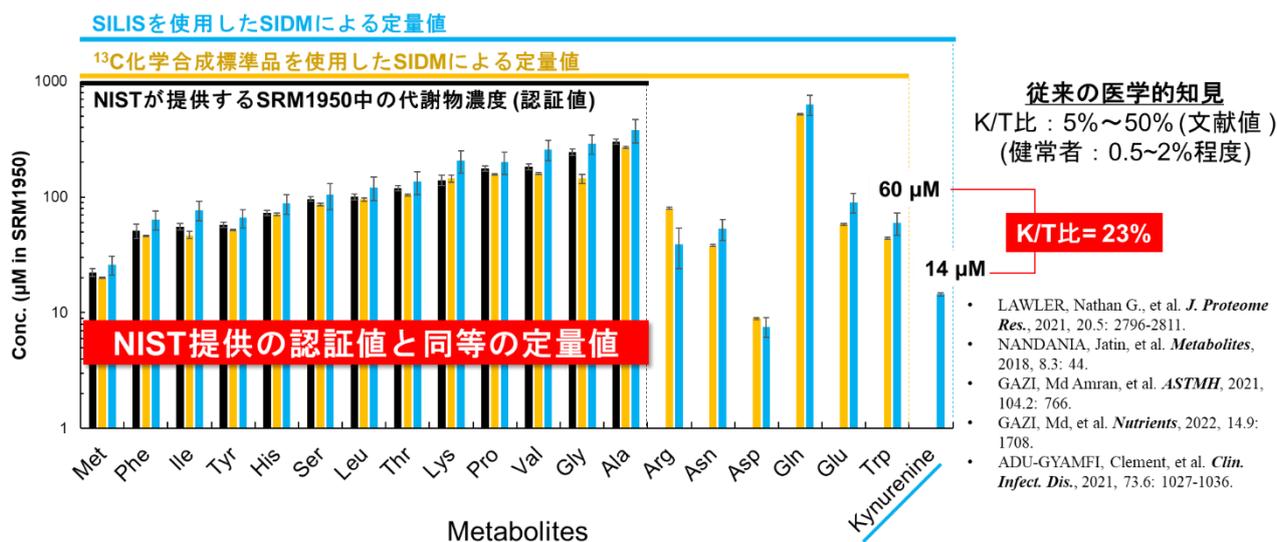


図 1. 大腸菌 SynPath 株由来の SILIS を用いたヒト血漿中のアミノ酸および L-Kynurenine の定量

#### 共同研究者・謝辞

本研究では共同研究者として、九州大学生体防御医学研究所・メタボローム分野・馬場健史 教授，和泉自泰 准教授，高橋政友 助教，今戸優理 氏にご協力・ご助言を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Panuwet P. et al., *Crit Rev Anal Chem.* 2016;46(2):93-105. doi: 10.1080/10408347.2014.980775.
- 2) Wu L. et al., *Anal Biochem.* 2005 Jan 15;336(2):164-71. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.001.
- 3) Bennett BD. et al., *Nat Protoc.* 2008;3(8):1299-311. doi: 10.1038/nprot.2008.107..
- 4) Mashego MR. et al. *Biotechnol Bioeng.* 2004 Mar 20;85(6):620-8. doi: 10.1002/bit.10907.
- 5) Adu-Gyamfi C. et al., *Clin Infect Dis.* 2021 Sep 15;73(6):1027-1036. doi: 10.1093/cid/ciab232.