

「申請研究題目」

産業技術総合研究所 主任研究員

相馬 悠希

要旨

メタボロミクスは生体内代謝物の網羅的解析を可能とする手法として広く活用されているが、質量分析におけるマトリックス効果により絶対定量は困難である。安定同位体希釈法 (SIDM) は有効な解決策であるものの、高価な標品を必要とし網羅解析には非現実的である。本研究では、U-¹³C₆-グルコースを基質として遺伝子改変大腸菌にヒト由来代謝物を合成させ、安定同位体標識内部標準混合物 (SILIS) のバイオプロダクション法を確立し、ヒト定量メタボロミクスへの応用可能性を検討した。ヒト血漿標準試料 SRM1950 と大腸菌 BW25113 株のメタボローム比較により、大腸菌に内在しないヒト代謝物を同定し、その中から疾患関連 27 種を選定した。必要酵素遺伝子を導入した代謝改変大腸菌を U-¹³C₆-グルコース培地で培養し、¹³C 標識代謝物を生成後、精製して SILIS を調製した。27 種中 16 種の代謝物合成に成功し、高い ¹³C 標識率を確認した。SILIS を用いた SRM1950 の定量結果は NIST 認証値と一致し、新たに疾患バイオマーカーの定量にも成功した。

背景・目的

メタボロミクスは生体内代謝物を網羅的に解析する、表現型に最も近いオミクス技術であり、免疫細胞や腫瘍の代謝リモデリング解明やバイオマーカー探索への応用が期待されている。クロマトグラフィー質量分析により数百～数千の代謝物の一斉検出と相対比較が可能となった一方、絶対定量はほとんど行われていない。これは生体由来夾雑物によるマトリックス効果がイオン化効率に影響し、定量性を損なうためである。この課題に対し安定同位体希釈法 (SIDM) [1, 2] が提案されているが、市販標品は高価で網羅的解析には非現実的である。そこで、U-¹³C₆-グルコースを炭素源として微生物を標識化し代謝物群を取得する SILIS のバイオプロダクション法 [3,4] が考案されたが、生物種差により大腸菌由来 SILIS はヒト検体にそのまま適用できない。本研究では、代謝改変大腸菌にヒト代謝物を合成させることでヒト検体に適した SILIS 調製法を確立し、定量メタボロミクスの実現を目指す。

方法

1. 大腸菌の合成させるヒト代謝物の同定

SILIS 生産に用いる大腸菌株には、大腸菌 1 遺伝子欠損ライブラリ (Keio Collection) の宿主株である BW25113 株を使用した。大腸菌の代謝改変によって合成させる標的代謝物を選定するため、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、これらを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である P_{LacO1} プロモータ制御下に置いたメ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。

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 の調製し、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。ヒト血漿レファレンス検体 SRM1950 を解析対象として、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 ¹³C 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。

結果

1. 大腸菌の合成させるヒト代謝物の同定

ヒト血漿リファレンスサンプル SRM1950 と大腸菌 BW25113 株に含まれる代謝物をワイドターゲット・メタボローム解析に供し、ヒト血漿に含まれるが大腸菌には内在的に含まれない代謝物を明らかにした (図 1)。これら標的代謝物の合成に必要な酵素遺伝子を選定し、大腸菌にプラスミドによる形質転換によって導入することで代謝改変大腸菌株を構築した。これらを用いて SILIS 生産を実施し、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、計 16 種の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。

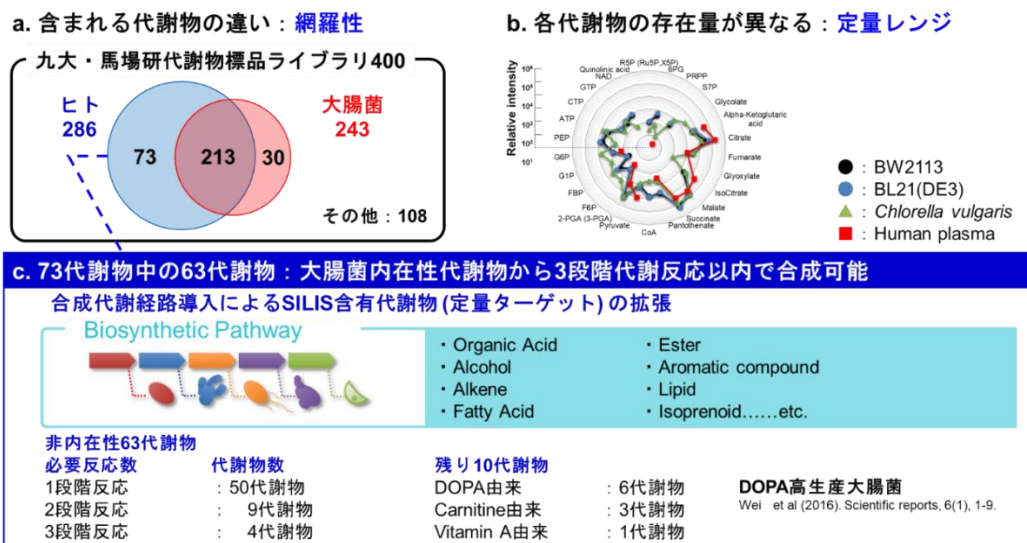


図 1. ワイドターゲット・メタボロミクスおよび KEGG Pathway 解析結果. a) ヒト血漿と大腸菌から検出される代謝物の比較結果. b) 大腸菌 (BW25113, BL21(DE3)), 光合成微生物 (*C. vulgaris*), ヒト血漿に含まれる代謝物の検出強度の比較結果. c) Pathway 解析に基づくヒト血漿代謝物を合成するための大腸菌の代謝改変デザイン.

2. 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

ヒト血漿成分を含む SILIS の調製に成功したため、これを用いてヒト血漿レファレンス検体 SRM1950 の定量解析を行った。本試料には一部代謝物の認証値が NIST より提供されている (図 2 黒)。まず、ヒト血漿と大腸菌に共通する 20 種のアミノ酸と、大腸菌に存在しない L-Kynurenine を対象に解析した。アミノ酸については市販の ^{13}C 標準品による安定同位体希釈法も併用した (図 2 黄)。その結果、NIST 認証値、化学合成標準品による定量値、SILIS による定量値は概ね一致した。認証値のない一部アミノ酸でも、両手法で同様の結果が得られ、SILIS の定量信頼性が示唆された。L-Kynurenine は認証値や標準品がなく正確性は未検証だが、得られた K/T 比は既知の医学的範囲と整合した [5,6]。以上より、更なる検証は必要ながら、本アプローチの有用性が示された。

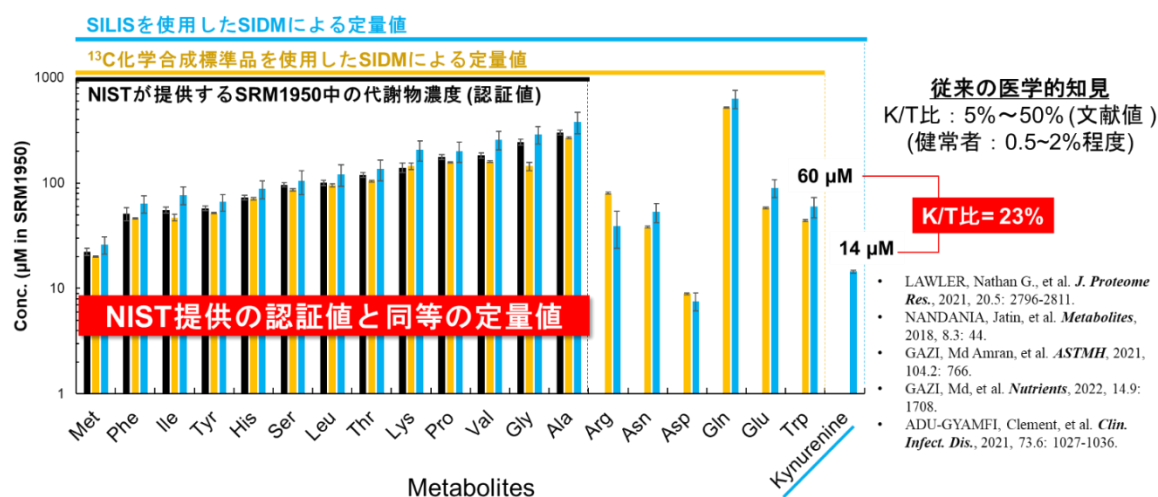


図 2. 大腸菌 SynPath 株由来の SILIS を用いたヒト血漿中のアミノ酸および L-Kynurenine の定量. 各棒グラフはヒト血漿サンプル SRM1950 中のアミノ酸および L-Kynurenine の濃度. 黒: NIST が提供する認証値, 黄: 化学合成された ^{13}C 標準品を使用した SIDM による定量結果, 青: SILIS を使用した SIDM による定量結果.

考察

本研究では、約 600 種の親水性代謝物標準ライブラリで同定可能な代謝物のみを解析した。その結果、ヒト検体で検出された 286 代謝物のうち 74%が大腸菌でも検出され、SILIS の分析カバレッジの高さが示された。さらに、大腸菌で未検出の 73 代謝物のうち 63 は、内在性経路から 3 酵素以内で合成可能と KEGG 解析で判明し、大腸菌によるヒト血漿代謝物合成の有用性が示唆された。一方、脂質合成には大規模改変が必要であり今後の課題である。調製した SILIS の多くの代謝物は 90%以上の高い ^{13}C 標識化率を示し、定量信頼性に十分な品質を達成した。SRM1950 を用いたアミノ酸および L-Kynurenine 定量では、従来法や NIST 認証値と一致する結果が得られた。SILIS 調製コストは 1 分析約 100 円と低く、今後は代謝改変株の拡張と更なる低コスト化を進め、各組織に適した定量メタボロミクス用 SILIS の開発を目指す。

共同研究者

九州大学生体防御医学研究所
メタボロミクス分野・助教
高橋政友

引用論文

- [1] Panuwet P, Hunter RE Jr, D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, et al. Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem*. 2016;46(2):93-105. doi:10.1080/10408347.2014.980775
- [2] Wu L, Mashego MR, van Dam JC, Proell AM, Vinke JL, Ras C, et al. Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Anal Biochem*. 2005;336(2):164-71. doi:10.1016/j.ab.2004.09.001
- [3] Bennett BD, Yuan J, Kimball EH, Rabinowitz JD. Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nat Protoc*. 2008;3(8):1299-311. doi:10.1038/nprot.2008.107
- [4] Mashego MR, Wu L, van Dam JC, Ras C, Vinke JL, van Winden WA, et al. MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-¹³C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. *Biotechnol Bioeng*. 2004;85(6):620-8. doi:10.1002/bit.10907
- [5] Adu-Gyamfi C, Savulescu D, Mikhathani L, Otwombe K, Salazar-Austin N, Chaisson R, et al. Plasma kynurenine-to-tryptophan ratio, a highly sensitive blood-based diagnostic tool for tuberculosis in pregnant women living with human immunodeficiency virus (HIV). *Clin Infect Dis*. 2021;73(6):1027-1036. doi:10.1093/cid/ciab232

助成研究に関連した発表論文

1. Imado, Y., Takahashi, M., Soma, Y., Aburaya, S., Nakatani, K., Hanai, T., ... & Izumi, Y. (2026). Evaluation of LC/MS methods for hydrophilic metabolites to enable integration of human blood metabolome data. *Mass Spectrometry*, A0188.
2. Soma, Y., Tominaga, S., Tokito, K., Imado, Y., Naka, K., Hanai, T., ... & Bamba, T. (2023). Trace impurities in sodium phosphate influences the physiological activity of *Escherichia coli* in M9 minimal medium. *Scientific reports*, 13(1), 17396.
3. 鳥越大平, 高橋政友, 中尾素直, 相馬悠希, 池田和輝, 中谷航太, ... & 和泉自泰. (2022). LC/HRMS/MS と in silico エピメタボライトデータベース (IEMDB) に基づく未知の親水性代謝物の包括的構造推定. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 70(4), 245-247.