

189. ヒト定量メタボローム解析技術の開発

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

緒言

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たオミクス解析技術であり、表現型に最も近接したオミクス階層を対象とした高解像度分子フェノタイピング技術である。近年では免疫細胞や腫瘍組織における代謝リモデリングの解明やバイオマーカー探索など、医科学分野でもその応用が期待されている。メタボロミクス分野では、高選択性・高感度・測定対象範囲が広い各種クロマトグラフィー質量分析を用いることで、数百～数千におよぶ代謝物の一斉検出を可能とし、サンプル間の代謝物レベルの相対比較に基づく様々な代謝プロファイリング法などが普及している。

一方で、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 (図 1A)。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)」が考案されている (図 1B) [1, 2]。同手法は、定量対象代謝物の安定同位体標識化合物を既知濃度の内部標準として添加し、サンプル由来の代謝物と内部標準の検出強度比から濃度を算出する内部検量法である。ただし、市販の安定同位体異性体標品は非常に高価であり、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。そこで、比較的安価な¹³C₆-Glucose を単一炭素源にして大腸菌などを培養して¹³C 標識し、代謝物群を一挙に取得する SILIS バイオプロダクション法が考案されている [3, 4]。ただし、生物種が異なれば含まれる代謝物の種類も量もことなるため、大腸菌由来の SILIS をそのままヒト検体の定量には使用できない。本研究では、ヒト由来代謝物を代謝改変大腸菌に合成させることで、ヒト検体に適応可能な SILIS 調製法を確立し、ヒト定量メタボロミクスの実現を図り、医科学分野におけるメタボロームデータの有効的な活用に貢献する。

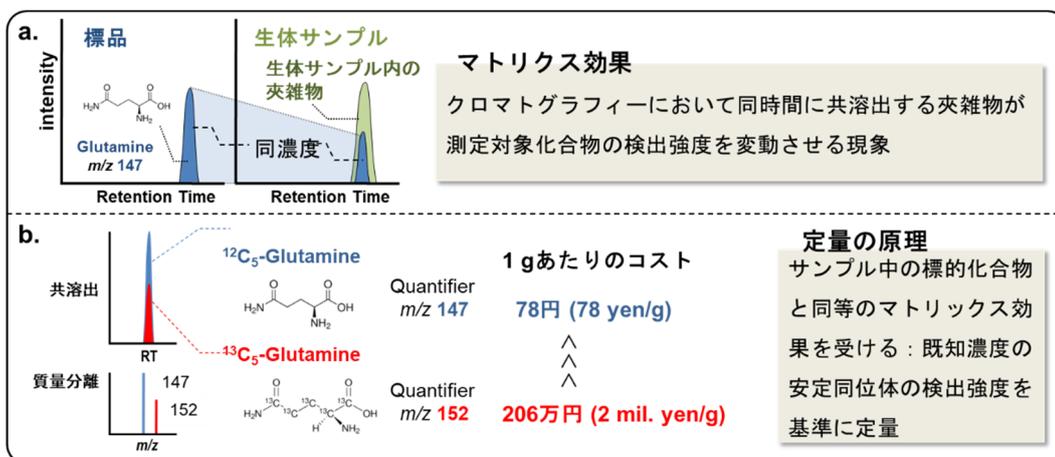


図 1. メタボロミクスにおける定量性の課題と解決策 (SIDM)

- 質量分析における「マトリクス効果」が生体サンプル分析の定量性に与える影響。
- 安定同位体希釈法 (Stable Isotope Dilution Method : SIDM) ; Glutamineの例。

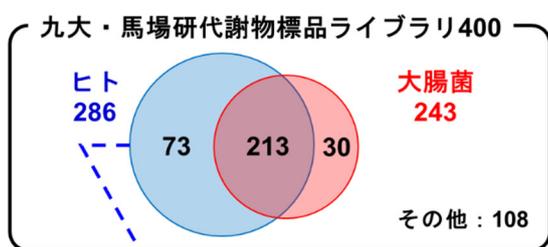
方法および結果

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

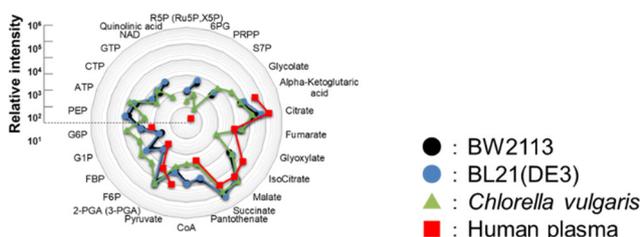
SILIS 生産のために用いる大腸菌株には、代謝変化には大腸菌 1 遺伝子欠損ライブラリ (Keio Collection) の宿主株である BW25113 株を使用した。BW25113 と米国標準技術研究所 (NIST) が提供するヒト血漿レファレンス検体 SRM1950 を、各種液体クロマトグラフィーと高分解能質量分析 (LC/HRMS/MS 分析) を組み合わせたメタボローム解析に供し、各試料中の代謝物の違いを比較した。ヒト血漿レファレンス検体 SRM1950 は複数の個人から採取した血漿サンプルを集積したプール血漿サンプルであり、世界的に血漿研究や分析メソッドの施設間検証に使用されている。

上述の比較分析によって、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 2)。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、大腸菌の代謝変化によって合成させる標的代謝物とした。

a. 含まれる代謝物の違い : 網羅性



b. 各代謝物の存在量が異なる : 定量レンジ



c. 73代謝物中の63代謝物 : 大腸菌内在性代謝物から3段階代謝反応以内で合成可能

合成代謝経路導入によるSILIS含有代謝物(定量ターゲット)の拡張

Biosynthetic Pathway



- Organic Acid
- Alcohol
- Alkene
- Fatty Acid
- Ester
- Aromatic compound
- Lipid
- Isoprenoid.....etc.

非内在性63代謝物

必要反応数

必要反応数	代謝物数
1段階反応	: 50代謝物
2段階反応	: 9代謝物
3段階反応	: 4代謝物

残り10代謝物

DOPA由来	: 6代謝物
Carnitine由来	: 3代謝物
Vitamin A由来	: 1代謝物

DOPA高生産大腸菌

Wei et al (2016). Scientific reports, 6(1), 1-9.

図 2. ワイドターゲット・メタボロミクスによる比較分析 (ヒト血漿 vs 大腸菌) と KEGG Pathway 解析結果

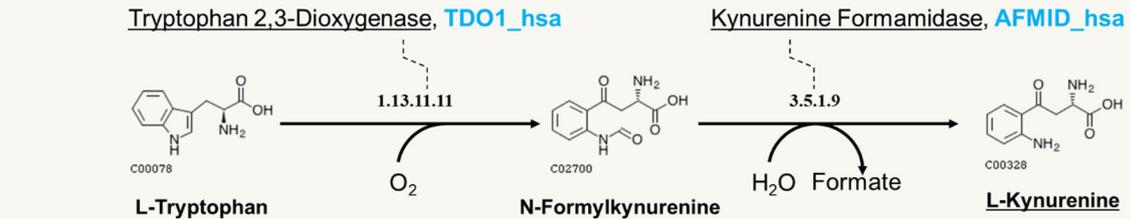
- ヒト血漿と大腸菌から検出される代謝物の比較結果。
- 大腸菌 (BW25113、BL21 (DE3))、光合成微生物 (*C. vulgaris*)、ヒト血漿に含まれる代謝物の検出強度の比較結果。
- Pathway解析に基づくヒト血漿代謝物を合成するための大腸菌の代謝変化デザイン。

2. 代謝変化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変化に取り組んだ。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した。コドン最適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 P₁lacO₁ プロモータ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 (図 3)。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-Acetylneuraminat 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、引き続きその他の合成経路構築に取り組んでいる。この際、図 4 に示す通り、高分解能質量分析によって標的代謝物の ^{13}C 標識にともなる質量シフトを確認し、 ^{13}C 標識化率を明らかにして SILIS の品質を担保した。

a. ヒトにおけるL-Kynurenine合成反応



b. 大腸菌における人工代謝経路の構築



図 3. ヒト血漿代謝物を合成する代謝改変大腸菌の構築 (L-Kynurenine の例)

- ヒト血漿代謝物L-Kynurenineの合成経路。
- 大腸菌にL-Kynurenineを合成させるための合成代謝経路の設計・導入。

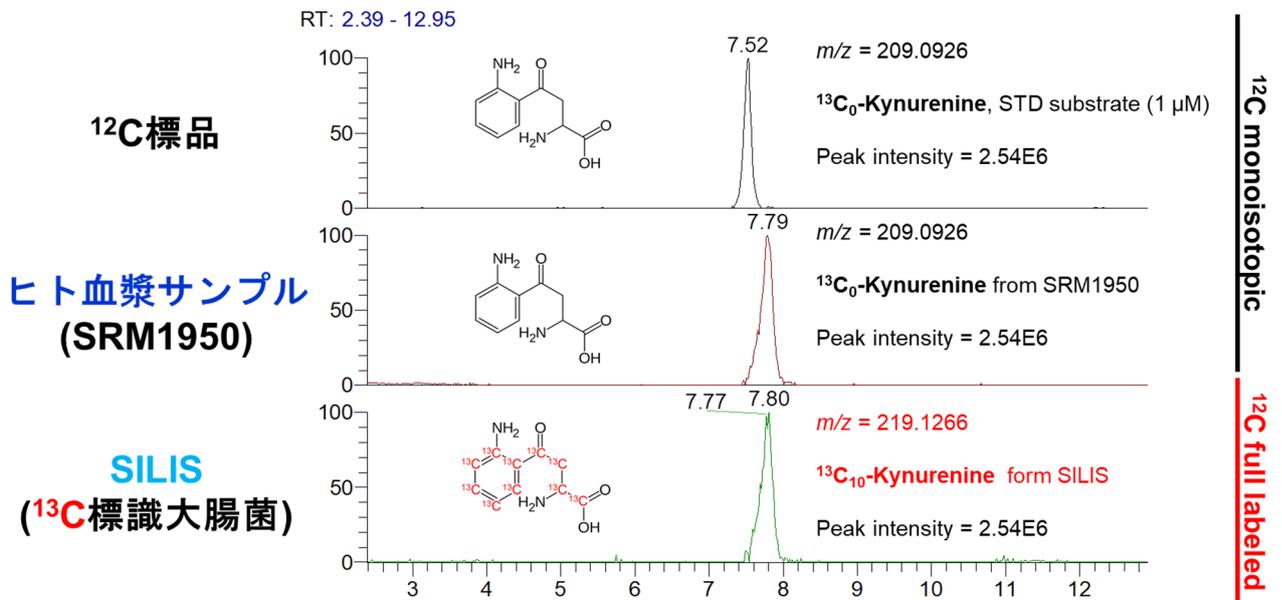


図 4. 代謝改変大腸菌株による L-Kynurenine 合成および安定同位体標識化の確認
全炭素骨格が ^{12}C で構成される ^{12}C 標品、ヒト血漿サンプル、代謝改変大腸菌から得られた SILIS から検出された L-Kynurenine の検出ピーク。

3. 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 5 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（図 5 黄）。その結果、NIST が提供する認証値（図 5 黒）、化学合成標品を用いた定量値、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¹³C 化学合成標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 [5]。

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ミクスのアプローチの有用性が示された。

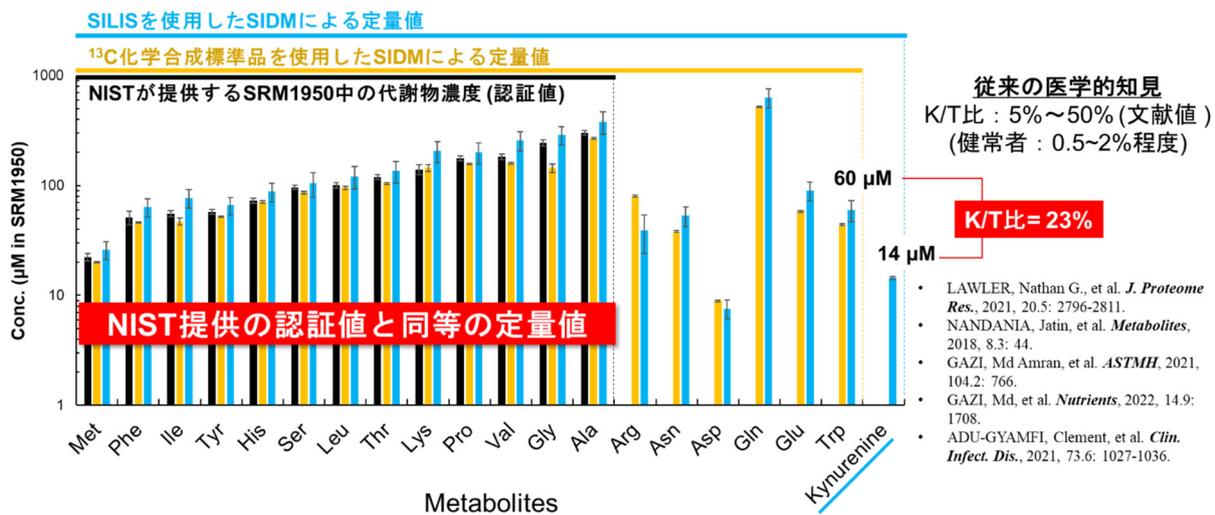


図 5. 大腸菌 SynPath 株由来の SILIS を用いたヒト血漿中のアミノ酸および L-Kynurenine の定量。各棒グラフはヒト血漿サンプルSRM1950中のアミノ酸およびL-Kynurenineの濃度。黒: NISTが提供する認証値、黄: 化学合成された¹³C標準品を使用したSIDMによる定量結果、青: SILISを使用したSIDMによる定量結果。

考 察

本研究では、九州大学生体防御医学研究所・メタボロミクス分野が有する代謝物標準品ライブラリ（親水性代謝物約 600）によって確実に同定可能な代謝物のみを解析対象とした。その結果、ヒト検体から検出された 286 代謝物のうちその 74%は大腸菌でも検出され、大腸菌由来の SILIS の分析カバレッジが比較的高いことを明らかとした。また、大腸菌では検出できなかった 73 代謝物のうち、63 代謝物は、大腸菌の内在性経路から 3 酵素反応以内で合成できることが KEGG Database を用いたパスウェイ解析で明らかとなったことから、大腸

菌を宿主としてヒト血漿代謝物を合成する戦略の有用性が比較的高いことを示唆している。ただし、ヒトと大腸菌で大きく代謝経路が異なる脂質の合成に関しては、大規模な代謝改変が必要であり、今後の課題である。

調製した SILIS 中の代謝物の¹³C 標識化率を精査した結果、検出された殆どの代謝物において 90%以上の高い¹³C 標識化率が確認された。¹³C 標識化率が低い場合、内部標準として添加する SILIS 由来の¹²C 代謝物が定量対象に可算されるため、定量値の信頼性を担保できないが、調製した SILIS は添加量から加味して定量性の低下に影響しない標識化率を達成しており、信頼性の高い定量メタボロミクスの実現に寄与することが期待できる。

実際に SILIS を用いた SRM1950 のアミノ酸および L-Kynurenine の定量結では、化学合成内部標品を使用した従来法や NIST の認証値や従来の医学的知見に沿った定量結果が得られており、SILIS に含まれるヒト血漿代謝物を拡張していくことで今後幅広いヒト血漿代謝物の定量が可能な SILIS の調製を実現できると期待される。今回実施した SILIS 調製の実質的なコストは実験室スケールで 1 分析あたり 100 円程度であり、定量メタボロミクスの低コスト化に大きく貢献する成果が得られている。今後は、ヒト代謝物を合成可能な代謝改変大腸菌のライブラリを拡張するとともに、更なるコスト低減のための代謝工学・培養工学的アプローチに取り組む。将来的には、ヒト血漿に限らず、各臓器や組織の定量メタボロミクスに適した SILIS を提供するための代謝デザインと SILIS 製造法の発展を目指す。

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ミクス分野の馬場健史教授、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, Hunter RE Jr, D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, Marder ME, Kartavenka K, Ryan PB, Barr DB. 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. PMID: 25562585; PMCID: PMC4695332.
- 2) Wu L, Mashego MR, van Dam JC, Proell AM, Vinke JL, Ras C, van Winden WA, van Gulik WM, Heijnen JJ. Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Anal Biochem.* 2005 Jan 15;336(2):164-71. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.001. PMID: 15620880.
- 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. PMID: 18714298; PMCID: PMC2710577.
- 4) Mashego MR, Wu L, Van Dam JC, Ras C, Vinke JL, Van Winden WA, Van Gulik WM, Heijnen JJ. 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 Mar 20;85(6):620-8. doi: 10.1002/bit.10907. PMID: 14966803.
- 5) Adu-Gyamfi C, Savulescu D, Mikhathani L, Otwombe K, Salazar-Austin N, Chaisson R, Martinson N, George J, Suchard M. 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 Sep 15;73(6):1027-1036. doi: 10.1093/cid/ciab232. PMID: 33718949; PMCID: PMC8442800.