

【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)」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 $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-Glucose}$ 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求した。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】米国 NIST が提供するヒト血漿リファレンスサンプルである 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。そのうち、ヒトの疾患バイオマーカーとその候補である 27 種の代謝物を選定し、大腸菌によって合成させるための代謝改変ターゲットとした。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し、代謝改変大腸菌株群を構築した。構築した代謝改変大腸菌株を $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-Glucose}$ を単一炭素源とする最小培地で培養することで、大腸菌内の代謝物を ^{13}C 標識した。得られた ^{13}C 標識大腸菌体から代謝物を精製し、SILIS を調製した。調製した SILIS を用いて SRM1950 の定量メタボローム解析を実施した。

【結果】代謝改変大腸菌のメタボローム解析の結果、選定した 27 種のターゲット代謝物 (ヒト血漿代謝物) の内、7 種の代謝物の合成に成功した。これらいずれのターゲット代謝物に関しても良好な ^{13}C 標識化率を担保できており、高品質な SILIS の調製に成功したことが確認された。取得した SILIS を用いて SRM1950 の定量メタボローム解析を実施した結果、NIST から提供された各種アミノ酸の定量値 (認証値) と SILIS を用いた定量結果は同等の値を示した。また、代謝改変によって新たに大腸菌で *de novo* 合成させた L-Kynurenine について、初めて SRM1950 中の定量値を明らかにした。これらの結果から、SILIS バイオプロダクション法と得られた SILIS を用いた定量メタボローム解析の有用性を示した。

SILIS のバイオプロダクション法によるヒト定量メタボロミクスの実現

