

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 新保 和高

本論文は、生命科学研究において重要なアミノ酸を高速に、また、高感度に分析するための分析技術開発とその代謝工学・臨床への応用研究を行なったものであり、緒言、3章からなる本論および結語からなる。

緒言では、メタボロミクス研究の歴史とアミノ酸分析の重要性、およびアミノ酸分析技術の現状と課題について述べている。

第1章では、アミノ酸分析における現状の課題であった、高速・高感度分析を実現するためのタンデム型質量分析計用の分析試薬のデザインおよび合成について述べている。デザインした試薬は、①質量分析計において高感度に検出するための構造、②高速分析を行うために逆相の HPLC で保持されるために構造、③アミノ基と穏和な条件で迅速に反応するための構造、および④誘導体化物がタンデム型質量分析計の衝突誘起解離 (CID) により、試薬由来の構造部分とアミノ酸との間で特異的に開裂する構造、という特徴を有するものであった。特に、試薬のデザインにあたっては、CID による開裂位置が電子の局在が関係し、芳香環のような電子が非局在化する共鳴構造を有する場合には、その共鳴構造により、イオン化した分子が安定化することで開裂が起こりにくくなる、という仮説をもとに実施し、その仮説をもとに新規の試薬を合成し、検証をおこなっている。さらに、④の特徴を有することが、アミノ酸の高速、高感度分析だけでなく、簡便な同位体標識率の分析などに応用できる試薬であると結論づけた。

第2章では、開発した試薬を利用したアミノ酸の高感度、高速分析法などについて記述している。第二節においては、試薬の構造中に質量分析計において重要なイオン化を促すカチオン性のトリメチルアンモニウム基を導入した TAHS (*p*-*N,N,N*-Trimethylammonioanilyl *N'*-Hydroxysuccinimidyl Carbamate Iodide) 試薬を用いることで、たんぱく質加水分解アミノ酸を 50~340 アットモルという従来よりも 1000 倍程度、超高感度に検出することに成功し、微量試料へのアミノ酸分析への適用を可能とした。また、第三節においては、特異的な開裂位置を利用した、アミノ酸の安定同位体標識率を簡便に求める分析法について記述していた。開発した試薬を用いる方法では、従来の GC-MS を用いる手法などでは必要であった、測定結果から安定同位体標識率を算出する複雑な補正計算を不要とした。また、本手法は、TAHS 試薬を用いることで、その感度も相俟って、アミノ酸生産菌体内の遊離のアミノ酸の同位体標識率の測定を可能とした。第四節では、同様に特異的な開裂位置を利用し、試薬骨格に由来する共通のフラグメントイオンを指標として、サンプル中の試薬と反応したアミノ化合物を一斉に検出する方法の開発について記述している。本手法は、サンプル中のアミノ基を有する化合物を網羅的に検出できることから、未知ピークの検出および質量情報からの同定も可能であり、メタボ

ロミクス研究の有用なツールとなることが示唆された。さらに、第五節では、試薬骨格に安定同位体である重水素を導入した試薬 (TAHS-d3) の開発について記述している。TAHS-d3 は TAHS と共に使用し、異なる 2 種類の検体をそれぞれの試薬で誘導体化後混合し、分析することで、検体間の相対的な定量を可能にした。そして、第六節においては、アミノ酸研究におけるボトルネックであり、アミノ酸分析の最大の課題となっていた、分析時間を大幅に短縮したことについて記述している。開発した方法は、比較的小さな骨格を有する APDS 試薬を用いる方法であり、逆相 HPLC での分離と、タンデム型質量分析計の高選択性を組み合わせることで、同一質量電荷比のアミノ酸を完全に分離し、わずか 7.5 分と従来の 10 分の 1 程度の時間で生体アミノ酸の分析を実現している。また、質量分析計の選択性を利用することで、100 種類以上の化合物を 10 分で分析を可能としアミノ酸研究の進展に大きく貢献するものである。

第 3 章では、第 2 章で開発した分析法の生命科学研究への応用について記述している。第二節では、第 2 章の第三節で開発した、安定同位体標識率の分析法の代謝工学的研究への応用展開の例について述べている。代謝フラックス解析を、従来の安定同位体ラベル基質を培養初期から添加し、菌体内のたんぱく質加水分解物の安定同位体標識率を求める手法から、培養途中にパルス的にラベル基質を投与し、細胞内の遊離のアミノ酸の同位体標識率を分析することでフラックスを求めることを可能とし、大幅な実験コストの削減を実現でき、また、目的の培養時点でのフラックス解析が可能となり、発酵菌の育種・プロセス開発に有用なツールになると結論づけている。また、第三節では、APDS 試薬を用いたアミノ酸高速分析の生体試料への適用を行い、アミノグラムの測定への応用について記述している。開発した分析法は、FDA の生体試料分析のためのバリデーション法のガイダンス基準を満たすものであり、臨床応用への適用も可能であると結論づけた。そこで、第四節においては、本手法の臨床などの検査現場へ導入する上で、大きな障壁となっていたプレカラム誘導体化工程を自動化する装置の開発を行っている。開発した装置は、血漿中のアミノ酸の分析を行なう上で十分な結果が得られたことから、将来的には健康診断などへの実用化の可能性について記述している。

結語では、研究全体を総括し、今後の展望について述べている。

以上、本論文は、メタボロミクス研究で重要なアミノ酸分析技術を飛躍的に向上させ、生命科学研究へ新たな応用をしたものであり、将来的なアミノ酸研究、メタボロミクス研究、臨床研究の発展に向けた基礎的な研究として貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値があるものと認めた。