The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Stable isotope dilution-based accurate profiling of metabolites and its application to plant
Author(s)	金, 載光
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46812
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【30】

氏　　名	金（キム）　載光（ジェクワン）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　１９８４８　号
学位授与年月日	平成 17 年 11 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学　位　論　文　名	Stable isotope dilution-based accurate profiling of metabolites and its application to plant **（安定同位体希釈法を用いた植物代謝産物定量系の開発とその応用）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　小林　昭雄 （副査） 教　授　卜部　格　　教　授　福井　希一　　教　授　塩谷　捨明 教　授　原島　俊　　教　授　仁平　卓也

論　文　内　容　の　要　旨

高感度及び高精度定量分析法によるメタボローム解析法を開発するため、安定同位体希釈法による代謝産物の定量分析システムの開発を行った。第一章では C_1 代謝における中間代謝産物である蟻酸をターゲットとし、安定同位体希釈法を用いた有効な蟻酸定量法を開発した。^{13}C-蟻酸を内部標準化合物として、メチル化反応後の蟻酸メチルを solid phase microextraction (SPME)/GC-MS に供した。安定同位体希釈法を用いることによって、誘導体化、分離分析など各実験段階で生じる誤差を標準化することが可能になり、高い精度や再現性をもつ蟻酸定量系が確立された。また、*in vivo* ラベリング法を用い、C_1 代謝に関連する含窒素化合物群分析系を開発した。^{15}N ラベル化した化合物（硝酸カリウム、硝酸アンモニウム）を含む改変 LS 培地にてシロイヌナズナ T87 細胞を培養することによって、細胞中の代謝産物は ^{15}N 安定同位体で標識された。T87 細胞内の代謝産物が ^{15}N 標識体に完全に置換されるまでの経時変化を測定した結果、21 日目、3 回植え継ぎすることにより、ほとんど全ての葉酸関連化合物、*S*-アデノシルメチオニン（SAM）、*S*-アデノシルホモシステイン（SAH）において全ての窒素原子が ^{15}N に置換されていることが確かめられた。そこで、内部標準として ^{15}N ラベル化した代謝産物を用い、内部標準法による葉酸関連化合物、SAM および SAH の相対定量法を開発した。また、当該手法を用いたアミノ酸の相対定量も可能になった。次に第二章ではこれらの手法をメタボロミクスに適用し、植物培養細胞における塩ストレス応答の代謝ネットワークに関する新知見を得ることを試みた。100 mM の塩化ナトリウムを処理した T87 培養細胞の経時サンプリング（72 時間）後、代謝産物変動を観測した。得られたメタボロームデータは、主成分分析ならびに自己組織化マッピング解析に供し、代謝産物間の相関関係について評価した。その結果、塩ストレスに対する代謝の相関メカニズムや再構成される代謝ネットワークのスキーム、さらに連続的な代謝機能を解析することができた。

論文審査の結果の要旨

本論文では、高感度および高精度定量手法によるメタボローム解析手法の開発を目的として、安定同位体希釈法に

よる代謝産物の定量分析システムの開発とその運用に取り組んだ研究の成果をまとめたものであり、主な成果は以下のとおりである。

(1) メタボローム解析おける実用的な安定同位体希釈法の運用を目指し、*in vivo* ラベリング法により一定に標識されたシロイヌナズナ T87 培養細胞の取得方法を構築している。

(2) 内部標準として ^{15}N ラベル化した代謝産物を用い、内部標準法による葉酸関連化合物、SAN（*S*-アデノシルメチオニン）、SAH（*S*-アデノシルホモシステイン）およびアミノ酸など C_1 代謝に関連する含窒素化合物群の簡便なさらに高感度の分析法を開発している。

(3) C_1 代謝における C_1 ソースである蟻酸の測定においても安定同位体希釈法を適用し、誘導体化、分離分析など各実験段階で生じる誤差を標準化できる手法を構築している。

(4) これまで示した手法をメタボローム解析に適用し、塩ストレスに対する代謝ネットワークでの連続的な代謝応答を解析している。

以上のように、本論文において初めて植物細胞における安定同位体希釈法による高精度かつ再現性の高いメタボローム解析法が開発された。当該手法を用いて塩ストレスに対する連続的な代謝応答の動きを追跡することによって重要な知見が得られている。安定同位体希釈法によるメタボローム解析は今後の包括的な代謝制御機構の解明を目指すオーム科学の中心戦術として、今後のメタボローム解析研究の発展に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。