

主要水溶性代謝物141成分一斉分析法による微生物中の代謝物分析と代謝経路への可視化

堀江 征司 吉田 崇伸² 岡本 真美 荒尾 洋平 渡邊 淳 蓮沼 誠久^{1,2}

1; 国立大学法人 神戸大学 先端バイオ工学研究センター
2; 国立大学法人 神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科

ユーザーベネフィット

- ◆ 中心代謝経路周辺の低分子代謝物を対象とした141成分の一斉分析が可能です。
- ◆ 研究対象として利用頻度の高い大腸菌・酵母由来の細胞実試料でも安定して分析可能です。
- ◆ マルチオミクス解析パッケージとの連携により、代謝物の量的変化を代謝経路図上で解釈することができます。

はじめに

近年の合成生物学研究の興隆に伴い、微生物に他生物由来の化合物を高生産させる技術が広がっています。生物の代謝を利用する合成生物学研究分野において、代謝物を網羅的に分析するメタボロミクスの手法は、欠かせない手法です。

島津製作所は神戸大学との共同開発により、一次代謝物を中心とした141成分を網羅的に分析する手法を開発し、「LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物Ver.3」としてリリースしました。別途提供する解析ソフトウェア「マルチオミクス解析パッケージ」¹⁾に搭載した代謝マップを利用することで、定量的な変動が代謝マップ上のどこで生じているかを容易に解析することが可能です。

本稿では、大腸菌と酵母をモデルサンプルとして、細胞抽出物についての代謝物一斉分析と代謝マップを活用した解析事例を紹介いたします。



図1 LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver.3 およびLCMS™-8060

試料の前処理

図2に前処理のワークフローを示します。大腸菌と酵母サンプルは、それぞれ以下の方法で処理しました。

<大腸菌>

液体培地で培養した大腸菌の細胞懸濁液を、-20℃に冷やした40%エタノール/0.8%NaCl水溶液に加えてクエンチし、遠心分離によって菌体を回収しました。回収した菌体は、0.75 mLのエタノールで懸濁後、70℃で15分間熱処理を行い、2分間氷上に静置しました。続いて0.75 mLの水を加えて混和、3,900 g、4℃で5分間遠心分離し、上清を回収しました。上清は乾固し、分析する際は等量の水で再溶解し、サンプルとしました。必要に応じて水で希釈しました。

<酵母>

液体培地で培養した酵母の細胞懸濁液を、-40℃に冷やしたメタノールに加えてクエンチし、遠心分離によって菌体を回収しました。回収した菌体は、95℃に加熱した75%エタノール1 mLに懸濁し、95℃、3分間熱処理を行いました。続いて遠心分離し、上清を回収、乾固しました。分析する際は等量の水で再溶解し、サンプルとしました。必要に応じて水で希釈しました。

分析条件

一次代謝物の一斉分析は、「LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver.3」に含まれるPFPPカラムを用いた分析法、およびLCMS-8060(図1)を使用しました。本方法では、141種の親水性低分子代謝物をターゲットとすることができます。表1にHPLCおよびMSの分析条件を示します。

表1 UHPLCとMSの分析条件

UHPLC (Nexera™ X3 system)	
Column	: Shim-pack™ GIST PFPP* (150 mm × 2.1 mm, 3.0 μm, Shimadzu)
Mobile phase	: A) 0.1% Formic acid - Water : B) 0.1% Formic acid - Acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min (17 minから19 minは0.5 mL/min)
Injection volume	: 3 μL
MS (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Positive/Negative)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

PN: 227-30858-07 (島津GLC)

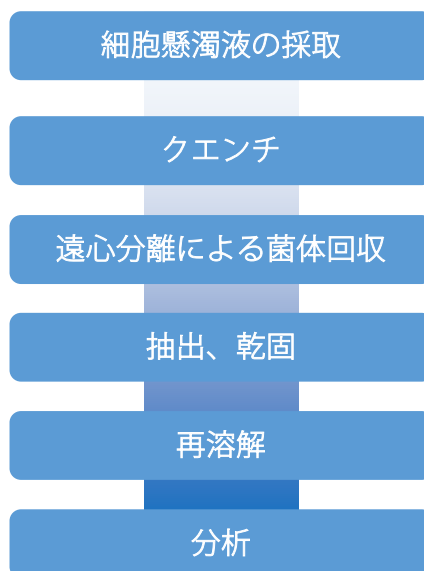


図2 前処理ワークフロー

■ 分析結果

<検出成分数>

全141成分のうち、大腸菌からは95成分、酵母からは92成分が検出されました(表2)。図3に大腸菌と酵母の抽出物を分析した際の代表的なMRMクロマトグラムを示します。また、図5に成分の詳細を示しており、アミノ酸や有機酸、核酸等、カテゴリに偏りなく検出されていることがわかります。

表2 各サンプルで検出された成分数

	大腸菌	酵母
検出成分数	95/141	92/141

<保持時間と面積値の再現性>

検出された成分の保持時間と面積値の再現性を検討するために、同一サンプルを3回ずつ分析し、変動係数(cv)を算出しました。表3は、検出された成分のうち、有用物質生産につながるPhenylalanine、その類縁体であるPhenylpyruvic acid、Ver.3で新たに追加したヒスチジン生合成前駆体のHistidinolについての再現性をまとめた結果です。大腸菌、酵母いずれのサンプルにおいても、保持時間のcv%は0.5%未満、面積値は7%未満であり、高い再現性を有する分析系であることが示されました。

また、図4には、Phenylalanine、Phenylpyruvic acid、HistidinolのMRMクロマトグラムを例示します。大腸菌、酵母に関わらず、安定した分離・検出を確認しました。

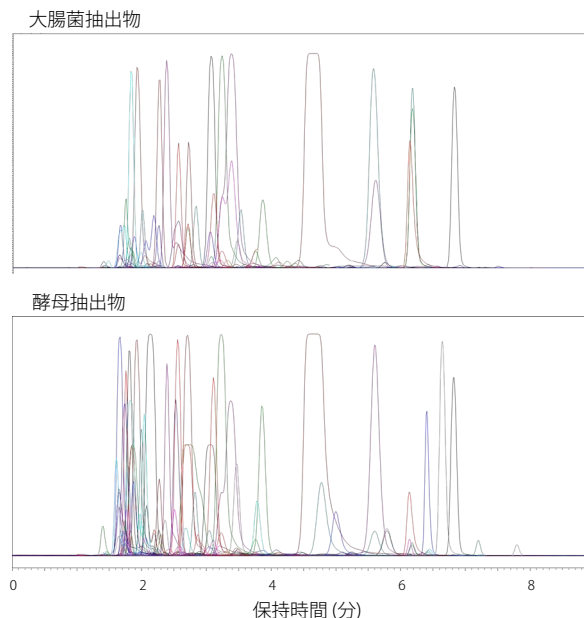


図3 大腸菌および酵母抽出物のMRMクロマトグラム全景
(上段：大腸菌抽出物、下段：酵母抽出物)
※縦軸の強度はピークごとに倍率を変えて表示しています。

表3 保持時間と面積の平均値と再現性 (n=3)

成分名	生物種	保持時間(分)		面積値	
		大腸菌	酵母	大腸菌	酵母
Phenylalanine		4.66 (0.50)	4.66 (0.44)	74,244,748 (0.9)	86,733,835 (1.4)
Phenylpyruvic acid		3.73 (0.51)	3.73 (0.45)	5,106,830 (4.8)	774,303 (6.7)
Histidinol		5.08 (0.07)	5.10 (0.08)	608,365 (1.5)	2,556,348 (1.5)

※ () 内の値は cv %

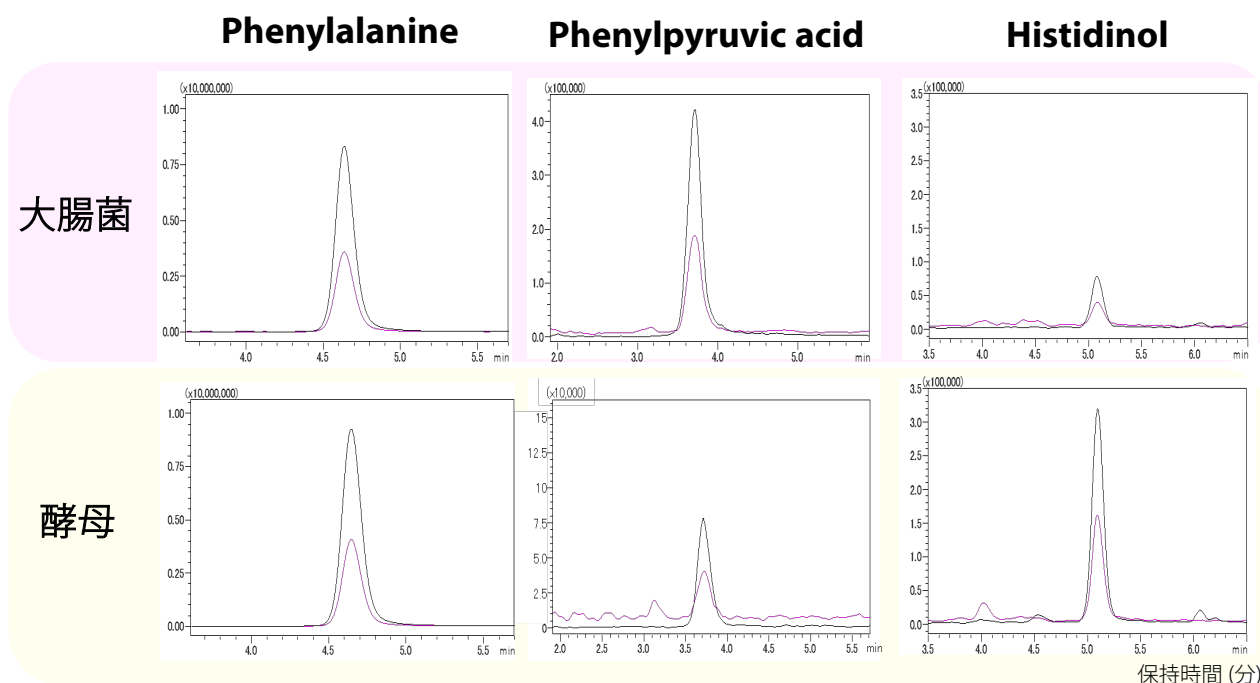


図4 検出された代表的成分のMRMクロマトグラム

	成分名	大腸菌	酵母		成分名	大腸菌	酵母
糖類※	Lactic acid	○		有機酸	Creatine	○	
	Pyruvic acid	○	○		Glycolic acid *	○	○
TCA回路	2-Ketoglutaric acid	○	○		Glyoxylic acid *	○	
	Aconitic acid	○	○		Orotic acid	○	○
	Citric acid	○	○		Pantothenic acid	○	○
	Fumaric acid		○		Taurocholic acid	○	○
	Isocitric acid		○		※1 Dopamine	○	
	Malic acid	○	○		※2 PLP *	○	○
	Succinic acid	○	○		塩基・ヌクレオシド・ヌクレオチド	Adenine	○
尿素回路	Argininosuccinic acid	○	○			Adenosine	○
	Ornithine	○	○	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate		○	○
	Arginine	○	○	Adenosine monophosphate		○	○
	Citrulline	○	○	Adenylsuccinic acid		○	○
アミノ酸	2-Aminobutyric acid	○	○	AlCAR *		○	○
	4-Aminobutyric acid	○	○	Cytidine		○	○
	4-Hydroxyproline	○	○	Cytidine monophosphate		○	○
	Alanine	○	○	Cytosine		○	○
	Asparagine	○	○	Guanine		○	○
	Aspartic acid	○	○	Guanosine		○	○
	Asymmetric dimethylarginine	○	○	Guanosine monophosphate		○	○
	Dimethylglycine	○	○	Inosine		○	○
	Glutamic acid	○	○	Thymidine monophosphate		○	○
	Glutamine	○	○	Uracil	○	○	
	Glycine	○	○	Uridine	○	○	
	Histidine	○	○	Thymidine	○	○	
	Isoleucine	○	○	Thymine	○	○	
	Leucine	○	○	※3 Hypoxanthine	○		
	Lysine	○	○	※4 Xanthine	○	○	
	Methionine sulfoxide	○	○	Mevalonic acid *	○	○	
	Phenylalanine	○	○	※4 MEP *	○	○	
	Proline	○	○	※4 DOXP *	○	○	
	Serine	○	○	その他	4-Hydroxybenzoic acid *	○	○
	Symmetric dimethylarginine	○	○		Acetylcarnitine	○	○
	Threonine	○	○		Carnitine	○	○
	Tryptophan	○	○		Carnosine	○	○
	Tyrosine	○	○		Choline	○	○
	Valine	○	○		Citicoline	○	○
	Cysteine		○		Creatinine	○	○
	Cystine	○	○		Histamine	○	○
	Histidinol	○	○		Kynurenine	○	○
Homocystine	○	○	3-Dehydroshikimic acid *		○	○	
Cystathionine	○	○	4-Aminobenzoic acid		○	○	
Homocysteine	○	○	Anthranilic acid *		○		
Methionine回路(4-5) Transsulfuration経路	Methionine	○	○		Chorismic acid *	○	
	5-Glutamylcysteine	○	○		Indole *	○	
	Glutathione	○	○		Nicotinic acid	○	○
	Oxidized glutathione	○	○		Ophthalmic acid	○	○
	S-Adenosylhomocysteine		○		Phenylpyruvic acid *	○	○
S-Adenosylmethionine	○	○	Protocatechuic acid *	○	○		
補酵素	FAD	○	○	Shikimic acid 3-phosphate *	○	○	
	FMN	○	○	Tyramine *	○		
	NAD	○	○				
	Niacinamide	○	○				

※1：カテコールアミン
 ※2：ビタミン
 ※3：プリン誘導体及び代謝産物
 ※4：メバロン酸/MEP経路
 *はVer.3で新たに追加した成分を示します²⁾。

図5 大腸菌および酵母の抽出物サンプルから、PFPPカラムを用いた分析法で検出された一次代謝物(延べ104成分)

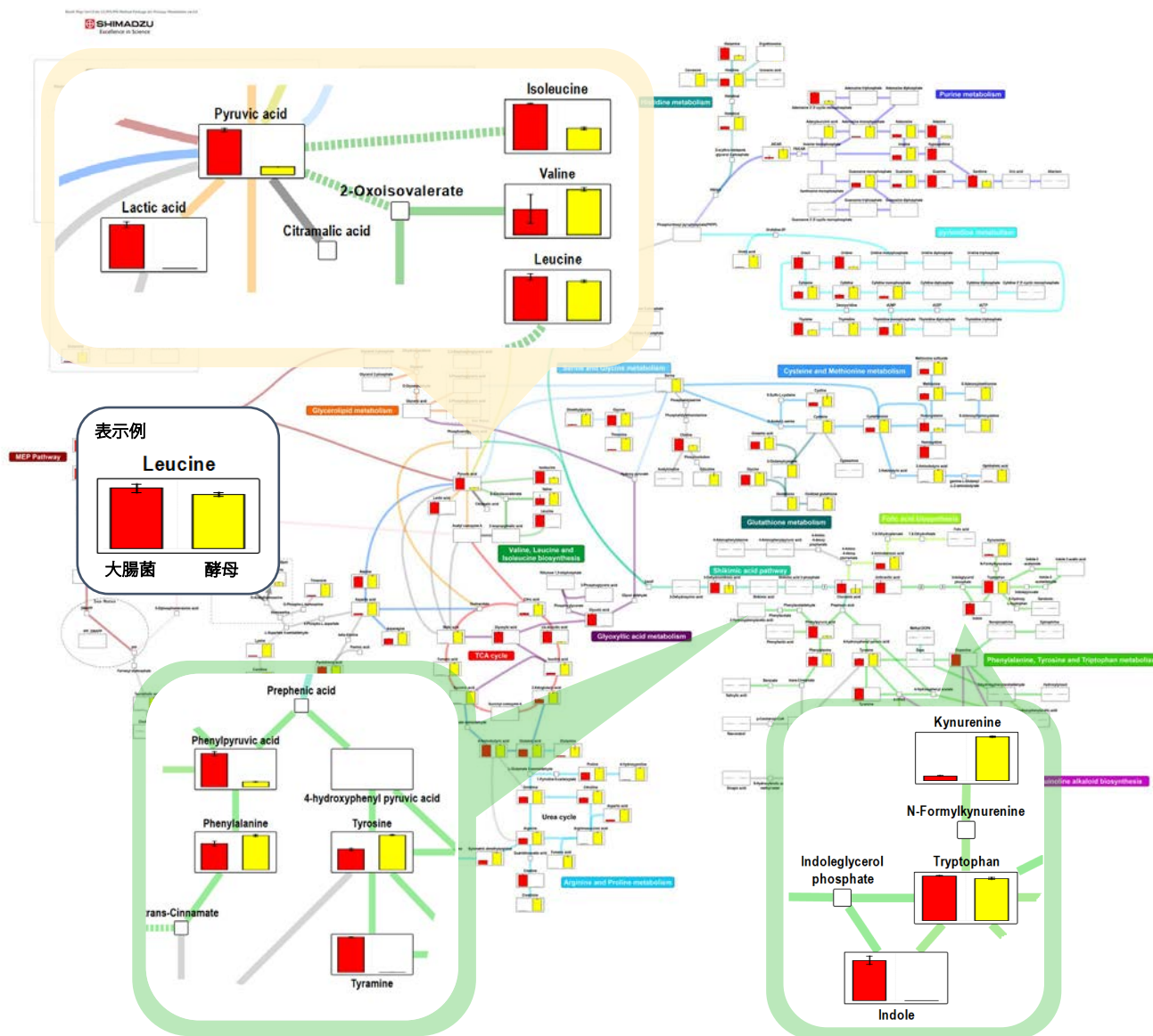


図6 マルチオミクス解析パッケージを利用した、代謝経路図への可視化の例

■ 解析結果

＜マルチオミクス解析パッケージによる解析＞

分析結果は、マルチオミクス解析パッケージと連携し、簡単に代謝経路図へ投影することができます。この解析は、代謝全体の状態変化を視覚的にとらえるための有効な手段です。図6に、大腸菌と酵母の抽出物の分析結果を代謝経路図へ可視化した例を示しました。大腸菌、酵母の抽出液について、中心代謝経路周辺の対象成分が、代謝経路に偏りなく検出されていることがわかります。このようにマルチオミクス解析パッケージを用いて解析すると、サンプルの群間比較や経時変化を簡単に図示することが可能です。

■ 参考文献

- 1) LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 Ver.3 https://www.an.shimadzu.co.jp/lcms/tq-option/mp_primary-metabolites.htm
本製品にはマルチオミクス解析パッケージが同梱されています。
- 2) Takenaka et al. *Talanta*, 222, 121625, (2021)

LCMS、Nexera、およびShim-packは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00209-JP 初版発行：2021年10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021