

Application News

No.C131A

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

微生物育種へのメタボロミクス応用

Application of Metabolomics to Microbial Breeding

微生物を用いた有用物質生産は食品、バイオ、エネルギーなど幅広い産業分野で古くから利用されています。たとえば食品分野では、酒類、発酵食品に代表されるように微生物の発酵プロセスを利用した食品への応用が行われていますし、バイオ分野においてはアミノ酸や抗生物質の大量供給に利用されてきました。またエネルギー分野では今後の課題としてコスト面での改善がハードルになっているものの、バイオ燃料への実用的な応用に期待がもたれています。このように様々な有用物質生産に利用されている微生物ですが、更なる生産効率の向上を目指して、遺伝子改変や育種といった操作がよく行われます。メタボロミクスはこのような微生物育種における代謝変動を評価するうえで、目的物質はもちろんのこと、その前駆体・中間体を含めた代謝変動を理解するために有効な技術であり、物質生産に関連した代謝経路をより深く理解することで、生産効率の高い物質生産への応用が期待されます。本稿ではシステイン産生大腸菌を試料として、システイン合成に使われる硫黄源にチオ硫酸あるいは硫酸を添加した場合に、関連する含硫代謝物が培養経過に依存してどのように変動するかをLC/MSで分析した例をご紹介します。

T. Nakanishi

■大腸菌抽出物のLC/MS分析

LC/MS Analysis of the Extracts from *Escherichia coli*

硫黄源としてチオ硫酸もしくは硫酸を添加した最小培地を用いて大腸菌の培養を行いました。また培養経過に依存した代謝物変動を評価するために、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9時間経過後に培養懸濁液から菌体の一部を回収しました。回収した大腸菌はOD値を測定した後、フィルター濾過により培地成分と菌体を急速に分離しました。その後分離した菌体をメタノール中にて破碎することで大腸菌抽出液を調製しました。濃縮遠心機でメタノールをとばした後、超純水で溶かしたものを適宜希釈してLC/MS分析を行いました。代謝物を分析するにあたっては、LCMSメソッドパッケージ【一次代謝物】のイオンペアメソッド(LCMS-8040)および非イオンペアメソッド(LCMS-8050)による分析条件にて一斉分析を行いました。Table 1はそれぞれのメソッドにおける分析条件を示しています。また、Fig. 1はチオ硫酸添加培地にて培養した大腸菌抽出液を分析した際のそれぞれの分析メソッドによるMRMクロマトグラム(ともに6時間経過時点)を示しています。イオンペアメソッドではアミノ酸、補酵素、核酸関連化合物を中心として、また非イオンペアメソッドではアミノ酸、有機酸、核酸関連化合物に由来するピークが検出されました。

Table 1 イオンペアメソッドと非イオンペアメソッドによる分析条件
Analytical Conditions of Ion Pairing Method and Non-ion Pairing Method

イオンペアメソッド (LC分析条件)		非イオンペアメソッド (LC分析条件)	
カラム	: RP column	カラム	: RP column
移動相 A	: 15 mmol/L Acetate, 10 mmol/L Tributylamine - Water	移動相 A	: 0.1 % Formic acid - Water
移動相 B	: Methanol	移動相 B	: 0.1 % Formic acid - Acetonitrile
流速	: 0.3 mL/min	流速	: 0.25 mL/min
モード	: Gradient Elution	モード	: Gradient Elution

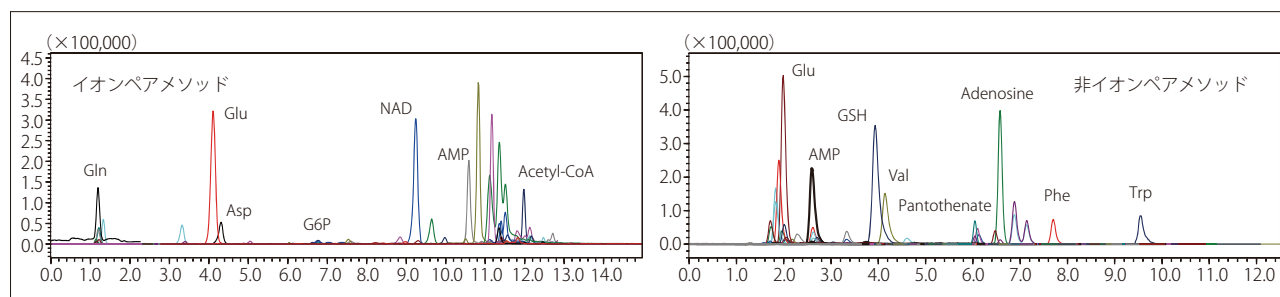


Fig. 1 チオ硫酸添加培地にて培養した大腸菌抽出物のMRMクロマトグラム
MRM Chromatograms of Extracts from *Escherichia coli* Cultured in a Thiosulfate-containing Medium

■含硫代謝物の培養経過による代謝変動

Time Courses of Sulfur-containing Metabolites

得られた結果をもとに、システインをはじめとする含硫代謝物に関連した代謝物の面積比をチオ硫酸および硫酸添加培地にて培養時間ごとに比較したのが Fig. 2 になります（縦軸：面積比、横軸：時間を表します）。ここに示すように、硫黄源の違いにより培養時における代謝物の変動が確認されました。特にグルコースが枯渇する6時間前後において、チオ硫酸添加培地におけるCysteineの減少（7時間以降）、また代謝経路の上流にあたるSerineにおいて増加（6時間時

点）が認められました。またこれ以外にもチオ硫酸添加培地において、ヌクレオシドの上昇（Adenosine, Inosine）が確認されました。このように培地に添加する硫黄源の違いがCysteineをはじめとする含硫代謝物の産生能に影響することが、メタボロミクスによるアプローチから分かります。

本稿ではシステイン産生に関連する含硫代謝物を中心に、大腸菌の培養経過に応じた代謝変動を見てきましたが、一次代謝物メソッドパッケージとトリプル四重極型質量分析装置を組み合わせることで、アミノ酸、有機酸、核酸関連化合物などの生体にとって重要な代謝変動を評価することができます。

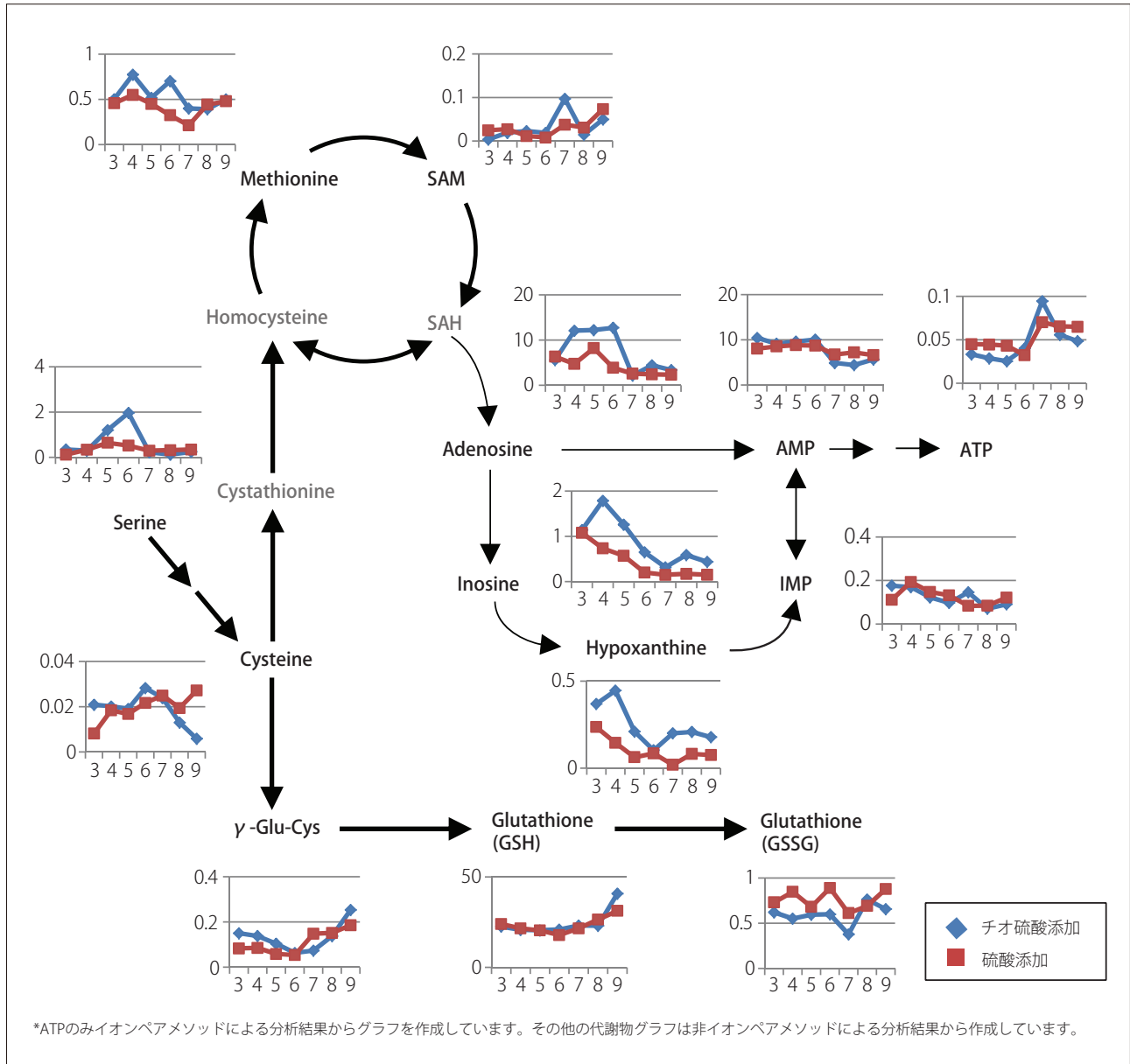


Fig. 2 チオ硫酸および硫酸添加培地にて培養した大腸菌における含硫代謝物の変動
Metabolic Changes of Sulfur-containing Compounds in *Escherichia coli* Cultured in a Thiosulfate or Sulfate-containing Medium

* 大腸菌試料は、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 バイオサイエンス専攻 統合システム生物学領域の大津徹生先生、河野祐介先生にご提供いただきました。

* 本研究は、農林水産省の「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」を活用して行われました。

A改訂版発行：2016年7月

初版発行：2016年5月

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

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。