

高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS™-8050

トリプル四重極LC/MS/MSを用いたメタボロミクスによる超好熱菌の炭素代謝解析

村松彩香¹、折田和泉¹、福居俊昭¹、猪鼻祐介²

1) 国立大学法人東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系、2) 株式会社島津製作所

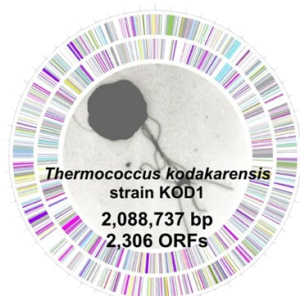
ユーザーベネフィット

- ◆ 親水性代謝物向けに確立されたReady to useメソッドに、有機酸成分を追加しました。
- ◆ イオンクロマトグラフィーでは検出困難な有機酸が、複雑な検討なしに一斉分析できます。
- ◆ 微生物の培養上清や菌体内代謝物を試料として、再現性の高いデータが得られます。

はじめに

*Thermococcus kodakarensis*は至適生育温度を85℃に持つ絶対嫌気性の超好熱性アーキアであり、超好熱菌研究のモデル微生物として様々な研究が進められています(図1)^{1), 2)}。超好熱菌由来の酵素は高度に熱安定であり、本菌由来のDNAポリメラーゼがPCR用酵素として市販されています。また本菌は培養条件によっては水素を発生しながら生育するため、水素の発酵生産菌としても注目されています³⁾。

筆者らは本菌におけるアミノ酸・有機酸の代謝について知見を得るために、トリプル四重極型質量分析計LCMS-8050(図2)を用いて本菌の培養上清ならびに菌体内代謝物を分析しました。従来のイオンクロマトグラフィー分析では検出できなかった有機酸について分析条件を確立し、アミノ酸をはじめとする一次代謝物との一斉分析を可能にしました。



- 至適生育温度を85℃にもつ超好熱性アーキア
- ペプチド・アミノ酸やピルビン酸、デンプン等を生育基質とする従属栄養絶対嫌気性菌
- 全ゲノム解析が完了・遺伝子の約半数が機能未知
- 遺伝子操作手法が確立
- 細菌や真核生物とは異なる代謝経路や酵素を有する

図1 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis*



図2 LCMS™-8050外観

菌体の培養と菌体内代謝物の抽出

*T. kodakarensis*は嫌気チャンバー内で植菌操作を行い、85℃で培養しました。人工海水をベースにした栄養豊富培地にピルビン酸を添加した培地で培養した前培養液を、同培地に植え継ぎ12-24時間本培養しました。

培養液は氷冷した人工海水と混合することで代謝を瞬時に停止(クエンチング)し、遠心分離により培養上清と菌体を取得しました。培養上清は、さらにフィルター処理を施してLC/MS/MSに供しました。菌体内代謝物の抽出は凍結融解抽出法により行いました(図3)。

クエンチングと菌体回収

- 本培養液 5 mLを回収して氷冷した人工海水30 mLと混合
- 遠心分離 (8000 xg, 10 min, 4℃)
- 上清を除いたあと、速やかに液体窒素で凍結
- 減圧乾燥

菌体内代謝物の抽出

- メタノール 1 mL、超純水 380 μL、および内部標準として 1 mM DL-メチオニンスルホンを20 μL添加
- 凍結融解および超音波破碎 (x3回) によって代謝物を抽出
- クロロホルム 800 μLを添加後、ボルテックスミキサーにより攪拌 (5 min)
- 遠心分離 (20,000 xg, 10 min, -8℃)
- 上層 (水層) を回収し、凍結乾燥
- 超純水 50-100 μLに溶解

LC/MS/MS解析

図3 菌体内代謝物抽出までのワークフロー

分析条件

表1にHPLCおよびMSの分析条件を示しました。網羅的な代謝物分析を行うにあたり、代謝物97成分と内部標準物質2成分を一斉分析可能なLC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 ver. 2に、インドール酢酸、4-グアニジノ酪酸、イミダゾール酢酸、5-アミノ吉草酸の分析条件を追加した計103成分を分析対象としました。追加した有機酸の分析条件を設定するため、それぞれの成分に対してMRM条件最適化を行いました。また各有機酸の保持時間については、LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 ver. 2と同じHPLC条件にて決定しました。

各代謝物のピーク面積を内部標準物質(DL-メチオニンスルホン)のピーク面積で正規化した面積比を算出し、さらに菌体回収時の菌体濃度(OD₆₀₀)で標準化することで各代謝物の濃度を評価しました。

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 3 µL
[MS conditions] (LCMS-8050)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
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

■ アミノ酸/有機酸分析の結果

*T. kodakarensis*は、アミノ酸に由来する2-ケト酸およびピルビン酸を有機酸に酸化する過程で還元力とATPを獲得します。ピルビン酸はピルビン酸: フェドキシシン(Fd)酸化還元酵素によってアセチル-CoAへと酸化され、さらにADP-依存型アセチル-CoAシンターゼによってATP生成を伴いながら酢酸へと変換されます。アミノ酸はアミノトランスフェラーゼによって2-ケト酸へと脱アミノ化された後に、ピルビン酸の酸化と同様に2-ケト酸: Fd酸化還元酵素によって対応するアシル-CoAへと酸化され、最終的に対応するそれぞれの有機酸へと変換されます(図4) 4)。

本研究ではインドール酢酸(Trp由来)、およびイオンクロマトグラフィーでは分析できなかった4-グアニジノ酪酸(Arg由来)、イミダゾール酢酸(His由来)、5-アミノ吉草酸(Lys由来)といった塩基性アミノ酸に由来する塩基性有機酸についての分析条件を確立し、LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 ver. 2に含まれる各種代謝物とともに一斉分析が可能であることを示しました(図5)。5-アミノ吉草酸はValの異性体ですが、カラム分離における保持時間の違いで選択的に検出することが可能でした。

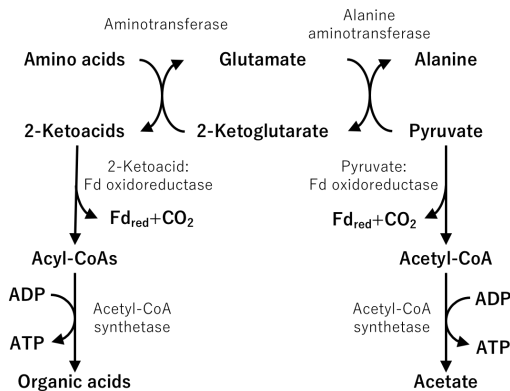
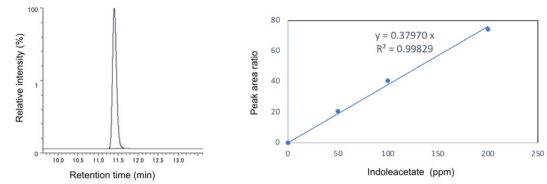
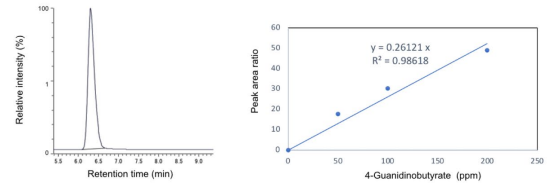


図4 *T. kodakarensis*におけるアミノ酸酸化代謝

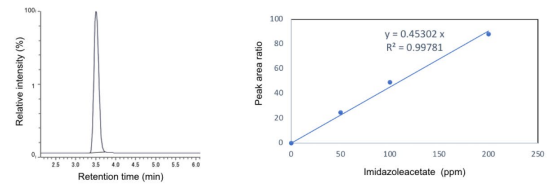
Indoleacetate ($m/z=176.20 > 130.30$)



4-Guanidinobutyrate ($m/z=146.15 > 87.20$)



Imidazoleacetate ($m/z=127.10 > 81.25$)



5-Aminovalerate ($m/z=118.15 > 55.25$)

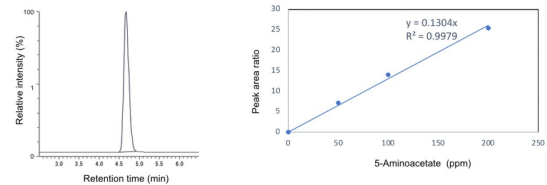


図5 各種有機酸におけるMRMクロマトグラムと検量線

解析の結果、*T. kodakarensis*培養上清および菌体内代謝物から0.2 mM程度のインドール酢酸、4-グアニジノ酪酸、イミダゾール酢酸を検出しましたが、5-アミノ吉草酸は検出されませんでした。*T. kodakarensis*における塩基性アミノ酸代謝の詳細は不明でしたが、Arg、Hisは代謝する一方でLysは代謝しないことが明らかとなりました。

■ まとめ

超好熱菌の培養上清および細胞抽出物について、LCMS-8050によるメタボローム解析を行うための条件を検討しました。特に、塩基性アミノ酸の酸化によって生じる有機酸の分析条件を確立し、各種一次代謝物との一斉分析を可能にしました。本研究により、超好熱菌アミノ酸代謝について重要な知見を得ることができました。

<参考文献>

- 1) Atomi H. et al., *Archaea*, 1, 263-267 (2004).
- 2) Fukui T. et al., *Genome Res.*, 15, 352-363 (2005).
- 3) Kanai T. et al., *J. Biotechnol.*, 116, 271-282 (2005).
- 4) Nohara K. et al., *J. Bacteriol.*, 196: 3831-3839 (2014).

LCMSおよびNexeraは、株式会社島津製作所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

01-00216-JP 初版発行：2021年8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」、「®」を明記していない場合があります。

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にご登録いただけますと、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