

# Application News

## No. C157

LC/MS

### メタボロミクスとリポドミクスによる複合的なオミクスアプローチ

大腸菌や酵母をはじめとする微生物は、食品・バイオ・エネルギーといったさまざまな産業分野において、有用物質を大量生産するために利用されています。例えば食品分野においては酒類や発酵食品を対象として、微生物の発酵プロセスが広く利用されており、より効率の良い発酵生産また付加価値の高い代謝物産生を目的とした微生物育種が行われています。このような有用物質生産の効率化あるいは高付加価値化合物の産生能向上を目的として、メタボロミクスによる代謝変動のモニタリングが求められています。代謝変動のモニタリングでは、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必要があるため、多くの化合物を一斉分析できるメタボロミクスのアプローチはきわめて有効であると期待されています。また本稿ではメタボロミクスによる代謝変動を評価するとともに、リン脂質を対象としたリポドミクスの結果を組み合わせることで、複合的なオミクスアプローチによる代謝変動の理解を試んでいます。ここでは、含硫代謝物であるエルゴチオネインを効率的に産生する大腸菌を試料として、基質となるシステイン合成に使用される硫黄源にチオ硫酸塩あるいは硫酸塩を添加した場合に、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メタボロミクスおよびリポドミクスによるアプローチから評価した例をご紹介します。

#### ■ 大腸菌抽出物の LC/MS 分析

硫黄源として 50 mM チオ硫酸塩もしくは 100 mM 硫酸塩を添加した最小培地を用いて、ジャーファーメンターによる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、0、24、48、72、96、120、168、216h 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、OD=2、1 mL 相当になるように調整して培地を除去してから、超純水にて菌体をリンスしました。次に Bligh-Dyer 法を用いて菌体からの親水性代謝物およびリン脂質の抽出を行いました。水層およびクロロホルム層を回収して、濃縮遠心機で乾固させた後、超純水およびメタノールで溶かしたものを適宜希釈して LCMS-8060 による一斉分析を行いました。代謝物の分析にあたっては、LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 ver.2 の非イオンペアメソッドを、リン脂質の分析にあたっては、LC/MS/MS MRM ライブラリ リン脂質プロファイリングによる分析条件にて一斉分析を行いました。表 1 はそれぞれの分析条件を示しています。また、図 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一次代謝物の MRM クロマトグラムおよびリン脂質の MRM クロマトグラムの一例（ともに 0 時間経過時点および 72 時間経過時点）を示しています。

T. Nakanishi

表 1 メタボロミクスとリポドミクスの分析条件

一次代謝物の分析 (LC 分析条件)	
カラム	: PFPP カラム (2.1×150 mm, 3 μm)
移動相 A	: 0.1 % formic acid - Water
移動相 B	: 0.1 % formic acid - Acetonitrile
流速	: 0.25 mL/min
タイムプログラム	: Linear gradient
カラムオープン温度	: 40 °C
注入量	: 3 μL
リン脂質の分析 (LC 分析条件)	
カラム	: C8 カラム (2.1×150 mm, 2.6 μm)
移動相 A	: 20 mM ammoniumformate - Water
移動相 B	: 50 % Acetonitrile/50 % 2-Propanol
流速	: 0.3 mL/min
タイムプログラム (B conc.)	: Curved gradient
カラムオープン温度	: 45 °C
注入量	: 3 μL

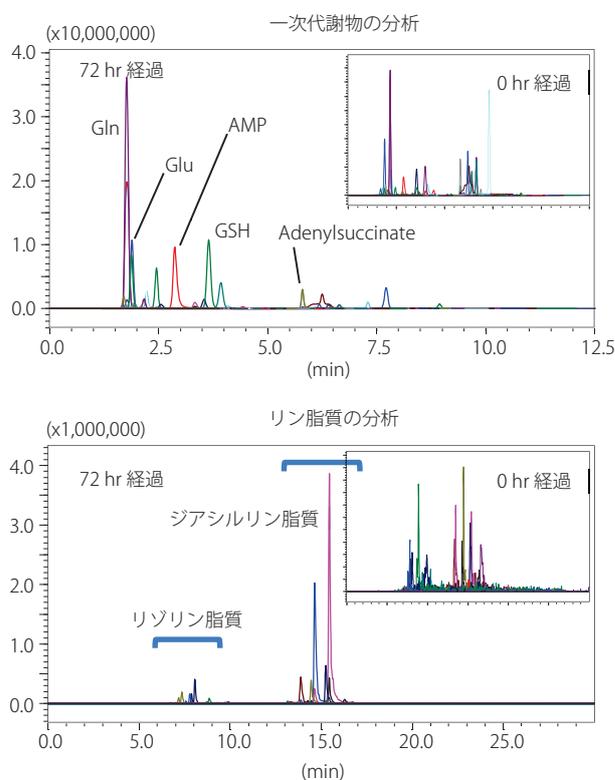


図 1 チオ硫酸添加培地にて培養した大腸菌抽出物の MRM クロマトグラム (一次代謝物およびリン脂質)

## ■ 複合的オミクスによる代謝変動の評価

今回の分析では、一次代謝物として 49 成分、リン脂質として 56 成分を確認しました。図 1 の MRM クロマトグラムからも分かるように培養時間によって、菌体中の代謝物およびリン脂質が大きく変動していることが確認できます。次にエルゴチオネインの基質となる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塩および硫酸塩添加培地にて培養時間ごとに比較した結果を図 2 に示します（縦軸：面積比、横軸：時間を表します）。また図 2 ではホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなどのリン脂質の経時変化も合わせて示します（縦軸：面積、横軸：時間）。図 2 のシステイン合成に関連した代謝経路上では、硫黄源の違いにより培養時の代謝物の変動が確認されました。特に対数増殖期から安定期に移行してからの培養時（72 時間以降）において、チオ硫酸塩添加培地でのシステイン合成に関連した化合物の上昇が見られます。また同様にリン脂質の変動に着目してみると、対数増殖期に硫酸塩添加培地において、PE や PS といったリン脂質が大きく増

大していることを確認できます。大腸菌において PE は PS を基質として生合成されることから、細胞膜の主要成分である PE が優先的に生合成されていることが示唆されます（PS より PE が上昇する培養時間が早い）。またシステイン合成経路の上流に位置するセリンをその構造に持つ PS は、基質となるセリンが不足した場合には、システイン合成経路に影響を与える可能性も考えられます。このように培地に添加する硫黄源の違いがシステイン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。またリポミクスデータを重ね合わせることで、関連する代謝変動をより深く理解することができます。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、トリプル四重極型質量分析装置によるメタボローム解析とリポドーム解析を組み合わせることで、より詳細な代謝変動を評価することが可能となります。

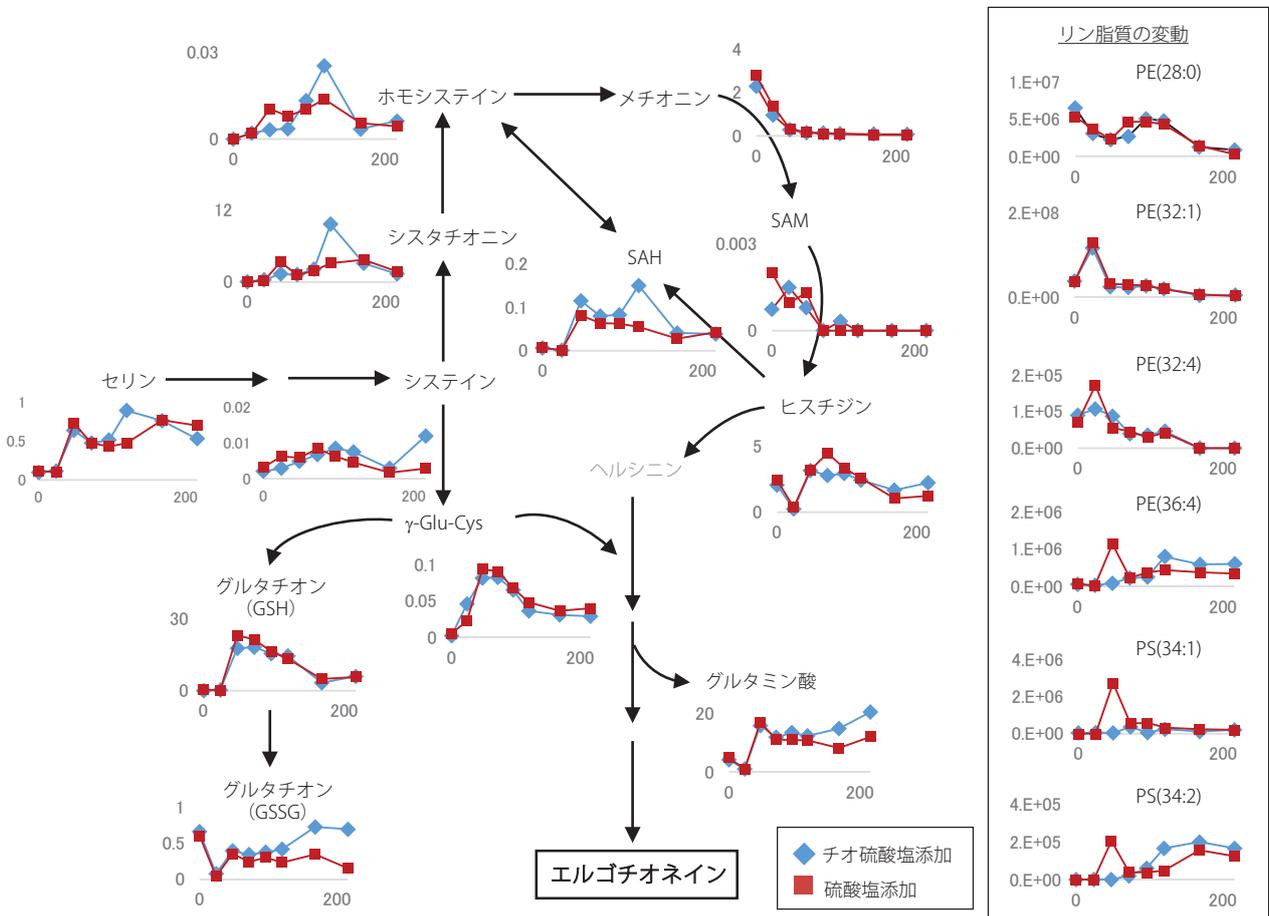


図 2 チオ硫酸塩および硫酸塩添加培地にて培養した大腸菌における含硫代謝物およびリン脂質の変動

\*大腸菌試料は、国立大学法人筑波大学 国際産学連携本部の大津厳生先生、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。

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

初版発行：2017年5月

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。