SHIMADZU
Excellence in Science

Application Note

No. 72

代謝工学

出芽酵母代謝工学株が生産するファイトケミカルの高分解能質量分析による構造確認
－プレニルナリンゲニンの分析－

岡橋 伸幸[1,2,3]、磯貝 章太[4,5,6]、石井 純[4,5,7]、中園 純菜[8]、松田 史生[1,2,3]

■要旨

本レポートでは、バイオプロダクションを担う微生物の代謝工学研究における、高分解能質量分析装置の活用例を紹介します。植物の有用成分であるプレニルナリンゲニンのバイオプロダクションを目指し、植物、微生物由来の外来遺伝子を組み込んだ代謝工学出芽酵母株が構築されました。四重極飛行時間（Q-TOF）型質量分析計LCMS™-9030の持つ高分解能と、*m/z*値の高い正確性を活用することで、夾雑物との判別や生産物の構造の迅速な推定につながりました。高分解能質量分析装置が低炭素社会の実現に向けたバイオプロダクション研究の迅速化に寄与していくことが期待されます。

1. はじめに

近年、微生物を用いた有用物質のバイオプロダクションの重要性が強く認識されるようになっています。バイオ燃料、バイオ化成品原料に加え、植物が生産する複雑な構造を持つ有用物質（ファイトケミカル）の微生物生産を実現することが期待されています。植物が生産するプレニルナリンゲニンは、抗酸化や抗炎症、抗インフルエンザなど様々な生理活性に加え、がんや糖尿病の治療にも有効であることが報告されており、バイオプロダクションのターゲットとして注目されています[1, 2]。プレニルナリンゲニンはフラボノイド骨格を持つナリンゲニンを、プレニル化することで生合成されます。既に遺伝子工学技術を用いて、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae* に植物由来の酵素遺伝子を導入し、ナリンゲニンを生産可能な酵母株が構築されています。一方、微生物の中でナリンゲニンをプレニル化できる有用な遺伝子は、一部の植物を除いて報告されていませんでした。そこで、本研究では様々な植物や微生物から発見されたプレニル化酵素遺伝子を出芽酵母に追加導入し、プレニルナリンゲニンの微生物生産の実現を試みました（図1）[3]。

[1] 大阪大学大学院情報科学研究科
[2] 大阪大学先導的学際研究機構産業バイオイニシアチブ研究部門
[3] 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所
[4] 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科
[5] 高機能遺伝子デザイン技術研究組合（TRAHED）
[6] 奈良先端科学技術大学院大学先端科学研究科バイオサイエンス領域
[7] 神戸大学先端バイオ工学研究センター
[8] 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ライフサイエンスグループ

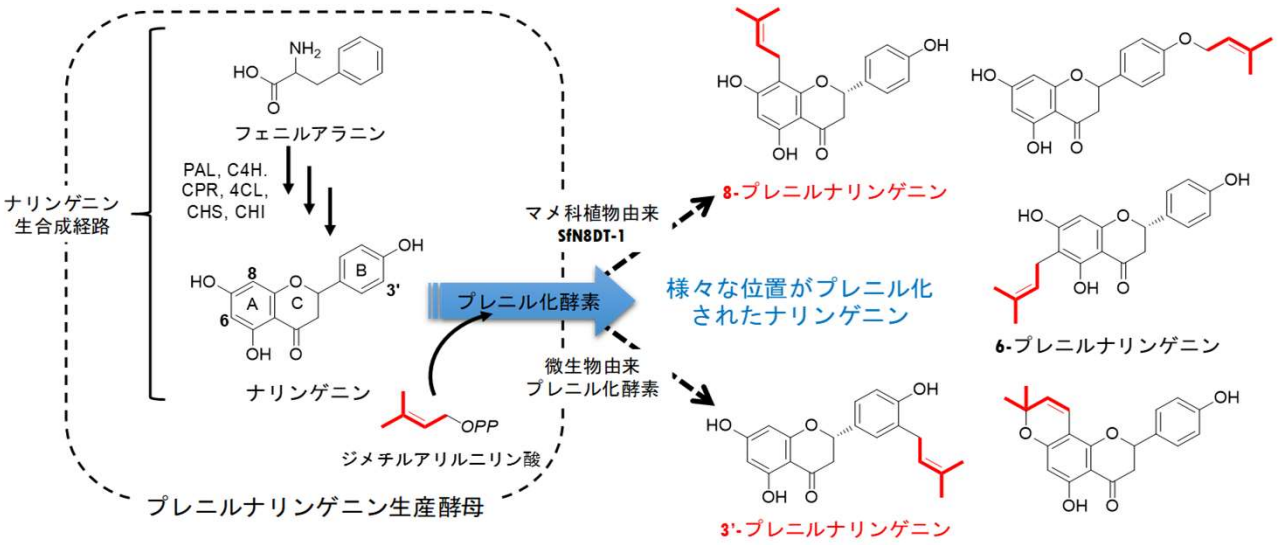

図1　プレニルナリンゲニン生産酵母の代謝工学の概要

2. バイオプロダクションにおける高分解能質量分析の役割

プレニルナリンゲニンには、プレニル化位置が異なる複数の構造異性体があります（図1）。ナリンゲニンをプレニル化する遺伝子の選択性によって、複数の構造異性体が同時に生産される可能性があります。通常は、市販標準化合物を用いたクロマトグラフィーによる保持時間確認によって同定が行われます。それ以前にLCMS-9030のプロダクトイオンスキャンで取得した高分解能プロダクトイオンスペクトルから得られるフラグメント化の情報を用いることで、迅速に候補化合物を絞り込むことが可能になります。さらに、出芽酵母が本来持つ代謝機能などによって、未知の夾雑物が生成されている可能性も排除できません。プレニルナリンゲニン生産出芽酵母株由来の粗抽出物をサーベイし、夾雑物と区別しながら迅速に生産物の構造を推定するためにもLCMS-9030の有する高分解能が力を発揮すると期待されます。

3. プレニルナリンゲニン生産酵母の構築と評価

研究チームではまず、前駆体のフェニルアラニンからナリンゲニンを合成する経路を出芽酵母に構築しました。シロイヌナズナ*Arabidopsis thaliana* 由来の6遺伝子　(*AtPAL1, AtC4H, AtCPR1, At4CL3, AtCHS3, AtCHI1*) を導入した株を構築しました。植物と同じ真核生物に属する出芽酵母の利点を活かし、植物由来の遺伝子を工夫しながら利用することで、ナリンゲニンの生産が確認されました。

つぎに、植物や微生物のゲノム情報データベースからプレニル化酵素のアミノ酸配列を11種取得し、合成遺伝子をナリンゲニン生産出芽酵母に追加導入しました。例えば、マメ科植物クララ*Sophora flavescens* 由来のプレニル化酵素SfN8DT-1を発現した代謝工学出芽酵母株から代謝物を抽出し、シングル四重極型のLC-MSを用いてプレニルナリンゲニンの脱プロトン化分子 $[M-H]^-$（*m/z* 339.1）を選択イオンモニタリングモードで分析しました。その結果複数のシグナルが観察されました。これらの中には、目的のプレニルナリンゲニンや、夾雑物由来のシグナルが含まれる可能性があります。しかし、これ以上の情報を得ることができませんでした。

4. 四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030を用いたプレニルナリンゲニンの構造推定

そこでさらなる情報を得るために、液体クロマトグラフ－四重極飛行時間型質量分析計（LCMS-9030）を検出器として用いて、スキャンモードでデータを取得しました（表1）。まず、プレニルナリンゲニンの脱プロトン化分子 $[M-H]^-$（*m/z* 339.124）に注目し、*m/z* 339.124±0.25の抽出イオンクロマトグラムを作成しました（図2(a)）。その結果、やはり複数のピークが観察されました。そこで、プレニルナリンゲニンを選択的に検出するため、幅5ppm（*m/z* 339.124±0.002）という極めて狭い範囲の抽出イオンクロマトグラムを作成しました（図2(b)）。すると保持時間19.5分のシグナルのみが検出されました。取得したデータを精査すると、図2(a)の※のピークは*m/z* 399.199を持つ無関係の夾雑物に起因すると判断できました。

次いで、検出したシグナル（Compound 1）をターゲットとしてプロダクトイオンスキャンモードで、プロダクトイオンスペクトルを取得しました（図3(a)）。得られたプロダクトイオンスペクトルをクエリとして、公共プロダクトイオンスペクトルデータベースであるMassBank (http://www.massbank.jp/) で検索すると、非常に高い類似度で、6-プレニルナリンゲニン (ACCESSION: BS003003) 、8-プレニルナリンゲニン (BS003083) がヒットしました。さらに既報の8-プレニルナリンゲニンのCIDフラグメント化機構と照合すると、予想フラグメントの*m/z* と実測値が0.001以下の非常に小さい誤差で一致しました（図3(a-c), 表2）[4]。したがって、Compound 1は6-プレニルナリンゲニンあるいは8-プレニルナリンゲニンであると推定しました。精密質量やプロダクトイオンスペクトルのみからは、6-プレニルナリンゲニンと8-プレニルナリンゲニンの構造異性体を区別することはできませんが、候補化合物を絞り込むことが可能になりました。そこで、市販の8-プレニルナリンゲニン、 6-プレニルナリンゲニンを用いた保持時間確認を行いました（図4(b-c)）。その結果、 Compound 1は8-プレニルナリンゲニンであると同定しました（図4(a-b)）。また他の生物由来のプレニル化酵素を発現した出芽酵母株についても同様の解析を行い、一般的に基質選択性が植物より低いと言われる微生物由来のプレニル化酵素（真菌 *Neosartorya fischeri* 由来）を用いることで、3'-プレニルナリンゲニンを合成する株の構築にも成功しました[3]。今後、異なる構造を持つプレニルナリンゲニン異性体を作り分けることで、様々な生理活性を持つ化合物のバイオプロダクションが可能になると期待されます。

表 1　出芽酵母粗抽出物のLC-MS分析条件

[LC]	
Instrument	: Nexera™ X2
Column	: COSMOSIL 5C_{18}-MSII column (2.0 mm I.D.× 150 mm, 5 mm, ナカライテスク)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Mobile phase A	: Ultrapure Water (QTofMS用, Wako) ＋ 0.1% Acetic acid (Sigma-Aldrich)
Mobile phase B	: Acetonitrile (QTofMS用, Wako) ＋ 0.1% Acetic acid (Sigma-Aldrich)
Time program (B conc.)	: 20% (0 min) - 80% (34 min) - 95% (35-40 min) - 20% (40.1-55 min)
Column temp.	: 30℃
[Q-TOF-MS]	
Instrument	: LCMS-9030
Ionization	: ESI
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
DL temp.	: 300℃
BH temp.	: 400℃
Interface temp.	: 300℃
Mode	: MS scan (0.5 s) + MS/MS scan (0.5 s, precursor ion *m/z* 339.1)
MS scan range	: *m/z* 70-1000
MS/MS scan range	: *m/z* 70-350
Q1 resolution	: Low
Collision energy	: 35 V
Collision energy spread (±)	: 17 V

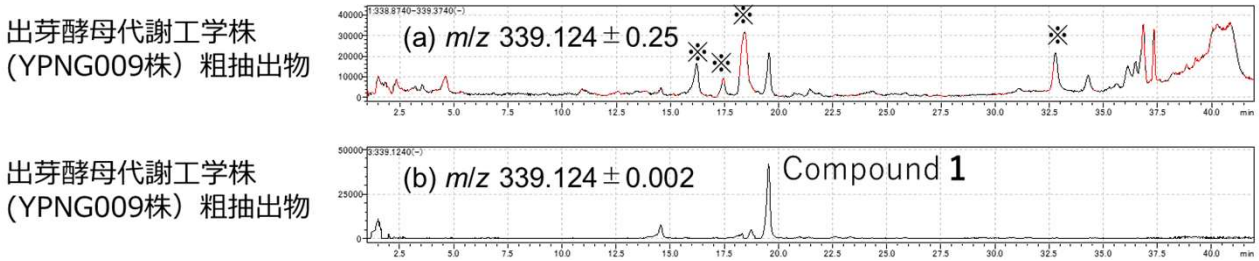

図 2　LCMS-9030で取得した出芽酵母代謝工学株粗抽出物の抽出イオンクロマトグラム

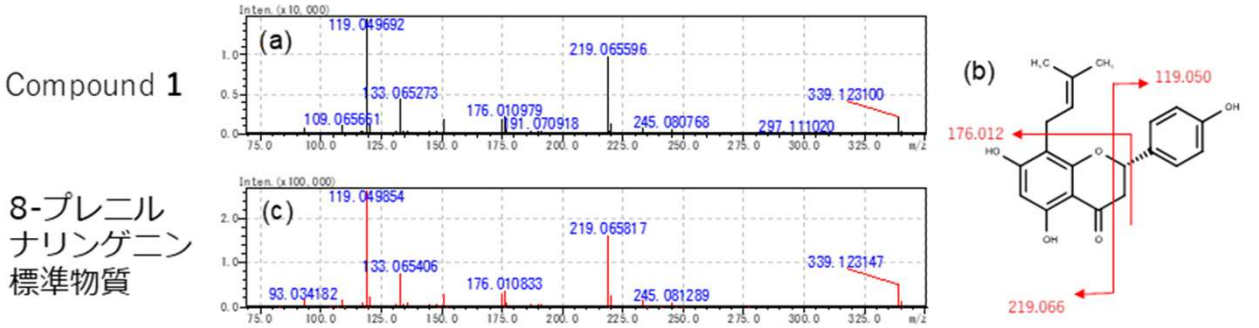

図 3　Compound 1 のプロダクトイオンスペクトル

表 2　LCMS-9030で取得したCompound 1（8-プレニルナリンゲニン）のプロダクトイオンスペクトルデータの比較

	m/z		
フラグメントイオン	理論値	Compound 1	8-プレニルナリンゲニン標準物質
$[C_{20}H_{19}O_5]^-$	339.1232	339.1230	339.1231
$[C_{12}H_{11}O_4]^-$	219.0657	219.0656	219.0658
$[C_9H_4O_4]^-$	176.0110	176.0110	176.0108
$[C_8H_7O]^-$	119.0500	119.0500	119.0500

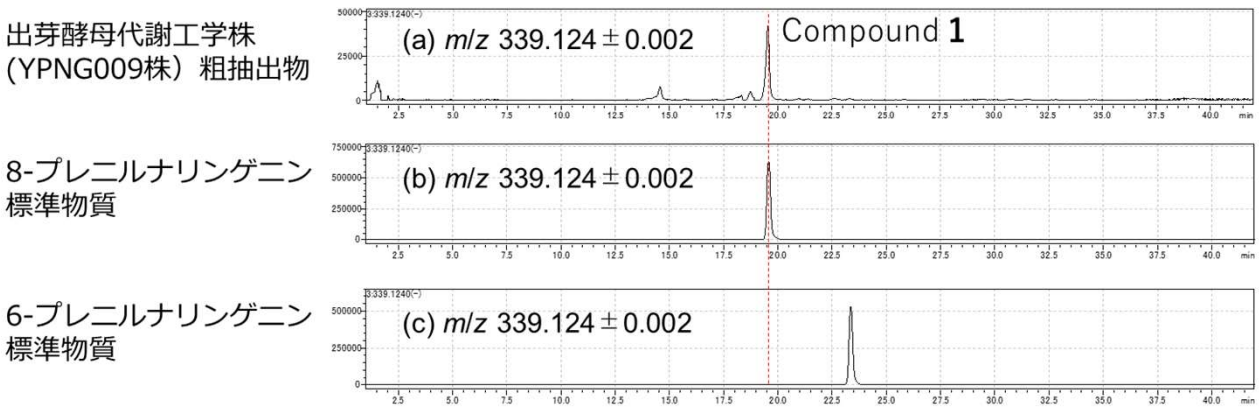

図 4　Compound 1とプレニルナリンゲニン標準品の保持時間比較

5. まとめ

バイオプロダクションを担う微生物の代謝工学研究は近年大きく進展し、作成した代謝工学株の評価の迅速化が求められています。LCMS-9030の持つ高分解能と、*m/z*値の高い正確性を活用することで、代謝工学株の生産物の構造を迅速に推定することができました。低炭素社会の実現に向け、様々な化合物のバイオプロダクションが試みられており、その迅速な研究開発に高分解能質量分析計が寄与すると期待されます。

<参考文献>
1) Cui, L., Ndinteh, D. T., Na, M., Thuong, P. T., Silike-Muruumu, J., Njamen, D., Mbafor, J. T., Fomum, Z. T., Ahn, J. S., and Oh, W. K.: Isoprenylated flavonoids from the stem bark of Erythrina abyssinica, *J. Nat. Prod.,* 70, 1039-1042 (2007).
2) Wang, S., Dunlap, T. L., Howell, C. E., Mbachu, O. C., Rue, E. A., Phansalkar, R., Chen, S. N., Pauli, G. F., Dietz, B. M., and Bolton, J. L.: Hop (Humulus lupulus L.) Extract and 6-Prenylnaringenin Induce P450 1A1 Catalyzed Estrogen 2-Hydroxylation, *Chem. Res. Toxicol.,* 29, 1142-1150 (2016).
3) Isogai, S., Okahashi, N., Asama, R., Nakamura, T., Hasunuma, T., Matsuda, F., Ishii, J., and Kondo, A.: Synthetic production of prenylated naringenins in yeast using promiscuous microbial prenyltransferases, *Metab Eng Comm,* in press (2021).
4) Nikolic, D., Li, Y., Chadwick, L. R., Grubjesic, S., Schwab, P., Metz, P., and van Breemen, R. B.: Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (Humulus lupulus), by human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.,* 32, 272-279 (2004).

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

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。
本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。
掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。
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。

初版発行：2021年12月
© Shimadzu Corporation, 2021