

国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

研究領域「低炭素社会のためのメタボロミクス」

研究課題名「1-ブタノール生産に資する新規メタボリック解析システムの開発」

平成 23 年度実施報告書

研究代表者 福崎英一郎

大阪大学大学院工学研究科 教授

1. 研究実施の概要

1. GC/MS および LC/MS を基盤とした包括的メタボロミクスプラットフォームの開発および代謝工学への応用

メタボロミクスでは、ターゲット（目標あり）とノンターゲット（目標なし）の代謝物プロファイリング技術が両方必要とされている。ガスクロマトグラフィー - 質量分析（GC/MS）はメタボロミクスの中心技術の一つであり、特に親水性代謝物のターゲット分析およびノンターゲット分析によく用いられる。GC/MS 分析技術において一つ大きな課題は分析装置に依存しない生データの処理と未知代謝物の同定・注釈の自動化である。特にノンターゲット代謝物プロファイリングにおいては、正確な質量ピークの同定が必須である。我々はこの条件を満たす方法論的プラットフォームの開発を行った。まず、一段四重極 GC-MS によるノンターゲット代謝物プロファイリング分析系を最適化し、データ処理のために。ピーク同定アルゴリズムと SIMCA 分類法に基づいた未知ピーク注釈アルゴリズム両方を包括したソフトウェアを開発した。また、ソフトウェアが自動的に行うピークの照合・同定に必要な代謝物リファレンスライブラリーも構築した。上記に加えて、LC/MS を用いて微生物代謝解析に重要な CoA 化合物の精密定量系を検討した。平成 23 年度は、約 20 種類の CoA 化合物（市販品）を標準品として LC-MS での分析系を検討した。

2. ^{13}C 代謝フラックス解析システムを用いた細胞評価系の開発

解析に用いるモデルの自動合成を行えるプラットフォームの開発を行った。本プラットフォームでは、代謝反応、原子マッピングに関する情報を含むファイル設定を行うことにより、代謝バランスを表現するモデルを自動生成した。本ファイルにおける人為的設定ミスもチェックが可能なようにプラットフォームの開発を行った。また、ゲノムスケールの代謝反応モデルを用いて *in silico* 代謝デザインと遺伝子改変の評価系の統合により細胞工場の代謝改変の最適化を行うシステムを検討した。微生物の中枢代謝経路の代謝反応の情報を集積し、代謝解析を行うための準備を行った。平成 24 年度以降、本研究で開発したシステムを用いて米国サイド Liao グループと連携し 1-ブタノール生産の代謝改変デザインのための性能評価を行って生産の高度化を行う予定である。

3. 中心代謝成分一斉プロファイリングシステムの開発

高速液体クロマトグラフィー—トリプル四重極型質量分析装置（LC-QqQ-MS）を用いたワイドターゲットメタボローム分析法の開発し、高速 ^{13}C 基盤フラックス解析の予備検討を実施した。

具体的には、糖リン酸、CoA化合物、有機酸といった中心代謝成分を一斉に定量する代謝プロファイル分析法を開発した。これを発展させ ^{13}C フラックス解析の高精度化を検討した。酵母、大腸菌の中心代謝経路に関わる代謝産物を一斉に測定する高感度分析系の開発を行った。また、構造未知物質を測定する基礎となるMS/MSデータの取得を行った。微生物の代謝工学研究で必要とされる糖リン酸、CoA化合物、有機酸といった中心代謝の既知代謝成分を対象にした高感度かつ高い再現性、高スループットでのプロファイル分析が可能な分析法を高速液体クロマトグラフィー—トリプル四重極型質量分析装置（LC-QqQ-MS）を持ちいて開発した。また、未知代謝成分を分析可能なワイドターゲット分析法の開発に向けて、酵母、大腸菌の抽出液中代謝物のMS/MSスペクトラムを網羅的に収集した。今後、本研究で開発した高感度かつ高い再現性、高スループットな中心代謝産物分析法と、より精度の高い代謝フラックスの測定法を運用し、微生物細胞中での代謝プロファイルと代謝フラックスの関連を明らかにし、1-ブタノール生産性向上に資する情報を収集する予定である。

2. 研究実施体制

(1)「福崎」グループ(研究機関別)

① 研究者名(当該研究実施年度の所属、役職)

	氏名	所属	役職	参加時期
○	福崎 英一郎	大阪大学 大学院工学研究科	教授	H23.12～
	馬場 健史	大阪大学 大学院工学研究科	准教授	H23.12～
	Sastia Prama Putri	大阪大学 大学院工学研究科	博士研究員	H24・1～
	中山泰宗	大阪大学 大学院工学研究科	大学院学生 (D2)	H24・1～
	津川裕司	大阪大学 大学院工学研究科	大学院学生 (D1)	H24・1～
	Zanariah Binti Hashim	大阪大学 大学院工学研究科	大学院学生 (D1)	H24・1～
	Teoh Shao Thing	大阪大学 大学院工学研究科	大学院学生 (M1)	H24・1～
	平子哲也	大阪大学 大学院工学研究科	大学院学生 (M1)	H24・1～

② 研究項目

GC/MSを基盤とした包括的メタボロミクスプラットフォームの開発およびその代謝工学における戦略的ターゲット認識への応用

(2)「清水」グループ(研究機関別)

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	清水 浩	大阪大学 大学院情報科学研究科	教授	H23.12～
	古澤 力	大阪大学 大学院情報科学研究科	准教授	H23.12～
	平沢 敬	大阪大学 大学院情報科学研究科	助教	H23.12～
	梶畠 秀一	大阪大学 大学院情報科学研究科	RA	H23.12～
	大野 聡	大阪大学 大学院情報科学研究科	RA	H23.12～
	仲嶋 翼	大阪大学 大学院情報科学研究科	RA	H23.12～

② 研究項目

代謝フラックス解析プラットフォームの開発

(3)「神戸大」グループ(研究機関別)

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	松田 史生	神戸大学自然科学系先端 融合研究環重点研究部	准教授	H23.10～
	近藤 昭彦	神戸大学 大学院工学研究科	教授	H23.10～

② 研究項目:高速液体クロマトグラフィー—トリプル四重極型質量分析装置(LC-QqQ-MS)を用いたワ

3. 研究実施内容

大阪大学 福崎グループ

1-ブタノール生産性向上に資する微生物代謝解析のためのメタボロミクスプラットフォームの開発

1) GC/MS を基盤としたノンターゲットとターゲット代謝物プロファイリングシステムの開発

メタボロミクスでは、ターゲット（目標あり）とノンターゲット（目標なし）の代謝物プロファイリング技術が両方必要とされている（図1）。ガスクロマトグラフィー-質量分析（GC/MS）はメタボロミクスの中心技術の一つであり、特に親水性代謝物のターゲット分析およびノンターゲット分析によく用いられる。GC/MS 分析技術において一つ大きな課題は分析装置に依存しない生データの処理と未知代謝物の同定・注釈の自動化である。特にノンターゲット代謝物プロファイリングにおいては、正確な質量ピークの同定が必須である。そこで、我々はこの条件を満たす方法論的プラットフォームの開発を行った。

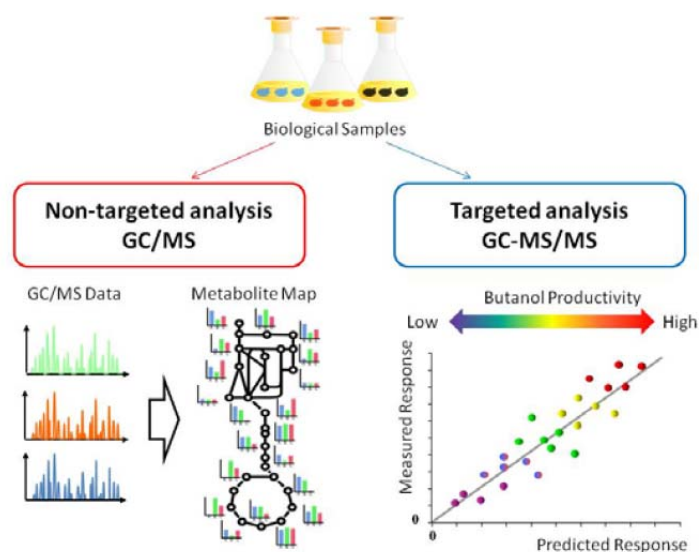


図1. GC/MS分析におけるターゲット分析とノンターゲット分析

本研究では一段GC-MS分析系と縦列（タンデム）GC-MS/MS 分析系を利用した。

一段GC-MS 分析はノンターゲット代謝プロファイリングに用い、トランスジェニック大腸菌における代謝摂動の概観をとらえ、重要で精密に計測すべき代謝物について指針を得る。データ処理は本研究室内で開発された、ピーク同定アルゴリズムとSIMCA 分類法（図1）に基づいた未知ピーク注釈アルゴリズム両方を包括したソフトウェアを用いて行うことが可能になった。

また、ソフトウェアが自動的に行うピークの照合・同定に必要な代謝物リファレンスライブラリーも構築した。

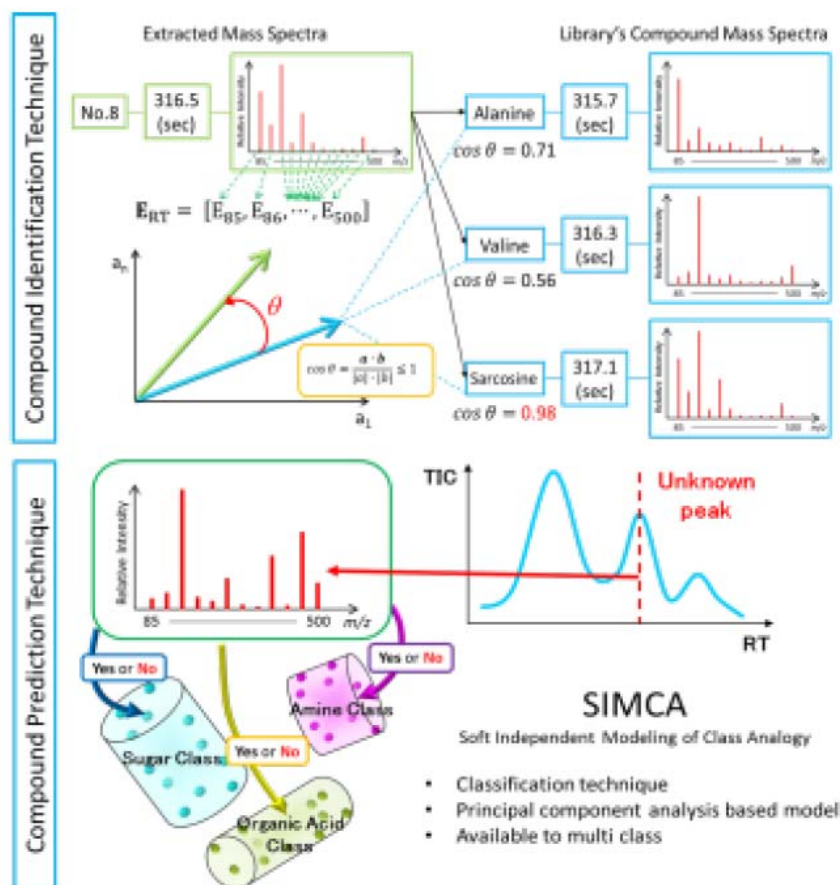


図 2. ピークの同定と予測のためのアルゴリズム

一方、ターゲットメボロミクスにはタンデム GC-MS/MS 分析と予測モデル構築を用いる。予測モデルの構築は潜在構造投影 (Projection to Latent Structures; PLS) 教師あり回帰分析により行い、注目された代謝物とブタノール生産能力との関係を解明する。このような予測モデルに必要なメタボロームデータを得るためには、標的代謝物を正確に同定し、精密に定量することが重要である。この条件を満たすに、GC 三連四重極質量分析、(GC-QqQ-MS) を最適化 (SRM パラメータの判定など) して利用することが必要となる。上記に加えて、LC-QQQ-MS を用いた分析系により CoA 類分析系の予備検討を行った。次年度第 1 四半期には完成する見込みである。すでに本分析プラットフォームが確立されたので、以下のタスク 2 で検証し、更に US チーム (Liao 教授@UCLA) との共同研究で 1-ブタノール生産トランスジェニック大腸菌のメタボローム解析およびその生産能の向上へ導く戦略の提案に応用することが計画されている。

¹³C代謝フラックス解析システムを用いた細胞評価系の開発

微生物を細胞工場として利用した物質生産の応用において、その生産効率を改善して生産性を高める方策を得るためには、その微生物の代謝過程の中でどのような物質が生成されているかを知るだけでなく、それぞれの代謝反応の流量、代謝フラックスそのものを理解することが重要である。本グループでは、メタボロミクスで測定されたデータをもとに、細胞内の代謝系における各代謝反応のフラックスの分布を効率よく解析するためのプラットフォームの開発を行う。本研究グループは細胞レベルでの代謝経路の活性化状態を実験的に評価できるシステムを開発することを目的とする。具体的には、解析に用いるモデルの自動合成を行えるプラットフォームの開発を行う。本プラットフォームでは、代謝反応、反応間での原子の移動を示す原子マッピングに関する情報を含むファイル設定を行うことにより、代謝フラックスのバランスを表現するモデルをコンピュータ上で自動生成するプログラムパッケージを開発する。平成 23 年度は、微生物の中枢代謝経路の代謝反応の情報を集積し、代謝フラックス解析を行うための準備を行った。*Escherichia coli* の代謝経路情報を取得し、モデル自動生成を行うための代謝反応、反応間での原子の移動を示すマッピングに関する必要な要件を絞り込むことを考えた。

細胞が取り込んだ基質をどのように代謝して目的の代謝物質を作り出しているか、その代謝反応の流量を測定するひとつの方法が、炭素の安定同位体である¹³Cを含んだ基質を用いたフラックス解析の手法である。この方法では、代謝反応で化合物が作り替えられていく過程で、取り込まれた同位体の炭素原子が個々の化合物のどの位置に移動して行くかを追跡するモデルを構築し、GC-MS、CE-MS等の質量分析器で測定された細胞内代謝物質の同位体の分布からフラックスを逆算する。

この解析モデルの構築には代謝経路の各反応における原子の移動の全てを網羅した非常に多数の方程式の構築が必要なため、遺伝子操作などによって代謝の経路を改変させた株の代謝など、さまざまな対象の細胞のフラックスを効率よく解析するには、与えられた任意の代謝ネットワークに応じて動的に原子の移動のモデルを自動構築することができるようなシステムの構築が不可欠といえる。

まず、代謝反応における原子の移動のモデルを構築する。例としてピルビン酸からアセチルCo-Aへの変換を図 1 に示す。この反応ではピルビン酸の一位の炭素が酸化されて二酸化炭素となり、残りの炭素が補酵素Aと結合する。¹³C同位体の追跡では、これらの原子の移動を計算するため、まず、各化合物のどの位置に¹³Cが含まれているかの分布を表すベクトル IDV

(Isotopomer distribution vector) を定義する。たとえばピルビン酸の場合では、三つの炭素がそれぞれラベル化されているか否か、すなわち¹³Cに置き換えられているか否かを 1 と 0 で表すと、000 から 111 まで 8 通りの組み合わせがある。細胞内のピルビン酸にどの組み合わせの同位体がどれだけ含まれているかの比率がピルビン酸のIDVとしてモデル上で表される。フラックス解析モデルの構築には、代謝回路におけるそれぞれの化合物において、このように全てのラベル化のパターンを構築し、IDVとして用意する必要がある。

次に、各代謝反応での炭素の移動を示す変換行列 IMM (Isotopomer Mapping Matrix) を定義する。図 1 のピルビン酸からアセチル Co-A の例では、ピルビン酸の 8 通りの組み合わせからアセチル Co-A の 4 通りの組み合わせに変換されるため、次のような行列

$$\text{IMM}_{\text{Pyr} \rightarrow \text{AcCoA}} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (1)$$

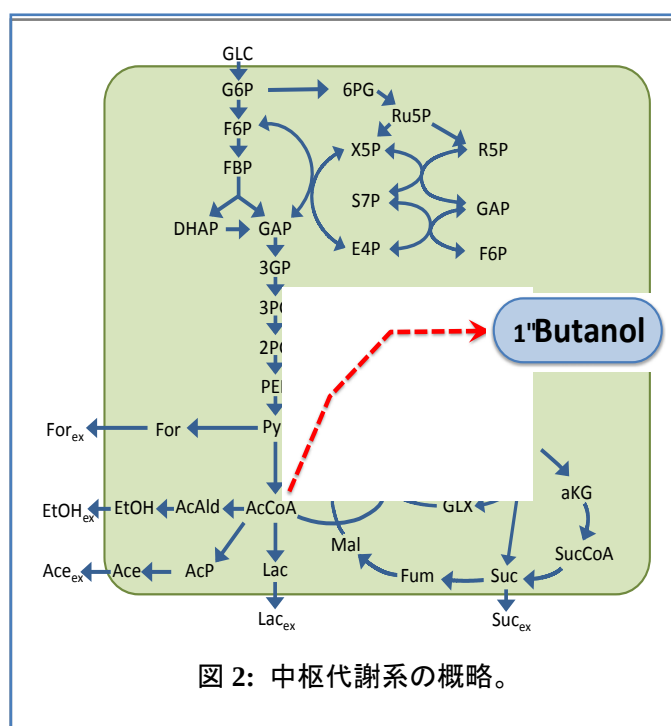
をピルビン酸の IDV にかけることで、反応後のアセチル Co-A の IDV を求めることができる。これをピルビン酸からアセチル Co-A への IMM とする。モデルに含まれる全ての化学反応において、その基質と生成物の組み合わせに対し、このような変換行列が対応することになる。このようにして生成した IDV、IMM を用いると、化合物 X に対する収支式を IDV のベクトルに対応する連立方程式として次のように表すことができる。

$$\frac{d\text{IDV}_X}{dt} = \sum_{X'} f_{X' \rightarrow X} \text{IMM}_{X' \rightarrow X} \text{IDV}_{X'} - \sum_{X''} f_{X \rightarrow X''} \text{IDV}_X \quad (2)$$

ここで、 $f_{X' \rightarrow X}$ 、 $f_{X \rightarrow X''}$ はそれぞれ化合物 X を生成する反応、及び消費する反応のフラックス量を表すものとする。すべての化合物の IDV に対する反応を合わせると数百次元の連立方程式になるため、本プロジェクトでは、与えられた代謝反応のリストとその反応での原子の移動の対応表からこれらの IDV、IMM を自動的に生成するアルゴリズムを開発している。

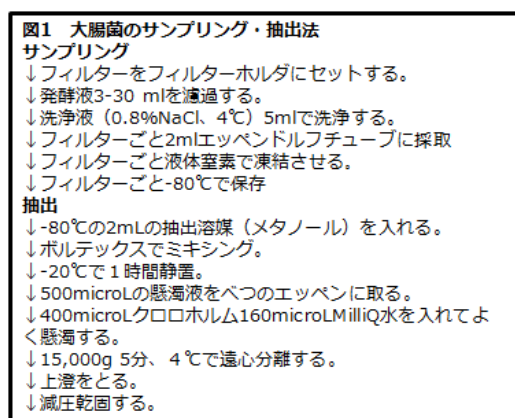
これらのモデルを構築することで代謝経路におけるフラックスをシミュレーションすることが可能となるが、実際に質量分析器で測定することができるのは代謝物質の同位体の質量であり、分子内に含まれる ^{13}C 同位体の数は区別できるが、どの位置にその ^{13}C が位置しているかは区別できないことに注意する必要がある。そのため、IDV としてモデル化された同位体の分布の中で、含まれる同位体の個数が同じものを足し合わせ、質量数ごとの分布に変換したものを MDV (Mass distribution vector) として定義するものとする。モデルから計算された IDV をこの MDV に変換した値と実際に測定された各化合物の MDV とを比較し、その誤差を最小とするようなパラメーターを求めることで細胞内のフラックスの分布を定量的に予測することがこのプラットフォームを用いたフラックス解析の方法となる。

平成 23 年度は、本プラットフォーム開発の準備段階として自動生成アルゴリズムの基本部分の設計を行った。また、*Escherichia coli* の代謝反応のうち、解糖系、ペントースリン酸回路、TCA 回路を含む中枢代謝経路（図 2）の反応リスト及び原子の移動のマップをデータとして集積し、それぞれの代謝反応のデータから各化合物の IDV と MDV、及び、各反応についての IMM を作成した。これに Liao グループの先行研究 (Shen and Liao, Metabolic Engineering, 2008) で導入されているブタノール生産経路を追加したモデルを構築し、1-Butanol 生成を目的とした代謝設計に必要とされる大腸菌の代謝を解析するモデルとして利用する予定である。



高速液体クロマトグラフィーートリプル四重極型質量分析装置（LC-QqQ-MS）を用いたワイドターゲットメタボローム分析法の開発

平成 23 年度は、まず、酵母、大腸菌の中心代謝経路に関わる代謝産物を一斉に測定する高感度分析系の開発を行った。これまで、酵母菌体中の 99 種の中心代謝産物を抽出し、GC-MS および LC-MS/MS をもちいて、一斉定量分析を行う手法を確立している(Kato *et al.* 2012 JBB in press)。これをもとに、LC-MS/MS 分析条件を最適化して 2 倍の高感度化を達成した。さらに、本プロジェクトでターゲットとする大腸菌について、菌体の回収、抽出方法の条件を検討し、基準プロトコールを設定した(図1)。さらに、菌体をフィルターで回収後、洗浄時に、菌体内代謝産物、特に補酵素類がリークしていることから、菌体の洗浄はできるだけ行わないことが重要であることが判明した。今後ブタノール生産菌の分析を実施する場合は、無機培地を用いることが望ましい。リッチな培地を用いる場合も、培地から混入する代謝産物を把握し、培地からの干渉を受けない場合は、菌体の洗浄をできるだけ行わず分析するなどの対策が必要であることを確かめた。



ついで、構造未知物質を測定する基礎となる MS/MS データの取得を行った。これまで、MS/MS データを取得する際の条件を検討し、コリジョン電圧が 20V にするとよいことを確認した。現在これをもとにデータの取得および解析を進めている。

さらに、グルコース-6-リン酸、ピルビン酸、リンゴ酸などの微量中間体の同位体濃縮度を測定する手法を確立した。まず、上記で確立したLC-MS/MSを用いた一斉定量分析法のMRM系列データをもとに、解糖系、TCAサイクル、ペントースリン酸経路の中間体である、19 個の中間体(G1P, G6P, F6P, FBP, X5P, Ru5P, R5P, S7P, E4P, DHAP, GA3P, 2PG, PEP, PYR, 2-ketoglutarate, aconitate, succinate, fumarate, malate, oxaloacetate)の同位体濃縮度を定量するための検出法を作成した。たとえばG6P(グルコース-6-リン酸)の場合、本化合物を検出するMRM系列を、プリカーサーイオンを m/z 259 ([M-H]⁻炭素原子6個)、プロダクトイオンを m/z 79(PO₃⁻炭素原子0個)と設定している。このMRM系列を 259/79 (0/0)と表記する。かっこ内の数字はそれぞれ、プリカーサーとプロダクトイオンに含まれる安定同位体原子数を示す。したがって、6 個の炭素原子のどれかが¹³CラベルしたG6Pは、260/79(1/0)のMRM系列で選択的に検出可能である。同様に、2、3、4、5、6 個の炭素原子が¹³CラベルしたG6Pを検出するために、それぞれ 261/79 (2/0), 262/79 (3/0), 263/79 (4/0), 264/79 (5/0), 265/79 (6/0)のMRM系列を設定した。リン酸化された中心代謝産物では、MS/MS分析により、リン酸が主要なプロダクトイオンとして生成する。このため、リン酸化中心代謝産物を観測する際は、分子中の¹³Cラベル化した炭素の総数を知ることが可能であるが、ラベル化された位置については情報を与えない。厳密にいうと、G6Pの¹³Cラベル化のパターンは総計 $2^6 = 64$ 個あるがそれらをわずか 7 つのMRMでまとめて計測することになる。

一方、PYR(pyruvate)の場合、プリカーサーイオンを m/z 87 ([M-H]⁻炭素数3)、プロダクトイオンを m/z 43 ([M-COO-H]⁻炭素数2)に設定したMRM系列で検出を行う。[1-¹³Cグルコース]から 3 種の経路(解糖経路、ED経路、PPP経路)を経て生成したピルビン酸は¹³Cラベル化のパターンが異なる。このうち解糖経路とED経路を経て生成したピルビン酸はそれぞれ、3 位と 1 位が¹³Cラベル化している。シングルMSを用い

た分析では、分子内の ^{13}C の総数に基づいて選択的な検出を行うため、解糖経路とED経路に由来するアイソトプマーを区別できない。一方、MS/MSをもちいることで、解糖経路とED経路に由来するアイソトプマーの区別が可能となる。リンゴ酸など他の中間代謝産物についても同様にMRM系列の設定を行い、メソッドの構築を行った。

作成した同位体濃縮度測定用メソッドの検証を行った。大腸菌(*E. coli*) BW25113 株を 5mL の M9 培地中 (炭素源として 100%, 1- ^{13}C グルコースを含む) で試験管に植菌した。37°C 200 rpm で培養し、対数増殖期にサンプリングを行った。フィルターを用いて菌体を回収し、上記の方法で、クエンチ、抽出し、LC-MS/MS 分析に供した。得られたデータは各MRMチャンネルごとにピーク面積を測定し、今回は、G6PとPYRの同位体濃縮度を測定した。G6Pの分子中1つの炭素が ^{13}C ラベル化したシグナルの同位体濃縮度は89%であり、大腸菌菌体中のグルコースが効率的にラベル化されていることを確かめた。また、PYRの同位体濃縮度を調べると、解糖系に由来するものは47%であったのに対し、ED経路に由来するものは1%と非常に少なかったことから、ED経路のフラックスは非常に少ないことが明確に示された。これまでのフラックス解析では、ED経路のフラックスを正確に測定することが難しかったが、LC-MS/MS法を導入することで、より高精度な分析が可能になることが示された。

4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

① 発表総数
なし

② 論文詳細情報

(4-2) 特許出願

① 平成 23 年度特許出願内訳
なし

② 本事業での研究期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)
なし

(4-3) 国際学会および主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内 0 件、国際 0 件)
なし
- ② 口頭講演 (国内 0 件、国際 0 件)
なし
- ③ ポスター発表 (国内 0 件、国際 0 件)
なし

(4-4) 受賞等

- ① 受賞 なし
- ② 新聞報道 なし
- ③ その他の成果発表 なし

(4-5) その他特記事項

なし

5. 主催したワークショップ等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2012 年 2 月 18 日	米国側とのチームミーティング	成田ヒルトンホテル内	8	日米の役割分担と 24 年度到達目標を議論した. Skype を用いた月例ミーティングの方法について決定した.

6. 学生・研究者の派遣、受け入れ等

(派遣)

派遣者： 教授(大阪大学) 1名

派遣先： UCLA

派遣期間： 2012 年1月29日～1月31日(3日)

(派遣)

派遣者： ポスドク (大阪大学) 1名

派遣先： UCLA

派遣期間： 2012 年 3 月 10 日～3 月 18 日 (8 日)

(派遣)

派遣者： ポスドク (大阪大学) 1名 修士 学生 (大阪大学) 1名

派遣先： 神戸大学

派遣期間： 2012 年 3 月 28 日～3 月 28 日 (1 日)

(受け入れ)

なし

以上