

2B11-3 大腸菌のTCA関連遺伝子破壊が培養特性および代謝におよぼす影響について

○指原 卓也, Mahabuba RAHMAN, Li MAI, 城戸 大助, Mohammad KABIR, 清水 和幸
(九工大)

【目的】 効率的な有用物質生産のためには、細胞の代謝調節機構を定量的に解析する必要がある。また、特定の遺伝子を破壊すると、通常はよく見えない細胞の調節機構が見えてくるはずである。このため本研究ではATP生成に重要な役割を果たすTCA回路の遺伝子を破壊した大腸菌細胞について網羅的な代謝解析を行った。

【方法および結果】

培養体積3L規模のバイオリアクターを用いて、野生株大腸菌BW25113、およびTCA関連遺伝子欠損株 (*gluA*-, *acnA*-, *acnB*-, *icdA*-, *sucA*-, *sucC*-, *sdhA*-, *sdhC*-, *fumA*-, *fumC*-, *aceA*-) の実験を行った。天然培地およびグルコースを炭素源としたM9合成培地を用い、温度37°C、PH7.0の好気条件下で回分培養実験を行った。また10%の[U-13C]グルコース、10%の[1-13C]グルコースおよび80%の通常のグルコースの混合物を炭素源とした連続培養を行い、細胞内代謝流分布を求めた。さらにRT-PCRを用いた遺伝子発現、酵素活性の測定を行って細胞の代謝機構を明らかにしようと試みた。その結果、*gluA* や *acnA*, *B* 欠損株では酢酸が野生株に比べてやや多く生成し、生成した酢酸は消費されなことが分かった。また*sucA*欠損株ではグリオキシル酸経路が活性化され、*sdhA*, *C* 欠損株ではコハク酸が生成することが分かった。*sucA*, *C* および *fumA*, *C* 欠損株については同位体実験により、TCA回路とグリオキシル酸経路との調節をフラックスの点から明らかにした。

Effect of single-gene knockout for Tricarboxylic Acid Cycle on the metabolic regulation in *Escherichia coli*

○Takuya SASHIHARA, Mahabuba RAHMAN, Li MAI, Daisuke KIDO, Mohammad KABIR, kazuyuki SIMIZU
(Kyushu Inst. Tech.)

Key words *Escherichia coli*, gene expression analysis, gene knockout, TCA cycle

2B11-5 Metabolic profiling of green Tea, *Camellia sinensis*, and its application as quality assessment

○Wipawee PONGSUWAN¹, Eiichiro FUKUSAKI¹, Tsutomu YONETANI², Takeshi BAMBA³, Akio KOBAYASHI¹

(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Tea branch, Nara Prefecture Agricultural Experiment Station, ³Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Green tea is classified to several grades according to their materials and manufacturing process, which cause a variation in green tea metabolites. To understand the sensory evaluation results, metabolic profiling of Japanese green tea is analyzed. As the previous work, green tea samples were analyzed in order to verify the components that played an important role in the evaluation of green tea ranking. Major hydrophilic-primary metabolite profiling of Japanese green tea were amino acids, organic acids and sugars. The important contributors to the differences between low and high grade green tea were quantity of quinic acid, phosphoric acid, aspartic acid, glutamic acid, theanine, glutamine and different concentration of sugars, fructose, mannose, sucrose, ribose and arabinopyranose. By applying a regression method called Projections to Latent Structure (PLS) integrated with spectral filtering method, green tea's quality-its metabolic profiling relationship model was created. This model was considered to be one effective model in quality prediction and assessment of unknown-rank samples in the future.

Metabolic profiling of green tea, *Camellia sinensis*, and its application as quality assessment

○Wipawee PONGSUWAN¹, Eiichiro FUKUSAKI¹, Tsutomu YONETANI², Takeshi BAMBA³, Akio KOBAYASHI¹

(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Tea branch, Nara Prefecture Agricultural Experiment Station, ³Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Key words metabolic profiling, *Camellia sinensis*, quality of green tea, prediction model

2B11-4 Metabolite Profiling of Folk Medicinal Plants: *Angelica* and *Paeonia* species

Eiichiro FUKUSAKI¹, ○Sukanda TIANNIAM¹, Takeshi BAMBA², Akio KOBAYASHI¹

(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Metabolomics is utilized to assess and define specific dissimilarities between two *Paeonia* species (*P. lactiflora* and *P. albiflora*) and 6 different *Angelica* qualities, in order to determine the differences that exist between species and create a better and more accurate parameters for analyzing its quality, correspondingly, for the purpose to improve quality assessment and control for pharmaceutical/commercial uses. Two analytical instruments were used: Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF/MS) and Double-shot Pyrolyser coupled to Gas Chromatography Mass Spectrometry (Double-Shot PY/GC-MS). The first was employed to analyze primary metabolites, whereas the latter was used to investigate volatile-aroma-related and nonvolatile polymer compounds. Consecutively, both data were applied separately to Principle Component Analysis (PCA) and/or manual statistical comparison of selected compounds to comprehend and visualize the chromatographic data, and establishing the distinction between different Chinese herbs' species and qualities.

Metabolite Profiling of Folk Medicinal Plants: *Angelica* and *Paeonia* species

Eiichiro FUKUSAKI¹, ○Sukanda TIANNIAM¹, Takeshi BAMBA², Akio KOBAYASHI¹

(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Key words Metabolomics, GC-TOF/MS, Double Shot PY/GC-MS, PCA

2B12-1 キャピラリー電気泳動 / 質量分析計 (CE/MS) を用いたアニオン性代謝産物プロファイリング法の開発

○原田 和生, 福岡 英一郎, 小林 昭雄
(阪大院・工・生命先端)

【目的】 演者らは糖リン酸、有機酸、ヌクレオチド、CoA化合物などアニオン性代謝産物の一斉分析を可能にする capillary electrophoresis/electrospray ionization - mass spectrometry (CE/ESI-MS) の新手法を既に報告した^{1), 2)}。本手法を生体サンプルの分析に適用するには、分析システムの感度、精度、再現性を向上させる必要があった。そこで分析システムの改良を行った。【方法・結果】 質量分析計は三連四重極型 MS を用い、Multiple reactions monitoringによる測定を行った。当該システムの再現性はイオン化部の堅牢性が最も重要であり、シース液の組成、流量、スプレーヤーの構造等の検討を行った。その結果、ピーク面積変動係数が10%を下回る分析システムの確立に成功した。

また、生体サンプルの前処理法についても検討を行った。脂質、たんぱく質を逆相固相で、続いてアミン、金属元素をカチオン交換固相で除去したサンプルは、連続分析を行っても安定した分析が可能であった。

以上のように最適化した分析手法を用いて、酵母、植物培養細胞におけるアニオン性代謝産物プロファイルを行った。

1. 原田ら, 日本生物工学会2005年度大会要旨集 p174.

2. Harada *et. al.* J. Biosci. Bioeng. 101, 403-409.

Development of metabolic profiling for anionic metabolites using capillary electrophoresis / mass spectrometry (CE/MS)

○Kazuo HARADA, Eiichiro FUKUSAKI, Akio KOBAYASHI

(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words metabolomics, capillary electrophoresis / mass spectrometry, anionic metabolite