

1A09-1 出芽酵母寿命関連変異株のメタボローム解析

○吉田 亮¹, 原田 和生¹, 林 俊介¹, 高岡 千賀¹, 田村 隆行²,
向 由起夫², 小林 昭雄¹, 福崎 英一郎¹
(¹阪大院・工・生命先端, ²長浜バイオ大・バイオサイエンス)

【目的】 カロリー制限 (CR) は寿命を延長させることができる唯一確実な方法であるが、その機構については、ストレス耐性などが考えられているものの、未解明のままである。そこで本研究では、CRに伴う代謝の変動に注目し、寿命の延長・短縮と代謝の変動との関係を、出芽酵母を用いて明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 栄養応答に関わるシグナル伝達系が欠損したことで寿命が変化した6種の変異株とCR処理した野生株について、94種の代謝産物の相対量をGC-MS、CE-MSを使ったメタボローム解析により測定し、各相対量に基づいて主成分分析を行った。その結果、各株は主に3つの主成分に基づきクラスター分離した。そのうち第3主成分は寿命の長短に応じた分離を表現しており、各株の代謝の違いは寿命と強く関係していることが示唆された。また、この時の分離に寄与した化合物から、寿命に関係する代謝経路として、核酸、NADH、アミノ酸の代謝やTCA回路などが予想された。今後、寿命関連遺伝子を推測し、当該変異株についてメタボローム解析と寿命観測を行い、寿命延長遺伝子を探索する予定である。

Metabolomics of yeast longevity mutants

○Ryo YOSHIDA¹, Kazuo HARADA¹, Shunnsuke HAYASHI¹,
Chika TAKAOKA¹, Takayuki TAMURA², Yukio MUKAI²,
Akio KOBAYASHI¹, Eiichiro FUKUSAKI¹
(¹Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ., ²Dept. Biosci., Nagahama Bio Univ.)

Key words metabolic analysis, *Saccharomyces cerevisiae*, longevity, aging

1A09-3 ニチニチソウのメチルジャスモン酸応答に関するメタボローム解析

○田伏 哲也, 原田 和生, 小林 昭雄, 福崎 英一郎
(阪大院・工・生命先端)

【目的】 ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) は非常に多様なアルカロイド Terpenoid Indole Alkaloids (TIAs) を生合成する。これらの中には医薬価値の高い化合物が含まれており、TIAs の生合成機構の解明が望まれている。これまで、TIAs合成に関与する遺伝子のクローニング、発現局在についての研究は広くなされてきた。しかし実際に細胞内の代謝産物がどのように変動し関わりあっているのか、TIAsと一次代謝物を含めた代謝物全体を見る解像度の高い研究はなされていない。そこで今回、TIAsの生合成が活性化された際の代謝変動を代謝産物レベルで解析することを目的とし、メチルジャスモン酸 (MeJA) 処理時における一次代謝と二次代謝の代謝物プロファイリングを行った。

【方法および結果】 MeJAを添加した培地にニチニチソウ懸濁培養細胞を植え継いでMeJA処理を開始した。経時的にサンプリングを行い、アミノ酸、有機酸、糖リン酸、ヌクレオチド等のイオン性代謝物はCE/MS分析に、糖はGC/MS分析に、またTIAsはLC/MS分析により測定した。結果、処理した培養細胞では、36~48時間後に一部のアミノ酸やTCA回路中の有機酸、TIAsであるアジュマリシンの蓄積量の増加が見られた一方で、プトレッシンやトリプタミンの蓄積量の増加は見られなかった。

Metabolomic analysis of *Catharanthus roseus* with Methyl jasmonate treatment

○Tetsuya TABUSHI, Kazuo HARADA, Akio KOBAYASHI,
Eiichiro FUKUSAKI
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words metabolome, *Catharanthus roseus*, methyl jasmonate

1A09-2 ゼブラフィッシュのメタボローム解析

○林 俊介¹, 田丸 浩², 秋山 真一³, 小林 昭雄¹, 福崎 英一郎¹
(¹阪大院・工・生命先端, ²三重大・生資, ³三重大・SVBL)

【目的】 ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、世代時間が短く、発生過程の観察が容易であることから、脊椎動物の初期発生モデル生物として注目されており、アンチジーン化合物を用いた遺伝子のノックダウンの方法論が確立されている。一方、発生の任意段階で薬物投与が可能のため、薬物暴露による病態・薬効・毒性スクリーニングのアッセイ系としても重用されている。現在、目視あるいは、顕微鏡観察による形態学的な評価に基づく表現型解析が行われているが、再現性、解像度に問題がある。そこで、メタボロームを精密な表現型と捉えることにより、高解像度汎用表現型解析システムの構築を考案した。第一段階として、初期発生段階予測モデルの作成を試みた。

【方法および結果】 種々の発生ステージのゼブラフィッシュ受精卵1, 3, 6, 9, 12, 15, 24 hpf (hours post-fertilization) を材料から親水性画分を抽出し、メトキシ化、シリル化による誘導体化を行った後、GC/TOF-MS 分析に供した。得られたマスプロトグラムをベースライン補正、マルチプルアライメント等の前処理を施した後、保持時間インデックスを独立変数、ピーク強度を従属変数とした行列データを作成し、多変量解析に供した。主成分分析でデータ構造を確認後、PLS回帰により、発生段階予測モデルを作成し、有用性を検証した。

metabolome analysis of zebrafish

○Shunsuke HAYASHI¹, Yutaka TAMARU², Shinito AKIYAMA³,
Akio KOBAYASHI¹, Eiichiro FUKUSAKI¹
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Fac. Biores., Mie Univ., ³SVBL, Mie Univ.)

Key words zebrafish, GC/MS, metabolomics, PLS

1A10-1 スルホン化キャピラリーを用いたキャピラリー電気泳動/質量分析計による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, 大山 陽子, 田伏 哲也, 小林 昭雄, 福崎 英一郎
(阪大院・工・生命先端)

【目的】 昨年度大会で演者らは糖リン酸、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/mass spectrometry (CE/MS) の新手法を既に報告した¹⁾。以前の方法は安価なフューズドシリカキャピラリーを用いていたが、標準物質混合溶液と生体サンプル試料溶液との間で移動時間の再現性が得られなかった。そこで、移動時間再現性の向上を図るため、Kodamaらが開発したスルホン化キャピラリー²⁾を用いたCE/MS分析法の検討を行った。

【方法・結果】 スルホン化キャピラリーを用いたCE/MS法によりアニオン性代謝産物標準混合溶液を分析したところ、移動時間の再現性が向上した。また、EOFが速まり、結果、感度が上昇し、分析時間も短縮できた。しかしながら、ピークエリア再現性は低下した。そこで、dwell timeを延長し、分析時間毎に分析対象化合物を変更する方法を採用することによって、ピークエリア再現性を向上させた。さらに、スルホン化キャピラリーに適したサンプル調製法を検討した。以上のように最適化した分析手法を用いて、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2006年度大会要旨集 2B12-1

²⁾Kodama *et. al. Electrophoresis*, **2005**, 26, 4070-4078

Development of anionic metabolite profiling using capillary electrophoresis/mass spectrometry with sulfonated capillary

○Kazuo HARADA, Yoko OHYAMA, Tetsuya TABUSHI,
Akio KOBAYASHI, Eiichiro FUKUSAKI
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words metabolomics, sulfonated capillary, capillary electrophoresis/mass spectrometry, anionic metabolites