

**3P-015 モノリスカラムを用いたスーパー液体クロマトグラフィーによるトップダウンプロテオミクスへの展開**

○森坂 裕信, 植田 充美  
(京大院・農・応用生命)  
morisaka@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景と目的】ポストゲノム科学が注目を集め、質量分析計の開発を筆頭に測定技術の進歩も著しく、プロテオーム解析に関する報告も増加している。プロテオミクス研究においては手法選択が重要であるが、現在では、同定のみでなく定量解析等、付加価値の大きい手法が開発されている。最も支持されている手法であるショットガン法は、ボトムアップアプローチによる網羅的定量解析が可能であるが、アイソフォーム判別が困難という欠点を持つ。これは、タンパク質を酵素消化し、ペプチドとして測定するボトムアップ法の原理的な弱点である。そこで本研究では、アイソフォーム判別が可能で、インタクトプロテオームを測定するトップダウン法によるシステム構築を検討した。【結果】プロテオーム解析の質量分析計検出では、イオン化抑制による性能低下が問題となっている。これを回避するには、試料の徹底的精製が効果的であるが、サンプルロス等のリスクも伴う。そこで我々は、高分離性能モノリスカラムを装備したスーパー液体クロマトグラフィーシステムを開発した。プレ精製を省略した試料を用い、開発システムによるプロテオーム解析を行った結果、イオン化抑制の回避に成功した [1]。さらに、独自に開発したワイドボアを持つモノリスカラム [2] を用いて、インタクトタンパク質を分離した結果、非常に高い分離性能を示したので、これをトップダウンプロテオミクスに適用した結果をまとめて報告する。 [1] H. Morisaka et al., *AMB Express*, 2, e37 (2012) [2] H. Morisaka, et al., *J. Sep. Sci.*, 32, 2747 - 2751 (2009)

**Development for top down proteomics by super liquid chromatography using monolithic column**

○Hironobu Morisaka, Mitsuyoshi Ueda  
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** proteomics, monolith, top down proteomics

**3P-017 新規比較プロテオーム解析を用いたミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* の動態**

○南部 真実, 立上 陽平, 森坂 裕信, 黒田 浩一, 植田 充美  
(京大院・農・応用生命)  
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】共生窒素固定細菌であるミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* は宿主であるミヤコグサ *Lotus japonicus* と特異的に共生し、窒素固定を行う。根粒菌は単生では窒素固定を行わないが、宿主との共生下では窒素固定を行うことが知られている。そこで、根粒菌の窒素固定メカニズムを解明するために、単生、及び、共生下における *M. loti* の比較プロテオーム解析を行った。【方法・結果】共生状態のモデルとして水耕栽培した *L. japonicus* に *M. loti* を感染させ、根粒を形成させた。一方、単生状態のモデルとして *M. loti* を液体培地で培養した。得られたそれぞれの試料は独自に開発したロングモノリスカラムと LC/MS/MS を組み合わせた系により分析した [1]。この分析系は、従来法とは異なり、微量の根粒から根粒菌を分離・精製せずにプロテオーム解析を行うことが可能である。その結果、共生、及び、単生下において得られたタンパク質のプロファイルに差が見出された。過去に報告された窒素固定だけでなく、二次代謝物にも興味深い差が見られたので、まとめて報告する。 [1] Y. Tatsukami, M. Nambu et al. submitted

**Behavior of *Mesorhizobium loti* with novel and comparative proteome analysis**

○Mami Nambu, Yohei Tatsukami, Hironobu Morisaka, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda  
(Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** symbiosis, nitrogen fixation, *Mesorhizobium loti*, proteomics

**3P-016 バイオマスに応じた *Clostridium cellulovorans* の構成酵素プロファイルの解析**

○江坂 康平<sup>1</sup>, 松井 一真<sup>1</sup>, 森坂 裕信<sup>1</sup>, 黒田 浩一<sup>1</sup>, 三宅 英雄<sup>2</sup>, 田丸 浩<sup>2</sup>, 植田 充美<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農・応用生命, <sup>2</sup>三重大院・生資)  
esaka.kohei.42x@st.kyoto-u.ac.jp

【目的】中温性絶対嫌気性細菌である *Clostridium cellulovorans* は、菌体外にセルロソームと呼ばれる超酵素複合体を形成する。セルロソームは足場タンパク質 (Cbpa) の上に多数のバイオマス分解酵素を集積させて複合体を形成し、基質に応じてその構成を最適化する。さらに、糖質分解に関与する分泌酵素群と共役し、効率的な分解を実現している。またバイオマスに対して、その構成酵素プロファイルを明らかにすることにより、効率的バイオリファイナリーの実現に貢献できると考えられる。そこで本研究では、我々が世界に先駆けて明らかにした全ゲノム配列完全解析の結果<sup>[1]</sup>を基にして、我々の開発展開しているスーパープロテオーム解析を行い、各種のバイオマスに対する構成酵素プロファイルを明らかにすることを試みた。【方法・結果】種々の実バイオマスと、対照区としてセロビオースを炭素源として *C. cellulovorans* を嫌気条件下で培養し、タンパク質の抽出、ペプチド化を行った。その後、独自に開発したロングモノリスカラム (200 cm) を用いた LC/MS/MS システム<sup>[2]</sup>により、プロテオーム解析を行った。その結果、基質による構成酵素プロファイルの変化を明らかにすることに成功したので、その結果をまとめて報告する。

[1] Y. Tamaru et al., *J. Bacteriol.*, 192, 901-902 (2010)

[2] H. Morisaka et al., *AMB Express*, 2, 37 (2012)

**Proteomic analysis of enzymes produced by *Clostridium cellulovorans* in response to various biomasses**

○Kohei Esaka<sup>1</sup>, Kazuma Matsui<sup>1</sup>, Hironobu Morisaka<sup>1</sup>, Kouichi Kuroda<sup>1</sup>, Hideo Miyake<sup>2</sup>, Yutaka Tamaru<sup>2</sup>, Mitsuyoshi Ueda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Dept. Life. Sci., Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

**Key words** *Clostridium cellulovorans*, cellulosome, proteomics

**3P-018 メタボロミクス技術に基づく1-プロパノール生産組換え大腸菌の遺伝子改変戦略の構築**

○川瀬 直樹<sup>1</sup>, プトリ サスティア プラマ<sup>1</sup>, シェン クレア<sup>2</sup>, リャオ ジェイムズ<sup>2</sup>, 馬場 健史<sup>1</sup>, 福崎 英一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工・生命先端・生工, <sup>2</sup>UCLA)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

近年、化石燃料の枯渇や地球温暖化の問題から代替エネルギーとして微生物を用いたバイオ燃料が注目されている。中でも、エタノールよりも長鎖を持つアルコールの研究が盛んになっている。UCLA の Liao は *Escherichia coli* にて、スレオニン合成経路と、*Methanococcus* 由来のシトラマル酸合成経路を組み合わせることで、溶剤や化粧品等に用いられる1-プロパノールの高生産株の育種に成功したが、実用化に向けて、さらなる生産量の増加が必要とされている。今回、我々はメタボロミクス技術を1-プロパノール生産株に適応し、効率的な遺伝子改変戦略の構築に取り組んだ。2つの経路の発現状況が異なる4つの株に対して、代謝物経時サンプリングデータを取得し、多変量解析に供したところ、それぞれの株が持つ代謝経路の特徴を表すことができただけでなく、従来の遺伝子工学手法では発見することが困難であった代謝物の蓄積を明らかにすることができた。それらの代謝物の蓄積は生産量向上を目的とした、代謝改変の指針として有効なものであった。以上の結果から、今後、他のバイオ燃料生産微生物の育種においてもメタボロミクス技術の貢献が期待される。

**Metabolomics-based approach for strain improvement of 1-propanol producing *Escherichia coli***

○Naoki Kawase<sup>1</sup>, Sastia Prama Putri<sup>1</sup>, Claire Shen<sup>2</sup>, James Liao<sup>2</sup>, Takeshi Bamba<sup>1</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

**Key words** metabolic analysis, metabolic engineering, *Escherichia coli*