3P-027 ガスクロマトグラフィー質量分析とOPLSモデリングを用いたメタボロミクスを基盤とした出芽酵母1-ブタノール耐性関連遺伝子の半合理的特定

○Teoh Shao Thing¹, Putri Sastia Prama¹, 向 由起夫², 馬場 健史¹, 福崎 英一郎¹
(¹阪大院・工・生命先端・生工,²長浜バイオ大・バイオ)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

メタボロミクスは種々のオミクス解析の中で最も表現型に近接しており、高解像度な表現型とみなせる。本研究では、メタボロームを比較することで目的性能の向上に有効な遺伝子標的を選抜できるのではないかと、という仮説の元、メタボロミクスを用いた工業用微生物宿主の半合理的な改良戦略の有用性について検証を行った。研究対象には出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の1-ブタノール耐性を用いた。まず、それぞれ異なる耐性を示す転写因子破壊株20種を培養し、細胞内代謝物分析を行った。次に、それぞれの耐性能を応答変数、代謝物情報を説明変数として直交潜在構造投影法 (OPLS) 回帰モデルを構築し、モデルより耐性に強く寄与する代謝物を特定した。特定された代謝物を標的として遺伝子改変戦略を立案し、細胞内蓄積量を変化させたところ、得られた変異株は親株よりも耐性が有意に向上した。また、この変異株のメタボローム情報は前述のモデルと高い適合度を示したことから、本モデルの妥当性が示された。以上より、本研究によってメタボローム情報を用いた半合理的な宿主改良戦略が有用であることが実証された。

Metabolomics-based semi-rational identification of gene targets conferring 1-butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* using gas chromatography-mass spectrometry and OPLS modeling

○Shao Thing Teoh¹, Sastia Prama Putri¹, Yukio Mukai², Takeshi Bamba¹, Eiichiro Fukusaki¹
(¹Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Dept. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Technol.)

Key words metabolic analysis, strain improvement, *Saccharomyces cerevisiae*, stress resistance

3P-029 GC-MS を用いたメタボロミクスにおけるキャリアーガス種の検討とライブラリー構築

○宮川 浩美¹, 秋本 智¹, 山下 俊幸², 富尾 紋子², 斎藤 裕美², 山中 裕佳子², 山崎 一彦¹, 古野 正浩¹, 馬場 健史², 福崎 英一郎²
(¹ジーエルサイエンス,²阪大院・工・生命先端)
h.miyagawa@gls.co.jp

メタボロミクスは代謝物を網羅的に解析する手法である。その代謝物の化学的性質は多岐に及んでおり、代謝物に応じて様々な分析手法が選択される。GC/MS は誘導体化することにより親水性から疎水性まで幅広い化合物を分析できる網羅性のほか、ライブラリーによるピーク同定が可能な点や高い再現性を有することからメタボロミクスにおいて頻用される。GC/MS では一般的なキャリアーガスとしてヘリウムが用いられているが、米国の備蓄充実政策、シェールガスの増加による減産、中国を中心としたアジア地域での需要の伸びなどの理由 [1] により、ヘリウムの供給量減少、価格高騰が続いている。そこで、この問題に対応するために、400 以上の分析種についてヘリウムと水素をキャリアーガスに用い、それぞれにおいて保持時間、保持指標とマススペクトルのライブラリーを構築し、比較検討した。その結果、ピークキャパシティはヘリウムをキャリアーガスとした場合が若干優れていたが、水素でも当該目的に利用できることが判明した。また、GC/MS のデータ解析に用いられている自動ピーク同定ソフト AIOutput [2] で利用可能なライブラリーも作成し、同定の精度についても確認を行った。

- [1] 大家 泉, 高圧力の科学と技術, 22(3),185-190(2012)
[2] H.Tsugawa, et al., BMC Bioinformatics,12,131(2011)

Method development for metabolites library with GC-MS using He and H₂ carrier gases

○Hiromi Miyagawa¹, Satoshi Akimoto¹, Toshiyuki Yamashita², Ayako Tomio², Hiromi Saito², Yukako Yamanaka², Kazuhiko Yamasaki¹, Masahiro Furuno¹, Takeshi Bamba², Eiichiro Fukusaki²
(¹GL Sciences Inc., ²Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words metabolic analysis, GC/MS, helium, hydrogen

3P-028 イオントラップ-飛行時間型質量分析計を用いた抱合体の同定方法の開発

○小倉 泰郎^{1,2}, 馬場 健史¹, 福崎 英一郎¹
(¹阪大院・工・生命先端・生工,²高津製作所)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

抱合反応は薬物などの外因性物質や一部の内因性代謝物にグルクロン酸や硫酸などの親水性物質が付加する反応であり、化合物の極性を高めて尿などへの排出を促すことが知られている。特に薬物代謝では第 II 相反応と呼ばれる重要な代謝反応である。このように抱合体は生体内で活性を持つ化合物に関する情報を含む代謝物であると考えられる。ここで、メタボロミクスは代謝物を網羅的に解析する学術分野であり、これらの抱合体を解析する重要性も高い。対象化合物を特定せずに分析を行うノンターゲットメタボロミクスは、幅広い代謝物を対象とした解析が可能である。その一方、食品など複雑な成分の代謝により生じる抱合体を同定することは難しい。その理由のひとつに化合物データベースに収載されている抱合体の不足が挙げられる。抱合体の情報から直接的に化合物同定を行うことは困難であることから、我々は精密質量 MSⁿ 分析と一般的な化合物データベースおよびプロダクトイオンスペクトルの帰属の組み合わせを用いて、グルクロン酸および硫酸抱合体の同定方法について検討を行った。質量分析計の MS² 分析において脱抱合体を生成させ、MS³ 分析において脱抱合体の部分構造情報を生成させ、これらの情報を組み合わせることで抱合反応の種類および脱抱合体の同定方法の構築を試みた。

Development of the identification of conjugates using iontrap-TOF mass spectrometry

○Tairo Ogura^{1,2}, Takeshi Bamba¹, Eiichiro Fukusaki¹
(¹Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Shimadzu Co.)

Key words metabolic analysis, compound identification, conjugates

3P-030 glucose 誘導性の分解を受けにくい alpha-glucoside transporter の発現が、酵母にもたらす増殖阻害

○畠中 治代^{1,2}, 光永 均², 大村 文彦¹, 石黒 正路³, 馬場 健史², 福崎 英一郎²
(¹サントリー SIC,²阪大院・工・生命先端・生工,³新潟薬大・応生命)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

酵母は、glucose などの単糖は、hexose transporter によって、maltose などのオリゴ糖は、alpha-glucoside transporter (AGTR) によって取り込む。AGTR 遺伝子の発現は glucose によって抑制され、maltose によって誘導される。また、AGTR は glucose 存在下では速やかに分解されることが知られている。すなわち、酵母は複数の糖がある場合、glucose などの単糖から資化するようなシステムを持っている。我々はこれまでに、複数存在する AGTR の中でも、Mal21p が特別に、glucose 存在下でも分解されにくいことを見出している。また、その Mal21p の情報から、もう 1 つの分解されにくい変異型 transporter, Agt1-55Pp を取得している。これらの分解されにくい AGTR を酵母で高発現した時、glucose や maltose を単一の C 源とする場合には、通常に生育するのに対し、混合糖では、非常に長い lag time が生じた。この lag time は不活性型 Mal21p を発現させた株では観察されないため、maltose の取り込み自体が増殖阻害を引き起こすものと考えられる。我々は、この現象について、メタボローム、トランスクリプトームを含めた解析を行ったので報告する。

Growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* caused by expression of alpha-glucoside transporters (AGTR) tolerant to glucose-induced degradation

○Haruyo Hatanaka^{1,2}, Hitoshi Mitsunaga², Fumihiko Omura¹, Shoji Ishiguro³, Takeshi Bamba², Eiichiro Fukusaki²
(¹Suntory SIC,²Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ³Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

Key words transporter, growth inhibition, metabolic analysis