

2P-105 Ultra-fast mass spectrometry を用いたエタノール非生産遺伝子欠損酵母株の中心代謝酵素定量プロテオーム分析

○松田 史生^{1,2}, 小倉 泰郎³, 富田 淳美¹, 平野 一郎³, 清水 浩¹
(¹阪大院・情報・バイオ情報, ²理研・バイオマス, ³島津製作所)
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

[目的] 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のさまざまな代謝機能は、酵素量の変化を通じて制御されている。本研究ではナノ LC と高速動作が可能な UFMS (ultra-fast mass spectrometry) を用いた定量プロテオーム分析系を構築し、アルコール非生産遺伝子欠損酵母株の中心代謝酵素プロファイルを解析した。**[方法]** 酵母 S288C 株およびアルコール脱水素酵素破壊株 (BY4739 adh1Δadh2Δadh3Δadh4Δadh5Δsfa1Δ, JBB (2012)113,192-195) を、非標識または [U-¹³C] グルコースを含む SD 培地 (100 mL) で回分培養し、抽出したタンパク質から定法に従ってトリブシン消化を行った。トリブシン消化物は nanoLC-UFMS (Prominence nano+LCMS-8040、カラム: L-column C18, 0.1*150mm) を用いて分析した。データ解析には Skyline ver 2.5 を用いた。**[結果]** [U-¹³C] グルコースを含む SD 培地で培養した S288C 株から、フルラベルペプチドサンプルを作成した。非ラベル培地で培養した遺伝子破壊株から調製したペプチドサンプルとフルラベルペプチド溶液を 1:1 で混合したものを LC-MS 分析に供した。解析対象の中心代謝酵素 205 タンパク質 (3062 ch) のうち 137 個を相対定量できた。アルコール脱水素酵素破壊株で Adh1p, Adh3p のシグナル強度がほぼゼロになっており正しく定量できていることが確かめられた。またペントースリン酸経路の酵素量が増加していることから、NADPH 再生を活性化していると考えられた。

Targeted proteome analysis of non-alcohol producing yeast strain

○Matsuda Fumio^{1,2}, Ogura Tairo³, Tomita Atsumi¹, Hirano Ichiro³, Shimizu Hiroshi¹
(¹Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²BMEP, RIKEN, ³Shimadzu Co.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, central metabolism, Ultra-fast mass spectrometry, Quantitative proteomics

2P-107 SSDesign: エレメンタリーモード解析を利用した解空間に基づく代謝経路デザイン

○戸谷 吉博, 白木 孝典, 清水 浩
(阪大院・情報・バイオ情報)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

[背景・目的] 微生物を用いた有用物質生産において、代謝経路の化学量論モデルに基づく改変は効果的なアプローチである。代謝フラックスの取りうる範囲 (解空間) を指標とすることで、増殖連動型・増殖非連動型のそれぞれの培養プロセスに適した代謝経路をデザインできる。我々はエレメンタリーモード解析 (EMA) を利用して、目的に応じて解空間の形を自由にデザインする手法 (Solution space design [SSDesign]) を開発した。**[手法]** EMA は代謝ネットワークを物質収支を満たす最小の反応セット (EFMs) に分解する手法であり、全てのフラックス分布は EFMs の線形結合で表される。そのため、フラックスの解空間の外殻の端点には必ず EFMs が存在する。SSDesign ではこの性質を利用して、親株の解空間から削除すべき領域を定義し、その領域に含まれる EFMs を削除するために必要な遺伝子破壊の組合せを探索した。**[結果]** 大腸菌による増殖連動型のコハク酸生産と増殖非連動型のエタノール生産について、SSDesign の性能を評価した。増殖連動型のデザインでは、実験によりコハク酸の生産性向上が報告されている *ptsG*, *pykA*, *F*, *pflA* を含む遺伝子破壊セットを予測できた。増殖非連動型のデザインでは、*frdA*, *ldhA*, *pta* など 13 種類の遺伝子破壊セットが予測された。*zwf*, *ndh*, *sfaA*, *maeB*, *ldhA*, *frdA*, *poxB*, *pta* を破壊することでエタノールの生産性が向上したことが報告されており、*ΔfrdA*, *ldhA*, *pta* の破壊遺伝子が全て含まれており、残りの 5 遺伝子を破壊しなくても、定常期のエタノール生産に影響しないことが予測された。

SSDesign: Computational pathway design based on metabolic solution space using elementary mode analysis

○Yoshihiro Toya, Takanori Shiraki, Hiroshi Shimizu
(Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words elementary flux mode, metabolic pathway modification

2P-106 グリセロール単一炭素源における正確な代謝フラックス推定のための ¹³C 標識条件の検討

○大橋 秀伍, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報・バイオ情報)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

[背景と目的] 代謝フラックス解析は反応経路の化学量論に基づいてフラックス分布を定量的に明らかにする手法である。バイオディーゼルの副産物として余剰生産されているグリセロールは、様々な有用物質生産の原料として期待されているが、その代謝フラックス解析はこれまで行われていない。本研究では、グリセロール単一炭素源条件下で培養した大腸菌の ¹³C 代謝フラックス解析を実現するための最適な標識条件を調査した。**[方法]** グリセロール単一炭素源の合成培地を用いて大腸菌野生株を好気回分培養した。グリセロールの標識条件として、天然標識と [U-¹³C]、天然標識と [2-¹³C]、天然標識と [1,3-¹³C] をそれぞれ 1 対 1 (w/w) で混合した 3 種類を検討した。対数増殖期の菌体から得たタンパク質由来アミノ酸の ¹³C 濃縮度を測定し、これらを全て説明可能なフラックス分布を推定した。また、各実験についてフラックスの 95% 信頼区間を推定し、フラックスの決定に有効な標識基質を明らかにした。**[結果]** フラックス解析の結果、取り込まれたグリセロールの約 70% は糖新生経路を経由し、ペントースリン酸経路で代謝され、TCA 回路のフラックスは基質消費速度の約 20% であった。そのため、増殖に必要な NADPH の大半が酸化ペントースリン酸経路で補われたと示唆された。エントナー・ドウドロフ経路、グリオキシル酸経路、リンゴ酸経路のフラックスは僅かであった。また、各実験のフラックスの信頼区間の比較より、[2-¹³C] グリセロールを用いた場合が最も信頼区間が狭く、最適な標識条件であると明らかになった。

Optimal design of ¹³C-labeling for precise metabolic flux estimation on glycerol as a sole carbon source

○Shugo Ohashi, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words glycerol, *Escherichia coli*, metabolic flux analysis, central metabolism

2P-108 芳香植物のテルペン合成酵素遺伝子のカタログ化 - ツバキの花を例に -

○八反 順一郎¹, 田垣 千恵¹, 大野 史菜¹, 石井 純², 近藤 昭彦³, 播本 孝史⁴, 三沢 典彦¹
(¹石川県大・生物資源研, ²神戸大・自科・研究環, ³神戸大・工・応化, ⁴神戸天然物化学)
n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp

[目的] 芳香植物から、様々なテルペン合成酵素 (TPS) をコードする遺伝子配列 (*Tps*) を単離し、大腸菌機能解析系によりこれらの機能の同定を行いカタログ化する。**[方法]** メバロン酸経路等の一連の酵素遺伝子群を導入した大腸菌に、基質としてリチウムアセト酢酸を加えることで、セスキテルペンの前駆物質となるファルネシル二リン酸 (FPP) を多量合成させることができる。芳香成分を含む植物の花や新芽から、既知の TPS とホモロジーのある遺伝子配列を単離し、上記大腸菌に導入し発現させることで、FPP を基質とするセスキテルペンの合成を試み、GC-MS 等により産物の解析を行う。**[結果]** ショウガ科植物の紫ウコンや、ウコギ科植物のコシアブラ、ウド等から、*Tps* を単離し、構造と機能解析を行った。これらの植物からは β-ユーデスモール、β-カリオフィレン等の合成活性を持つ新規酵素遺伝子が得られた。さらに、ツバキ 2 品種の芳香を有する花に着目し、いくつかの新規 *Tps* を単離し、機能解析を行った。その結果、エレモール、リナロール等の合成を担う新規酵素遺伝子を単離することができた。生成したテルペンについては、健康の維持や病気治療等への利用の報告があった一方で、機能未知のものも複数あった。本発表では、ツバキ科植物を例に報告する。なお、この成果は経済産業省の委託事業によるものです。

Cataloguing terpene synthase genes of fragrant plants -example of *Camellia* flowers-

○Jun-ichiro Hattan¹, Chie Tagaki¹, Fumina Ohno¹, Jun Ishii², Akihiko Kondo³, Takashi Harimoto⁴, Norihiko Misawa¹
(¹Res. Inst. Biosour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., ²Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ³Dept. Chem. Sci. Eng., Fac. Eng., Kobe Univ., ⁴KNC Laboratories)

Key words *Camellia*, fragrance, terpene synthase, cataloging