

炭素固定能を増強した シアノバクテリア変異株の GC/Q-TOF メタボロミクス

アプリケーションノート

バイオ燃料

著者

Dong Hee Chung,
Christine Rabinovitch-Deere, and
Shota Atsumi
Department of Chemistry
University of California-Davis,
Davis, CA
Sofia Aronova
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

概要

非ターゲットメタボロミクスにより、モデルシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* の変異株を評価し、より効率的な成長を可能にする表現型変化の候補を特定しました。変異株の分析には、Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF を使用しました。代謝物プロフィールの変化の評価には、Mass Profiler Professional の Agilent Pathway Architect ソフトウェアを使用しました。このアプローチにより、変異株の表現型向上を解明しうるターゲット候補として、多くの代謝経路が特定されました。

はじめに

化石燃料の埋蔵量には限りがあり、CO₂ 放出量の増加による悪影響も懸念されていることから、持続可能な代替燃料を生成する微生物の遺伝子操作に多くの関心が集まっています。光合成により二酸化炭素を固定する微生物のシアノバクテリアは、炭素源として温室効果ガスを、エネルギー源として光を使用できるため、特に大きな注目を集めています。

しかし、生産量の少なさが産業スケールでの生産を妨げる大きな障壁となっていることから、シアノバクテリアベースのバイオ燃料を経済的に採算のとれるものにするためには、細胞の成長速度を改良する必要があります [1]。過去の研究では、炭素固定能がシアノバクテリアの成長を制限する主要な要因であることがわかっています [2]。指向変異により炭素固定速度を向上させる試みがこれまでに数多くなされてきましたが、いずれもわずかな改良しか見られていません。したがって、指向進化アプローチを用いれば、これまで検討されていなかった有益な代謝変化を特定できる可能性があります。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートで述べている研究は、シアノバクテリアの成長の制約という問題を克服するためのものです。 *S. elongatus* PCC7942 野生型シアノバクテリアのランダム突然変異試験により、成長と CO₂ 固定の効率を高める変異のスクリーニングをおこないました。高分解能の精密質量 7200 GC/Q-TOF システムを用いた非ターゲットメタボロミクスアプローチにより、分析で得られた変異株をさらに評価しました。Pathway Architect を含む複数のソフトウェアで精密質量データを処理し、有益な変化に関する可能性のある代謝経路を特定しました。この研究により、シアノバクテリア変異株の特性向上に関する可能性のある多くの代謝経路が明らかになりました。

実験手法

装置

この研究には、Agilent 7890B GC システムと Agilent 7200 GC/Q-TOF システムを使用しました。機器の設定条件を表 1 に示しています。

表 1. GC および質量分析条件

GC 分析条件

カラム	Agilent J&W DB-5 MS ウルトライナート、 30 m × 0.25 mm、0.25 μm (p/n 122-5532UI)
注入量	1 μL
スプリット比	10:1
スプリット/スプリットレス 注入口温度	250 °C
オープン温度プログラム	60 °C で 1 分維持、10 °C/min で 60~325 °C、 3.5 分維持
キャリアガス	ヘリウム、1 mL/min 定流量
トランスファライン温度	290 °C

MS 条件

イオン化モード	EI
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
質量範囲	50~800 <i>m/z</i>
スペクトル採取レート	5 Hz、セントロイドおよび プロファイルモードの両方で採取

サンプル前処理

メタンスルホン酸エチル (EMS) またはニトロソグアニジン (NTG) を用いて、野生型 *S. elongatus* PCC7942 の突然変異を誘発しました。回復後、高濃度の CO₂ の存在下で細胞を成長させました。密度の高い培地を数回にわたって逆希釈し、成長速度の速い細胞を濃縮しました。有望な分離株については、のちに成長アッセイを用いて 3 回確認しました。16 の候補のうち、4 つの変異株を選択し、野生型株と成長速度を比較して更なる分析をおこないました。

メタノール/クロロホルム抽出により、代謝物を抽出しました。水性フラクションを採取して乾燥させたのち、ピリジン中ヒドロキシルアミン HCl の飽和溶液を用いてメトキシ化し、Nメチル-N-(トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (MSTFA) および 1% トリメチルクロロシラン (TMCS) によりシリル化して誘導体化をおこないました。

データ処理と統計解析

データ処理にあたっては、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアパッケージ (B.07) の Unknowns Analysis ツールを用いてクロマトグラフィーピークをデコンボリューションしたのち、Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクスリテンションタイムロック (RTL) ライブラリと比較して化合物を同定しました。精密質量情報と MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアパッケージ (B.07) の精密質量分析ツールを用いて、同定した代謝物をさらに確認しました。

Mass Profiler Professional (MPP) (12.6) の多変数統計解析パッケージを用いて統計解析をおこない、変異株と野生型株の代謝変化と、異なる変異株間の代謝変化を特定しました。さらに、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアを用いて、代謝物の相対量を定量しました。最後に、MPP の Pathway Architect を用いて、変異株における有益な変化に関する可能性のある生化学的経路を特定しました。

結果と考察

クロマトグラフィーピークのコラボレーションとライブラリ検索

Unknowns Analysis ツール (図 1) を用いて、質量精度設定 100 ppm と可変のリテンションタイム係数 (75~200) でクロマトグラムのデコンボリューションによるデータ処理をおこない、もっとも信頼度の高い成分を特定しました (図 1)。化合物の同定にあたっては、Agilent-Fiehn GC/MS メタボロミクスリテンションタイムロック (RTL) ライブラリと比較しました。デコンボリューションプロセスの所要時間は、1 サンプルあたり約 4~5 分でした。デフォルトのスクリーニングパラメータを用いたライブラリ検索は、1 サンプルあたり 1 分未満でした。

化合物の多くは、デコンボリューションに ± 100 ppm の質量抽出率を用いた場合にのみ同定され、 $+0.3/-0.7$ Da のパラメータでは同定されませんでした。このことから、精密質量設定を用いれば、より確実に成分を特定できることがわかります (図 2)。デコンボリューションで特定された各化合物の同定結果を、精密質量情報、Molecular Formula Generator ツール、MassHunter ソフトウェアの Fragment Formula Annotation ツールを用いて確認しました (図 3)。

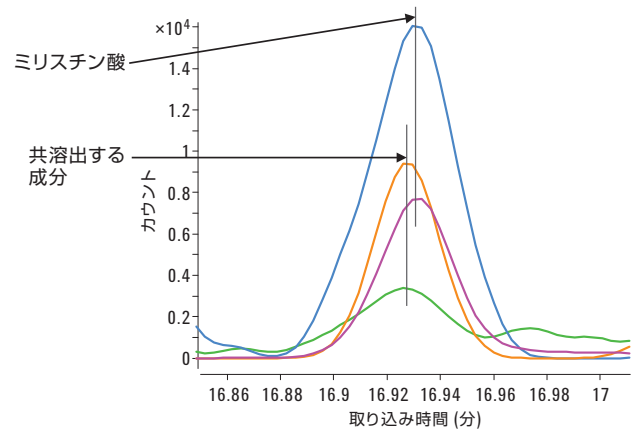


図 2. ミリスチン酸 (青およびピンクのピーク) と共溶出成分 (黄色および緑のピーク) は、100 ppm の RT 係数パラメータを用いた場合にのみ分離および同定され、 $+0.3/-0.7$ Da を用いた場合には同定されませんでした。

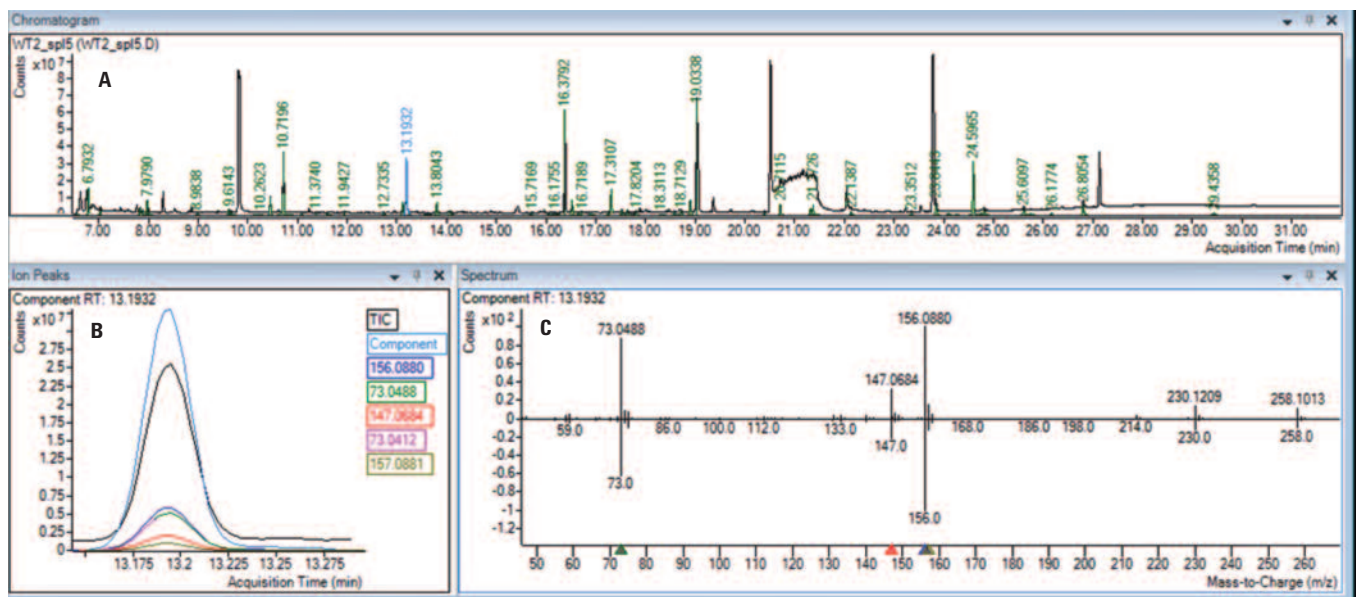


図 1. Unknowns Analysis ツールを用いて、クロマトグラムのデコンボリューションをおこないました。A にクロマトグラム、B に成分の EIC の重ね表示、C に成分のミラープロットおよびライブラリヒットスペクトルを示しています。

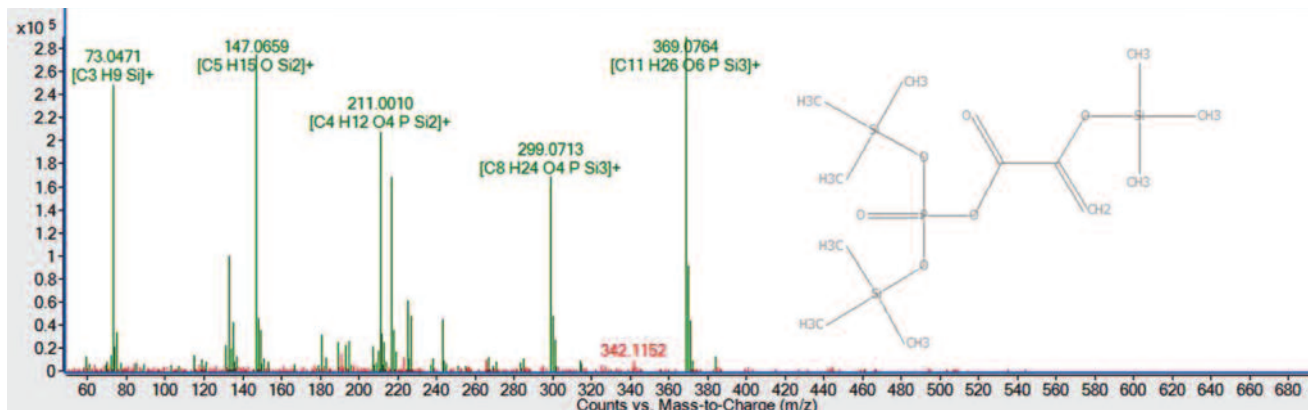


図 3. Agilent MassHunter Qualitative ソフトウェアの Formula Generator ツールとライブラリ検索、Fragment Formula Annotation により、化合物フラグメントを自動的に割り当て、化合物の同定結果を確認しました。フラグメントの化学式がライブラリ検索により同定された分子式の一部である場合には、フラグメントにアノテーションがつき、緑に色分けされています。確認には NIST11.L ライブラリを使用しました。

有意なメタボロミクス変化の特定

MPP の統計ツールを用いて、シアノバクテリアの野生型株と変異株における代謝物生産の有意な変化を特定しました。まず、主成分分析 (PCA) により、データのクラスタリングを視覚化しま

した。レプリケートサンプルの各グループで得られた特徴的な PCA クラスターは、データの再現性が良好であることを示しています。この図では、5 つのシアノバクテリア株における有意なメタボロミクス変化が示されています (図 4)。

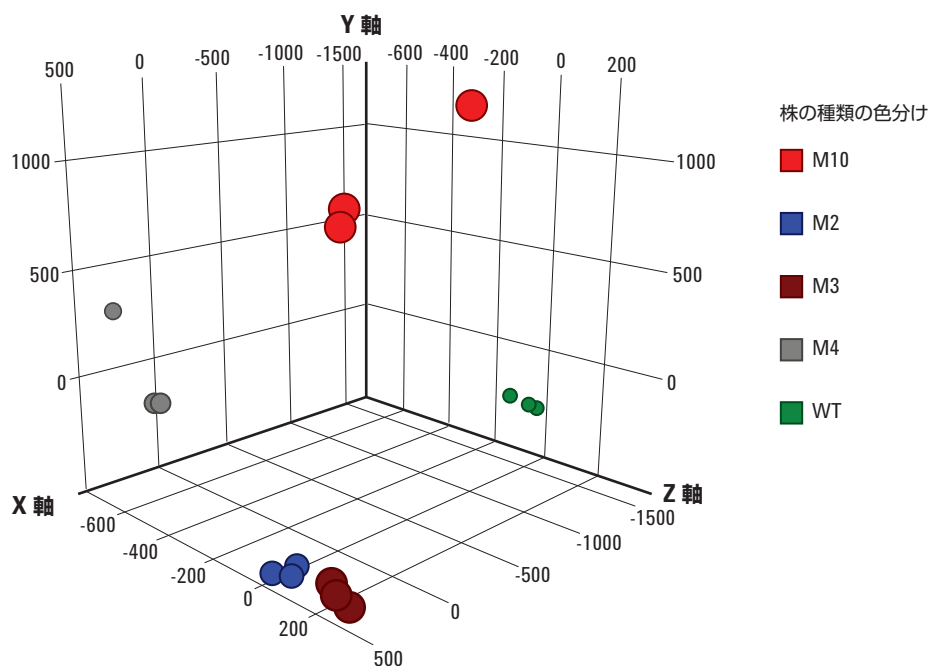


図 4. 野生型株および変異株サンプルの PCA プロットは、各株における変動に起因する特徴的なクラスターの存在を示しています。

倍率変化解析 (FCA) を用いて各株における代謝物量の有意な変化を特定しました。変化の統計的有意性に対して代謝物濃度の倍率変化をプロットしたボルケーノプロットに、その結果が示されています (図 5)。比較した株ペア (条件) 間の代謝物濃度の倍率変化値が大きく、p-値が小さい化合物が赤で示されるため、容易に

特定することができます。プロットの右側の化合物は、野生型株のほうが濃度が高い化合物です。それに対して、プロットの左側の化合物は、変異株のほうが野生型株よりも濃度が高い化合物です (図 5)。

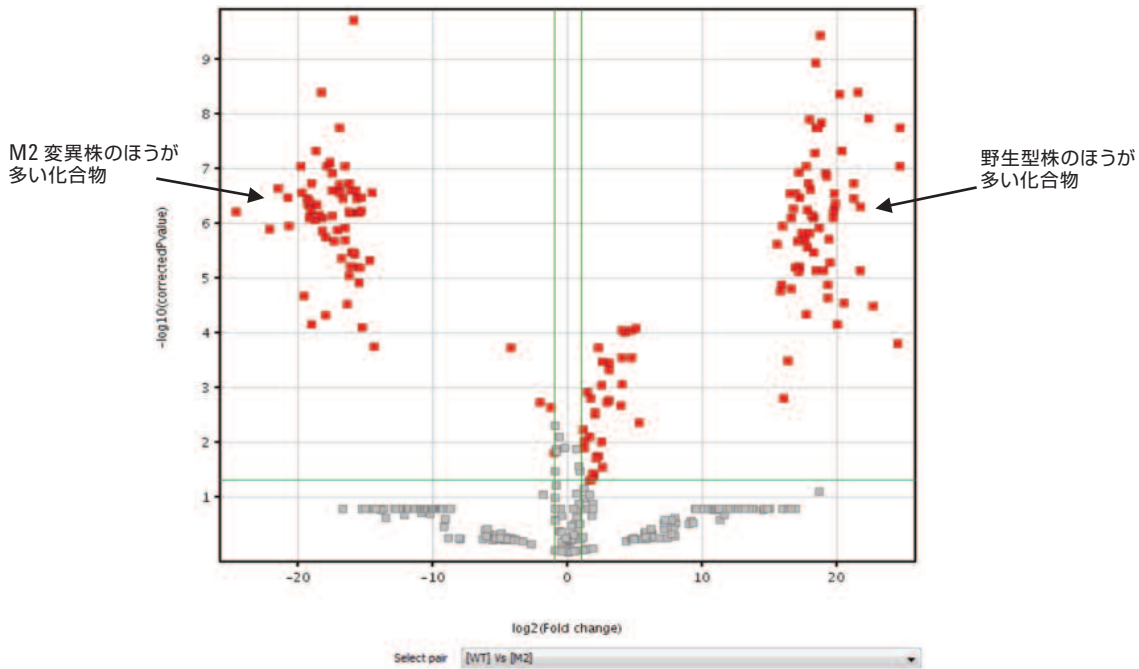


図 5. 野生型株と M2 変異株における p-値のマイナスログ 10 に対して代謝物量の倍率変化のログ 2 をプロットした、倍率変化のボルケーノプロット。p-値のカットオフ 0.05 と倍率変化のカットオフ 2 を満たすデータポイントが、赤で示されています。

さらに、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアを用いて、シアノバクテリアの変異株および野生型株における代謝物濃度について、半定量的比較をおこないました。このソフトウェアでは、採取したデータとライブラリ検索情報をもとに、すべての代謝物の定量メソッドが自動的に作成されます。クオンティファイアイオンとクオリファイアイオンはアバンドンスと特異性の両方から選択されるように最適化されています。クオンティファイアイオンに 100 ppm という狭い質量抽出枠を選択したことで、精密質量情報の活用が可能になり、選択性が高まりました。これにより、より確実な定量が可能になりました (図 6)。

各株における代謝物量の重要な変化が見られたのは、有機酸、アミノ酸、糖リン酸などでした (図 7)。中心的な代謝物であるグルコースの量はすべての株で同じでしたが、TCA サイクル (クエン酸、リンゴ酸など) と炭素固定サイクル (2-ホスホグリセリン酸、リボース-6-ホスフェート) の重要代謝物を含めたその他の代謝物では、野生型株と変異株で有意な変化が見られています。野生型株に対して、すべての変異株でアデノシンが増えている一方で、アデノシン-5-モノホスフェートが減っているという結果からは、変異株に共通の代謝的欠陥があることが示唆されています (図 7)。

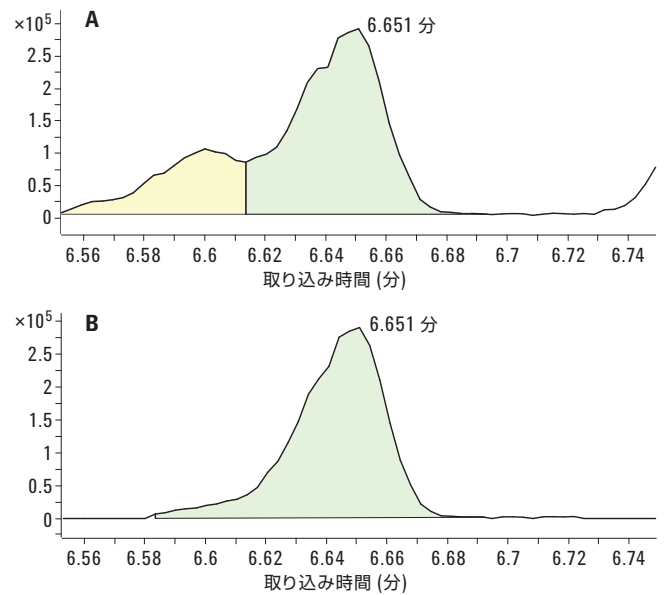


図 6. 質量枠 +0.3/-0.7 Da (A) および ± 100 ppm (B) で抽出したピルビン酸のクオンティファイアイオンの抽出イオンクロマトグラム (EIC)。100 ppm という狭い質量枠を用いることで、選択性の低い +0.3/-0.7 枠設定を用いた定量で生じる干渉を排し、定量精度を高めることが可能です。

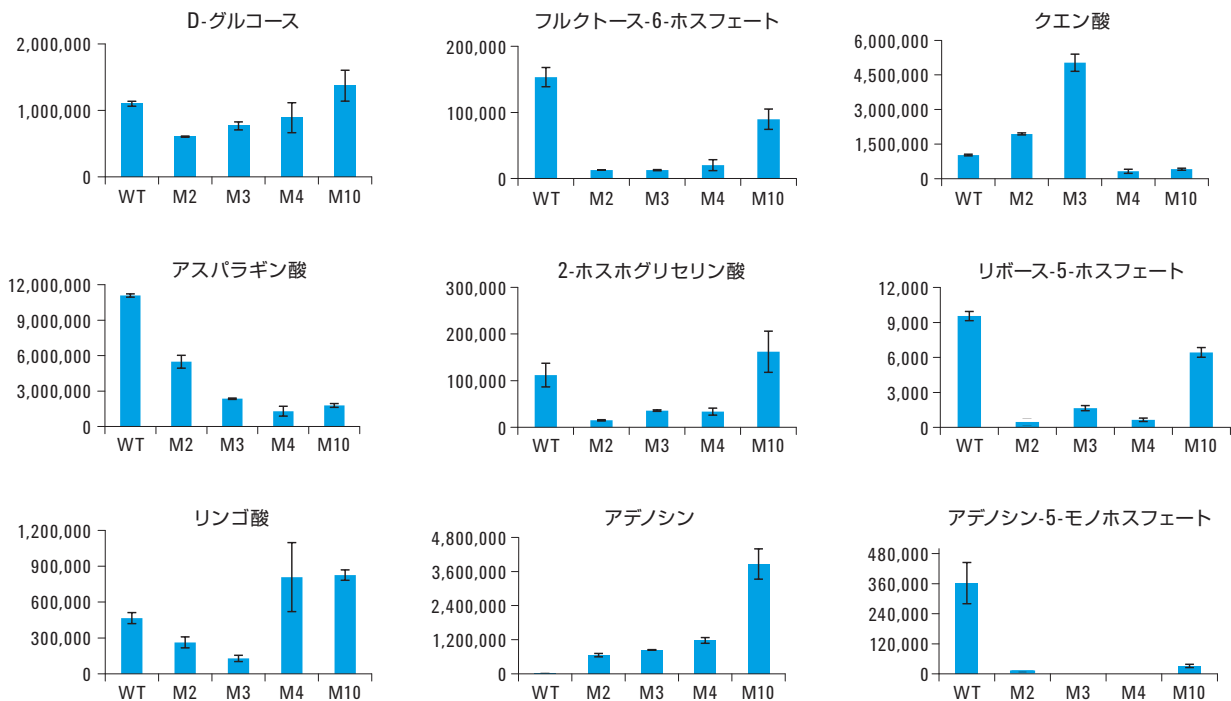


図 7. 野生型株と変異株における代表的な代謝物量の半定量的比較

メタボロミクス変化の経路解析

特定の代謝物量の変化が、どのような特定の代謝経路の変化によって引き起こされているのかを解明するために、*S. elongatus* 変異株をさらに詳しく解析しました。経路解析には Pathway Architect を使用しました。例として、M2 に関する結果の一部を示しています (図 8)。この結果からは、炭素固定サイクル、トリカルボン酸 (TCA) サイクル、解糖、脂肪酸生成といった主要な代謝経路において、有意な遺伝子型の変化が生じている可能性が見てとれます。

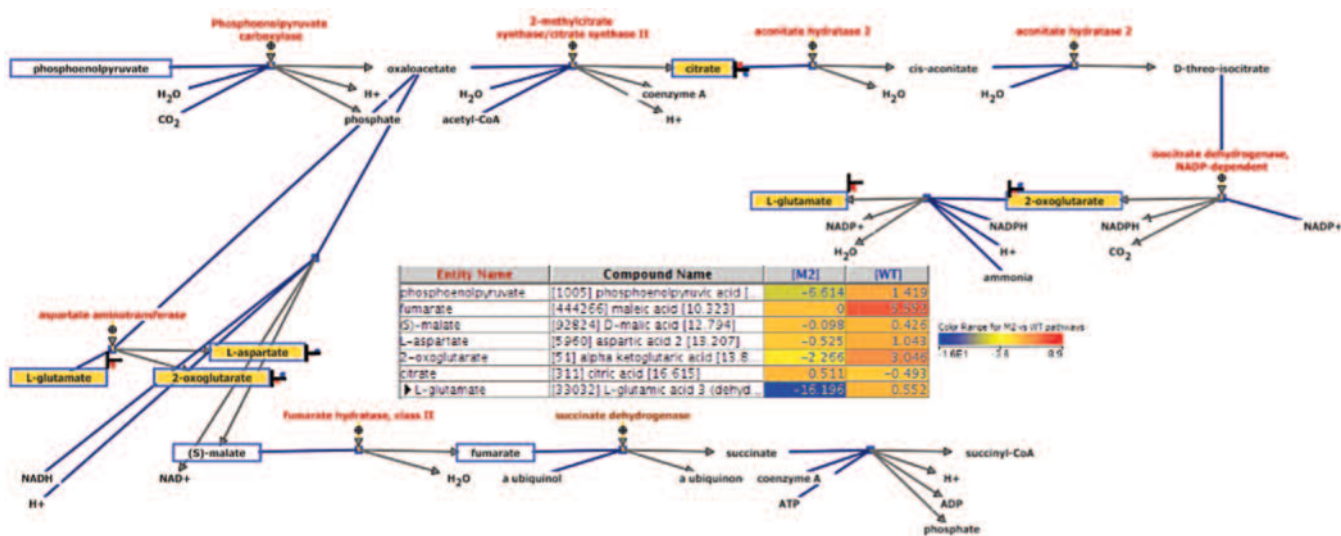


図 8. M2 変異株の経路解析結果例は、TCA サイクルで野生型株との違いが生じていることを示しています。経路図でハイライト表示されている代謝物は、当該経路に属していて、かつ実験で同定された代謝物です。表中のヒートマップは、比較した 2 つの株における代謝物の相対量を示しています。

結論

非ターゲットメタボロミクスアプローチを用いて、バイオ燃料生産などのアプリケーションにおいて有益な特徴を向上させる変異株の代謝的变化を特定しました。Agilent 7200 GC/Q-TOF で得られる精密質量情報は、特定の代謝物の同定および定量に欠かせません。変異株で観察された特性向上について、どの経路の代謝物変化が関係しているのかを特定するためには、MassHunter Quantitative Analysis の Unknowns Analysis や、主成分分析、倍率変化解析、Mass Profiler Professional の Pathway Architect といった複数のソフトウェアツールも不可欠です。

参考文献

1. D.N.Juurink and I.A.Dhalla “Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants” *J Biotechnol.***162**, 134-147 (2012).
2. G.G.Tcherkez, G.D.Farquhar, T.J.Andrews “Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized” *PNAS* **103**, 7246-7251 (2006).

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Published in Japan

December 5, 2013

5991-3476JAJP



Agilent Technologies