

LC-DAD-MSDと蛍光指紋分析を融合した微生物代謝産物のハイブリッド解析

The Hybrid Analysis of Microbial Secondary Metabolites with LC-DAD-MSD and Fluorescence Fingerprint Measurements



東北医科薬科大学 薬学部
天然物化学教室
教授

内田 龍児 博士(薬学)

1. はじめに

放線菌や糸状菌を代表とする微生物、生薬・植物や海洋生物などが生産する二次代謝産物、いわゆる天然物は、抗生物質、抗がん薬、免疫抑制薬、抗寄生虫薬などの様々な医薬品を生み出し、医療の発展とともに人類に多大な貢献をしてきた。NewmanとCraggの報告によれば、現在臨床薬として使われている低分子医薬品の約6割が、天然物のコア構造(ファーマコフォア)あるいはそれを模倣した構造を有しており¹⁾、天然物は創薬の重要なシーズとして今なお位置付けられる。しかし、培養液や粗抽出物に新しい構造を有する化合物や有用な生物活性物質が含まれている可能性を、早い段階で見極めることは難しく、天然物創薬研究に従事する者にとっての課題でもある。この解決手段の1つとして、近年、LC-MSやLC-MS/MSを用いた代謝産物の網羅的な解析やモレキュラーネットワーキング解析²⁾などの手法を取り入れた、探索研究も進められている。また、選別方法の新しい着眼点として、本誌Vol. 60, No. 2に掲載された近畿大学・福田 隆志博士が提案した「蛍光指紋分析を利用した分析法」が挙げられる³⁾。蛍光指紋分析は、食品科学の分野で異物の混入や生産地の判定などの品質評価にも利用されている分析法で、化合物が混在するサンプルでもほとんど前処理の必要がなく、短時間で蛍光物質の測定が可能である。

そこで今回は、先に行われた蛍光指紋分析を用いた海洋由来微生物の培養液の主成分解析の結果に、LC-DAD-MSD分析のデータを系統樹解析した結果を加えた、異種分析統合型解析法(ハイブリッド解析)によって得られた知見について紹介する。

2. 実験

2-1. 試験菌

東シナ海、瀬戸内海および種子島の海洋環境より採取した、海泥および海洋生物サンプルから分離した海洋由来放線菌および細菌(48株)を試験菌として使用した。分離方法は、本誌60, 5277-5282, 2017を参照³⁾。

2-2. 試験菌の培養および抽出

分離した48種の菌(菌株番号153~200)の培養は、Soluble starch (1.0%), Bacto™ Yeast extract (0.4%), Bacto™ Peptone (0.2%), CaCO₃ (0.1%), KBr (0.01%), Fe₂(SO₄)₃·7H₂O (0.004%)を天然海水で調製したM1(+)培地と蒸留水で調製したM1(-)培地の2種の培地を用いた。各培地(25 mL)を含む100 mL容三角フラスコに植菌し、ロータリーシェーカー(27℃, 160 rpm)で14日間培養後、25 mLのエタールを加え1時間振盪し、微生物抽出液(培養サンプル)とした(計96サンプル)。

2-3. 測定サンプルの調製

微生物抽出液の上澄み(1 mL)をマイクロチューブに移し、10,000 rpmで15分遠心後、その上清(300 μL)をミニザルトRC4(ザルトリウス社製)でフィルター濾過したものを、LC-DAD-MSD分析用の測定サンプルとした。

2-4. 培養サンプルの測定

マスキロマトグラム (m/z : 200 ~ 1,000) および紫外可視吸収スペクトル (200 ~ 500 nm) は、図1に示す機器を用いて取得した。また、200 ~ 600 nm の励起波長に対して200 ~ 600 nm の蛍光波長を網羅的に測定する三次元蛍光スペクトルは図2に示す機器を用いて取得した。



図1 高速液体クロマトグラフ Chromaster®

使用機種1：高速液体クロマトグラフ Chromaster®

- ・ 5160ポンプ(P/N:892-0120)
- ・ 5260オートサンブラ(P/N:892-0280)
- ・ 5310カラムオープン(P/N:892-0300)
- ・ 5440ダイオードアレイ検出器(P/N:892-0440)
- ・ 5610質量検出器(P/N:811-0005)

分析条件：

- ・ カラム：Meteoric Core C18 (YMC社)
- ・ サイズ：75 × 2.1 mm I.D. S-2.7 μ m. 8 nm
- ・ カラム温度：50°C
- ・ 移動相：5~95% CH₃CN-0.1% HCOOH (10 minリニアグラジェント)
- ・ 流速：0.2 mL/min
- ・ UV検出：200~500 nm
- ・ MS検出： m/z 200~1,000
- ・ インジェクション量：5 μ L



図2 F-7100形分光蛍光光度計

使用機種2：F-7100形分光蛍光光度計(EEM® Auto システム)

- ・ EEMアシストプログラム(P/N:5J0-0356)
- ・ マイクロプレート付属装置(P/N:5J0-0118)

2-5. 系統樹解析および主成分解析

系統樹解析および主成分解析は、多変量解析ソフトウェア: 3D SpectAlyze™ (株式会社ダイナコム) を用いて行った。

3. 測定結果

3-1. LC-DAD 分析による培養サンプルの系統樹解析

LC-DAD の3次元データ(吸収波長, 吸光度, 保持時間)を基に, 3D SpectAlyze™ で系統樹解析した結果を図3に示した。M1 (+) 培地と M1 (-) 培地を用いて培養したサンプルは海水の有無の培養に依存せず, 様々な位置に分布しクラスターを形成した。

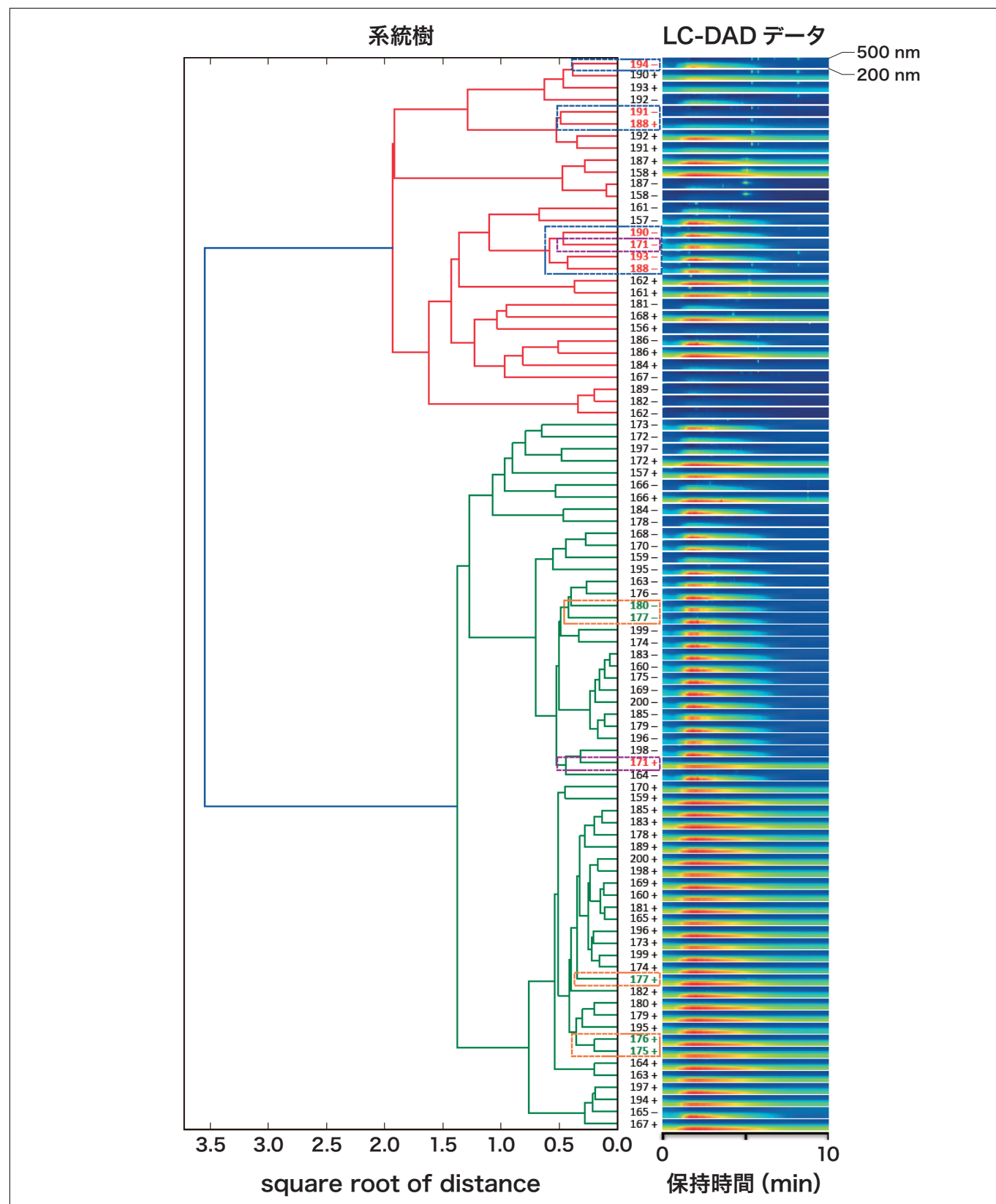


図3 系統樹解析した結果 LC-DADデータ

3-2. LC-MSD 分析による培養サンプルの系統樹解析

3-1.と同様に、LC-MSD の3次元データ(分子量： m/z ，強度，保持時間)を基に，系統樹解析した結果を図4に示した。LC-DAD での系統樹解析の結果とは異なり，M1 (+) 培地を用いた培養サンプルは赤線，M1 (-) 培地を用いた培養サンプルは緑線で示した大クラスター中にほぼ位置した(図4)。この中で，M1 (-) 培地を用いた培養サンプル 158 (-)，165 (-)と187 (-)のみが，M1 (+) 培地を用いた培養サンプルの大クラスターに位置し(図4：紫色破線枠内)，そのうち培養サンプル 158 (-)と187 (-)は，M1 (+) 培地を用いた培養サンプル 158 (+)と187 (+)と同じクラスターを形成することが明らかになった(図4：緑色破線枠内)。したがって，培養サンプル 165 (-)と生産菌158株と187株が生産する培養サンプル(158 (+)，(-)と187 (+)，(-))は特徴的であると判断された。

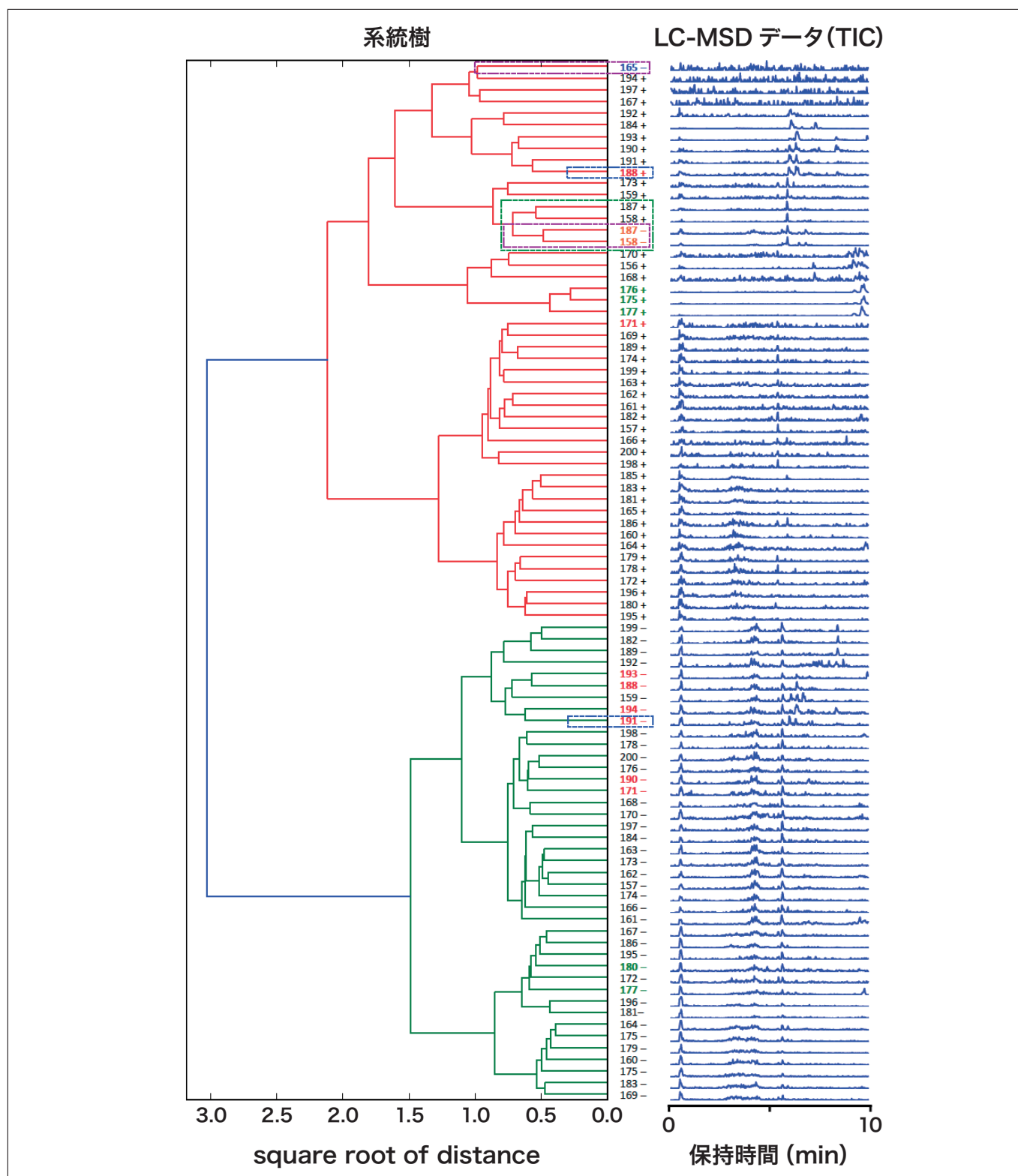


図4 系統樹解析した結果 LC-MSDデータ(TIC)

3-3. 蛍光指紋分析による主成分解析

蛍光指紋分析の測定結果を基に、主成分解析した結果を図5に示した³⁾。多くの培養サンプルは中心付近にプロットされたが、390～400 nmの蛍光波長で強い蛍光が見られた培養サンプル(171(+), 171(-), 188(+), 188(-), 190(-), 191(-), 193(-)と194(-))は赤枠内に位置し、これらの中で、生産菌171株と188株の培養サンプルは海水の有無の培養に影響せず同じ群に位置した。また、430 nm以上の蛍光波長で強い蛍光が見られた培養サンプル(175(+), 176(+), 177(+), 177(-)と180(-))は緑枠内に位置し、生産菌177株の培養サンプルのみが海水の有無の培養に影響せず同じ群に位置した。

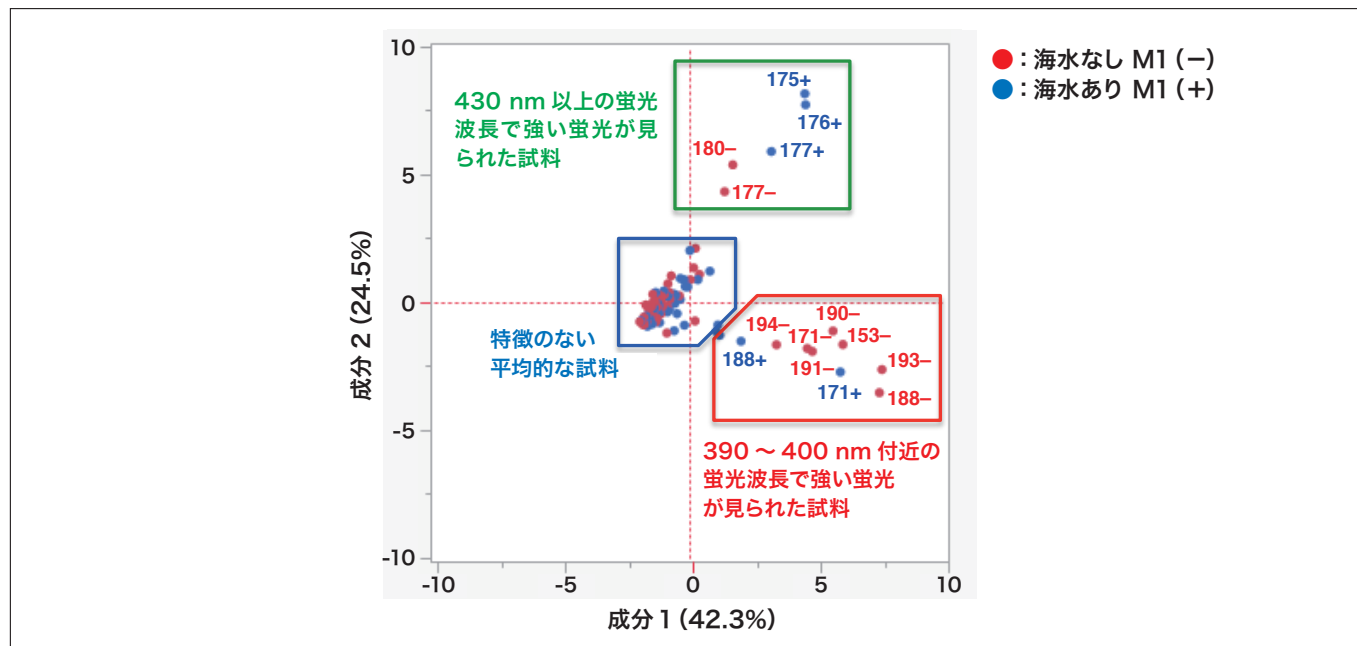


図5 蛍光指紋分析による主成分解析結果

3-4. LC-DAD-MSD 分析と蛍光指紋分析を合わせたハイブリッド解析

各測定機器から得られた結果を統合したハイブリッド解析より判断した、培養サンプルの特徴を示す。まず、蛍光指紋分析とLC-DAD分析のデータを合わせてみる。蛍光指紋分析では海水の有無の培養に関係なく同じ赤線枠内(図5: 390～400 nmの蛍光波長で強い蛍光が観察)に位置した培養サンプル171(+)と171(-)は、LC-DAD分析の系統樹解析ではそれぞれ緑線と赤線で示した異なる大クラスター内に存在した(図3: 紫色破線枠内)。また、培養サンプル171(+)以外は全て赤線で示した大クラスター内に位置し、培養サンプル194(-), 培養サンプル191(-)と188(+)および培養サンプル190(-), 171(-), 193(-)と188(-)の3つのグループに分類された(図3: 青色破線枠内)。したがって、唯一、緑線の大クラスターに位置する培養サンプル171(+)はこれらの中で特徴的なサンプルであることが示唆された。

一方、蛍光指紋分析で緑線枠内(図5: 430 nm以上の蛍光波長で強い蛍光が見られた培養液)については、全て緑線で示した大クラスター内に位置し、培養サンプル175(+)と176(+), 培養サンプル177(+)および培養サンプル177(-)と180(-)の3つのグループに大別された(図3: 橙色破線枠内)。

これにLC-MSD分析での系統樹解析を組み合わせてみることにした。まず、蛍光指紋分析(図5: 赤線枠内)とLC-DAD分析のハイブリット解析で同じグループにまとめられた培養サンプル171(-), 188(-), 190(-)と193(-)のグループは、LC-MSD分析では培養サンプル171(-)と190(-)および培養サンプル188(-)と193(-)のクラスターの2つに細分された(図6: 青色破線枠内)。また、LC-DAD分析では、やや離れて位置していた培養サンプル191(-)と194(-)は、LC-MSD分析では全く同じクラスターに位置し、さらに培養サンプル188(-)と193(-)のクラスターと近い位置にあった(図6: 橙色破線枠内)。しかし、LC-DAD分析で培養サンプル191(-)と同じクラスターに位置していた培養サンプル188(+)は(図3: 青色破線枠内)、LC-MSD分析では異なる大クラスターに位置していた(図4: 青色破線枠内)。したがって、蛍光指紋分析では1つのグループにまとめられていた培養サンプルは、ハイブリッド解析によって3つのグループに細分化された。

次に、蛍光指紋分析(図5: 緑線枠内)とLC-DAD分析のハイブリット解析で、近い位置にあった培養サンプル177(-)と180(-)は、LC-MSD分析でも近いクラスターに位置していた(図7: 青色破線枠内)。逆に、LC-MSD分析では同じクラスターに位置していた培養サンプル175(+), 176(+)と177(+)は、LC-DAD分析では培養サンプル177(+)だけがやや離れた場所に位置していた(図7: 橙色破線枠内)。したがって、このグループも3つのグループに細分化された。

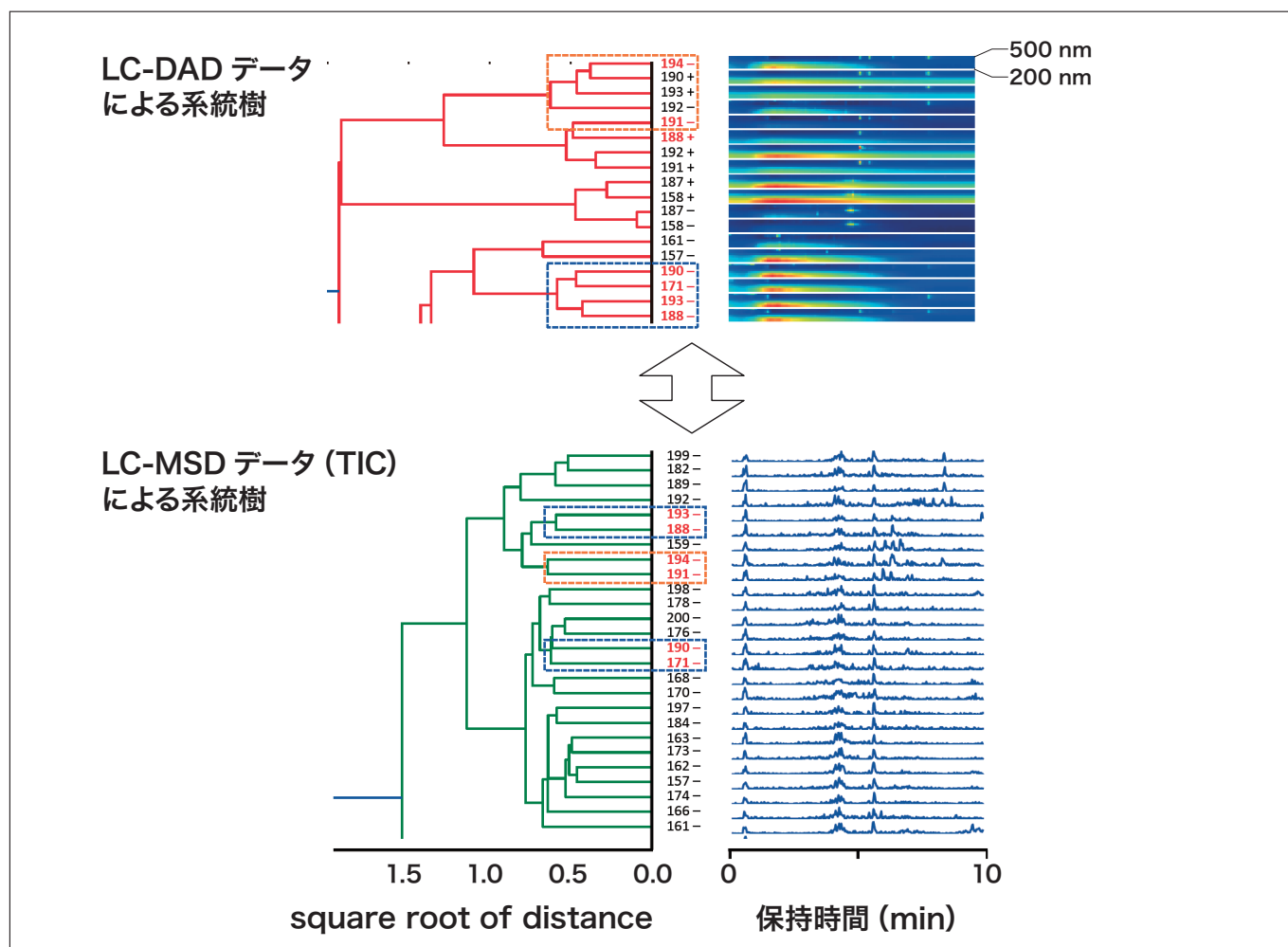


図6 蛍光波長：390～400 nmで強い蛍光が観察された培養サンプルの系統樹解析の比較 LC-DADデータとLC-MSDデータ(TIC)

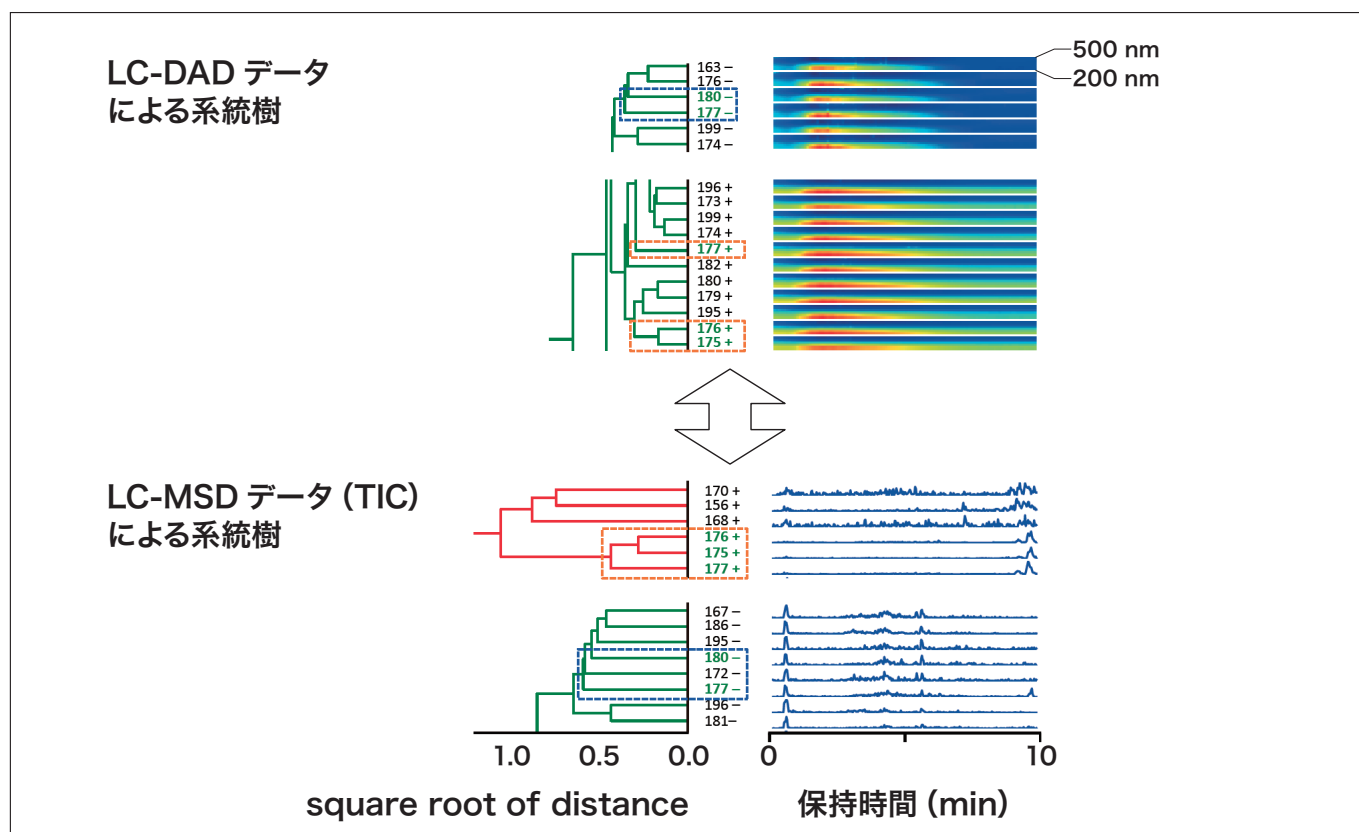


図7 蛍光波長：430 nm以上で強い蛍光が観察された培養サンプルの系統樹解析の比較 LC-DADデータとLC-MSDデータ(TIC)

4. 優先順位の決定例

各分析方法で得られた結果をクラスター解析あるいは主成分解析し、単独のデータからでも他とは性質の異なる特徴的な培養サンプルの選択が可能である。例えば、LC-MSD 分析からは、海水なしで培養した培養サンプル 158 (-) と 187 (-) の 2 サンプルだけが、海水有りで培養したサンプルのクラスター内に位置することから (図 4 紫色破線内)、この 2 つは特異的なサンプルの可能性はあることは先に述べた通りである。また、蛍光指紋分析からは 2 つのグループが選択され、その中でも生産菌 171 株、177 株と 188 株の培養サンプルは、海水の有無に関係なく同じグループに分類される特異的な生産菌として挙げられる (図 5)。しかし、今回試みたハイブリッド解析では、さらに違った切り口でサンプルの特徴を表し、細分化することで優先順位もつけることが可能である。例えば、蛍光指紋分析 (図 6) から特徴的と判断された 171 株、177 株と 188 株のうち、171 株の培養サンプル (171 (+) と 171 (-)) は、LC-DAD (図 3) および LC-MSD (図 4) の両分析方法では全く異なるクラスターに位置し、3 株の中で最も有望なサンプルの可能性はある。また、177 株の培養サンプル (177 (+) と 177 (-)) および 188 株の培養サンプル (188 (+) と 188 (-)) は、LC-MSD 分析 (図 4) では海水の有無の増地で異なる大クラスターに位置していたが、LC-DAD 分析 (図 3) では同じ大クラスターに位置し、さらに、188 株の 2 つの培養サンプルの方が 177 株の 2 つの培養サンプルより少数の大クラスターにある。したがって、この 3 つの生産菌の優先順位をつけるとすれば、171 株 > 177 株 ≥ 188 株の順と判断される。

5. 考察と今後

今回、先に行われた蛍光指紋分析による培養サンプルの結果に、LC-DAD-MSD の分析結果を統合したハイブリッド解析について紹介させていただいた。1 つの分析方法では選択の判断が難しい場合でも、複数の測定方法を組み合わせるハイブリッド解析では、多くの培養サンプルの中から特徴的なものを選別でき、さらにその優先順位をつけることも可能である。著者の研究室では天然資源からの創薬研究として、バイオアッセイによる生物活性を指標としたスクリーニングを実施しており、これにハイブリッド解析を組み合わせても面白いと考えている。バイオアッセイでは、生物活性の強弱だけで判断しているため類似の培養サンプルを選択してしまい、結果的に同じ化合物を活性物質として単離・同定してしまうことがある。しかし、各測定機器から得られる測定データだけで客観的に判断できるハイブリッド解析は、同じ生物活性を示すグループ内の培養サンプルをより細分化でき、偏った培養サンプルの選択を防ぐこともできるのではないかと考えている。現在、約 500 の培養サンプルを解析中で、それに生物活性を加えたデータ処理を進めており、その結果に興味を持たれる。機会があれば、続編として紹介させていただければと考えている。

謝辞

今回紹介した研究の一部は、北里大学薬学部 供田 洋 教授のもとで行いました。また、海洋サンプルは、東京海洋大学海洋生物資源学部門 今田 千秋 教授より御提供いただきました。なお、本資料の作成にあたり、近畿大学農学部水産学科 福田 隆志 准教授に御協力および御助言をいただきました。この場を借りて皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) D. J. Newman and G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, **79**, 629-661, 2016.
- 2) D. D. Nguyen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **110**, E2611-20, 2013.
- 3) 福田隆志, *The Hitachi Scientific Instrument News*, **60**, 5277-5282, 2017.

1. “BactoTM” は、Becton, Dickinson and Company の日本における登録商標です。
2. “3D SpectAlyzeTM” は、株式会社ダイナコム の日本における登録商標です。
3. “EEM[®]”, “Chromaster[®]” は、株式会社日立ハイテクサイエンスの日本における登録商標です。

Figure legends

- 図1 測定に使用した機器 (Chromaster[®] : LC-DAD-MSシステム)
- 図2 測定に使用した機器 (F-7100 : 分光蛍光光度計 (EEM[®] Auto システム))
- 図3 LC-DAD 分析による培養サンプルの系統樹解析
- 図4 LC-MSD 分析による系統樹解析系統樹解析
- 図5 蛍光指紋分析による培養液の主成分解析
- 図6 蛍光波長 : 390 ~ 400 nm で強い蛍光が観察された培養サンプルのハイブリッド解析
- 図7 蛍光波長 : 430 nm 以上で強い蛍光が観察された培養サンプルのハイブリッド解析