nite



2022年度NITE講座

質量分析装置による微生物産生物質の分析 (カロテノイドを例として)

2022年11月15日

独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE) バイオテクノロジーセンター(NBRC) 解析技術課 細山 哲

微生物色素 化学染料、顔料の状況



お申は 日本經濟新聞 Myニュース 日経会社情報 人事ウオッチ 日経ビジネス ログイ トップ 速報 オピニオン 経済 政治 ビジネス 金融 マーケット マネーのまなび テック 业 この記事は会員限定です 染料、中国環境規制で高騰 工場停止相次ぐ 車の内装材にも波及 2019年1月8日 2:00 [有料会員限定] 保存 中国の環境規制を受け、繊維の色を染めるのに使う染料が高騰している。衣料に使う 代表品種の知値は前年同期比2割高く、5年前に比べると2倍超だ。最大生産国の中国 では2018年春から規制を満たさない工場が相次ぎ操業を停止し、供給が減ったため だ。再稼働は今も一部にとどまる。自動車内装材などの分野を含め、影響の長期化を 懸念する声が広がってきた。 衣料用の代表的な染料では、中国が世界の7割を生産するとされる。...

出典:日本経済新聞 電子版

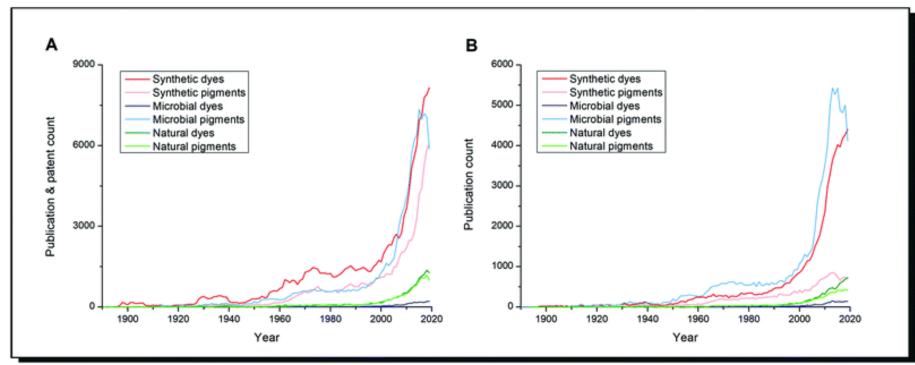
https://www.nikkei.com/article/DGKKZO39696440X00C19A1QM8000/

出典: VOGUE JAPAN公式サイト

https://www.vogue.co.jp/change/article/why-we-should-be-worried-about-chemicals-cnihub



微生物色素 顔料、染料の研究動向(傾向)



出典: Fried R.et al.

Biogenic colourants in the textile industry-a promising and sustainable alternative to synthetic dyes.

Green Chem. 2022; 24: 13-35



微生物色素 バイオ系の色素



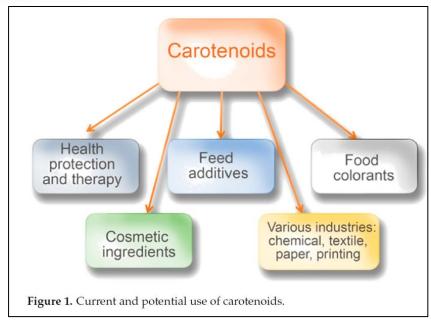
出典:化学工業日報社 公式Twitter https://twitter.com/chemicaldailyad/status/157271439494519603 2?s=20&t=8Ra SLo02PKZwnWu-tci8g



出典: Ginkgo Bioworks 公式Twitter https://twitter.com/Ginkgo/status/157589927889939661 4?s=20&t=8Ra_SLo02PKZwnWu-tci8g

微生物色素 カロテノイド

○カロテノイドの用途



出典:A. Rapoport, I. Guzhova, L. Bernetti, P. Buzzini, M. Kieliszek and A. M. Kot

Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts Metabolites 2021 Vol. 11 Issue 2

○サプリメント(藻類)



出典:大塚製薬NatureMadeホームページ.「ベータカロテン」. https://www.otsuka.co.jp/nmd/product/item 113/

○飼料用(海洋微生物Paracoccus carotinifaciens)



出典: ENEOSホームページ. 「Panaferd® (アスタキサンチン含有混合飼料) https://www.eneos.co.jp/business/function/astaxanthin/



微生物による植物が作るカロテノイドの産生

出典: NEDOスマートセルプロジェクト

https://www.jba.or.jp/nedo_smartcell/proof/07.php

実施機関

江崎グリコ(株)、(国研)産業技術総合研究所、京都大学、石川県立大学

研究開発のゴール

パプリカ由来の希少カロテノイドを高効率に生産できる微生物を開発する。

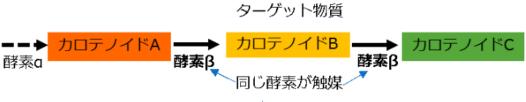
目的

食品用色素には天然色素と合成色素が存在するが、近年、天然色素のニーズが急激に上昇している。現在、天然色素の原料となる植物の調達に関しては、その大半を中国に依存しているのが現状である。原料を植物に頼らず微生物において色素生産が実現できれば、原料調達の問題が回避でき、日本企業が世界をリードできると考えられる。一方、カロテノイド色素は、可視光、紫外線の吸収機能、活性酸素の消去機能、完全な共役電子系、などの特徴を有する機能材料であり、色素としての利用以外に、生理機能素材としての健康食品、化粧品への利用が世界的に進むと考えられている。

本研究では、パプリカ由来希少カロテノイドの微生物生産実現のため、「カロテノイド代謝工学」(ウエット技術)と「機械学習情報解析」(ドライ技術)を組み合わせ、実用的なカロテノイド生産系を構築する。

結果・成果

①カロテノイドB産生微生物の構築、改良(含有率の向上)



【背景】起源種によって、カロテノイ ドB蓄積型と非蓄積型酵素がある。



【課題】ドライ技術で蓄積型酵素を洗い 出しカロテノイドBを多く蓄積させる



微生物カロテノイドスクリーニング

• NITEも、NBRC株の多様な微生物資源を保有することから、カロテノイドをターゲット物質として、微生物株を用いて実際にスクリーニングを行うことにより、生産性の高い酵素反応を持つ微生物を探索する。

約34,000株

NBRC株 (ISO9001管理)

◆一般に広く公開された高品質な微生物

- ◆一般に広く公開された同品員な似土物
- ✓ 主に国内外の研究者から寄託された微生物
- ✓ 基本的に種レベルまで同定
- ✓ ISO9001の品質マネジメントシステムにより管理
- ✓ 薬局方、JIS、ISOなどの試験法に規定
- ✓ 9,020円/株 (L-乾燥標品、アカデミック価格あり)

約60,000株

RD株 (Resource for Development) ◆NBRCが独自に収集した研究開発用の微生物

- ✓ 国内由来株: NITEが日本国内各地から収集 海外由来株: アジア各国と共同収集
- ✓ 基本的に属レベルまで同定
- ✓ 産業用途を主として想定
- ✓ 年間利用料 770円/株/年(国内由来株)









- 微生物の選抜方法
 - カロテノイド関連遺伝子の有無
 - コロニーの色
 - 真核、原核を含めた幅広い属種



43株

	No.	門 (Phylum)	株名(網属種名)、NBRC 番号							
	01	Actinobacteria	Micrococcus luteus NBRC 3333							
	02	Actinobacteria	Kocuria rosea NBRC 15588							
	03	Actinobacteria	Kocuria flava NBRC 107626							
	04	Actinobacteria	Streptomyces mirabilis NBRC 13450							
	05	Actinobacteria	Streptomyces olivochromogenes NBRC 13067							
	06	Actinobacteria	Actinophytocola gilvus NBRC 109453							
	07	Actinobacteria	Actinoplanes teichomyceticus NBRC 13999 Angustibacter luteus NBRC 105387							
	08	Actinobacteria								
	09	Actinobacteria	Asanoa ishikariensis NBRC 14551							
	10	Actinobacteria	Asanoa ferruginea NBRC 14496							
	11	Actinobacteria	Cellulomonas aerilata NBRC 106308							
	12	Actinobacteria	Nocardia seriolae NBRC 15557							
	13	Actinobacteria	Streptoalloteichus hindustanus NBRC 15115							
	14	Actinobacteria	Streptomyces cellostaticus NBRC 12849							
	15	Bacteroidetes	Flavobacterium glycines NBRC 105008							
	16	Bacteroidetes	Marinilabilia salmonicolor NBRC 15948							
	17	Firmicutes	Bacillus vietnamensis NBRC 101237							
	18	Proteobacteria	Corallococcus coralloides NBRC 100076							
	19	Proteobacteria	Pseudomonas alcaligenes NBRC 14159							
	20	Proteobacteria	Pseudomonas parafulva NBRC 16636							
	21	Proteobacteria	Sphingomonas astaxanthinifaciens NBRC 102146							
	22	Proteobacteria	Sphingomonas jaspsi NBRC 102120							
	23	Proteobacteria	Sphingomonas pruni NBRC 15498							
	24	Proteobacteria	Sphingomonas trueperi NBRC 100456							
	25	Proteobacteria	Altererythrobacter ishigakiensis NBRC 107699							
	26	Proteobacteria	Paracoccus marinus NBRC 100637							
	27	Rhodothermaeota	Rubricoccus marinus NBRC 107124							
	28	(Bigyra)	Aurantiochytrium sp. NBRC 102614							
	29	(Bigyra)	Botryochytrium radiatum NBRC 104107							
	30	(Bigyra)	Oblongichytrium sp. NBRC 102618							
	31	(Bigyra)	Ulkenia amoeboidea NBRC 104106							
	32	(Bigyra)	Aurantiochytrium sp. NBRC 111922							
	33	(Bigyra)	Thraustochytrium sp. NBRC 111921							
	34	(Bigyra)	Thraustochytrium sp. NBRC 111915							
	35	(Bigyra)	Schizochytrium sp. NBRC 102617							
	36	Ascomycota	Neonectria coccinea NBRC 104641							
	37	Mucoromycota	Phycomyces blakesleeanus NBRC 33097							
	38	Mucoromycota	Blakeslea trispora NBRC 32295							
	39	Mucoromycota	Mucor circinelloides f. circinelloides NBRC 4554							
	40 41	Basidiomycota	Rhodosporidium toruloides NBRC 0559							
		Basidiomycota	Rhodotorula aurantiaca NBRC 0754							
	42	Basidiomycota	Rhodotorula mucilaginosa NBRC 0909							
	43	Basidiomycota	Rhodosporidium toruloides NBRC 10032							
ŀ										



微生物カロテノイドスクリーニング 計測方法

微生物細胞



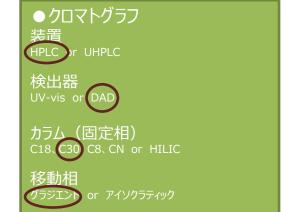
●カロテノイドの抽出

細胞破砕

物理的:乳鉢、乳棒、ビーズ破砕、温度 化学的:酸、アルカリ、界面活性剤 生物学的:リゾチーム、ペクチナーゼ、セルラーゼ

有機溶剤の選択 ヘキサン、アセトン、エタノール DMSO







●質量分析 イオン源 APCI ESI, APPI

質量分析装置

イオントラップ(IT)、トリプル四重極(QQQ)、四重 極飛行時間(Q TOF)、 フーリエ変換型(Orbitrap FT-ICR)









出典:生物資源データプラットホームDBRP. https://www.nite.go.ip/nbrc/dbrp/top

	⊿ A	В	С		E Const Mass	F	G	Н	100000	J	K	L	M	N N
	2 No.	Phylum ^{*a} Scientific Name	Peak	分子式 (予30)	Exact Mass	λmax (UV-visible spectrum) ^{*t}	HPLC条件1 RT(min)	ESI-MS (m/z)	HPLC条件2 RT(min)	APCI-MS (m/x)	APCI-MS/MS fragment ion $(m/z)^{*d}$	同定カロテノイト (一部、文献情報による	文献記載カロテノイト	カロテノイド生産性文献情
	3 🔻	NBRC No.	▼	Ψ .	v v		Ψ 1			7	· ·	推定がロテノイド)**		•
	4		P01-	C62H92O12	1028.6589	-	4.7	1028.6672[M]+ 1029.6738[M+H]+ 1051.6586[M+Na]+ 1067.6339[M+K]+	10.4-10.8			(Sarcinaxanthin diglucoside)		
・タID	_ A	Actinobacteria	P01-	2 C56H8207	866.6061	413, 437, 467	7.2	866.6050[M]+ 867.6114[M+H]+ 889.5961[M+Na]+ 905.5682[M+K]+ 849.6020[M+H+H20]+	14.6-15.3	867.6141[M+H + 849.6033[M+H+H2O]+ 705.5606[M+H+monoquiucoside]+ 667.5505[M+H+H2O-monoqiucoside]+ 669.5404[M+H-212O-monoqiucoside]+	687.5[M+H+H20-monoqlucoside]+; 128.1, 159.1, 169.1, 173.1, 185.1, 197.1, 209.1, 215.2, 223.2, 235.2, 251.2, 277.2, 317.2	(Sarcinaxanthin monoglucoside)	文部原告がは、同様になり、Seronssarthn dishoods、Seronssarthn monoplusade. Seronsarthn、Pakausethn. Norshisusarthn. Lycopene. Desprensarthn. Sarprensarthn の著き/検索されいる。	PM1D: 20802040 PMCID: PMCE950468 DOI: 10.1126/36.00724-10
・タタイト	6	NBRC 3333	P01-1	3 C50H7202	704.5532	414, 437, 467	10.8	704.5518[M]+ 705.5585[M+H]+ 727.5419[M+Ns]+ 743.5128[M+K]+	19.8-20.5	705.5594[M+H]+ 687.5501[M+H+20]+ 669.5397[M+H+20]0]+ 669.5397[M+H+20]0]+ 613.4997[M+H+20]0]+ 613.4992[M+H+70]uleme]+ 995.4882[M+H+20-Tolume]+	687.5[M+H-H2O]+; 128.1, 199.1, 169.1, 173.1, 188.1, 197.1, 209.1, 215.2, 223.2, 225.2, 251.2, 277.2, 317.2 705.6[M+H]+; 128.1, 199.1, 169.1, 173.1, 188.1, 197.1, 209.1, 215.2, 223.2, 235.2, 251.2, 277.2, 317.2	(Sarcinaxanthin)		
機関名	7 02	Actinobacteria Kocuria rosea	P02-	-		-	9.1		16.9				文献調査がおは、同種について、Carthaxanthin。 Echimenone, 4-Hydroxyechinenone 等の産生が報告さ TUA	PMID: 21299681 h PMID: 21299681
	8	NBRC 15588	P02-		-	-	12.8		21.3				(4-0)	
	。 <mark>·株</mark> 情	 等報、検	出ビー	ク、分子	式(予	測)、	DAD	(\lambdamax)	, HPL	_Cリテンション!	タイム、MS計測イス	ン、同定力	ロテノイド(予測)、文献情
	10 ⁰⁴ S	reptomyces mirabilis NBRC 13450 Actinobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	•			
		NBBC 13067 Actinobacteria	es -	-	-	-	-	-	-	-	-			
	12	NBRC 109453 Actinobacteria		-	-	-	-	-	-	-	•			
	13 O7 Activ	NBRC 13999 Actinobacteria	-	-		-		-	-	-	•			
日	14 08	Actinobacteria Angustibacter luteus NBRC 105387	-	-	-	-	-	- 1028.6622[M]+	-	-				
	15		P09-	C62H92012	1028.6589	-	4.7	1028.06.22[M]+ 1029.0670[M+H]+ 1051.6529[M+Na]+ 1067.6293[M+K]+	10.4-10.8	-	-	(Sarcinaxanthin diglucoside)		
ンロード	16	Actinobacteria	P09-	2 C56H8207	866.5061	413, 437, 467	7.2	866.6071[M]+ 867.6136[M+H]+ 889.5971[M+Na]+ 905.5699[M+K]+ 849.6036[M+H-H2O]+	14.6-15.3	867.5125[M+H]+ 849.6036[M+H+H20]+ 831.5934[M+H+24(20]+ 705.5605[M+H+monoqiucosde]+ 687.5502[M+H+H20-monoqiucosde]+ 649.5407[M+H+24(2)-monoqiucosde]+	687.5[M+H+H20-monoqlucosde]+; 128.1, 159.1, 169.1, 173.1, 185.1, 197.1, 209.1, 215.2, 223.2, 235.2, 251.2, 277.2, 317.2	(Sarcinaxanthin monoglucoside)		
ファイル ファイル		Acanoa ishikariensis NBRC 14551	P09-:	3 C50H7202	704.5532	-	10.8	704.5537[M]+ 705.5598[M+H]+ 727.5437[M+Na]+ 743.5170[M+K]+	19.8-20.5	705.5605[M+H]+ 687.5500[M+H]+ 687.5500[M+H+202]+ 669.5400[M+H-202]+ 669.5400[M+H-204]+ 613.4980[M+H+704]ene]+ 995.4880[M+H+704]ene]+	687.5[M+1H420]+: 128.1, 199.1, 169.1, 173.1, 185.1, 197.1, 209.1, 215.2, 223.2, 255.2, 251.2, 277.2, 317.2 705.6[M+H]+: 128.1, 199.1, 169.1, 173.1, 185.1, 197.1, 209.1, 215.2, 223.2, 235.2, 251.2, 277.2, 317.2	(Sarcinaxanthin)		
								536,4385[M]+		537,4462[M+H]+				
ンロード	LCMSresults_carotenoids.xlsx)		
ファイル	イルの名前 別添 2 - LCMS測定結果													
ファイル	の説明 微生物43株のカロテノイド及び標準品のLCMS測定結果													



	(ダウンロート
データID	ANAS0000100150001
データタイトル	データ(No.01:Actinobacteria:Micrococcus luteus NBRC 3333株の微生物カロテノイドプロファイルデータ)
実施機関名	独立行政法人 製品評価技術基盤機構
概要	高速液体クロマトグラフ(Nexera(島津製作所製))/フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析計(solariX 7T(Bruker製))により得られたフォトダイオードアレイ検出器(PDAD)の検出成分の紫外・可視吸収スペクトルの結果からは3本のピークを検出し、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)、大気圧化学イオン化法(APCI)から得られたMSスペクトルデータ及び文献情報からカロテノイドを推定した。
実施日	
URL	
ダウンロード	01_Actinobacteria_Micrococcus_luteus_NBRC_3333.pdf
ファイルの名前	微生物色素分析データ01 Actinobacteria Micrococcus luteus NBRC 3333
ファイルの説明	Micrococcus luteus NBRC 3333株のカロテノイド生産性についてのレポート
ダウンロード	LCM

01 Actinobacteria

Micrococcus luteus NBRC 3333

カロテノイド生産性確認測定結果



ファイルの名前

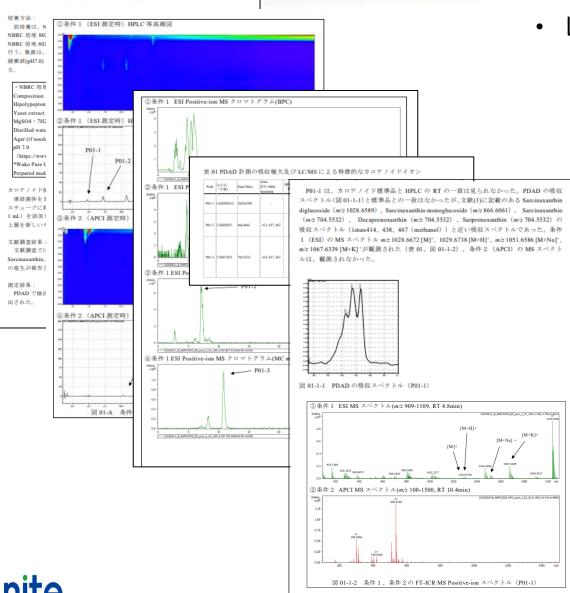
ファイルの説明

別添

微生

01 Actinobacteria

Micrococcus luteus NBRC 3333



- レポートの内容
 - 用語、略号の解説
 - LCMS測定条件
 - 培養方法
 - カロテノイド抽出方法
 - 文献調査
 - 測定結果(HPLC,MS)
 - 検出ピークごとのデータ (DAD、MS)
 - 予想されるカロテノイド産生結果

・本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構の委託事業 「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発/高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」「(2) 遺伝子配列設計システムの開発 (2)-1. 代謝系を設計する情報解析技術の開発 (2)-1-1.新規代謝経路の設計・最適化手法の開発」(平成29年度~30年度)及び「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発/高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」「(1)ハイスループット合成・分析・評価手法の開発(1)-9. 自家蛍光顕微鏡開発」(平成31年度~令和元年度)で行われたものです。



質量分析装置を使った解析の取組

○バイオ解析技術の応用



出典: NITEバイオ解析技術の応用

URL: https://www.nite.go.jp/nbrc/technology/index.html

○プロテオーム解析プロジェクト



出典:NITEプロテオーム解析プロジェクト

URL: https://www.nite.go.jp/nbrc/genome/project/proteome/index.html



質量分析装置による微生物解析

• プロテオーム解析





ご清聴ありがとうございました。

ご不明な点がありましたらお気軽にご連絡ください。

〒151-0066 東京都渋谷区西原 2 - 4 9 - 1 0 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) バイオテクノロジーセンター (NBRC)

解析技術課

E-mail: bio proteome@nite.go.jp

TEL: 03-3481-1936

(プロテオーム解析プロジェクト)

URL: https://www.nite.go.jp/nbrc/genome/project/proteome/index.html

(バイオ解析技術の応用)

URL: https://www.nite.go.jp/nbrc/technology/index.html

