

Title	長期植え継ぎ培養を用いた大腸菌のエタノールストレスへの適応に関する研究
Author(s)	堀之内, 貴明
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1470
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

長期植え継ぎ培養を用いた大腸菌の
エタノールストレスへの適応に関する研究

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2011年1月

堀之内 貴明

学位取得に関わる発表論文

学術雑誌

- [1] Takaaki Horinouchi, Kuniyasu Tamaoka, Chikara Furusawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Takashi Hirasawa, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, "Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress", *BMC genomics*, **11**:579, 2010.

- [2] Takaaki Horinouchi, Katsunori Yoshikawa, Risa Kawaide, Chikara Furusawa, Yoshihiro Nakao, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu, "Genome-wide expression analysis of *Saccharomyces pastorianus* orthologous genes using oligonucleotide microarrays", *J. Biosci. Bioeng.* **110**:602-607, 2010.

国際会議

- [1] Takaaki Horinouchi, Kuniyasu Tamaoka, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, "Genome-wide mutational and expression analyses of evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress", The 20th International Conference on Genome Informatics, Poster and Software Demonstrations, P071_1-2, Yokohama, Japan, December 14-16, 2009.

- [2] Takaaki Horinouchi, Kuniyasu Tamaoka, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Naoaki Ono, Shingo Suzuki, Tetsuya Yomo, Hiroshi Shimizu, "Genome-wide mutational and expression analysis of ethanol-tolerant *Escherichia coli*", International Symposium on Complex Systems Biology, Poster number 27, Tokyo, Japan, September 29 - October 1, 2009.

- [3] Takaaki Horinouchi, Katsunori Yoshikawa, Chikara Furusawa, Yoshihiro Nakao, Hiroshi Shimizu, "Analysis of lager beer yeast at low temperature fermentation using DNA microarray", The 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Journal of Biotechnology Vol.136/S S351 V2-P-016, Dalian, China, October 12-17, 2008.

内容梗概

微生物を用いた物質生産は、近年の地球環境問題に対する関心の高まりを受けて、これまでも増して注目されており、物質生産効率の向上は至上命題となっている。対象となる物質生産は多岐に渡り、宿主となる微生物も目的に応じて様々なものが用いられている。こうした背景のもと、物質生産に向けた有用細胞の育種はもちろん、いかにすれば有用細胞を創製することができるかという設計原理の構築が求められている。物質生産に向けた有用細胞の取得のためには、生物が厳しい環境条件に対しても適応できるという性質を利用した変異育種や進化工学といった手法がこれまで広く用いられてきた。また、近年の技術の進歩により、細胞状態を網羅的に解析する手法が登場してきた。最近では、このような進化工学などによる有用細胞の取得と、網羅的解析とを組み合わせることによる研究が、有用細胞を育種するための有力な手法の1つとして台頭しつつある。このような気運を受けて本研究では、進化工学の1手法として長期植え継ぎ培養系を用い、これによる有用株の取得と、その網羅的解析による育種方法についての研究を行った。

本研究では解析対象の微生物として大腸菌 *Escherichia coli* を用い、ストレスに対して適応した菌を取得し、その解析によりストレス耐性に関与する情報の取得を試みた。ストレス環境の題材としてはエタノールストレスを用いた。エタノールはバイオ燃料として既に工業的に利用されているが、その微生物による生産の際には、生産物であるエタノールによる毒性が生産効率の低下を引き起こすことが解決すべき課題となっている。そのため本研究の遂行によって、バイオエタノール生産の生産性向上に貢献するような知見を得ることを期待して、題材として選んだ。

本学位論文は第1章から第6章より構成される。以下に本論文の各章の内容を示す。第1章では本研究の背景と目的について記述した。

第2章ではストレスに対する適応株の取得について記した。エタノールストレス環境における長期植え継ぎ培養を複数系列行い、比増殖速度が上昇したような株（適応株）を6株得た。

第3章では、第2章で得た適応株と親株について遺伝子発現情報の解析を行った。適応株6株と親株の計7株について、エタノール存在下および非存在下の2条件における網羅的遺伝子発現量の測定を行い、これらを比較することにより、エタノールに対する応答や適応に関与する要素の探索を行った。その結果見出された知見の一例として、適応株ではアミノ酸 (Trp, His, Ile など) の合成に関与する遺伝子の発現量が上昇していることを明らかにした。またこれらのアミノ酸の培地中への添加により、親株のエタノール存在下における比増殖速度が上昇したことから、これらのアミノ酸がエタノールストレス耐性に関与することが示唆された。また、エタノールに対する応答や、長期培養実

験の過程で、細胞内の酸化還元状態が変化していることが示唆された。これにより、ストレスに対する応答や適応は、細胞内の代謝レベルの変化を引き起こしたことが示唆された。

第4章では代謝ネットワークに着目して遺伝子発現量の違いを解析する手法を開発した。第3章の結果より、適応株の代謝状態が変化していることが示唆されたため、代謝レベルの相違に着目した解析により、ストレスへの適応によって生じた現象をより詳細に理解できると考えたためである。第4章ではまず、生物が細胞内に持つ代謝ネットワークを、データベースを用いて構築し、発現量が増えているような遺伝子が集中しているような経路を網羅的にスクリーニングするというアルゴリズムを構築した。この手法を用いることで従来手法（遺伝子機能の情報を用いたスクリーニング）よりも、代謝レベルの変化をより詳細に把握することができることを示そうとした。この手法が有効に働くことの検証を、まずは大腸菌以外の生物種において取得した遺伝子発現データを用いて行うこととし、ラガービール醸造に用いられるラガービール酵母の遺伝子発現データに対してこの手法を適用した。

第5章では、第4章で構築した代謝ネットワークに着目した解析手法を用い、大腸菌エタノールストレス適応株と親株の遺伝子発現データの解析を行うことで、エタノールストレスに対する応答や、長期培養実験の過程における代謝レベルの変化を明らかにしようとした。その結果、ピルビン酸を中心とする TCA 回路近傍の代謝反応に関わる遺伝子の発現量が、エタノールストレスの有無や、適応株と親株の比較において変化していることが見出された。このことは、第3章において推察したような細胞内酸化還元状態の変化と対応するものであり、エタノールストレスによって引き起こされた現象を代謝状態の変化という観点から明らかにすることができた。また、第5章で行った解析により、エタノールストレス存在下においては核酸合成経路の一部が活性化するというなどを新たに見出した。

最後に第6章では本研究で得られた知見をまとめ、進化工学と網羅的情報を組み合わせることによる手法が有用細胞の育種にどのように貢献できるのかについて論じ、その結果を踏まえて今後の展望について述べた。

目次

第1章 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.2 網羅的解析をもとにした有用細胞の育種	3
1.3 進化工学による有用細胞の育種	5
1.4 進化工学と網羅的解析の組み合わせによる有用細胞の育種	6
1.5 本論文の目的および論文の構成	7
第2章 長期植え継ぎ培養を用いた大腸菌のエタノールストレスへの適応	10
2.1 緒言	10
2.2 実験方法および実験材料	13
2.2.1 使用菌株	13
2.2.2 使用培地	13
2.2.3 大腸菌の培養	14
2.2.3.1 試験管を用いた培養実験	14
2.2.3.2 濁度計つき振とう培養装置を用いた培養実験	14
2.2.3.3 植え継ぎ培養実験	14
2.2.3.4 長期植え継ぎ培養実験	14
2.3 結果	15
2.3.1 ストレス環境下における長期植え継ぎ実験に供するための親株の取得	15
2.3.2 長期植え継ぎ実験に供するためのエタノールストレス濃度の検討	17
2.3.3 エタノールストレス環境下における長期植え継ぎ実験による適応株の取得	19
2.3.4 様々なエタノール濃度における比増殖速度の評価	20
2.3.5 エタノールストレス適応株の表現型安定性の検証	21
2.4 考察	23
2.5 結言	25
第3章 遺伝子発現情報に基づくエタノール適応株の解析	26
3.1 緒言	26
3.2 実験方法および実験材料	28
3.2.1 使用菌株	28
3.2.2 使用培地	28
3.2.3 大腸菌の培養	29
3.2.3.1 試験管を用いた培養実験	29
3.2.3.2 濁度計つき振とう培養装置を用いた培養実験	29

3.2.4	DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現量の測定	29
3.2.4.1	タイリングアレイの概要	29
3.2.4.2	DNA マイクロアレイ実験	30
3.2.5	DNA マイクロアレイ解析	30
3.2.5.1	マイクロアレイデータの前処理	30
3.2.5.2	マイクロアレイデータの解析	31
3.2.5.3	統計検定	31
3.2.6	軟寒天培地による細胞運動性試験	33
3.2.7	アミノ酸および硫酸鉄の添加による増殖への影響	33
3.2.8	蛍光プローブによる細胞内活性酸素種濃度の測定	33
3.2.8.1	測定原理	33
3.2.8.2	活性酸素種濃度の測定	34
3.3	結果	35
3.3.1	親株および適応株の遺伝子発現情報の主成分分析	35
3.3.2	主成分分析により得られた情報を用いた遺伝子のスクリーニング と機能分類	39
3.3.2.1	第一主成分に対して大きく寄与する遺伝子の機能	39
3.3.2.2	第二主成分に対して大きく寄与する遺伝子の機能	50
3.3.2.3	第三主成分に対して大きく寄与する遺伝子の機能	59
3.3.3	アミノ酸および硫酸鉄の添加による増殖への影響	63
3.3.4	エタノール適応による細胞内活性酸素種濃度の変化	67
3.4	考察	72
3.5	結論	75
第4章	代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニング手法の開発	76
4.1	緒言	76
4.2	実験方法および実験材料	81
4.2.1	代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニング	81
4.2.1.1	代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニングの概要	81
4.2.1.2	代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニングの アルゴリズム	82
4.2.1.2	代謝ネットワークの構築	83
4.2.2	ラガービール酵母のDNA マイクロアレイデータの取得	83
4.2.2.1	使用菌株	83
4.2.2.2	ラガービール酵母の培養	83
4.2.2.3	DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現量の測定	84
4.2.3	DNA マイクロアレイ解析	84

4.2.3.1	遺伝子発現データの前処理	84
4.2.3.2	遺伝子機能分類	84
4.3	結果	85
4.3.1	ラガービール酵母の DNA マイクロアレイデータの取得	85
4.3.2	ラガービール酵母の DNA マイクロアレイデータの遺伝子 機能分類による解析	86
4.3.3	ラガービール酵母の DNA マイクロアレイデータの代謝 ネットワーク構造に着目した解析	89
4.3.3.1	代謝ネットワークの構築	89
4.3.3.2	スクリーニングによって得られた代謝ネットワーク	91
4.4	考察	95
4.5	結言	96
第 5 章	代謝ネットワークに着目したエタノール適応株の解析	97
5.1	緒言	97
5.2	実験方法および実験材料	98
5.2.1	使用した遺伝子発現データ	98
5.2.2	代謝ネットワークの構築	98
5.2.3	代謝ネットワーク構造に基づくスクリーニングのアルゴリズム	98
5.3	結果	99
5.3.1	大腸菌親株および適応株における遺伝子発現データの代謝 ネットワーク構造に着目した解析	99
5.3.2	エタノールストレスの有無によって発現量が変わった代謝経路	102
5.3.3	親株とエタノール適応株とで発現量が変わった代謝経路	102
5.4	考察	106
5.5	結言	107
第 6 章	結論	108
6.1	結果のまとめ	108
6.2	エタノールストレスへの応答や耐性付与、エタノール生産に対する 本研究の寄与	109
6.3	今後の展望	112
参考文献	114
Appendix	127
謝辞	146

第1章 序論

1.1 研究の背景

微生物は古くは発酵食品などの生産に用いられてきた。こうした発酵食品の生産は、微生物の細胞内において起こる、生存や繁殖のために必要な物質を生成するための生体内化学反応（代謝反応）を利用したものである。最近では環境負荷の低減のために、微生物を用いた物質生産の重要性が認識されつつある（Rittmann 2008; Okano *et al.*, 2010）。このような物質生産もまた、微生物の代謝を利用したものにほかならない。

こうした物質生産に際しては、物質生産菌の生産効率を上昇させることが求められる。そのためのアプローチを大別すると(1)目的物質のより効率的な生成、(2)生産効率低下の要因の排除の2つが挙げられる。(1)の目的物質のより効率的な生成のための方策としては、基質となる栄養源の取り込み速度や目的物質の生成速度の向上、副生成物を減少させることによる目的物質の収率の上昇などが挙げられ、そのような特性を持つ菌株の単離や育種が試みられてきた。(2)の生産効率低下の要因とは、物質生産の過程で生じ、物質生産菌の生産性の低下を引き起こすストレスのことを指し、それを緩和したり回避したりする努力がなされてきた。このようなストレスには、物質生産の各工程に生じる、様々な要因に起因するものがある。たとえば培養初期の高い基質濃度に起因する浸透圧や、発酵熱による高熱ストレス、生産物の蓄積による毒性によるストレス、物質生産過程における環境（pH、基質濃度など）の変化によるストレスがある。これらを軽減、回避するための方策として、物質生産プロセスの改良（基質を徐々に添加する流加培養、基質の添加と同時に培養液の抜き取りも行う灌流培養など）や、ストレスに強い菌株の単離や育種が行われてきた（Jarboe *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008）。

前述のような生産性向上に向けた物質生産菌の育種のために古典的に用いられてきた方法の1つとして、変異育種がある。紫外線や変異誘導物質を用い、細胞のゲノムに突然変異を生じさせることで、元の菌株と異なる性質を有する変異株を発生させることができる。このようにして生じさせた多数の変異株から、目的とする性質を持つような有用株を選抜し、物質生産などに用いるという方法が用いられていた（相田ら, 1986）。しかしこの方法によって得た変異株に、どのような細胞の性質の変化が起こったのかを知ることは困難であり、生産性の向上にどのような要素が必要であるか理解することは難しかった。そのため、目的に応じてその都度新たな変異株を得る必要があるという点や、得た複数の変異株の特性を複合させることが難しいという問題点がある。変異育種を用いた方法によって、様々な微生物による非常に多くの物質生産において数々の成功例があるにも関わらず、前述のような問題点により、これらの成功例を組み合わせたり、さらに発展させたりするということは困難であった。変異育種による方法は、そのよう

な点において汎用性に欠けるといえる。また、目的とする性質を付与するような変異以外の、不要または有害な変異が同時に生じてしまうことがある。たとえば、対象とする物質の生産能が高い変異株を選抜すると、しばしばその増殖能は野生型株よりも劣っていることがある (Ikeda, 2003)。このように、変異育種はその簡便さにより多くの成果を挙げ、現在まで用いられてきたが、解決すべき問題も多く抱えているといえる。

一方、分子生物学の発達により、細胞の構成要素である遺伝子やタンパク質についての研究が進み、生物システムについての知見が徐々に蓄積されるにつれ、物質生産の過程で起こっている現象の理解が可能となってきた。また、分子生物学の発展による遺伝子組換え技術 (Curtiss, 1976) の登場により、人為的に遺伝子の改変を行い、それにより物質生産菌の表現型を操作することによる育種を行うことができるようになってきた。しかし、人為的な遺伝子の改変を行う際にどのような遺伝子をターゲットとすればよいかということが新たな課題として生じてきた。

また、生化学や生理学の発展により、細胞内の主要な代謝反応や、それに関与する遺伝子やタンパク質についての知見が蓄積されてきた (Gots and Benson, 1974)。そのため、基質となる栄養源の取り込み速度や目的物質の生成速度の向上、また副生成物を減少させることによる目的物質の収率の上昇などのために、どの遺伝子をターゲットとすべきであるかについて、ある程度の示唆を得ることができるようになった。また、細胞が有する環境応答機構に関する研究により、細胞がストレスにどのように応答しているのかが徐々に明らかにされ (Gregory *et al.*, 1973; Anderson *et al.*, 1979; Craig, 1985)、そうした知見を物質生産過程におけるストレスの緩和や回避に生かすことが可能となってきた。

しかしながら、こうした知見を手掛かりとしながらも、遺伝子改変による細胞育種はしばしば多大なる試行錯誤を必要とした。このことの原因として考えられるのは、生物の有する複雑さである。生体内で起こる代謝反応や、環境に対する応答反応は全て DNA、RNA、タンパク質という多段階の情報伝達によって制御されている。DNA、RNA、タンパク質はそれぞれの階層において複雑な相互作用のネットワークを形成しており、また階層間にも相互作用が存在する (Fig. 1.1)。これらの要素数は現在明らかになっている範囲で、それぞれ数百から千以上にも上る。さらに、このような生体内のネットワークの形状は、株間や生物種間で異なった特徴を有する。このような複雑な生物システムを対象とし、個々の遺伝子について組み換え技術による改変を行おうと考えた時に、生物の全体としてのふるまいにどのような影響を与えるかを予測することは多くの場合非常に困難である。こうした理由により、遺伝子改変によって目的の性質を細胞に付与しようとする細胞育種は、試行錯誤による事例の蓄積や経験則に基づいて行われることが多かった。そのため、有用菌株の合理的な育種手法の開発や、合理的育種のための生物システムの理解が望まれてきた。

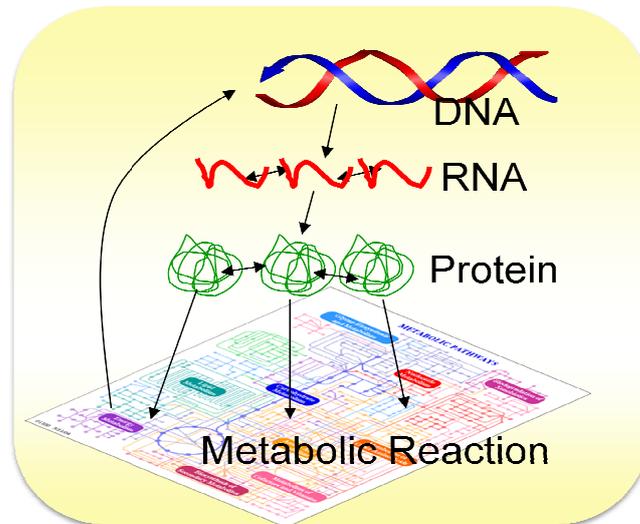


Fig. 1.1. 生物が有する多階層構造の概要図
DNA、RNA、タンパク質はそれぞれの階層において複雑な相互作用のネットワークを形成しており、また階層間にも相互作用が存在する。

1.2 網羅的解析をもとにした有用細胞の育種

近年の分子生物学の発展により、細胞の様々な情報を網羅的に測定する手法が開発されてきた。こうした手法の登場により生物システムをより詳細に理解できるようになり、その成果を育種に利用しようとする試みがなされた。

ゲノムプロジェクトによって様々な生物種のゲノムの全塩基配列の解読が進められている (Liolios *et al.*, 2010)。ゲノム塩基配列は生物システムの中でも最も根幹となる情報であり、その解読によって、生命現象のより詳細な理解が可能となった。たとえば複数の生物種のゲノム配列の比較、とりわけ研究が進んでいるモデル生物とその他の生物との比較により、遺伝子の機能アノテーションが効率的に進むようになった。さらに、最近のシーケンサーの性能向上によるゲノム解読のコスト低下 (Sterky and Lundeberg, 2000; Bennett *et al.*, 2005; Droege and Hill, 2008; Metzker, 2010) によって、ゲノム解析を育種に応用することが可能となってきた。たとえば野生型株と変異株とのゲノム比較により、有用な表現型をもたらす遺伝子変異を同定することが可能である。これにより有用な変異のみを付与した株を構築することができるため、有害な変異が同時に生じてしまうという変異育種の持つ欠点を克服することができる。このようなアプローチによる成果の一例として、変異育種によって取得したリジン高生産変異株の解析により、リジン生産能を高めた株を遺伝子改変によって再構成することに成功したという報告 (Ohnishi *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2006) がある。

また、ゲノム配列のみならず細胞の内部状態を一斉分析する手法も登場した。たとえば DNA マイクロアレイ技術の登場により、細胞内の全ての遺伝子について、その発現量を一度に測定することが可能となった (Lipshutz *et al.*, 1999; Noordewier and Warren, 2001; Kapranov *et al.*, 2003)。また各種クロマトグラフィーや質量分析計により、細胞内外の代謝物質を一斉に測定することが可能となった (Monton and Soga, 2007; Rabinowitz, 2007; Krone *et al.*, 2010)。こうした分析技術を用いて、生物のストレス応答機構のより詳細な理解や、目的物質の生産性の向上を目指す研究が行われるようになった。このような研究の最もベーシックなアプローチの1つとしては、同一の菌株を用い、その状態が異なるような場合を解析対象とするものがある。たとえば環境ストレスが存在する場合と存在しない場合の比較により、生物のストレス応答機構のゲノムワイドな解析を行うことができる。大腸菌を題材としたものでは、高温ストレスや浸透圧ストレスなどの環境ストレスに対して、どのような遺伝子の発現が誘導されたり抑制されたりするのかを解析したという例がある (Gunasekera *et al.*, 2008)。しかしながらこの方法は、ストレスに対しての細胞の応答を解析することができても、そのようにして発見した、ストレスに対して応答を示す遺伝子が、ストレス耐性をもたらすものであるかどうかは明らかではない。一方、より直接的にストレス耐性に関与する要素をスクリーニングするための方法としては、野生型株と、それよりも優れたストレス耐性を有する近縁種とを比較することによって、ストレス耐性に関与する知見を得ようとするものがある。たとえば、伝統的に醸造などに用いられてきた醸造酵母は、実験室酵母と比較して、醸造中に生じるストレス (基質である糖や生産物であるエタノールの高濃度ストレス) に対して優れた耐性を示す。醸造酵母と実験室酵母の遺伝子発現パターンの比較により、エタノールストレス耐性や、醸造特性に関与すると思われる要素の抽出に成功したという成功例がある (Hirasawa *et al.*, 2007; Shobayashi *et al.*, 2007)。

このように、標準的な株とストレス耐性株や物質生産株との比較は、生産性向上のための知見を効率よく取得する強力な手法の1つとして用いられている。しかしながら、この方法を常に用いることができるとは限らない。その理由は、目的とする性質を有する株 (上述のストレス耐性株などに対応するもの) が常に存在するとは限らないからである。醸造酵母は人類の歴史の中で、長い期間にわたって酒類の製造に用いられてきたため、その過程で醸造プロセスに特化した性質を獲得したと考えられる。従って、エタノール耐性を汎用性のある実験室酵母などに付与しようと考えた時に、リファレンスとすべき菌株としてそうした醸造酵母に白羽の矢が立つのは自然な着想である。しかし最近では、微生物を用いた物質生産の対象は多岐にわたっている。たとえばバイオ燃料としていち早く研究が進み、実用化がなされたのはエタノールであるものの、最近では、より燃料としての化学的性質が優れたブタノールやプロパノールなどが着目されつつある (Dürre, 2007; Yan and Liao, 2009)。前述のように、エタノール耐性の解析には醸造酵母を用いることができたが、ブタノールやプロパノールなど、人類の歴史においてこ

れまであまりなじみがなかったような物質に対して耐性を有するような菌株は、とりわけ酵母や大腸菌のような、物質生産菌の宿主として通常用いられるようなモデル生物やその近縁種においては、単離がなされていない場合がほとんどである。このように、標準株とストレス耐性株（や物質生産株）との比較による育種は、任意の目的物質を対象とすることはできず、より一般性のある方法論の開発が望まれている。

1.3 進化工学による有用細胞の育種

生物は厳しい環境条件などに対しても、長期間かけて適応するという環境適応能力を有する。たとえば元来増殖が困難であったり、増殖が可能であったとしてもその速度が著しく小さくなるような環境条件に置かれても、しだいに増殖能を獲得または回復させる（適応する）という現象がしばしば観察される。このような適応現象は、個体レベルで生じることもある。とりわけ世代時間が長いような生物種では、個体レベルの適応現象がよく観察される。また、世代をまたいでこのような適応現象が起こる場合もあり、世代時間の短い微生物においてよく研究がなされている。こうした適応現象を育種に利用するという試みが行われてきた（Sauer 2001）。このような適応現象は、細胞に生じた変異と、自然淘汰による適者生存によって起こると考えられており、進化の一種であるといえる。変異育種は通常、変異剤による変異の導入と、目的とする形質の選択培地によるスクリーニング（多くは寒天培地によるシングルコロニーアイソレーション）という2つの段階からなり、人為的な進化プロセスの一種と解釈することができる。また、上述のような寒天培地を用いた変異育種以外にも、リアクターによる連続培養系や試験管による植え継ぎ培養系などを用いて長期間培養することによる実験室進化も、しばしば行われてきた（Helling *et al.*, 1987; Lenski and Bennett; 1993）。このように生物進化を工学的な目的に利用することを進化工学と呼ぶ。進化工学による育種は、希望する性質や機能を人為的に設計することができない場合であっても、生物進化の原理を利用して希望する性質や機能を持つ生物を獲得することができるという特徴があり、古くから利用されてきた。

網羅的な分析手法の登場以前は、進化工学的手法によって得た株にどのような変化が起こり、目的とする性質が付与されたのかを解析することは困難であった。そのため、進化工学の研究分野においては、タンパク質や核酸など、配列情報の分析が比較的容易な生体高分子を題材として、欲しい機能を有する生体高分子を創製したり、得られた高分子の構造解析により高分子の設計原理を理解するという研究（進化分子工学）が多く行われた（伏見, 1993; Steipe, 1999）。このころにも生物そのものを用いた実験室進化を題材とした研究は行われていたが、技術的な制約から、その解析は表現型を中心とした

ものや、集団遺伝学などの観点からの研究に限定されていた (Lenski and Travisano, 1994; Cooper and Lenski, 2000)。

1.4 進化工学と網羅的解析の組み合わせによる有用細胞の育種

網羅的分析技術の発展により、進化工学に新たな可能性が生じてきた。実験室進化によって得た株と元の株の比較により、その過程で生じた変化（発生した変異や細胞内部状態の変化）を詳細に解析することが可能となった。最近になって、実験室進化と網羅的解析を組み合わせた報告例が出つつある。たとえば Palsson らのグループは、グリセロールや乳酸など、大腸菌が本来資化しにくいような物質を単一炭素源とした場合にも高い増殖速度を示す大腸菌を長期培養培養によって得たのちに、その株の詳細解析を行っている (Fong *et al.*, 2005a; Herring *et al.*, 2006)。また、Lenski らのグループは、高温条件に対して適応した複数の大腸菌株の解析を行っている (Riehle *et al.*, 2003)。このように、進化工学的手法に網羅的分析を取り入れるという研究が進められつつある。

前節で述べたように、進化工学を用いることで、希望する性質や機能の設計原理が不明瞭であるような場合であっても、実験室進化によって目的とする性質を有する株を取得することができる。さらに、これらの株の網羅的解析を行うことで、希望する性質や機能を設計するための情報を取得することができる。このような、進化工学と網羅的解析の組み合わせによる手法を用いて、目的物質の生産能やストレス耐性などを対象として研究を行うことで、物質生産の際の生産効率を上昇させるような情報を取得可能するだけではなく、そのような有用細胞を設計するための知見が得られると考えられる。この育種手法は、原理的には任意の目的物質を対象として、その耐性菌を取得したり、そうした耐性をもたらすような知見を得ることができる。そのため 1.2 で挙げた一般性についての問題点（たとえば、元来自然界にあまり存在しない物質に対する耐性菌をどのようにすれば育種できるようになるか、など）を解決できるものと考えられる。

網羅的解析に供するための耐性菌の取得に、長期培養実験などではなく変異育種を用いるという戦略も考えられる。実際に、変異育種によってストレス耐性株を取得し、その解析をマイクロアレイなどによって行ったという報告が既に存在する (Yomano *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2003)。一方で、こうした株の細胞内部状態の解析のみならず、次世代シーケンサー (Metzker, 2010) などによる全ゲノム配列解析をも行おうとした際には、変異育種によって得た株の場合、高い変異率に起因する多数の不要な、または有害な変異が、有用な変異と同時に発見される場合がある。たとえば変異育種によって得たリジン生産菌の例 (Ikeda *et al.*, 2006) においては、リジン合成に関与する代謝経路に対象を絞ることによって、有用な変異のみを選抜しようと試みている。しかしながら、こうしたターゲットの絞り込みが難しい場合には、変異育種によって得た株のゲノム配

列の解析から有用な変異を同定することは難しいと考えられる。進化工学的手法においては、こうした変異育種とは異なり変異原を用いず、長期にわたる淘汰によってすぐれた形質をもつ株をスクリーニングするため、有用でない変異が同時に発生するという頻度が小さくなることが期待される。そのためストレスなどに対する耐性株を取得するためには、変異育種による手法よりも実験デザインとして適していると考えられる。実際に前述したような、実験室進化を用いた研究を強力に進めようとしている研究者らは、進化実験によって得た進化株を全ゲノム配列解析に供するという研究を行っており、すでにそうした成果も報告されつつある (Herring *et al.*, 2005; Stanek *et al.*, 2009)

1.5 本論文の目的および論文の構成

微生物を用いた物質生産は、近年の地球環境問題に対する関心の高まりを受けて、これまでも増して注目されており、物質生産効率の向上は至上命題となっている。対象となる物質生産は多岐に渡り、宿主となる微生物も目的に応じて様々なものが用いられている。こうした背景のもと、物質生産に向けた有用細胞の育種はもちろん、いかにすれば有用細胞を構築することができるかという設計原理の理解が求められている。そうした有用細胞の育種、および有用細胞の設計原理の理解のために、生物の適応を基盤とする進化工学と網羅的解析とを組み合わせることによる研究が、有力な手法の1つとして台頭しつつある。このような気運を受けて本研究では、進化工学の1手法として長期植え継ぎ培養系を用い、これによる有用株の取得と、その網羅的解析を行うこととした。

本研究では解析対象の微生物として大腸菌 *Escherichia coli* を用いた。大腸菌はモデル生物として古くから遺伝的背景が解析され、遺伝子操作の手法も確立されている。また近年では、様々な物質、バイオ燃料や医薬品、工業原料などを生産するための宿主としても用いられている (Ajikumar *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Yan and Liao, 2009)。この大腸菌を用い、ストレス環境条件下における長期植え継ぎ培養を行い、ストレスに対して適応した菌を取得し、その解析によりストレス耐性に関与する情報の取得を試みた。ストレス環境の題材としてはエタノールストレスを用いた。エタノールはバイオ燃料として既に工業的に利用されているが、その微生物による生産の際には、生産物であるエタノールによる毒性が生産効率の低下を引き起こすことが解決すべき課題となっている。そのため本研究の遂行によって、バイオエタノール生産の生産性向上に貢献するような知見を得ることを期待して、題材として選んだ。

本学位論文は第1章から第6章より構成される。その概要を Fig. 1.2 に示す。以下に本論文の各章の内容を示す。第1章では本研究の背景と目的について記述した。

第2章ではストレスに対する適応株の取得について記した。エタノールストレス環境における長期植え継ぎ培養を複数系列行い、比増殖速度が上昇したような株（適応株）を6株得た。

第3章では、第2章で得た適応株と親株について遺伝子発現情報の解析を行った。適応株6株と親株の計7株について、エタノール存在下および非存在下の2条件における網羅的遺伝子発現量の測定を行い、これらを比較することにより、エタノールに対する応答や適応に關与する要素の探索を行った。その結果見出された知見の一例として、適応株ではアミノ酸 (Trp, His, Ile など) の合成に關与する遺伝子の発現量が上昇していることを明らかにした。またこれらのアミノ酸の培地中への添加により、親株のエタノール存在下における比増殖速度が上昇したことから、これらのアミノ酸がエタノールストレス耐性に關与することが示唆された。また、エタノールに対する応答や、長期培養実験の過程で、細胞内の酸化還元状態が変化していることが示唆された。これにより、ストレスに対する応答や適応は、細胞内の代謝レベルの変化を引き起こしたことが示唆された。

第4章では代謝ネットワークに着目して遺伝子発現量の違いを解析する手法を開発した。第3章の結果より、適応株の代謝状態が変化していることが示唆されたため、代謝レベルの相違に着目した解析により、ストレスへの適応によって生じた現象をより詳細に理解できると考えたためである。第4章ではまず、生物が細胞内に持つ代謝ネットワークを、データベースを用いて構築し、発現量が変化しているような遺伝子が集中しているような経路を網羅的にスクリーニングするというアルゴリズムを構築した。この手法を用いることで従来手法（遺伝子機能の情報をを用いたスクリーニング）よりも、代謝レベルの変化をより詳細に把握することができることを示そうとした。この手法が有効に働くことの検証を、まずは大腸菌以外の生物種において取得した遺伝子発現データを用いて行うこととし、ラガービール醸造に用いられるラガービール酵母の遺伝子発現データに対してこの手法を適用した。

第5章では、第4章で構築した代謝ネットワークに着目した解析手法を用い、大腸菌エタノールストレス適応株と親株の遺伝子発現データの解析を行うことで、エタノールストレスに対する応答や、長期培養実験の過程における代謝レベルの変化を明らかにしようとした。その結果、ピルビン酸を中心とする TCA 回路近傍の代謝反応に關わる遺伝子の発現量が、エタノールストレスの有無や、適応株と親株の比較において変化していることが見出された。このことは、第3章において推察したような細胞内酸化還元状態の変化と対応するものであり、エタノールストレスによって引き起こされる現象を代謝状態の変化という観点から明らかにすることができた。また、第5章の解析によりエタノールストレス存在下においては核酸合成経路の一部が活性化するという事を見出した。

最後に第6章では本研究で得られた知見をまとめ、進化工学と網羅的情報を組み合わせることによる手法が有用細胞の育種にどのように貢献できるのかについて論じ、その結果を踏まえて今後の展望について述べた。

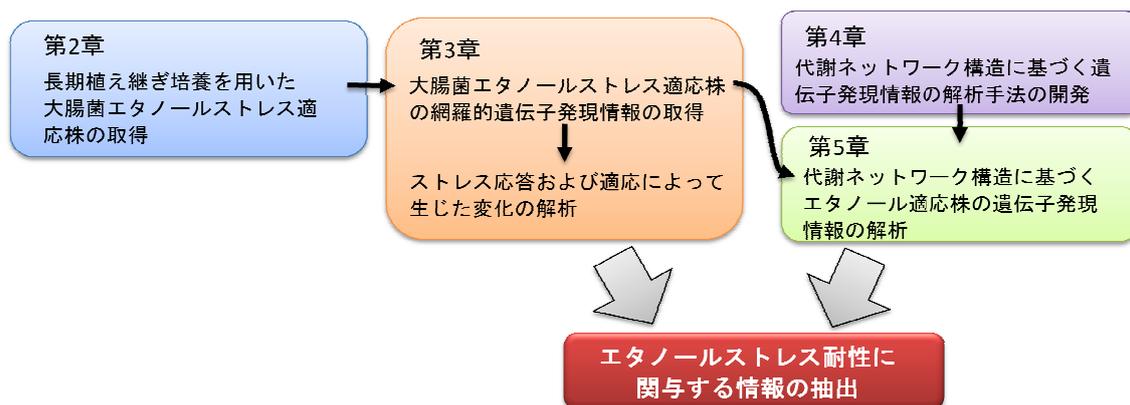


Fig. 1.2. 本論文の構成とその概要

第2章 長期植え継ぎ培養を用いた大腸菌のエタノールストレスへの適応

2.1 緒言

近年の地球環境問題に対する関心の高まりや、化石燃料に変わる代替燃料の開発の必要性を受け、その方策の1つとしてバイオマス由来燃料の生産に関する研究が盛んに行われている。その先駆けとして、酒類として人類と歴史上最も古くから関わってきたエタノールが題材として研究されてきた。エタノール生産のための宿主として、ビールやワイン、日本酒などの酒類の生産に用いられる酵母のほかに、様々な物質生産の宿主として用いられることも多い大腸菌を用いた研究がなされている (Jarboe *et al.*, 2007)。大腸菌は酵母ほどのエタノール耐性能は持たないものの、高い比増殖速度や、糖類の資化性などの利点を持つ。とくに糖類の資化性は、木質系バイオマスを原料としてエタノール生産に用いる際には重要となってくる。木質系原料は六単糖（主にグルコース）と五単糖（主にキシロース）より構成され、酵母はこれらのうち五単糖を資化できないが、大腸菌はその両方を資化する能力を有する。

バイオエタノール生産に際して、生成物であるエタノールの毒性による生産性の向上は大きな問題となる。とりわけ大腸菌は酵母よりもエタノール耐性の点で劣るため、その耐性の付与は特に重要な課題であると言える。大腸菌のエタノール耐性に関する研究は1970年の後半から行われており、そのころには生理学的な研究や、個別遺伝子についての研究が行われてきた。たとえばエタノール耐性と、細胞膜に含まれる脂肪酸の構成成分との関連性を述べた研究 (Ingram, 1976; Dombek and Ingram, 1984) や、エタノールの暴露によって引き起こされる大腸菌のストレス応答についての研究 (VanBogelen *et al.*, 1987; Brissette *et al.*, 1990; Tamura *et al.*, 1992) などがある。また、同様の研究は酵母においても行われている (Sajbidor and Grego, 1992; Costa *et al.*, 1993; Alexandre *et al.*, 1994; Piper, 1995)。

最近の技術の発展により、網羅的手法を用いてエタノールストレスに対する生物の応答を解析する研究が行われている。酵母においては、エタノールストレスに暴露した際の遺伝子発現の変化のマイクロアレイによる解析 (Alexandre *et al.*, 2001) や、エタノール耐性に優れた醸造酵母と実験室酵母との遺伝子発現の比較により、耐性に関する情報 (Hirasawa *et al.*, 2007) の取得が試みられている。野生型の大腸菌がエタノールストレスに対してどのように応答するかについての網羅的な解析はなされていないものの、変異育種によって取得したエタノール耐性大腸菌の網羅的遺伝子発現解析が行われ

(Gonzalez *et al.*, 2003)、エタノール耐性株が親株と比してどのような性質を有しているかということの解析が行われた。

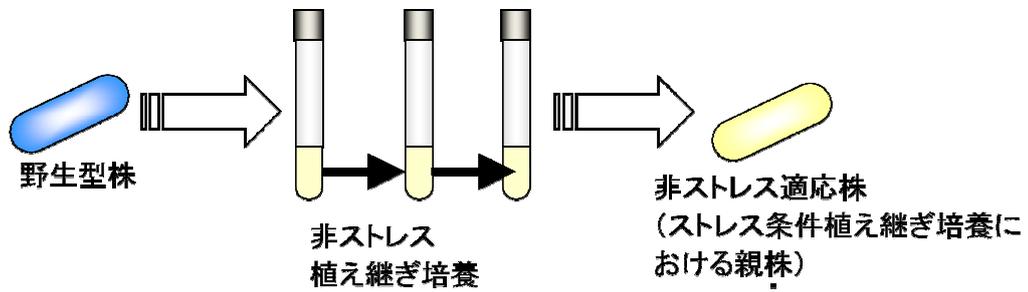
しかしながら、この研究は、変異育種によって取得した株を解析対象としている。変異育種は変異剤などの存在下で遺伝子変異を高頻度で生じさせることで、耐性株を効率よくスクリーニングしようとする反面、耐性と無関係、あるいは有害となる表現型を生じさせるような変異が同時に発生する確率が高く、その解析結果には耐性と無関係な情報が含まれる恐れがある。そのため本研究では、変異剤が存在しないような環境下で長期間培養実験を行うことによってエタノール環境に対して適応した株を得て、その株を解析することで、エタノール耐性に関与する公算がより大きいような情報を抽出することを試みた。

Gonzalez らの報告 (Gonzalez *et al.*, 2003) は、エタノール耐性株 1 株のみについて解析した結果であり、遺伝子変異という確率事象によって生じた株を対象としている以上、何が必要な変化で何が偶然による変化かを切り分けて考えることは困難であると考えられる。そこで本研究では、複数系列の長期植え継ぎ培養実験を独立に行い、これらをすべて解析に供し、その共通点や差異を議論することで、エタノール耐性に関与する情報を取得することを試みた。

また、このような長期培養実験を行うと、ストレス物質の存在の有無にかかわらず、温度条件や培地条件に対して大腸菌が適応し、比増殖速度が徐々に上昇するという現象が起こることが報告されている (Cooper and Lenski, 2000; Fong *et al.*, 2005; Kishimoto *et al.*, 2010)。そこで、このような温度条件や培地条件に対する適応とエタノールストレスに対する適応とを分離して解析するために、本章ではまず、ストレスが存在しない条件において比増殖速度が上昇しなくなるまで培養実験を行い、それによって得た株を親株として、エタノールストレス条件下における培養実験に供する (Fig. 2.1) という実験系を用いることにした。

本論文では、適応、耐性という語について、以下のような意味で用いる。適応とは、長期培養実験によって、その環境条件下での比増殖速度が上昇することを指し、長期培養実験によって得た株を適応株と呼ぶ。耐性は、ある環境条件に対して、野生型株よりも抵抗性（その環境条件下における比増殖速度や生残率）が高いことを指し、長期培養実験によって得た株以外に対しても用いる。

1. ストレス以外の条件(温度、培地条件など)への適応



2. 複数系列のストレス条件下における植え継ぎ培養

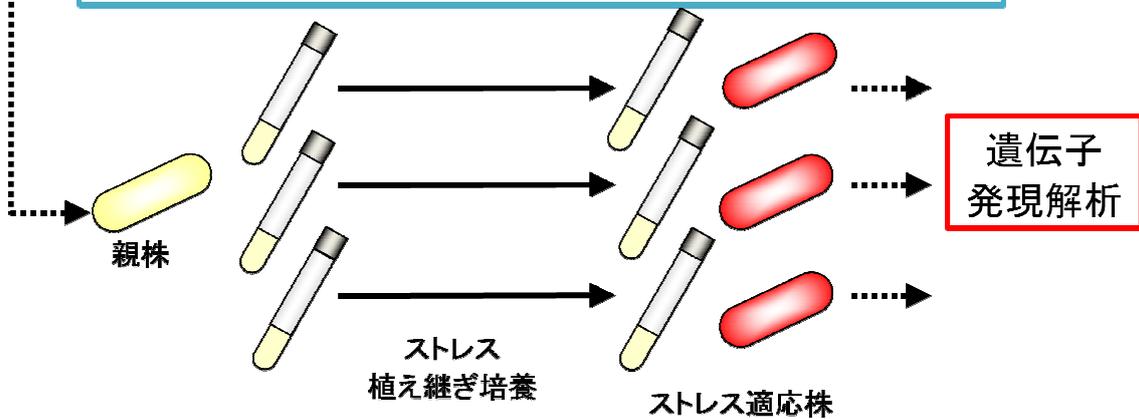


Fig. 2.1. 本研究で用いた長期植え継ぎ培養実験の実験デザイン

まずエタノールストレスが存在しない条件において培養を行い、得られた株を親株としてエタノールストレス条件下での長期植え継ぎ培養実験に供することで、ストレス耐性に関与する情報の取得を試みた。また、エタノールストレス条件下での長期植え継ぎ培養実験を複数系列行い、それらを比較することにより、ストレス耐性に関与する情報の取得を試みた。

2.2 実験方法および実験材料

2.2.1 使用菌株

本章で用いた大腸菌株を Table 2.1 に示す。*Escherichia coli* W3110 は国立遺伝学研究所より譲渡を受けたものを用いた。

Table 2.1. 第 2 章で用いた大腸菌株

Strain	
<i>Escherichia coli</i>	
W3110	野生型株
親株	野生型株を、エタノールを含まない培養条件における長期植え継ぎ培養実験 (2.3.1) に供することで取得した株
適応株 A 株 ~ F 株	親株を、エタノール 5% を含む条件における長期植え継ぎ培養実験 (2.3.3) に供することで取得した株

2.2.2 使用培地

大腸菌の培養には M9 培地を用いた。本研究で用いた M9 培地の組成を Table 2.2 に示す。H₃PO₄を用いて、培地の pH が 7.0 となるように調製した。また、エタノールストレス条件における培養実験を行う場合には、この培地にエタノールを、所定の終濃度 (v/v) となるように添加した。

Table 2.2. M9 培地組成 (Sambrook and Russell, 2001 による)

試薬名	濃度
Glucose	4 g/L
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	17.1 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mM
CaCl ₂	0.1 mM

2.2.3 大腸菌の培養

2.2.3.1 試験管を用いた培養実験

全ての培養実験における前培養、および 2.3.2 におけるエタノール濃度の検討、2.3.4 における様々なエタノール濃度での増殖の評価、ならびに全ての植え継ぎ培養実験は、蓋付き試験管 TST-SCR18-180 (旭硝子株式会社)、9998CAP415-18 (AGC テクノグラス株式会社) を用いて行った。蓋付き試験管に 10 ml の液体培地を入れ、ウォーターバス Personal-11 (タイテック株式会社) を用いて、30°C、150 stroke/min. で振とう培養を行った。増殖は分光光度計 UV mini-1240 (株式会社 島津製作所) を用いて、波長 600 nm の濁度により測定した。

2.2.3.2 濁度計つき振とう培養装置を用いた培養実験

2.3.5 のエタノールストレス条件下における比増殖速度の測定には、濁度計つき振とう培養装置バイオフィトレコーダーTVS062CA (アドバンテック東洋株式会社) を用いて行った。L型培養管 TV100030 (アドバンテック東洋株式会社) に 5 ml の液体培地を入れ、TVS062CA を用いて 30°C、40 rpm で振とう培養を行った。増殖は TVS062CA に内蔵されている濁度計を用いて、波長 660 nm の濁度により測定した。

2.2.3.3 植え継ぎ培養実験

試験管を用いた培養実験のうち、培養液の一部を新たな液体培地が入った試験管に移すことによって培養を継続するようなものを、本論文では植え継ぎ培養実験と呼ぶ。

2.2.3.4 長期植え継ぎ培養実験

ある環境条件下に対して大腸菌を適応させるために、長期間にわたって植え継ぎ培養を行うものを、特に長期植え継ぎ培養実験と呼ぶ。植え継ぎは 24 時間に一度行い、その都度、培養液の一部を新たな培地が入った試験管に移した。植え継ぐ培養液の量は以下のようにして決定した。

- 1) 前回の植え継ぎから 24 時間が経過した時点の培養液の濁度を測定する。
- 2) 前回の植え継ぎの初期細胞濃度と、24 時間が経過した時点の培養液の濁度より、比増殖速度を算出する。
- 3) 算出した比増殖速度を用い、24 時間後に濁度 $OD_{600}=0.05$ となるように、植え継ぐ培養液の量を計算する。

2.3 結果

2.3.1 ストレス環境下における長期植え継ぎ実験に供するための親株の取得

本章ではエタノールストレス環境下における長期植え継ぎ培養により、ストレス適応株を取得することを目的としている。しかしながら、微生物を変化しない一定環境のもとで長期間培養すると、その環境（温度や培地条件など）に対して適応し、比増殖速度を増加させるということがしばしばみられる（Cooper and Lenski, 2000; Fong *et al.*, 2005; Kishimoto *et al.*, 2010）。そのため、野生型株をそのままストレス存在下での長期植え継ぎ実験に供すると、このような環境への適応と、ストレスへの適応が同時に起こると予想される。このような環境への適応と、ストレスへの適応とを分離して解析するために、まず野生型株をストレスが存在しない環境に適応させ、その株を親株としてストレス環境下における長期植え継ぎ実験に供することとした。

大腸菌 W3110 株（以後野生型株）を 3 つの試験管に植菌し、これらをエタノールを含まない環境に対して適応させるために長期植え継ぎ実験を行った（Fig. 2.2）。その結果、約 600 時間の植え継ぎ培養により、全ての系列において比増殖速度が約 0.26 h^{-1} から約 $0.5 \sim 0.55 \text{ h}^{-1}$ 程度まで上昇した。その後約 300 時間培養実験を継続したが、比増殖速度はそれ以上上昇しなかった。培養開始より 912 時間が経過した時点において、3 つの系列の菌体を -80°C で凍結保存した。

前述のようにして得られた株を凍結保存から復帰させた場合にも、同様の高い比増殖速度を保持しているかどうかを確認するために、凍結保存していた株をふたたび長期植え継ぎ培養実験に供した（Fig. 2.3）。その結果これらの株は、元の株と同程度の比増殖速度を示した。

上記のようにして、ストレスが存在しないような実験系における環境に対して適応した 3 種の株を得ることに成功した。これらのうちの系列 1（Fig. 2.2）を、エタノールストレス環境下での長期培養実験における親株として用いることにした。

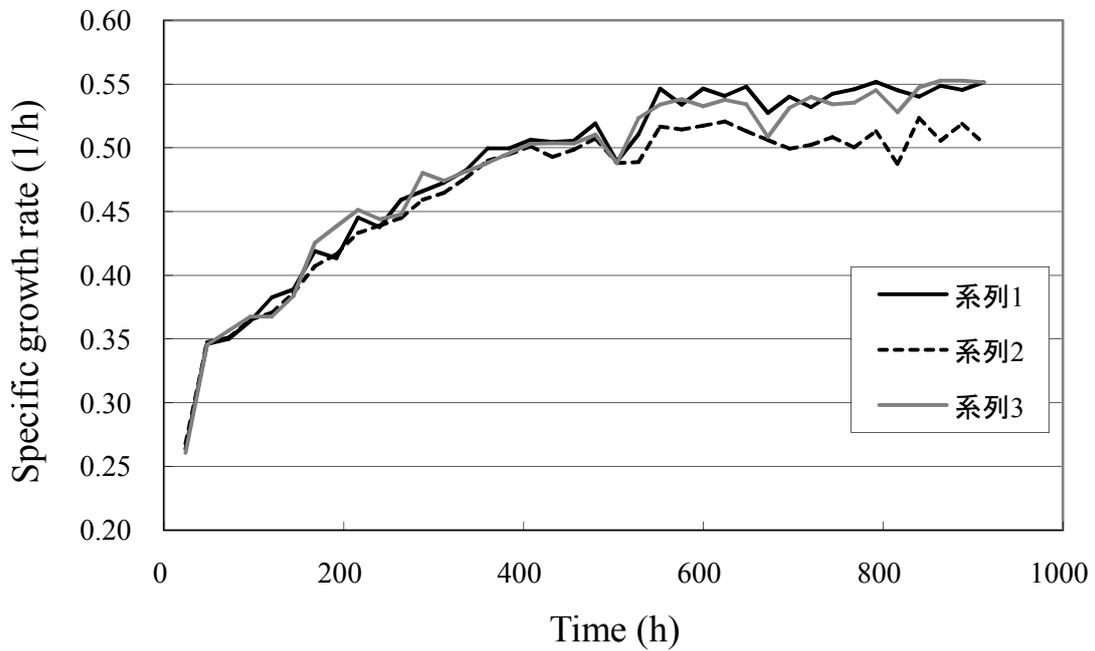


Fig. 2.2. ストレス非存在下での大腸菌野生型株の長期植え継ぎ培養実験における比増殖速度の経時変化。約 600 時間の植え継ぎ培養により、全ての系列において比増殖速度が約 0.26 h^{-1} から約 $0.5 \sim 0.55 \text{ h}^{-1}$ 程度まで上昇した。

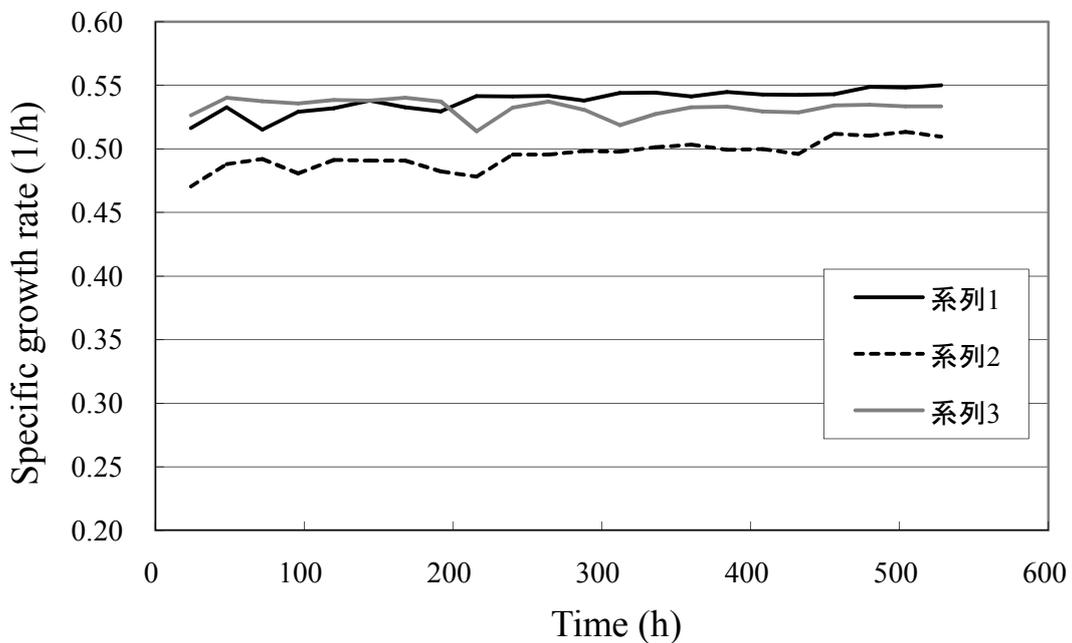


Fig. 2.3. ストレス非存在下に対して適応した株が、凍結保存後も高い比増殖速度を保っていることを検証するための長期植え継ぎ培養実験。これらの株は凍結保存後も、Fig. 2.2 と同程度の比増殖速度を示した。

2.3.2 長期植え継ぎ実験に供するためのエタノールストレス濃度の検討

長期植え継ぎ実験に供するためのエタノールストレス濃度を検討するために、親株を様々な濃度条件において培養した。大腸菌のエタノールストレスに対する応答を調査した報告では、野生型大腸菌に対して3~5%程度の濃度のエタノールを使用することが多く (Ingram, 1976; Dombek and Ingram., 1984; Cullum *et al.*, 2001)、エタノール耐性株の育種や取得を目的とした既存研究においては、5~7%の濃度のエタノール存在下において増殖が可能であるような耐性菌が取得されている (Yomano *et al.*, 1998)。そこでこの検討実験において用いるエタノール濃度としては、5%以上の濃度を供することにした。エタノール濃度がそれぞれ0%, 5%, 6%, 7%, 7.5%となるように、培地にエタノールを添加し、培養を行った (Fig. 2.4) その結果、親株はエタノール濃度6%までは増殖が可能であったが、エタノール濃度7%以上ではほぼ増殖が停止した。

次に、これらのエタノール濃度を含むような培地において、親株を長期間培養することが可能であるかどうかを検証した。親株をまずエタノール濃度5%および6%を含む培地で培養し、培養液の一部を、同じ濃度のエタノールを含む新たな培地に植え継ぎ、その後24時間ごとに植え継ぎ操作を行った (Fig. 2.5)。その結果、エタノール濃度6%における培養実験では、約60時間目以降においては増殖が停止した。そこでエタノールストレス環境下における長期植え継ぎ培養実験には、エタノール濃度5%を用いることにした。

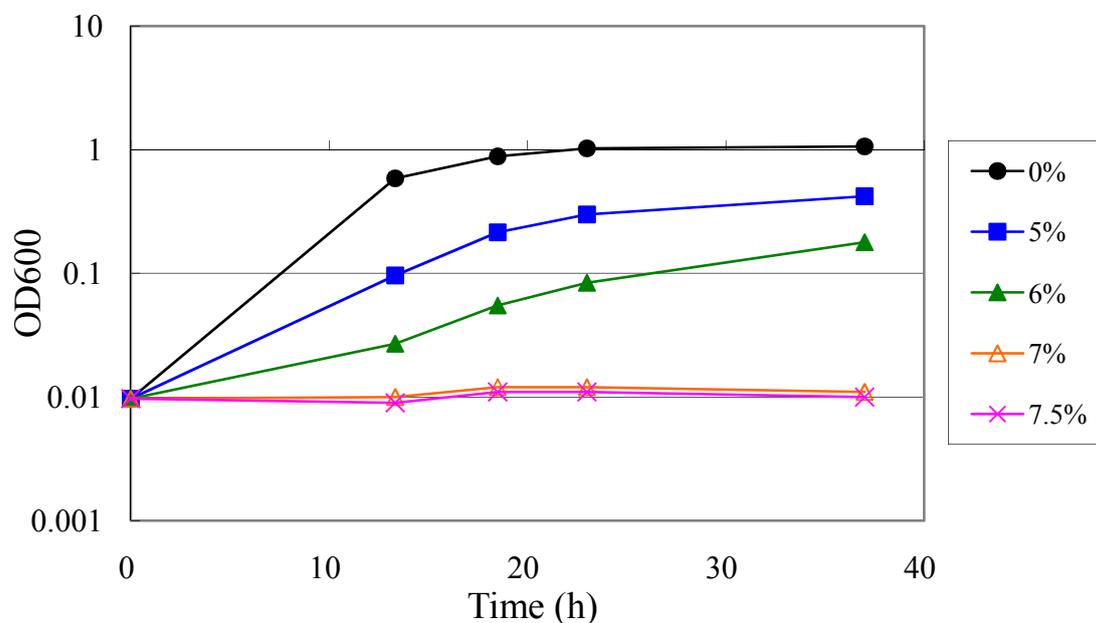


Fig. 2.4. 親株の様々なエタノールストレス濃度における増殖曲線。エタノール濃度6%までは増殖を示したが、エタノール濃度7%以上においてはほぼ増殖が停止した。

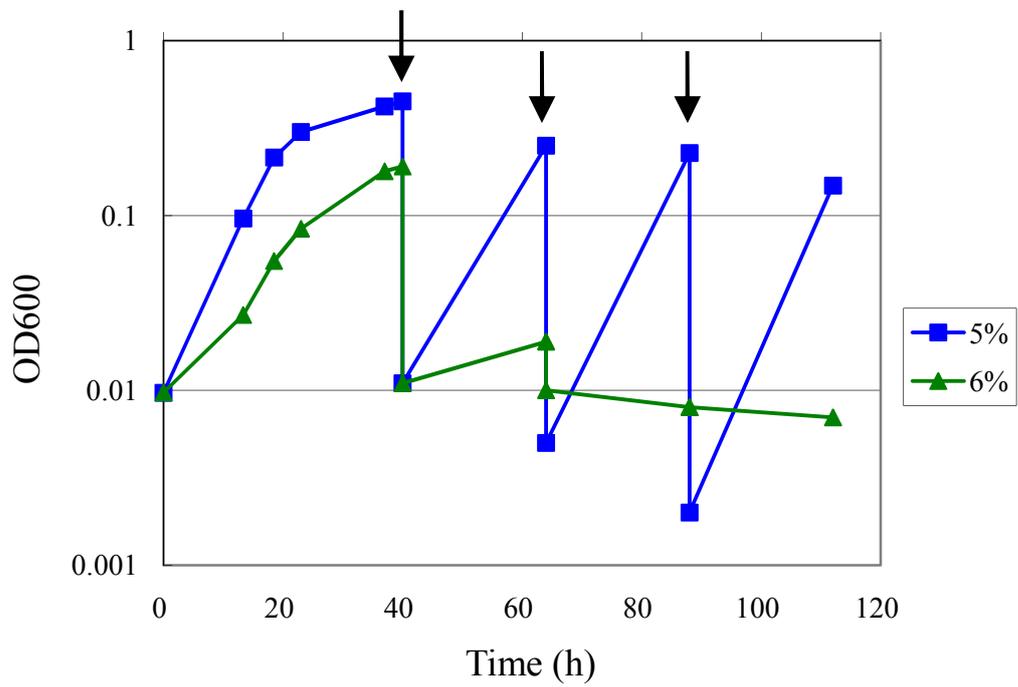


Fig. 2.5. 親株を用いたエタノール濃度 5%および 6%における植え継ぎ培養。図中矢印において植え継ぎ操作を行った。エタノール濃度 6%においては、約 60 時間目以降は増殖が停止した。

2.3.3 エタノールストレス環境下における長期植え継ぎ実験による適応株の取得

2.3.1 において取得した親株を用い、エタノールが濃度 5% となるように添加した培地を用い、長期植え継ぎ培養実験を 6 つの系列において行った (Fig. 2.6)。その結果、約 2500 時間後 (約 1000 世代) までに、全ての系列において比増殖速度が 0.3 h^{-1} まで上昇した。また、約 2200 時間後以降は比増殖速度の上昇がみられなくなったため、2496 時間目に培養実験を終了した。これらの系列を以後、培養終了時の比増殖速度の順に、適応株 A 株 ~ F 株と呼ぶ。これらの株を -80°C で凍結保存した。

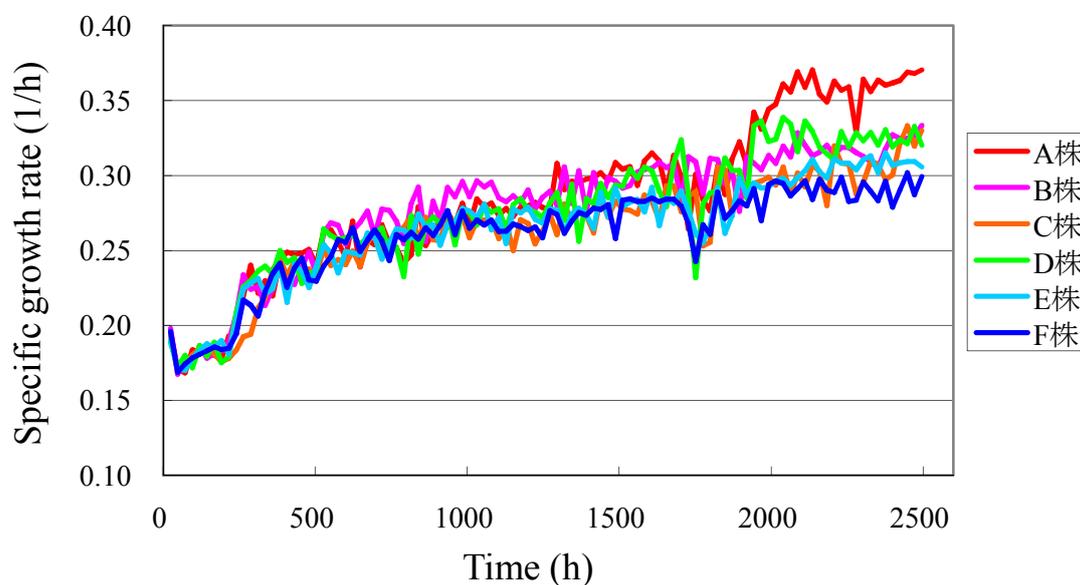


Fig. 2.6. エタノール濃度 5%における植え継ぎ培養実験における比増殖速度の経時変化。全ての系列において約 2500 時間後には、比増殖速度が 0.3 h^{-1} 前後まで上昇した。これらの系列を以後、比増殖速度の順に、適応株 A 株 ~ F 株と呼ぶ。

2.3.4 様々なエタノール濃度における比増殖速度の評価

2.3.3 によって得られた適応株が、エタノール存在下において親株や野生型株よりも高い比増殖速度を示すかどうかを確認するために、様々な濃度のエタノールを添加した培地を用いて培養実験を行い、それぞれの場合における比増殖速度を算出した (Fig. 2.7)。その結果、エタノール存在下では全ての濃度条件において、適応株 A 株および F 株は、親株や野生型株よりも高い比増殖速度を示した。また、適応株 A 株は F 株よりも高い比増殖速度を有しており、長期培養実験終了時 (Fig. 2.6) の比増殖速度の大小関係が保存されていることが確認できた。さらに、親株および野生型株はエタノール濃度 6.5% 以上においては増殖できなかったが、適応株は増殖することができた。一方でエタノール非存在下においては、適応株よりも親株のほうが高い比増殖速度を示した。野生型株は全ての条件において、最も低い比増殖速度を示した。

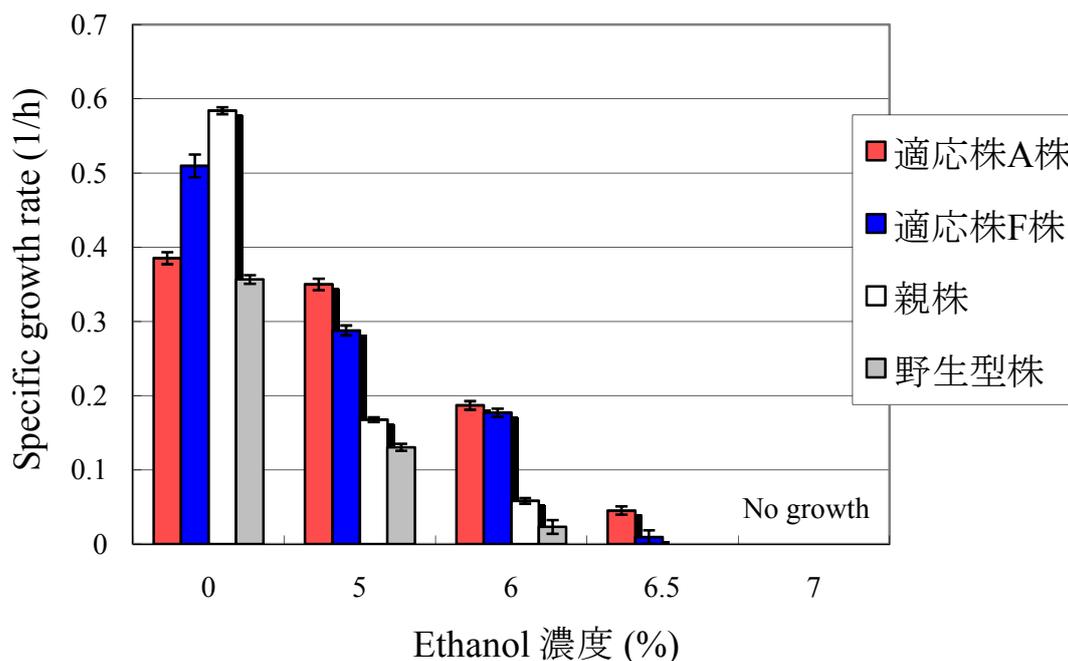


Fig. 2.7. 様々なエタノール濃度における野生型株、親株、適応株の比増殖速度。エラーバーは 3 回の繰り返し実験における比増殖速度の標準偏差を示す。

2.3.5 エタノールストレス適応株の表現型安定性の検証

長期植え継ぎ実験によって得られた適応株が有する、エタノールストレス環境下における高い比増殖速度という性質が、安定に保持されうるかどうかを検証するために、エタノールストレスを含まない環境において植え継ぎ培養を行い、その後もエタノール存在下における比増殖速度が低下しないかどうかを調査した (Fig. 2.8)。Fig. 2.9 に、適応株 A 株および F 株を用いてエタノール非存在下において植え継ぎ培養を行った場合の比増殖速度の経時変化を示す。また Fig. 2.10 に、その場合におけるエタノール存在下 (濃度 5%) での比増殖速度を示す。適応株は、エタノール非存在下において 144 時間 (約 100 世代) が経過した後も、親株よりも高い比増殖速度を保持していることが確認できた。

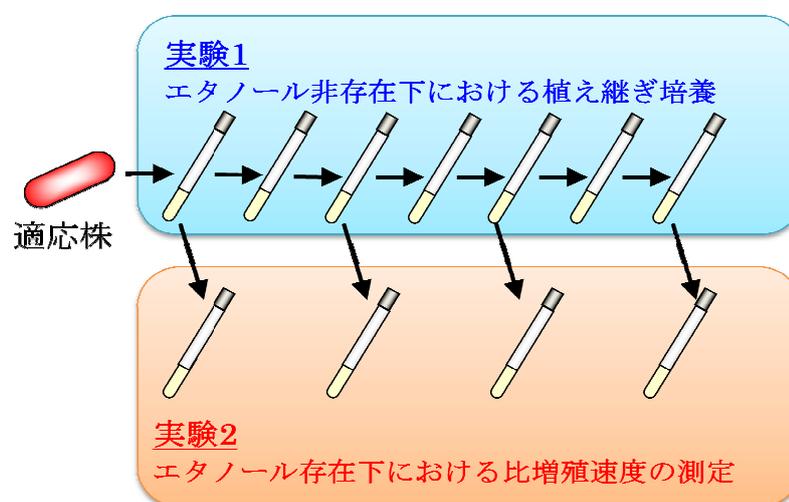


Fig. 2.8. エタノールストレス適応株の安定性を検証するための実験デザイン。適応株をエタノール非存在下における植え継ぎ培養に供し (実験 1)、その過程においてエタノール存在下での比増殖速度が変化するかどうかを検証した(実験 2)。

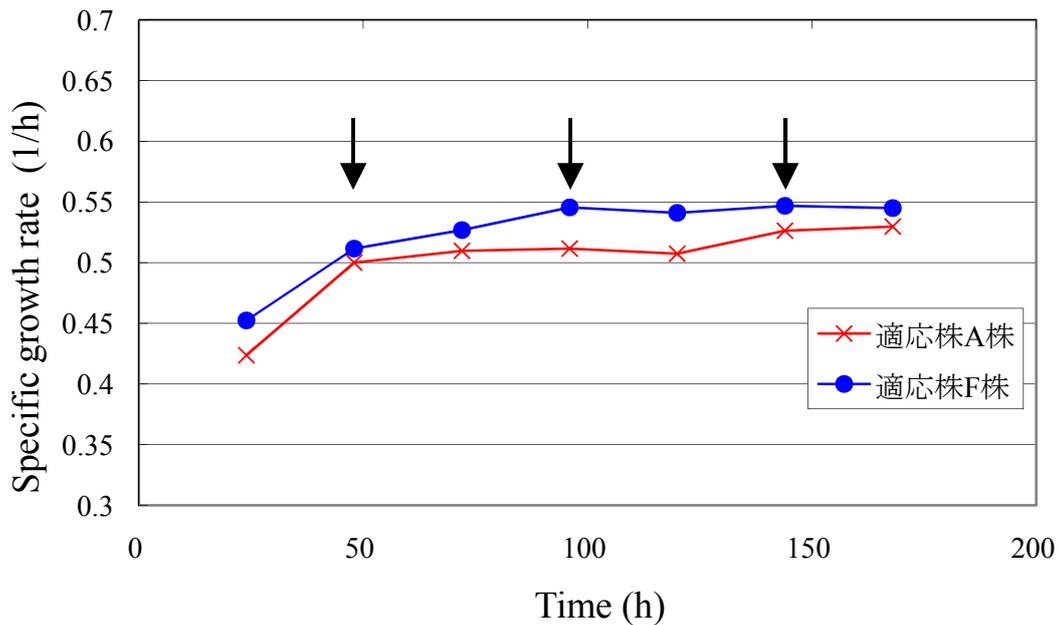


Fig. 2.9. エタノールストレス適応株の安定性を検証するための実験 1 (Fig. 2.8 における実験 1 に対応する)。適応株 A 株および F 株をエタノール非存在下における植え継ぎ培養に供したときの、比増殖速度の経時変化。矢印の時点における菌体を実験 2 (Fig. 2.10) に供した。

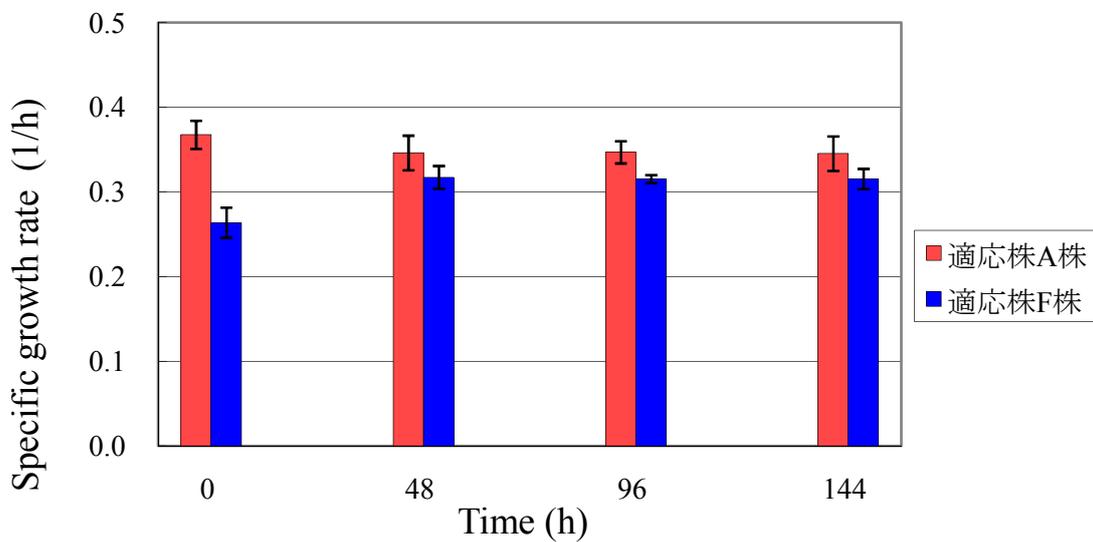


Fig. 2.10. エタノールストレス適応株の安定性を検証するための実験 2 (Fig. 2.8 における実験 2 に対応する)。適応株 A 株および F 株をエタノール非存在下における植え継ぎ培養に供した際の、エタノール存在下 (濃度 5%) における比増殖速度。エラーバーは 3 回の繰り返し実験における標準偏差を示す。適応株は 144 時間 (約 100 世代) 後も、親株よりも高い比増殖速度を保持していた。

2.4 考察

本章では、エタノールストレスを含まない条件において長期植え継ぎ培養実験を行い、得られた株を親株としてストレス環境下での長期植え継ぎ培養実験に供した。これらの長期植え継ぎ実験の過程では、ストレス非存在下、およびストレス存在下の両方の長期培養実験において、比増殖速度は徐々に上昇していった。このような比増殖速度の漸増は、長期間にわたる一定の選択圧のもとで行われた培養実験ではしばしば観察されている (Cooper and Lenski, 2000; Fong *et al.*, 2005; Kishimoto *et al.*, 2010)。これらの研究では比増殖速度の上昇という表現型変化は、長期培養実験中に生じた有利な突然変異によるものであると説明されている。しかしながら本研究では、ストレス非存在下、およびストレス存在下の両方において、複数の株の比増殖速度がそれぞれほぼ同一のペースで上昇している。突然変異という、確率事象に基づき発生する時期や種類が異なると考えられるような事象のみを駆動力として、このような複数株間における比増殖速度の斉一的な上昇が起こるとは考えにくい。このことは、長期培養実験の過程で大腸菌の細胞内の状態を徐々に最適化させるような未知の機構が存在するかもしれないことを示唆している。実際に、環境変動や遺伝子操作による遺伝的背景の変化など、細胞内の状態を大規模に変化させなければならない状況に陥った際、細胞内の状態が最適化されるまでにはある程度の時間を要するという洞察がなされている (Ibarra *et al.*, 2002; Charusanti *et al.*, 2010)。一方で、2.3.5 で示したように、これらの株のエタノール存在下における高い比増殖速度という表現型は、約 100 世代世代後も安定に保持されていた。エタノール適応株にエタノール耐性をもたらした原因が突然変異によるものであるかどうかは本結果からは明確ではないが、もし突然変異によらないものだとすると、その原因の 1 つの有力な仮説として、たとえば DNA のメチル化などによる後天的修飾のようなエピジェネティックなものが挙げられる。しかしながら、このような修飾が適応の情報を保持するために用いられているという例は、少なくとも大腸菌においては報告されていない。本研究で得た適応株が、どのような機構によって比増殖速度の増加という性質を保持しているかに関しては、さらなる解析が必要である。

2.3.4 において、エタノール存在下における比増殖速度が高い株、すなわち適応株の中では F 株よりも A 株は、エタノール非存在下では逆に比増殖速度が低かったことが明らかとなった。このことはエタノール存在下における比増殖速度とエタノール非存在下における比増殖速度との間に進化的トレードオフの関係が存在することを示唆している。進化的トレードオフの存在は生態学や進化生物学の分野で古くから知られており、また大腸菌を用いた適応進化を題材とした研究においてもその存在が示されている

(Bennett and Lenski, 2007)。エタノール非存在下とエタノール存在下との間にトレードオフの関係が存在するということは、エタノール耐性に対して寄与する何らかの性質が、エタノール非存在下においては不要であるか、害をもたらすということを示唆している。

Fig. 2.7 より、エタノール適応株は、長期培養実験に用いたエタノール 5%濃度においてより高い比増殖速度を獲得したことにとどまらず、より高いストレス濃度においても増殖が可能となった。この事実は、これらの株が獲得したエタノール耐性が、どのようなメカニズムによるものであるかを考察するための手がかりとなる。大腸菌のストレス耐性機構のうちで、よく研究が進んでいるものの 1 つとして酸耐性がある (Richard and Foster, 2003)。大腸菌が酸ストレスに対抗するための機構の 1 つとして、Glutamate-dependent acid resistance (GDAR) system と呼ばれる機構を有していることが明らかとなっている (Richard and Foster, 2004)。この機構は細胞外よりグルタミン酸を取り込み、細胞内で γ -amino butyric acid (GABA) を生産し、その反応において細胞内プロトン消費し、GABA を細胞外に排出するという過程を経て細胞外から流入するプロトンを細胞外に排出し、細胞内プロトン濃度を低く保つというものである。これにより大腸菌はあるレベルの酸ストレスを越えるまでは、酸ストレス環境下においても比増殖速度や生残率をほとんど低下させることがないが、大腸菌のプロトン排出能を上回る流入が起こるような酸ストレスレベルになると、急激に増殖能を失う (Mehta *et al.*, 1986; Cui *et al.*, 2001; Diez-Gonzalez and karaibrahimoglu, 2004) という応答パターンを示す (Fig. 2.11 Case 1)。ストレス物質に対してそれを排出し、細胞内の濃度を低く保つ機構によって大腸菌がこれを無害化しているということ、およびその機構の許容範囲と思われるストレス強度を越えると、一挙に致死に至るということが特徴である。これに対しエタノールストレスにおいては、ストレス濃度が上昇するに従い徐々に比増殖速度が低下するという挙動 (Fig. 2.11 Case2) を示した。このような挙動は野生型や親株だけでなく、本研究で得たストレス適応株についても当てはまる。また、こうした応答はエタノールだけでなく、*n*-ブタノール、イソブタノールなどのアルコールによるストレスでも観察される (Brynildsen and Liao, 2009; Rutherford *et al.*, 2010;)。こうした事実より、大腸菌のエタノールストレスに対する応答機構においては、Case 1 のような排出機構は主要なものではなく、また、本章で得たストレス適応株は、そうしたエタノールの排出などによる無効化以外の方法によりエタノール耐性を獲得したものであると推察される。

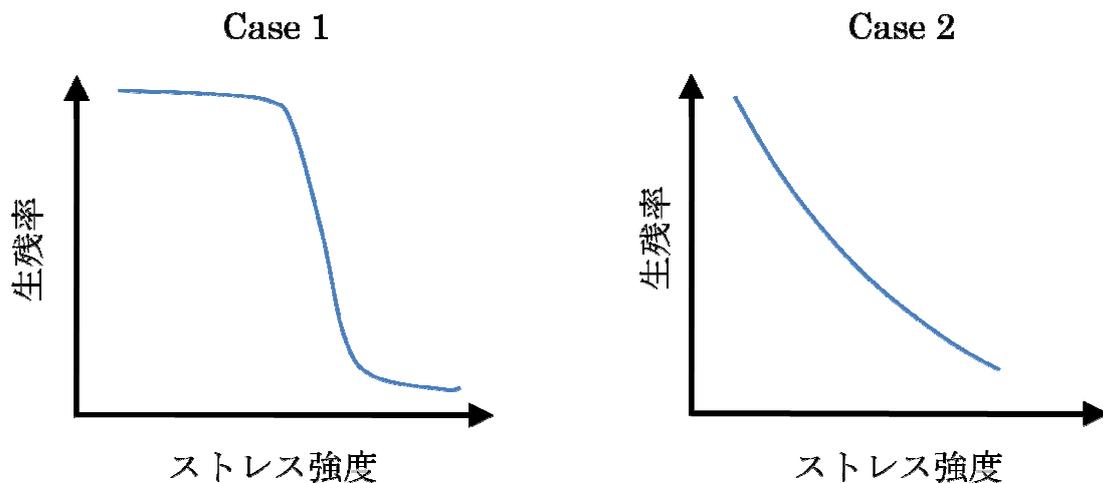


Fig. 2.11. ストレス物質によるストレス強度と生存率との関係性の模式図。酸ストレスなど、排出機構などによりストレス物質の細胞内濃度を低く保つことができる場合は左 (Case 1) のような挙動を示し、そうでない場合は右 (Case 2) のような挙動となる場合が多い。

2.5 結言

本章では、エタノールストレスに対して耐性を有する株を取得するために、試験管による長期植え継ぎ培養を行った。ストレス存在下における長期植え継ぎ実験に先立ち、ストレス非存在下における長期植え継ぎ実験を行い、これによって得た株を親株としてストレス存在下における長期植え継ぎ実験に供することで、ストレスに対する適応と、ストレス以外 (温度や培地条件) に対する適応とを切り分けて解析ができるようにした。また、ストレス存在下における長期植え継ぎ培養実験を 6 つの独立な系列について行ったところ、全ての系列において比増殖速度の上昇が確認できた。これらの株のエタノール存在下における高い比増殖速度は、ストレス非存在下において 100 世代程度連続的に培養を行った後にも安定に保持されていることが明らかとなった。また、本研究で得た株のエタノール耐性のレベル (ストレス濃度 5% における高い比増殖速度およびストレス濃度 6.5% における増殖能) は、既報で得られているエタノール耐性大腸菌に十分匹敵し (Yomano *et al.*, 1998)、また現在工業的に用いられている大腸菌によるエタノール生産における培地中のエタノール濃度 (特表 2010-500026, 2010) に対しても十分に寄与できるレベルである。本章で得た株を親株と比較することにより、このようなエタノール耐性をもたらした要素を抽出することが可能であると考えられる。

第3章 遺伝子発現情報に基づくエタノール適応株の解析

3.1 緒言

第2章で、長期植え継ぎ培養実験によって、エタノールストレス条件下においても高い比増殖速度を有する株を6株得た。これらの株を親株と比較することで、エタノール耐性をもたらす要素が何であるかを明らかにすることができると考えられる。

近年の技術の発達により、細胞の様々な情報を網羅的に測定する手法が開発されてきた。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現量の網羅的測定 (Lipshutz *et al.*, 1999; Noordewier and Warren, 2001; Kapranov *et al.*, 2003)、タンパク質量の網羅的測定 (VanBogelen *et al.*, 1997; Han and Lee, 2003; 2006)、細胞内代謝物質量の網羅的測定 (Monton and Soga, 2007; Rabinowitz, 2007; Krone *et al.*, 2010) など、細胞内の様々な階層における分析が可能となってきた。これらの中でも DNA マイクロアレイを用いた解析は、網羅性に優れ、全ての遺伝子についての測定が可能である。また、遺伝子という階層は、細胞内の比較的多様な情報を有していると考えられる。たとえば、どの代謝反応がどの遺伝子によって担われているかという対応付けにより、遺伝子の発現量の多寡から細胞内代謝反応の活性化の度合いを推察することも可能であるし、遺伝子の発現制御を担っているような遺伝子に着目することにより、細胞の環境条件などに対する応答を推察することも可能である。そこで本研究では DNA マイクロアレイを用い、エタノール適応株の解析を行うことにした。第2章で得た6つの適応株と親株の計7株を用い、これらの株がストレスの存在下や非存在下において遺伝子発現量をどのように変化させるかを解析するために、ストレス存在下（長期植え継ぎ培養で用いた濃度と同じ5%エタノール存在下）およびストレス非存在下における遺伝子発現量をそれぞれ測定した (Fig. 3.1)。このようにして得た遺伝子発現データを、遺伝子の機能データベース (Gama-Castro *et al.*, 2008; Barrell *et al.*, 2009) などを援用しながら、情報科学的手法や統計学的手法によって処理し、親株と適応株との相違や、ストレスの有無による変化にはどのような遺伝子が関与しているかを明らかにしようとした。

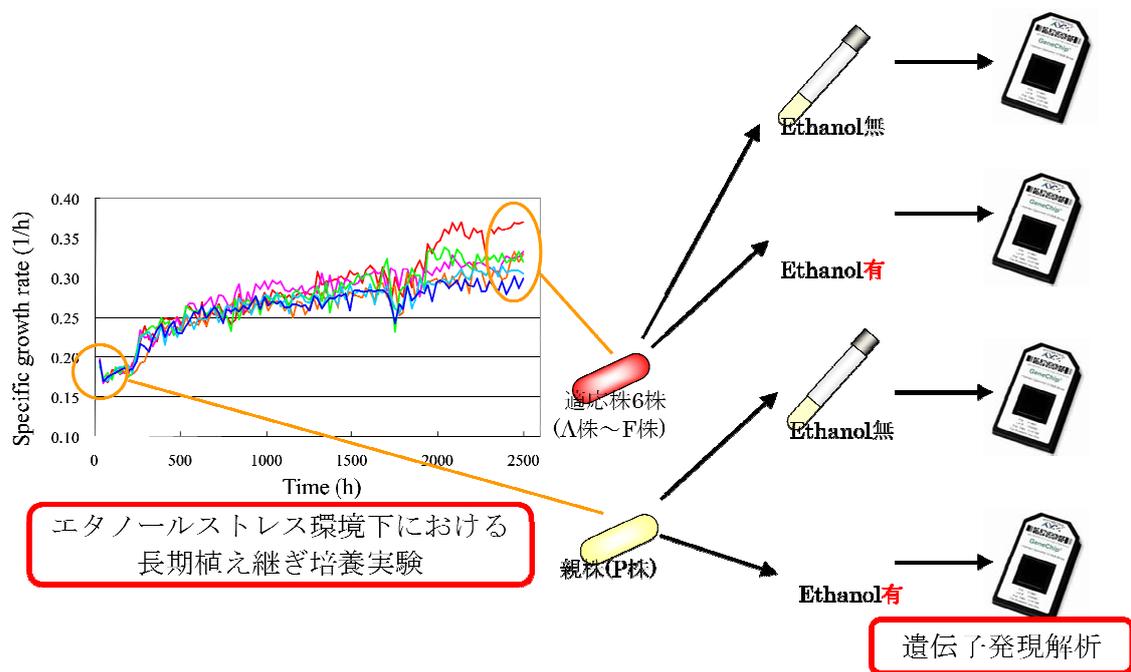


Fig. 3.1. 遺伝子発現情報に基づくエタノール適応株の解析の概要

3.2 実験方法および実験材料

3.2.1 使用菌株

本章では、Table 2.1 (2章) で示した大腸菌株を使用した。

3.2.2 使用培地

本章で使用した培地組成を以下に示す。全ての培養実験における前培養、および 3.2.3.1 の試験管を用いた培養実験には M9 培地 (Table 2.1) を用いた。3.2.3.2 の濁度計つき振とう培養装置を用いた培養実験には M9-Mg (Table 3.1) 培地を用いた。培養時に生じるマグネシウム塩が、濁度計つき振とう培養装置による濁度の測定に影響を与えることから、培地中のマグネシウム濃度を減じた。また、3.2.6 の硫酸鉄添加実験では、M9-P 培地 (Table 3.2) を用いた。この理由は、硫酸鉄の添加により生じるリン酸鉄の沈殿が、濁度の測定に影響を与えるためである。エタノールストレス条件における培養実験を行う場合には、これら培地にエタノールを、所定の終濃度 (v/v) となるように添加した。

Table 3.1. M9-Mg 培地組成 (Sambrook and Russell, 2001 をもとにマグネシウム濃度を改変した)。H₃PO₄を用いて、培地の pH が 7.0 となるように調製した。

試薬名	濃度
Glucose	4 g/L
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	17.1 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 mM
CaCl ₂	0.1 mM

Table 3.2. M9-P 培地組成 (Sambrook and Russell, 2001 をもとにリン濃度を改変した) HCl を用いて、培地の pH が 7.0 となるように調製した。

試薬名	濃度
Glucose	4 g/L
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	3.4 g/L
KH ₂ PO ₄	0.6 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mM
CaCl ₂	0.1 mM

3.2.3 大腸菌の培養

3.2.3.1 試験管を用いた培養実験

全ての培養実験における前培養、3.2.4 のマイクロアレイ実験ならびに 3.2.7 の蛍光プローブによる細胞内活性酸素種濃度の測定に供するための菌体の取得は、蓋付き試験管 TST-SCR18-180 (旭硝子株式会社)、9998CAP415-18 (AGC テクノグラス株式会社) を用いて行った。蓋付き試験管に 10 ml の液体培地を入れ、ウォーターバス Personal-11 (タイテック株式会社) を用いて、30°C、150 stroke/min. で振とう培養を行った。増殖は分光光度計 UV mini-1240 (株式会社 島津製作所) を用いて、波長 600 nm の濁度により測定した。

3.2.3.2 濁度計つき振とう培養装置を用いた培養実験

3.2.6 のアミノ酸および硫酸鉄の添加実験は、濁度計つき振とう培養装置バイオフィトレコーダーTVS062CA (アドバンテック東洋株式会社) を用いて行った。蓋付きバイアル瓶 TV100050 (アドバンテック東洋株式会社) に 5 ml の液体培地を入れ、TVS062CA を用いて 30°C、40 rpm で振とう培養を行った。増殖は TVS062CA に内蔵されている濁度計を用いて、波長 660 nm の濁度により測定した。

3.2.4 DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現量の測定

3.2.4.1 タイリングアレイの概要

本研究では、DNA マイクロアレイの一種であるタイリングアレイを遺伝子発現量の測定に用いた。タイリングアレイは、Affymetrix 社製の GeneChip プラットフォームに

において、一般のマイクロアレイに比べ、より多い種類のプローブを敷き詰めたものである。本研究で用いたタイリングアレイは、基準となる大腸菌の全ゲノム配列（約 460 万 base）に対して一塩基ずつスライドさせたプローブを有している（Fig. 3.2）。

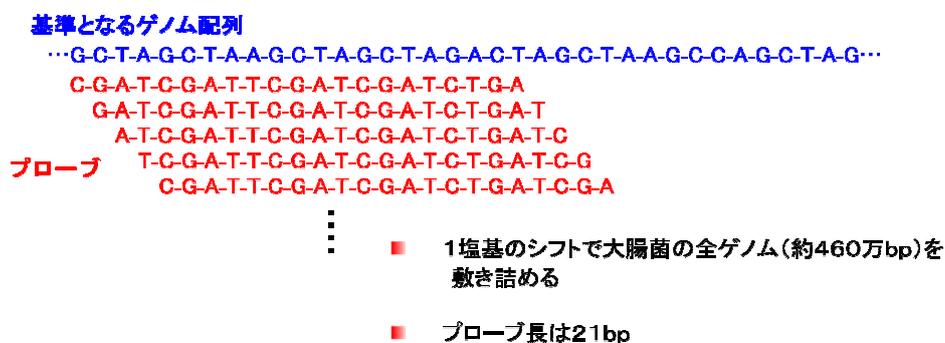


Fig. 3.2. 本研究で用いたタイリングアレイのデザイン

3.2.4.2 DNA マイクロアレイ実験

-80°Cで保存した菌体を M9 液体培地に植菌し、14 時間前培養した。前培養液の一部を用いて本培養を行った。培養方法は 3.2.3.1 に準ずる。対数増殖期に達した菌体 (OD₆₀₀ = 約 0.05) を遠心分離により分取し、液体窒素により凍結させ、RNA 抽出を行うまで -80°C で保存した。大腸菌からの total RNA の抽出および精製は RNeasy Mini Kit (Qiagen) の添付プロトコルに従い行った。cDNA 合成、断片化、末端ビオチン化はマイクロアレイ添付のプロトコル (Affymetrix) に従い行った。ハイブリダイゼーション、洗浄、染色、およびスキャンは、Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix) に従い、Fluidics Station 450, GeneChip Scanner 3000 (ともに Affymetrix) を用いて行った。スキャン画像からの蛍光強度の算出は、GCOS 1.0 software (Affymetrix) によって行った。

3.2.5 DNA マイクロアレイ解析

3.2.5.1 マイクロアレイデータの前処理

プローブ配列情報を用いた熱力学モデルによるプローブ-ターゲット間相互作用の推定 (Ono *et al.*, 2008) により、DNA マイクロアレイ実験によって得た各プローブの蛍光強度から遺伝子発現量を推定した。複数のマイクロアレイデータ間の比較を行うために、quantile normalize (Bolstad *et al.*, 2003) によって正規化を行った。

3.2.5.2 マイクロアレイデータの解析

7株、2条件の計14つの遺伝子発現データを主成分分析に供した。主成分分析はR (R Development Core Team, 2005) により行った。主成分分析によって得られた各主成分に対する各遺伝子の主成分負荷量 (loadings) を用い、その値の大小によって遺伝子をスクリーニングした。遺伝子の機能分類は、データベース (Gene Ontology Annotation; GOA, Barrell *et al.*, 2009) を参照した。遺伝子間制御の情報は、データベース RegulonDB (Gama-Castro *et al.*, 2008) を参照した。

3.2.5.3 統計検定

スクリーニングした遺伝子における、ある遺伝子機能カテゴリに属する遺伝子の割合が、全遺伝子中のその遺伝子機能カテゴリに含まれる割合に対して有意に高いかどうか (Fig. 3.3) を超幾何分布 (Rivals *et al.*, 2007) によって検定した。いま、ある機能カテゴリ A に着目したときに、大腸菌が持つ全 N 個の遺伝子のうち M 個が、そのカテゴリ A に含まれていたとする (Fig. 3.3 上)。このような N 個の遺伝子集団から、 n 個の遺伝子をスクリーニング (非復元抽出) したときに、カテゴリ A に含まれる遺伝子の個数 x が X をとる確率 P は式[3.1]で定義される。

$$P(X = x | N, M, n) = \frac{\binom{M}{x} \binom{N-M}{n-x}}{\binom{N}{n}} \quad [3.1]$$

この確率関数を用いることで、 n 個の遺伝子をスクリーニングしたときに、カテゴリ A に含まれる遺伝子が k 個以上得られる確率 p は、式[3.2]によって求めることができる。

$$p = \sum_{i=k}^n \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}} \quad [3.2]$$

このようにして算出した確率 p が十分に小さいとき、スクリーニングした n 個の遺伝子中にはカテゴリ A に属する遺伝子が有意に多く含まれていることを示している。

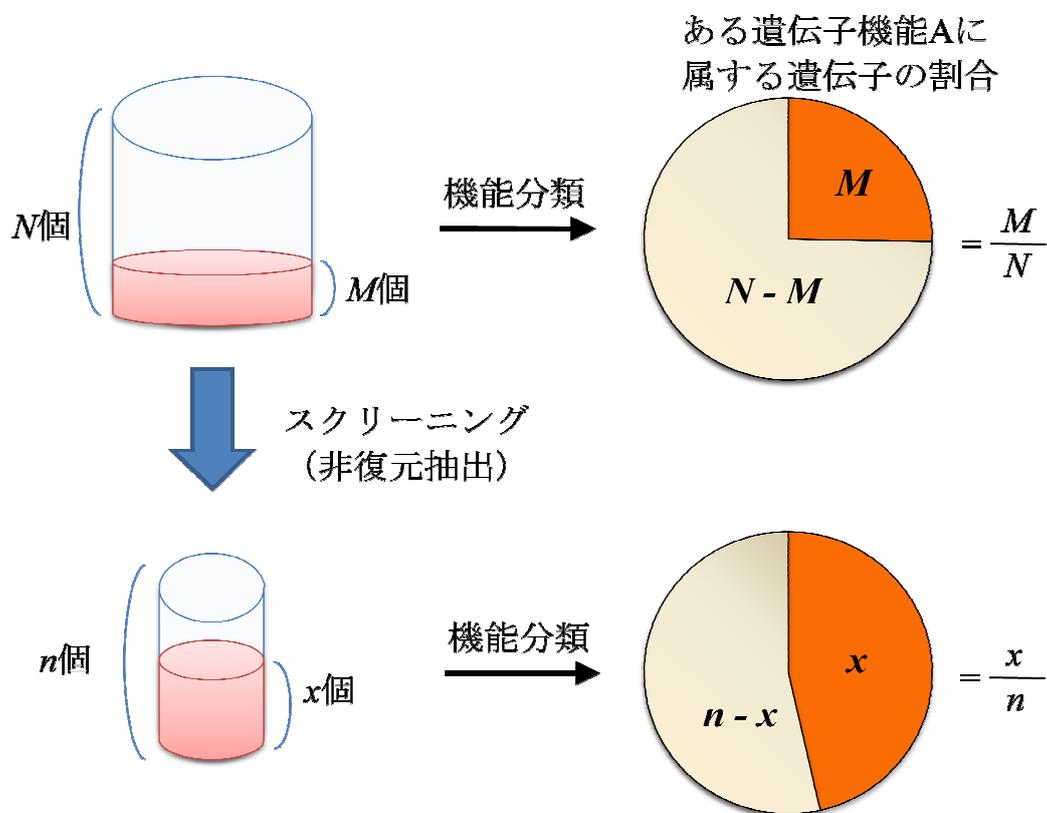


Fig. 3.3. 超幾何分布を用いた統計検定の概念図。

ある機能カテゴリ A に着目したときに、全遺伝子中のその遺伝子機能カテゴリに含まれる割合（上）とスクリーニングした遺伝子における、機能カテゴリ A に属する遺伝子の割合（下）とが有意に異なるかどうかを超幾何分布（式[3.1], [3.2]）を用いて検定する。

3.2.6 軟寒天培地による細胞運動性試験

細胞の運動性の評価に、軟寒天培地を用いた。M9 培地、およびエタノール 5%を含む M9 培地に、Agar (ナカライテスク株式会社) を 0.35% (w/v) となるように加え、直径 150 mm 大判プレート 430597 (Corning) を用いて軟寒天培地を作成した。 -80°C で保存した菌体を M9 液体培地に植菌し、14 時間前培養し、対数増殖期 ($\text{OD}_{600} = \text{約 } 0.05$) となったものを、株や条件間で全て同一の菌体濃度となるように M9 液体培地で希釈し、 $5 \mu\text{l}$ をプレートに植菌して 30°C で培養した。

3.2.7 アミノ酸および硫酸鉄の添加による増殖への影響

-80°C で保存した菌体を M9 液体培地に植菌し、14 時間前培養した。前培養液の一部を用いて本培養を行った。液体培地にそれぞれのアミノ酸および硫酸鉄を所定の濃度となるように添加し、アミノ酸および硫酸鉄を添加しない場合は同量の滅菌水を添加した。アミノ酸の添加実験は培地として M9-Mg 培地を用い、硫化鉄の添加実験には M9-P 培地を用いた。培地 5 ml を蓋付きバイアル瓶に入れ、濁度計つき振とう培養装置を用いて 30°C 、40 rpm で培養し、濁度の測定を行った。全ての実験において、物質を添加する場合としない場合の両方の培養を行い、その間の比較を行った。添加するアミノ酸および硫酸鉄の濃度に関しては、アミノ酸については 0.1 mM から 10 mM 、硫酸鉄の場合は $1 \mu\text{M}$ から $4 \mu\text{M}$ の範囲において予備実験を行い、最も増殖に影響があった濃度を実験に供した。

3.2.8 蛍光プローブによる細胞内活性酸素種濃度の測定

3.2.8.1 測定原理

大腸菌の細胞内活性酸素種の濃度を、5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy- H_2DCFDA ; Invitrogen) を用いて測定した。carboxy- H_2DCFDA (Fig. 3.4) は細胞内で酸化されるまでは細胞透過性の非蛍光物質であり、生細胞内で二酢酸基がエステラーゼによって切断される。その後活性酸素種が存在すると、色素が酸化され、蛍光を発するようになる (Rosenkranz *et al.*, 1992)。本研究では carboxy- H_2DCFDA を蛍光プローブとし、その蛍光強度を用いることで細胞内の活性酸素種濃度の測定を行った。

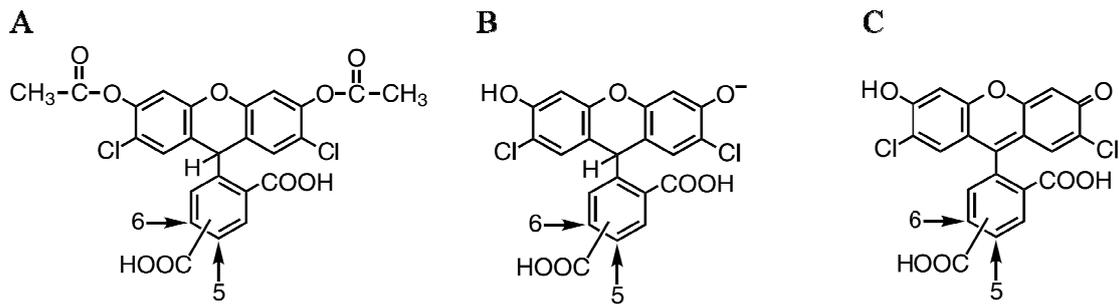


Fig. 3.4. 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA) とその酸化物の構造 (Invitrogen, <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp36103.pdf> より引用)。

(A) carboxy-H₂DCFDA の構造、(B) 還元型 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) の構造、(C) 酸化型 DCF の構造を示している。細胞内エステラーゼによって A が B に変化し、活性酸素種の存在により B が C に変化する。C は緑色蛍光を発するため、この蛍光の強度を測定することにより細胞内の活性酸素種の濃度を測定することができる。

3.2.8.2 活性酸素種濃度の測定

-80°C で保存した菌体を M9 液体培地に植菌し、14 時間前培養した。前培養液の一部をもちいて本培養を行った。培養方法は 3.2.3.1 に準ずる。対数増殖期に達した菌体 (OD₆₀₀ = 約 0.05) を遠心分離により分取し、PBS buffer (Invitrogen) に懸濁し、100% エタノールに溶解させた carboxy-H₂DCFDA を濃度が 10 μM となるように添加し、30°C で 60 分反応させた。その後遠心分離により反応液を除き、PBS buffer に懸濁したものを、96 ウェルマイクロタイタープレート (costar 3595, Corning および OptiPlate-96 F, PerkinElmer) に分注し、30°C で 30 分から 90 分反応させ、その際の濁度 (OD₆₀₀) および蛍光強度 (励起波長 485 nm、測定波長 535 nm) をプレートリーダー 1420ARVO (PerkinElmer) により測定した。

3.3 結果および考察

3.3.1 親株および適応株の遺伝子発現情報の主成分分析

親株およびエタノール適応株 A~F 株の、エタノール非存在下および存在下 (5%) における遺伝子発現量を、DNA マイクロアレイにより測定した。プローブ・ターゲット間相互作用の熱力学モデル (Ono *et al.*, 2008) により、得られたプローブ単位の蛍光強度から、遺伝子ごとの発現量を遺伝子発現量の推定を行った。この際、遺伝子発現量がある閾値以下のものは定量限界以下とし、それらを除いたものを以後の解析に用いた。7 株 2 条件のデータ間で、前述のような遺伝子を 1 つも含まない 2317 個の遺伝子をデータセットとして、主成分分析に供した。Fig. 3.5 に第一主成分 (Principal Component 1; 以下 PC1) と第二主成分 (同 PC2) の散布図を、Fig. 3.6 に第二主成分と第三主成分 (PC4) の散布図を示す。また、Table 3.3 に、得られた各主成分の寄与率および累積寄与率を示す。PC1 によってストレス存在下および非存在下におけるデータが良く分離されていることから、PC1 はストレスの有無による遺伝子発現の違いに対応する軸であると考えられる。また PC2 によって親株と適応株が分離され、また適応株のエタノールストレス環境下における比増殖速度が大きいものほど、親株との距離が大きくなる傾向がみられたことから、PC2 は適応による遺伝子発現の違いに対応する軸であると考えられる。また PC3 上では、A 株や C 株と、他の株との距離が大きく、株ごとのストレス有無による差は小さかったことから、PC3 は適応株間のバリエーションを表していると考えられる。第四主成分以下は、データを特徴的なパターンに分類することができておらず、また寄与率が 10% を下回っていた。そのため、第一主成分から第三主成分について、より詳細な解析を行うことにした。

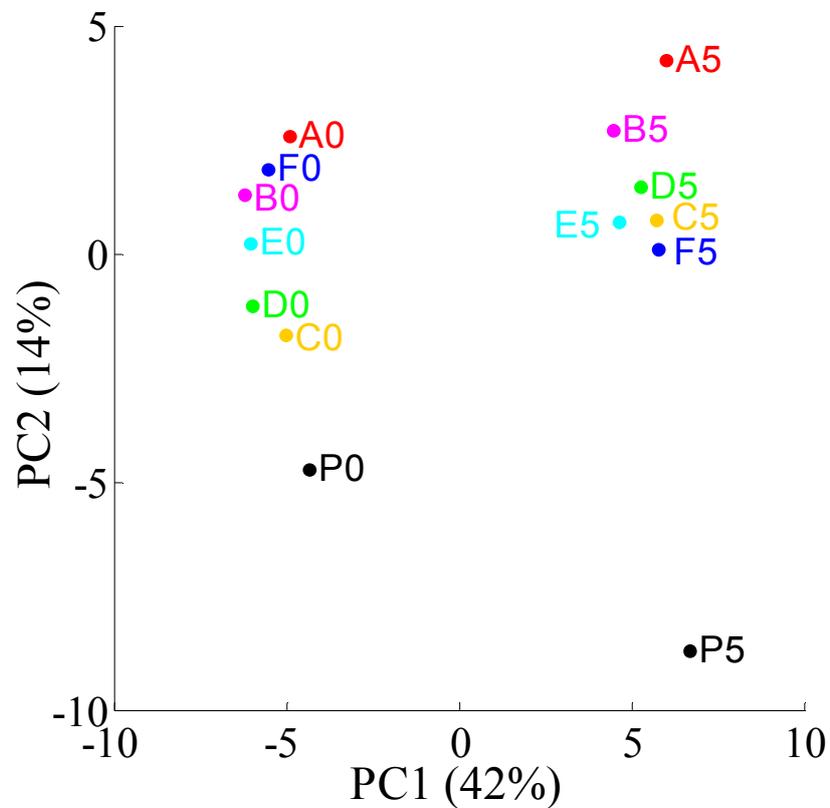


Fig. 3.5. 親株 (P) および適応株 (A ~ F) の、エタノールストレス非存在下 (0) およびエタノールストレス存在下 (5) における遺伝子発現データの主成分分析によって得られた第一主成分 (PC1) および第二主成分 (PC2) による散布図。括弧内の数字は各主成分の寄与率を示す。PC1 によってストレス存在下および非存在下におけるデータがよく分類されていた。また PC2 によって親株と適応株が分離され、また適応株のストレス環境下における比増殖速度が大きいものほど、親株との距離が大きくなる傾向がみられた。

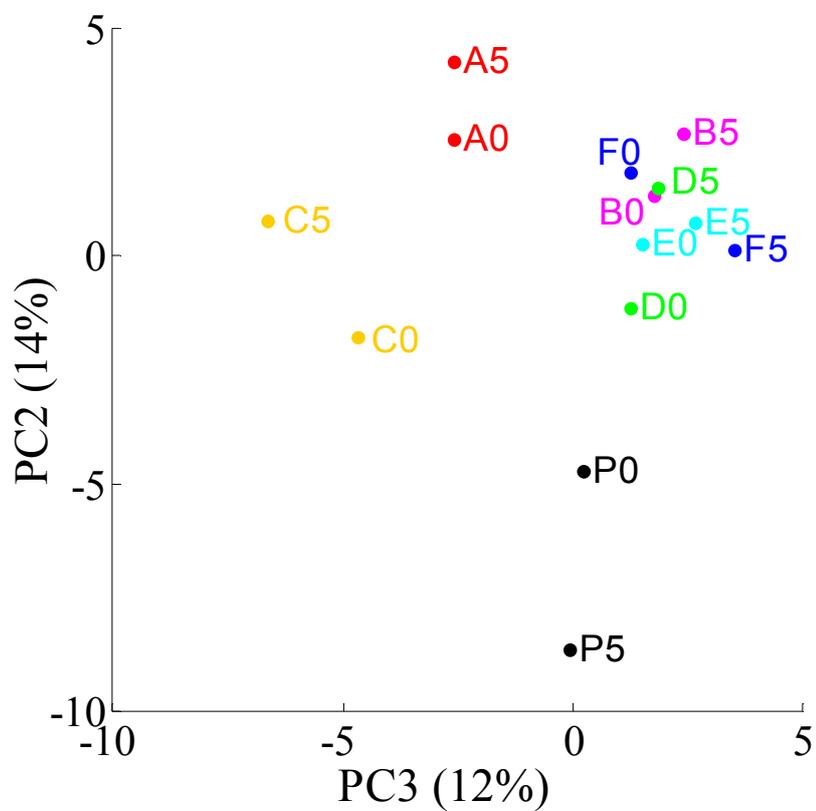


Fig. 3.6. 親株 (P) および適応株 (A ~ F) の、エタノールストレス非存在下 (0) およびエタノールストレス存在下 (5) における遺伝子発現データの主成分分析によって得られた第二主成分 (PC2) および第三主成分 (PC3) による散布図。括弧内の数字は各主成分の寄与率を示す。PC3 によって、適応株 A 株ならびに C 株と、他の株とが分離された。

Table 3.3. 主成分分析によって得られた各主成分の寄与率および累積寄与率

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14
寄与率	0.423	0.137	0.115	0.090	0.083	0.036	0.029	0.026	0.029	0.026	0.020	0.015	0.013	0.009	0.005	<0.001
累積 寄与率	0.423	0.560	0.675	0.765	0.848	0.884	0.913	0.938	0.913	0.938	0.958	0.973	0.986	0.995	>0.999	1

3.3.2 主成分分析により得られた情報を用いた遺伝子のスクリーニングと機能分類

主成分分析によって得られたそれぞれの主成分に対して大きく寄与する遺伝子を解析することで、その主成分を特徴づけている遺伝子にはどのようなものが存在するかを明らかにすることができる。たとえば PC1 はストレスの有無による違いを示す軸であるが、この軸に対して大きな主成分負荷量を持つような遺伝子をスクリーニングし、そのような遺伝子にどのような機能を含むものが多いかを解析することで、ストレスの有無によって発現量が変化したような遺伝子群やその機能を抽出することが可能である。そこで、PC1,2,3 それぞれに対する主成分負荷量の値が大きな遺伝子および小さな遺伝子を、それぞれ全遺伝子の 5% に相当する個数 (116 個) だけスクリーニングした。次に、データベース GOA (Barrell *et al.*, 2009) を用いて遺伝子を機能カテゴリに分類し、スクリーニングした遺伝子における存在割合が有意に ($p < 0.005$) 多い遺伝子機能カテゴリを解析した。

3.3.2.1 第一主成分に対して大きく寄与する遺伝子の機能

PC1 に対する主成分負荷量の値が大きな遺伝子において、有意に存在割合が多かったような遺伝子機能カテゴリをスクリーニングした (Table 3.4)。PC1 はデータセットをエタノールストレスの有無による遺伝子発現の変化によって分離するような軸であるため、スクリーニングできた遺伝子機能は、大腸菌のストレスに対する応答に関与すると考えられる。

“galactitol metabolic process”に含まれる *gat* 遺伝子 (*gatB*, *gatC*, *gatY*, *gatZ*) は親株および適応株において、ストレスの添加により発現量が増加していた (Fig. 3.7)。*gat* 遺伝子は大腸菌のバイオフィーム形成に関与することが知られており (Domka *et al.*, 2007)、また酸ストレスなどのいくつかのストレスによって発現が誘導されるという報告がある (Pomposiello *et al.*, 2001; Kannan *et al.*, 2008)。“phosphate transport”に関与する遺伝子群 (*phoB*, *phoU*, *pstB*, *pstA*, *pstC*, *pstS*) もまた、エタノールストレスの添加により発現量が増加していた (Fig. 3.8)。これまでの研究により、大腸菌は PhoR/PhoB からなる二成分制御系によって“phosphate transport”に関与する遺伝子群の発現量を制御することが知られている (Makino *et al.*, 1989)。PhoR/PhoB 二成分制御系は、リン酸の枯渇によって活性化される (Makino *et al.*, 1989) ことが知られている。一方で、リン酸が枯渇していない場合であっても、酸ストレス (Seputiene *et al.*, 2003) やイソブタノールストレス (Brynildsen and Liao, 2009) によって活性化されるという報告がある。Brynildsen および Liao は、イソブタノールなどの両親媒性分子は、細胞膜に溶解込みその流動性を変化させることによって膜上の多くのタンパク質の構造に影響を与え、それによって多くの制御系の応答を引き起こすと推察している。我々の実験において“phosphate transport”

に關与する遺伝子群の発現量がエタノールストレスによって上昇したという結果も、同様のメカニズムによって引き起こされた可能性がある。

また、エタノールストレスの添加により *manXYZ* も発現量が増加していた (Fig. 3.9)。このオペロンは大河内らによって、有機溶剤 (*n*-hexane, cyclohexane, *p*-xylene) に応答することが報告されている (Okochi *et al.*, 2007) 他、*n*-butanol 存在下においては遺伝子発現量とタンパク質発現量の両方が増加することが報告されている (Rutherford *et al.*, 2010)。*manXYZ* がこれらのストレスにどのように關与しているかは明らかではないが、エタノールストレスの場合にも、これらのストレスと同様の機構が働き、*manXYZ* の発現量が増加したことが示唆される。

さらに、”response to heat”にはシャペロン分子をコードする遺伝子 (*groS*, *groL*, *grpE*, *dnaK*) が存在していた。これらの遺伝子はグローバルレギュレーターである *rpoH* の制御を受けている。既報において *rpoH* およびその制御下の遺伝子群の発現量が上昇することは、エタノール (VanBogelen *et al.*, 1987)、*n*-butanol (Rutherford *et al.*, 2010)、isobutanol (Brynildsen and Liao, 2009) によるストレス条件下で觀察されており、これらの場合にはシャペロン分子は、両親媒性物質であるアルコールにより変性したタンパク質の折りたたみを行っていると考えられている。本結果はこれらの既報と合致するものとなっている。

PC1 に対する主成分負荷量の値が小さな遺伝子の解析により、エタノールストレスによって遺伝子発現量が低下するような遺伝子機能が発見できた (Table 3.2)。いくつかのアミノ酸 (ヒスチジン、アルギニン) の生合成および輸送に關与する遺伝子の発現量が低下していた [Fig. 3.10(a), (b)]。このような発現量の低下のメカニズムは不明であるものの、本結果はこれらのアミノ酸がエタノールストレスに対する応答に關与している可能性がある。さらに、鞭毛合成に關与する遺伝子群の発現量がエタノールの添加によって低下することが明らかになった。鞭毛合成に關与する遺伝子の殆どは、エタノールストレス存在下における発現量が低すぎるため主成分分析や遺伝子機能分類などの解析から除外され、Table 3.2 には記載されていないが、エタノールの添加によって発現量が著しく低下することを確認した。鞭毛合成に關わる代表的な遺伝子の発現量を Fig. 3.10(c) に示す。鞭毛合成に關わる遺伝子群は、熱ショックストレスや浸透圧ストレスに曝露された場合も発現量が低下することが報告されており (Gunasekera *et al.*, 2008)、また、そのような場合には細胞の運動性が損なわれることが示されている。そこでエタノールストレス存在下でもそのような細胞運動性の低下が起きるかどうかを確認するために、軟寒天培地による培養実験を行った。その結果、全ての株においてエタノール存在下では運動性が阻害され (Fig. 3.11)、DNA マイクロアレイより得られた発現量の情報と対応していた。

このように、PC1 に対して大きく寄与する遺伝子に着目した解析により、大腸菌がエタノールストレスに対してどのような遺伝子の発現を上昇または低下させるかについて

て、網羅的な知見を得ることができた。それらの多くは、これまで個別に調べ上げられてきた現象とよく対応した。本研究で得た知見は、エタノールストレスが大腸菌に対してどのように生理学的な影響を及ぼすのか、さらに大腸菌がそれに対してどのような応答機構を働かせているかを理解するための足がかりになると考えられる。

Table 3.4. 主成分1 に対する主成分負荷量の大きさが上位 5%および下位 5%であるような遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリー

Function	P-value	Screened members	Total members	Gene name
PC 1 top 5%				
Galactitol metabolic process	5.98×10^{-6}	4	4	<i>gatB, gatC, gatY, gatZ</i>
Phosphate transport	3.58×10^{-7}	6	8	<i>phoB, phoU, pstA, pstB, pstC, pstS</i>
Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	3.01×10^{-4}	6	20	<i>dhaH, gatB, gatC, manX, manY, manZ</i>
Response to stress	9.57×10^{-6}	13	64	<i>clpB, degP, dnaK, grpE, hslJ, hslU, htpG, ldhA, pstS, uspG, relB, relE, yfiA</i>
Response to heat	1.16×10^{-5}	8	24	<i>dnaK, groL, groS, grpE, hslJ, hslU, htpG, ldhA</i>
Protein folding	1.64×10^{-5}	8	25	<i>degP, dnaK, dsbA, groS, groL, grpE, htpG, ppiA</i>
PC 1 bottom 5%				
Cellular amino acid biosynthetic process	3.73×10^{-8}	20	100	<i>argF, argI, aroF, aroM, carA, carB, hisA, hisB, hisC, hisD, hisF, hisG, hisH, hisI, leuL, lysC, meth, pheA, thrL, trpL</i>
Histidine biosynthetic process	4.53×10^{-9}	8	11	<i>hisA, hisB, hisC, hisD, hisF, hisG, hisH, hisI</i>
Arginine biosynthetic process	3.00×10^{-3}	4	13	<i>argF, argI, carA, carB</i>
Tricarboxylic acid cycle	4.05×10^{-4}	6	21	<i>fumA, mgo, sdhA, sdhB, sdhC, sdhD</i>
Transport	1.21×10^{-4}	33	351	<i>amtB, argT, betT, emrA, entD, fadL, fhu, kgtP, livF, livG, livH, livJ, livK, livM, modA, modB, ompF, oppA, oppB, oppC, oppD, oppF, proP, putP, rbsB, rfbX, sdhA, sdhB, sdhC, sdhD, tsx, uraA, yhbE</i>
Amino acid transport	1.63×10^{-3}	8	46	<i>putP, argT, livF, livG, livM, livH, livK, livJ,</i>
Peptide transport	1.91×10^{-3}	5	19	<i>oppA, oppB, oppC, oppD, oppF</i>
Flagellum organization	4.72×10^{-4}	3	4	<i>flgC, flgD, flhM</i>

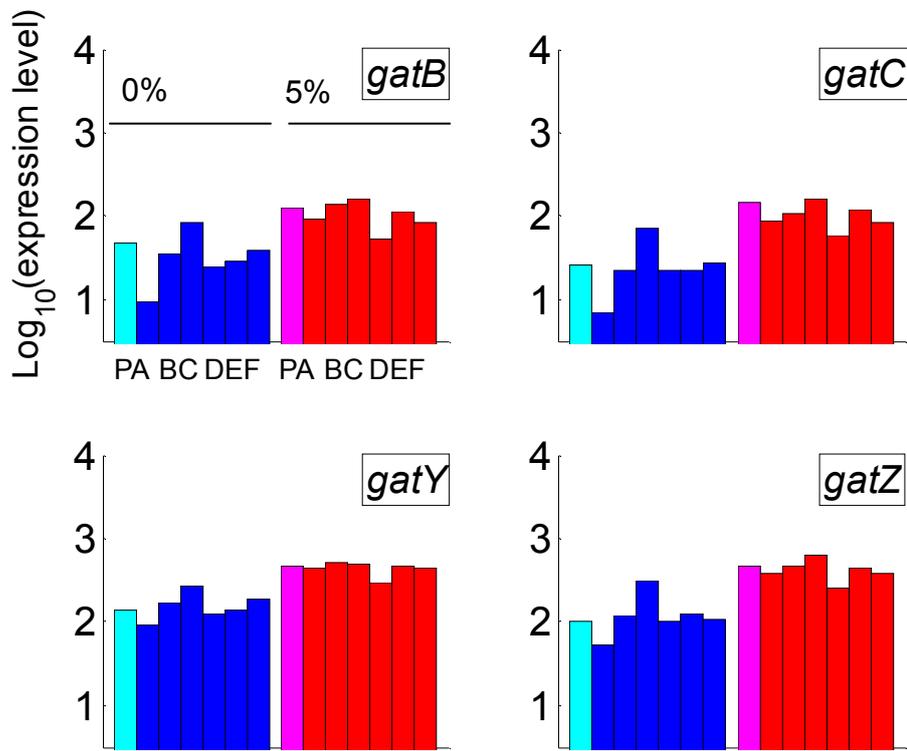


Fig. 3.7. “galactitol metabolic process”に含まれる *gat* 遺伝子 (*gatB*, *gatC*, *gatY*, *gatZ*) の各株、各条件における遺伝子発現量。エタノール存在下（5%）では非存在下の場合よりも発現量が上昇していた。

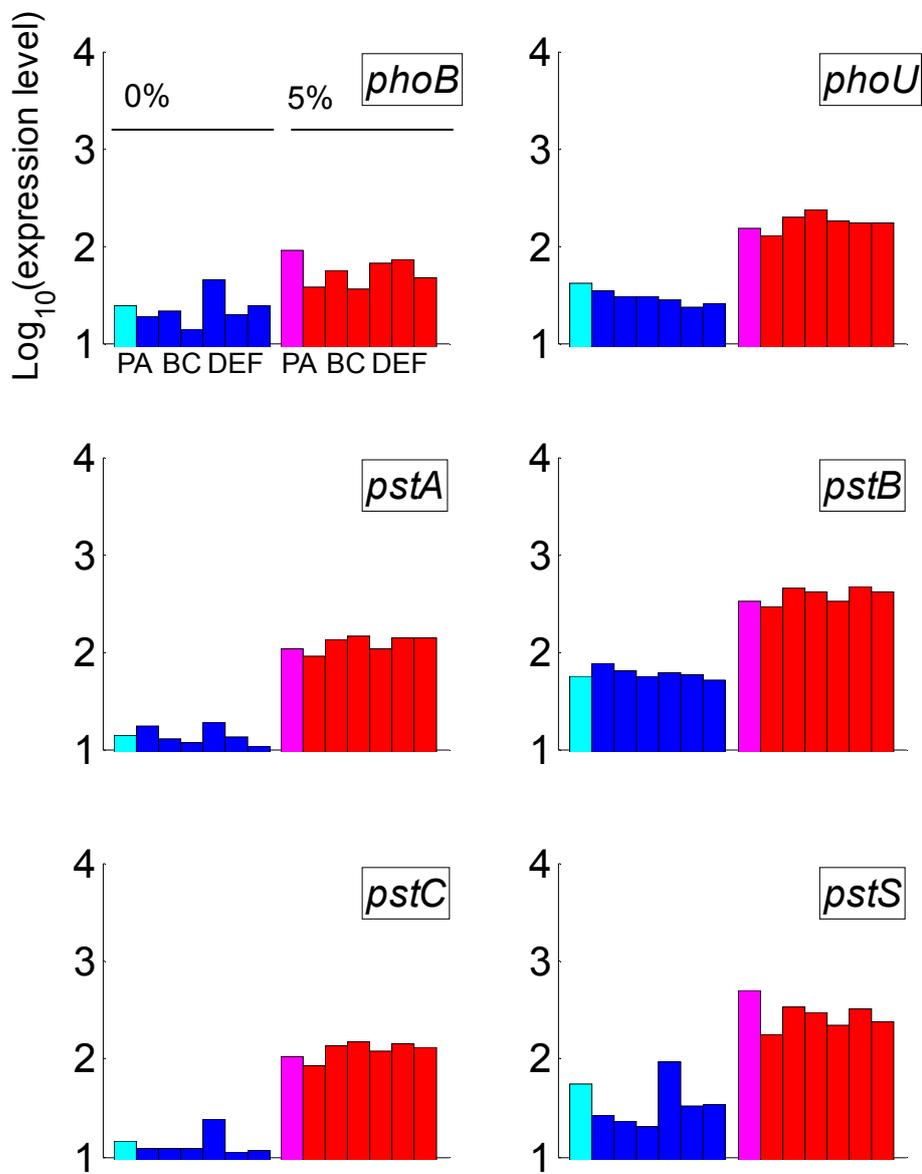


Fig. 3.8. "phosphate transport"に関する遺伝子群 (*phoB*, *phoU*, *pstB*, *pstA*, *pstC*, *pstS*) の各株、各条件における遺伝子発現量。エタノール存在下 (5%) では非存在下の場合よりも発現量が上昇していた。

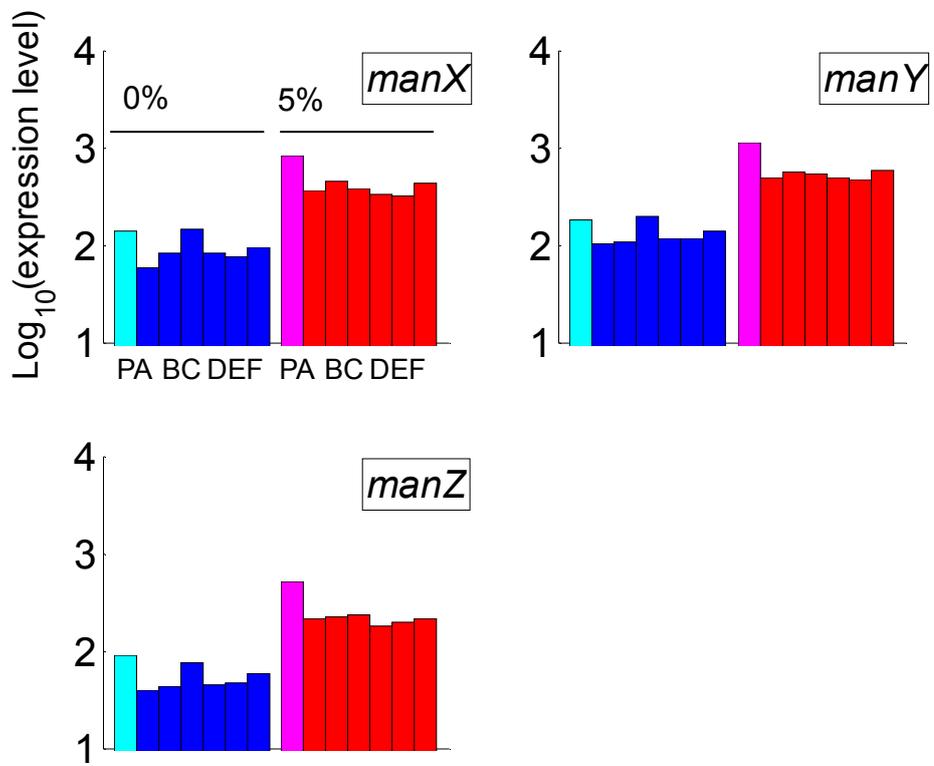
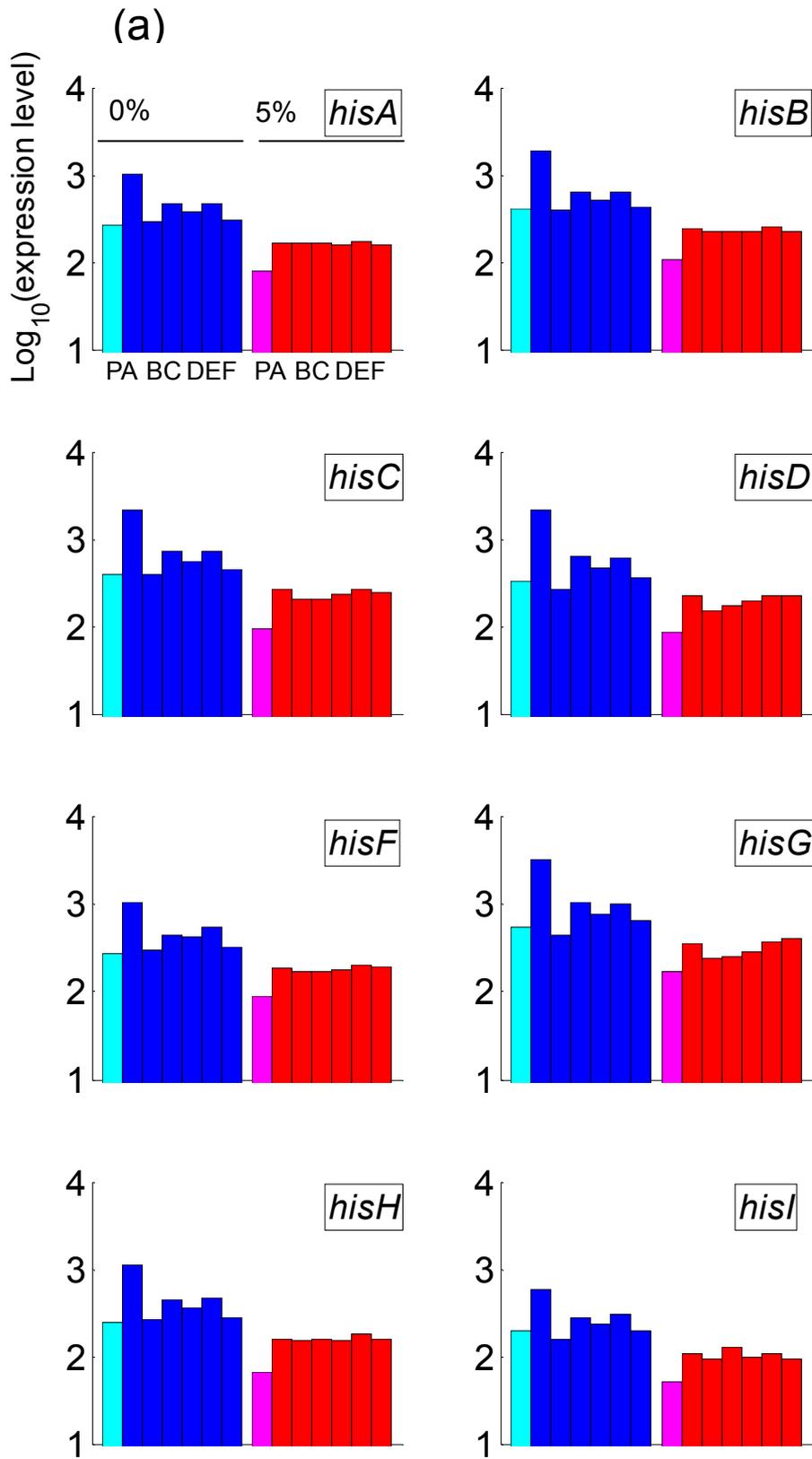
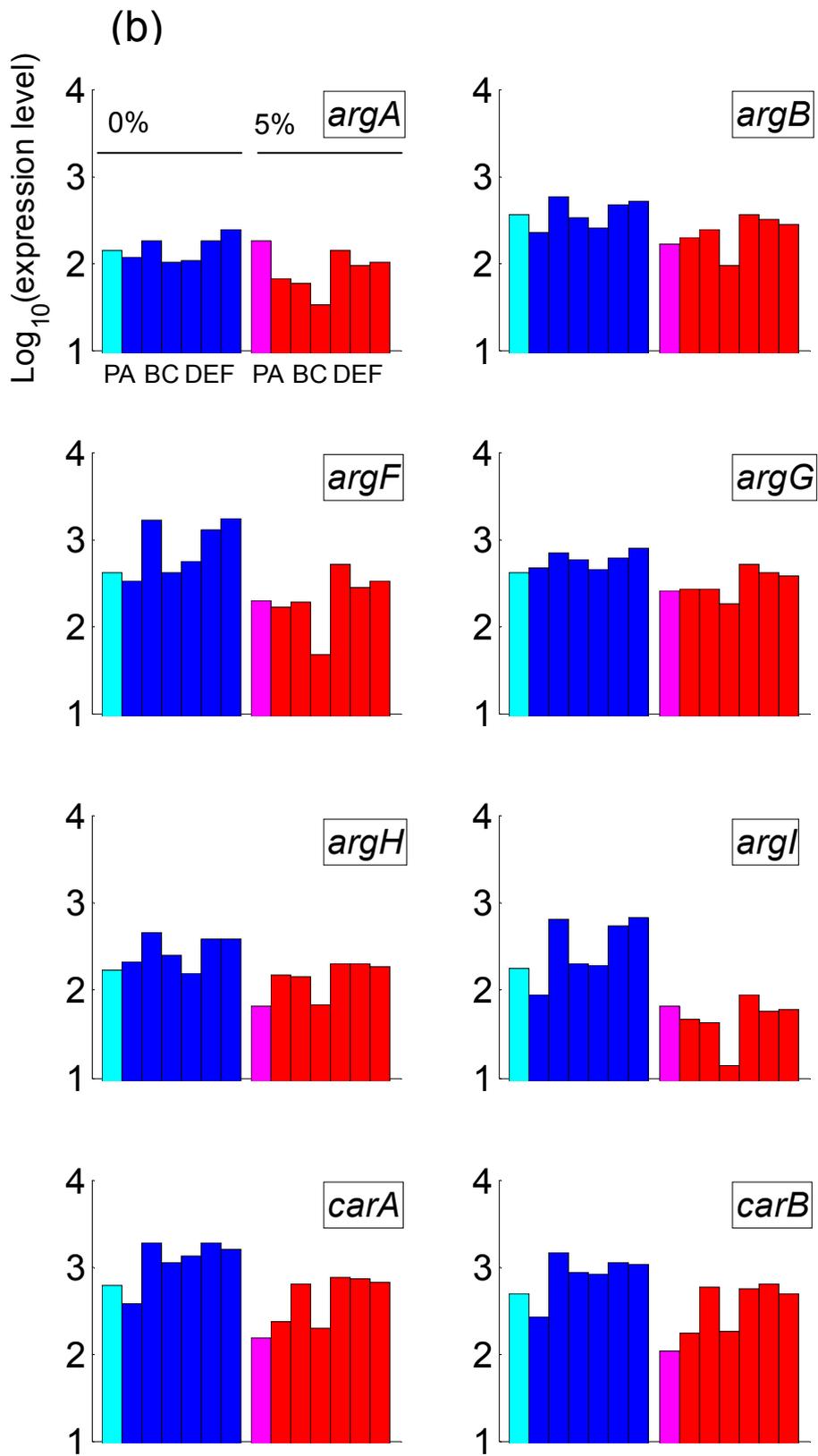


Fig. 3.9. *manXYZ* の各株、各条件における遺伝子発現量。
 エタノール存在下 (5%) では非存在下の場合よりも発現量
 が上昇していた。





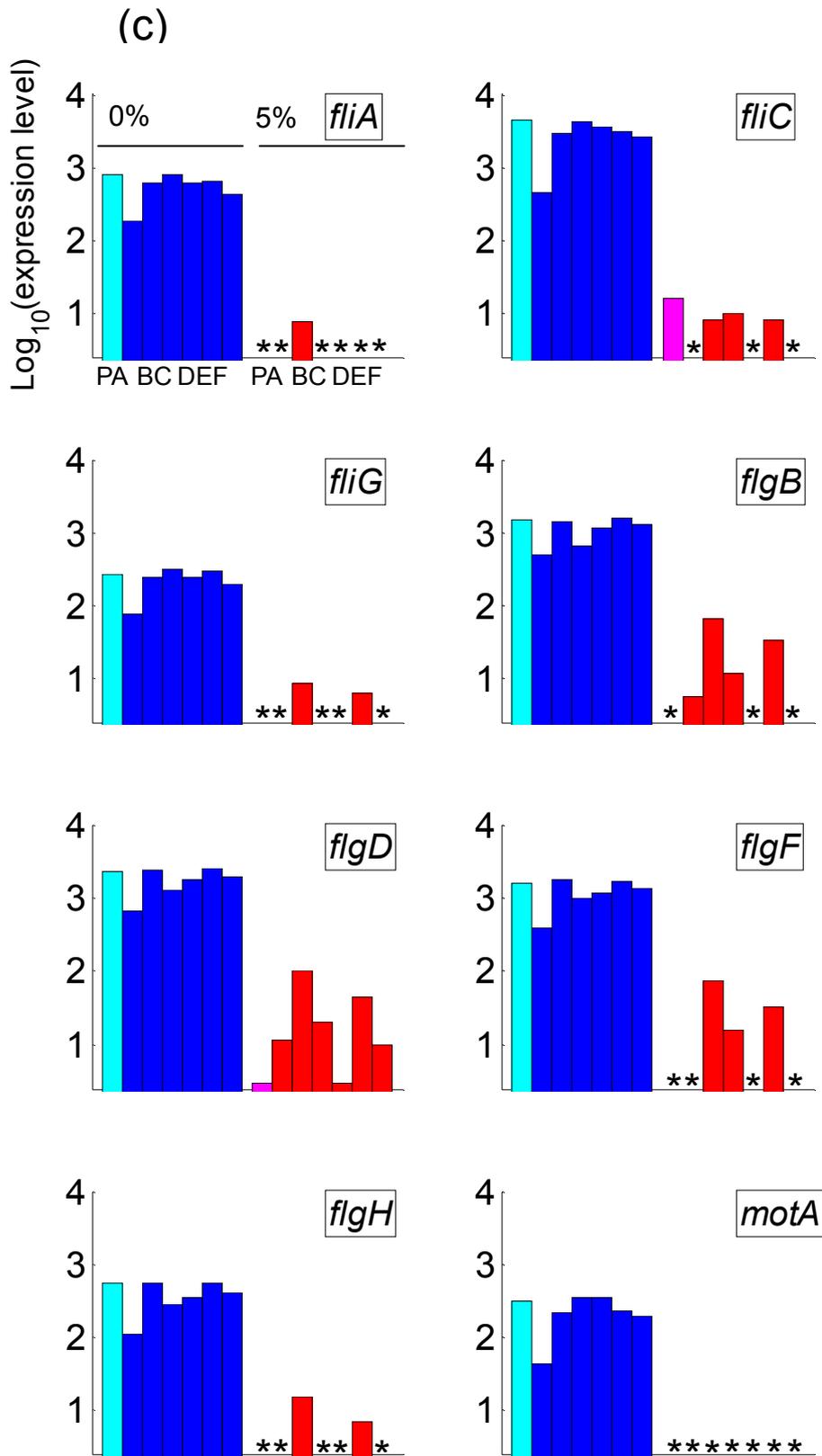


Fig. 3.10. エタノール非存在下 (0%) に比べてエタノール存在下 (5%) において発現量が低下していた遺伝子。

(a)ヒスチジン合成に関与する遺伝子 (*hisA*, *hisB*, *hisC*, *hisD*, *hisF*, *hisF*, *hisG*, *hisH*, *hisI*)、(b)アルギニン合成に関与する遺伝子 (*argA*, *argB*, *argF*, *argG*, *argH*, *argI*, *carA*, *carB*)、(c)鞭毛合成に関与する遺伝子 (*fliA*, *fliC*, *fliG*, *flgB*, *flgD*, *flgF*, *flgH*, *motA*) の各株、各条件における遺伝子発現量を示した。*印は遺伝子発現量が低く主成分分析には用いなかったデータであることを示す。

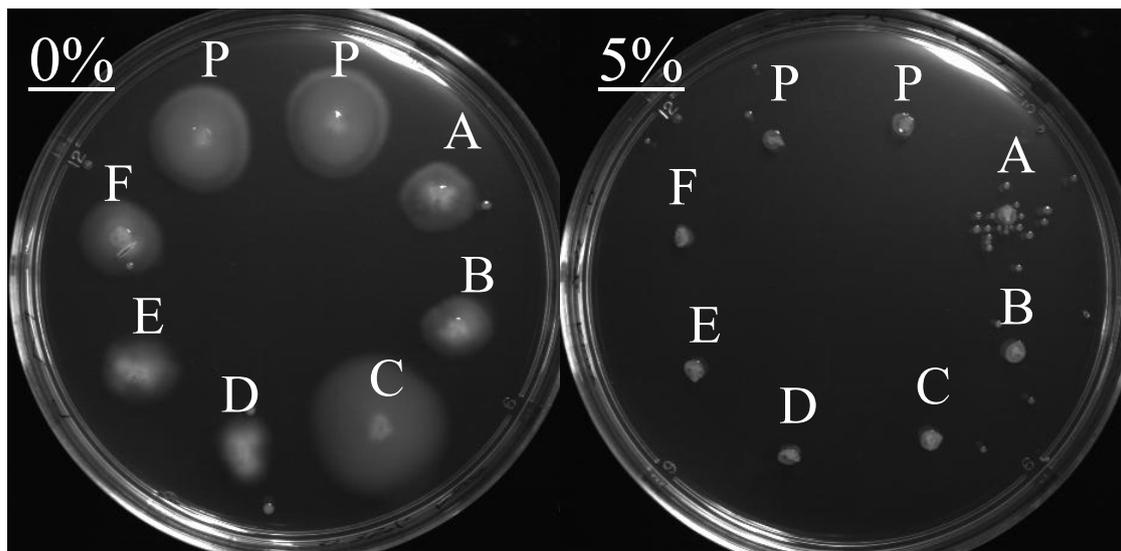


Fig. 3.11. 軟寒天培地による細胞運動性試験。プレート上の白濁は菌体であり、白濁の広がり、菌体が運動性を有していることを示す。エタノール非存在下 (左) においては、株間に若干の多寡があるものの、どの株においても運動性が確認された。エタノール5%存在下 (右) では、全ての株において運動性が阻害された。

3.3.2.2 第二主成分に対して大きく寄与する遺伝子の機能

PC2 に対する主成分負荷量の値が大きな、または小さな遺伝子において、有意に存在割合が多かったような遺伝子機能カテゴリをスクリーニングした (Table 3.5)。PC2 はデータセットを親株と適応株とに分離し、さらに適応株間においてエタノール存在下での比増殖速度の高いものほど PC2 上において親株との距離が大きくなる傾向がみられたことから、PC2 は適応による遺伝子発現の変化に対応する軸であると考えられる。

Table 3.3 より、ヒスチジン、トリプトファンおよび分枝アミノ酸 (バリン、ロイシン、イソロイシン) の合成に関与する遺伝子群が多く見出された。これらの遺伝子の発現量は適応株において上昇していた [Fig. 3.10(a), 3.12(a,b)]。これらのアミノ酸合成経路の活性化は、適応株のエタノール耐性に関与している可能性がある。いくつかの先行研究において、アミノ酸の添加やアミノ酸合成経路の発現増強と、ストレス耐性との関係性が報告されている。たとえば細胞内のグルタミン酸、アルギニンは酸ストレス耐性に関与し、グリシンやプロリンは浸透圧耐性に関与する (Chung *et al.*, 2006)。しかしながら、本研究で見出されたアミノ酸 (ヒスチジン、トリプトファン、バリン、ロイシン、イソロイシン) と大腸菌のエタノール耐性との関係は、これまで報告されていない。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、トリプトファン合成経路の発現増強 (Hirasawa *et al.*, 2007) や培地中へのイソロイシン、メチオニン、フェニルアラニンなどの添加 (Hu *et al.*, 2005) がエタノール耐性をもたらすと報告されている。さらに、大腸菌において細胞内アミノ酸濃度がさまざまなストレス環境条件下 (低温、熱、酸化ストレス) において上昇していた (Jozefczuk *et al.*, 2010) という報告から、アミノ酸濃度の上昇はストレス耐性と深い関係があることが示唆される。本研究において見出した、適応株におけるアミノ酸合成経路に関与する遺伝子の発現量増加は、エタノールストレス耐性に関与する可能性がある。

また、“iron ion transport”、“enterobactin biosynthetic process”および“iron-sulfur cluster assembly”のような鉄イオンの輸送および代謝に関与する遺伝子機能が多く見出された。これらの遺伝子の多くは、鉄輸送に関わる転写因子 Fur (Ferric iron uptake global transcriptional repressor) によって制御されることが知られている (McHugh *et al.*, 2003)。Fur によって抑制される 57 遺伝子の発現量を、Fig. 3.13 に示した。図よりこれらの遺伝子は概ね、適応株において親株よりも高い発現量を有していた。鉄イオンがエタノールストレス耐性に関与するという報告はこれまでなされていないが、適応株における鉄輸送遺伝子群の活性化による鉄取り込みの亢進がエタノールストレス耐性に関与する可能性がある。

PC2 に対する主成分負荷量の値が小さな遺伝子の解析により、エタノールストレスによって遺伝子発現量が低下するような遺伝子機能が発見できた (Table 3.3 PC 2 bottom 5%)。“Lipopolysaccharide biosynthetic process”に関与する遺伝子群の発現量が、親株に比して適応株において低下していた [Fig. 3.12(c)]。Lipopolysaccharide (LPS) は細胞膜外壁

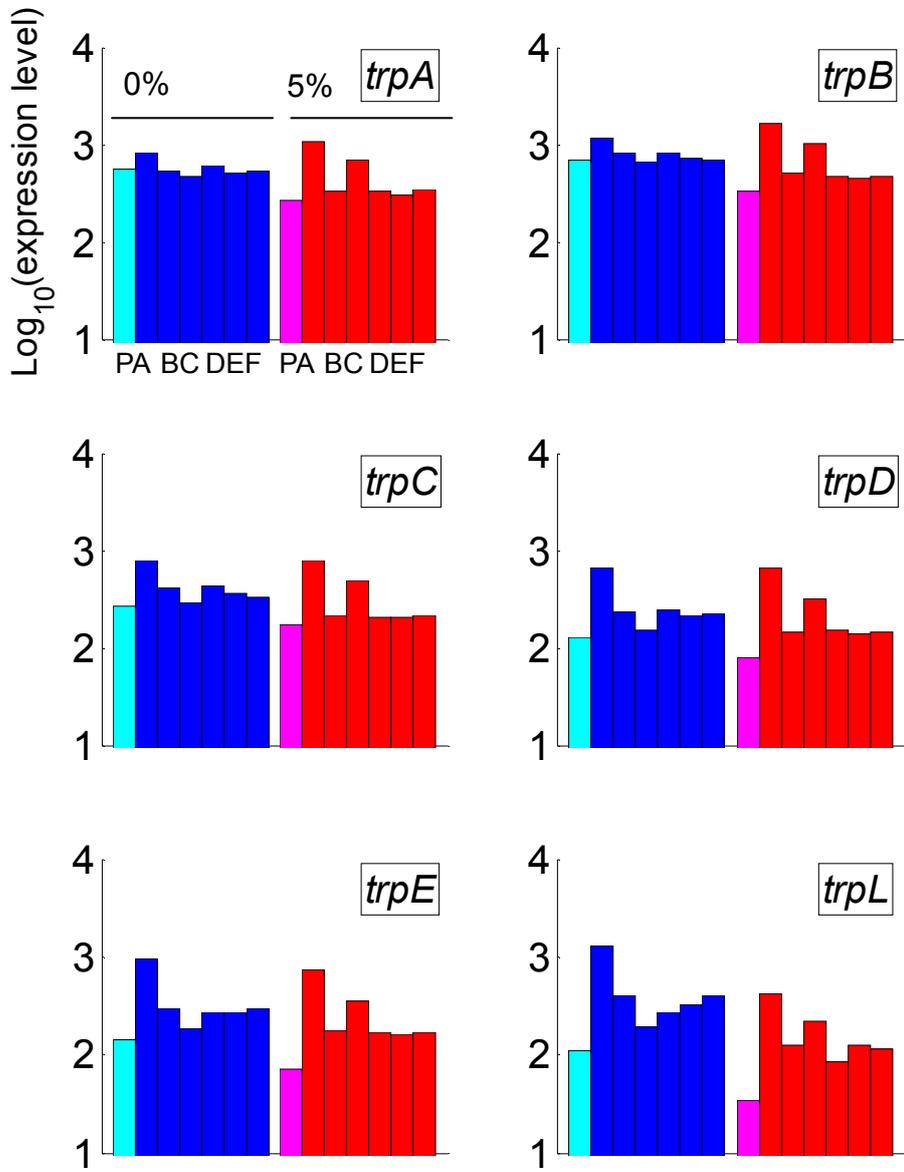
の構成成分であり、疎水性分子の膜透過性やストレス応答に関係するということが知られている (Bianco *et al.*, 2006)。LPS 合成の不活性化は、細胞外膜の構成比が変化したことを示唆している。エタノール耐性に関するこれまでの研究で、酵母や大腸菌においては膜構成成分である脂肪酸の鎖長や不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の構成比がエタノール耐性に重要であるということが明らかにされている (Mishra and Prasad, 1989; Ingram, 1977)。しかしながら、本結果においては、脂肪酸合成に関与する遺伝子群の発現量には有意な変化はみられなかった。本研究によって得た適応株は、脂肪酸ではなく LPS 合成量の調整により膜透過性をエタノールストレス条件に適した状態に変化させたという可能性がある。

このように、PC2 に対して大きく寄与する遺伝子に着目した解析により、エタノールストレスに対して適応した株に、遺伝子発現レベルでどのような変化が生じたかを明らかにすることができた。いくつかのアミノ酸の合成に関与する遺伝子群や、鉄イオンの取り込みに関与する遺伝子群の発現量が上昇していたことから、これらの物質がエタノール耐性に関与することが示唆された。

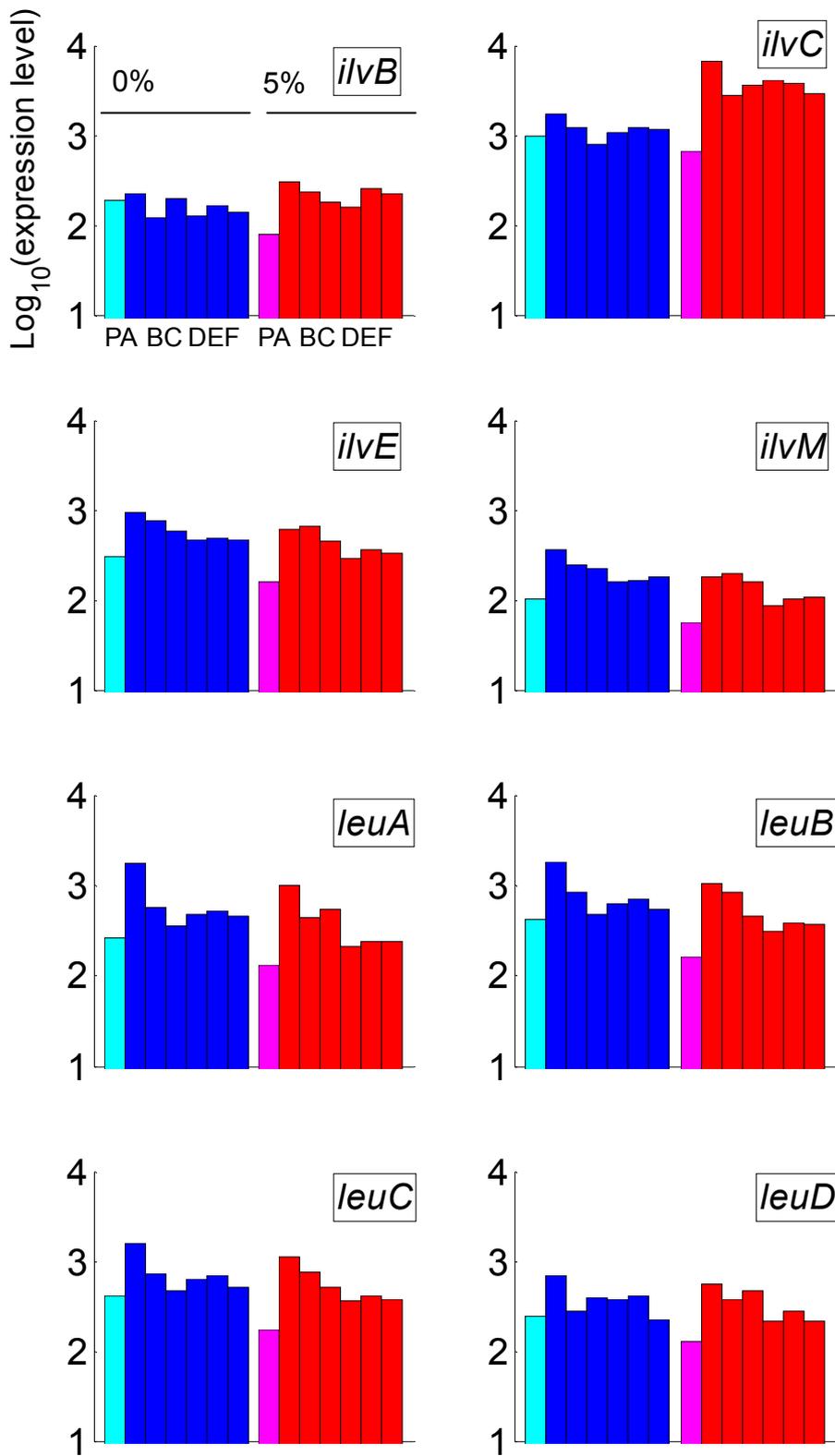
Table 3.5. 主成分 2 に対する主成分負荷量の大きさが上位 5%および下位 5%であるような遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリー

Function	P-value	Screened members	Total members	Gene name
PC 2 top 5%				
Cellular amino acid biosynthetic process	1.49×10^{-10}	23	100	<i>argH, aroF, carB, hisB, hisC, hisD, hisH, ilvA, ilvB, ilvC, ilvD, ilvE, ilvM, leuA, leuB, leuC, leuD, trpB, trpC, trpD, trpE, trpL, tyrA</i>
Histidine biosynthetic process	1.50×10^{-3}	4	11	<i>hisB, hisC, hisD, hisH</i>
Tryptophan biosynthetic process	1.67×10^{-6}	5	6	<i>trpB, trpC, trpD, trpE, trpL</i>
Branched chain family amino acid biosynthetic process	9.76×10^{-10}	10	17	<i>ilvA, ilvB, ilvC, ilvD, ilvE, ilvM, leuA, leuB, leuC, leuD</i>
Iron ion transport	5.47×10^{-17}	18	30	<i>cirA, entA, entB, entC, entD, entE, entF, fecA, fecB, fecL, fecR, fepA, fepB, fepC, fes, fhuE, fhu, mntH</i>
Enterobactin biosynthetic process	6.62×10^{-10}	7	7	<i>entA, entB, entC, entD, entE, entF, ybdB</i>
Iron-sulfur cluster assembly	1.05×10^{-4}	5	11	<i>hscA, iscS, sufA, sufB, sufD</i>
PC 2 bottom 5%				
Lipopolysaccharide biosynthetic process	2.70×10^{-6}	12	49	<i>eptB, kdtA, htrL, rfaB, rfaC, rfaF, rfaG, rfaI, rfaP, rfaQ, rfaS, rfaY</i>
Dipeptide transport	8.29×10^{-5}	4	6	<i>dppB, dppC, dppD, dppF</i>

(a)



(b)



(c)

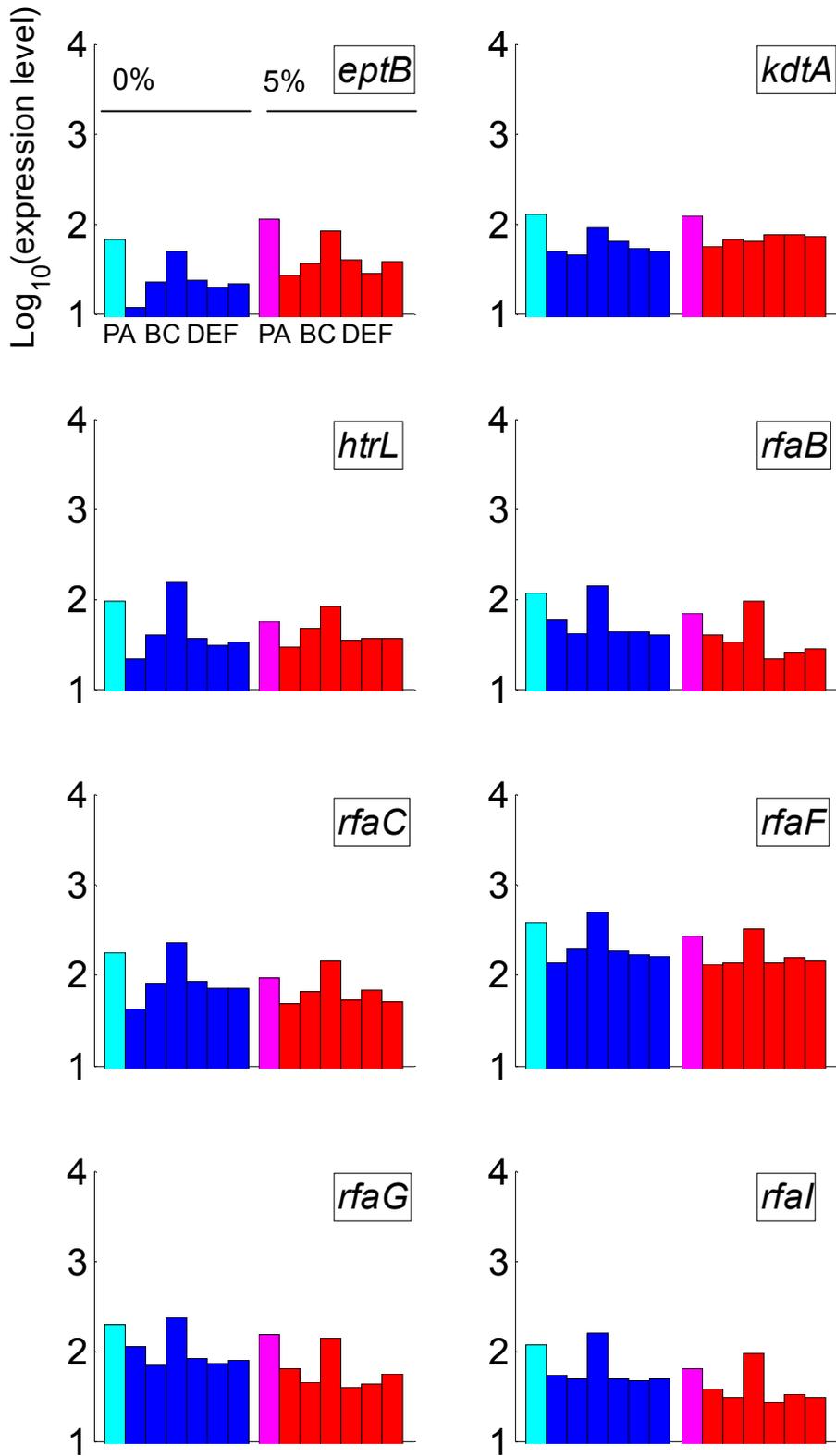


Fig. 3.12. 親株に比べてエタノール適応株において発現量が上昇または低下していた遺伝子。

(a)トリプトファン合成に関与する遺伝子 (*trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpD*, *trpE*, *trpL*)、(b)分枝アミノ酸 (Val, Leu, Ile) 合成に関与する遺伝子 (*ilvB*, *ilvC*, *ilvE*, *ilvM*, *leuA*, *leuB*, *leuC*, *leuD*)、(c) Lipopolysaccharide biosynthetic process”に関与する遺伝子群 (*eptB*, *kdtA*, *htrL*, *rfaB*, *rfaC*, *rfaF*, *rfaG*, *rfaI*, *rfaG*, *rfaI*) の各株、各条件における遺伝子発現量を示した。

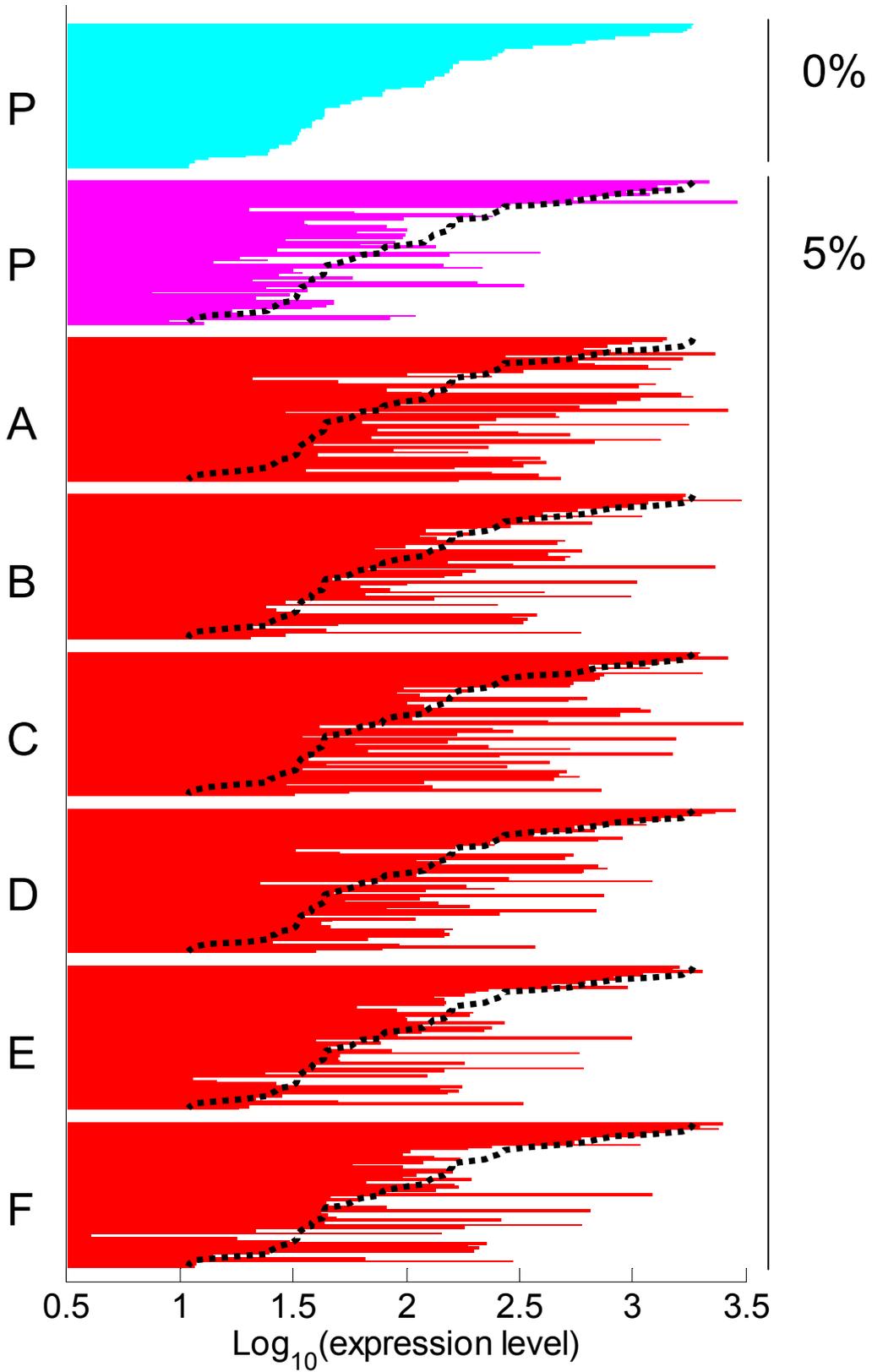


Fig. 3.13. Furによって抑制される57遺伝子についての、各株・各条件における遺伝子発現量。57つの遺伝子は、親株エタノール0%条件における発現量の降順により並べ替えてあり、他の株や条件についてもその並び順でプロットしている。点線は親株エタノール0%条件における発現量を示している。図より進化株では親株と比較し、Furの制御下にある遺伝子の発現量が上昇する傾向にあることがわかる。

3.3.2.3 第三主成分に対して大きく寄与する遺伝子の機能

PC3 に対する主成分負荷量が大きな、または小さな遺伝子において、有意に存在割合が多かったような遺伝子機能カテゴリをスクリーニングした (Table 3.6)。PC3 方向は A 株と C 株とが他の株と異なる挙動を示しており、進化株間におけるバリエーションを示していると考えられる。

PC3 に対する主成分負荷量が大きな遺伝子において多く存在した機能カテゴリには、”Arginine biosynthetic process” [Fig. 3.10(b)], ”Methionine biosynthetic process” (Fig. 3.14), ”Glucan biosynthetic process” (Fig. 3.15) などがあり、これらは特定の株 (A 株または C 株) における発現量が、他の株よりも低くなっていた。これとは逆に PC3 に対する主成分負荷量が小さな遺伝子において多く存在した機能カテゴリには”Aromatic amino acid family biosynthetic process”に含まれるトリプトファン合成遺伝子や、”Lipopolysaccharide biosynthetic process” [Fig. 3.12(a, c)]のように、A 株や C 株における発現量が他の適応株よりも高くなっていた。

Table 3.6 においてスクリーニングできた機能の多くは、Table 3.4 や Table 3.5 においても含まれているものであった。さらに注目すべきは、類似する機能が、PC3 に対する主成分負荷量が大きな遺伝子と小さな遺伝子の両方に存在するということである。たとえば PC2 においては適応株において発現量が上昇していた鉄イオンの輸送・代謝に関する機能カテゴリは、PC3 では”Iron ion transport”および”Enterobactin biosynthetic process”については主成分負荷量小さい遺伝子に集中しており、逆に”Iron-sulfur cluster assembly”については主成分負荷量大きい遺伝子に集中していた。同様の関係は”Aromatic amino acid family biosynthetic process”と、”Arginine biosynthetic process”および”Methionine biosynthetic process”について、さらに、”Lipopolysaccharide biosynthetic process”と”Glucan biosynthetic process”についても観察された。グルカンは多糖の一種であり、グルカン合成に関与する *mdo* 遺伝子は sodium dodecyl sulfate (SDS) に対する耐性や、浸透圧耐性に関与することが知られている (Rajagopal *et al.*, 2003)。その耐性機構は明らかにされていないが、恐らく細胞表層において働くであろうと推察される。リポポリサッカライドも同様に細胞表層の構成成分であることから、A 株や C 株は、他の株とは異なる方法によって細胞表層をエタノールが存在する環境に適した構成とすることにより耐性を獲得したのではないかと考えられる。同様に、上に列挙したアミノ酸合成や鉄イオンの輸送・代謝についても、もしこれらの機能がエタノールストレス耐性に関与していたとして、その耐性を獲得するためのこれらの遺伝子機能の組み合わせやバランスには複数の解があり、適応株はそれぞれ複数の解を選んだのではないかと推察される。

Table 3.6. 主成分3 に対する主成分負荷量の大きさが上位 5%および下位 5%であるような遺伝子に多く存在する遺伝子機能カテゴリー

Function	P-value	Screened members	Total members	Gene name
PC3 top 5%				
Pyrimidine nucleotide biosynthetic process	7.00×10^{-8}	7	10	<i>carA, carB, pyrD, pyrC, pyrF, pyrI, pyrB</i>
Arginine biosynthetic process	3.25×10^{-8}	8	13	<i>carA, carB, argF, argA, argE, argC, argB, argI</i>
Methionine biosynthetic process	1.05×10^{-4}	5	11	<i>metC, metR, metB, metF, metA</i>
Glucan biosynthetic process	2.19×10^{-3}	3	6	<i>mdoC, mdoG, mdoB</i>
Peptide transport	1.91×10^{-3}	5	19	<i>oppA, oppB, oppC, oppD, oppF</i>
Iron-sulfur cluster assembly	1.05×10^{-4}	5	11	<i>yfhJ, hscA, iscA, iscU, iscS</i>
PC3 bottom 5%				
Aromatic amino acid family biosynthetic process	2.97×10^{-5}	7	20	<i>trpC, trpD, trpE, trpL, pheA, tyrA, aroF</i>
Lipopolysaccharide biosynthetic process	3.63×10^{-7}	13	49	<i>htrL, rfaD, rfaF, rfaK, rfaZ, rfaY, rfaJ, rfaI, rfaB, rfaS, rfaP, rfaG, rfaQ</i>
Dipeptide transport	8.29×10^{-5}	4	6	<i>ydgR, dppF, dppD, dppA</i>
Iron ion transport	1.04×10^{-12}	15	30	<i>entD, fepA, entF, entE, entB, entA, fiu, shuE, cirA, mntH, feoB, fecB, fecA, fecR, fecI</i>
Enterobactin biosynthetic process	9.33×10^{-8}	6	7	<i>entD, entF, entE, entB, entA, ybdB</i>
Siderophore transport	8.29×10^{-5}	4	6	<i>fepA, fiu, shuE, fecA</i>

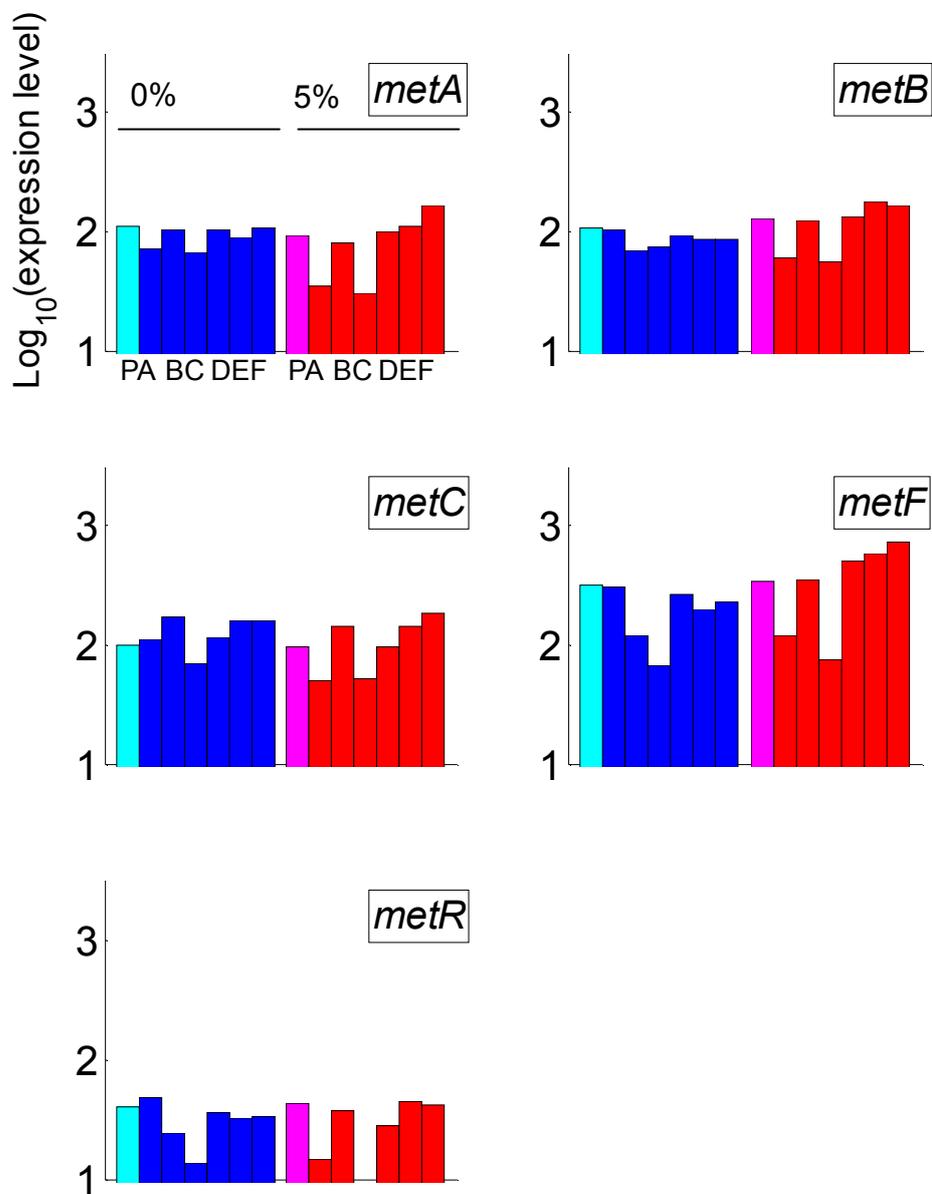


Fig. 3.14. “Methionine biosynthetic process”に含まれる遺伝子 (*metA*, *metB*, *metC*, *metF*, *metR*) の各株、各条件における遺伝子発現量。とくに5%エタノール条件のA株とC株において、発現量の低下がみられた。

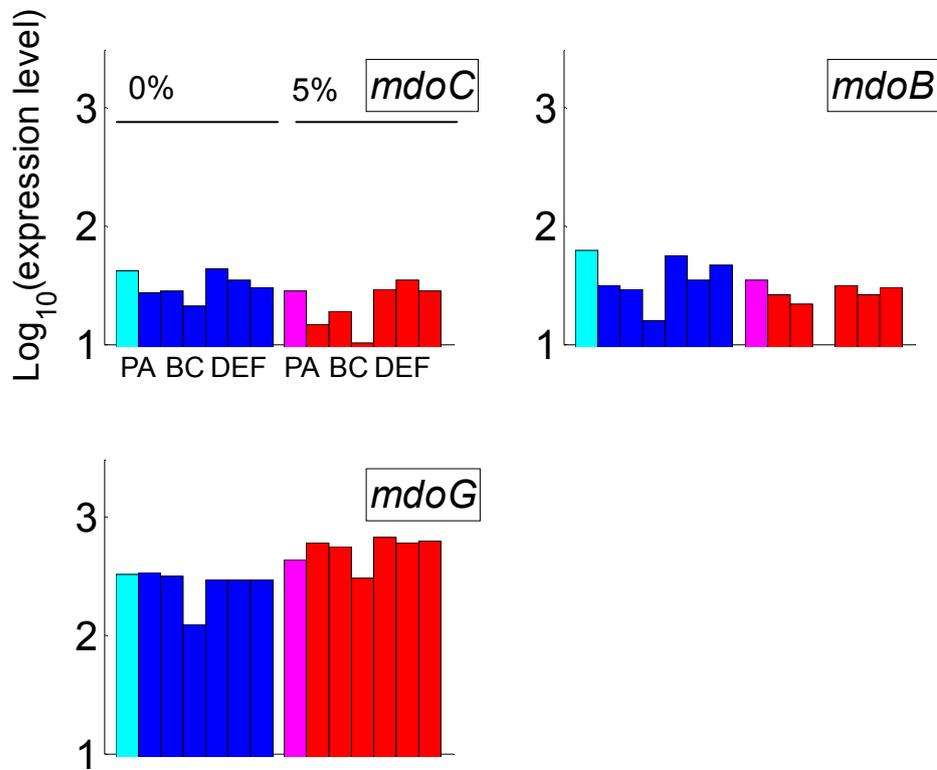


Fig. 3.15. “Glucan biosynthetic process”に含まれる遺伝子 (*mdoC*, *mdoB*, *mdoG*) の各株、各条件における遺伝子発現量。C株特異的に発現量の低下がみられた。

3.3.3 アミノ酸および硫酸鉄の添加による増殖への影響

遺伝子発現データの主成分分析のと機能カテゴリ解析の結果、適応株ではいくつかのアミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、ヒスチジン）の合成経路および鉄イオン輸送に関与する遺伝子群の発現量が上昇していることが明らかとなった。そこで、これらの物質がエタノールストレス耐性に関与するかどうかを明らかにするため、培地中にこれらの物質を添加した場合に比増殖速度が変化するかどうかを検証した。親株および適応株 A 株に対してエタノール非存在下および存在下において、イソロイシン、トリプトファン、ヒスチジンを添加しなかった場合、および添加した場合の比増殖速度を Table 3.7. に示す。

イソロイシン、トリプトファン、ヒスチジンの添加により、親株エタノール 5% 存在下では比増殖速度が上昇した。一方でエタノール非存在下では、これらのアミノ酸の添加によって親株の比増殖速度は増加しなかった (Fig. 3.16)。このことから、イソロイシン、トリプトファン、ヒスチジンの添加はエタノール耐性に対して寄与することが明らかとなった。一方で適応株においては、エタノール存在下における比増殖速度の増加はみられなかった。遺伝子発現解析の結果からは、適応株ではこれらのアミノ酸合成経路の発現量が上昇していることから、すでにエタノール耐性獲得のために十分なアミノ酸を生合成によって得ているために、培地中の添加によってそれ以上の比増殖速度の増加が起こらなかったと解釈できる。

硫酸鉄の添加により、両方の株において、エタノール存在下のみならずエタノール非存在下においても比増殖速度が増加した。このことから、鉄はエタノール耐性には寄与せず、細胞増殖そのものに寄与していることが示唆された。

バリン、ロイシンについては、培地への添加により増殖が完全に阻害され、比増殖速度を算出することができなかった。これらの物質は、細胞外に存在するとフィードバック阻害によって分枝アミノ酸の合成経路が阻害されることが知られている (Fig. 3.17)。そのためアミノ酸を含まない合成培地中にバリンを添加すると、バリンだけでなくロイシンやイソロイシンの合成も阻害されることにより、細胞増殖に必須であるこれらのアミノ酸が合成できないため細胞は増殖できない (De Felice *et al.*, 1979) という報告があり、本結果もこれに準ずるものであった。

Table 3.7. アミノ酸および硫酸鉄の添加による比増殖速度への影響。

親株 (P) および適応株 A 株 (A) について、エタノールストレス非存在下 (0%) および存在下 (5%) における比増殖速度を、濁度計付き培養器による培養実験を行い算出した。全ての物質の比較実験において、物質を添加しない場合 (-と表記) および添加した場合 (+) の両方の培養を行った。全ての培養実験を 3 回ずつ行い、その平均値と標準偏差を示した。

	比増殖速度 (h ⁻¹)			
	P0%	P5%	A0%	A5%
Ile-	0.553 ± 0.006	0.208 ± 0.009	0.497 ± 0.004	0.372 ± 0.006
Ile+	0.557 ± 0.019	0.257 ± 0.001	0.509 ± 0.005	0.367 ± 0.007
Trp-	0.599 ± 0.003	0.212 ± 0.001	0.509 ± 0.004	0.403 ± 0.008
Trp+	0.607 ± 0.015	0.230 ± 0.004	0.517 ± 0.006	0.402 ± 0.005
His-	0.557 ± 0.004	0.189 ± 0.008	0.499 ± 0.016	0.399 ± 0.009
His+	0.493 ± 0.002	0.212 ± 0.004	0.441 ± 0.006	0.397 ± 0.003
FeSO ₄ -	0.495 ± 0.004	0.119 ± 0.008	0.446 ± 0.009	0.299 ± 0.014
FeSO ₄ +	0.567 ± 0.011	0.149 ± 0.004	0.499 ± 0.011	0.345 ± 0.002

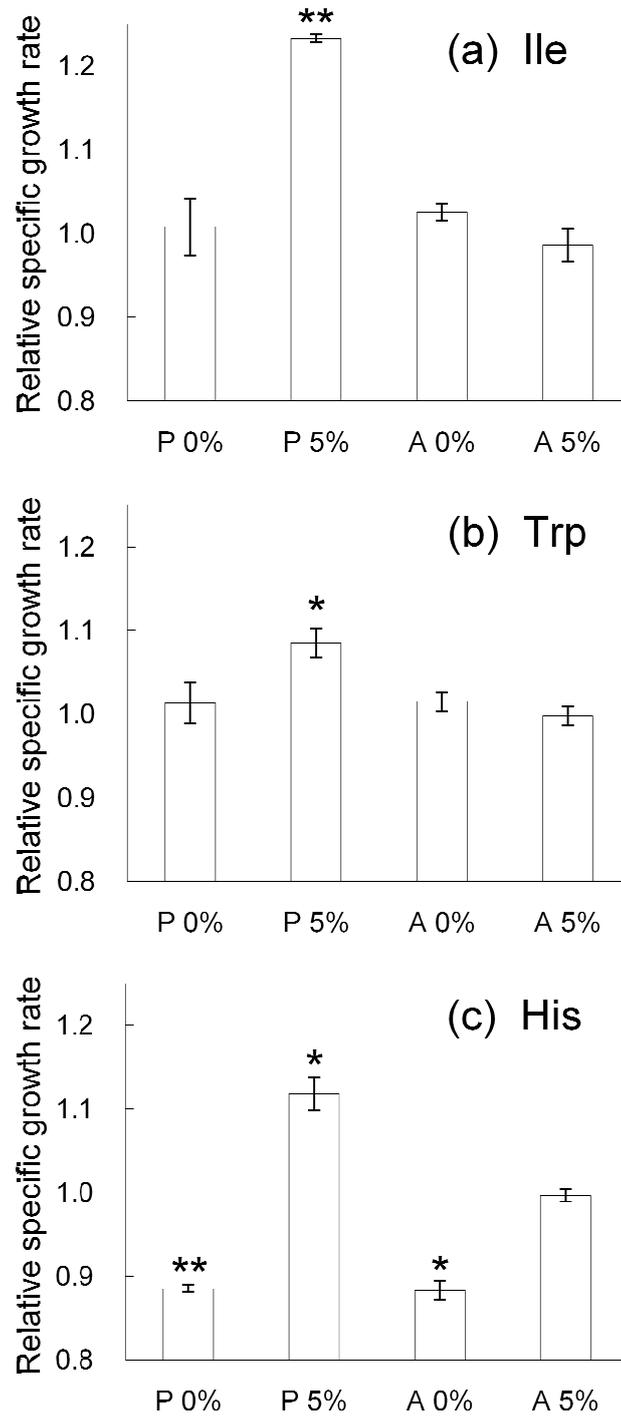


Fig. 3.16. アミノ酸の添加による増殖への影響。

(a)Ile を添加したとき、(b)Trp を添加したとき、(c)His を添加したときの、親株 (P) および適応株 A 株 (P) のエタノールストレス非存在下および存在下における比増殖速度を、それぞれ添加しなかった場合の比増殖速度で割った値を示している。エラーバーは 3 回の繰り返し実験による標準偏差を表し、アスタリスクは t 検定による p 値が 0.02 以下 (*), および 0.002 以下 (**) を表している。

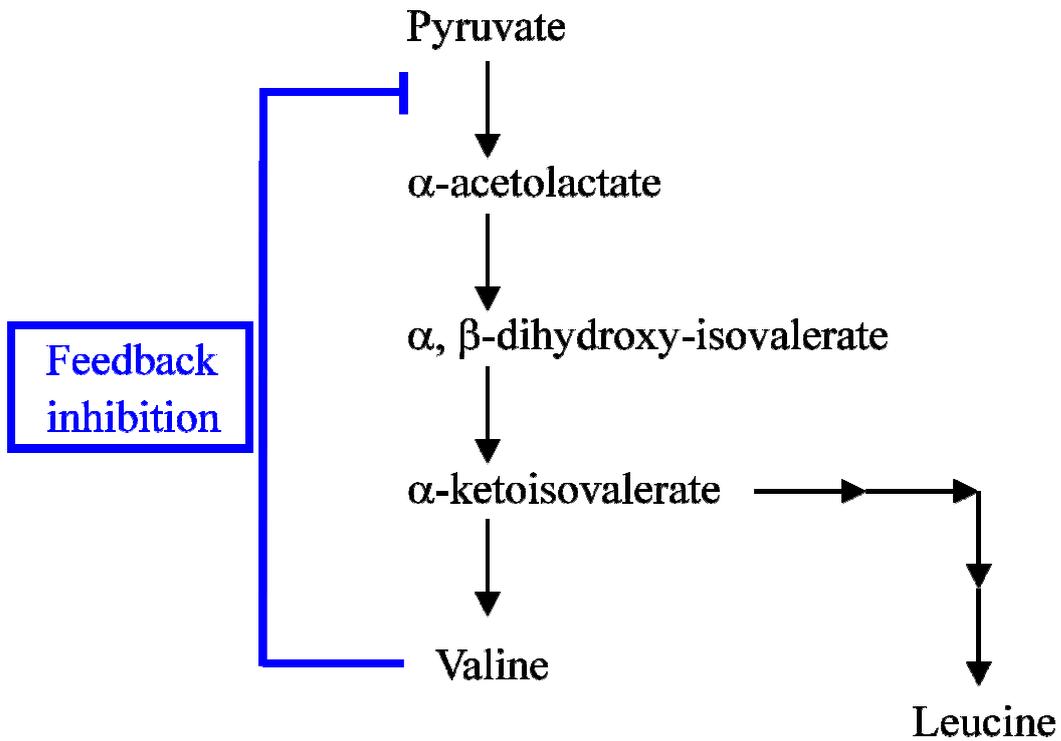


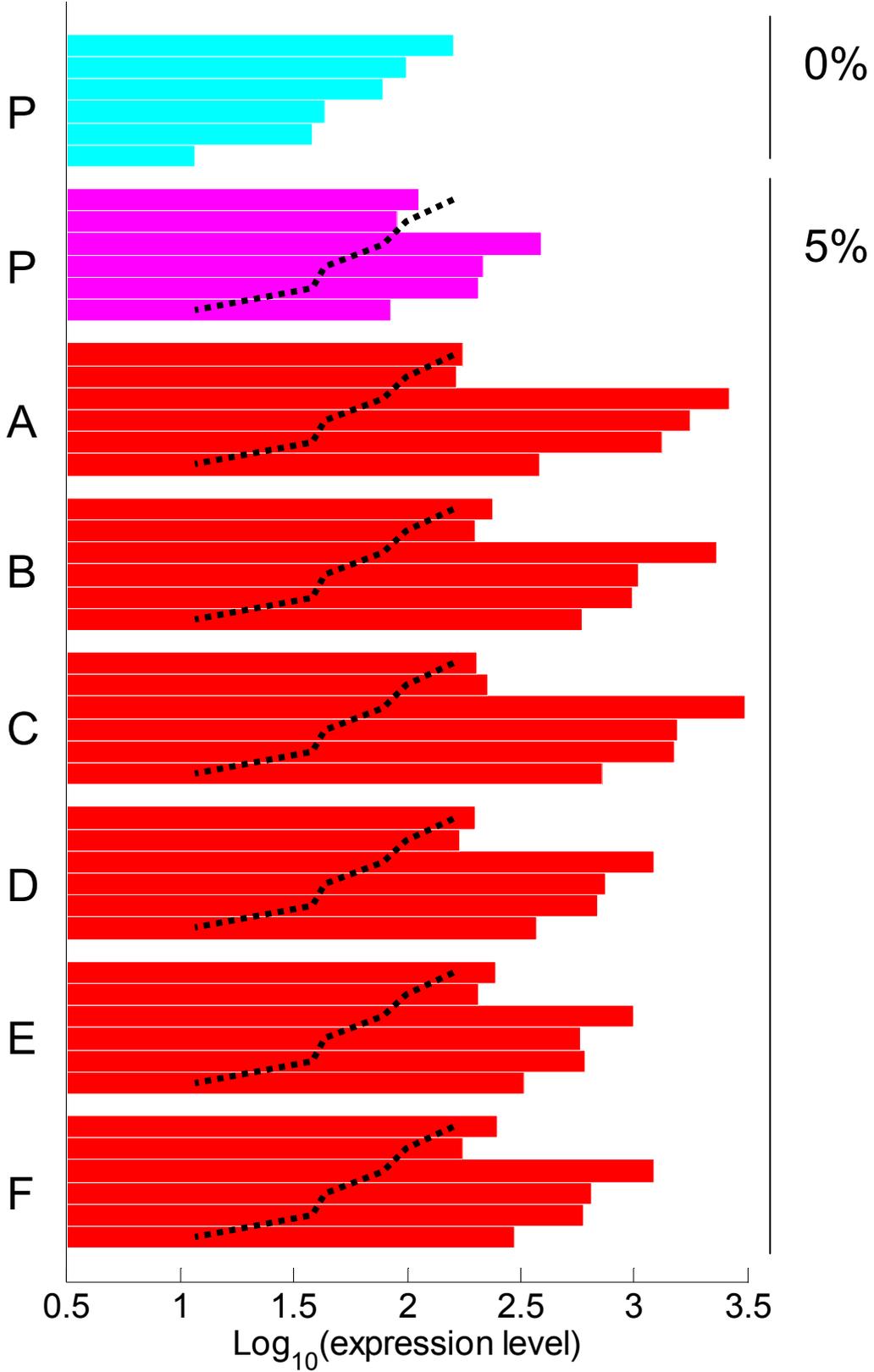
Fig. 3.17. 大腸菌の分枝アミノ酸合成経路の概要。
 最終生成物であるバリンによって分枝アミノ酸の前駆体である α -acetolactate の合成が阻害される (De Felice *et al.*, 1979)。このことによりバリンだけでなく、ロイシンの合成も阻害される。

3.3.4 エタノール適応による細胞内活性酸素種濃度の変化

遺伝子発現解析により鉄輸送遺伝子群の発現量が適応株において増加していることが見出されたが、3.3.3 では鉄イオンそのものはエタノール耐性には寄与しないことが示された。一方で鉄輸送に関わる遺伝子群は、鉄イオンの欠乏以外に起因して発現量を変化させる場合がある。たとえば細胞内の酸化還元状態によってこれらの遺伝子の発現量は変化する。Brynildsen らの研究によると、Fur に制御される遺伝子の発現量は、isobutanol の添加により低下し、それはキノンの機能阻害による細胞内スーパーオキシドアニオン濃度の減少によってもたらされることが示唆されている (Brynildsen and Liao, 2009)。また、酸化ストレスによる細胞内スーパーオキシドアニオン濃度の上昇によって Fur が抑制され、それにより Fur 制御化の遺伝子群の発現量が増加することが示されている (Blanchard *et al.*, 2007; Varghese *et al.*, 2007)。これらの先行研究より、本研究で得た適応株は、長期植え継ぎ実験の結果細胞内の酸化還元バランスを変化させており、それにより細胞内スーパーオキシドアニオン濃度が上昇した可能性がある。酸化ストレスに応答すること制御因子として OxyR[Oxidative (oxy) stress regulator]および NrdR[Nrd (Ribonucleoside diphosphate reductase) regulator]が知られている (Storz *et al.*, 1990; Torrents *et al.*, 2007)。これらの制御因子によって制御される遺伝子群の発現量が、適応株において上昇していた (Fig. 3.18) ことも、適応株の細胞内活性酸素種濃度の変化を示唆している。Fig. 3.19 に、これらをまとめて、細胞内酸化還元状態によって影響を受ける遺伝子群の制御関係、および予想される細胞内の酸化還元状態の変化を図示した。

そこでこれらの仮説を確かめるために、細胞内活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) の存在量を蛍光プローブ 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA, Invitrogen) を用いて測定した (Fig. 3.20)。その結果、適応株 A 株のエタノール 5%存在下では、その他の条件よりも有意に多い ROS が存在しており、遺伝子発現解析の結果と対応していた。

(a)



(b)

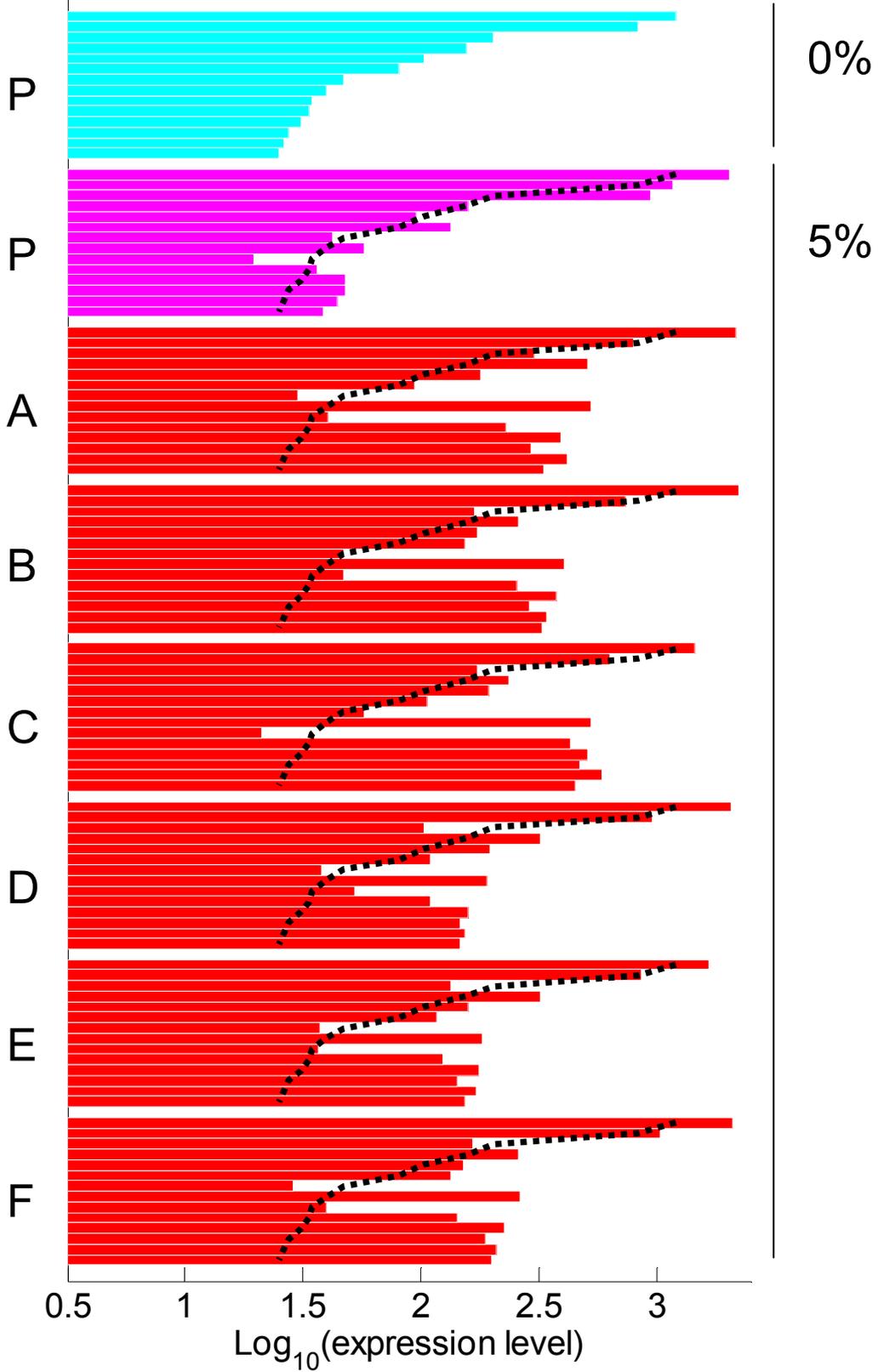


Fig. 3.18. OxyR および NrdR によって制御される遺伝子群の、各株・各条件における遺伝子発現量の、(a)OxyR によって制御される 6 遺伝子、(b)NrdR によって制御される 12 遺伝子の発現量を表している。これらの図に含まれる遺伝子はそれぞれ、親株エタノール 0%条件における発現量の降順により並べ替えてあり、他の株や条件についてもその並び順でプロットしている。点線は親株エタノール 0%条件における発現量を示している。図より進化株では親株と比較し、OxyR および NrdR の制御下にある遺伝子の発現量が上昇する傾向にあることがわかる。

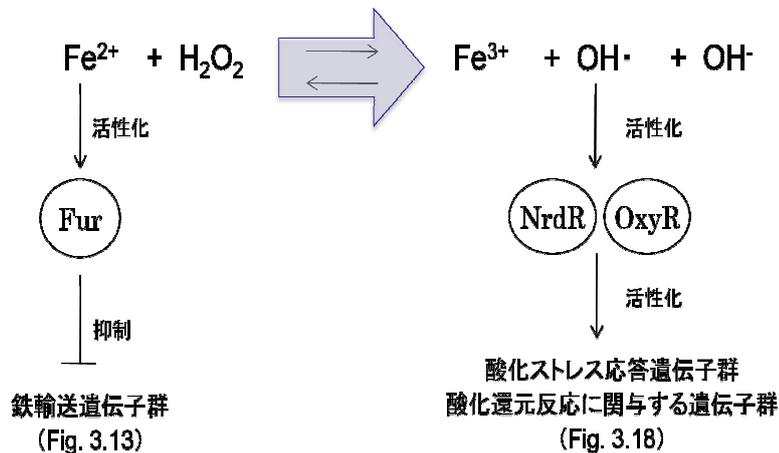


Fig. 3.19. 適応株において予想される細胞内の酸化還元状態の変化。

細胞内の鉄二価イオン (Fe^{2+}) は、酸化ストレス条件下においてはフェントン反応 (図中の化学反応式) によって鉄三価イオン (Fe^{3+}) に変化される。これによって鉄イオンが欠乏し、Fur による鉄輸送遺伝子群の抑制的制御 (図の左側) が解除され、鉄輸送遺伝子群の発現量は上昇する (Blanchard *et al.*, 2007; Varghese *et al.*, 2007)。Fig. 3.13 に示すように、鉄輸送遺伝子群の発現量上昇は、エタノール適応株において観察されている。一方で、フェントン反応によってヒドロキシラジカル ($\text{OH}\cdot$) が発生すると、酸化ストレス応答などに関与する遺伝子の発現が誘導される (図の右側)。Fig. 3.18 により、適応株では酸化ストレス応答などに関与する遺伝子の発現量もまた上昇していた。これらを総合すると、適応株ではフェントン反応の平衡は右側にシフトし、ヒドロキシラジカルが生じていると予想される。

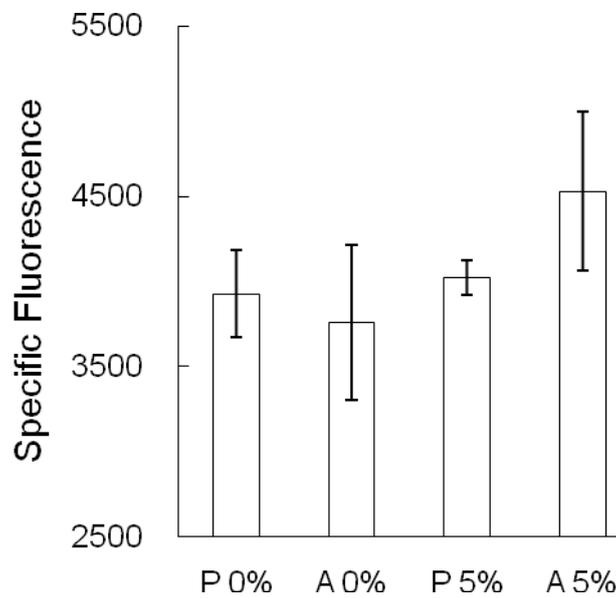


Fig. 3.20. 蛍光プローブ carboxy-H₂DCFDA による、親株(P) および適応株 A 株 (A) のストレス非存在下、および存在下における細胞内 ROS の測定。細胞に添加した蛍光プローブの蛍光強度を、細胞の濁度で割った値を示している。エラーバーは 6 回の繰り返し実験における標準偏差を表す。

3.4 考察

本章では、第2章で得たエタノール適応株6株と親株の計7株について、それぞれエタノール非存在下および存在下(5%)における遺伝子発現量の測定およびその解析を行った。主成分分析により(1)ストレスの有無により発現量が増加した遺伝子群、(2)適応による発現量が増加した遺伝子群、(3)適応株間において発現量が異なる遺伝子群をスクリーニングし、それらの遺伝子群にどのような機能のものが多く含まれるかを明らかにした。その結果、エタノール適応株はアミノ酸(トリプトファン、ヒスチジン、分枝アミノ酸)の合成に関わる遺伝子群および鉄イオンの輸送に関わる遺伝子群の発現量が上昇していた。

イソロイシン、トリプトファン、ヒスチジンの培地への添加によって、親株ストレス存在下における比増殖速度が上昇したことから、これらのアミノ酸がエタノールストレス耐性に関与することが示された。いくつかの先行研究において、アミノ酸の添加やアミノ酸合成経路の発現増強と、ストレス耐性との関係性が報告されている。たとえば大腸菌において、細胞内のグルタミン酸、アルギニンは酸ストレス耐性に関与し、グリシンやプロリンは浸透圧耐性に関与する(Chung *et al.*, 2006)。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、トリプトファン合成経路の発現増強(Hirasawa *et al.*, 2007)や培地中へのイソロイシン、メチオニン、フェニルアラニンなどの添加(Hu *et al.*, 2005)がエタノール耐性をもたらすと報告されている。さらに、大腸菌において細胞内アミノ酸濃度がさまざまなストレス環境条件下(低温、熱、酸化ストレス)において上昇していた

(Jozefczuk *et al.*, 2010)という報告から、アミノ酸濃度の上昇はストレス耐性と深い関係があることが示唆される。しかしながら、本研究で見出したイソロイシン、トリプトファン、ヒスチジンについて、大腸菌のエタノール耐性に関与するという報告はこれまでなされていない。また、これらのアミノ酸がどのようなメカニズムによってエタノール耐性をもたらすのかは明らかではなく、さらなる研究が必要であると考えられる。

一方で、鉄イオンの添加はストレス存在下のみならずストレス非存在下においても比増殖速度の上昇をもたらしたため、鉄イオンはストレスに対する耐性ではなく増殖そのものに関与すると考えられる。鉄イオン輸送に関与する遺伝子群は、細胞内酸化還元状態によって発現量が増加することが知られており、また3.3.4で示したように、適応株A株ストレス存在下では細胞内ROS濃度が適応株よりも高いレベルとなっており、このような細胞内ROS濃度の違いが鉄イオン輸送に関与する遺伝子の発現量を変化させたと考えられる。このような、適応株における細胞内ROS濃度の変化がどのような理由で生じたかを直接証明することには、本研究は至っていない。しかしながら、関連研究においてアルコールストレスによる細胞内酸化還元状態の変化について論じた例

(Brynildsen and Liao, 2009)があるので、これを参考にしながら考察を深めたい。

Brynildsenらは、イソブタノールを大腸菌に曝露した際の遺伝子発現の変化をマイクロ

アレイによって解析した。その結果、電子伝達系において電子を輸送するキノンの機能不全がイソブタノールストレスによって引き起こされるということが示された。このキノンの機能不全は、イソブタノールによって細胞膜の流動性が変化し、細胞膜上のタンパク質の構造が変化することにより、キノンとの相互作用が阻害されることによって生じると推察されている。この電子伝達系の阻害により、細胞内酸化還元状態が変化し、様々な応答を引き起こすことが彼らのマイクロアレイ解析の結果より示唆された。この応答の主なものとしては、本研究でも ROS の測定によって示したように、細胞内 ROS 濃度が変化するというものである。この他にも、細胞内補酵素の酸化還元状態の変化も生じることが Brynildsen らによって示されている。キノンは電子伝達系において、呼吸鎖複合体 I と共役し、電子の授受にともなって NADH を NAD^+ に変換する反応が起こる。この反応が阻害を受けると、解糖系において生じた NADH を、呼吸鎖以外の反応において再酸化する必要が生じる。このような場合に予想される大腸菌のふるまいの 1 つの例として、乳酸や蟻酸などの有機酸を生成することにより NADH の再酸化を試みるというものがある。元来大腸菌は、酸素が存在しない条件下においては有機酸を生成することで NADH の再酸化を行うことがよく知られている（嫌気発酵, Clark, 1989）。また Vasilij らは呼吸鎖複合体 II などを破壊した大腸菌変異株を作成したところ、酸素存在下においても乳酸を生産するようになるなどの中央代謝経路の大幅な変化が引き起こされることを示した (Vasilij *et al.*, 2010)。このように、イソブタノールストレスによって生じる電子伝達系の阻害は、細胞に大きな影響を引き起こし、それは細胞内の代謝レベルにも及ぶことが示唆された。本研究においても、親株と適応株の比較により、細胞内酸化還元状態が変化していることを示唆するような遺伝子発現量の変化が観察されており、エタノールストレスに対する応答、および適応株がエタノール耐性を獲得する過程で、細胞の代謝状態を大きく変化させた可能性がある。また、親株における細胞内 ROS レベルはエタノールの有無によっても変化しなかったものの (Fig. 3.19)、OxyR や NrdR によって制御される遺伝子群の発現量は、親株においてエタノールの添加により上昇していた (Fig. 3.18)。このことから、エタノールストレスに対する応答として、細胞内酸化還元状態の変化が生じた可能性がある。これらの推察は、イソブタノールストレスによって引き起こされるような電子伝達系の阻害はエタノールストレスにおいても同様に引き起こされるという可能性を示しており、イソブタノールとエタノールストレスとは電子伝達系の阻害という点において、同様の作用機構で働くかもしれないということを示唆している。実際に、イソブタノールストレスが電子伝達系の阻害を引き起こす理由は、Brynildsen らによってイソブタノール分子による膜の流動性の変化であると考察されており、同じ両親媒性分子であるエタノールによって同様の現象が引き起こされるということも十分にあり得る。

先行研究では、変異育種により大腸菌エタノール耐性株を得て、その株の遺伝子発現量が親株とどう異なるかをマイクロアレイによって解析した例 (Gonzalez *et al.*, 2003)

や、大腸菌トランスポゾンライブラリおよび一遺伝子発現増強ライブラリを用いてエタノール耐性やエタノール感受性に関与する遺伝子を抽出した例 (Goodarzi *et al.*, 2010) が報告されている。これらの研究においては、たとえばグリシン代謝に関与する遺伝子 (*gcvT*, *gcvP*, *lpdA*) や芳香族アミノ酸合成に関与する遺伝子 (*aroF*, *aroG*, *aroL*, *tyrA*) の発現がエタノール耐性菌において上昇した (Gonzaletz *et al.*, 2003) ことなど、本研究で見出した結果とは合致しない点が多い。本研究ではアミノ酸を含まない合成培地である M9 培地を実験に用いているのに対し、これらの研究では栄養源を豊富に含む天然培地である Luria-Bertani 培地を用いているというような実験条件の違いが、彼我の結果の違いを引き起こした原因の 1 つになっていると考えられる。一方でこれらの報告はともに、転写因子 FNR (Fumarate and nitrate reduction) がエタノール耐性に関与することを見出しており、その破壊がエタノール耐性を促進するということを確認している。FNR は中央代謝経路上の多くの遺伝子の発現を主に嫌気条件において制御しているため、これらの研究においても、細胞の酸素利用や細胞内酸化還元状態、さらには代謝状態がエタノール耐性と関与することを示唆していると言える。

3.5 結言

本章では、第2章で得たエタノール適応株6株と親株の計7株について、それぞれエタノール非存在下および存在下（5%）における遺伝子発現量の測定およびその解析を行った。主成分分析により(1)ストレスの有無により発現量が変化した遺伝子群、(2)適応による発現量が変化した遺伝子群、(3)適応株間において発現量が異なる遺伝子群をスクリーニングし、それらの遺伝子群にどのような機能のものが多く含まれるかを、データベースによる遺伝子機能分類と統計検定により明らかにした。その結果、エタノール適応株はアミノ酸（トリプトファン、ヒスチジン、分枝アミノ酸）の合成に関わる遺伝子群および鉄イオンの輸送に関わる遺伝子群の発現量が上昇していた。これらの遺伝子群の発現上昇がストレス耐性に関与すると考え、これらの物質を培地中に添加することによる増殖への影響を調べたところ、イソロイシン、トリプトファン、ヒスチジンの添加は親株エタノール5%存在下における比増殖速度を上昇させた。またこれらの物質の添加は、親株ストレス非存在下や適応株ストレス存在下における比増殖速度を上昇させなかった。これらのことから、イソロイシン、トリプトファン、ヒスチジンはエタノールストレスに対する耐性に関与することが示された。また、鉄イオンの添加はストレス存在下のみならずストレス非存在下においても比増殖速度の上昇をもたらしたため、鉄イオンはストレスに対する耐性ではなく増殖そのものに関与すると考えられる。一方で鉄イオン輸送に関与する遺伝子群は、細胞内酸化還元状態によって発現量が変化することが知られており、同時に本研究の遺伝子発現解析から、適応株において酸化ストレスの発生が示唆されたことから、適応株では何らかの理由により細胞内ROS濃度が変化し、それが鉄イオン輸送の発現量を変化させたのではないかと推察した。そこで蛍光プローブを用いて細胞内ROS濃度の測定を行ったところ、適応株A株のエタノール5%存在下では、親株よりも高いレベルの細胞内ROS濃度が存在することが示された。また、関連研究（Brynildsen and Liao, 2009）によると、イソブタノールストレスは電子伝達系の阻害によって代謝状態の変化を引き起こすことが示唆されており、本研究の遺伝子発現解析において観察された発現変化は、エタノールストレスに対する応答や、長期培養実験の過程において類似する代謝状態の変化が起きた可能性があることを示唆している。また、エタノール耐性を題材とした先行研究（Gonzalez *et al.*, 2003, Goodarzi *et al.*, 2010）においても、嫌気代謝に関わるグローバル制御因子がエタノール耐性に関与することが示唆された。このように、エタノール適応株には代謝レベルの変化が生じていることが予想されると考えられる。

第4章 代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニング手法の開発

4.1 緒言

第3章の親株および適応株の遺伝子発現解析の結果、エタノールストレスに対する応答および長期培養実験によるエタノールストレスへの適応は、代謝レベルの変化を伴うことが示唆された。近年の技術の発達により、代謝経路上の分子を直接測定する技術が登場したり (Monton and Soga, 2007; Rabinowitz, 2007; Krone *et al.*, 2010)、代謝反応の流量を推定する手法 (Iwatani *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009) が発達したりしてきた。一方で、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析は、代謝反応をコードする遺伝子の発現量も測定することができるため、DNA マイクロアレイ解析による発現量のデータから、代謝状態を推定するような情報を取得することも可能である。

第3章の結果から、エタノール耐性に関するさらなる知見を得るためには、ストレスに対する応答や適応によって代謝レベルでどのような変化が生じたかの解析が重要であることが示唆された。このためには、遺伝子発現量のデータから、代謝経路上において、発現量が大きく変化したような経路がどこに集中しているか、といった情報を抽出する必要がある。そうした手法の1つとして第3章で用いた Gene Ontology Annotation (Barrell *et al.*, 2009) に代表されるような遺伝子の機能分類により、代謝に関係する機能を抽出するというものがある。しかしながらこの機能カテゴリは、たとえば“Methionine biosynthetic process”といった表記にみられるように、代謝経路を粗視化した表現であるため、機能カテゴリ間の関係性がわかりづらいなどの問題がある。とりわけ、代謝経路の分岐点のどちら側に反応が進んでいるか、などの詳細な考察を、前述のような機能カテゴリによって表現された情報から行うことは困難である。

一方で、細胞内で生じる代謝反応の情報は KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) に代表されるように、データベースとして整備されており、このような代謝反応の情報を利用することで、代謝経路の構造を含むレベルの議論が可能である。生物は細胞内に 1000 前後の代謝経路や代謝分子を含んでおり、これらは相互に連結してネットワークを形成している。KEGG ではこのような生物が持つ代謝ネットワークを、部分的な経路図に分割して表現している。たとえば“Glycolysis / Gluconeogenesis”や“Citrate cycle (TCA cycle)”といった経路が、KEGG には合計で数百程度存在し、それぞれ数十の代謝反応や代謝物質を含んでいる (Fig. 4.1)。また KEGG を用いることで、どの遺伝子がどの代謝反応と対応しているかという情報も同時に取得できるため、たとえばマイクロアレイによって測定した遺伝子発現量を、代謝ネットワークのリンクに相当する部分に重みとして持た

せることが可能である。KEGG の情報を用いて遺伝子発現データを解析する方法としては、前述したような KEGG の部分的な経路図に、遺伝子発現量を併記するというような手法がある (Arakawa *et al.*, 2005)。こうした手法は視覚的には優れているものの、システムティックな手法であるとはいえない。すなわち、たとえば遺伝子発現量が大きくなっているような経路を、客観的な指標に基づいて定量的に、かつ網羅的にスクリーニングしたいという要求を満たすことはできない。また、こうした解析に用いる KEGG の部分的な経路図は、生化学的知見に基づく経験的な分類に従っているものが多く、複数の経路図間にまたがるような部分を解析しづらいという点もある (Fig. 4.2)。そこで本研究ではまず、遺伝子発現情報を、代謝ネットワーク構造に基づいて、定量的かつ網羅的に解析するための手法を開発することにした。

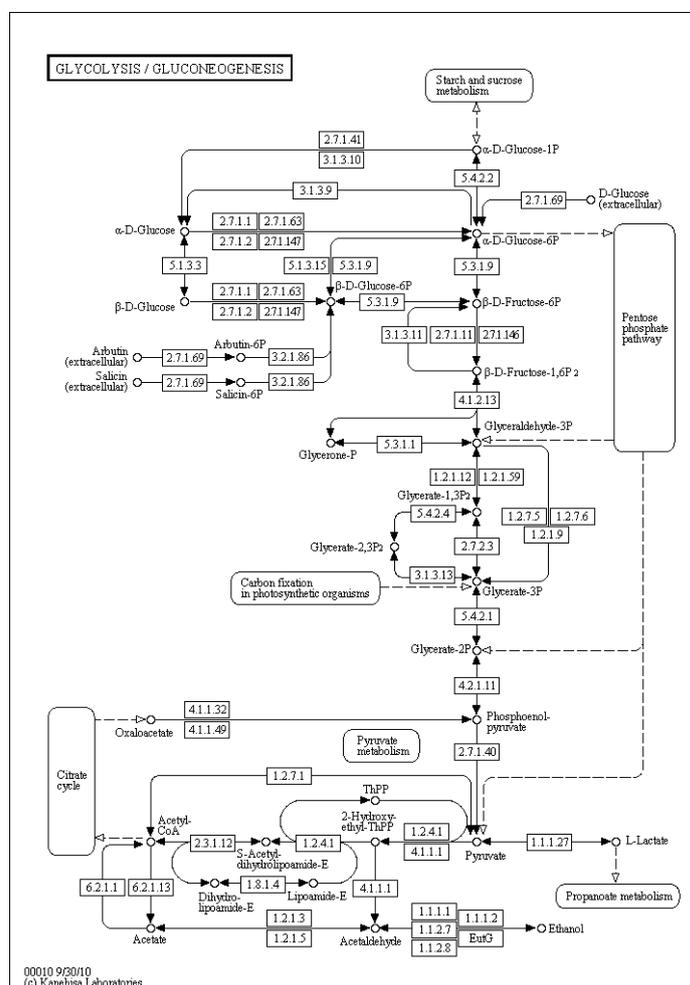


Fig. 4.1. KEGG に記載されている部分的な代謝経路図の例。
 ”Glycolysis / Gluconeogenesis”に含まれる代謝反応 (矢印が代謝反応、
 四角囲みが酵素を表す) と代謝分子 (丸印) を例として記載した。
<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00010.html> より引用。

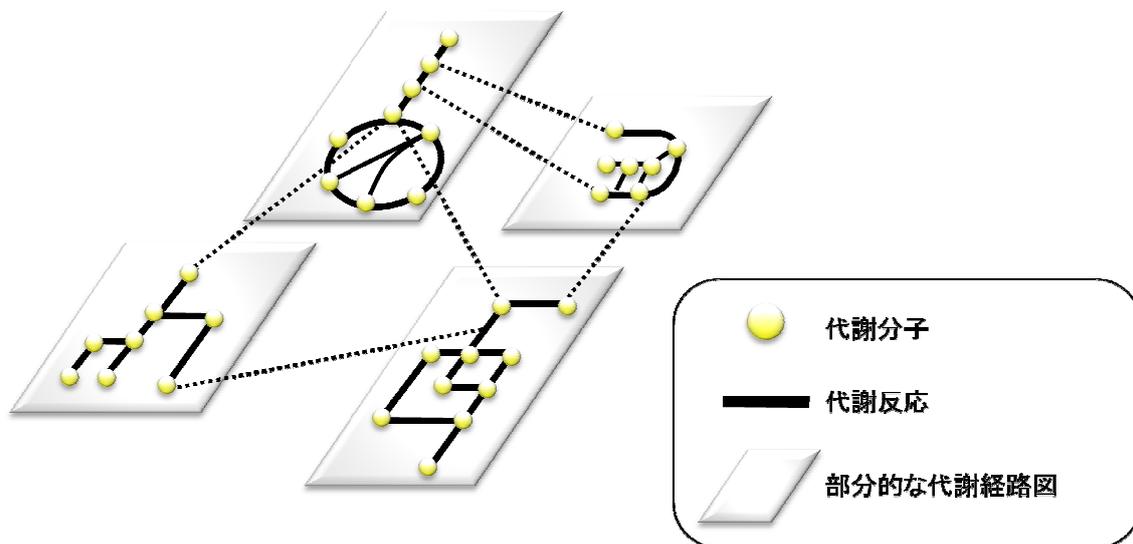


Fig. 4.2. KEGG による細胞内代謝ネットワーク表現方法の模式図。図中の丸は代謝分子、実線は代謝反応、四角は部分的な代謝経路図を示す。点線は、同一の代謝分子が複数の部分的な代謝経路図上にまたがって存在していることを示す。

KEGG においては、生化学的知見に基づき生体内の代謝反応を部分的な代謝経路図（例”Glycolysis / Gluconeogenesis”など）の組み合わせによって表現している。こうした部分的な経路図は合計で数百程度にも上る。多くの代謝分子は、こうした部分的な経路図の複数個所にまたがって存在しており、こうした代謝分子を含むような経路を解析するのは困難な場合が多い。

次に、この手法を用いて遺伝子発現データを解析したときに、機能分類による解析では発見することが難しいような情報を取得することが可能であるかを確認するために、両方の解析を行いその結果を比較した。このための検証データとして、ビールの醸造に用いられるラガービール酵母のマイクロアレイデータを用いた。

ラガービール酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、世界のビール市場において主流となっているラガータイプと呼ばれるビールの醸造に用いられる。ラガービール酵母は実験室酵母やパン酵母、醸造酵母である *Saccharomyces cerevisiae* の近縁種であるものの、*S. cerevisiae* と比較すると研究が進んでいなかった。その理由の一つとして、ラガービール酵母の複雑な染色体構造がある。ラガービール酵母は2種の類縁である酵母種が自然交雑して生じたといわれており (Tamai *et al.*, 1998)、2種の酵母に由来する染色体の両方を細胞内に有している (Fig. 4.3)。これらの2つ染色体のゲノム配列のうち片方は、*S. cerevisiae* と極めて高い相同性 (99%以上) を示す (Sc 型ゲノムと表記) が、もう一方 (非 Sc 型ゲノム) は、80%程度の相同性に留まることが知られている (Kodama *et al.*, 2006)。ラガービール酵母の細胞内には、こうした2種の染色体に由来する、互いに配列が若干異なるような遺伝子が重複して存在しており、その総数は全遺伝子の8割にも上る。このような、ある程度配列が類似するような重複遺伝子が、ラガービール醸造の性質にどのように寄与しているかは長らく不明であった。その解析には、このような重複遺伝子を区別して解析する精度を持った技術の登場を待たねばならなかったからである。最近になってラガービール酵母の全ゲノム配列が解読され (Nakao *et al.*, 2009)、その配列を元にして、全ての重複遺伝子の発現量を区別して測定することができる DNA マイクロアレイが登場した。

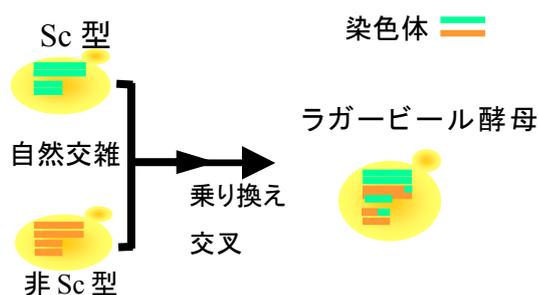


Fig. 4.3. ラガービール酵母の染色体構造の概念図。

ラガービール酵母の細胞内には、類似する2つの祖先種 (Sc 型、非 Sc 型と表記) に由来する染色体が共存している。これらの2種の染色体上には、同一の機能を有しながら遺伝子配列が若干異なるような遺伝子 (重複遺伝子) が多数存在している。

本章では、ラガービール酵母の重複遺伝子を区別して測定可能であるような DNA マイクロアレイを用い、重複遺伝子の発現量の相違を解析する。ラガービール酵母は実験室酵母などに代表される *S. cerevisiae* と比較して、ビール醸造において重要な生理学的性質として、低温でも高い麦汁資化性を有することや (Boulton and Quain, 2001, Zheng *et al.*, 1994)、高いエステル生成能、亜硫酸の生成能、低い硫化水素生成能 (Crumplen *et al.*, 1993) といった特徴を持つことが既に知られている。このような相違は、ラガービール酵母が非 Sc 型遺伝子を有することによってもたらされたと考えられるが、非 Sc 型遺伝子のうちどの遺伝子がそうした特徴に関わっているかは、古くから行われている個別遺伝子の解析によって、部分的に明らかにされているにとどまっている。前述したように、遺伝子の機能分類による方法や、代謝ネットワーク構造に基づいた方法によってラガービール酵母のマイクロアレイデータを解析することで、そうした相違をもたらすと考えられる遺伝子群をスクリーニングすることが可能であるかどうかを検証した。

4.2 実験方法および実験材料

4.2.1 代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニング

4.2.1.1 代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニングの概要

代謝ネットワークの構造に着目して、発現量が上昇または低下しているような代謝経路をスクリーニングするための方法を構築した。いま、代謝分子と、それらを連結する代謝反応とをノードとリンクとする代謝ネットワークを考える (Fig. 4.4)。それぞれのリンクには、その代謝反応に関与する遺伝子の発現量または発現比などを重みとして与えることができる。代謝反応によって連結された、連続する n 個の代謝分子に着目し、これを部分ネットワークと呼ぶ。部分ネットワークに含まれるすべての遺伝子の重みの平均値を、この部分ネットワークの代表値とする。すべての可能な部分ネットワークについての代表値を算出し、代表値が高いものや低いものをスクリーニングすることで、重みの値が高い (または低い) ような遺伝子を含む部分ネットワークをスクリーニングした。

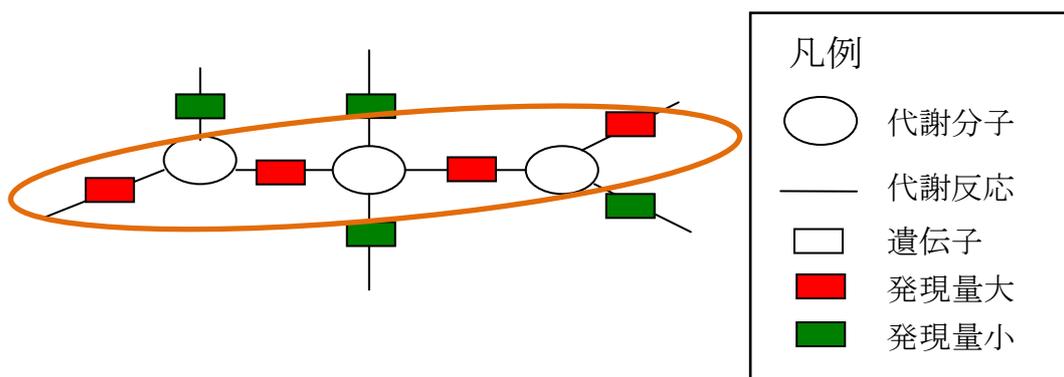


Fig. 4.4. 代謝ネットワーク構造に着目した遺伝子スクリーニングの概要図。茶色の丸囲みは代謝分子 3 つ、代謝反応 4 つを含むような部分ネットワークの一例を表している。この部分ネットワークには部分ネットワークには発現量が大きな遺伝子が集中しているということを模式的に示している。

4.2.1.2 代謝ネットワーク構造に基づく遺伝子スクリーニングのアルゴリズム

前項で述べたような代謝分子と代謝反応からなるネットワークが存在し、それに対応する遺伝子発現データが与えられた際に、こうしたデータを用いて Fig. 4.4. で示したような部分ネットワークのスクリーニング法について示す。

今、ある生物種が有する全ての代謝と代謝反応からなる代謝ネットワークを用いて、大きさが n の (代謝分子 n 個と代謝反応 $n-1$ 個からなる) 部分ネットワークを、可能な全ての組み合わせについて考える。このような部分ネットワークの例を Fig. 4.5. に示す。Fig. 4.5. は部分ネットワークの大きさを 3 としたときの、 i 番目の部分ネットワークについての構成要素を模式的に表したものである。各部分ネットワークは代謝分子 $C(i, j)$ と、代謝反応に対して与えられる重み $w(i, j)$ を持つ。ここで i は部分ネットワークのインデックス、 j は各部分ネットワークに含まれる代謝分子と代謝反応のインデックスである。各代謝反応の重み $w(i, j)$ は式[4.1]で定義する。

$$w(i, j) = \frac{\sum_{k=1}^m data(i, j, k)}{m} \quad [4.1]$$

ここで $data(i, j, k)$ は、 i 番目の部分ネットワークの j 番目の代謝反応に関与する遺伝子に対応する遺伝子発現データである。 k はこの代謝反応に関与する遺伝子が複数存在するときの、遺伝子のインデックスであり、その総数 m は代謝反応に固有のものである。このようにして算出した $w(i, j)$ を用い、 i 番目の部分ネットワークの代表値 $R(i)$ を式[4.2]によって算出する。

$$R(i) = \frac{\sum_{j=1}^n w(i, j)}{n} \quad [4.2]$$

全ての部分ネットワークについて代表値 $R(i)$ を算出し、その値の大きなものや小さなものをスクリーニングすることによって、高い (または低い) 遺伝子発現値を多く含むような部分ネットワークをスクリーニングすることができる。

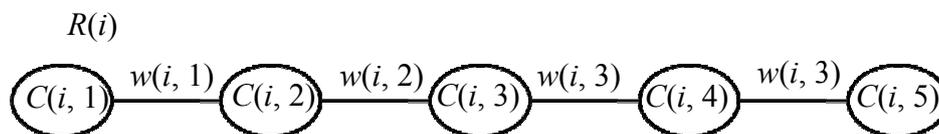


Fig. 4.5. 部分ネットワークに含まれる要素の模式図。 i 番目の部分ネットワークには代謝分子 $C(i, j)$ と、代謝反応に対して与えられる重み $w(i, j)$ が含まれる。ここで i は部分ネットワークのインデックス、 j は各部分ネットワークに含まれる代謝分子と代謝反応のインデックスである。この重み $w(i, j)$ から代表値 $R(i)$ を算出する。

4.2.1.3 代謝ネットワークの構築

代謝ネットワークを構築するための情報として、代謝分子、代謝反応、代謝反応と酵素および遺伝子との対応関係を KEGG (Kanehisa and Goto, 2000; <http://www.genome.jp/kegg/>) より取得した。本章では部分ネットワークは 5 個の代謝分子、4 個の代謝反応を含むものとした。このような部分ネットワークに含まれる遺伝子について、それぞれ重複遺伝子間の遺伝子発現比を重みとし、部分ネットワークに含まれる全ての遺伝子のデータの中央値を算出し、その部分ネットワークの代表値とした。中央値を算出する際、部分ネットワークに含まれる 4 つの代謝反応のうち 1 か所までは、遺伝子発現データが測定誤差の影響などにより得られなかったとしても、その間の代謝反応は連結されているとして扱い、部分ネットワークの代表値は残りの遺伝子のデータから算出した。構築した代謝ネットワークは代謝分子 666 個、代謝反応 997 個からなり、部分ネットワークの総数は 237,965 個となった。また、こうした部分ネットワークから、重みの値が高い（または低い）ような部分ネットワークをスクリーニングする際には、部分ネットワーク同士の重複があった場合（ある 2 つの代謝物質が、複数の異なる酵素反応によって連結されていた場合など）、それらをまとめて表記した。

4.2.2 ビール酵母の DNA マイクロアレイデータの取得

構築したスクリーニング手法の有用性の実証するために、ビール酵母の DNA マイクロアレイデータを本手法によって解析した。このビール酵母のマイクロアレイデータは、サントリーホールディングス株式会社の中尾嘉宏博士より譲渡されたものを用いた。

4.2.2.1 使用菌株

ラガービール酵母のマイクロアレイ実験には、ラガービール酵母 *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 を用いた。菌株は Fachhochschule Weihenstephan (Freising, Germany) より譲渡を受けたものを使用した。

4.2.2.2 ラガービール酵母の培養

ラガービール酵母のマイクロアレイ解析のための菌体を取得するために、発酵試験を行った。溶存酸素濃度が 11 ppm となるように調整した 100% 麦汁を培地として用い、2 l E. B. C. (European Brewery Convention) チューブにて発酵試験を行った。初期菌体量が 7.5 g/l-wet cell weight となるように植菌し、15°C において静置条件で培養した。発酵進行度の指標としてアパレントエキス濃度を、比重計 DMA46 (Anton Paar Co., Graz, Austria) を用いて測定した。

4.2.2.3 DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現量の測定

発酵試験の 0, 21, 45, 69, 98, 189, 239 時間目における培養液を採取し、DNA マイクロアレイ実験に供した。total RNA の抽出および精製、cDNA 合成、断片化、末端ビオチン化、ハイブリダイゼーション、洗浄、染色、ならびにスキャンはマイクロアレイ添付のプロトコル (Affymetrix) に従って行った。本研究で用いたマイクロアレイは、CustomExpress®の 49-7875 フォーマットを用いて、*S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 のゲノム情報 (Nakao *et al.*, 2009) に基づいて設計したものであり、約 23,000 のプローブセットを含む。

4.2.3 DNA マイクロアレイ解析

4.2.3.1 遺伝子発現データの前処理

プローブレベルの遺伝子発現データから遺伝子発現量を推定するために、MBEI (Model-based expression indexes; Li and Wong, 2001) を改変した方法を用いた。複数のマイクロアレイデータ間の比較を行うための正規化に、quantile normalize (Bolstad *et al.*, 2003) を用いた。

4.2.3.3 遺伝子機能分類

ラガービール酵母の遺伝子の機能分類は、Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) データベースにおける Functional Catalogue (FunCat, Ruepp *et al.*, 2004) を用いて行った。スクリーニングした遺伝子に、ある遺伝子機能カテゴリが有意に多く存在するかどうかを、超幾何分布を用いて検定した (3.2.5.3)。

4.3 結果

4.3.1 ラガービール酵母の DNA マイクロアレイデータの取得

ラガービール酵母 *S. pastorianus* の DNA マイクロアレイデータを取得するために、発酵試験を行った。ラガービール酵母を麦汁培地に植菌し、0, 21, 45, 69, 98, 189, 239 時間目に培養液を分取し、菌体濃度の測定、エキス濃度の測定 DNA マイクロアレイ解析のための菌体の取得を行った。Fig. 4.6 に発酵試験における発酵挙動を示す。これらの菌体を用いて DNA マイクロアレイ実験を行い、遺伝子発現量の測定を行った。測定によって得られたプローブレベルの蛍光強度データより、MBEI (Model-based expression indexes; Li and Wong, 2001) を用いて遺伝子発現量を算出した。7つのマイクロアレイデータを quantile normalize (Bolstad *et al.*, 2003) によって正規化した。Sc 型ゲノムに由来する遺伝子 (以後 Sc 型遺伝子)、非 Sc 型ゲノムに由来する遺伝子 (以後非 Sc 型遺伝子) の両方が存在する遺伝子 5025 個を解析対象とし、Sc 型遺伝子の発現量と非 Sc 型遺伝子の発現量の比の値を算出した。

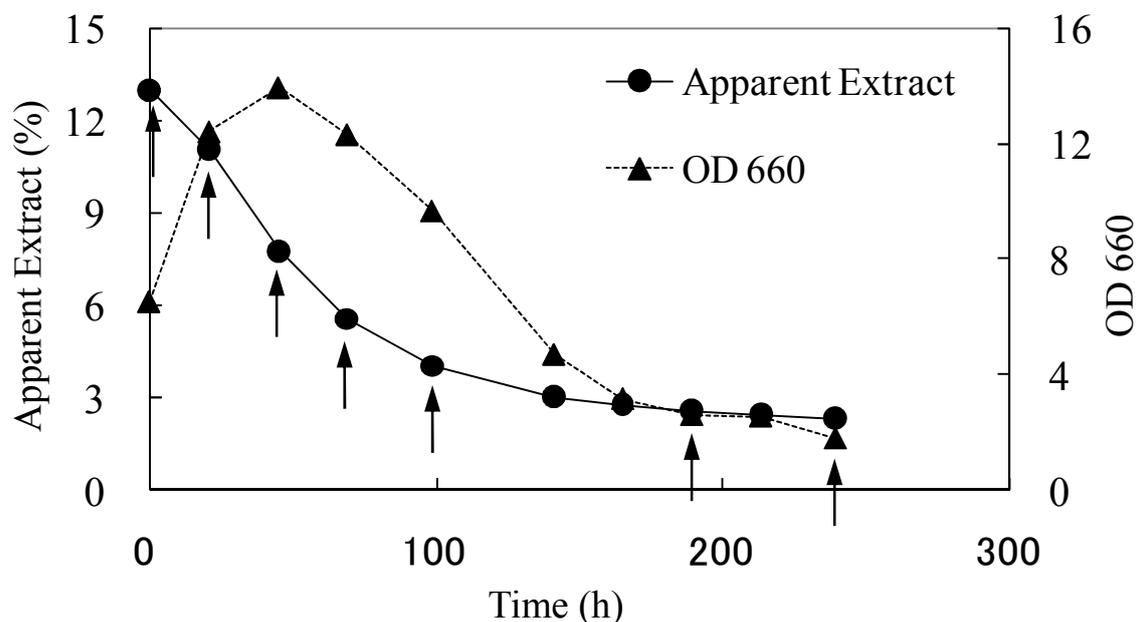


Fig. 4.6. ラガービール酵母の麦汁培地による発酵試験の発酵挙動。図中矢印の時点において、DNA マイクロアレイ解析に供する菌体を取得した。

4.3.2 ラガービール酵母の DNA マイクロアレイデータの遺伝子機能分類による解析

4.3.1 において取得した、発酵試験中の7つのタイムポイントにおけるラガービール酵母重複遺伝子の発現量の比について、その値が大きいものまたは小さいもの上位5%ずつをスクリーニングし、Sc 優勢遺伝子または非 Sc 優勢遺伝子と定義した。ラガービール酵母の遺伝子を、データベース Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) を用いて遺伝子機能ごとに分類し、スクリーニングした遺伝子に、ある遺伝子機能カテゴリが多く含まれているかどうかを検定した。Sc 優勢遺伝子または非 Sc 優勢遺伝子において有意に多く含まれていた機能カテゴリを Table 4.1 に示す。

パン酵母などに代表される *S. cerevisiae* は、近縁種よりも高いエタノール発酵能や増殖能を有することが知られている。Sc 優勢遺伝子に多く含まれる機能は、そうした発酵能や増殖能に関与していると考えられる。そのような遺伝子機能の例としてたとえば、”sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism”のようなエネルギー合成や”purine nucleotide anabolism”の核酸合成のように細胞増殖に関与するもののほかに”biosynthesis of thioredoxin, glutaredoxin, glutathion”、”chemical agent resistance”にみられるように、解毒に関連する遺伝子機能が多く含まれていた。このような解毒に関連する遺伝子は、ビール醸造中に生じるストレスに対する防御機構として働いている可能性がある。ビール醸造中に生じるストレスについては、溶存酸素濃度、pH、浸透圧、エタノール濃度、栄養源の濃度や温度など、様々な観点からの研究がなされている (reviewed in Gibson *et al.*, 2007) もの、未だに不明な点も多く、本研究でスクリーニングした解毒に関する遺伝子が、醸造中に生じるストレスに対してどのように関与するかは報告されていない。

一方で非 Sc 優勢に多く含まれているような遺伝子機能には、ビール醸造において重要な生理学的性質との関連を示すようなものが多く含まれていた。たとえばビール中に含まれる亜硫酸は抗酸化作用によってビールの品質劣化を防止する働きがある。一方で硫化水素はオフフレーバーの原因物質となるので、ビール中の含有量は低いことが好ましい。”sulfate assimilation”はこのような硫黄代謝物の生成に関与すると考えられ、その生成には非 Sc 遺伝子が主要な役割を果たしていることを本結果は示唆している。また、ビールの香気成分である高級アルコールやそのエステルは分枝アミノ酸合成経路上の中間代謝物から生成される (Kobayashi *et al.*, 2008)。”metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine”に含まれる遺伝子はそうした香気成分の生合成に関与していると考えられ、その生合成には非 Sc 優勢遺伝子が大きく寄与していることが明らかとなった。また”sugar transport”や”C-compound and carbohydrate utilization”は炭水化物の取り込みおよび代謝に関連する機能であり、ラガービール酵母が低温においても、高い麦汁資化性を有することに関係している可能性がある。

このように、遺伝子機能分類により、ラガービール酵母の有する特徴が、重複遺伝子のうちのどちらによって担われているかを明らかにすることができた。

Table 4.1. Sc 優勢遺伝子および非 Sc に多く含まれていた遺伝子機能カテゴリ

*: p-value<0.05, **: p-value<0.01, ***: p-value<0.001

MIPS functional category	1	2	3	4	5	6	7
higher expressed at Sc genes							
purine nucleotide anabolism	**		*				*
DNA degradation		*				**	**
phosphate utilization		*	*	*	*		*
sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism	**			*	*	**	**
transfer of activated C-1 groups	*		*	*	*	*	*
biosynthesis of secondary products derived from glycine, L-serine and L-alanine			*	**	*	*	*
biosynthesis of thioredoxin, glutaredoxin, glutathion			**	**	**	**	*
glyoxylate cycle	**		*	**	**	*	*
metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)		*		*	*	*	*
transcription elongation	*	*					
ribosome biogenesis	**		**	*	**		
FE/S binding		**	**	*	*	*	*
drug transport		*		*	*	*	*
chemical agent resistance	*	**	**	**	**	**	**
detoxification		**	*		*	**	*
homeostasis of phosphate				*	*	*	*
cell-cell adhesion					*		*

Table 4.1. Sc 優勢遺伝子および非 Sc に多く含まれていた遺伝子機能カテゴリ (続き)

MIPS functional category	time point						
	1	2	3	4	5	6	7
TRANSPOSABLE ELEMENTS, VIRAL AND PLASMID PROTEINS		*		*			
higher expressed at non-Sc genes							
biosynthesis of methionine	*	**	*	*	**	**	**
biosynthesis of serine			*	*	*	*	*
metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine	*		*	**	**		
sulfate assimilation	**	**	**	**	**	**	**
C-compound and carbohydrate utilization	**	**	*	**	**	**	**
metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)	*	*	*	*		*	*
G1/S transition of mitotic cell cycle						**	**
complex cofactor/cosubstrate binding	*	*		**	**	**	**
FAD/FMN binding						*	*
NAD/NADP binding	*			*	*	*	*
anion transport (Cl, SO4, PO4, etc.)		**	**	**	**		*
sugar transport		**	*		**	**	**
vitamin/cofactor transport			*	*		*	
cellular import	**	**	**	**	*	**	**
second messenger mediated signal transduction	*		*		*	*	*
homeostasis of cations	**		*	*	*	*	*

4.3.3 ラガービール酵母の DNA マイクロアレイデータの代謝ネットワーク構造に着目した解析

4.3.3.1 代謝ネットワークの構築

代謝分子、代謝反応、代謝反応と酵素および遺伝子との対応関係を KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) より取得し、代謝分子 666 個、代謝反応 997 個からなるラガービール酵母の代謝ネットワークを構築した。この代謝ネットワークについて、連続する代謝物質 5 つ、代謝反応 4 つを含む部分ネットワークを全ての可能な組み合わせ (総数 237,965 個) について作成し、それぞれの部分ネットワークについての代表値を式[4.1]および[4.2]に従い算出した。得られた全ての部分ネットワークについての代表値の分布を Fig. 4.6 に示す。次に、得られた代表値の大きさをを用い、上位 30 個および下位 30 個の部分ネットワークをスクリーニングした。スクリーニングに用いた閾値を Fig. 4.7 の黒線で示す。得た部分ネットワークの構成要素 (代謝分子名や遺伝子名) を列挙して議論する都合上、本研究ではスクリーニングする部分ネットワークの個数を 30 個として指定した。この閾値の大きさは、部分ネットワークの代表値が示す分布を正規分布と仮定して算出した有意水準 99.9% (平均値 $\pm 3.29 \times \sigma$) を上回ることを確認した。

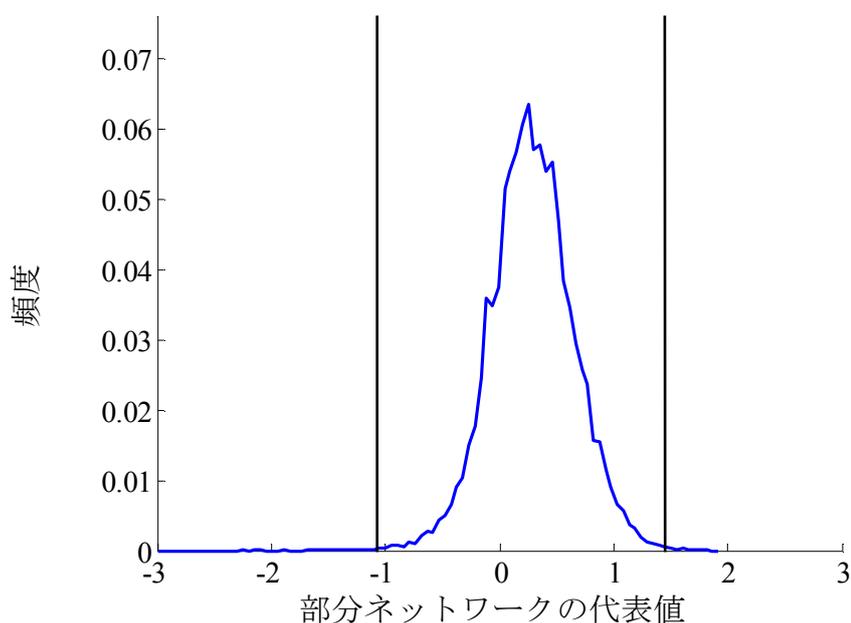


Fig. 4.7. ラガービール酵母の代謝ネットワーク上の全ての可能な部分ネットワークについて遺伝子発現比のデータを用いて算出された代表値の分布。縦線は代表値の大きさ上位 30 個および下位 30 個をスクリーニングした際の閾値を示す。

次に、得られた上位 30 個および下位 30 個の部分ネットワークに含まれる遺伝子の発現比が、それ以外の部分ネットワークに含まれる遺伝子の発現比よりも高い（または低い）傾向にあるかどうかを確認するために、遺伝子発現比の値を Fig. 4.8 にプロットした。図中の横軸は、部分ネットワークに含まれる各代謝反応のインデックス ($j=1,2,3,4$)、縦軸は、 i 番目の部分ネットワークに含まれる j 番目のインデックスの代謝反応に対する重みの値 $w(i, j)$ を示し、各部分ネットワークに含まれる代謝反応のデータ ($w(i, j)$ の $j=1,2,3,4$) を線で連結して示したものである。赤線は上位 30 個、青色は下位 30 個の部分ネットワークのデータを示し、黒線はそれ以外の部分ネットワークからランダムに 30 個をサンプリングして図示したものである。また、太線は各 30 個の部分ネットワークの平均値を示している。図より、代表値の大きさによりスクリーニングした部分ネットワークには、発現比が高い、または低い遺伝子が多く含まれることが確認できた。

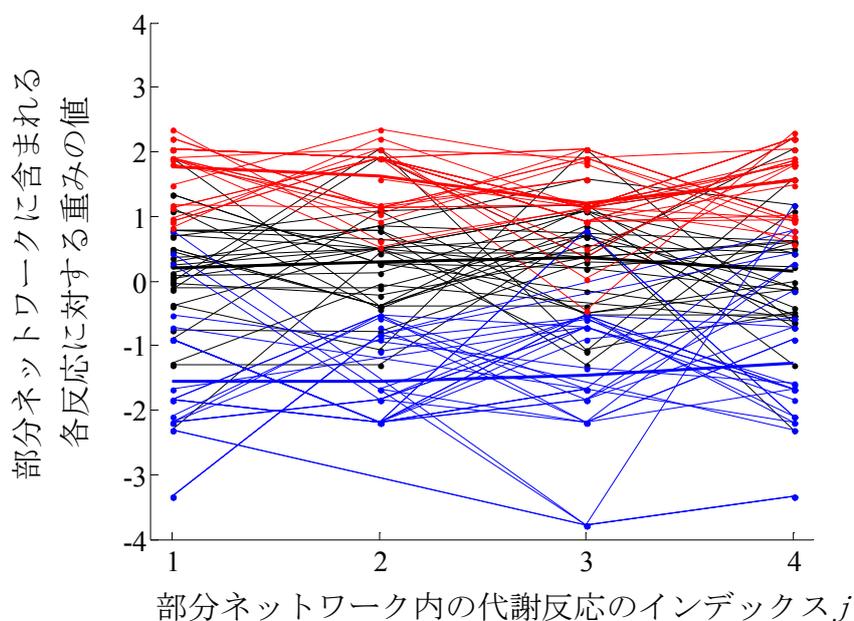


Fig. 4.8. Fig. 4.7 においてスクリーニングした、代表値が大きい部分ネットワーク上位 30 個 (赤) または小さい下位 30 個 (青)、およびそれ以外の範囲からランダムに選択した 30 個 (黒) に含まれる各代謝反応の重みの値について、各部分ネットワークに含まれる代謝反応のデータ ($w(i, j)$ の $j=1,2,3,4$) を線で連結して示した。太線はそれぞれの平均値を示す。

4.3.3.2 スクリーニングによって得られた代謝ネットワーク

前項で得た、大きなまたは小さな代表値を持つ部分ネットワークそれぞれ 30 個ずつについて、含まれる代謝分子名、および代謝反応に関わる遺伝子名を Appendix-Table 2,3 に示した。これらのうち、ラガービール酵母のビール醸造に関連が深いと考えられる経路を含む部分ネットワークを選び、その代表的な例を Fig. 4.9 に示した。また、Fig. 4.9 に示す部分ネットワークに含まれる代謝分子および代謝反応が、KEGG のどの代謝マップ上に存在するかを示した。

Fig. 4.9(a)は Sc 優勢であるような遺伝子を多く含む部分ネットワークの例である。図には TCA 回路上の有機酸を含む部分ネットワーク (a-1, a-2) と、核酸合成に関わる部分ネットワーク (a-3, a-4) を示している。(a-3) は機能カテゴリ解析の結果 (Table 4.1) では” purine nucleotide anabolism”と対応しているが、(a-1, a-2) の TCA 回路上の有機酸を含む部分ネットワークは、機能カテゴリを用いた解析ではスクリーニングされなかった。

Fig. 4.9(b)は非 Sc 優勢であるような遺伝子を多く含む部分ネットワークの例である。(b-1) の部分ネットワークは、硫酸イオンが亜硫酸および硫化水素に変換される反応を示している。(b-2) の部分ネットワークは、ピルビン酸を前駆体として、分枝アミノ酸の 1 つであるバリンへと至る生合成経路がスクリーニングされている。また、(b-3) の部分ネットワークは 6 単糖および糖リン酸などを含む代謝反応群である。これらはそれぞれ、前項で行った機能分類による解析によって得られた“sulfate assimilation”, “metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine”, “C-compound and carbohydrate utilization”と対応している。しかしながらこれらのカテゴリは十から数十程度の遺伝子を含んでいる。Fig. 4.9 の結果により、そのカテゴリ中のどの経路が特に優勢に機能しているかということが明らかとなった。

また、Sc 優勢であるような経路と非 Sc 優勢であるような経路とが隣接しており、機能カテゴリによる解析のみでは解釈が難しいような場合が存在する。たとえば Table 4.1 では Sc 優勢であるような機能カテゴリとして” sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism”、非 Sc 優勢であるような機能カテゴリとして” C-compound and carbohydrate utilization”がスクリーニングされ、両者とも中央代謝経路を主とする炭化水素に関与する代謝反応である。しかし Fig. 4.9 により、このうちペントースリン酸経路を含む部分は Sc 遺伝子が優勢、6 単糖および糖リン酸の変換反応は非 Sc 遺伝子が優勢であるということが明らかとなり、より詳細な解釈が可能となった。また、ピルビン酸を中心とする TCA 回路上の反応は、機能カテゴリ解析においてはスクリーニングされなかった。しかし本手法により、TCA 回路上の有機酸を含む反応は Sc 優勢、TCA 回路からバリンなどのアミノ酸を合成する経路は非 Sc 優勢となっており、ピルビン酸を中心とする代謝経路上の分岐点における違いを本手法によって明らかにすることができた。このよう

に、機能カテゴリ分類では複数のカテゴリにまたがるなどの理由によって抽出しにくいような経路を、本手法により抽出できることが示された (Fig. 4.10)。

また、KEGGにおける部分的な経路図に分割された表記法 (Fig. 4.1 に例示) を用いた場合には複数の経路図を確認しなければならないような経路についても、本手法によってスクリーニングすることができた。たとえばピルビン酸を中心とする代謝分子や代謝反応は、TCA 回路、発酵経路、アミノ酸合成経路といった多数の経路図上に点在している。また、このような多数の代謝反応に関与するような代謝分子はピルビン酸以外にも多く存在する。このような、解析対象が経路図をまたがるような場合においても、本提案手法を用いることでスクリーニングが可能であることが示された。

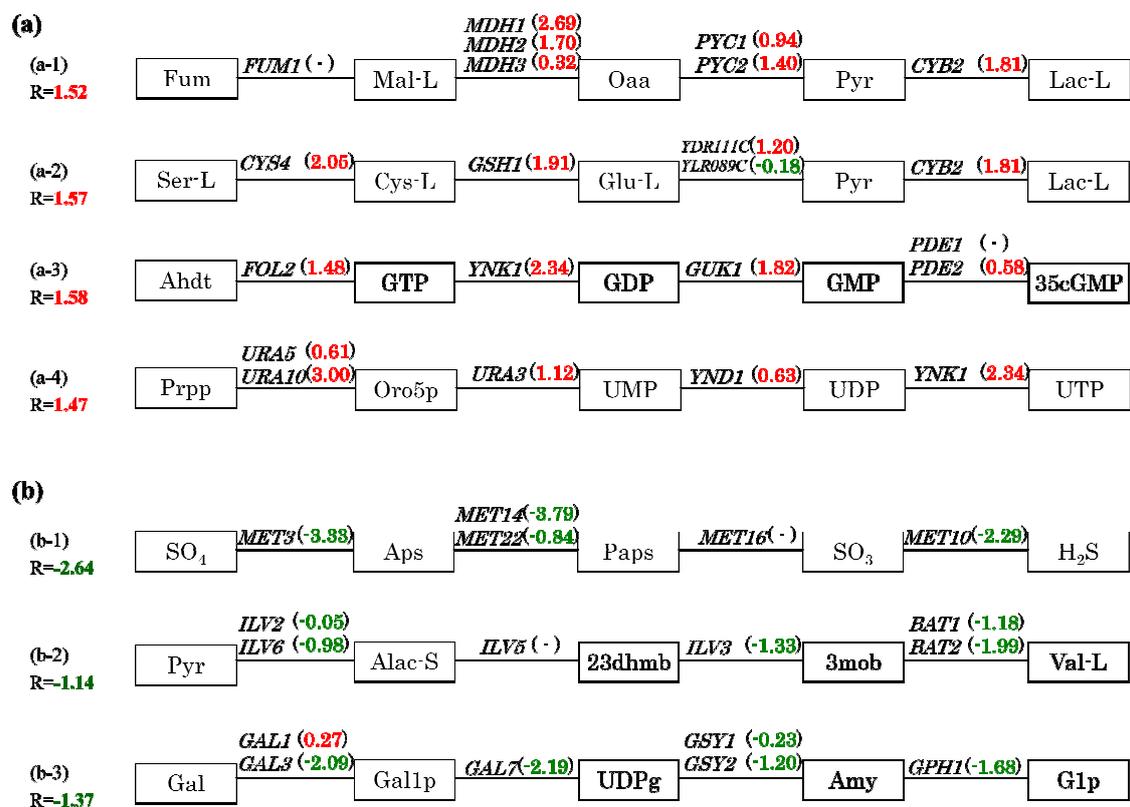


Fig. 4.9. 代謝ネットワーク構造に着目した解析により得た部分ネットワークのうち、ラガービール酵母のビール醸造に関与する性質と対応するものの一例。四角囲みは代謝分子、実線は代謝反応を示す。四角囲み中の文字は代謝分子名（略語については Appendix-Table 1 に記した）、代謝反応上の文字は反応に関与する遺伝子名、括弧内の数字は遺伝子の発現比を底が 2 の対数に変換したものを表す。(a)Sc 優勢である遺伝子を多く含む部分ネットワークの例。(b)非 Sc 優勢である遺伝子を多く含む部分ネットワークの例。 R は各部分ネットワークの代表値を示す。

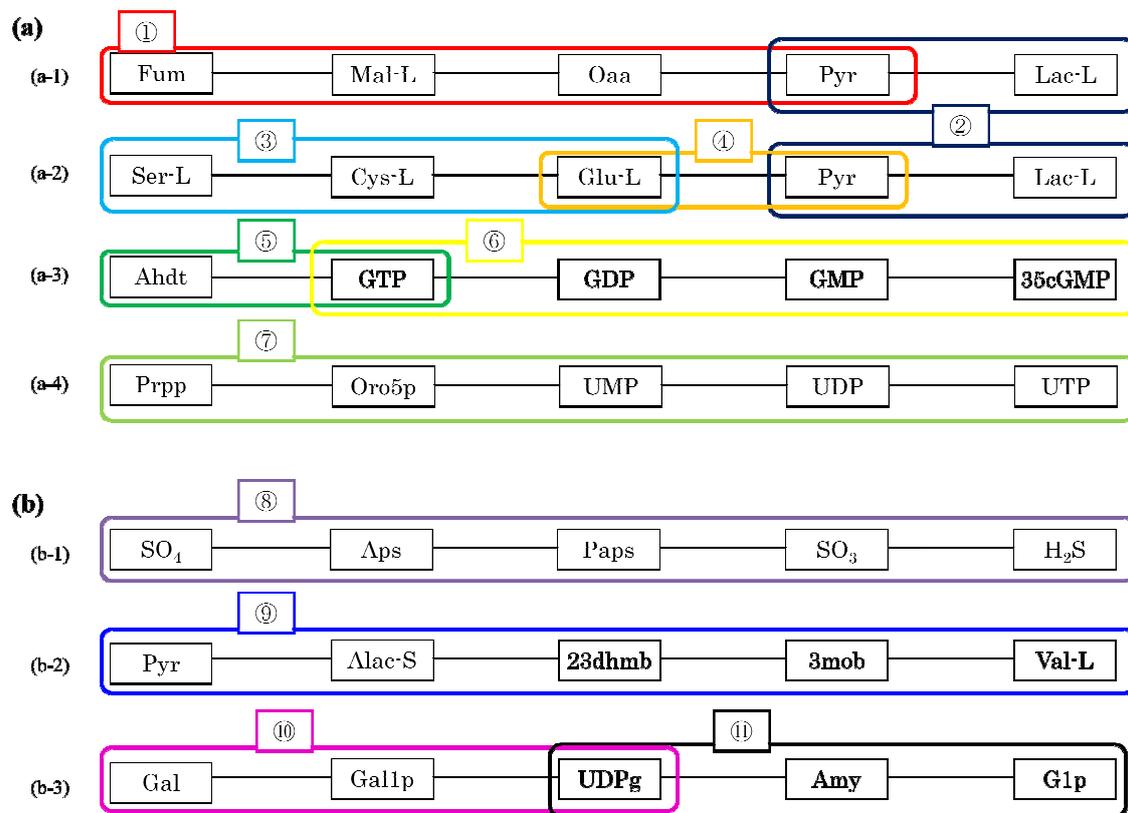


Fig. 4.10. Fig. 4.9 で示した部分ネットワークに含まれる代謝分子および代謝反応が、KEGG のどの代謝マップ上に存在するかを示した。それぞれの色の囲みは、該当する代謝分子と代謝反応がその代謝マップ上に存在することを示す。KEGG における代謝マップの名称を以下に示す。

- ① TCA cycle
- ② Pyruvate metabolism
- ③ Glutathione metabolism
- ④ Alanine, aspartate and glutamate metabolism
- ⑤ Folate biosynthesis
- ⑥ Purine metabolism
- ⑦ Pyrimidine metabolism
- ⑧ Sulfur metabolism
- ⑨ Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
- ⑩ Galactose metabolism
- ⑪ Starch and sucrose metabolism

4.4 考察

本章では、ラガービール酵母が有する重複遺伝子についての遺伝子発現解析を行い、重複遺伝子のうちのいずれが、ビール醸造において重要な表現型に対して寄与しているかを明らかにした。4.3.2 では遺伝子の機能分類による解析を行い、4.3.3 では代謝ネットワーク構造に着目した部分ネットワークのスクリーニングを行い、両者とも、ビール醸造に深く関与する表現型（硫黄代謝や香気成分の生成など）に関与する遺伝子群をスクリーニングできていた。代謝ネットワーク構造に着目した解析からは、遺伝子名にとどまらず代謝経路の名称についての情報が得られ、これに基づいて代謝経路上の分岐点の周囲などについて、代謝経路という観点における詳細な解析が可能であることが示された。

一方で、遺伝子の機能分類による手法は、対象とする遺伝子は代謝反応に関係する遺伝子にとどまらないという利点を有する。実際に4.3.2 では”chemical agent resistance”など、代謝反応には関与しないものの、重要であると考えられる機能をスクリーニングすることができている。このように、遺伝子の機能分類を用いた手法と代謝ネットワーク構造に着目した遺伝子のスクリーニング手法とは異なる長所を有していると言えることから、目的に応じて使い分けることが重要である。

Appendix-Table 2,3 に、スクリーニングした部分ネットワークの一覧を示しているが、この中には同一の代謝分子が非常に多くの部分ネットワーク上に登場する例がある。このような代謝分子は、多くの代謝反応によるリンクを有していることに起因して、スクリーニングされる頻度が高くなっているものと考えられる。このような多数のリンクを有する代謝物質を含む部分ネットワークによって、少数のリンクしか持たないような代謝経路がスクリーニングされづらいということが予想される。このような問題のために、スクリーニングする部分ネットワークの個数を大小さまざまに変化させる、得られた部分ネットワークのうち構成成分の大半が同じようなものは統合する、などの工夫が必要な場合があると考えられるので、留意が必要である。

本章では、ラガービール酵母の重複遺伝子の発現量比を代謝反応に対する重みとして用いたが、重みには任意の統計量を用いることができるため、目的に応じて与える重みを変えることも可能である。たとえば複数のマイクロアレイデータを比較し、その差異が大きな経路をスクリーニングしたい場合はマイクロアレイ間の遺伝子発現比を算出して重みとすればよいし、比較対象とするデータ数が多くなった場合には、遺伝子発現パターンの相関係数などを重みにすることも可能である。さらに、代謝反応に関連付けられるデータであれば、マイクロアレイ実験に由来するもの以外であってもかまわない。

本章で行ったマイクロアレイデータ解析の結果は、ラガービール酵母の育種のための基盤となる情報を与えるものと考えられる。たとえば、ラガービール酵母の表現型を変化させるために、ある遺伝子や機能を対象として遺伝子改変を行う際に、重複遺伝子の

うちのいずれをターゲットとすべきかという問題が生じる。この際に、重複遺伝子のいずれが、対象としている機能に対して大きく寄与しているかという情報によって、ターゲットを選択することが可能であると考えられる。具体的には、ビールに含まれる成分の生成量を変化させるために、ラガービール酵母のある遺伝子や遺伝子群をターゲットとして育種を行いたいという場面が想定される。こうした育種は実際に、亜硫酸の生産 (Yoshida *et al.*, 2008) や発泡酒における香気成分 (Kobayashi *et al.*, 2008) などをターゲットとして行われており、本研究によって得た知見は、こうした育種に応用することが可能である。

4.5 結言

本章では、代謝ネットワーク構造に着目した遺伝子のスクリーニング手法の構築と、その有効性の確認を行った。データベース KEGG を用い、代謝分子と代謝反応からなる代謝ネットワークを構築し、連続した代謝分子と代謝反応を含む部分ネットワークを考えることによるスクリーニング手法を開発した。この手法を、ラガービール醸造に用いられるラガービール酵母のマイクロアレイデータに供したところ、遺伝子の機能分類による手法よりも、代謝経路という観点において詳細な情報を取得することが可能であることを示すことができた。この解析により、たとえば分岐点を有するような代謝経路の周囲がどのようになっているか、などを明らかにすることが可能であると考えられる。

本提案手法はまた、KEGG の既存の部分代謝 MAP (Glycolysis など) に注目して視覚的に解析を行うような手法と比べると、全ての可能な部分ネットワークを対象としたスクリーニングが可能であるという網羅性という点や、複数の代謝経路図をまたがるような場合も解析が可能である点、代表値として中央値や平均値といった統計量を用い、その値によってスクリーニングするという定量性という点において優れているといえる。

本章で行ったラガービール酵母のマイクロアレイ解析は、ラガービール酵母の育種を行う際の基盤となる知見をもたらした。たとえば遺伝子操作を行う際に、重複遺伝子のどちらをターゲットとすればよいかという問題について、本研究で行った遺伝子発現量の測定結果を元にして選択肢を得ることが可能である。

第5章 代謝ネットワークに着目したエタノール適応株の解析

5.1 緒言

第3章の親株およびエタノール適応株の遺伝子発現解析の結果、エタノールに対する適応は細胞内の代謝レベルの変化を伴うことが示唆された。KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) などの、遺伝子と代謝経路に関する情報を集積したデータベースを援用することで、DNA マイクロアレイ解析による遺伝子の発現量のデータから、細胞内の代謝の状態を推定するような情報を取得することが可能である。第4章において、代謝ネットワークに着目して遺伝子発現量が上昇または低下しているような代謝経路を、網羅的かつ定量的にスクリーニングする手法を構築した。

本章では、この手法を大腸菌エタノールストレス適応株および親株についての遺伝子発現データに供することで、エタノールに対する応答、および適応によって生じた代謝レベルの変化を明らかにすることを目指した。第3章における主成分分析の結果、大腸菌のエタノールストレスに対する応答を表現すると考えられる主成分 (PC1) および長期培養実験における適応過程を表現すると考えられる主成分 (PC2) を得ることに成功している。そこで、これらの主成分に対する各遺伝子の負荷量 (loadings) を代謝反応の重みとして用い、その値が大きいような代謝経路や小さいような代謝経路をスクリーニングした。こうした解析により、エタノールストレスに対して発現量が上昇する経路や低下する経路、またはエタノール適応株において親株よりも発現量が上昇または低下する経路をスクリーニングすることが可能である。

5.2 実験材料・方法

5.2.1 使用した遺伝子発現データ

本章で用いる遺伝子発現データは、3章で測定した大腸菌親株および適応株6株についての、エタノール非存在下および存在下(5%)におけるマイクロアレイ実験の結果を使用した。

5.2.2 代謝ネットワークの構築

代謝ネットワーク解析に用いた代謝分子、代謝反応、代謝反応-酵素反応-遺伝子の対応関係はKEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)を用いて構築した。代謝分子751個、代謝反応1185個からなる代謝ネットワークを構築した。

5.2.3 代謝ネットワーク構造に基づくスクリーニングのアルゴリズム

代謝反応によって連結された、連続する5つの代謝分子に着目し、これを部分ネットワークと呼ぶ。部分ネットワークに含まれる全ての遺伝子が持つ重みの平均値を、この部分ネットワークの代表値とする。代表値を算出する際、部分ネットワークに含まれる4つの代謝反応のうち1か所までは、遺伝子発現データが定量限界以下などにより得られなかったとしても、その間の代謝反応は連結されているとして扱い、部分ネットワークの代表値は残りの遺伝子のデータから算出した。すべての可能な部分ネットワークについての代表値を算出し、代表値が高いものや低いものをスクリーニングすることで、重みの値が高い(または低い)ような遺伝子を含む部分ネットワークをスクリーニングすることができる。本研究で構築した代謝ネットワークには、合計で587,687個の部分ネットワークが存在した。こうした部分ネットワークから、重みの値が高い(または低い)ような部分ネットワークをスクリーニングする際には、部分ネットワーク同士の重複があった場合(ある2つの代謝物質が、複数の異なる酵素反応によって連結されていた場合など)、それらをまとめて表記した。

本章ではエタノールに対する応答、および適応によって生じた代謝レベルの変化を明らかにするために、遺伝子の重みとして、第3章において実施した主成分分析により得た、第一主成分(PC1)、および第二主成分(PC2)に対する各遺伝子の因子負荷量(loadings)を用いた。

5.3 結果

5.3.1 大腸菌親株および適応株における遺伝子発現データの代謝ネットワーク構造に着目した解析

代謝分子、代謝反応、代謝反応と酵素および遺伝子との対応関係を KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) より取得し、代謝分子 751 個、代謝反応 1185 個からなる大腸菌の代謝ネットワークを構築した。この代謝ネットワークについて、連続する代謝物質 5 つ、代謝反応 4 つを含む部分ネットワークを全ての可能な組み合わせ (総数 587,687 個) について作成した。ネットワークの重みとして、第 3 章において行った主成分分析の結果を用い、PC1 (エタノールストレスに対する応答に対応) および PC2 (親株と適応株の差に対応) に対する主成分負荷量 (loadings) を各遺伝子についての重みとして与え、それぞれの部分ネットワークについての代表値を算出した。

第 4 章において行った解析とは異なり、本章においては主成分負荷量を解析に用いている。このような解析が可能であるかを検証するために、全ての部分ネットワークについての分布がどのようになるかを Fig. 5.1 に示した。また、このような部分ネットワークの中から、代表値が高いものおよび低いものを 40 個ずつスクリーニングした。Fig. 5.2 に、スクリーニングした部分ネットワークに含まれる各代謝反応の重み (主成分負荷量の値) を示す。本章は第 4 章とは異なり、この重みの値は 7 株 (親株と進化株 6 株) 2 条件 (エタノール存在下および非存在下) の情報を縮約して得られたものである。そこで、このスクリーニングによって本当に遺伝子発現比が高いような遺伝子をスクリーニングできたかどうかを確認するため、スクリーニングした部分ネットワークに含まれる、全ての株の遺伝子発現比 (エタノール非存在下に対するエタノール存在下の割合) を Fig. 5.3 に示した。図より、代表値の大きなもの (Fig. 5.2 赤線) には遺伝子発現比が高いもの (Fig. 5.3 赤線) が確かに多く含まれ、代表値の小さなものについても同様に、代表値が小さなものは遺伝子発現比も低いということが確認できた。

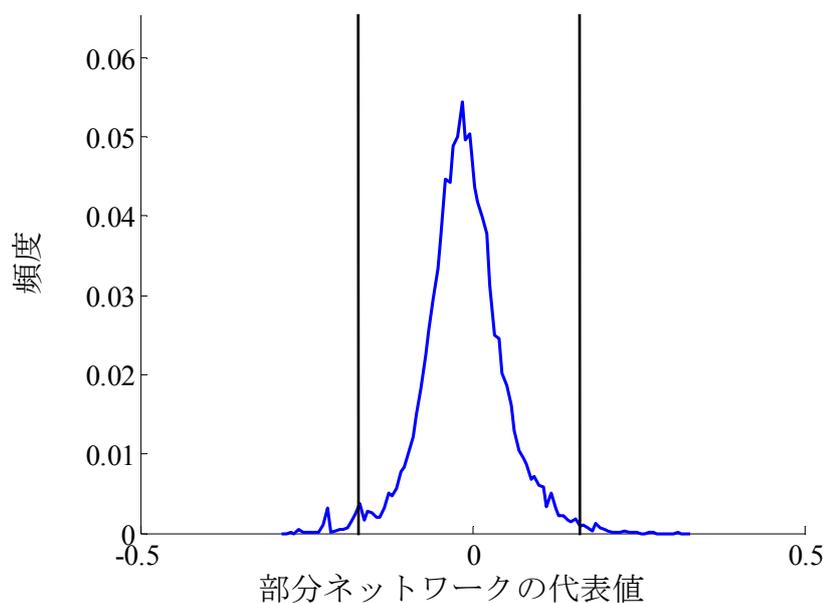


Fig. 5.1. 大腸菌の代謝ネットワーク上の全ての可能な部分ネットワークについて、主成分 1 に対する主成分負荷量の値を重みとして用いて算出された代表値の分布。黒線は代表値の大きさ上位 40 個および下位 40 個をスクリーニングした際の閾値を示す。

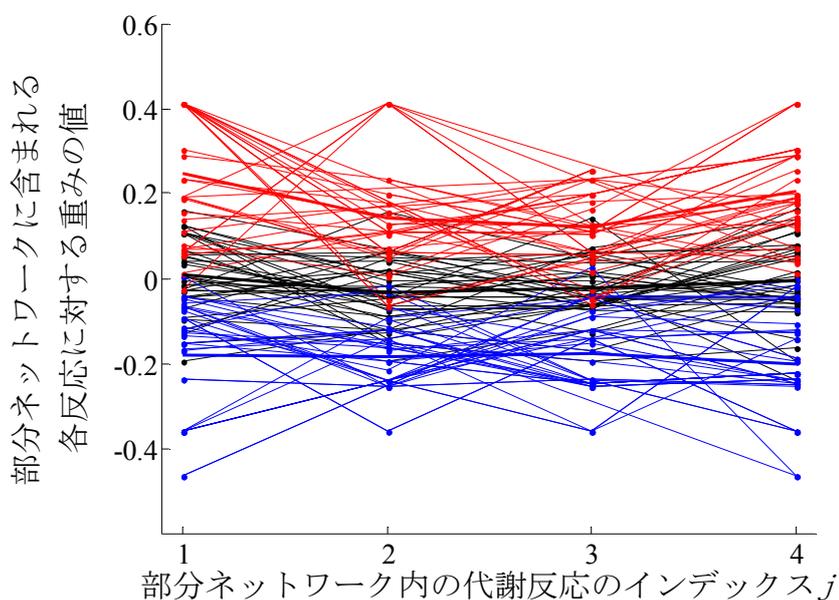


Fig. 5.2. Fig. 5.1 においてスクリーニングした、代表値が大きい部分ネットワーク上位 40 個 (赤) または小さい下位 40 個 (青)、およびそれ以外の範囲からランダムに選択した 40 個 (黒) に含まれる各代謝反応の重みの値について、各部分ネットワークに含まれる代謝反応のデータ ($w(i, j)$ の $j=1,2,3,4$) を線で連結して示した。太線はそれぞれの平均値を示す。

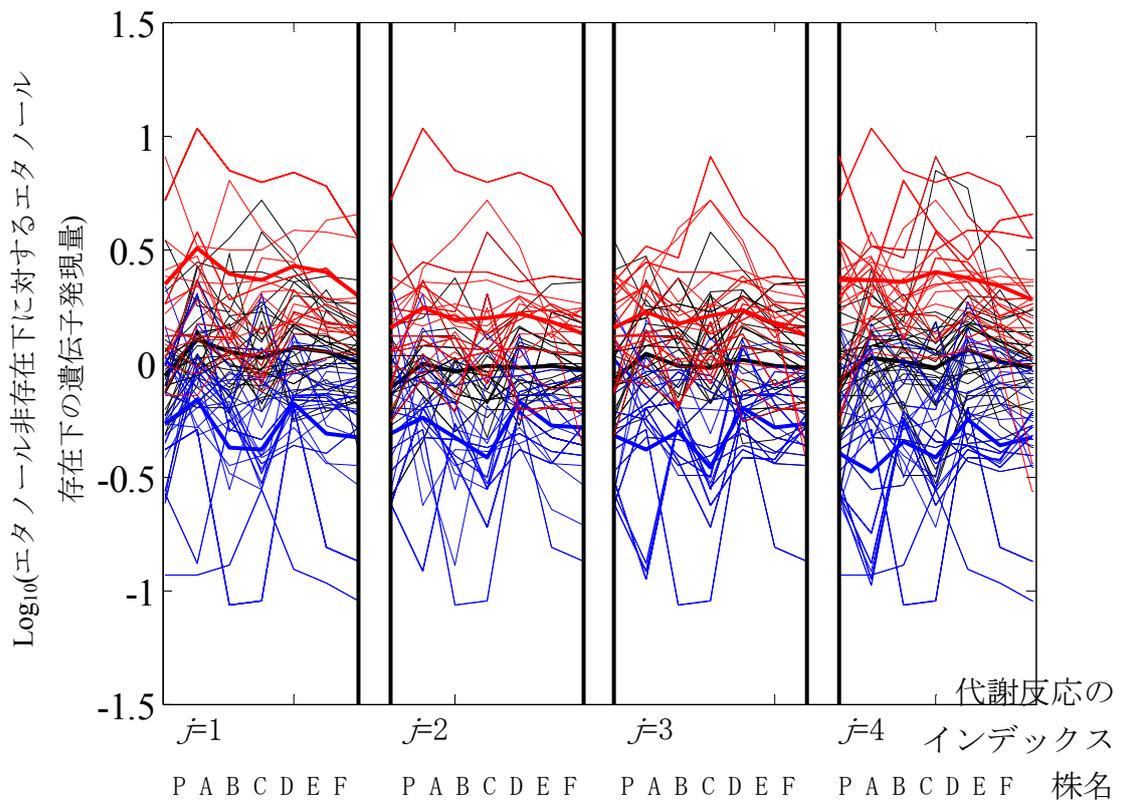


Fig. 5.3. Fig. 5.2 に示した代表値が大きい部分ネットワーク 40 個 (赤) または小さい 40 個 (青)、およびそれ以外の 40 個 (黒) に含まれる各代謝反応について、遺伝子発現比 (エタノール非存在下に対するエタノール存在下) を全ての株について示した。太線はそれぞれのデータについての平均値を示している。

5.3.2 エタノールストレスの有無によって発現量に変化した代謝経路

主成分1に対する負荷量を重みとして用いた際にスクリーニングできた部分ネットワークを Appendix Table 4,5 に示す。これらのうち代表的なものを Table 5.1 に示す。エタノールストレスによって発現量が上昇した部分ネットワークのうち特筆すべきものとして、ペントースリン酸経路から核酸合成に至る経路（上から1つ目）および、ホスホエノールピルビン酸からリン酸転移反応と共役することによる核酸の修飾反応に関わる遺伝子と代謝分子がスクリーニングできた。これらの遺伝子や代謝経路は、第3章において行った機能分類によるスクリーニングによっては得られなかったものである。その理由として考えられるのは、核酸合成に関与する機能カテゴリは比較的多くの遺伝子（数十以上）を含んでいるため、それらの一部分のみがエタノールストレスによって活性化するような場合には統計検定によって有意とならないということが考えられる。また、ピルビン酸を中心とする TCA 回路上の分子や、ピルビン酸を前駆体とする有機酸の生成に関わる遺伝子と代謝反応がスクリーニングできた。

エタノールストレスによって発現量が低下した部分ネットワークとしては、ヒスチジンやアルギニンなどのアミノ酸の合成経路がスクリーニングできた。こうしたアミノ酸の合成経路は第3章において行った機能分類によるスクリーニングによって発見されたものと同一のものである。Table 5.1 からはこれに加え、ヒスチジンやアルギニンの合成経路を含む部分ネットワークには、グルタミン酸によるアミノ基転移反応が含まれていることが明らかとなった。グルタミン酸はさまざまなアミノ酸の合成の際にアミノ基の供与体として働くことが知られているが（Marcus and Halpern, 1969; Gelfand and Steinberg, 1977）、その中でもとりわけヒスチジンとアルギニン合成に関与するものがエタノールストレスによって発現量が低下するということが本結果から明らかとなった。

5.3.3 親株とエタノール適応株とで発現量に変化した代謝経路

主成分2に対する負荷量を重みとして用いた際にスクリーニングできた部分ネットワークを Appendix Table 6,7 に示す。これらのうち代表的なものを Table 5.2 に示す。親株に対してエタノール適応株において発現量が上昇した部分ネットワークには、分枝アミノ酸（バリン、ロイシンなど）やトリプトファンの合成に関与するものが多くふくまれていた。これらのアミノ酸は、第3章において行った機能分類によるスクリーニングにおいても発見されたものである。またコリスミ酸を前駆体とするエンテロバクチンの合成経路がスクリーニングされた。エンテロバクチンは細胞外の鉄イオンを効率よく取り込むためのキレート剤として細胞外に分泌される分子であり（Braun V. and Braun M., 2002）、機能分類によるスクリーニングにおいても鉄輸送に関与する遺伝子群としてスクリーニングされている。Table 5.2 からは、これら分枝アミノ酸、トリプトファン、エ

ンテロバクチンのいずれもがピルビン酸を起点として合成されることが明らかとなった。

親株に対してエタノール適応株において発現量が低下した部分ネットワークには、ピルビン酸を出発点とする TCA 回路上の代謝分子や、有機酸の合成経路がスクリーニングされた。これらの遺伝子群は機能分類によるスクリーニングでは得られなかった。また、リポポリサッカライドとその原料となる糖類を含む遺伝子群についても、適応株において発現量が低下していた。リポポリサッカライド合成に関する機能カテゴリおよび関連遺伝子 (*rfa* 遺伝子) は、第 3 章で行った解析においても得られたものであるが、その前駆体である糖類の代謝に関わる遺伝子も適応株において発現量を低下させていたことに関しては、本章の解析によって新たに発見した知見である。

5.4 考察

本章ではエタノールに対する応答、および適応によって生じた代謝レベルの変化を明らかにするために、遺伝子の重みとして、第3章において実施した主成分分析により得た、第一主成分(PC1)、および第二主成分(PC2)に対する各遺伝子の因子負荷量(loadings)を用い、因子負荷量の値が大きな、または小さな遺伝子を多く含むような部分ネットワークをスクリーニングした。

エタノールストレスによって発現量が上昇する遺伝子が多く含まれていた代謝経路として、ペントースリン酸経路から核酸に至る合成経路をスクリーニング新規にスクリーニングすることに成功した。しかしながら、エタノールストレスや他のアルコールストレス、その他の環境条件（高温、高浸透圧など）によるストレスを題材とした関連研究において、こうした遺伝子群の発現が誘導されるという報告は現在までのところ存在しない。しかしながら最近の研究で、大腸菌において増殖フェーズによって核酸の細胞内プール量が増加するという報告がなされており（Buckstein *et al.*, 2008）、ストレスによってもこのような核酸の細胞内プール量の変化という現象が起こることはあり得る。本結果はエタノールストレスに対する細胞の応答として、何らかの理由で核酸合成を活性化させている可能性があることを示唆している。また、スクリーニングした核酸合成経路を含む部分ネットワークは *nrdA*, *nrdD* という遺伝子を含んでいた（Table 5.1 の上から3つ目の部分ネットワーク）。これらの遺伝子はチオレドキシンの酸化還元反応と共役し、核酸合成反応を行う遺伝子である。チオレドキシンは低分子量の酸化還元タンパク質であり、酸化ストレスによって生じるフリーラジカルの補足などの役割を有することが知られている（Carmel-Harel and Storz, 2000）。そのため、合成された核酸ではなく、チオレドキシンの共役して核酸を合成する反応を行うことそのものが、エタノールストレスに関与している可能性がある。また、ピルビン酸を中心とする TCA 回路上の分子や、ピルビン酸を前駆体とする有機酸の生成に関わる遺伝子が、エタノールストレスによって発現量を上昇させることが明らかとなった。第3章においても議論したように、イソブタノールストレスによって電子伝達系の機能が阻害されること（Brynildsen and Liao, 2009）、また電子伝達系の機能を阻害すると、中枢代謝経路の状態が大幅に変化し、乳酸生産などの嫌気発酵を行うようになる（Vasilij *et al.*, 2010）ということが報告されている。本章の結果とこれらの関連研究を合わせて考えると、イソブタノールストレスの場合と同様に、エタノールストレスによっても電子伝達系の阻害が引き起こされ、上述した遺伝子群の発現変化は、これに付随して生じたものである可能性がある。

親株と比して適応株において発現量が上昇していたような経路において、分枝アミノ酸、トリプトファン、エンテロバクチンの合成に関与する遺伝子の発現量が上昇していることが明らかとなった、これらはいずれもピルビン酸を前駆体として合成されるものである。一方で、適応株において発現量が低下していたような経路として、ピルビン酸

を含む有機酸の合成経路がスクリーニングされた。これらのことから、適応株においては分枝アミノ酸などの物質の合成を活性化させると同時に、有機酸の合成を抑制するという代謝変化が生じている可能性がある。このような、競合する経路の不活性化を伴うような代謝状態の変化が、エタノールストレスに対する適応の過程でどのようにして実現され得るのかは明らかではないものの、この結果は、そのような代謝状態の合理的な再編成の存在を示唆するものである。

5.5 結言

本章では、代謝分子、代謝反応、代謝反応と酵素および遺伝子との対応関係を、データベース KEGG より取得し、代謝分子 751 個、代謝反応 1185 個からなる大腸菌の代謝ネットワークを構築することにより、大腸菌親株および適応株における遺伝子発現データの代謝ネットワーク構造に着目した解析を行った。この際、遺伝子の重みとして、第 3 章において実施した主成分分析により得た、エタノールストレスに対する応答と考えられる第一主成分 (PC1)、および適応による遺伝子発現の変化と考えられる第二主成分 (PC2) に対する各遺伝子の因子負荷量(loadings)を用いることで、エタノールに対する応答、および適応によって生じた代謝レベルの変化を明らかにすることを試みた。その結果、第 3 章で行った機能分類による手法では得られなかったような知見を新たに得ることができた。たとえば、エタノールストレスによる核酸合成の活性化、電子伝達系の機能阻害による代謝状態の変化などを示唆するような結果が得られた。また親株と適応株の比較により、適応株はアミノ酸の合成を活性化させると同時に、競合する経路である有機酸の合成を不活性化することで、アミノ酸の合成に注力している可能性があるということが遺伝子発現レベルで示唆された。

第6章 結論

6.1 結果のまとめ

本研究では、進化工学の1手法である長期植え継ぎ系を用いて、エタノールストレス耐性株の取得と、網羅的手法を用いたその株と親株との比較により、エタノールストレス耐性に関する情報や、エタノールストレス耐性株を育種するための情報を得るために、研究を行った。物質生産にも広く使用されているモデル生物である大腸菌を用い、試験管による長期植え継ぎ培養系によってエタノールストレスに対して大腸菌を適応させることによりストレス適応株を取得し、親株および適応株の解析を行った。本論文で述べた結果を以下で簡単にまとめる。

第2章では、エタノールストレス環境下における長期植え継ぎ培養と、エタノール適応株の取得について述べた。これらの株は、親株は生育することができないような濃度のエタノール条件下においても増殖することができた。また、これらの株をストレス非存在下において長期間培養しても、エタノールストレス環境下における高い比増殖速度を失わないということが明らかとなった。

第3章では、上述のようにして得た適応株6株と親株の、エタノール非存在下および存在下における遺伝子発現解析について述べた。これらの遺伝子発現データセットを主成分分析に供することにより、ストレスの有無による発現量の相違や、エタノールに対する適応による発現量の変化を切り分けることができた。このような主成分に対して大きく寄与する遺伝子をスクリーニングし、それらにどのような遺伝子機能を持つものが多く含まれているかを、遺伝子機能データベースを援用して解析した。得られた結果の一例として、エタノール適応株は親株と比較し、トリプトファン合成、ヒスチジン合成、分枝アミノ酸合成、鉄イオン輸送に関する遺伝子群の発現量が上昇していたことが明らかとなった。また、これらのアミノ酸を培地中への添加は、親株のストレス存在下においてのみ比増殖速度を上昇させたことから、これらのアミノ酸はエタノールストレス耐性に関与することが明らかとなった。また鉄イオン輸送に関する遺伝子群の発現量の変化などから、エタノールストレスに対する応答や長期培養実験の過程において、酸化還元バランスの変化に起因する代謝レベルの変化が生じていることが示唆された。

第4章では、代謝経路についてのデータベースの利用による代謝ネットワーク構造に着目した遺伝子のスクリーニング手法の構築について述べた。これにより、遺伝子発現量に変化しているような遺伝子が集中しているような代謝経路を網羅的かつ定量的にスクリーニングすることが可能となった。この手法によって、遺伝子機能分類による手法よりも、代謝経路に関する情報を高解像度で取得できることが、ラガービール醸造に用いられるラガービール酵母のマイクロアレイデータの解析により明らかとなった。

第5章では、第4章で構築した代謝ネットワーク構造に着目した手法を用いた解析による、エタノールストレスに対する応答および長期培養実験の過程で生じた代謝レベルでの変化について述べた。解析により、ピルビン酸を中心とする TCA 回路近傍の代謝反応に関わる遺伝子の発現量が、エタノールストレスの有無や、適応株と親株の比較において変化していることが明らかとなった。この結果は、第3章において推察されたような細胞内酸化還元状態の変化と対応するものであり、エタノールストレスが引き起こした現象が代謝状態の変化という観点から明らかになった。また、エタノール適応株はアミノ酸などの物質の合成を活性化させるとともに、競合する経路である有機酸の合成を不活性化させていることが遺伝子発現のレベルで示唆された。

以上の研究結果を踏まえ、本研究によって得た結果が、エタノールストレスに対する応答や耐性付与に関してどのように寄与することができるかを述べる。また、実用的エタノール生産に対してどのように寄与することができるかを述べる。さらに、本研究で為し得なかった点、本研究を今後どのように発展させることが可能かなどをまとめ、今後の展望として述べた。

6.2 エタノールストレスへの応答や耐性付与、エタノール生産に対する本研究の寄与

本研究は、進化工学的手法と網羅的発現解析を組み合わせることにより、大腸菌のエタノール耐性に関与する情報を取得することを試みた。大腸菌だけでなく酵母など他の微生物種においても、本研究以外にも、エタノール耐性を題材とした研究はなされているが、エタノールに対する耐性の詳細な分子機構の解明には至っていない。エタノール以外のストレスについては、たとえば大腸菌の酸に対する応答についての研究は進んでおり、どういった分子機構により大腸菌が酸ストレスに対して応答するか、その分子機構はどのような遺伝子などの構成要素により制御されているかが明らかにされている

(Richard and Foster, 2004)。任意の菌株に対して確実にエタノール耐性を付与したり、より高い耐性を付与させるためにも、エタノール耐性メカニズムの理解は重要な課題であると言える。現在までその解明に至っていないことの原因として考えられるのは、エタノールストレスが細胞に対して多面的な影響を及ぼすからであると考えられる。エタノールは両親媒性分子であるため、疎水部が細胞膜（真核生物の場合はこれに加え細胞内マトリクスと細胞質とを隔てる膜）に溶け込むことで膜の透過性を変化させ、膜内外の物質の濃度勾配に対して攪乱を与える。加えてエタノールは、細胞内のタンパク質の分子内相互作用に影響を及ぼし、その活性を変化させたり変性させる。これにより物質の代謝や輸送、シグナル伝達など様々なレベルの攪乱が生じる (Chung *et al.*, 2006)。このような多面的な影響に対しては、応答機構もまた多面的になり得ると考えられる。

エタノールではないものの、同じアルコールである *n*-ブタノールを題材とした研究では、*n*-ブタノールによって様々な様相の応答が観察されることが明らかにされている。たとえば熱ショック応答によって引き起こされる遺伝子群や、酸化ストレス応答に関与する遺伝子群、膜ストレスに関与する遺伝子群などが *n*-ブタノールによって活性化する (Rutherford *et al.*, 2010)。

このように、エタノールストレスは大腸菌に多面的な影響を及ぼし、耐性を付与するための方策もまた、多面的なものである可能性がある。本研究で行った遺伝子発現解析は、エタノールによって引き起こされる応答、およびエタノールに対して耐性を有するために必要な要素の両面について、関連すると思われる構成要素を網羅的にスクリーニングすることに成功した。たとえば本研究では第3章の結果により、いくつかのアミノ酸の合成に関わる遺伝子の適応株における活性化、および、これらのアミノ酸の添加によるエタノール存在下における比増殖速度の上昇が明らかとなり、これらのアミノ酸がエタノールストレス耐性と関与することが示唆された。しかしながら、これらのアミノ酸がどのような理由によりエタノール耐性を付与するかは依然として不明である。たとえば、これらのアミノ酸そのものがエタノール耐性に関与するのか、これらのアミノ酸を前駆体として生成される物質に関与するのかは不明である。しかしながら、アミノ酸をはじめとする低分子化合物が細胞内に蓄積されることでストレス耐性が付与されるという報告は存在する。たとえば大腸菌において、浸透圧ストレスに対して細胞内外の浸透圧の差を緩和するために、ある種のアミノ酸などの低分子化合物を細胞内に貯蔵することが効果的である (Wood, 1988; Lucht and Bremer, 1994) ことが知られていたり、環状構造を有するアミノ酸またはその類似化合物が、細胞内のフリーラジカルに対する抗酸化剤として機能するといった例 (Simic *et al.*, 1989; Reiter *et al.*, 1999) が報告されている。いずれにせよ、本研究によって見出したアミノ酸を対象としてさらなる研究を行うことで、耐性機構が明らかとなれば、それを他の菌株などに応用したり、それをさらに改善する、といった育種の手がかりを得ることができるようになると考えられる。

また、上述のようなアミノ酸以外についても、本研究の実施により、エタノールストレスとの関係性が示唆された。たとえば第5章において見出した核酸合成や中央代謝経路の変化、および第3章において得た多数の機能カテゴリなどがそうである。もちろん、これらの物質や機能が実際にエタノールストレスに関与しているかどうか、といった点の検証が必要である。しかしながら本研究では、エタノールストレスに関与する可能性がある候補として、これらの物質や機能を抽出することができたと言える。今後行われる、ストレスなどを題材とした研究により、こうした物質や機能がスクリーニングされることがあった場合、こうした物質や機能がストレスに関与するという公算がより大きくなると言える。

このように、本研究で得た知見を基盤とし、さらに詳細な研究が行われることで、エタノール耐性の分子生物学的な機構についての理解へと至ることができると考えられ

る。一方で、微生物によるエタノール生産は既に実用レベルで行われている。こうした、すでに実施されているエタノール生産に対して、本研究によって得た成果がどのように寄与するのかを述べる。

エタノール存在下における比増殖速度の上昇は、培養期間短縮によるコスト低下に貢献すると考えられる。高濃度エタノールにおける増殖能は、粗培養液の終エタノール濃度（収量）を上昇させ、精製のコストも低下させる。これらが実際のプラントでどの程度のコスト減をもたらすかは、プラントの規模や各種条件に依るので精査することは難しい。しかし本研究で得たエタノール耐性菌の耐性レベルは、実用的にも用いられるエタノール耐性大腸菌（Yomano *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 2008; 特表 2010-500026.）に匹敵するものである。本研究で得たエタノール適応株の親株は野生型株であり、工業的に用いられるようなエタノール生産大腸菌株とは異なるため、本研究で得た株をそのまま工業的に用いることはできない。しかしながら、本研究によって得た知見（イソロイシンなどのアミノ酸合成がエタノール耐性をもたらす）、および本研究を今後さらに発展させて得られる新規知見を既存のエタノール耐性菌に適用することで、さらに耐性の高い菌を構築することができると考えられる。

エタノール生産においては、大腸菌ではなく、より優れたエタノール耐性を有する酵母が用いられる場合がある。しかしながら、野生型の酵母は五単糖を資化する能力を有していない。最近になって酵母に五単糖資化能を付与させるための研究がさかんに行われている（Jeffries and Shi, 1999; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Matsushika *et al.*, 2009）。一方で大腸菌は、この五単糖を資化する能力を有するという点はもとより、比増殖速度そのものが酵母よりも大きいという利点もあるため、酵母と大腸菌はそれぞれ、高いエタノール耐性と、高い比増殖速度という異なる長所を有するといえる。これらのことから実用的なエタノール生産の場ではしばしば、酵母と大腸菌など複数種の微生物の共培養によるエタノール生産が行われている（Taniguchi *et al.*, 1997; Qian *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 2008）。木質系バイオマス由来の原料は五単糖と六単糖の両方を含むため、このような酵母と大腸菌の共培養においては、大腸菌がまず五単糖を消費しつつ増殖し、五単糖が枯渇した後に酵母が優勢になるというものである。このようなことから、エタノール耐性という観点だけでは大腸菌は酵母よりも劣る点があるとはいえ、大腸菌のエタノール耐性研究にも大きな実用的価値があり、本研究、および本研究を基盤とするさらなる研究はその価値をさらに高めるような知見をもたらすと考えられる。

6.3 今後の展望

本研究では、マイクロアレイ技術を用いて適応株と親株の比較を行った。近年の技術の発展は、マイクロアレイ技術によるトランスクリプトーム以外にも、様々な階層を解析できるオミックス技術が数多く登場している。これらを適用することで、適応株に生じた表現型変化を、より詳細に解析することができ、エタノール耐性を獲得したメカニズムを理解することができるようになるのではないかと考えられる。たとえば、第5章の結果から、エタノール適応株はその代謝状態を合理的に変化させていることが遺伝子発現レベルで示唆された。近年になって細胞内代謝物質や、代謝反応の流量の測定技術が進歩しており (Tang *et al.*, 2009; Krone *et al.*, 2010)、これらの手法の適用により、適応株の代謝レベルで生じた変化をより詳細に解析できると考えられる。

次世代シーケンサーなど登場により、適応株の表現型にとどまらず、その遺伝型を全ゲノムレベルで解析できるようになってきた。これにより、長期適応実験において生じた変異を同定することができれば、その耐性獲得のメカニズムがたとえ不明のままであっても、実用株に対して耐性を付与させることが直接的に行える。また、同定した変異を1つずつ親株に導入し、その効果を解析することにより、適応株に生じた変化を解析することが可能であろう。また、本研究で用いた長期植え継ぎ培養系は、変異原を用いる変異育種と異なり自然変異率による長期の適応実験であるため、有用な変異が生じた時に、偶然同時に不要な変異または有害な変異が発生すると、それらも固定されるという頻度が低く、全ゲノム変異解析に供する際に、有効でない変異が入りにくいため、耐性をもたらす変異を同定しやすいという利点がある。

本研究で示した適応進化を利用した育種法は、さらなる発展が可能であるようにデザインされている。たとえば本研究では適応実験終了後 (2500 時間後) と親株の2点での比較を行ったが、長期培養実験中は1週間に2回の頻度で、培養中の菌株を冷凍保存しており、適応過程の解析を行うことで、さらなる情報を取得できる可能性がある。たとえば適応株が示した情報 (アミノ酸合成経路の遺伝子発現の上昇など) が、適応過程で徐々に起っているのであれば、耐性に関与する情報を取得するためには2500時間もの培養実験を行うまでもない、ということがわかる。すなわち、短～中期間の培養実験を行い、その発現解析の結果からアミノ酸合成経路の発現量の上昇が予測可能であれば、実験期間の短縮が可能であるということである。

また、本研究ではエタノール濃度を一定にして長期培養実験を行ったが、段階的にストレス物質の濃度を上昇させることで、より高いストレスに対して適応するような株を得ることが可能である。実際にそのようにして、濃度を徐々に上昇させていくような長期培養の実験系は、高温ストレス (Kishimoto *et al.*, 2010) やコハク酸 (Kwon *et al.*, 2010) などで成功しており、エタノールでも実現可能性が高いと思われる。

さらに、本研究で用いた長期培養実験による適応現象を利用した育種方法は、対象とする物質や生物種についても、エタノールや大腸菌に限定されないものである。適応現象は進化能という生物が一般的に有する能力を利用したものであり、大腸菌にとどまらず他の生物を用いることも可能である。たとえばエタノールストレスに対してより高い耐性を付与するために、実験室酵母を進化させるという試みが既に成功している (Dinh *et al.*, 2008; 2009)。また、エタノール以外の物質についても、最近では、より燃料としての化学的性質が優れたブタノールやプロパノールなどの高級アルコールが注目されつつある (Dürre, 2007; Yan and Liao, 2009)。しかし、このような高級アルコールは、エタノールよりも細胞毒性が高いことから、こうした物質に対する耐性菌の育種が期待されている。これらの物質に関する耐性の研究は、実験室株を用いてこうした物質を曝露したときの応答を解析するという研究が最近になって報告された段階であり (Brynildsen and Liao, 2009; Rutherford *et al.*, 2010)、途上であるといえる。本提案手法はこうした物質に対しても有効に機能すると考えられる。またイソブタノールストレスは電子伝達系の機能阻害を引き起こすことが示唆されている (Brynildsen and Liao, 2009; Vasiliy *et al.*, 2010)。本研究により、エタノールストレスにおいても同様に、電子伝達系の機能阻害を引き起こすことが示唆された。このことは、エタノールストレスに関する研究により得られた知見がイソブタノールストレスに対しても応用できる可能性があることを示しており、エタノールという低分子量のアルコールに関する研究と、より高分子量のアルコール種に関する研究との関連性、および両者の発展という新たな展開への足がかりとなるものである。

このように、生物の適応現象を基盤とした進化工学と網羅的手法を組み合わせることによる育種手法は、本研究が直接示した成果にとどまらず、さらに広範にわたって適用可能な強力なツールたり得ると考えられ、微生物を用いた物質生産に大きく貢献する可能性を秘めていると言える。

参考文献

- Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, Stephanopoulos G. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm.* 2008, **5**(2):167-190.
- Alexandre H, Rousseaux I, Charpentier C. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem.* 1994, **20** (Pt 2):173-183.
- Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, Blondin B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2001, **498**(1):98-103.
- Anderson IC, Rhodes M, Kator H. Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. *Appl Environ Microbiol.* 1979, **38**(6):1147-1152.
- Arakawa K, Kono N, Yamada Y, Mori H, Tomita M. KEGG-based pathway visualization tool for complex omics data. *In Silico Biol.* 2005, **5**(4):419-423.
- Barrell D, Dimmer E, Huntley RP, Binns D, O'Donovan C, Apweiler R. The GOA database in 2009--an integrated Gene Ontology Annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 2009, **37**(Database issue):D396-403.
- Bennett AF, Lenski RE. An experimental test of evolutionary trade-offs during temperature adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, **15**;104 Suppl. 1:8649-8654.
- Bennett ST, Barnes C, Cox A, Davies L, Brown C. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics.* 2005, **6**(4):373-382.
- Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Amoresano A, Carpentieri A, Pucci P, Defez R. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Arch Microbiol.* 2006, **185**:373-382.
- Blanchard JL, Wholey WY, Conlon EM, Pomposiello PJ. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS One.* 2007, **2**:e1186.

- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003, **19**(2):185-193.
- Boulton C, Quain D. Brewing Yeast. *Brewing yeast and Fermentation*, 2001, *4*:143-259.
- Braun V, Braun M. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 2002, **529**(1):78-85.
- Brisette JL, Russel M, Weiner L, Model P. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990, **87**(3):862-866.
- Brynildsen MP, Liao JC. An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*. 2009, **5**:277.
- Buchanan RL, Edelson SG. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J Food Prot*. 1999, **62**(3):211-8.
- Buckstein MH, He J, Rubin H. Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008, **190**(2):718-726.
- Carmel-Harel O, Storz G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol*. 2000, **54**:439-461.
- Charusanti P, Conrad TM, Knight EM, Venkataraman K, Fong NL, Xie B, Gao Y, Palsson BØ. Genetic Basis of Growth Adaptation of *Escherichia coli* after Deletion of *pgi*, a Major Metabolic Gene. *PLoS Genet*. 2010, **6**(11):e1001186.
- Chung HJ, Bang W, Drake MA. Stress response of *Escherichia coli*. *Comp Rev Food Sci Food Safety*. 2006, **5**:52-64.
- Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*. 1989, **5**(3):223-234.

Cooper VS, Lenski RE. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*. 2000, **407**(6805):736-739.

Costa V, Reis E, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1993, ;**300**(2):608-614.

Craig EA. The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem*. 1985, **18**(3):239-280.

Crumplen R, D'Amore T, Slaughter C, Stewart GG. Novel differences between ale and lager brewing yeasts. *Proc Congr Eur Brew Conv*. 1993, **24**:267–274.

Cui S, Meng J, Bhagwat AA. Availability of glutamate and arginine during acid challenge determines cell density-dependent survival phenotype of *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2001, **67**(10):4914-4918.

Cullum AJ, Bennett AF, Lenski RE. Evolutionary adaptation to temperature. IX. Preadaptation to novel stressful environments of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Evolution*. 2001, **55**(11):2194-2202.

Curtiss R III. Genetic manipulation of microorganisms: potential benefits and biohazards. *Annu Rev Microbiol*. 1976, **30**:507-533.

De Felice M, Levinthal M, Iaccarino M, Guardiola J. Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Rev*. 1979, **43**(1):42-58.

Diez-Gonzalez F, Karaibrahimoglu Y. Comparison of the glutamate-, arginine- and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*. 2004, **96**(6):1237-1244.

Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS One*. 2008, **3**(7):e2623.

Dinh TN, Nagahisa K, Yoshikawa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2009, **32**(5):681-688.

Dombek KM, Ingram LO. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol.* 1984, **157**(1):233-239.

Domka J, Lee J, Bansal T, Wood TK. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol.* 2007, **9**:332-346.

Droege M, Hill B. The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol.* 2008, **136**(1-2):3-10.

Dürre P. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol J.* 2007, **2**(12):1525-1534.

Fong SS, Joyce AR, Palsson BØ. Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states. *Genome Res.* 2005a, **15**(10):1365-1372.

Fong SS, Burgard AP, Herring CD, Knight EM, Blattner FR, Maranas CD, Palsson BØ. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnol Bioeng.* 2005b, **91**(5):643-648.

Gama-Castro S, Jiménez-Jacinto V, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Peñaloza-Spinola MI, Contreras-Moreira B, Segura-Salazar J, Muñoz-Rascado L, Martínez-Flores I, Salgado H, Bonavides-Martínez C, Abreu-Goodger C, Rodríguez-Penagos C, Miranda-Ríos J, Morett E, Merino E, Huerta AM, Treviño-Quintanilla L, Collado-Vides J. RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Res.* 2008, **36**:D120-124.

Gelfand DH, Steinberg RA. *Escherichia coli* mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases. *J Bacteriol.* 1977, **130**(1):429-440.

Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev.* 2007, **31**(5):535-569.

- Gots JS, Benson CE. Biochemical genetics of bacteria. *Annu Rev Genet.* 1974, **8**:79-101.
- Gregroy EM, Yost FJ Jr, Fridovich I. Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localization and functions. *J Bacteriol.* 1973, **115**(3):987-991.
- Gunasekera TS, Csonka LN, Paliy O. Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. *J Bacteriol.* 2008, **190**(10):3712-3720.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007, **108**:147-177.
- Han MJ, Lee SY. Proteome profiling and its use in metabolic and cellular engineering. *Proteomics.* 2003, **3**(12):2317-2324.
- Han MJ, Lee SY. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006, **70**(2):362-439.
- Herring CD, Raghunathan A, Honisch C, Patel T, Applebee MK, Joyce AR, Albert TJ, Blattner FR, van den Boom D, Cantor CR, Palsson BØ. Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. *Nat Genet.* 2006, **38**(12):1406-1412.
- Helling RB, Vargas CN, Adams J. Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. *Genetics.* 1987, **116**(3):349-358.
- Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J Biotechnol.* 2007, **131**:34-44.
- Hu CK, Bai FW, An LJ. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2005, **21**:809-813.
- Hua Q, Joyce AR, Palsson BØ, Fong SS. Metabolic characterization of *Escherichia coli* strains

adapted to growth on lactate. *Appl Environ Microbiol.* 2007, **73**(14):4639-4647.

Ibarra RU, Edwards JS, Palsson BO. *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature.* 2002, **420**(6912):186-189.

Ikeda M. Amino acid production processes, Edited by Faurie R. and Thommel J. *Adv Biochem Eng Biotechnol* vol.79. Microbial production of L-amino acids”, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2003, 1-35.

Ikeda M, Ohnishi J, Hayashi M, Mitsuhashi S. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006, **33**(7):610-615.

Ingram LO. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol.* 1976, **125**(2):670-678.

Ingram LO, Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl Environ Microbiol.* 1977, **33**:1233-1236.

Iwatani S, Yamada Y, Usuda Y. Metabolic flux analysis in biotechnology processes. *Biotechnol Lett.* 2008, **30**(5):791-799.

Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, Shanmugan KT, Ingram LO. Development of ethanologenic bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007, **108**:237-261.

Jeffries TW, Shi NQ. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1999, **65**:117-161.

Jozefczuk S, Klie S, Catchpole G, Szymanski J, Cuadros-Inostroza A, Steinhauser D, Selbig J, Willmitzer L. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2010, **6**:364.

Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000, **28**(1):27-30.

Kannan G, Wilks JC, Fitzgerald DM, Jones BD, Bondurant SS, Slonczewski JL. Rapid acid

treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery. *BMC Microbiol.* 2008, **8**:37.

Kapranov P, Sementchenko VI, Gingeras TR. Beyond expression profiling: next generation uses of high density oligonucleotide arrays. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2003, **2**(1):47-56.

Kim HU, Kim TY, Lee SY. Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms. *Mol Biosyst.* 2008, **4**(2):113-120.

Kishimoto T, Iijima L, Tatsumi M, Ono N, Oyake A, Hashimoto T, Matsuo M, Okubo M, Suzuki S, Mori K, Kashiwagi A, Furusawa C, Ying BW, Yomo T. Transition from positive to neutral in mutation fixation along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution. *PLoS Genet.* 2010, **6**(10):e1001164.

Kobayashi M, Shimizu H, Shioya S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. *J Biosci Bioeng.* 2008, **106**(4):317-323.

Kodama Y, Kielland-Brandt MC, Hansen J. Lager brewing yeast. *Topics in Current Genetics.* 2008, **15**:145-164.

Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, Shackleton CH. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010, **121**(3-5):496-504.

Kwon YD, Kim S, Lee SY, Kim P. Long-term continuous adaptation of *Escherichia coli* to high succinate stress and transcriptome analysis of the tolerant strain. *J Biosci Bioeng.* 2010, In Press.

Lee SY, Kim HU, Park JH, Park JM, Kim TY. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug Discov Today.* 2009, **14**(1-2):78-88.

Lenski RE, Bennett AF. Evolutionary response of *escherichia coli* to thermal stress. *Am Nat.* 1993, **142**:S47-64.

Lenski RE, Travisano M. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation

experiment with bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, **91**(15):6808-6814.

Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, **98**(1):31-36.

Liolios K, Chen IM, Mavromatis K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, Markowitz VM, Kyrpides NC. The Genomes On Line Database (GOLD) in 2009: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res*. 2010, **38**(Database issue):D346-354.

Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*. 1999, **21**:20-24.

Lucht JM, Bremer E. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system *proU*. *FEMS Microbiol Rev*. 1994, **14**(1):3-20.

Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol*. 1989, **210**:551-559.

Marcus M, Halpern YS. The metabolic pathway of glutamate in *Escherichia coli* K-12. *Biochim Biophys Acta*. 1969, **177**(2):314-320.

Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009, **84**(1):37-53.

McHugh JP, Rodríguez-Quinoñes F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli* A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem*. 2003, **278**:29478-29486.

Mehta S, Archer JF, Mills J. pH-dependent bactericidal barrier to gram-negative aerobes: its relevance to airway colonisation and prophylaxis of acid aspiration and stress ulcer syndromes--study in vitro. *Intensive Care Med*. 1986, **12**(3):134-136.

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010, **11**(1):31-46.

Mishra P, Prasad R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989, **30**:294-298.

Monton MR, Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007, **1168**(1-2):237-246.

Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M, Ashikari T. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res*. 2009, **16**(2):115-129.

Noordewier MO, Warren PV. Gene expression microarrays and the integration of biological knowledge. *Trends Biotechnol*. 2001, **19**(10):412-415.

Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, Ando S, Yokoi H, Ochiai K, Ikeda M. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002, **58**(2):217-223.

Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010, **85**(3):413-423.

Okochi M, Kurimoto M, Shimizu K, Honda H. Increase of organic solvent tolerance by overexpression of *manXYZ* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007, **73**:1394-1399.

Okuda N, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S. Strategies for reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: inoculum size increase and coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*. 2008, **105**(2):90-96.

Ono N, Suzuki S, Furusawa C, Agata T, Kashiwagi A, Shimizu H, Yomo T. An improved physico-chemical model of hybridization on high-density oligonucleotide microarrays. *Bioinformatics*. 2008, **24**(10):1278-1285.

Piper PW. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and

functional overlap. *FEMS Microbiol Lett.* 1995, **134**(2-3):121-127.

Pomposiello PJ, Bennik MH, Demple B. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol.* 2001, **183**:3890-3902.

Qian M, Tian S, Li X, Zhang J, Pan Y, Yang X. Ethanol production from dilute-Acid softwood hydrolysate by co-culture. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006, **134**(3):273-284.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing 2005, [<http://www.R-project.org>]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0.

Rabinowitz JD. Cellular metabolomics of *Escherichia coli*. *Expert Rev Proteomics.* 2007, **4**(2):187-198.

Rajagopal S, Eis N, Bhattacharya M, Nickerson KW. Membrane-derived oligosaccharides (MDOs) are essential for sodium dodecyl sulfate resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003, **223**(1):25-31.

Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv Exp Med Biol.* 1999, **467**:379-387.

Richard HT, Foster JW. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol.* 2003, **52**:167-186.

Richard H, Foster JW. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J Bacteriol.* 2004, **186**(18):6032-6041.

Rittmann BE. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol Bioeng.* 2008, **100**(2):203-212.

Rivals I, Personnaz L, Taing L, Potier MC. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics.* 2007, **23**(4):401-407.

Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods*. 1992, **156**(1):39-45.

Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Mewes HW. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res*. 2004, **32**(18):5539-5545.

Rutherford BJ, Dahl RH, Price RE, Szmidski HL, Benke PI, Mukhopadhyay A, Keasling JD. Functional genomic study of exogenous *n*-butanol stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, 2010, **76**:1935-1945.

Sajbidor J, Grego J. Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiol Lett*. 1992, **72**(1):13-16.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. *Cold Spring Harbor*, Cold Spring Harbor Press 2001.

Sauer U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2001, **73**:129-169.

Seputiene V, Motiejūnas D, Suziedelis K, Tomenius H, Normark S, Melefors O, Suziedeliene E. Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *J Bacteriol*. 2003, **185**:2475-2484.

Shobayashi M, Ukena E, Fujii T, Iefuji H. Genome-wide expression profile of sake brewing yeast under shaking and static conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007, **71**(2):323-335.

Simic MG, al-Sheikhly M, Jovanovic SV. Inhibition of free radical processes by antioxidants--tryptophan and 5-hydroxytryptophan. *Bibl Nutr Dieta*. 1989, (43):288-296.

Stanek MT, Cooper TF, Lenski RE. Identification and dynamics of a beneficial mutation in a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. *BMC Evol Biol*. 2009, **9**:302.

Steipe B. Evolutionary approaches to protein engineering. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999,

243:55-86.

Sterky F, Lundeberg J. Sequence analysis of genes and genomes. *J Biotechnol.* 2000, **76**(1):1-31.

Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* 1990, **248**:189-194.

Streliaoff CC, Lenski RE, Ofria C. Evolutionary dynamics, epistatic interactions, and biological information. *J Theor Biol.* 2010, **266**(4):584-594.

Tamai Y, Momma T, Yoshimoto H, Kaneko Y. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast.* 1998, **14**(10):923-933.

Tamura K, Shimizu T, Kourai H. Effects of ethanol on the growth and elongation of *Escherichia coli* under high pressures up to 40 MPa. *FEMS Microbiol Lett.* 1992, **78**(2-3):321-324.

Tang YJ, Martin HG, Myers S, Rodriguez S, Baidoo EE, Keasling JD. Advances in analysis of microbial metabolic fluxes via ¹³C isotopic labeling. *Mass Spectrom Rev.* 2009, **28**(2):362-375.

Taniguchi M, Tohma T, Itaya T, Fujii M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by a novel co-culture system with two fermentors and two microfiltration modules. *J Ferment Bioeng.* 1997, **84**:59-64.

Taylor M, Tuffin M, Burton S, Eley K, Cowan D. Microbial responses to solvent and alcohol stress. *Biotechnol J.* 2008, **3**(11):1388-1397.

Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundström H, Borovok I, Aharonowitz Y, Sjöberg BM, Cohen G. NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol.* 2007, **189**:5012-5021.

VanBogelen RA, Kelley PM, Neidhardt FC. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1987, **169**(1):26-32.

VanBogelen RA, Abshire KZ, Moldover B, Olson ER, Neidhardt FC. *Escherichia coli* proteome

analysis using the gene-protein database. *Electrophoresis*. 1997, **18**(8):1243-1251.

Varghese S, Wu A, Park S, Imlay KR, Imlay JA. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2007, **64**:822-830.

Wood JM. Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J Membr Biol*. 1988, **106**(3):183-202.

Yan Y, Liao JC. Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009, **36**(4):471-479.

Yomano LP, York SW, Ingram LO. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1998, **20**(2):132-138.

Yoshida S, Imoto J, Minato T, Oouchi R, Sugihara M, Imai T, Ishiguro T, Mizutani S, Tomita M, Soga T, Yoshimoto H. Development of bottom-fermenting *saccharomyces* strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2008, **74**(9):2787-2796.

Zheng XT, D'Amore T, Russell I, Stewart GG. Factors influence maltotriose utilization during brewery wort fermentations. *J Am Soc Brew Chem*. 1994, **52**:41-47.

相田 浩, 千畑 一郎, 山田 秀明, 滝波 弘一, 中山 清 編. アミノ酸発酵. 学会出版センター, 1986.

伏見 譲. 進化分子工学による超分子の適応設計. 共立出版, 蛋白質核酸酵素 **38**(7):1338-1344 1993

ザ ユニバーシティー オブ フロリダ リサーチ ファンデーション インク. エタノール産生のための組み換え細菌. 特表 2010-500026. 2010.1.7.

Appendix

Table 1. 第4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 において用いた代謝分子の略語と、対応する分子名。

略語	物質名
Fum	fumarate
Mal-L	(S)-malate
Oaa	oxaloacetate
Pyr	pyruvate
Lac-L	(S)-lactate
Ser-L	L-serine
Cys-L	L-cysteine
Glu-L	L-glutamate
Ahdt	2-amino-4-hydroxy-6-(erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)dihydropteridine
35cGMP	3,5-cyclic GMP
Prpp	5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate
Orot5p	orotidine 5-phosphate
Aps	adenylylsulfate
Paps	3-phosphoadenylyl sulfate
Alac-S	(S)-2-acetolactate
23dhmb	2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate
3mob	3-methyl-2-oxobutanoate
Val-L	L-valine
Gal	D-galactose
Gal1p	alpha-D-Galactose 1-phosphate
UDPg	UDPglucose
Amy	amylose
G1p	D-glucose 1-phosphate

Table 2. Sc 優勢であるような遺伝子を多く含む部分ネットワーク

代謝分子	遺伝子名							
	L-Cysteine	L-Glutamate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	CYS4	GSH1	AAT1	URA2
L-Serine					CYS4	GSH1	AAT2	
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	Glycine	L-Threonine	CYS4	GSH1	ASN1	
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	Oxaloacetate	(S)-Malate	CYS4	GSH1	ASN2	
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	Glutathione	Oxidized glutathione	CYS4	GSH1	GSH2	GLY1
Carbamoyl phosphate	L-Aspartate	Oxaloacetate	Pyruvate	(S)-Lactate	URA2	AAT1	AAT1	MDH1
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	Pyruvate	(S)-Lactate	CYS4	GSH1	AAT2	MDH2
Pyruvate	Oxaloacetate	L-Glutamate	L-Cysteine	L-Serine	PYC1	AAT1		MDH3
L-Glutamate	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	Glycine	L-Threonine	O-Phospho-L-homoserine	PYC2	AAT2	GSH2	GLR1
2-amino-4-hydroxy-6-erythro-1,2,3-trihydroxypropylidihydropteridine	GTP	GDP	GMP	3,5-Cyclic GMP	FOL2	YNK1	GLY1	CYS4
Glycine	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	L-Glutamate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	GSH2	GSH1	GUK1	THR4
L-Cysteine	L-Glutamate	Oxaloacetate	(S)-Malate	Fumarate	GSH1	AAT1		PDE1
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Aspartate	L-Glutamate	L-Cysteine	ARG3	URA2		PDE2

Table 2. Sc 優勢であるような遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子		遺伝子名						
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	L-Aspartate	4-Phospho-L-aspartate	CYS4	GSH1	AAT1	HOM3
2-Oxoglutarate	L-Glutamate	L-Cysteine	L-Serine	O-Phospho-L-serine	AAT1	GSH1	AAT2	SER2
(S)-Lactate	Pyruvate	Oxaloacetate	(S)-Malate	Fumarate	CYB2	PYC2	MDH3	FUM1
Fumarate	(S)-Malate	Oxaloacetate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	FUM1	MDH1	AAT1	URA2
N-Carbamoyl-L-aspartate	L-Aspartate	L-Glutamate	L-Cysteine	O-Acetyl-L-serine	URA2	MDH2	AAT2	
						MDH3	ASN1	
							ASN2	
						AAT1	GSH1	MET17YG
						AAT2	AAT2	R012W
						ASN1		
						ASN2		
L-Cysteine	L-Glutamate	Oxaloacetate	Pyruvate	(S)-Lactate	GSH1	AAT1	PYC1	CYB2
S-Adenosyl-L-methionine	L-Methionine	L-Homocysteine	L-Serine	O-Phospho-L-serine	SAM1	AAT2	PYC2	
UTP	UDP	UMP	Orotidine	5-Phospho-L-serine	SAM2	MET6	CYS4	SER2
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	5-phosphate	ibose 1-diphosphate	YMK1	YND1	URA3	URA5
			Glycine	tRNA(Gly)	CYS4	GSH1		URA10
O-Phospho-L-serine	L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	L-Glutamyl	SER2	CYS4	GSH1	PRO1
Glycine	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	L-Cysteine	L-Serine	5-phosphate	GSH2	GSH1	CYS4	SER2
				O-Phospho-L-serine				

Table 2. Sc 優勢であるような遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子	遺伝子名							
2-Oxoglutarate	L-Glutamate	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	Glycine	L-Threonine	AAT1 AAT2	GSH1	GSH2	GLY1
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	Glycine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	CYS4	GSH1	GSH2	HEM1
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	Succinate semialdehyde	CYS4	GSH1	GAD1	UGA1
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	2-Oxoglutarate	Thiamin diphosphate	CYS4	GSH1	AAT1 AAT2	KGD1
L-Glutamate	L-Cysteine	L-Serine	3-Dehydroshpinganine	Sphinganine	GSH1	CYS4	LCB1 LCB2	TSC10
L-Cysteine	L-Glutamate	2-Oxoglutarate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	GSH1	GDH1 GDH3	AAT1 AAT2	URA2
Acetyl-CoA	(S)-Malate	Oxaloacetate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	DAL7 MLS1	MDH1 MDH2 MDH3	ASN1 ASN2	URA2

Table 3. Sb 優勢であるような遺伝子を多く含む部分ネットワーク

代謝分子		遺伝子名				
Adenylylsulfate	3-Phosphoadenylyl sulfate	Sulfite	Hydrogen sulfide	<i>MET3</i>	<i>MET14</i> <i>MET22</i>	<i>MET16</i> <i>MET10</i>
UDP-D-galactose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	Amylose	<i>GAL10</i>	<i>GAL7</i>	<i>GPH1</i> <i>GDB1</i>
Adenylylsulfate	3-Phosphoadenylyl sulfate	Sulfite	O-Acetyl-L-homoserine	<i>MET3</i>	<i>MET14</i> <i>MET22</i>	<i>MET16</i> <i>MET17</i>
Sulfite	3-Phosphoadenylyl sulfate	Adenylylsulfate	P1,P4-Bis(5-adenosyl) tetraphosphate	<i>MET10</i>	<i>MET16</i>	<i>APA1</i> <i>APA2</i>
Adenylylsulfate	3-Phosphoadenylyl sulfate	Sulfite	O-Acetyl-L-serine	<i>MET3</i>	<i>MET14</i> <i>MET22</i>	<i>MET16</i> <i>MET17</i> <i>YGR012W</i>
UDP-D-galactose	UDPglucose	Amylose	D-Glucose 1-phosphate	<i>GAL7</i>	<i>GAL10</i>	<i>GSY1</i> <i>GSY2</i> <i>GPH1</i>
alpha-D-Galactose 1-phosphate	D-Glucose 1-phosphate	Starch	Amylose	<i>GAL1</i> <i>GAL3</i>	<i>GAL7</i>	<i>GDB1</i> <i>GDB1</i>
UDP-D-galactose	UDPglucose	Amylose	Starch	<i>GAL7</i>	<i>GAL10</i>	<i>GSY1</i> <i>GSY2</i> <i>GDB1</i>
UDP-D-galactose	UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	<i>GAL7</i>	<i>GAL10</i>	<i>UGP1</i> <i>GPH1</i>
Amylose	Starch	D-Glucose 1-phosphate	UDP-D-galactose	<i>GSY1</i> <i>GSY2</i>	<i>GDB1</i>	<i>GAL7</i> <i>YHL012W</i>
Amylose	D-Glucose 1-phosphate	UDPglucose	alpha-D-Galactose 1-phosphate	<i>GDB1</i>	<i>GPH1</i>	<i>GAL7</i>
alpha-D-Galactose 1-phosphate	D-Galactose	Melibiose	Raffinose	<i>GAL7</i>	<i>GAL1</i> <i>GAL3</i>	<i>SUC2</i> <i>MAL12</i> <i>MAL32</i> <i>FPS2</i> <i>YGR287C</i> <i>YIL172C</i> <i>YJL216C</i> <i>YOL157C</i>

Table 3. Sb 優勢であるような遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子		遺伝子名				
Amylose	UDPglucose	alpha-D-Galactose 1-phosphate	D-Galactose	GSY1 GSY2	GAL7	GAL1 GAL3
UDP-D-galactose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	alpha-D-Glucose	GAL7	GPH1	BSC1 SGA1 MUC1
Amylose	D-Glucose 1-phosphate	UDPglucose	alpha, alpha-Trehalose 6-phosphate	GPH1	GAL7	TPS1 TPS2 TPS3 TSL1
alpha-D-Galactose 1-phosphate	UDP-D-galactose	UDPglucose	alpha, alpha-Trehalose 6-phosphate	GAL7 GAL3	GAL10	TPS1 TPS2 TPS3 TSL1
beta-D-Fructose	alpha-D-Glucose	beta-D-Glucose	beta-D-Glucose 6-phosphate	MAL12 MAL32 FPS2 YGR287C YIL172C YJL216C YOL157C	GAL10	GLK1 HXX1 HXX2
2-Acetolactate	2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate	3-Methyl-2-oxobutanoate	L-Valine	ILV5 ILV2 ILV6	ILV3	BAT1 BAT2
D-Glucose 1-phosphate	UDPglucose	Amylose	Starch	UGP1 YHL012W	GSY1 GSY2	GDB1
alpha-D-Galactose 1-phosphate	D-Glucose 1-phosphate	alpha-D-Glucose 6-phosphate	beta-D-Fructose	GAL7 GAL1 GAL3	PGM1	SUC2
(S)-Malate	Pyruvate	L-Serine	CDP diacylglycerol	MAE1	CHAI	CHO1

Table 4. エタノールストレスによって発現量が増した遺伝子を多く含む部分ネットワーク

代謝分子名		遺伝子名						
S-Adenosyl-L-methio nine	S-Adenosyl-L-homocys teine	Adenine	Adenosine	Inosine	<i>cheR</i>	<i>pfs</i>	<i>deoD</i>	<i>add</i>
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	IDP	Cytidine	Uridine	<i>pps</i>	<i>pykF</i>	<i>udk</i>	<i>cdd</i>
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	IDP	Cytidine	Cytosine	<i>pps</i>	<i>pykF</i>	<i>udk</i>	<i>rihB</i>
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	D-Erythrose 4-phosphate	Glycerone phosphate	Glycerone	<i>pps</i>	<i>aroG</i>	<i>fabB</i>	<i>phoA</i>
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	dGDP	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	<i>pps</i>	<i>pykF</i>	<i>nrpA</i>	<i>nrpD</i>
Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho sphonoxy)-propanal	2-Deoxy-D-ribose 5-phosphate	2-Deoxy-D-ribose 1-phosphate	Guanine	<i>dgoA</i>	<i>deoC</i>	<i>deoB</i>	<i>deoD</i>
Glycine	Glutathione	Formate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	<i>gshB</i>	<i>frnB</i>	<i>ybiW</i>	<i>pps</i>
Glycine	L-Cysteine	Mercaptopyruvate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	<i>pepN</i>	<i>aspC</i>	<i>sseA</i>	<i>pps</i>
Glycine	Tetrahydrofolate	Formate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	<i>glyA</i>	<i>purU</i>	<i>ybiW</i>	<i>pps</i>
UDP-N-acetyl-D-gluc osamine	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-pr opanal	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate	<i>murA</i>	<i>pps</i>	<i>dgoA</i>	<i>gapA</i>
Formate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho sphonoxy)-propanal	Glycerone phosphate	Glycerone	<i>ybiW</i>	<i>dgoA</i>	<i>gatY</i>	<i>phoA</i>
Thiamin diphosphate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho sphonoxy)-propanal	Glycerone phosphate	Glycerone	<i>aceE</i>	<i>dgoA</i>	<i>gatY</i>	<i>phoA</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	Formate	2-Amino-4-hydroxy-6-(erythro-1,2,3-t rihydroxypropyl)dihydropteridine triphosphate	2-Amino-4-hydroxy-6-(D-eryt hro-1,2,3-trihydroxypropyl)-7,8 -dihydropteridine	<i>pps</i>	<i>ybiW</i>	<i>foE</i>	<i>phoA</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	Formate	Tetrahydrofolate	3-Methyl-2-oxobutanoate	<i>pps</i>	<i>ybiW</i>	<i>foD</i>	<i>panB</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Tryptophan	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-pr opanal	D-Tagatose 1,6-bisphosphate	<i>pps</i>	<i>tnaA</i>	<i>trpA</i>	<i>gatY</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(R)-Lactate	Glutathione	Halide	<i>pps</i>	<i>ldhA</i>	<i>gloB</i>	<i>gst</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	L-Histidine	<i>pps</i>	<i>trpD</i>	<i>gadB</i>	<i>pepD</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Glutamate	beta-Alanine	L-Histidine	<i>pps</i>	<i>trpD</i>	<i>puuE</i>	<i>pepD</i>

Table 4. エタノールストレスによって発現量が上昇した遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名		遺伝子名						
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	D-Fructose 6-phosphate	D-Fructose 1,6-bisphosphate	<i>pps</i>	<i>dgoA</i>	<i>tktB</i>	<i>pfkB</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	Glycerone phosphate	Methylglyoxal	<i>pps</i>	<i>dgoA</i>	<i>fbaB</i>	<i>mgsA</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	D-Ribose 5-phosphate	Adenine	<i>pps</i>	<i>dgoA</i>	<i>tktB</i>	<i>amn</i>
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	(2,3-Dihydroxybenzoyl)adenylate	<i>pps</i>	<i>entB</i>	<i>entA</i>	<i>entE</i>
L-Tryptophan	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	IDP	D-Fructose 6-phosphate	<i>tnaA</i>	<i>pps</i>	<i>pykF</i>	<i>pfkB</i>
IDP	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Tryptophan	L-Tryptophanyl-tRNA(Trp)	<i>pykF</i>	<i>pps</i>	<i>tnaA</i>	<i>trpS</i>
IDP	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	<i>pykF</i>	<i>pps</i>	<i>entB</i>	<i>entA</i>
IDP	Uridine	D-Ribose 1-phosphate	Adenosine	Inosine	<i>udk</i>	<i>udp</i>	<i>deoD</i>	<i>add</i>
Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	Pyruvate	dGDP	Thioredoxin	<i>gatY</i>	<i>dgoA</i>	<i>pykF</i>	<i>nrdA</i>
Glycerone phosphate	D-Tagatose 1,6-bisphosphate	IDP	Pyruvate	(S)-Malate	<i>gatY</i>	<i>pfkB</i>	<i>pykF</i>	<i>sfcA</i>
D-Ribose 5-phosphate	Adenine	Hypoxanthine	Inosine	Adenosine	<i>amn</i>	<i>ade</i>	<i>deoD</i>	<i>add</i>
5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Hypoxanthine	Adenine	Adenosine	Inosine	<i>hpt</i>	<i>ade</i>	<i>deoD</i>	<i>add</i>
(S)-Malate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	Nucleoside triphosphate	Nucleotide	<i>sfcA</i>	<i>pps</i>	<i>pykF</i>	<i>mazG</i>
(S)-Malate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	Glycerone phosphate	Methylglyoxal	<i>sfcA</i>	<i>dgoA</i>	<i>gatY</i>	<i>mgsA</i>
(S)-Malate	Pyruvate	dGDP	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	<i>sfcA</i>	<i>pykF</i>	<i>nrdA</i>	<i>nrdD</i>
(S)-Malate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	D-Tagatose 1,6-bisphosphate	D-Tagatose 6-phosphate	<i>sfcA</i>	<i>eda</i>	<i>gatY</i>	<i>pfkB</i>
Glycerone	Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate	2,3-Bisphospho-D-glycerate	<i>phoA</i>	<i>gatY</i>	<i>gapA</i>	<i>gpmA</i>

Table 4. エタノールストレスによって発現量が上昇した遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名		遺伝子名					
Adenosine	Inosine	D-Ribose 1-phosphate	Uridine	Cytidine	<i>deoD</i>	<i>udp</i>	<i>cdd</i>
(R)-Lactate	Pyruvate	Formate	2-Amino-4-hydroxy-6-(erythro-1,2,3-t rihydroxypropyl)dihydropteridine triphosphate	2-Amino-4-hydroxy-6-(D-eryt hro-1,2,3-trihydroxypropyl)-7,8 -dihydropteridine	<i>ldhA</i>	<i>ybiW</i>	<i>foIE</i>
Orotate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Hypoxanthine	Inosine	Adenosine	<i>pyrE</i>	<i>hpt</i>	<i>deoD</i>
Uridine	Cytidine	dGDP	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	<i>cdd</i>	<i>udk</i>	<i>nrdA</i>
Xanthine	Guanine	D-Ribose 1-phosphate	Uridine	Cytidine	<i>guaD</i>	<i>deoD</i>	<i>udp</i>
(S)-Lactaldehyde	Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	2-Deoxy-D-ribose 5-phosphate	2-Deoxy-D-ribose 1-phosphate	<i>ficA</i>	<i>gatY</i>	<i>deoC</i>

Table 5. エタノールストレスによって発現量が低下した遺伝子を多く含む部分ネットワーク

代謝分子名	遺伝子名					
Pyruvate	L-Cysteine	L-Glutamate	Carbamoyl phosphate	Carbamoyl phosphate	L-Ornithine	<i>maY</i> <i>gshA</i> <i>carA</i> <i>argF</i>
Pyruvate	L-Glutamate	Carbamoyl phosphate	L-Citrulline	L-Citrulline	L-Aspartate	<i>trpD</i> <i>carA</i> <i>argF</i> <i>argG</i>
Pyruvate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	L-Histidinol	L-Histidine	<i>trpD</i> <i>hisC</i> <i>hisB</i> <i>hisD</i>
L-Glutamate	L-Glutamine	Carbamoyl phosphate	L-Ornithine	L-Ornithine	N2-Acetyl-L-ornithine	<i>gttB</i> <i>carA</i> <i>argF</i> <i>argE</i>
L-Glutamate	L-Glutamine	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosyl-AMP	<i>glnA</i> <i>purF</i> <i>hisG</i> <i>hisI</i>
L-Glutamate	beta-Alanine	L-Aspartate	L-Citrulline	L-Citrulline	L-Ornithine	<i>puuE</i> <i>panD</i> <i>argG</i> <i>argF</i>
L-Glutamate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	1-(5-Phosphoribosyl)-5-amino-4-imidazolecarboxamide	Tetrahydrofolate	Tetrahydrofolate	5-Methyltetrahydrofolate	<i>purF</i> <i>apt</i> <i>purH</i> <i>metH</i>
UDP glucose	alpha.alpha-Trehalose 6-phosphate	alpha.alpha-Trehalose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucono-1,5-lactone	<i>otsA</i> <i>otsB</i> <i>treA</i> <i>gcd</i>
Glycine	5-Phosphoribosylamine	L-Glutamate	L-Glutamine	L-Glutamine	Carbamoyl phosphate	<i>purD</i> <i>purF</i> <i>glnA</i> <i>carA</i>
Glycine	5-Phosphoribosylamine	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	<i>purD</i> <i>purF</i> <i>hisC</i> <i>hisB</i>
L-Aspartate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	L-Histidinol	L-Histidine	<i>aspC</i> <i>hisC</i> <i>hisB</i> <i>hisD</i>
L-Aspartate	beta-Alanine	L-Glutamate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	<i>panD</i> <i>puuE</i> <i>hisC</i> <i>hisB</i>
L-Aspartate	Fumarate	N-(L-Arginino)succinate	L-Citrulline	L-Citrulline	L-Ornithine	<i>aspA</i> <i>argH</i> <i>argG</i> <i>argF</i>
L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl-ATP	<i>pyrB</i> <i>carA</i> <i>purF</i> <i>hisG</i>
UDP-D-galactose	UDPglucose	alpha.alpha-Trehalose 6-phosphate	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucono-1,5-lactone	<i>galE</i> <i>otsA</i> <i>treC</i> <i>gcd</i>
L-Serine	O-Phospho-L-serine	L-Glutamate	Carbamoyl phosphate	Carbamoyl phosphate	L-Ornithine	<i>serB</i> <i>serC</i> <i>carA</i> <i>argF</i>
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	L-Glutamine	L-Glutamine	5-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide	<i>argF</i> <i>carA</i> <i>gltB</i> <i>purL</i>
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	4-Aminobutanamide	4-Aminobutanamide	4-Aminobutanamide	<i>argF</i> <i>carA</i> <i>gadB</i> <i>ycdW</i>

Table 5. エタノールストレスによって発現量が低下した遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名		遺伝子名			
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	L-Aspartate	Fumarate	<i>argF carA asnB aspA</i>
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Adenine	<i>argF carA purF apt</i>
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	L-Leucine	L-Leucyl-tRN A	<i>argF carA ilvE leuS</i>
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Aspartate	Fumarate	(S)-Malate	<i>argF pyrB aspA fumC</i>
L-Ornithine	L-Citrulline	L-Aspartate	Fumarate	(S)-Malate	<i>argF argG aspA fumC</i>
L-Tryptophan	Pyruvate	L-Glutamine	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	<i>tnaA trpD carA hisC</i>
Tetrahydrofolate	10-Formyltetrahydrofolate	1-(5-Phosphoribosyl)-5-amino-4- imidazolecarboxamide	5-Phospho-alpha-D-ribose	Phosphoribosyl phosphate	<i>purT purH apt hisG</i>
Tetrahydrofolate	1-(5-Phosphoribosyl)-5-amino -4-imidazolecarboxamide	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosyl 1-AMP	<i>purH apt hisG hisI</i>
Fumarate	N-(L-Arginino)succinate	L-Citrulline	L-Ornithine	N2-Acetyl-L- ornithine	<i>argH argG argF argE</i>
D-Glucono-1,5-lactone	D-Glucose	D-Glucose 1-phosphate	ADPglucose	Amylose	<i>gcd agp glgA glgC</i>
D-Glucono-1,5-lactone	D-Glucose	D-Glucose 1-phosphate	UDPglucose	UDP-D-galact ose	<i>gcd agp galT galE</i>
Hypoxanthine	Adenine	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosyl 1-AMP	<i>ade apt hisG hisI</i>
4-Aminobutanoate	L-Glutamate	L-Glutamine	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl 1-ATP	<i>gadB glnA purF hisG</i>
(S)-Dihydroorotate	Orotate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosyl 1-AMP	<i>pyrD pyrE hisG hisI</i>
Cytosine	Uracil	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosyl 1-AMP	<i>codA upp hisG hisI</i>
Guanosine	Guanine	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosyl 1-AMP	<i>rifB gpt hisG hisI</i>

Table 5. エタノールストレスによって発現量が低下した遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名	遺伝子名				
N-Carbamoyl-L-aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Citrulline	L-Aspartate	4-Phospho-L-aspartate	<i>argF</i> <i>argG</i> <i>thrA</i>
N-Carbamoyl-L-aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Citrulline	L-Aspartate	aspartate	
4-Aminobutanol	4-Aminobutanolate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	Iminoaspartate	<i>argF</i> <i>argG</i> <i>nadB</i>
L-Histidinol	L-Histidinol phosphate	L-Glutamate	N-Acetyl-L-glutamate	L-Histidinol	<i>ycdW</i> <i>gadB</i> <i>hisB</i> <i>hisC</i> <i>argA</i> <i>argB</i>
				N-Acetyl-L-glutamate	<i>hisB</i> <i>hisC</i> <i>argA</i> <i>argB</i>
				utamate	
				5-phosphate	
L-Histidinol	L-Histidinol phosphate	L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanolate	2-Isopropylmalate	<i>hisB</i> <i>hisC</i> <i>livE</i> <i>leuA</i>

Table 6. 適応株において発現量が上昇していた遺伝子を多く含む部分ネットワーク

代謝分子名		遺伝子名					
Pyruvate	L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	2-Isopropylmalate	2-Isopropylmaleate	<i>trpD</i>	<i>leuA</i>	<i>leuD</i>
Pyruvate	L-Glutamine	L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	2-Isopropylmalate	<i>trpD</i>	<i>leuA</i>	<i>leuA</i>
Pyruvate	Isochorismate	Chorismate	Prephenate	3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvate	<i>entB</i>	<i>pheA</i>	<i>tyrA</i>
L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	<i>asnB</i>	<i>trpD</i>	<i>entA</i>
L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	(S)-2-Acetolactate	3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate	<i>glmS</i>	<i>trpD</i>	<i>ivc</i>
L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	<i>ilvE</i>	<i>avtA</i>	<i>entA</i>
Glycine	L-Cysteine	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	<i>pepN</i>	<i>malY</i>	<i>entA</i>
Glycine	L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	Isochorismate	<i>glvA</i>	<i>trpA</i>	<i>entB</i>
Glycine	5-Phosphoribosylamine	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	<i>purD</i>	<i>purF</i>	<i>entB</i>
UDP-N-acetyl-D-glucosamine	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	<i>murA</i>	<i>pps</i>	<i>entA</i>
L-Aspartate	L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	Isochorismate	<i>aspC</i>	<i>glmS</i>	<i>entB</i>
L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	<i>pyrB</i>	<i>carA</i>	<i>entB</i>
L-Aspartate	Prephenate	Chorismate	Pyruvate	Isochorismate	<i>tyrB</i>	<i>pheA</i>	<i>entB</i>
Formate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	(2,3-Dihydroxybenzoyl)adenylate	<i>ybiW</i>	<i>entB</i>	<i>entE</i>
Formate	10-Formyltetrahydrofolate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	<i>folD</i>	<i>folC</i>	<i>entB</i>
L-Serine	O-Phospho-L-serine	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	<i>serB</i>	<i>serC</i>	<i>entB</i>
L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	L-Glutamate	L-Leucine	<i>trpA</i>	<i>tnaA</i>	<i>ivE</i>
L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	<i>trpA</i>	<i>tnaA</i>	<i>entA</i>
L-Serine	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)propanal	Pyruvate	L-Glutamate	L-Leucine	<i>trpA</i>	<i>dgoA</i>	<i>ivE</i>

Table 6. 適応株において発現量が上昇していた遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名		遺伝子名					
L-Serine	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	<i>trpA</i>	<i>dgoA</i>	<i>entB</i>	<i>entA</i>
L-Tryptophan	Pyruvate	L-Glutamine	L-Glutamate		<i>tnaA</i>	<i>trpD</i>	<i>carA</i>
L-Cysteine	Mercaptopyruvate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate		<i>aspC</i>	<i>sseA</i>	<i>entB</i>
beta-Alanine	L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	Isochorismate	<i>puuE</i>	<i>pyrG</i>	<i>trpD</i>
Tetrahydrofolate	3-Methyl-2-oxobutanoate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	<i>panB</i>	<i>ilvE</i>	<i>trpD</i>
IDP	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate		<i>pykF</i>	<i>pps</i>	<i>entB</i>
L-Leucine	L-Glutamate	Chorismate	Prephenate	3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvate	<i>ilvE</i>	<i>trpD</i>	<i>pheA</i>
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal		<i>entA</i>	<i>entB</i>	<i>dgoA</i>
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	Pyruvate	L-Aspartate		<i>entA</i>	<i>entB</i>	<i>yagE</i>
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	Pyruvate	4-semialdehyde		<i>entA</i>	<i>entB</i>	<i>yagE</i>
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	Pyruvate	2,3-Dihydrodipicolinate		<i>entA</i>	<i>entB</i>	<i>yagE</i>
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	Pyruvate	2-Dehydro-3-deoxy-6-phospho-D-gluconate		<i>entA</i>	<i>entB</i>	<i>eda</i>
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate		<i>entC</i>	<i>entB</i>	<i>pps</i>
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	(S)-2-Acetylacetyl-CoA		<i>entC</i>	<i>entB</i>	<i>ilvC</i>
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	L-Tryptophan		<i>entC</i>	<i>entB</i>	<i>tnaA</i>
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	L-Alanine		<i>entC</i>	<i>entB</i>	<i>avtA</i>
Orotate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	<i>pyrE</i>	<i>purF</i>	<i>trpD</i>

Table 6. 適応株において発現量が上昇していた遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名		遺伝子名			
Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	dGDP	Pyruvate	Isochorismate	<i>nrdD</i> <i>nrdA</i> <i>pykF</i> <i>entB</i>
4-Aminobenzoate	Dihydropteroate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	<i>folP</i> <i>thyA</i> <i>trpD</i> <i>entB</i>
Isochorismate	Pyruvate	2-(alpha-Hydroxyethyl)thiamine diphosphate	(S)-2-Acetolactate	3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate	<i>entB</i> <i>aceE</i> <i>ivl</i> <i>ivC</i>
Isochorismate	Pyruvate	L-Glutamate	L-Glutamyl 5-phosphate	L-Glutamate	<i>entB</i> <i>trpD</i> <i>proB</i> <i>proA</i>
2-Isopropylmalate	3-Methyl-2-oxobutanoate	L-Glutamate	L-Aspartate	5-semialdehyde Iminoaspartate	<i>leuA</i> <i>ivE</i> <i>aspC</i> <i>nadB</i>

Table 7. 適応株において発現量が低下していた遺伝子を多く含む部分ネットワーク

代謝分子名		遺伝子名						
Pyruvate	(S)-Lactate	(S)-Lactaldehyde	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	<i>lldD</i>	<i>aldA</i>	<i>fucA</i>	<i>gpsA</i>
Pyruvate	(S)-Lactate	(S)-Lactaldehyde	Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	<i>lldD</i>	<i>aldA</i>	<i>fucA</i>	<i>fbaB</i>
Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	L-Cysteine	O-Succinyl-L-homoserine	<i>sdaA</i>	<i>cysE</i>	<i>cysK</i>	<i>metB</i>
Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	Selenide	Selenite	<i>sdaA</i>	<i>cysE</i>	<i>cysK</i>	<i>cysI</i>
Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	D-Erythrose 4-phosphate	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	<i>dgoA</i>	<i>tktB</i>	<i>fbaB</i>	<i>gpsA</i>
L-Glutamate	L-Glutamine	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Uracil	Cytosine	<i>glnA</i>	<i>purF</i>	<i>upp</i>	<i>codA</i>
UDP glucose	D-Glucose 1-phosphate	D-Glucose	alpha.alpha-Trehalose	alpha.alpha-Trehalose 6-phosphate	<i>galU</i>	<i>agg</i>	<i>treA</i>	<i>otsB</i>
UDP glucose	D-Glucose 1-phosphate	Amylose	D-Glucose	alpha.alpha-Trehalose	<i>galU</i>	<i>malP</i>	<i>malQ</i>	<i>treA</i>
Glycine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	L-Threonine	O-Phospho-L-homoserine	L-Homoserine	<i>kbl</i>	<i>tdh</i>	<i>thrC</i>	<i>thrB</i>
L-Alanine	Pyruvate	Methylglyoxal	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	<i>avtA</i>	<i>aldA</i>	<i>mgsA</i>	<i>gpsA</i>
L-Alanine	Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	L-Cysteine	<i>avtA</i>	<i>sdaA</i>	<i>cysE</i>	<i>cysK</i>
L-Alanine	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	<i>avtA</i>	<i>dgoA</i>	<i>tpiA</i>	<i>gpsA</i>
L-Aspartate	L-Asparagine	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	<i>asnA</i>	<i>asnB</i>	<i>gadB</i>	<i>ydcW</i>
L-Aspartate	L-Asparagine	L-Glutamine	L-Glutamate	N-Acetyl-L-glutamate	<i>asnA</i>	<i>asnB</i>	<i>glnA</i>	<i>argA</i>
3-Phosphoadenylyl sulfate	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	O-Acetyl-L-serine	L-Serine	<i>cysH</i>	<i>nrdD</i>	<i>cysK</i>	<i>cysE</i>

Table 7. 適応株において発現量が低下していた遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名		遺伝子名						
Formate	Glutathione	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	<i>frmB</i>	<i>ggt</i>	<i>gadB</i>	<i>ycdW</i>
L-Serine	O-Acetyl-L-serine	Thioredoxin	3-Phosphoadenylyl sulfate	Adenylylsulfate	<i>cysE</i>	<i>cysK</i>	<i>cysH</i>	<i>cysC</i>
D-Fructose 6-phosphate	D-Erythrose 4-phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	<i>tktB</i>	<i>talB</i>	<i>fabB</i>	<i>gpsA</i>
sn-Glycerol 3-phosphate	Glycerone phosphate	Methylglyoxal	Pyruvate	Ferricytochrome b1	<i>gpsA</i>	<i>mgsA</i>	<i>aldA</i>	<i>poxB</i>
sn-Glycerol 3-phosphate	Glycerone phosphate	Glycolaldehyde	2-Amino-4-hydroxy-6-(D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)-7,8-dihydropteridine triphosphate	2-Amino-4-hydroxy-6-(erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)dihydropteridine triphosphate	<i>gpsA</i>	<i>rhaD</i>	<i>folB</i>	<i>phoA</i>
Tetrahydrofolate	Dihydrofolate	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	<i>folA</i>	<i>thyA</i>	<i>gadB</i>	<i>ycdW</i>
Tetrahydrofolate	Glycine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	L-Threonine	O-Phospho-L-homoserine	<i>gcvT</i>	<i>abl</i>	<i>tdh</i>	<i>thrC</i>
Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	CDPdiacylglycerol	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	<i>gpsA</i>	<i>pgsA</i>	<i>pssA</i>	<i>cysE</i>
Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal	Pyruvate	(S)-Malate	Fumarate	<i>fabB</i>	<i>dgoA</i>	<i>sfcA</i>	<i>fumC</i>
Fumarate	(S)-Malate	Pyruvate	(S)-Lactate	(S)-Lactaldehyde	<i>fumC</i>	<i>sfcA</i>	<i>lldD</i>	<i>aldA</i>
Fumarate	(S)-Malate	Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	<i>fumC</i>	<i>sfcA</i>	<i>sdaA</i>	<i>cysE</i>
(S)-Lactate	Pyruvate	3-Methyl-2-oxobutanoate	Tetrahydrofolate	Dihydrofolate	<i>lldD</i>	<i>avtA</i>	<i>panB</i>	<i>folA</i>
L-Threonine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	Glycine	5,10-Methylenetetrahydrofolate	5-Methyltetrahydrofolate	<i>tdh</i>	<i>abl</i>	<i>gcvT</i>	<i>metF</i>
Nicotinate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Uracil	Cytosine	Cytidine	<i>pncB</i>	<i>upp</i>	<i>codA</i>	<i>ribB</i>

Table 7. 適応株において発現量が低下していた遺伝子を多く含む部分ネットワーク (続き)

代謝分子名		遺伝子名						
(R)-Lactate	Glutathione	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	<i>gloB</i>	<i>egt</i>	<i>gadB</i>	<i>ycdW</i>
Lipopolysaccharide	UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Amylose	ADPglucose	<i>rfaJ</i>	<i>galU</i>	<i>malP</i>	<i>glgA</i>
Dihydrofolate	Tetrahydrofolate	Glycine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	L-Threonine	<i>fofA</i>	<i>gcvT</i>	<i>kbl</i>	<i>tdh</i>
Dihydrofolate	Tetrahydrofolate	3-Methyl-2-oxobutanoate	Pyruvate	Ferricytochrome b1	<i>fofA</i>	<i>panB</i>	<i>avtA</i>	<i>poxB</i>
ADPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Amylose	D-Glucose	alpha.alpha-Trehalose 6-phosphate	<i>glgC</i>	<i>malP</i>	<i>malQ</i>	<i>treC</i>
4-Aminobutanal	4-Aminobutanoate	L-Glutamate	N-Acetyl-L-glutamate	N-Acetyl-L-glutamate 5-phosphate	<i>ycdW</i>	<i>gadB</i>	<i>argA</i>	<i>argB</i>
4-Aminobutanal	4-Aminobutanoate	L-Glutamate	L-Cysteine	D-4-Phosphopantothenate	<i>ycdW</i>	<i>gadB</i>	<i>gshA</i>	<i>dfp</i>
dTDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	D-Glucose	alpha.alpha-Trehalose	alpha.alpha-Trehalose 6-phosphate	<i>rfaA</i>	<i>agg</i>	<i>treA</i>	<i>otsB</i>
O-Acetyl-L-serine	L-Serine	Pyruvate	L-Alanine	6-Carboxyhexanoyl-CoA	<i>cysE</i>	<i>sdaA</i>	<i>avtA</i>	<i>bioF</i>
O-Acetyl-L-serine	L-Serine	Pyruvate	L-Alanine	N-Acetylmuramate	<i>cysE</i>	<i>sdaA</i>	<i>avtA</i>	<i>ybjR</i>

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大阪大学工学部応用自然科学科4年生から大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の博士前期課程と博士後期課程の6年間、研究の場を与えて下さり、終始暖かく、辛抱強く御指導、御助言を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻代謝情報工学講座、清水浩教授に心より御礼申し上げます。博士論文審査委員として、有益な御指導、御助言を頂きました大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻の松田秀雄教授、四方哲也教授、前田太郎教授に心より感謝申し上げます。博士後期課程のアドバイザリ委員として有益な御指導、御助言を頂きました大阪大学産業科学研究所の野地博行教授に心より感謝申し上げます。研究の遂行にあたり詳細な方針などについて様々な議論を行い、時には厳しく御指導を頂きました代謝情報工学講座の古澤力准教授に心より感謝申し上げます。生物学実験を中心として丁寧な御指導を頂きました代謝情報工学講座の平沢敬助教に心より感謝申し上げます。研究室生活が始まって間もない頃、多くの面で御指導を頂きました三菱ガス化学株式会社の永久圭介博士（元代謝情報工学講座助教）に心より感謝申し上げます。情報解析に関する様々な内容について親身な御指導を頂きました代謝情報工学講座の小野直亮特任准教授に心より感謝申し上げます。大腸菌のマイクロアレイ実験を行うにあたり丁寧な御指導を頂きました共生ネットワークデザイン学講座の鈴木真吾特任准教授に心より感謝申し上げます。4回生の時から先輩として多くの面で御助言を頂きました代謝情報工学講座の吉川勝徳特任助教に心より感謝申し上げます。共同研究の場を与えて下さり、ラガービール酵母のマイクロアレイデータの提供およびビール醸造に関する様々な御助言を頂きましたサントリーホールディングス株式会社の中尾嘉宏博士に心より感謝申し上げます。長期間に及ぶ植え継ぎ培養実験を共にを行い、議論を交わした代謝情報工学講座の玉岡邦康氏に心より感謝申し上げます。タイリングアレイのデータ処理およびデータの管理などの面でお世話になりました代謝情報工学講座の田辺久美氏に心より感謝申し上げます。植え継ぎ培養の実験系を整備し、筆者が大腸菌の研究を開始するにあたり御助言を頂きました田辺三菱製薬株式会社の鳳桐智治氏に心より感謝申し上げます。分析機器の使用にあたり御協力頂き、測定方法や結果の解釈などに関して御助言を頂きました三井化学株式会社の白井智量博士ならびに代謝情報工学講座の森英詞氏に心より感謝申し上げます。研究生生活において数多くの面でお世話になりました代謝情報工学講座の皆様へ心より感謝申し上げます。

最後に、長年にわたる大学生生活を精神的、経済的に支えて下さった両親に心より感謝致します。