

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

- <u>Takaaki Horinouchi</u>, 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] <u>Takaaki Horinouchi</u>, 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] <u>Takaaki Horinouchi</u>, 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] <u>Takaaki Horinouchi</u>, 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 - Octorber 1, 2009.
- [3] <u>Takaaki Horinouchi</u>, 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 れまでに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こ と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	
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	
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化した代謝経路	102
5.3.3 親株とエタノール適応株とで発現量が変化した代謝経路	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潅流培養など)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することができるようになり、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、 最近のシークエ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 外の代謝物質量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、プ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; Gonzaletz 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 世代シークエンサー(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 れまでに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ことを見 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、耐性に関与する情報(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

(Gonzaletz 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。

Gonzaletz らの報告(Gonzaletz 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。



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。

Strain	
Escherichia coli	
W3110	野生型株
立日 1/1-	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
术兄 们不	植え継ぎ培養実験(2.3.1)に供することで取得した株
	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
遍応休A休~F休	養実験(2.3.3)に供することで取得した株

Table 2.1. 第2章で用いた大腸菌株

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
$NaHPO_4 \cdot 12H_2O$	17.1 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	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℃、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ォトレコーダーTVS062CA(アドバンテック東洋株式会社)を用て 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℃、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。
- 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 OD₆₀₀=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 0.5~0.55 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 ~ 0.55 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℃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 トンを消費し、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。



ストレス強度

ストレス強度

Fig. 2.11. ストレス物質によるストレス強度と生残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

(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)。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



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 · $12H_2O$	17.1 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 mM
CaCl ₂	0.1 mM

試薬名	濃度
Glucose	4 g/L
NaHPO ₄ • $12H_2O$	3.4 g/L
KH ₂ PO ₄	0.6 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 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。

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ォ トレコーダーTVS062CA(アドバンテック東洋株式会社)を用て行った。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℃、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 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。

$$P(X = x \mid N, M, n) = \frac{\binom{M}{x}\binom{N-M}{n-x}}{\binom{N}{n}}$$
[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。

$$p = \sum_{i=k}^{n} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$
[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ということを示している。





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 (OD₆₀₀ = 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 μ1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 μ M から 4 μ 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-H₂DCFDA; Invitrogen)を用いて測定した。carboxy-H₂DCFDA (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-H₂DCFDA 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) に縣濁し、100% エタノールに溶解させた carboxy-H₂DCFDA を濃度が 10 μ M 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 に縣濁したもの 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。

ЦĻ
11/m
₩ ₩
美
Ğ
Ц
1 8
¥
1th
₩
6
R
昡
ЖÌ
ХП
λ,
5
À
121
得
γ
\mathcal{O}
4
Ň
ĩ
水
K
公公
成分分
主成分分
主成分分
3. 主成分分
3.3. 主成分关
le 3.3. 主成分关
able 3.3. 主成分关

	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	060.0	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	0400	0 EEO	0675	0 765	0100	1000	0010	0000	0010	0000	0.050	000	0000	0.005		Ŧ
寄与率	0.420	000.0	0.0.0	0.1.0	0.040	0.004	0.510	0.00	0.510	0.300	0.200	C/E.D	0.300	0.99.0	×0.333	-

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ういった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ル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、細胞膜に溶け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"

に関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関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, gloL, 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観察されており、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関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関わっている可 能性がある。さらに、鞭毛合成に関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。鞭毛合成に関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。鞭毛合成に関わる代表的な遺伝子の発現量を Fig. 3.10(c)に示す。鞭毛合成に関わる遺伝子群は、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こ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、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
Function	P_{-VG}	Screened	Total	Gene name
	1 - Valuc	members	members	
PC 1 top 5%				
Galactitol metabolic process	$5.98 imes 10^{-6}$	4	4	gatB, gatC, gatY, gatZ
Phosphate transport	$3.58\times10^{\text{-7}}$	9	8	phoB, phoU, pstA, pstB, pstC, pstS
Phosphoenolpyruvate-dependent				
sugar phosphotransferase	$3.01 imes 10^{-4}$	9	20	dhaH, gatB, gatC, manX, manY, manZ
system				
Response to stress	$9.57 imes 10^{-6}$	13	64	clpB, degP, dnaK, grpE, hslJ, hslU, htpG, ldhA, pstS, uspG, relB, relE, yfiA
Response to heat	$1.16 imes 10^{-5}$	8	24	dnaK, groL, groS, grpE, hslJ, hslU, htpG, ldhA
Protein folding	$1.64 imes 10^{-5}$	8	25	degP, dnaK, dsbA, groS, groL, grpE, htpG, ppiA
PC 1 bottom 5%				
Cellular amino acid biosynthetic process	$3.73 imes 10^{-8}$	20	100	argF, argI, aroF, aroM, carA, carB, hisA, hisB, hisC, hisD, hisF, hisG, hisH, hisI, leuL, lySC, metH, pheA, thrL, trpL
Histidine biosynthetic process	4.53×10^{-9}	8	11	hisA, hisB, hisC, hisD, hisF, hisG, hisH, hisI
Arginine biosynthetic process	$3.00 imes 10^{-3}$	4	13	argF, argl, carA, carB
Tricarboxylic acid cycle	$4.05 imes 10^{-4}$	9	21	fumA, mqo, sdhA, sdhB, sdhC, sdhD
				amtB, argT, betT, emrA, entD, fadL, fiu, kgtP, livF, livG, livH, livJ, livK,
Transport	$1.21 imes 10^4$	33	351	livM, modA, modB, ompF, oppA, oppB, oppC, oppD, oppF, proP, putP,
				rbsB, rfbX, sdhA, sdhB, sdhC, sdhD, tsx, uraA, yhbE
Amino acid transport	1.63×10^{-3}	8	46	putP,argT,livF,livG,livM,livH,livK,livJ,
Peptide transport	1.91×10^{-3}	5	19	oppA, oppB, oppC, oppD, oppF
Flagellum organization	4.72×10^{-4}	3	4	flgC, flgD, flhM



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"に関与する遺伝子群(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。





hisB









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、白濁の広がりは、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と関与する可 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。

Turaction	D \dots D	Screened	Total	
r uncuon	r-value	members	members	
PC 2 top 5%				
Cellular amino acid	1 40 \sim 10 ⁻¹⁰	с С	100	argH, aroF, carB, hisB, hisC, hisD, hisH, ilvA, ilvB, ilvC, ilvD, ilvE, ilvM, leuA,
biosynthetic process	1.49×10	C 7	100	leuB, leuC, leuD, trpB, trpC, trpD, trpE, trpL, tyrA
Histidine	$1 < 0 < 10^{-3}$	-	1	
biosynthetic process	$01 \times 0C.1$	4	11	nisd, nisC, nisD, nisH
Tryptophan	1 67 ~ 10 ⁻⁶	v	9	
biosynthetic process	1.01×10	ŋ	D	ирь, ирс, ирь, ирь, ирь
Branched chain				
family amino acid	9.76×10^{-10}	10	17	ilv4, ilvB, ilvC, ilvD, ilvE, ilvM, leuA, leuB, leuC, leuD
biosynthetic process				
Iron ion transport	5.47×10^{-17}	18	30	cirA, entA, entB, entC, entD, entE, entF, fecA, fecB, fecI, fecR, fepA, fepB, fepC, fes,
		10	00	fhuE, fiu, mntH
Enterobactin	667 × 10 ⁻¹⁰	٢	٢	out 1 out R out C out R out R while R
biosynthetic process	0.02×10	-	-	
Iron-sulfur cluster	1 05 ~ 10-4	ų	-	$Q_{2} = Q_{2} = V_{2} = V_{2$
assembly	01 × CU.1	n	11	nscA, 1sco, sujA, sujB, sujD
PC 2 bottom 5%				
Lipopolysaccharide		5	ŬV	משי משי משי משי ושי משי משי משי משי משי משי משי וייו ווון מייי
biosynthetic process	2./U × 1U	17	43	פעום, געוש, זוורב, רומם, רומכי, רומר, רומט, רומט, רומר, רומט, רומט, רומט, רומו
Dipeptide transport	8.29×10^{-5}	4	9	dppB, dppC, dppD, dppF







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が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が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 亿	対する主成分	負荷量の大	はささが上1	な 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
Runotion	D violan	Screened	Total	ana nama
runcuon	r-value	members	members	
PC3 top 5%				
Pyrimidine nucleotide biosynthetic process	$7.00 imes 10^{-8}$	7	10	carA, carB, pyrD, pyrC, pyrF, pyrI, pyrB
Arginine biosynthetic process	$3.25 imes 10^{-8}$	8	13	carA, carB, argF, argA, argE, argC, argB, argI
Methionine biosynthetic process	1.05×10^{-4}	5	11	metC, metR, metB, metF, metA
Glucan biosynthetic process	2.19×10^{-3}	ŝ	9	mdoC, mdoG, mdoB
Peptide transport	1.91×10^{-3}	5	19	oppA, oppB, oppC, oppD, oppF
Iron-sulfur cluster assembly	1.05×10^{-4}	5	11	yfhJ, hscA, iscA, iscU, iscS
PC3 bottom 5%				
Aromatic amino acid family biosynthetic	$2.97 imes 10^{-5}$	7	20	trpC, trpD, trpE, trpL, pheA, tyrA, aroF
process I inonolysecocharida				
biosynthetic process	$3.63 imes 10^{-7}$	13	49	htrL, rfaD, rfaF, rfaK, rfaZ, rfaY, rfaJ, rfaI, rfaB, rfaS, rfaP, rfaG, rfaQ
Dipeptide transport	8.29×10^{-5}	4	9	ydgR, dppF, dppD, dppA
Iron ion transport	1.04×10^{-12}	15	30	entD, fepA, entF, entE, entB, entA, fiu, fhuE, cirA, mntH, feoB, fecB, fecA, fecR, fecI
Enterobactin biosvnthetic process	$9.33 imes 10^{-8}$	9	٢	entD, $entF$, $entB$, $entA$, $ybdB$
Siderophore transport	8.29×10^{-5}	4	9	fepA, fiu, fhuE, fecA



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	$0.497 ~\pm~ 0.004$	0.372 ± 0.006
Ile+	$0.557 ~\pm~ 0.019$	$0.257 ~\pm~ 0.001$	$0.509 ~\pm~ 0.005$	$0.367 ~\pm~ 0.007$
Trp-	0.599 ± 0.003	$0.212 ~\pm~ 0.001$	$0.509 ~\pm~ 0.004$	$0.403 ~\pm~ 0.008$
Trp+	$0.607 ~\pm~ 0.015$	$0.230 ~\pm~ 0.004$	$0.517 ~\pm~ 0.006$	$0.402 ~\pm~ 0.005$
His-	0.557 ± 0.004	$0.189 ~\pm~ 0.008$	$0.499 ~\pm~ 0.016$	$0.399 ~\pm~ 0.009$
His+	$0.493 ~\pm~ 0.002$	$0.212 ~\pm~ 0.004$	$0.441 ~\pm~ 0.006$	$0.397 ~\pm~ 0.003$
FeSO ₄ -	0.495 ± 0.004	0.119 ± 0.008	$0.446 ~\pm~ 0.009$	$0.299~\pm~0.014$
FeSO ₄ +	$0.567 ~\pm~ 0.011$	$0.149 ~\pm~ 0.004$	$0.499 ~\pm~ 0.011$	$0.345 ~\pm~ 0.002$



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。





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 (<u>oxy</u>) stress <u>r</u>egulator]および NrdR[<u>Nrd</u> (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。





69 / 146

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。(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(Fe²⁺)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(Fe³⁺)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 (OH・)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変化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 Vasiliy 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 (Vasiliy 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(Gonzaletz 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(Gonzaletz 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 ステマ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。

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

$$[4.1]$$

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。

$$R(i) = \frac{\sum_{j=1}^{n} w(i, j)}{n}$$
 [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 1 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) に従い行った。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	time p	oint					
	1	2	3	4	5	9	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					*		*

MIPS functional category	time	point					
	1	0	б	4	5	9	٢
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	* *		*	*	*		

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)

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±3.29×σ)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。



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 meetabolism
- ⑦ Pyrimidine metabolism
- (8) Sulfur metabolism
- (9) Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
- 10 Galactose meta bolism
- ① 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ということが可能である。

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に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が変化した代謝経路

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が変化した代謝経路

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。

Table 5.1. $\pm \beta / \cdot$	ールストレスの	有無によって発現	量が変化した代謝経路の一例	(Appendix-Table 4,5 より抜粋)				
代謝分子名					遺伝山	名名		
PC1 上位(工	タノール存在下	ら時の(異土現きの	}ネットワークの一例					
D-Ribose 5-phosphate	Adenine	Hvpoxanthine	Inosine	Adenosine	Amn	ade	deoD	add
Pyruvate	Phosphoenolpyru	IDP	Cytidine	Uridine	sdd	pykA pykF	udk	cdd
	vate							
Pyruvate	Phosphoenolpyru	IDP	Cytidine	Cytosine	sdd	pykA pykF	udk	rihB
	vate							
(S)-Malate	Pyruvate	dGDP	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	sfcA	pykA pykF	nrdA nrdB	nrdD
							nrdF nrdF	
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(R)-Lactate	Glutathione	Halide	sdd	IdhA dId	gloB	gst
(R)-Lactate	Pyruvate	Formate	2-Amino-4-hydroxy-6-(erythro-1,2,	2-Amino-4-hydroxy-6-(D-erythro-1,2,3-tri	ldhA dld	ybiW ofIB	folE	PhoA
			3-trihydroxypropyl)dihydropteridine	hydroxypropyl)-7,8-dihydropteridine		tdcE nfID		
			triphosphate) ž		
PC1 下位(工	タノール存在下	で発現低下)の部分	うネットワークの一例					
Pyruvate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	L-Histidine	trpD troE	hisC	hisB	hisD
L-Aspartate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	L-Histidine	aspC	hisC	hisB	hisD
L-Glutamate	beta-Alanine	L-Aspartate	L–Citrulline	L-Ornithine	DuuE	panD	argG	argF arol
L-Glutamate	L-Glutamine	Carbamoyl phosphate	L-Ornithine	N2-Acetyl-L-ornithine	ghB ehD	carA carB	argF arel	argE
N-Carbamoyl-L-aspart	Carbamoyl	L-Citrulline	L-Aspartate	4-Phospho-L-aspartate	pyrB	argF argI	argG	thrA metL
ate	phosphate							lysC
Glycine	5-Phosphoribosy	L-Glutamate	L-Glutamine	Carbamoyl phosphate	purD	purF	glnA	carA carB
	lamine							

り抜粋)。
6,7 L
Table
(Appendix-7
-例
た代謝経路の-
たし
で発現量が変
レ適応株と
(- (
親株とエタ、
Table 5.2.

代謝分子名					遺伝子名	м		
PC2 上位(5	適応株において	発現上昇)の部分ネットワー	-クの一例					
Pyruvate	L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	2–Isopropylmalate	2-Isopropylmaleate	trpD trpE	ilvE	leuA	leuC leuD
L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	(S)-2-Acetolactate	3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobut	glmS	trpD trpE	ilvI ilvH	ilvC
				anoate			ivN IVB IVM	
Isochorismate	Pyruvate	2-(alpha-Hydroxyethyl)thiamine	(S)-2-Acetolactate	3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobut	entB	aceE	ivi Ivii Hvii	ilvC
		diphosphate		anoate			ilvN Bvli BvA	
L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	L-Glutamate	L-Leucine	trpA traB	tnaA	trpD trnF	ilvE
L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxyben	2,3-Dihydroxybenzoate	trpB trpB	tnaA	entB	entA
			zoate					
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	L–Tryptophan	L-Tryptophanyl-tRNA(Trp)	entC menF	entB	tnaA	trpS
PC2 下位(適応株において	発現低下)の部分ネットワー	-クの一例					
Pyruvate	(S)-Lactate	(S)-Lactaldehyde	Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphono	<i>DPII</i>	aldA	fucA	fbaB
				oxy)-propanal				
Fumarate	(S)-Malate	Pyruvate	(S)-Lactate	(S)-Lactaldehyde	fumA fumB	sfcA	<u> D</u> pli	Able
(S)-Lactate	Pyruvate	3-Methyl-2-oxobutanoate	Tetrahydrofolate	Dihy drofolate	Umo IIdD	avtA	panB	folA folM
(R)-Lactate	Glutathione	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	gloB	ggt	gadA PadB	ydcW
L-Alanine	Pyruvate	Methylglyoxal	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	avtA	AldA	mgsA	gpsA
Lipopolysaccharide	UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Amylose	ADPglucose	rfaJ	galF galU	malP eleP	glgA
UDPglucose	D-Glucose	D-Glucose	alpha,alpha-Trehalose	alpha,alpha-Trehalose	galF galU	agp	treF	otsB
	1-phosphate			6-phosphate				
UDPglucose	D-Glucose	Amylose	D-Glucose	alpha,alpha-Trehalose	galF galU	malP gigP	ma/Q	treA treF
	1-phosphate							

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 内プール量が変化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、 チオレドキシンと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(Vasiliy 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 ス耐性に関与する情報や、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、鉄イオン輸送に関与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与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 量が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理由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 ノールは両親媒性質分子であるため、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撹乱を与える。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撹乱が生じる(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)_o

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が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することが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.

Brissette 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, Muñiz-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. *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 USA. 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 Biotechn ol.* 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 *Escherchia 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'-dichlorofluorescin-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, Szmidt 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.

Strelioff 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

о • П
Ŕ
N-
户
2
No
to
1/2
Ţ
Ч×
,
J
н¦п
i∥i⊡ N⊓
惡
6
N,
占
17
韻
Ł
Ū,
ţ,
حہ
Ħ
Ň
1
حہ
5 2 2
いない
いたおい
10 におい
4.10 におい
5.4.10 におい
Fig. 4.10 におい
* Fig. 4.10 におい
び Fig. 4.10 におい
よび Fig. 4.10 におい
3よび Fig. 4.10 におい
および Fig. 4.10 におい
.9 および Fig. 4.10 におい
4.9 および Fig. 4.10 におい
ig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
簀 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
: 章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
:4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
第4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
第4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
. 第4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
e1. 第4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
ole 1. 第4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい
able 1. 第4章 Fig. 4.9 および Fig. 4.10 におい

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
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
3 mob	3-methyl-2-oxobutanoate
Val-L	L-valine
Gal	D-galactose
Gallp	alpha-D-Galactose 1-phosphate
UDPg	UDPglucose
Amy	amylose
Glp	D-glucose 1-phosphate

Table 2. Sc 優勢では	あるような遺伝子を多	るく含む部分ネット	、ワーク					
代謝分子					遺伝子名			
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	CYS4	GSH1	AATI	URA2
							AAT2	
							ASNI	
							ASN2	
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-	Glycine	L-Threonine	CYS4	GSH1	GSH2	פרגו
		cysteine						
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	Oxaloacetate	(S)-Malate	CYS4	GSH1	AATI	IHOW
							AAT2	MDH2
								800 CHOM
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-	Glutathione	Oxidized glutathione	CYS4	GSH1	GSH2	GLR1
		cysteine						
Carbamoyl phosphate	L-Aspartate	Oxaloacetate	Pyruvate	(S)-Lactate	URA2	AATI	PYC2	CYB2
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	Pyruvate	(S)-Lactate	CYS4	GSH1	YDR111C	CYB2
							YL R089C	
Pyruvate	Oxaloacetate	L-Glutamate	L-Cysteine	L-Serine	PYCI	AATI	GSHI	CYS4
					PYC2	AA 72		
L-Glutamate	gamma-L-Glutamyl-L-cys	Glycine	L-Threonine	O-Phospho-L-homos	GSH1	GSH2	UT 7.1	THR4
	teine			erine				
2-amino-4-hydroxy-6-(eryt	GTP	GDP	GMP	3,5-Cyclic GMP	FOL2	YNKI	GUKI	PDE1
hro-1,2,3-trihydroxypropyl)d								PDE2
ihydropteridine								
Glycine	gamma-L-Glutamyl-L-cys	L-Glutamate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	GSH2	GSH1	AATI	URA2
	teine						AAT2	
L-Cysteine	L-Glutamate	Oxaloacetate	(S)-Malate	Fumarate	GSH1	AATI	1HDM	FUMI
						AA 72	MDH2	
							8HDH3	
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Aspartate	L-Glutamate	L-Cysteine	ARG3	URA2	AATI	GSH1
							AAT2	

Idule 7. DC 変劣して	りつよりは見仏丁とる	ダくらど同じイント						
代謝分子					遺伝子名			
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	L-Aspartate	4-Phospho-L-asparta te	CYS4	GSH1	ААТI ААТ2	ЕМОН
2-Oxoglutarate	L-Glutamate	L-Cysteine	L-Serine	0-Phospho-L-serine	AATI	GSH1	CYS4	SER2
(S)-Lactate	Pyruvate	Oxaloacetate	(S)-Malate	Fumarate	AA T2 CYB2	PYC2	ЕНДМ	FUMI
Fumarate	(S)-Malate	Oxaloacetate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	FUMI	1HDW	AATI	URA2
						MDH2	<i>AAT2</i>	
						8HDH3	ASNI	
							ASN2	
N-Carbamoyl-L-aspartate	L-Aspartate	L-Glutamate	L-Cysteine	O-Acetyl-L-serine	URA2	AATI	GSHI	MET17YG
						AA 72		R012W
						ASNI		
						ASN2		
L-Cysteine	L-Glutamate	Oxaloacetate	Pyruvate	(S)-Lactate	GSH1	AATI	PYCI	CYB2
						AA 72	PYC2	
S-Adenosyl-L-methionine	L-Methionine	L-Homocysteine	L-Serine	O-Phospho-L-serine	SAM1	MET6	CYS4	SER2
					SAM2			
UTP	UDP	UMP	Orotidine	5-Phospho-alpha-D-r	YNKI	1 CINY	URA3	URA5
			5-phosphate	ibose 1-diphosphate				URA 10
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-	Glycine	tRNA(Gly)	CYS4	GSH1	GSH2	GRS1
		cysteine						
O-Phospho-L-serine	L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	L-Glutamyl	SER2	CYS4	GSH1	PR01
				5-phosphate				
Glycine	gamma-L-Glutamyl-L-cys	L-Cysteine	L-Serine	O-Phospho-L-serine	GSH2	GSH1	CYS4	SER2
	teine							

Table 3 Sc 優塾であるようた遺伝子を多く含む部分ネットワーク(結ま)

代謝分子					遺伝子名			
2-Oxoglutarate	L-Glutamate	gamma-L-Glutamy -L-	Glycine	L-Threonine	AA 71	GSH1	GSH2	UT XI
		cysteine			AA 72			
L-Serine	L-Cysteine	gamma-L-Glutamyl-L-	Glycine	L-2-Amino-3-oxobut	CYS4	GSH1	GSH2	HEM1
		cysteine		anoate				
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	Succinate	CYS4	GSH1	GADI	UGA1
				semialdehyde				
L-Serine	L-Cysteine	L-Glutamate	2-Oxoglutarate	Thiamin diphosphate	CYS4	GSH1	AATI	KGD1
							AAT2	
L-Glutamate	L-Cysteine	L-Serine	3-Dehydrosphingani	Sphinganine	GSH1	CYS4	LCB1	<i>TSC10</i>
			ne				LCB2	
L-Cysteine	L-Glutamate	2–Oxoglutarate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	GSH1	GDH1	AATI	URA2
						GDH3	<i>AAT2</i>	
							ASNI	
							ASN2	
Acetyl-CoA	(S)-Malate	Oxaloacetate	L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	DAL 7	1HDW	AATI	URA2
					IS7W	MDH2	AAT2	
						8HDH3	ASNI	
							A.SN2	

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)

Table 3. Sb 優勢では	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	MET3	MET14	MET16	METIO
					MET22		
UDP-D-galactose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	Amylose	GAL 10	GAL7	GPH1	GDB1
Adenylylsulfate	3-Phosphoadenylyl sulfate	Sulfite	O-Acetyl-L-homos	MET3	MET14	MET16	MET17
			erine		MET22		
Sulfite	3-Phosphoadenylyl sulfate	Adenylylsulfate	P1,P4-Bis(5-adenos	METIO	METI6	MET14	APAI
			yl) tetraphosphate			MET22	APA2
Adenylylsulfate	3-Phosphoadenylyl sulfate	Sulfite	O-Acetyl-L-serine	MET3	MET14	MET16	MET17
					MET22		YGR012W
UDP-D-galactose	UDPglucose	Amylose	D-Glucose	GAL7	GAL 10	GSYI	GPH1
			1-phosphate			GSY2	
alpha-D-Galactose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	Amylose	GAL1	GAL7	GPH1	GDB1
1-phosphate				GAL3			
UDP-D-galactose	UDPglucose	Amylose	Starch	GAL7	<i>GAL 10</i>	USV1	GDB1
						GSY2	
UDP-D-galactose	UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	GAL7	GAL 10	UGP1	СРН1
						VHL012W	
Amylose	Starch	D-Glucose 1-phosphate	UDP-D-galactose	USV1	GDB1	GPH1	GAL 7
				GSY2			
Amylose	D-Glucose 1-phosphate	UDPglucose	alpha-D-Galactose	GDB1	GPH1	UGP1	GAL 7
			1-phosphate			VHL012W	
alpha-D-Galactose	D-Galactose	Melibiose	Raffinose	GAL7	GAL1	MAL 12	SUC2
1-phosphate					GAL3	MAL 32	
						FPS2	
						YGR287C	
						YIL 172C	
						YJL216C	
						X0T 127C	

代謝分子				遺伝子名			
alpha-D-Galactose	UDP-D-galactose	UDPglucose	Amylose	GAL1	GAL7	GAL10	GSYI
1-phosphate				GAL3			GSY2
Starch	Amylose	UDPglucose	UDP-D-galactose	GPH1	GDB1	GSYI	<i>GAL 10</i>
						GSY2	
UDP-D-galactose	alpha-D-Galactose 1-phosphate	D-Galactose	D-Glucose	GAL 10	GAL7	GAL1	MAL 12
						GAL3	MAL 32
							FPS2
							YGR287C
							YIL 1 72C
							YJL216C
							YOL 157C
alpha-D-Galactose	UDPglucose	Amylose	D-Glucose	GAL1	GAL7	USY1	СРН1
1-phosphate			1-phosphate	GAL3		GSY2	
UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	alpha-D-Galactose	D-Galactose	<i>GAL10</i>	UGP1	GAL7	GAL 1
		1-phosphate			ХНГ012М		GAL3
UDPglucose	UDP-D-galactose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	IPSI	GAL 10	GAL7	СРН1
				TPS2			
				TPS3			
				1 TST 1			
UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	Amylose	<i>GAL10</i>	UGP1	GPH1	GDB1
					YHL012W		
UDP-D-galactose	D-Glucose 1-phosphate	alpha-D-Glucose	beta-D-Fructose	<i>GAL10</i>	GAL7	PGM1	SUC2
		6-phosphate				PGM2	
						YMR278W	
alpha-D-Galactose	UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	GAL1	GAL7	UGP1	GPH1
1-phosphate				GAL3		XHL012W	

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)

Table 3. Sb 優勢でま	らるような遺伝子を多く含む部	分ネットワーク(続	(や				
代謝分子				遺伝子名			
Amylose	UDPglucose	alpha-D-Galactose	D-Galactose	GDB1	GSY1	GAL7	GAL 1
		1-phosphate			GSY2		GAL3
UDP-D-galactose	D-Glucose 1-phosphate	Starch	alpha-D-Glucose	GAL 10	GAL7	GPH1	BSC1
							SGAI
							MUCI
Amylose	D-Glucose 1-phosphate	UDPglucose	alpha,alpha-Trehalo	GDB1	GPH1	GAL7	IPSI
			se 6-phosphate				TPS2
							TPS3
							1 7ST 1
alpha-D-Galactose	UDP-D-galactose	UDPglucose	alpha,alpha-Trehalo	GAL1	GAL7	GALIO	IPSI
1-phosphate			se 6-phosphate	GAL3			TPS2
							TPS3
							1 7ST 1
beta-D-Fructose	alpha-D-Glucose	beta-D-Glucose	beta-D-Glucose	SUC2	MAL 12	CAT 10	פראו
			6-nhosnhate		MAL 32		HXKI
					FPS2		HXK2
					YGR287C		
					YIL 172C		
					7.11 216C		
					X07127C		
2-Acetolactate	2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate	3-Methyl-2-oxobutanoat	L-Valine	IL V2	IL V5	11 1/3	BATI
		Û		IL V6			BAT2
D-Glucose 1-nhosnhate	DP¤ ircose	Amvioce	Starch	212	1001	1725	GDR1
			5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	Ì	50		
					ҮНL012W	GSY2	
alpha-D-Galactose	D-Glucose 1-phosphate	alpha-D-Glucose	beta-D-Fructose	GAL1	GAL7	PGM1	SUC2
1-phosphate		6-phosphate		GAL3			
(S)-Malate	Pyruvate	L-Serine	CDP diacylglycerol	FUM1	MAET	CHAI	СНО1

I noto				~				
代謝分子名					遺伝子	名		
S-Adenosyl-L-methio	S-Adenosyl-L-homocys	Adenine	Adenosine	Inosine	cheR	pfs	deoD	ppe
nine	teine							
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	IDP	Cytidine	Uridine	sdd	pykF	udk	cdd
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	IDP	Cytidine	Cytosine	sdd	pykF	udk	rihB
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	D-Erythrose	Glycerone phosphate	Glycerone	sdd	aroG	fbaB	PhoA
		4-phosphate						
Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	dGDP	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	sdd	pykF	hrdA	nrdD
Pyruvate	(2R)–2–Hydroxy–3–(pho	2-Deoxy-D-ribose	2-Deoxy-D-ribose 1-phosphate	Guanine	dgoA	deoC	deoB	deoD
	sphonooxy)-propanal	5-phosphate						
Glycine	Glutathione	Formate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	gshB	frmB	Widy	sdd
Glycine	L-Cysteine	Mercaptopyruvate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	Ndəd	aspC	sseA	sdd
Glycine	Tetrahydrofolate	Formate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	<i>giyA</i>	purU	Widy	sdd
UDP-N-acetyl-D-gluc	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonooxy)-pr	3-Phospho-D-glyceroyl	murA	sdd	dgoA	gapA
osamine			opanal	phosphate				
Formate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho	Glycerone phosphate	Glycerone	Widų	dgoA	gatY	PhoA
		sphonooxy)-propanal						
Thiamin diphosphate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho	Glycerone phosphate	Glycerone	aceE	dgoA	gatY	PhoA
		sphonooxy)-propanal						
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	Formate	2–Amino–4–hydroxy–6–(erythro–1,2,3–t	2-Amino-4-hydroxy-6-(D-eryt	sdd	Widy	foIE	PhoA
			rihy droxy propyl) dihy dropteridine	hro-1,2,3-trihydroxypropyl)-7,8				
			triphosphate	-dihydropteridine				
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	Formate	Tetrahydrofolate	3-Methyl-2-oxobutanoate	sdd	Widy	folD	panB
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Tryptophan	(2R)–2–Hydroxy–3–(phosphonooxy)–pr	D-Tagatose 1,6-bisphosphate	sdd	tnaA	trpA	gatY
			opanal					
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(R)-Lactate	Glutathione	Halide	sdd	IdhA	gloB	gst
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	L-Histidine	sdd	trpD	gadB	pepD
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Glutamate	beta-Alanine	L-Histidine	sdd	trpD	puuE	pepD

Table 4. $\pm \beta$	ールストレスによっ	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-(pho	D-Fructose 6-phosphate	D-Fructose 1,6-bisphosphate	sdd	dgoA	tktB	pfkB
		sphonooxy)–propanal						
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho	Glycerone phosphate	Methylglyoxal	sdd	dgoA	fbaB	mgsA
		sphonooxy)-propanal						
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho	D-Ribose 5-phosphate	Adenine	sdd	dgoA	tktB	amn
		sphonooxy)-propanal						
Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3–Dihydro–2,3–dihydro	2,3–Dihy droxy benzoate	(2,3-Dihydroxybenzoyl)adenylat	sdd	entB	entA	entE
		xybenzoate		υ				
L-Tryptophan	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	IDP	D-Fructose 6-phosphate	tnaA	sdd	pykF	pfkB
IDP	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	L-Tryptophan	L-Tryptophanyl-tRNA(Trp)	pykF	sdd	tnaA	trpS
IDP	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate	2,3-Dihy droxybenzoate	pykF	sdd	entB	entA
IDP	Uridine	D-Ribose 1-phosphate	Adenosine	Inosine	udk	dpn	deoD	add
Glycerone phosphate	(2R)–2–Hydroxy–3–(pho	Pyruvate	dGDP	Thioredoxin	gatY	dgoA	pykF	nrdA
	sphonooxy)-propanal							
Glycerone phosphate	D-Tagatose	IDP	Pyruvate	(S)-Malate	gatY	pfkB	pykF	sfcA
	1,6-bisphosphate							
D-Ribose 5-phosphate	Adenine	Hypoxanthine	Inosine	Adenosine	amn	ade	deoD	add
5-Phospho-alpha-D-ri	Hypoxanthine	Adenine	Adenosine	Inosine	hpt	ade	deoD	add
bose 1-diphosphate								
(S)-Malate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	Nucleoside triphosphate	Nucleotide	sfcA	sdd	pykF	mazG
(S)-Malate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho	Glycerone phosphate	Methylglyoxal	sfcA	dgoA	gatY	mgsA
		sphonooxy)-propanal						
(S)-Malate	Pyruvate	dGDP	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	sfcA	pykF	nrdA	nrdD
(S)-Malate	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho	D-Tagatose 1,6-bisphosphate	D-Tagatose 6-phosphate	sfcA	eda	gatY	pfkB
		sphonooxy)-propanal						
Glycerone	Glycerone phosphate	(2R)–2–Hydroxy–3–(pho	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate	2,3-Bisphospho-D-glycerate	PhoA	gatY	gapA	gpmA
		sphonooxy)-propanal						
代謝分子名					遺伝子	名		
------------------	-----------------------	-----------------------	---------------------------------------	---------------------------------	------	------	------	------
Adenosine	Inosine	D-Ribose 1-phosphate	Uridine	Cytidine	add	deoD	dpn	cdd
(R)-Lactate	Pyruvate	Formate	2–Amino–4–hydroxy–6–(erythro–1,2,3–t	2–Amino–4–hydroxy–6–(D–eryt	IdhA	VbiW	folE	PhoA
			rihy droxy propyl) dihy dropteri dine	hro-1,2,3-trihydroxypropyl)-7,8				
			triphosphate	-dihydropteridine				
Orotate	5-Phospho-alpha-D-rib	Hypoxanthine	Inosine	Adenosine	pyrE	hpt	deoD	add
	ose 1-diphosphate							
Uridine	Cytidine	dGDP	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	cdd	udk	nrdA	nrdD
Xanthine	Guanine	D-Ribose 1-phosphate	Uridine	Cytidine	guaD	deoD	dpn	cdd
(S)-Lactaldehyde	Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(pho	2-Deoxy-D-ribose 5-phosphate	2-Deoxy-D-ribose	fucA	gatY	deoC	deoB
		sphonooxy)-propanal		1-phosphate				

Table 5. $\pm \beta / -$	・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	子名		
Pyruvate	L-Cysteine	L-Glutamate	Carbamoyl phosphate	L-Ornithine	malY	gshA	carA	argF
Pyruvate	L-Glutamate	Carbamoyl phosphate	L-Citrulline	L-Aspartate	trpD	carA	argF	argG
Pyruvate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	L-Histidine	trpD	hisC	hisB	hisD
L-Glutamate	L-Glutamine	Carbamoyl phosphate	L-Ornithine	N2-Acety -L-	gltB	carA	argF	argE
				ornithine				
L-Glutamate	L-Glutamine	5-Phospho-alpha-D-ribose	Phosphoribosyl-ATP	Phosphoribosy	glnA	purF	hisG	hisI
		1-diphosphate		I-AMP				
L-Glutamate	beta-Alanine	L-Aspartate	L-Citrulline	L–Ornithine	BuuE	panD	argG	argF
L-Glutamate	5-Phospho-alpha-D-ribose	1–(5–Phosphoribosyl)–5–amino–4–i	Tetrahydrofolate	5-Methyltetra	purF	apt	purH	metH
	1-diphosphate	midazolecarboxamide		hydrofolate				
UDPglucose	alpha,alpha-Trehalose	alpha,alpha-Trehalose	D-Glucose	D-Glucono-1,	otsA	otsB	treA	gcd
	6-phosphate			5-lactone				
Glycine	5-Phosphoribosylamine	L-Glutamate	L-Glutamine	Carbamoyl	purD	purF	glnA	carA
				phosphate				
Glycine	5-Phosphoribosylamine	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	purD	purF	hisC	hisB
L-Aspartate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	L-Histidine	aspC	hisC	hisB	hisD
L-Aspartate	beta-Alanine	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	DanD	BuuE	hisC	hisB
L-Aspartate	Fumarate	N-(L-Arginino)succinate	L-Citrulline	L–Ornithine	aspA	argH	argG	argF
L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	5-Phospho-alpha-D-ribose	Phosphoribosy	pyrB	carA	purF	hisG
			1-diphosphate	I-ATP				
UDP-D-galactose	UDPglucose	alpha,alpha-Trehalose 6-phosphate	D-Glucose	D-Glucono-1,	galE	otsA	treC	gcd
				5-lactone				
L-Serine	O-Phospho-L-serine	L-Glutamate	Carbamoyl phosphate	L-Ornithine	serB	serC	carA	argF
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	L-Glutamine	5-Phosphoribo	argF	carA	gltB	purL
				syl-N-formylgl				
				ycinamide				
L-Ornithine	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4–Aminobutan	argF	carA	gadB	ydcW
				6				

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

Table 5. $\pi \beta / -$	ルストレスによって発現	<u>、量が低下した遺伝子を多くき</u>	含む部分ネットワーク(続き	٤)				
代謝分子名					遺伝子	名名		
N-Carbamoyl-L-aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Citrulline	L-Aspartate	4-Phospho-L-	pyrB	argF	argG	thrA
				aspartate				
N-Carbamoy -L-aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Citrulline	L-Aspartate	Iminoaspartate	pyrB	argF	argG	nadB
4-Aminobutanal	4-Aminobutanoate	L-Glutamate	L-Histidinol phosphate	L-Histidinol	ydcW	gadB	hisC	hisB
L-Histidinol	L-Histidinol phosphate	L-Glutamate	N-Acetyl-L-glutamate	N-Acety -L-g	hisB	hisC	argA	argB
				utamate				
				5-phosphate				
L-Histidinol	L-Histidinol phosphate	L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	2-Isopropylmal	hisB	hisC	ilvE	leuA
				ate				

	40	
~	n N	

代謝分子名					遺伝子	名		
Pyruvate	L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	2-Isopropylmalate	2-Isopropylmaleate	trpD	ilvE	leuA	leuD
Pyruvate	L-Glutamine	L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	2–Isopropylmalate	trpD	glmS	ilvE	leuA
Pyruvate	Isochorismate	Chorismate	Prephenate	3–(4–Hydroxyphenyl)py	entB	entC	pheA	tyrA
L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxyb	2,3-Dihydroxybenzoate	asnB	trpD	entB	entA
L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	enzuere (S)-2-Acetolactate	3-Hydroxy-3-methyl-2 -oxobutanoate	glmS	trpD	iivī	ivc
L-Glutamate	3-Methyl-2-oxobutanoate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxyb enzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	ilvE	avtA	entB	entA
Glycine	L-Cysteine	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxyb enzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	<i>pepN</i>	ma/Y	entB	entA
Glycine	L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	Isochorismate	<i>BlyA</i>	trpA	tnaA	entB
Glycine	5-Phosphoribosylamine	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	purD	purF	trpD	entB
UDP-N-acetyl-D-glucos amine	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxyb enzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	murA	sdd	entB	entA
L-Aspartate	L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	Isochorismate	aspC	glmS	trpD	entB
L-Aspartate	Carbamoyl phosphate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	pyrB	carA	trpD	entB
L-Aspartate	Prephenate	Chorismate	Pyruvate	Isochorismate	tyrB	pheA	trpD	entB
Formate	Pyruvate	2,3–Dihydro–2,3-dihydroxybenzo ate	2,3-Dihydroxybenzoate	(2,3-Dihydroxybenzoyl) adenylate	ybiW	entB	entA	entE
Formate	10-Formyltetrahydrofolate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	folD	folC	trpD	entB
L-Serine	O-Phospho-L-serine	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	serB	serC	trpD	entB
L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	L-Glutamate	L-Leucine	trpA	tnaA	trpD	ihE
L-Serine	L-Tryptophan	Pyruvate	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxyb enzoate	2,3-Dihydroxybenzoate	trpA	tnaA	entB	entA
L-Serine	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosp honoovy)-neonanal	Pyruvate	L-Glutamate	L-Leucine	trpA	dgoA	trpD	ilvE
	попосху/ргорана							

ź
D
1
~
~
×
ì
K
뛢
.5
401
(11)
~
•.N
441
the
×1
T
ĺΝ
ЩЩ.
通
4
<
حہ
Ρ
4
単して
上昇して
シームに
が上昇して
量が上昇して
見量が上昇して
き現量が上昇して
発現量が上昇して
て発現量が上昇して
いて発現量が上昇して
いて発現量が上昇して
おいて発現量が上昇して
こおいて発現量が上昇して
において発現量が上昇して
株において発現量が上昇して
芯株において発現量が上昇して
飯店株において発現量が上昇して
適応株において発現量が上昇して
適応株において発現量が上昇して

Table 6. 適応株(において発現量が上身	早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-(phosp	Pyruvate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxyb	2,3-Dihydroxybenzoate	trpA	dgoA	entB	entA
	honooxy)-propanal		enzoate					
L-Tryptophan	Pyruvate	L-Glutamine	L-Glutamate	L-Leucine	tnaA	trpD	carA	iNE
L-Cysteine	Mercaptopyruvate	Pyruvate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxyb	2,3-Dihydroxybenzoate	aspC	sseA	entB	entA
			enzoate					
beta-Alanine	L-Glutamate	L-Glutamine	Pyruvate	Isochorismate	puuE	pyrG	trpD	entB
Tetrahydrofolate	3-Methyl-2-oxobutanoate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	panB	ilvE	trpD	entB
IDP	Phosphoenolpyruvate	Pyruvate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxyb	2,3-Dihydroxybenzoate	pykF	sdd	entB	entA
			enzoate					
L-Leucine	L-Glutamate	Chorismate	Prephenate	3–(4–Hydroxyphenyl)py	ilvE	trpD	pheA	tyrA
				ruvate				
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxy	Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosph	1-Deoxy-D-xylulose	entA	entB	dgoA	sxp
	benzoate		onooxy)-propanal	5-phosphate				
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxy	Pyruvate	L-Aspartate	L-Homoserine	entA	entB	yagE	thrA
	benzoate		4-semialdehyde					
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxy	Pyruvate	2,3-Dihydrodipicolinate	2,3,4,5-Tetrahydrodipic	entA	entB	yagE	dapB
	benzoate			olinate				
2,3-Dihydroxybenzoate	2,3–Dihydro–2,3–dihydroxy	Pyruvate	2-Dehydro-3-deoxy-6-phos	6-Phospho-D-gluconat	entA	entB	eda	edd
	benzoate		pho-D-gluconate	в				
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	Phosphoenolpyruvate	D-Erythrose	entC	entB	sdd	aroG
				4-phosphate				
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	(S)-2-Acetolactate	3-Hydroxy-3-methyl-2	entC	entB	ilvl	ivc
				-oxobutanoate				
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	L-Tryptophan	L-Tryptophanyl-tRNA(entC	entB	tnaA	trpS
				Trp)				
Chorismate	Isochorismate	Pyruvate	L-Alanine	Selenide	entC	entB	avtA	sufS
Orotate	5-Phospho-alpha-D-ribos	L–Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	pyrE	purF	trpD	entB
	e 1-diphosphate							

代謝分子名					遺伝子	殆		
Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	dGDP	Pyruvate	Isochorismate	nrdD	nrdA	pykF	entB
4-Aminobenzoate	Dihydropteroate	L-Glutamate	Pyruvate	Isochorismate	foIP	thyA	trpD	entB
Isochorismate	Pyruvate	2–(alpha–Hydroxyethyl)thiamine	(S)-2-Acetolactate	3-Hydroxy-3-methyl-2	entB	aceE	ilvī	ilvC
		diphosphate		-oxobutanoate				
Isochorismate	Pyruvate	L-Glutamate	L-Glutamyl 5-phosphate	L-Glutamate	entB	trpD	proB	proA
				5-semialdehyde				
2–Isopropylmalate	3-Methyl-2-oxobutanoate	L-Glutamate	L-Aspartate	Iminoaspartate	leuA	ilvE	aspC	nadB

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言	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	(Ip)	aldA	fucA	gpsA
Pyruvate	(S)-Lactate	(S)-Lactaldehyde	Glycerone phosphate	(2R)–2–Hydroxy–3–(phosph onooxy)–propanal	<i>DPII</i>	aldA	fucA	fbaB
Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	L-Cysteine	O-Succinyl-L-homoserine	sdaA	cysE	cysK	metB
Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	Selenide	Selenite	sdaA	cysE	cysK	cysl
Pyruvate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphono	D-Erythrose 4-phosphate	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	dgoA	tktB	fbaB	gpsA
L-Glutamate	oxy/ propanal L-Glutamine	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Uracil	Cytosine	glnA	purF	ddn	codA
UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	D-Glucose	alpha,alpha-Trehalose	alpha,alpha-Trehalose 6-phosphate	galU	agp	treA	otsB
UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Amylose	D-Glucose	alpha,alpha-Trehalose	galU	malP	malQ	treA
Glycine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	L-Threonine	O-Phospho-L-homoserine	L-Homoserine	q	tdh	thrC	thrB
L-Alanine	Pyruvate	Methylglyoxal	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	avtA	AldA	mgsA	gpsA
L-Alanine	Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	L-Cysteine	avtA	SdaA	cysE	cysK
L-Alanine	Pyruvate	(2R)–2–Hy droxy–3–(phosph onooxy)–propanal	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	avtA	dgoA	tpiA	gpsA
L-Aspartate	L-Asparagine	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	asnA	asnB	gadB	ydcW
L-Aspartate	L-Asparagine	L-Glutamine	L-Glutamate	N-Acetyl-L-glutamate	asnA	asnB	glnA	argA
3-Phosphoadenylyl sulfate	Thioredoxin	Oxidized thioredoxin	O-Acetyl-L-serine	L-Serine	cysH	nrdD	cysK	cysE

通に株にないて登録量が低下していた遺伝子を多く会む部分ネットロ・

Table 7. 適応株	ミにおいて発現量が低下1	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	frmB	ggt	gadB	ydcW
L-Serine	O-Acetyl-L-serine	Thioredoxin	3-Phosphoadenylyl sulfate	Adenylylsulfate	cysE	cysK	cysH	CNSC
D-Fructose 6-phosphate	D-Erythrose 4-phosphate	(2R)–2–Hydroxy–3–(phosph onooxy)–propanal	Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	tktB	talB	fbaB	gpsA
sn-Glycerol 3-phosphate	Glycerone phosphate	Methylglyoxal	Pyruvate	Ferricytochrome b1	gpsA	mgsA	aldA	Bxod
sn-Glycerol 3-phosphate	Glycerone phosphate	Glycolaldehyde	2–Amino-4-hydroxy-6-(D-er ythro-1,2,3-trihydroxypropyl) -7,8-dihydropteridine	2-Amino-4-hydroxy-6-(ery thro-1,2,3-trihydroxypropyl)dihydropteridine triphosphate	gpsA	rhaD	folB	<i>Aohq</i>
Tetrahydrofolate	Dihydrofolate	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	folA	thyA	gadB	ydcW
Tetrahydrofolate	Glycine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	L-Threonine	O-Phospho-L-homoserine	gcvT	kbl	tdh	thrC
Glycerone phosphate	sn-Glycerol 3-phosphate	CDP diacylglycerol	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	gpsA	pgsA	pssA	cysE
Glycerone phosphate	(2R)-2-Hydroxy-3-(phosphono oxy)-propanal	Pyruvate	(S)-Malate	Fumarate	fbaB	dgoA	sfcA	fumC
Fumarate	(S)-Malate	Pyruvate	(S)-Lactate	(S)-Lactaldehyde	fumC	sfcA	<i>CIPII</i>	aldA
Fumarate	(S)-Malate	Pyruvate	L-Serine	O-Acetyl-L-serine	fumC	sfcA	SdaA	cysE
(S)-Lactate	Pyruvate	3-Methyl-2-oxobutanoate	Tetrahydrofolate	Dihydrofolate	[[dD	avtA	panB	fo/A
L-Threonine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	Glycine	5,10-Methylenetetrahydrofol ate	5-Methyltetrahydrofolate	tdh	<i>kbl</i>	gcvT	metF
Nicotinate	5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate	Uracil	Cytosine	Cytidine	pncB	ddn	CodA	rihB

代謝分子名					遺伝子	名		
(R)-Lactate	Glutathione	L-Glutamate	4-Aminobutanoate	4-Aminobutanal	gloB	ggt	gadB	ydcW
Lipopolysaccharide	UDPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Amylose	ADPglucose	rfaJ	Uleg	malP	glgA
Dihydrofolate	Tetrahydrofolate	Glycine	L-2-Amino-3-oxobutanoate	L-Threonine	folA	gcvT	kbl	tdh
Dihydrofolate	Tetrahydrofolate	3-Methyl-2-oxobutanoate	Pyruvate	Ferricytochrome b1	folA	panB	avtA	Bxod
ADPglucose	D-Glucose 1-phosphate	Amylose	D-Glucose	alpha,alpha-Trehalose 6-phosphate	glgC	malP	ma/Q	treC
4-Aminobutanal	4-Aminobutanoate	L-Glutamate	N-Acetyl-L-glutamate	N-Acetyl-L-glutamate 5-phosphate	ydcW	gadB	argA	argB
4-Aminobutanal	4-Aminobutanoate	L-Glutamate	L-Cysteine	D-4-Phosphopantothenate	ydcW	gadB	gshA	dfp

otsB

treA

agp

rfbA

alpha,alpha-Trehalose 6-phosphate

alpha,alpha-Trehalose

D-Glucose

D-Glucose 1-phosphate

dTDPglucose

bioF

avtA

sdaA

cysE

6-Carboxyhexanoyl-CoA

L-Alanine

Pyruvate

L-Serine

O-Acetyl-L-serine

L-Serine

O-Acetyl-L-serine

L-Alanine

Pyruvate

YljR

avtA

sdaA

cysE

N-Acetylmuramate

(続き)
トワーク
含む部分ネッ
た遺伝子を多く
57
いて発現量が低下し
適応株におい
Table 7.

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に心より感謝申し上げます。

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