



Title	遊離アミノ酸および中間代謝物質の ¹³ C標識情報に基づく代謝フラックス解析に関する研究
Author(s)	森, 英詞
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26164
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

博士論文題名

遊離アミノ酸および中間代謝物質の
 ^{13}C 標識情報に基づく代謝フラックス解析に関する研究

学位申請者 森 英詞

以下本文記載

再生可能なバイオマス資源から、有用物質を生産する微生物発酵プロセスを実用化するには、微生物内部の代謝を改変し、生産性や生産収率を向上することが必要である。そこで、微生物内部の代謝状態を解析する手法として、代謝流量を測定する ^{13}C 代謝フラックス解析法が開発してきた。本法は ^{13}C 標識した炭素源で微生物を培養し、タンパク質中のアミノ酸に取り込まれた ^{13}C 標識濃縮度から、フラックス分布を推定する。しかし、タンパク質中アミノ酸の ^{13}C 標識が定常に達するまでに長時間要することから、本法は回分培養や流加培養など代謝状態が短時間で変化する系には適用できなかった。そこで、本研究では、代謝フラックスの経時的な変化を測定することを目指し、より標識時間が短い ^{13}C 代謝フラックス解析法の開発を行った。

本学位論文は第 1 章から第 4 章より構成される。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、遊離アミノ酸を利用した代謝フラックス解析法を開発した。タンパク質合成の原料となる遊離のアミノ酸には、 ^{13}C 標識がより速くとりこまれると考えられる。そこで、酸素利用量のみ変えた 3 条件下で、大腸菌を連続培養し、 ^{13}C 標識を開始後、経時的に菌体を回収し、タンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸サンプルを調製した。アミノ酸の ^{13}C 濃縮度は GC-MS を用いて測定した。その結果、最も好気条件で培養した大腸菌では、標識開始 1 時間後で ^{13}C 標識が定常に達していた。標識開始 1 時間後の遊離アミノ酸の ^{13}C 濃縮度のデータから推定したフラックス分布は、従来法（標識時間 25 時間）の結果と一致した。遊離アミノ酸を用いることで大幅に標識時間を短縮できた。第 3 章では、代謝フラックスの経時変化を連続的なスナップショットとして測定することを目的とした。そのために、より標識時間が短いと考えられる、中間代謝物質の ^{13}C 濃縮度を用いた代謝フラックス解析法を開発した。ホスホグルコース異性化酵素遺伝子の発現を IPTG によって誘導可能な大腸菌株を、連続培養し、途中で IPTG を培地から抜いた。経時的に菌体をサンプリングし、抽出した中間代謝産物の ^{13}C 濃縮度を CE-MS を用いて測定した。その結果、ホスホグルコース異性化酵素遺伝子の発現低下とともに代謝フラックスの経時的な変化を、30 時間にわたって 30 分間隔で測定することに成功した。また、第 4 章では実生産における発酵プロセスへの本法の適用可能性について議論した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (森英詞)		
論文審査担当者	(職)	氏名
	主査 教授	清水 浩
	副査 教授	松田 秀雄
	副査 教授	若宮 直紀
	副査 教授	四方 哲也
	副査 教授	前田 太郎
	副査 招へい教授	古澤 力

論文審査の結果の要旨

微生物の代謝反応を用いた生産プロセスにおいては、微生物内部の代謝を改変し、生産性や生産収率を向上することが重要である。微生物の代謝状態を解析する手法として、代謝物質の流量を測定する¹³C代謝フラックス解析法が開発されてきた。従来、¹³C標識した炭素源を用いて微生物を培養し、タンパク質中のアミノ酸に取り込まれた¹³C標識濃縮度から、代謝フラックス分布を推定する方法が用いられてきた。しかし、タンパク質中アミノ酸の¹³C標識濃縮度が定常に達するまでに長時間を要することから回分培養や流加培養など代謝状態が短時間で変化する系には適用できないという短所を有していた。本研究では、代謝フラックスの経時的な変化を測定することを目指し、より標識時間が短い遊離アミノ酸や中間代謝物質の¹³C標識濃縮度を計測することで適用範囲の広い¹³C代謝フラックス解析法の開発を行うことを目的としている。

本学位論文は第1章から第4章より構成されている。第1章では、本研究の背景と目的について記述している。第2章では、遊離アミノ酸を利用した代謝フラックス解析法を開発している。酸素利用量を変えた3条件下で、大腸菌の連続培養を行い、¹³C標識グルコースを流入開始後、経時的に菌体を回収し、タンパク質由来アミノ酸と遊離アミノ酸の¹³C標識濃縮度をガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）により測定している。その結果、最も好気的な条件で培養した大腸菌では、標識開始1時間後において¹³C標識濃縮度が定常に達していた。標識開始1時間後の遊離アミノ酸の¹³C標識濃縮度のデータから推定したフラックス分布は、従来法（標識時間25時間）の結果と一致することが見出されている。これにより、遊離アミノ酸を用いることで大幅に標識時間を短縮できることが実証されている。第3章では、代謝フラックスの経時変化を連続的なスナップショットとして測定することを目的としている。遊離アミノ酸より、さらに標識時間の短い中間代謝物質の¹³C標識濃縮度を用いた代謝フラックス解析法を開発している。IPTGによってホスホグルコース異性化酵素遺伝子の発現誘導が可能な大腸菌株を連続培養し、途中でIPTG濃度を希釀する連続培養系において、経時的に菌体をサンプリングし、抽出した中間代謝産物の¹³C標識濃縮度をキャピラリー電気泳動質量分析計（CE-MS）を用いて測定している。その結果、ホスホグルコース異性化酵素遺伝子の発現低下にともなう代謝フラックスの経時的な変化を、30時間にわたって30分間隔で決定することに成功している。第4章では発酵プロセスへの本法の適用可能性について議論している。

このように、本論文では、物質生産のための細胞の代謝フラックス解析において遊離アミノ酸や中間代謝物質を用いた方法についての開発を行い、その有用性について述べており、情報科学と生物工学の融合領域において重要な貢献をもたらすものである。よって、博士（情報科学）の学位論文として価値あるものと認める。